

Využitie NGS (next generation sequencing) v rutinnej diagnostike

Lucia Žideková¹, Ľubica Majerová¹, Michaela Patáková Zrubcová¹, Antónia Hatalová², Renata Lukačková¹

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava

Sekvenovanie novej generácie (*next generation sequencing*, NGS), tiež známe ako masívne paralelné sekvenovanie, umožňuje analýzu veľkého objemu dát v jednom teste. Viac ako 90 % sekvenačných dát je získaných princípom SBS (*sequencing by synthesis*) od firmy Illumina. Zaradenie myeloidného NGS panela medzi rutinné vyšetrenia bolo na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., najvýznamnejším míľnikom v diagnostike myeloproliferatívnych ochorení za rok 2018. Štandardným diagnostickým postupom bolo kaskádové vyšetrenie génov *JAK2*, *CALR* a *MPL*, pomocou ktorých možno odlíšiť pravú polycytémiu (*polycythemia vera*, PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF). Z dôvodu WHO reklasifikácie myeloproliferatívnych ochorení z roku 2016 bolo nevyhnutné rozšíriť panel vyšetrovaných génov pre správne zaradenie pacientov do špecifických skupín, monitorovanie liečebnej odpovede a zaradenie do transplantáčného procesu.

Kľúčové slová: NGS, myeloproliferatívne neoplázie, rutinná diagnostika

Application of NGS (next generation sequencing) in routine diagnostics

Next generation sequencing (NGS) also known as massive parallel sequencing is able to detect a large amount of data in a single assay. More than 90% sequence data is obtained from sequencing by synthesis (SBS) principle from Illumina. Including myeloid NGS panel into routine examination was the most significant diagnostic milestone for patients with myeloproliferative neoplasms on the department of medical genetics, Medirex, a. s. in 2018. Standard diagnostic procedure is cascade examination of *JAK2*, *CALR* and *MPL* genes to distinguish polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Due to new WHO reclassification of myeloproliferative diseases in 2016, it was necessary to extend the panel of examined genes for correct assessment of diagnosis, monitoring of treatment response and inclusion into transplantation process.

Keywords: NGS, myeloproliferative neoplasms, routine diagnostics

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 9 – 12

Úvod

Termín myeloproliferatívne neoplázie (MPN) označuje skupinu ochorení, ktorých patogenéza sa začína transformáciou pluripotentnej kmeňovej bunky. V transformovanej bunke dochádza k somatickým mutáciám, ktoré poskytujú selektívnu výhodu pre patologický klon, ktorý potláča fyziologickú hemopoézu. Dôsledkom tohto procesu dochádza aj k vývoju krvných elementov z jedného hematologického radu, ktorý výrazne prevyšuje ostatné⁽¹⁾. Základné rozdelenie MPN je založené na prítomnosti, resp. neprítomnosti Philadelphia (Ph) chromozómu. Medzi Ph pozitívne neoplázie patrí chronická myelocytová leukémia (CML) s prítomnosťou *BCR-ABL1* fúzie. Ph negatívne MPN zvyčajne nesú somatickú *driver* mutáciu v génoch *JAK2*, *CALR* alebo *MPL*, ktoré sú hlavnými diagnostickými markermi spolu s hematologickými a morfológickými abnormalitami. Transformácia ochorenia do myelodysplastického syndrómu (MDS) alebo sekundárnej akútnej myeloidnej leukémie (AML) je možná pri Ph+ a Ph– MPN⁽²⁾.

Ph negatívne MPN

Medzi Ph– MPN sú zaradené neoplázie bez *BCR-ABL1* fúzie. Táto skupina zahŕňa pravú polycytémiu (PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF). WHO klasifikácia MPN je založená najmä na morfológických

zmenách v kostnej dreni a počte krvných elementov v periférnej krvi. Trombocytóza je hlavným znakom pre ET, ale býva prítomná aj pri iných MPN. Erytrocytóza je diagnostickým znakom pre PV a leukocytóza sa vyskytuje u pacientov s pokročilým štádiom ochorenia. Pacienti s PMF majú často kombináciu prejavov, avšak v významnej časti sa vyskytuje najmä anémia. Na diferenciálnu diagnostiku uvedených ochorení sa v rutinnej praxi využíva detekcia somatických mutácií na molekulovej úrovni. Vo viac ako 95 % prípadov sú za vznik MPN zodpovedné *driver* mutácie v génoch *JAK2*, *CALR* a *MPL*⁽³⁾. Štandardným postupom pri určení diagnózy je detekcia mutácie *JAK2* (V617F) a v prípade negativity sa pokračuje detekciou mutácií *JAK2* v exóne 12 – 15. Pozitívny nález je v takomto prípade indikátorom PV. V prípade negatívneho výsledku pokračuje vyšetrenie analýzou génu *CALR*, v ktorom sa vyskytujú najmä *frame-shift* (FS) mutácie posledného exónu, čo má za následok vznik alternatívneho C-konca v peptide. Ak nie sú prítomné ani mutácie v géne *CALR*, vyšetrenie je v poslednom kroku zamerané na detekciu *MPL* (W515L/K). Prítomnosť somatických mutácií v génoch *CALR* a *MPL* je v priamej súvislosti s diagnózami ET a PMF, ktorých patogenéza postihuje megakaryocytovú líniu buniek. ET súvisí najmä s megakaryocytovou proliferáciou a PMF s diferenciáciou – myelodyspláziou⁽⁴⁾. Na základe poslednej WHO reklasifikácie myeloproliferatívnych neoplázií

z roku 2016 bolo nevyhnutné zahrnúť do rutinej molekulogenetickej diagnostiky ďalšie gény pre správne zaradenie pacientov do jednotlivých skupín, určenie liečebnej stratégie a prognózy, monitorovanie MRD (minimálna reziduálna choroba) a na posúdenie zaradenia do transplantáčného programu. Požadované gény zahŕňajú *ASXL1*, *IDH1/IDH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *TET2* a *EZH2*⁽⁵⁾. Vhodnou alternatívou simultánneho vyšetrenia viacerých génov, resp. vybraných exónov a hotspotových oblastí bolo zavedenie panelového NGS do rutinej diagnostiky myeloproliferatívnych neoplázií.

Next generation sequencing (NGS)

Najčastejšie využívaným postupom pri NGS je tzv. *sequencing by synthesis* (SBS) od firmy Illumina. Proces spočíva v tom, že počas cyklu DNA syntézy sú fluorescenčne značené dNTP inkorporované do templátového vlákna pomocou DNA polymerázy. V každom cykle je daný nukleotid identifikovaný prostredníctvom excitácie fluorofóru. Pred samotným sekvenovaním je potrebná príprava tzv. knižnice. Základným princípom prípravy knižnic je fragmentácia DNA, prípadne cDNA s následnou modifikáciou 3' a 5' koncov vlákien, na ktorých dochádza k ligácii adaptérov. K jednotlivým vzorkám sa počas prípravy pridáva unikátna kombinácia adaptérov, čo umožňuje multiplexovú analýzu (do 96 vzoriek). Fragmenty DNA s viazanými adaptérmi sú následne amplifikované pomocou PCR reakcie a prečistené podľa príslušného protokolu⁽⁶⁾. Na tvorbu klastrov je potrebná hybridizácia amplifikovaných knižnic na flow-cell. Na jej povrchu sa nachádzajú oligonukleotidy komplementárne k sekvenciám adaptérov. Po hybridizácii nastáva tvorba klastrov prostredníctvom mostíkovej amplifikácie, počas ktorej DNA polymeráza vytvorí komplementárne vlákno k templátu. Pôvodné vlákno je odmyté a ponechané je nové, reverzné. Na konci reverzného vlákna sa nachádza adaptérová sekvencia, pomocou ktorej sa nové vlákno prichytí na komplementárny oligonukleotid na povrchu flow-cell. DNA polymeráza tak vytvorí

nové komplementárne vlákno identické s pôvodným templátom. Vzniknutá dsDNA je denaturovaná, a tak sa môže samostatne každé vlákno opäť prichytiť adaptérom na príslušný oligonukleotid (**obrázok 1**). Uvedeným spôsobom vznikajú naraz vo vzorke tisíce klastrov, ktoré sú sekvenované v priebehu 2-3 dní. Prítomnosť konkrétnej bázy vo vlákne DNA je detegovaná pomocou štyroch reverzibilných terminátorov, ktoré sú značené fluoreescenčnými farbivami s rozdielnou emisiou. Sekvenátor (MiSeq System, Illumina) po každom cykle odfotí fluorescenčné signály na flow-cell a po ukončení analýzy poskladá výslednú sekvenciu⁽⁸⁾.

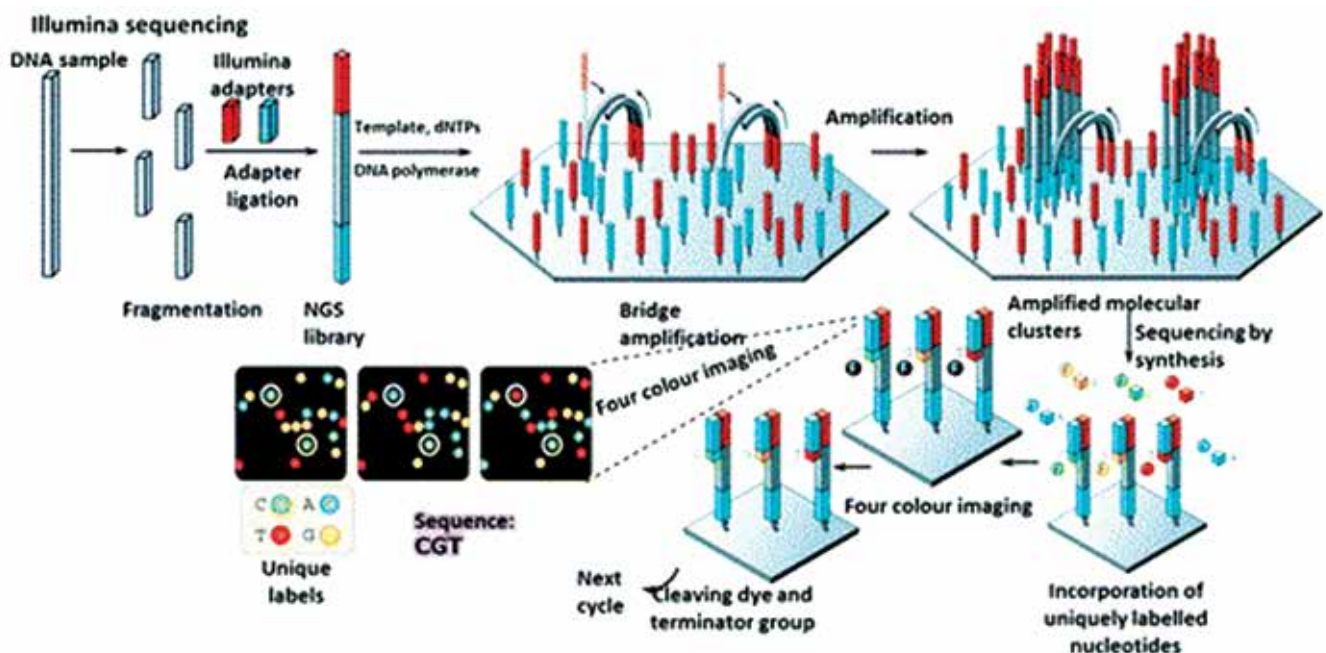
Súbor pacientov

V roku 2018 bolo do rutinej diagnostiky zavedené panelové sekvenovanie TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina. Do súboru bolo zatiaľ zaradených 56 pacientov. Použitým materiálom bola gDNA získaná izoláciou z plnej kostnej drene a periférnej krvi. Do vyšetrenia boli zahrnutí pacienti s diagnózou zo skupiny myeloproliferatívnych neoplázií. Najčastejšie išlo o pacientov nereagujúcich na liečbu s podozrením na prítomnosť mutácie v iných génoch, ako *JAK2*, *CALR* a *MPL*, u pacientov s ťažko definovateľnou diagnózou z dôvodu polyfenotypového prejavu ochorenia alebo v prípade predikcie úspešnosti transplantáčného procesu.

Materiál a metódy

Na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., bolo medzi rutinné vyšetrenia pacientov s MPN zavedené panelové sekvenovanie TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina. Uvedená metóda slúži na detekciu somatických variantov, ktorých výskyt je typický najmä pre akútnu myeloidnú leukémiu (AML), myelodysplastický syndróm (MDS), myeloproliferatívne neoplázie (MPN), chronickú myeloidnú leukémiu (CML), chronickú myelomonocytovú leukémiu (CMML) a juvenilnú myelomonocytovú leukémiu (JMML). Uvedený panel pokrýva 15 génov (exóny) a v 39 génoch zahŕňa hotspotové

Obrázok 1. Schéma mostíkovej amplifikácie⁽⁷⁾



oblasti (**tabuľka 1**). Okrem génov *JAK2*, *CALR* a *MPL* zahŕňa všetky ostatné gény potrebné na diagnostiku MPN podľa najnovšej WHO klasifikácie z roku 2016. Vstupným materiálom je gDNA s koncentráciou 50 ng na reakciu. Použitá bola chémia MiSeq Reagent Kit v3 v kombinácii s nano-flow-cell, čo umožňuje simultánnu analýzu 8 vzoriek. Veľkosť výsledných amplikónov je ~250 bp. Získané výsledky boli hodnotené v softvéroch Finalist Dx, Ingenuity a IGV. Do správy pre klinikov boli uvedené iba sekvenčné varianty s patogénnym a pravdepodobne patogénnym významom, s počtom čítaní aspoň 500x a alelovou frekvenciou nad 5 %.

Výsledky

Pacient 1.

46-ročná pacientka liečená od roku 2009 s diagnózou PV vo FNŠP F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici. V roku 2017 progresia ochorenia do sekundárnej myelofibrózy. V marci 2018 na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., bola panelovým NGS detegovaná prítomnosť sekvenčného variantu *JAK2* (V617F) s patogénnym významom a alelovou frekvenciou 50 %. V tom istom mesiaci bola prítomnosť uvedenej mutácie potvrdená metódou real-time PCR s 53 % zastúpením. V apríli 2018 bola pacientka zaradená do transplantáčného programu v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda v Bratislave. V tom čase bola kvantita mutovaného *JAK2* už 73 %. V júni 2018 bol prvýkrát vyšetrený chimérizmus po transplantácii. Hodnota pôvodnej autológnej krvotvorby klesla pod 2 % a *JAK2* (V617F) na 0,64 %.

Pacient 2.

49-ročný pacient bol v apríli 2018 odoslaný na genetické vyšetrenie do centrálného laboratória Medirex, a. s., s podozrením na CML. Výsledok analýzy *BCR-ABL1* zlomov bol bez nálezu. V tom istom mesiaci boli pomocou *FISH* vyšetrené gény *MLL*, *CRLF2*, *ABL2* a molekulovou MLPA analýzou gén *IKZF1*. Uvedené vyšetrenia mali negatívny výsledok. U pacienta bol zároveň vyšetrený vstupný panel pre AML, z ktorého pozitívny výsledok mala iba hodnota exprese *WT1* (NCN = 0,05). V máji 2018 bol u pacienta vyšetrený myeloidný NGS panel, pomocou ktorého bola detegovaná

prítomnosť sekvenčného variantu v géne *CSF3R* (T618I) s patogénnym významom. Alelová frekvencia bola 39 %. V septembri 2018 bolo realizované kontrolné NGS vyšetrenie, ktorým bola dokázaná stúpajúca hodnota mutovaného génu až na 48 %. Hladina exprese *WT1* génu mala tiež stúpajúci charakter. U pacienta je podozrenie na relaps.

Pacient 3.

47-ročný pacient liečený v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda s diagnózou PV. V roku 2018 prechod do sekundárnej myelofibrózy. V januári 2018 bol vyšetrený vstupný panel pre MPN. Pomocou real-time PCR bola detegovaná prítomnosť mutácie *JAK2* (V617F), kvantita 86 %. U pacienta bol následne vyšetrený myeloidný NGS panel, ktorý potvrdil prítomnosť sekvenčných variantov v génoch *DNMT3A* (R659C) s alelovou frekvenciou 40,2 % a *JAK2* (V617F) s alelovou frekvenciou 60,7 %. U pacienta je zvažovaná alogénna transplantácia.

Diskusia

WHO klasifikácia MPN ochorení z roku 2016 zahŕňa nové diagnostické entity podľa prítomnosti genetických variantov (mutácií) vybraných génov. Diagnostické kritériá boli rozšírené vďaka zavádzaniu nových citlivejších metód molekulovej diagnostiky a cielemu sekvenovaniu klinicky relevantných génov. Ďalšie mutácie v génoch, ktoré sa podieľajú na epigenetickej regulácii a signalizácii, zohrávajú kľúčovú úlohu v patogenéze MPN. Mutácie v epigenetických regulátoroch sú zapojené do iniciácie a progresie ochorenia. Cieľom práce bolo zavedenie panelového NGS do rutinej molekulovo-genetickej diagnostiky týchto ochorení. Na analýzu pacientov bol použitý TruSight Myeloid Sequencing Panel od firmy Illumina, ktorým možno analyzovať 54 génov v jednej reakcii. Pomocou uvedeného vyšetrenia sú zachytené aj mutácie s prediktívnym významom pre prognózu a prežívanie pacientov, ale aj na posúdenie úspešnosti transplantáčného procesu. Zavedenie panelového NGS má v rutinej diagnostike významné postavenie, pretože umožňuje aj detekciu takých mutácií, ktoré by pri bežnom vyšetřovacom algoritme vôbec neboli zachytené. Pri PMF sa v čase diagnózy vyskytujú iné mutácie ako v *JAK2*, *CALR* a *MPL* vo viac ako 50 %. Pri PV a ET sú ďalšie mutácie detegované približne v 10 % prípadov.

Tabuľka 1. Prehľad génov v TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina⁽⁹⁾

Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón
ABL	4-6	DNMT3A	celý	KDMT6A	celý	RAD21	celý
ASXL1	12	ETV6/TEL	celý	KIT	2, 8-11, 13, 17	RUNX1	celý
ATRX	8-10; 17-31	EZH2	celý	KRAS	2-3	SETBP1	4 (časť)
BCOR	celý	FBXW7	9-11	MLL	5-8	SF3B1	13-16
BCORL1	celý	FLT3	14, 15, 20	MPL	10	SMC1A	2, 11, 16, 17
BRAF	15	GATA1	2	MYD88	3-5	SMC3	10, 13, 19, 23, 25, 28
CALR	9	GATA2	2-6	NOTCH1	26-28, 34	SRSF2	1
CBL	8-9	GNAS	8-9	NPM1	12	STAG2	celý
CBLB	9-10	HRAS	2-3	NRAS	2-3	TET2	3-11
CBLC	9-11	IDH1	4	PDGFRA	12, 14, 18	TP53	2-11
CDKN2A	celý	IDH2	4	PHF6	celý	U2AF1	2, 6
CEBPA	celý	IKZF1	celý	PTEN	5, 7	WT1	7, 9
CSF3R	14-17	JAK2	12-14	PTPN11	3, 13	ZRSR2	celý
CUX1	celý	JAK3	13				

Mutácia v géne *TET2* sa pri PMF vyskytuje v 19 % a *ASXL1* až v 40 % prípadov. Obe sú pri MPN asociované so zlou prognózou⁽¹⁰⁾. Výskyt patogénnych variantov v génoch *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* a *IDH1/2* indikuje u pacientov výrazne skrátený čas prežívania. V prípadoch s dvomi a viac mutáciami je medián dožitia 2,6 roka, pri jednej mutácii 7 rokov a v prípadoch bez mutácií v uvedených génoch je medián prežívania 12,3 roka⁽¹¹⁾. Hlavnou výhodou NGS analýzy je simultánna analýza veľkého množstva DNA s vysokou citlivosťou v porovnaní s klasickým Sangerovým sekvenovaním. Sekvenovaním mnohých génov naraz možno vyšetriť aj viaceré diagnózy, čo značne skraca čas nasadenia vhodnej terapie. NGS analýzou je stanovená aj alelová frekvencia danej mutácie, čo slúži najmä na sledovanie účinku liečby a MRD (minimálna reziduálna choroba). Zatiaľ najväčšou nevýhodou všetkých NGS analýz je veľký objem získaných dát, ktoré musia byť okrem iného vyhodnotené so zreteľom na daný druh ochorenia a pô-

vod zachytenej mutácie (somatická vs germinálna). V neposlednom rade je pri hodnotení dát potrebné brať ohľad aj na etickú stránku a citlivosť získaných informácií o danom pacientovi v súvislosti s diagnózou.

Záver

Sekvenovanie novej generácie sa v rutinej diagnostike používa v čoraz vyššej miere a predstavuje významný nástroj na potvrdenie, resp. vylúčenie viacerých diagnóz v jednej analýze. Detekcia patogénnych variantov v daných génoch má diagnostický a prognostický význam u pacientov s myeloproliferatívnymi neopláziami. NGS vyšetrenie je tiež dôležité na stanovenie klonálneho charakteru ochorenia. Najväčšou výzvou do budúcnosti je zefektívnenie vyhodnotenia veľkého objemu získaných dát a zavedenie štandardného postupu na hodnotenie ich kvality.

LITERATÚRA

1. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood* 2017; 129(12): 1607-161.
2. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2017; 376: 2168-2181.
3. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classica myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129(6): 680-692.
4. Schalling M, Gleiss A, Gisslinger B, et al. Essential thrombocythemia vs. pre-fibrotic/early primary myelofibrosis: discrimination by laboratory and clinical data. *Blood Cancer J* 2017; 7(12): 643-647.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20): 2391-2405.
6. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364.
7. Chandran A. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies and Its Application in Chemical Biology. In: *Advancing Development of Synthetic Gene Regulators*. Springer These 2018.
8. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016; 107(1): 1-8.
9. <https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-myeloid.html#gene-list>
10. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *SF3B1*, *SUZ12*, and *TET2* in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 743-755.
11. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014; 28(9): 1804-1810.



Mgr. Lucia Žideková

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: lucia.zidekova@medirex.sk