

## Molekulové metódy detekcie mutácií v kinázovej doméne fúzneho génu *BCR-ABL1* u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou

Michaela Bezecná<sup>1</sup>, Ľubica Majerová<sup>2</sup>, Renata Lukačková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Zavedenie liečby inhibítormi tyrozínkinázy (TKI) u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou výrazne ovplyvnilo prognózu tohto ochorenia. Liečba použitím TKI znamená významný benefit, 25 – 35 % pacientov však potrebuje v priebehu 5 rokov zmenu liečby z dôvodu rezistencie alebo zlyhania liečby. Najčastejším mechanizmom zodpovedným za rezistenciu je rozvoj mutácií v kinázovej doméne. Za štandard pre skrining mutácií vo fúznom géne *BCR-ABL1* sa považuje Sangerovo sekvenovanie. V súčasnosti sa najviac pracuje na implementácii technológie sekvenovania novej generácie ako štandardného vyšetrovacieho postupu.

**Kľúčové slová:** mutácie v kinázovej doméne Abl1, Sangerovo sekvenovanie, sekvenovanie novej generácie NGS (next generation sequencing)

### *Molecular detection methods of mutations in the kinase domain of fusion gene bcr-abl1 in patients with chronic myelocyte leukemia*

The implementation of the treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with chronic myelocyte leukemia has significantly influenced the prognosis of the disease. TKI treatment is a significant benefit, but 25-35% of patients need to change treatment within 5 years due to resistance or treatment failure. The most common mechanism responsible for resistance is the development of mutations in the kinase domain. Sanger sequencing is considered the standard method for screening mutations in the *BCR-ABL1* fusion gene. Currently, most work is being done to implement the next-generation sequencing technology as a standard method.

**Keywords:** mutations in the Abl1 kinase domain, Sanger sequencing, next-generation sequencing (NGS)

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 37 – 40

### Úvod

Chronická myelocytová leukémia (CML) je klonálne myeloproliferatívne ochorenie, ktoré je výsledkom neobmedzenej expanzie buniek v kostnej dreni. Diferenciácia buniek sa zastavuje v štádiu blastov. Charakteristickým znakom CML je prítomnosť Philadelphia (Ph) chromozómu, ktorý vzniká recipročnou translokáciou medzi dlhými ramienkami chromozómov 9 a 22. Pri uvedenej translokácii t(9;22)(q34;q11) dochádza k fúzii génu *BCR* na chromozóme 22 s génom *ABL1* na chromozóme 9. Výsledkom je vznik patologického fúzneho génu *BCR-ABL1*<sup>(1)</sup>. Neliečená CML prebieha v troch fázach, ktoré určujú progresiu ochorenia počtom trombocytov a blastových buniek v krvi a kostnej dreni. Prvotné štádium CML predstavuje chronická fáza (*angl. chronic phase, CP*), v ktorej je diagnostikovaných až 90% pacientov. Počas CP nezrelé blastové bunky proliferujú a diferencujú pomaly, v dôsledku čoho môže CP pretrvávajúť mesiace až roky. Diagnóza CML sa stanoví hematologickým a cytogenetickým vyšetrením a následne sa začne liečba inhibítormi tyrozínkinázy (TKI). V prvej línii liečby v CP sa pacienti v podmienkach SR môže podávať buď imatinib, alebo nilotinib v závislosti od stratifikácie pacienta pri stanovení diagnózy. Agresívnejšou formou CML je akcelerovaná fáza (*angl. accelerated phase, AP*), pri ktorej dochádza k zvýšenej proliferácii blastových buniek v periférnej krvi a kostnej dreni. V AP sa u pacientov môžu vyskytnúť prídavné chromozómové aberácie ako

prítomnosť extra chromozómu 8 alebo izochromozómu 17q (pozostáva z dvoch dlhých ramienok 17. chromozómu), ktoré sú považované za marker progresie ochorenia. Bez liečby progreduje AP do fatálnej blastovej fázy (*angl. blastic phase, BP*). Táto fáza sa správa ako chemorezistentná akútna leukémia. Pacientom v BP sa odporúča transplantácia krvotvorných buniek, ktorej predchádza kombinovaná liečba intenzívnou chemoterapiou a TKI. Prognóza je však krajne nepriaznivá. Vzhľadom na limitovanú účinnosť liečby pacientov v BP, je prínosom včasný záchyt prídavných zmien u rizikových pacientov<sup>(2)</sup>.

### Éra tyrozínkinázových inhibítorov

Spočiatku bola liečba CML založená na podávaní perorálnej chemoterapie v podobe cytotoxických látok ako busulfán alebo hydroxyurea. U väčšiny liečených pacientov však nedosiahla dostatočnú liečebnú odpoveď a takmer všetci pacienti progredovali do AP a BP. Od roku 1981 sa na liečbu CML začal používať interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ). Ukázalo sa, že IFN- $\alpha$  má priamy antiproliferačný účinok a inhibuje patologickú sebaobnovu myeloidných progenitorov. Štandardnou liečebnou metódou pre pacientov v CP a AP bola transplantácia krvotvorných buniek, ktorá však bola zaťažovaná rizikom vysokej morbidita a mortality (napr. reakcia štepu proti hostiteľovi, GvHD). Vývoj malej molekuly imatinibmesylátu – tyrozínkinázového inhibítora spôsobil v roku 2000 revolúciu v liečbe

CML. Bolo dokázané, že TKI silne interferujú s interakciou medzi proteínom Bcr-Abl1 a adenosíntrifosfátom (ATP). TKI sa viaže v blízkosti väzobného miesta ATP, a tým sa stabilizuje tyrozínkináza v inaktívnej konformácii. Inhibíciou tohto procesu sa zastaví aktivácia signálnych dráh, ktoré podporujú leukemický fenotyp bunky. Tyrozínkinázy sú dôležitými mediátormi signálnej kaskády vo fyziologických bunkách. Určujú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch, ako je proliferácia, diferenciácia, metabolizmus a apoptóza. Deregulovaná aktivita tyrozínkinázy je základom pre patogenézu ľudských onkologických ochorení.

Imatinib predstavuje TKI prvej generácie. Medzi TKI 2. generácie patrí bosutinib, dasatinib a nilotinib. Ponatinib je TKI 3. generácie. Cieľená terapia vo forme selektívnych TKI významne zlepšila prognózu, predĺžila celkové prežívanie aj kvalitu života pacientov s CML<sup>(3)</sup>.

## Rezistencia proti TKI

Za chemorezistenciu nádorových buniek je zodpovedný celý rad bunkových mechanizmov. Rozoznávame dve kategórie rezistencie proti liečbe imatinibom, resp. TKI všeobecne – primárnu a sekundárnu. Ak nie je zaznamenaná odpoveď po iniciálnej liečbe, hovoríme o primárnej rezistencii. V prípade, keď momentu vzniku rezistencie predchádza liečebná odpoveď, ide o sekundárnu rezistenciu. Primárna rezistencia (vnútorná) sa vzťahuje na mechanizmy prítomné v bunke skôr, ako boli vystavené inhibítoru TK. Sekundárna rezistencia (získaná) je reprezentovaná farmakologickými parametrami, ktoré ovplyvňujú účinnosť liečiv molekulárnymi zmenami. Pri sekundárnej rezistencii dochádza k strate liečebnej odpovede. Bolo dokázané, že nádorové mikroprostredie prispieva k vnútornej, ale aj získanej rezistencii proti liečivám. Na mechanickej úrovni klasifikujeme rezistenciu proti TKI ako nezávislú od Bcr-Abl1 alebo závislú od Bcr-Abl1. Závislá rezistencia zahŕňa mechanizmy, najčastejšie bodové mutácie, ktoré sú priamo závislé od kinázy Bcr-Abl1. Rezistencia nezávislá od Bcr-Abl1 je sprostredkovaná rôznymi alternatívnymi signálnymi dráhami v nádorových bunkách. Klinická rezistencia je pozorovaná prostredníctvom oboch mechanizmov, pričom získaná rezistencia je pravdepodobnejšie závislá od Bcr-Abl1. Primárna rezistencia má tendenciu byť nezávislá od Bcr-Abl1. Rezistencia proti TKI je spojená s nepriaznivými klinickými výsledkami<sup>(4)</sup>.

## Sekundárna rezistencia

Mutácie v kinázovej doméne *BCR-ABL1* génu sú najčastejšou príčinou sekundárnej rezistencie proti liečbe TKI. Bolo opísaných viac ako 100 mutácií v Abl1 tyrozínkinázovej doméne. Najznámejšou mutáciou u rezistentných pacientov je c.944C > T vedúca k zámene aminokyselín treonínu za izoleucín v pozícii 315 proteínu Bcr-Abl1 (p. T315I), ktorá spôsobuje posun Abl1 kinázy k aktívnej konformácii. Naopak, mnohé bodové „missense“ mutácie Abl1 kinázovej domény pravdepodobne nemajú príčinnú súvislosť so vznikom rezistencie, v niektorých prípadoch môže byť takáto mutácia prítomná aj pri dostatočnej odpovedi na liečbu. Preto interpretácia kauzálnej súvislosti rezistencie a mutácie musí vychádzať z klinického stavu a aktuálnych laboratórnych výsledkov monitorovania.

Bodové mutácie v kinázovej doméne *BCR-ABL1* génu možno detegovať pomocou viacerých metód s rôznou úrovňou senzitivity aj časovej a manuálnej náročnosti. V bežnej laboratórnej praxi je najpoužívanejšou metódou priame sekvenovanie Abl1 kinázovej domény (senzitivita 10 – 20%), alelovo špecifická PCR (ASO-PCR – allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction, senzitivita 0,01 – 0,1%) a NGS sekvenovanie (sekvenovanie novej generácie, senzitivita 1%).

## Možnosti detekcie prítomnosti mutácií pomocou molekulových metód

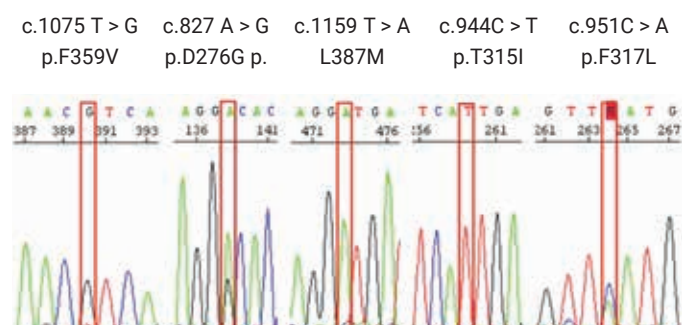
### Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie je najrozšírenejšia metóda pri rutinnom monitorovaní pacientov, ale má obmedzenú citlivosť detekcie 15 – 20%. Pred samotným Sangerovým sekvenovaním musí prebehnúť amplifikácia fúzneho génu *BCR-ABL1* pomocou nested polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V prvom kroku nested PCR sa amplifikuje celá kinázová doména fúzneho génu *BCR-ABL1*. V druhom kroku nested PCR dochádza k amplifikácii fragmentu Abl1 kinázy. Produkty PCR sa analyzujú sekvenovaním. Princípom Sangerovho sekvenovania je syntéza nového reťazca DNA pomocou DNA polymerázy a inkorporácia terminačného dideoxynukleozidtrifosfátu (ddNTP). Termináciou syntézy vznikajú rôzne dlhé DNA fragmenty, ktoré sú zakončené konkrétnym ddNTP. Po skončení sekvenovania prebehne elektroforetická separácia vzniknutých DNA fragmentov na základe ich veľkosti (**obrázok 1**). Výsledné sekvencie sa porovnávajú s referenčnou sekvenciou zdravého jedinca. Reakčná zmes Sangerovho sekvenovania musí obsahovať templátovú (vyšetrovanú) DNA, DNA polymerázu, dNTP, ddNTP, špecifický primer a reakčný pufor.

### Alelovošpecifická PCR

Alelovošpecifická PCR (AS-PCR) poskytuje informáciu o prítomnosti alebo neprítomnosti mutácie na jednej alele génu. Na stanovenie genotypu je nutné, aby prebehli dve PCR reakcie, jedna slúži len na amplifikáciu alely bez mutácie, druhá reakcia je špecifická pre mutantnú alelu (**obrázok 2**). Príslušné PCR primery sú sekvenčne identické, odlišujú sa len v nukleotide na 3' konci, čím sa zabezpečí preferenčná amplifikácia jednej alely pred druhou. Na vylúčenie nesprávnej genotypizácie v dôsledku zlyhania PCR sa do každej z reakcií

**Obrázok 1.** Sekvenogramy mutácií detegovaných na oddelení genetiky, Medirex

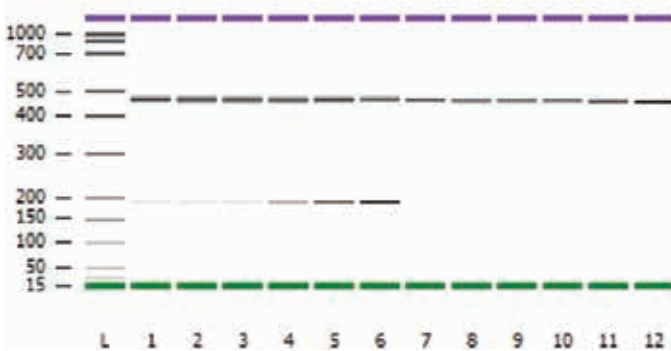


pridáva ďalší pár alelovonespecifických primerov pre amplifikáciu kontrolného fragmentu. AS-PCR ponúka výhody v podobe rýchlejších výsledkov analýzy, nižších nákladov a ľahšieho pracovného protokolu. Jej detekčný limit je 0,5 – 1% mutovanej alely<sup>(5)</sup>. Nevýhodou metódy je, že je schopná detegovať len konkrétnu mutáciu.

**NGS – sekvenovanie novej generácie**

NGS (sekvenovanie novej generácie) umožňuje detegovať a kvantifikovať variant v Bcr-Abl1 transkriptoch až na úrovni 1%. NGS pozostáva z troch krokov. V prvom kroku dochádza

**Obrázok 2.** AS-PCR: Detekcia prítomnosti mutácie T315I pomocou AS-PCR. Dráha 1 – 6: prítomnosť mutácie T315I (veľkosť asi 200 bp) a kontrolného fragmentu (veľkosť asi 500 bp), dráha 7 – 12: prítomnosť len kontrolného fragmentu (veľkosť asi 500 bp), bez detekcie mutácie T315I.

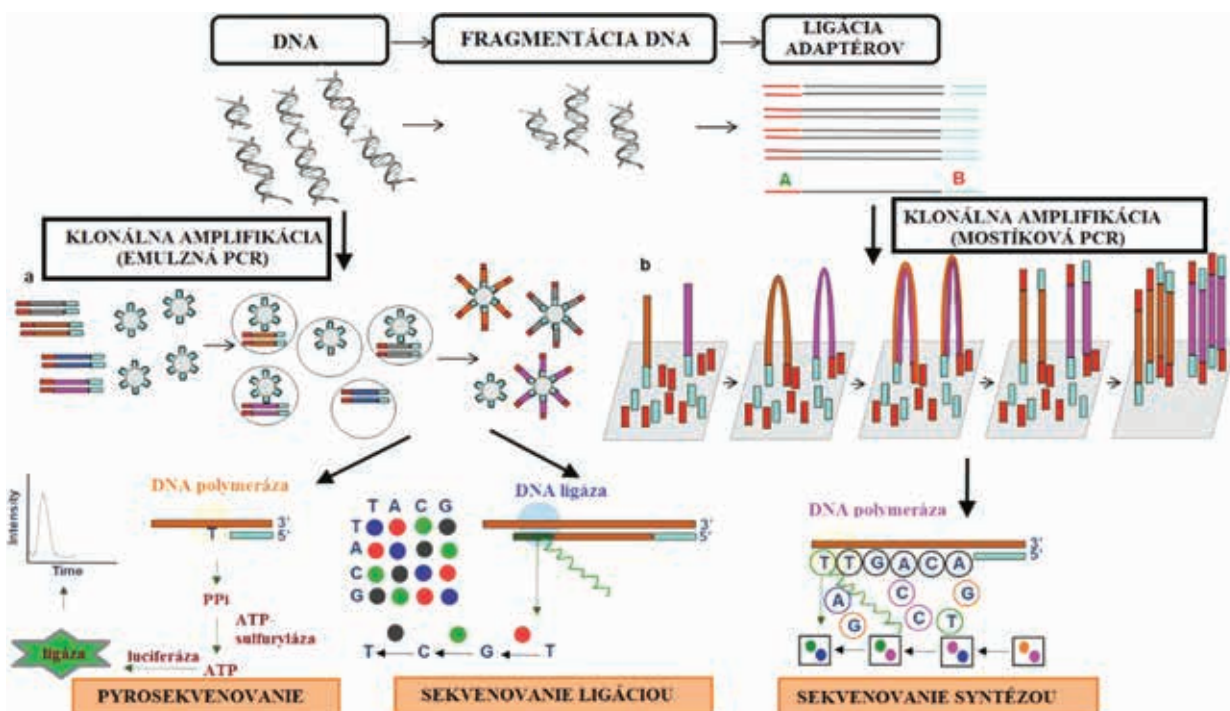


k vytvoreniu sekvenačnej knižnice fragmentáciou genomickej DNA. V druhom kroku sa sekvenačná knižnica amplifikuje. V treťom kroku dochádza k masívnemu paralelnému sekvenovaniu každej jednej molekuly DNA v špeciálnom sekvenátore (**obrázok 3**). Presnosť NGS metódy závisí od počtu čítaní každého fragmentu DNA. U pacientov so zlyhaním na liečbe TKI sa môžu vyskytnúť mutácie pod detekčným limitom Sangerovho sekvenovania, ktoré sa rutinne využíva vo väčšine laboratórií. NGS metóda môže byť užitočná u pacientov, ktorí nezlepšujú svoje odpovede na terapiu druhou, resp. treťou líniou TKI. U pacientov v AP a BC je často detegovaných viac mutácií, keď metóda NGS môže poskytnúť jednoduchý spôsob identifikácie viacerých mutácií u jedného pacienta<sup>(6)</sup>.

**Záver**

Cielená liečba pomocou TKI výrazne zlepšila prognózu aj kvalitu života pacientov s CML. Problémom terapie však zostáva rezistencia, preto je potrebné poznať biologickú podstatu rezistencie a prispôbiť jej liečebnú stratégiu. Potvrdenie mutácie v kinázovej doméne ako príčiny rezistencie má veľký klinický význam, pretože umožňuje včas ovplyvniť neefektívnu terapiu. Podľa typu zistenej mutácie dochádza k zvýšeniu dávky podávaného liečiva alebo k zmene liečby. V prípade rezistencie proti imatinibu možnosť úspešnej terapie prinášajú TKI 2. generácie, resp. 3. generácie, niektoré z nich už v súčasnosti zastávajú miesto aj v prvolínievej liečbe CML. V ojedinelých prípadoch do úvahy prichádza aj alogénna transplantácia krvotvorných buniek. Úlohou molekulovej genetiky je presná a rýchla detekcia mutácií aj ďalšie monitorovanie vývoja mutovaného leukemického klonu.

**Obrázok 3.** Princíp NGS sekvenovania (upravené podľa Arora, 2019)<sup>(7)</sup>. Základom NGS sekvenovania je chemická reakcia (DNA syntéza alebo ligácia). Signál z chemických reakcií je následne transformovaný do sekvenačných dát. Dáta sú analyzované pomocou viacerých softvérov, napr. Finalist Dx, Ingenuity a IGV.



### LITERATÚRA

1. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes J E. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clinic Proceedings* 2015; 90(10): 1440-1454.
2. Gong Z, Medeiros L.J., Cortes, JE, et al. Cytogenetics-based risk prediction of blastic transformation of chronic myeloid leukemia in the era of TKI therapy. *Blood Advances* 2017; 1(26): 2541-2552.
3. Jabbour E. Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. *American Journal of Hematology* 2015; 91(1): 59-66.
4. Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting BCR-ABL Drug Resistance Mutations in Chronic Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11: 4-11.
5. Kockan B, Toptas T, Atikündüz Tuglular AT, et al. Molecular screening and the clinical impacts of BCR-ABL KD mutations in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Oncology Letters* 2018; 15(2): 2419-2424.
6. Soverini S, Abruzzese E, Bocchia M, et al. Next-generation sequencing for BCR-ABL1 kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: a position paper. *Journal of Hematology & Oncology* 2019; 12: 131.
7. Arora PM. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Microbial Technology for the Welfare of Society* 2019; (313-341), ISBN 978-981-13-8843-9.

**Bc. Michaela Bezecná**

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4  
e-mail: bezecnamiska@gmail.com