Etablierung des *IDH2*-R140Q-Assays auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System von Thermo Fisher Scientific

Nadine Dardel, BMA 22-25

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Kantonsspital Aarau (KSA), medizinische Genetik



Abb. 1 QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System, Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2023)

1. Zusammenfassung

Die R140Q-Mutation im *IDH2*-Gen ist ein molekularer Marker bei hämatologischen Neoplasien wie AML, MDS und Glioblastomen. Bisher stand der medizinischen Genetik am Kantonsspital Aarau (KSA) keine validierte Methode zur Detektion der *IDH2*-R140Q-Mutation zur Verfügung. Ziel dieser Diplomarbeit war die Etablierung des *IDH2*-R140Q-Assays auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ digital PCR System (dPCR) von Thermo Fisher Scientific. Dazu wurden 26 DNA-Proben aus EDTA-Vollblut (PB) oder EDTA-Knochenmark (KM) extrahiert und analysiert. Die Ergebnisse wurden mit Daten der digital droplet PCR (ddPCR) des Universitätsspitals Basel (USB) verglichen und validiert. Das Assay erreichte eine Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) von 0.05 % und eine Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) von 1 %. Sensitivität und Spezifität lagen bei 100 %. Auch Proben mit niedriger Mutationsallelfrequenz (%MAF) wurden zuverlässig detektiert. Die hohe Reproduzierbarkeit wurde durch Intra- und Inter-Runs bestätigt. Das Assay erfüllt alle diagnostischen Anforderungen und ermöglicht schnellere Ergebnisse, was eine rasche Diagnosestellung und Therapieeinleitung ermöglicht. Zudem werden durch den Wegfall des externen Probenversands Zeit und Kosten eingespart. Das Assay ist inzwischen erfolgreich in die Routinediagnostik am KSA integriert.

2. Einleitung

Das *IDH2*-Gen (Isocitrat-Dehydrogenase 2), lokalisiert auf Chromosom 15 (15q26.1), kodiert ein mitochondriales Enzym des Citratzyklus, das Isocitrat zu α-Ketoglutarat umwandelt. Die R140Q-Mutation (c.419G>A im Exon 4) führt zum Austausch von Arginin durch Glutamin an Position 140. Dadurch entsteht die Fähigkeit, α-Ketoglutarat in den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat (2HG) umzuwandeln. 2HG hemmt α-Ketoglutarat-abhängige Enzyme wie DNA- und Histon-Demethylasen, was zu epigenetischen Veränderungen, Hemmung der Zelldifferenzierung und Tumorentstehung führt. Die Mutation ist besonders relevant bei AML, MDS und Glioblastomen und stellt einen wichtigen diagnostischen und therapeutischen Marker dar. [1] Die dPCR ist eine Technologie zur absoluten Quantifizierung von Nukleinsäuren und erfordert keine Standardkurve. Sie ist besonders geeignet für die Überwachung somatischer Mutationen bei niedrigen Target-Konzentrationen. Das Prinzip basiert auf der Aufteilung der Hauptreaktion in tausende kleine, unabhängige Reaktionen in einer Mikrowellplatte. Ein Beispiel ist das QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System von Thermo Fisher Scientific mit Mikrofluidik-Array-Platten (MAP)-Technologie. [2]

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel: Etablierung des *IDH2*-R140Q-Assays in der medizinischen Genetik am KSA, Überprüfung der Routinetauglichkeit hinsichtlich Sensitivität- und Spezifität sowie Evaluation der Zuverlässigkeit der Ergebnisse in verschiedenen unabhängigen Versuchsansätzen.

Fragestellung: 1. Kann eine Nachweisgrenze (LOD) von 0.05 % und eine Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 1 % erreicht werden?

Referenzen

[1] Andersson, A. K., Miller, D. W., Lynch, J. A., Lemoff, A. S., Cai, Z., Pounds, S. B., Radtke, I., Yan, B., Schuetz, J. D., Rubnitz, J. E., Ribeiro, R. C., Raimondi, S. C., Zhang, J., Mullighan, C. G., Shurtleff, S. A., Schulman, B. A. & Downing, J. R. (2011). *IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia.* Leukemia, *25*(10), 1570–1577. https://doi.org/10.1038/leu.2011.133

[2] Thermo Fisher Scientific. (2022). Introduction to Digital PCR (dPCR): *The fundamentals QuantStudio Absolute QTM Instrument SmartStart Orientation* [Internes Dokument, Schulungsunterlagen].

Abbildungen

Abb. 1 Thermo Fisher Scientific. (2023). *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System: Installation, use, and maintenance*

Tabellen

Tab. 1 Dardel, N. (2025). *Ergebnisse dPCR-Run 1.* medi.

Tab. 2 Dardel, N. (2025). *Ergebnisse dPCR-Run 8, experimenteller Verdünnungsansatz 1:3.* medi.

4. Material, Methodik, Vorgehen

Es wurden 26 DNA-Proben aus EDTA-PB oder EDTA-KM eines männlichen AML-Patienten untersucht, bei dem 2022 eine *IDH2*-R140Q-Mutation mittels Next-Generation Sequencing (NGS) nachgewiesen wurde. Die DNA wurde mit dem Maxwell® RSC-System extrahiert und auf 60 ng/µl verdünnt. Alle Proben waren zuvor am USB mittels ddPCR analysiert worden; die Ergebnisse lagen zum Vergleich vor. Zur Etablierung des *IDH2*-R140Q-Assays auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System wurden zunächst Wildtyp-Runs (WT) zur Optimierung der PCR-Bedingungen und Festlegung des Thresholds durchgeführt. Danach erfolgte die Analyse der 26 Patientenproben in sieben Runs mit biologischen Duplikaten sowie eines WT und einer No Template Control (NTC). Es wurde ein Mastermix (MM) für jeweils 16 Reaktionen vorbereitet, anschliessend erfolgte die Zugabe der DNA. Der Reaktionsmix wurde in die Mikrofluidik-Array-Platte (MAP16) pipettiert, mit Isolations-Buffer überlagert, versiegelt und bei 60 °C, 40 Zyklen amplifiziert. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Intra- und Inter-Runs überprüft. Da keine Probe mit einer %MAF von 0.05 % vorlag, wurde ein experimenteller Verdünnungsansatz (1:3) zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) von 0.05% durchgeführt.

5. Ergebnisse/ Resultate

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse des dPCR-Run 1. Alle im Run 1 gemessenen Proben wurden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des USB als positiv erkannt.

Tabelle 1 Ergebnisse dPCR-Run 1 (Dardel, 2025)

Run	Intra-Run	Inter-Run	Probe Nr.	Mittelwert FAM™ (WT) Punkte	Mittelwert VIC™ (Mutation) Punkte	Mittelwert % MAF	Resultat	% MAF USB	Resultat USB	Bewertung
1			1	9292	17	0.14	Pos.	0.27	Pos.	OK
			2	9722	18	0.13	Pos.	0.27	Pos.	OK
			3	9221	26	0.22	Pos.	0.28	Pos.	OK
	X		3	8782	22	0.19	Pos.	0.28	Pos.	OK
			4	8446	20	0.19	Pos.	0.41	Pos.	OK
			5	8584	31	0.28	Pos.	0.3	Pos.	OK
			6	8845	20	0.17	Pos.	0.5	Pos.	OK

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des dPCR-Run 8. Hier wurde ein experimenteller Verdünnungsansatz (1:3) zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) von 0.05 % durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Nachweisgrenze von 0.05 % erreicht wird. Werte < 0.05 % können nicht mehr zuverlässig nachgewiesen werden.

Tabelle 2 Ergebnisse dPCR-Run 8, experimenteller Verdünnungsansatz 1:3 (Dardel, 2025)

Run	Intra-Run	Inter-Run	Probe Nr.	Mittelwert FAM™ (WT) Punkte	Mittelwert VIC™ (Mutation) Punkte	Mittelwert % MAF	Resultat	% MAF USB	Resultat USB	Bemerkung	Bewertung
8			1	15588	2	0.01 0.047	Neg.	0.27	Pos.	< 0.05	< Nachweisgrenze
			2	14039	2	0.01 0.043	Neg.	0.27	Pos.	< 0.05	< Nachweisgrenze
			3	14182	3	0.01 0.073	Pos.	0.28	Pos.		OK
			4	13902	6	0.03 0.063	Pos.	0.41	Pos.		OK
			5	13132	4	0.02 0.093	Pos.	0.3	Pos.		OK
			6	13814	4	0.02 0.057	Pos.	0.5	Pos.		OK
	x		3	14449	4	0.02 0.063	Pos.	0.28	Pos.		OK

6. Diskussion

Die Nachweisgrenze (LOD) von 0.05 % und die Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 1 % wurden erfolgreich erreicht. Die Methode zeigt eine hohe Empfindlichkeit und ermöglicht eine zuverlässige Quantifizierung, auch bei sehr niedrigen %MAF. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Intra- und Inter-Runs bestätigt. Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze < 0.05 % liegen ausserhalb des validierten Messbereichs und können nicht zuverlässig detektiert werden. Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze < 1 % werden als nicht quantifizierbar, jedoch als nachweisbar bewertet und befundet. Da die dPCR mit einem Auskorrigierungsfaktor arbeitet, liefert sie systematisch niedrigere Werte als die ddPCR ohne Korrektur, weshalb ein direkter Methodenvergleich nicht möglich ist. Insgesamt zeigt das Assay, dass die *IDH2*-R140Q-Mutation zuverlässig nachgewiesen und quantifiziert werden kann und für die Routinediagnostik geeignet ist.