

Moleculaire pathologie - basisprincipes -

K Zwaenepoel – P Pauwels

UZA'

Moleculaire pathologie - basisprincipes

Verschillende technieken

- FISH
- IHC
- PCR: real-time
- dideoxy sequencing – massive parallel sequencing (= NGS)

Verschillende genetische afwijkingen

- puntmutaties
- translocaties
- gen amplificatie

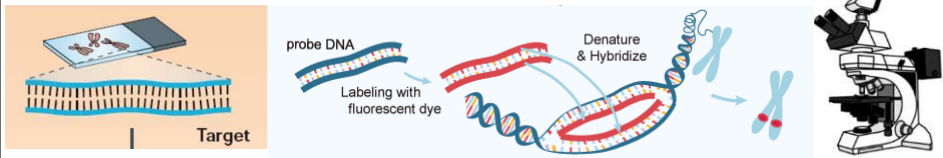
Rapportering in het moleculaire pathologie rapport

Kennis / Ervaring / Zorg


UZA'

FISH / fluorescente *in situ* hybridysatie

- binding van fluorescent gelabelde DNA probes (gemiddeld 100 000 – 500 000 base groot) aan specifieke genen
 - niet geschikt om mutaties thv 1-10 nlt te detecteren
 - + geschikt om grote genafwijkingen (gen amplificatie, translocatie) op te sporen
- op weefselsnedes → histologische test
 - + Onder microscoop kan je histologisch de correcte tumorcellen selecteren , dus geen achtergrond van normale cellen
 - Fluorescentie microscoop nodig, ervaring in herkennen van tumorcellen nodig

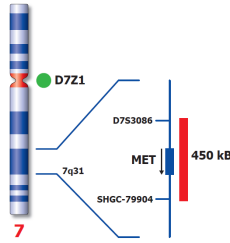


VB: MET gen amplificatie in NSCLC ; ALK translocatie in NSCLC



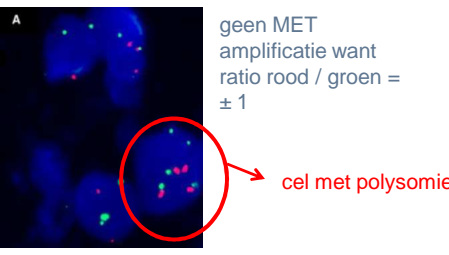
FISH / fluorescente *in situ* hybridysatie

MET gen amplificatie in NSCLC



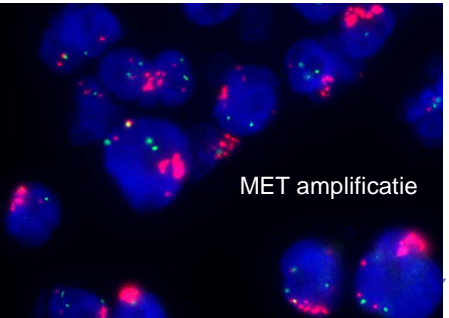
Rode probe detecteert MET gen
Groene probe detecteert centromeer van chrom7

Normale cel: 2 rode en 2 groene signalen



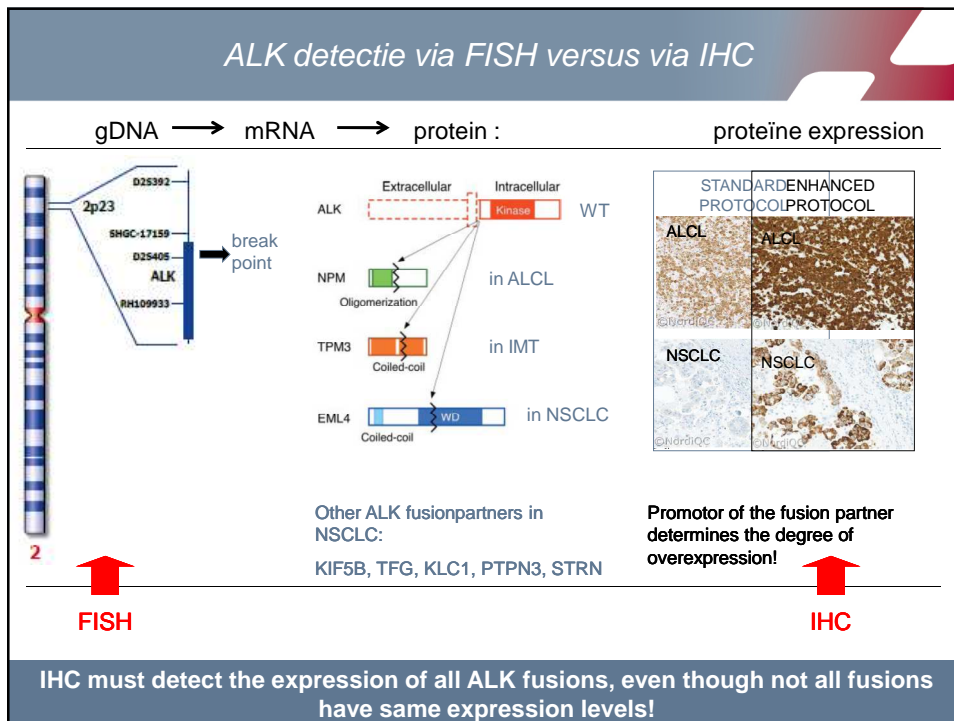
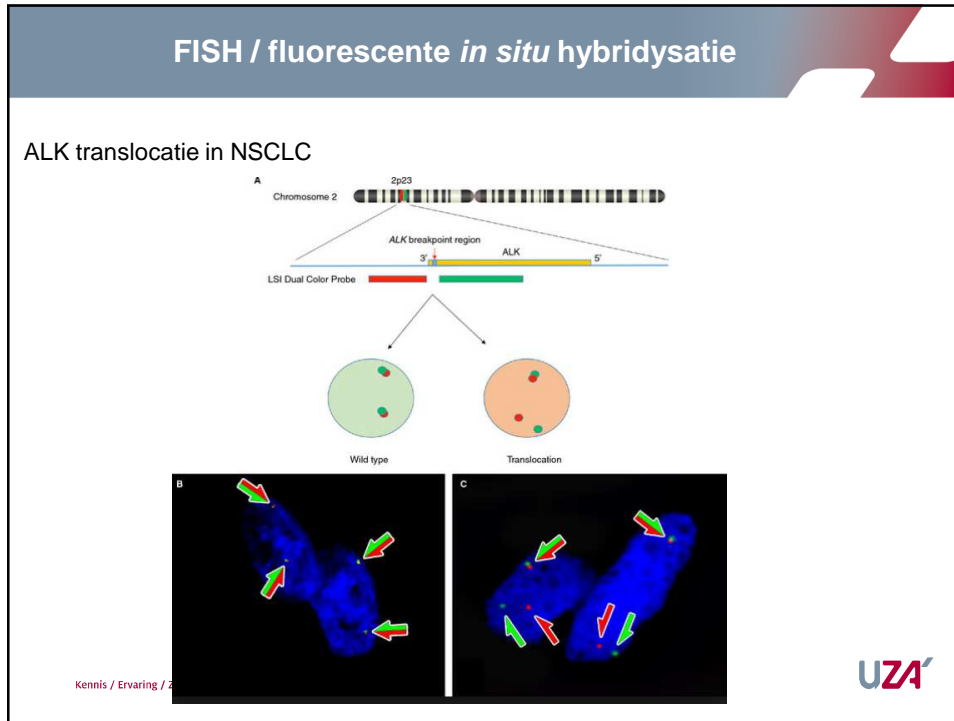
geen MET amplificatie want ratio rood / groen = ± 1

cel met polysomie



MET amplificatie

Kennis / Ervaring / Zorg



Real Time polymerase ketting reactie / PCR

STAP 1: Isolatie van genomisch DNA uit het weefsel

- Niet histologische, in een achtergrond niet-tumoraal DNA
- gDNA uit FFPE is zeer gefragmenteerd (max 150 baseparen lang)

lysbuffer → Scrape tissue and solution into microcentrifuge tube → Enkele opzuiveringsstappen → PCR-ready DNA

UZA'

Real Time polymerase ketting reactie / PCR

STAP 1: Isolatie van genomisch DNA uit het weefsel

- Niet histologische, in een achtergrond niet-tumoraal DNA
- gDNA uit FFPE is zeer gefragmenteerd (max 150 baseparen lang)

STAP 2+3: amplificatie + detectie van een targetsequentie van het genomisch DNA

template DNA → 1st cycle → 2nd cycle → 3rd cycle → 4th cycle → ... → 35th cycle

$2^2 = 4$ copies $2^3 = 8$ copies $2^4 = 16$ copies $2^5 = 32$ copies $2^{36} = 68$ billion copies

Exponential amplification

- + zeer gevoelige techniek
- contaminatiegevaar : 1 streng contaminatie kan 2 miljoen strengen worden

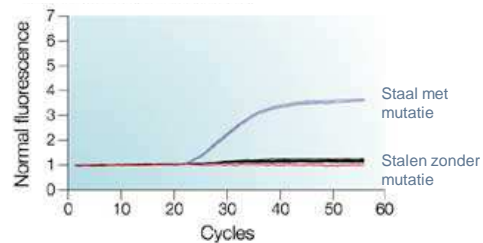
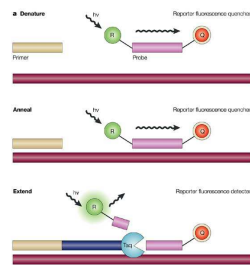
UZA'

Real-Time polymerase ketting reactie / PCR

STAP 1: Isolatie van genomisch DNA uit het weefsel

- Niet histologische, in een achtergrond niet-tumoraal DNA
- gDNA uit FFPE is zeer gefragmenteerd (max 150 baseparen lang)

STAP 2+3: amplificatie + detectie van een targetsequentie van het genomisch DNA



- + zeer gevoelige techniek
- Contaminatiegevaar : 1 streng contaminatie kan 2 miljoen strengen worden
- + zeer geschikt voor 1-10 basepaar veranderingen

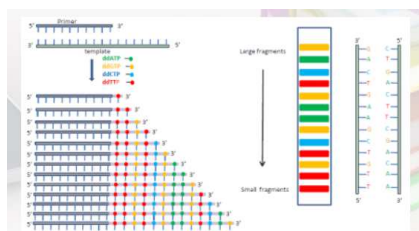
UZA'

PCR + sanger sequensing

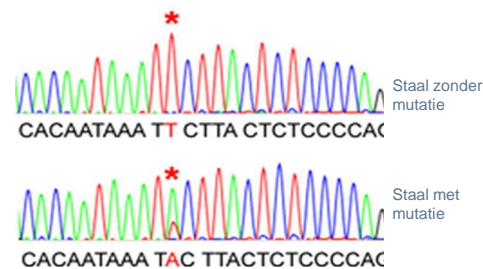
STAP 1: Isolatie van genomisch DNA uit het weefsel

- Niet histologische, in een achtergrond niet-tumoraal DNA
- gDNA uit FFPE is zeer gefragmenteerd (max 150 baseparen lang)

STAP 2+3: amplificatie → detectie van een targetsequentie van het genomisch DNA

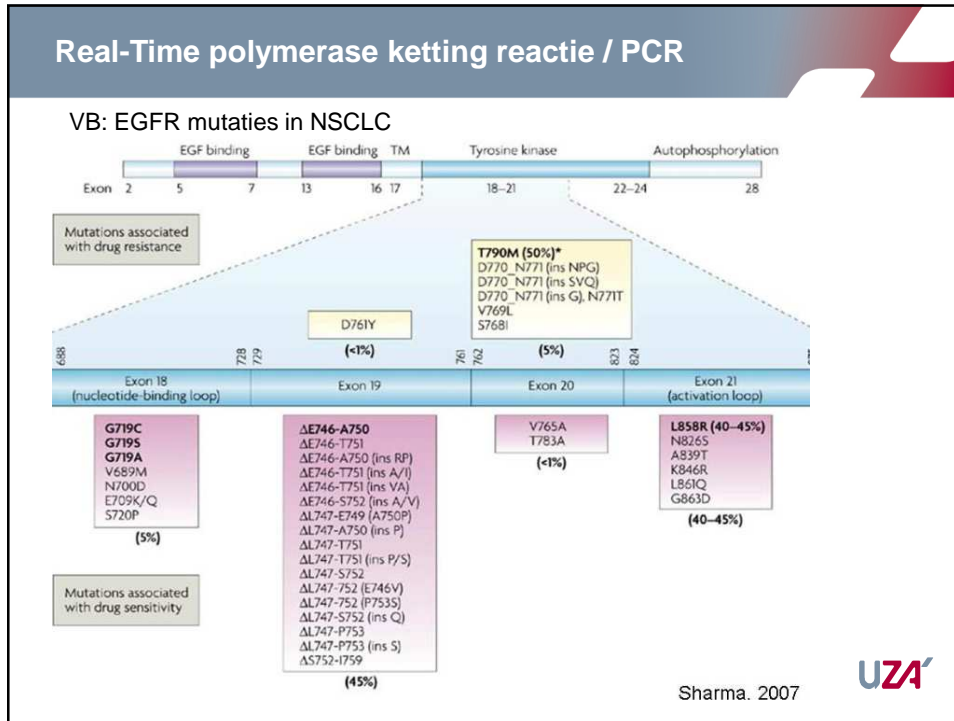


CACAATAAATACTTACTCTCCCCAG



- + gevoelige techniek
- contaminatiegevaar : 1 streng contaminatie kan 2 miljoen strengen worden
- + zeer geschikt voor 1-10 basepaar veranderingen

UZA'



Real-Time polymerase ketting reactie / PCR

VB: EGFR mutaties in NSCLC (exon 18, ex19, ex 20, ex21)
 exon 14 skipping van cMET gen door mutaties thv intron 14 en 15
 KRAS mutaties in NSCLC
 BRAF mutaties in NSCLC
 ALK mutaties (tgv ALK TKI therapy)
 ...

[Cancer Discov. 2015 Aug.5\(8\):842-9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1467. Epub 2015 May 13.](#)

Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping.

Palk PK¹, Drilon A², Fan PD³, Yu HP, Rekhiman N³, Ginsberg MS⁴, Borsu L³, Schultz N⁵, Berger MF⁶, Rudin CM⁶, Ladanyi M⁷.

Author information

Abstract
 Mutations in the MET exon 14 RNA splice acceptor and do CBL E3-ubiquitin ligase-binding site, and decreased turnover preclinical models. We now report responses to the MET in harboring mutation resulting in MET exon 14 skipping. High response rates were observed in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring this mutation. These findings suggest that MET exon 14 skipping is a potential therapeutic target in lung cancer.

Massive parallel sequencing / NGS

dabrafenib in a patient with BRAF-mutant non-small cell lung cancer

Charles M. Rudin, MD, PhD,¹ Kelvin Hong, MD,¹ and Michael Streit, MD²

[Author information](#) [Copyright and License information](#)

See other articles in PMC that cite the published article.

A V600E mutation in the *BRAF* oncogene found in ~2% of lung adenocarcinomas leads to constitutive kinase activity, triggering downstream pathways regulating cancer cell proliferation and survival.^{1,2} Mechanisms of acquired resistance to BRAF-targeted therapy in *BRAF*-mutant lung cancer have not been described.

Kennis / Ervaring / Zorg

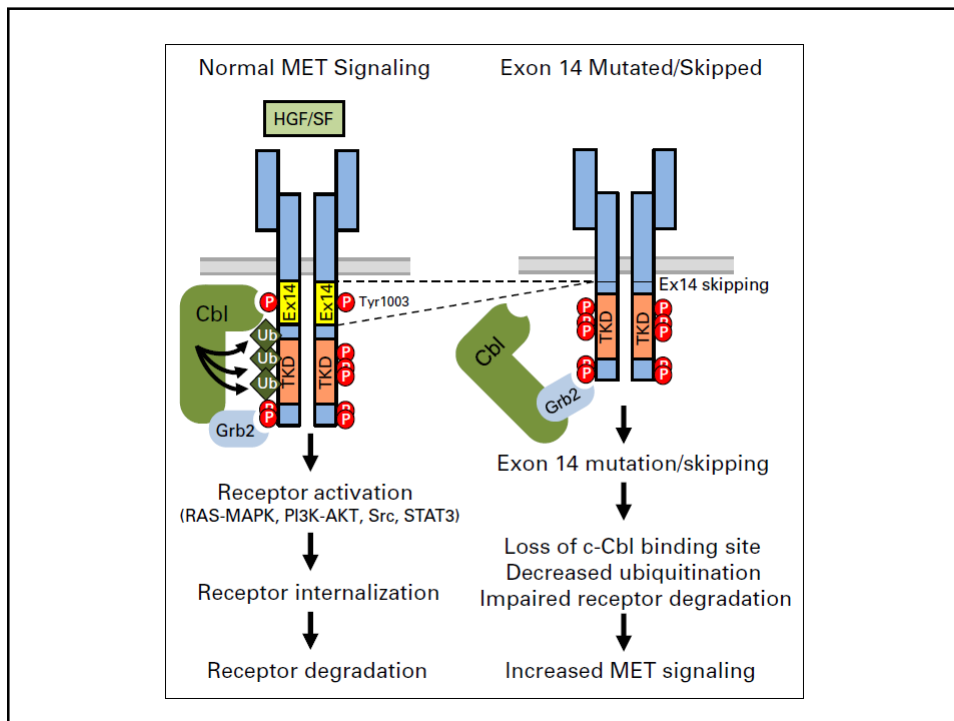
VOLUME 34 · NUMBER 8 · MARCH 10, 2016

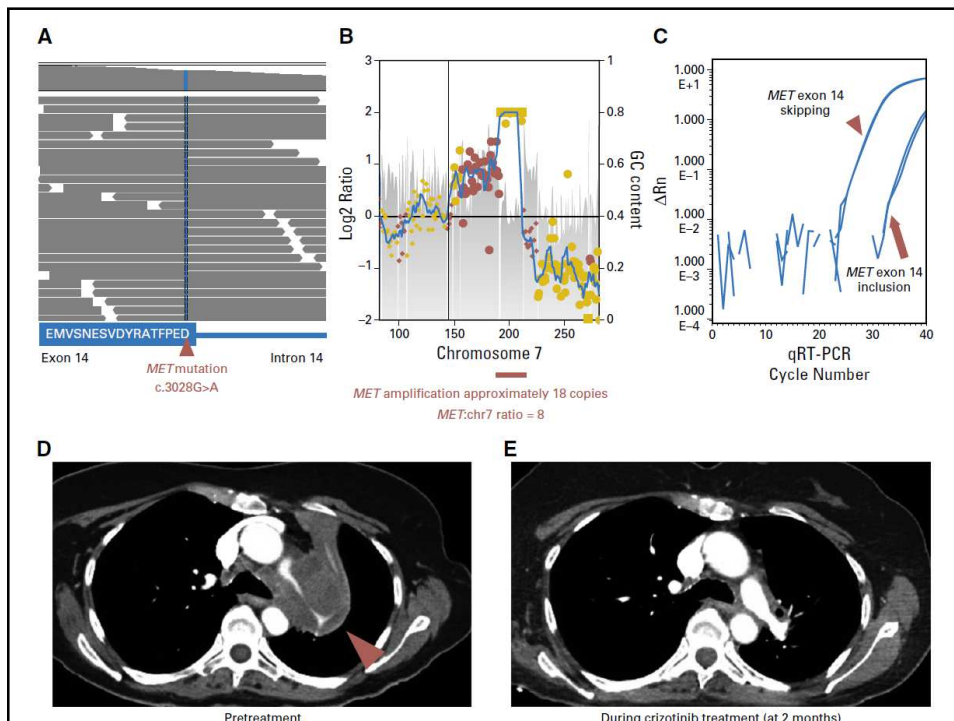
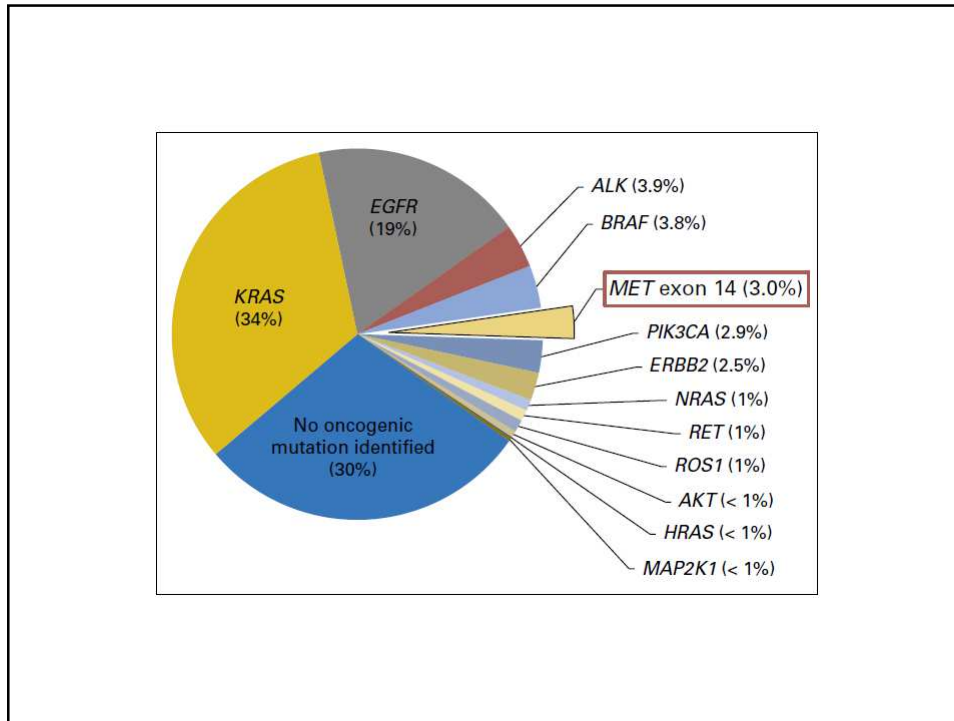
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

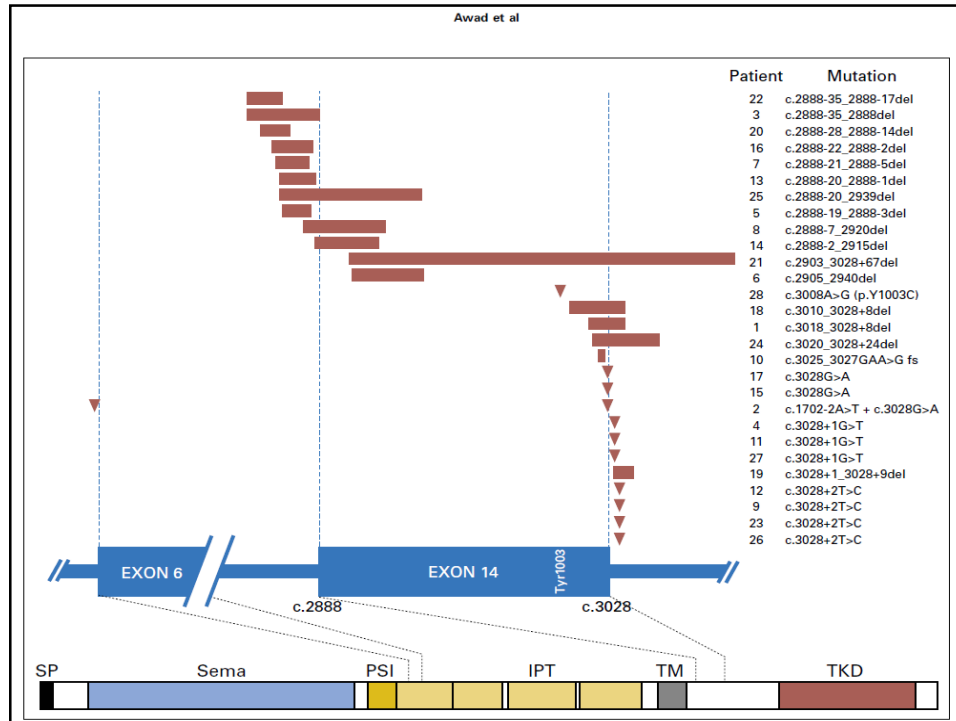
UNDERSTANDING THE PATHWAY

Impaired c-Met Receptor Degradation Mediated by *MET* Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer

Mark M. Awad, Lowe Center for Thoracic Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA







NGS / massive parallel sequencing

Verschillende mogelijkheden:
 - genomic sequencing ⇔ exome sequencing
 Startmateriaal: gDNA ⇔ RNA

Intron + exon seq.
enkel exon seq.
nog om te zetten naar cDNA (via reverse transcriptie)

1. Wat gebruik je best voor detectie van cMET exon 14 skipping? Of maakt het niet uit?
(hint: cMET exon 14 skipping wordt veroorzaakt door mutaties thv intron 14 of 15)

2. Wat gebruik je best voor EGFR mutatie detectie? Of maakt het niet uit?

**Nadeel van FFPE: RNA is van zeer slechte kwaliteit
 → vers/ingevroren materiaal nodig voor exome sequencing**

Kennis / Ervaring / Zorg **UZA**

NGS / massive parallel sequencing

Verschillende mogelijkheden:

- genomic sequencing ⇔ exome sequencing
- whole genome sequencing ⇔ targeted resequencing

Alles wordt geseq

Enkel de targets
aanwezig in je panel
worden geseq.

Targeted reseq. is goedkoper, vraagt minder tijd op het NGS apparaat,
vraagt minder analyse tijd

→ In klinische praktijk: vooral targeted resequencing van genomisch DNA

Kennis / Ervaring / Zorg

UZA

NGS – Targeted resequencing van gDNA

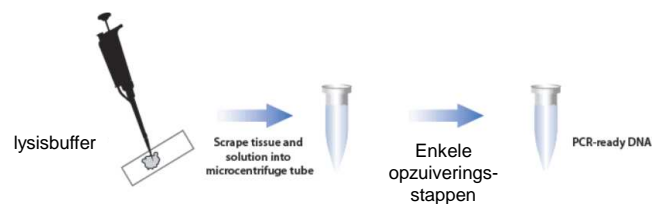
Verschillende mogelijkheden:

- exome sequencing ⇔ genomic DNA sequencing
- whole genome sequencing ⇔ targeted resequencing

→ In klinische praktijk: vooral targeted resequencing van genomisch DNA

STAP 1: Isolatie van genomisch DNA uit het weefsel

- Niet histologische, in een achtergrond niet-tumoraal DNA
- gDNA uit FFPE is zeer gefragmenteerd (max 150 baseparen lang)



Kennis / Ervaring / Zorg

UZA

NGS – Targeted resequencing van gDNA

STAP 2: Verrijking van de targetsequenties uit je panel

Je kan zelf een panel maken of een commercieel panel aankopen

Genes included			
AKT	ERBB2 (HER2)	IDH1	PDGFRA
ALK	ERBB4	IDH2	PIK3R1
BRAF	FGFR2	KIT	PIK3CA
CDKN2A (p16-INK4A, p14-ARF)	FGFR3	KRAS	PTEN
CTNWB1 (β-catenin)	H3F3A (Histone H3, F3A)	MEK1 (MAP2K1)	STK11 (LKB1)
DDR2	HIST1H3B (Histone H1, 3B)	MET	
EGFR	HRAS	NRAS	

Gene panel CLL MASTR™ Plus		
Gene name	Genomic location	
TP53	17q21.31	
BCL2	12q24.2	
ATM	11q22.3	
NOTCH1	9q34.3	
CD20	12p21.3	
XPB	3q25	
MPOB	3q27.2	
FANCA	4q12.3	
ADT1	7q31.32	

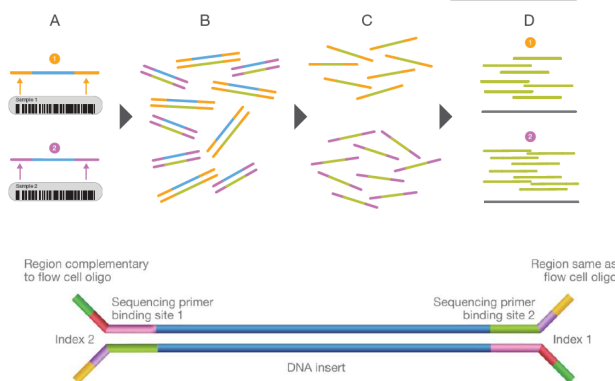
Gene	Variants
EGFR	L858R
	T790M
ERBB2	T2264C
	A3140GT
PIK3CA	C1616G
	G241A
	G1624AC
	Exon 6 (c.1093 G>A; p.E365K)
PIK3R1	E439

NGS – Targeted resequencing van gDNA

STAP 2: Verrijking van de targetsequenties uit je panel

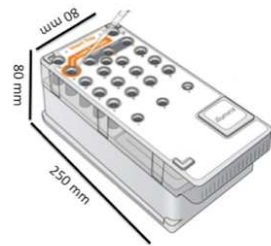
Toevoeging van adaptoren:

- binding sequences
 - primer sequences
 - een identificatie barcode (specifiek voor je patiënt)
- } Nodig voor 'bridging amplification'



NGS – Targeted resequencing van gDNA

STAP 3: Alle stalen samen op een flow cell brengen
→ bridging amplificatie

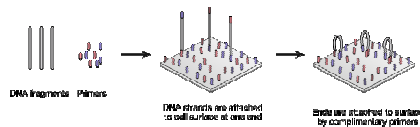


UZA

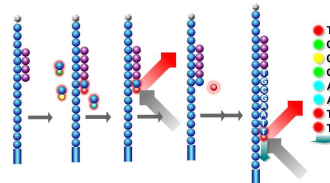
NGS – Targeted resequencing van gDNA

STAP 3: Alle stalen samen op een flow cell brengen

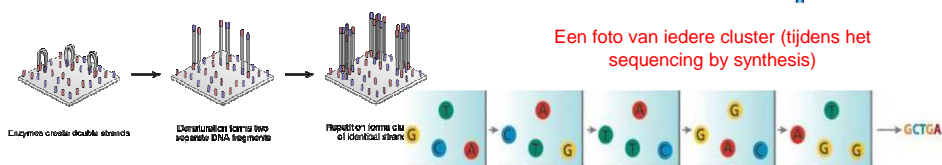
Op de flowcell worden meerdere cluster gemaakt adh bridging amplificatie



Per cluster: sequencing by synthesis



Een foto van iedere cluster (tijdens het sequencing by synthesis)



<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.ilmn>

NGS – Targeted resequencing van gDNA

STAP 4: data analyse :

Demultiplexing: via barcode patiënten terug uit elkaar halen

Uitlijnen tov een referentie sequentie

A A C A C A T G A A C A C A T G	Normal DNA
A A C A C A T G A A C A C A T G	
A A G A C A T G A A C A C A T G	Tumor DNA
A A C A C A T T A A C A C A T G	
A A C A C A T A A C A C C T G	

Somatic Mutation?

Waarom is deze strategie niet zo geschikt om amplificatie van volledige genen te detecteren?

NGS – Targeted sequencing van gDNA

Betekenis van een variatie

Classificatie van somatische varianten bij mlc testing van kankerstalen – Sukhai et al, 2015

Genetics
inMedicine

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

© American College of Medical Genetics and Genomics

Open

A classification system for clinical relevance of somatic variants identified in molecular profiling of cancer

Mahadeo A. Sukhai, PhD^{1,4}, Kenneth J. Craddock, MD^{1,4}, Mariam Thomas, PhD^{1,4}, Aaron R. Hansen, MD^{2,4}, Tong Zhang, MD^{1,4}, Lillian Siu, MD^{2,4}, Philippe Bedard, MD^{2,4}, Tracy L. Stockley, PhD, FCCMG^{1,3,4} and Suzanne Kamel-Reid, PhD, FACMG^{1,3,4}

[Geen titel]

Purpose: Interpretation systems for clinical laboratory reporting of genetic variants for inherited conditions have been widely published. By contrast, there are no existing systems for interpretation and classification of somatic variants found from molecular testing of cancer. **is found, (iii) recurrence of the variant; and (iv) evidence of clinical actionability.** We used these factors to develop a five-category somatic variant classification for simplified reporting of variant interpretations to treating oncologists.

Wat is het verschil tussen een somatische variant en een genetische variant?

NGS – Targeted sequencing van gDNA

Betekenis van een variatie - Classificatie van somatische varianten bij mlc testing van kanker stalen – Sukhai et al, 2015

DNA varianten kunnen worden ingedeeld in 6 categorieën (klassen) gebaseerd op Sukhai et al, 2015:

Klasse 1: Variant die **actionable is in de betreffende site/histologie**

Klasse 2: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie, maar wel gekend is als **actionable in een andere site/histologie**

Klasse 3: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie (en is geen SNP), maar **andere varianten in het gen** zijn wel gekend als **actionable in de betreffende site/histologie**

Klasse 4: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie (en is geen SNP), maar **andere varianten in het gen** zijn wel gekend als **actionable in een andere site/histologie**

Klasse 5: **variant met ongekende significantie (VUS)**

Klasse 6: **gekend polymorfisme (germline)**

	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	Class 5
Variant previously reported:	Yes pathogenic	Yes pathogenic	No	No	No
Specific variant is actionable:	In same site/histology	In different site/histology	Not reported	Not reported	Not reported
Other variants in same gene are actionable:			In same site/histology	In different site/histology	Not reported
Variant effect from prediction tools:			3A: pathogenic 3B: unknown 3C: benign	4A: pathogenic 4B: unknown 4C: benign	

Kennis / Ervaring / Zorg

NGS – Targeted sequencing van gDNA

Betekenis van een variatie - Classificatie van **somatische varianten** bij mlc testing van kanker stalen – Sukhai et al, 2015

DNA varianten kunnen worden ingedeeld in 6 categorieën (klassen) gebaseerd op Sukhai et al, 2015:

Klasse 1: Variant die **actionable is in de betreffende site/histologie**

Klasse 2: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie, maar wel gekend is als **actionable in een andere site/histologie**

Klasse 3: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie (en is geen SNP), maar **andere varianten in het gen** zijn wel gekend als **actionable in de betreffende site/histologie**

Klasse 4: Variant waarvoor (non)-actionability niet gekend is in de betreffende site/histologie (en is geen SNP), maar **andere varianten in het gen** zijn wel gekend als **actionable in een andere site/histologie**

Klasse 5: **variant met ongekende significantie (VUS)**

Klasse 6: **gekend polymorfisme (germline)**

Belangrijke definities:

- **actionable**: variant is geassocieerd met **gekende doelgerichte therapie / patiënt prognose / respons op therapie**. Of de identificatie van de variant heeft **implicaties op de diagnose/classificatie** met een impact op de behandeling als gevolg.

- **VUS / variant with unknown significance**: de actionability is (nog) niet gekend of werd aangetoond als zijnde niet-actionable

- **SNP / single nucleotide polymorfisme**: is een **1 veranderde nucleotidencode** voor een bepaald gen die bij een **duddanig groot percentage van de populatie** voorkomt dat **niet meer van een mutatie** kan worden gesproken. Volgens de definitie komen polymorfieën bij meer dan 1% van de populatie voor. In geval van meer zeldzame genveranderingen (voorkomen minder dan 1%) wordt van mutaties gesproken.

NGS – Targeted sequencing van gDNA

Betekenis van een variatie – classificatie voor **genetische varianten** voor overdraagbare, genetische condities – Plon et al, 2008

Belangrijk bij BRCA want daar verworven/somatisch alsook genetische mutaties

Het 5-klassensysteem volgens Plon et al. ziet er als volgt uit:

Klasse 1 varianten zijn (frequente) **polymorfismen of neutrale varianten** en zijn **niet pathogeen** (P).

Klasse 2 varianten zijn **waarschijnlijk niet-pathogeen** of klinisch weinig relevant, waardoor een diagnose moleculair niet bevestigd kan worden (UVkl2).

Klasse 3 varianten zijn **'Variants of Uncertain clinical Significance' (VUS)** waardoor een diagnose moleculair niet bevestigd maar evenmin uitgesloten kan worden (UVkl3 of VUS).

Klasse 4 varianten zijn **waarschijnlijk pathogeen**. De variant geeft (nog) geen volledige bevestiging maar ondersteunt wel de diagnose (UVkl4).

Klasse 5 varianten zijn **duidelijk pathogeen** waardoor een diagnose moleculair bevestigd wordt (M)

Sequence Variant Classification and Reporting: Recommendations for Improving the Interpretation of Cancer Susceptibility Genetic Test Results

Sharon E. Plon,^{1,11*} Diana M. Eccles,² Douglas Easton,³ William D. Foulkes,⁴ Maurizio Genuardi,^{5,12} Marc S. Greenblatt,⁶ Frans B.L. Hogervorst,⁷ Noline Hoogerbrugge,⁸ Amanda B. Spurdle,⁹ and Sean V. Tavtigian,¹⁰ for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group[†]



NGS – bruikbaar voor translocaties?



VB : ALK translocatie: de break kan zich op chromosoom 2 bevinden, in intron 19 (>2000 bp lang) van het ALK gen



Kan je ALK translocatie oppikken via NGS targeted resequencing van gDNA?

(tip : gDNA uit FFPE is max 150 bp lang en we matchen de gevonden fragmenten met een referentie genoom van een gezonde persoon)

Exon 19 Intron Exon 20 Intron

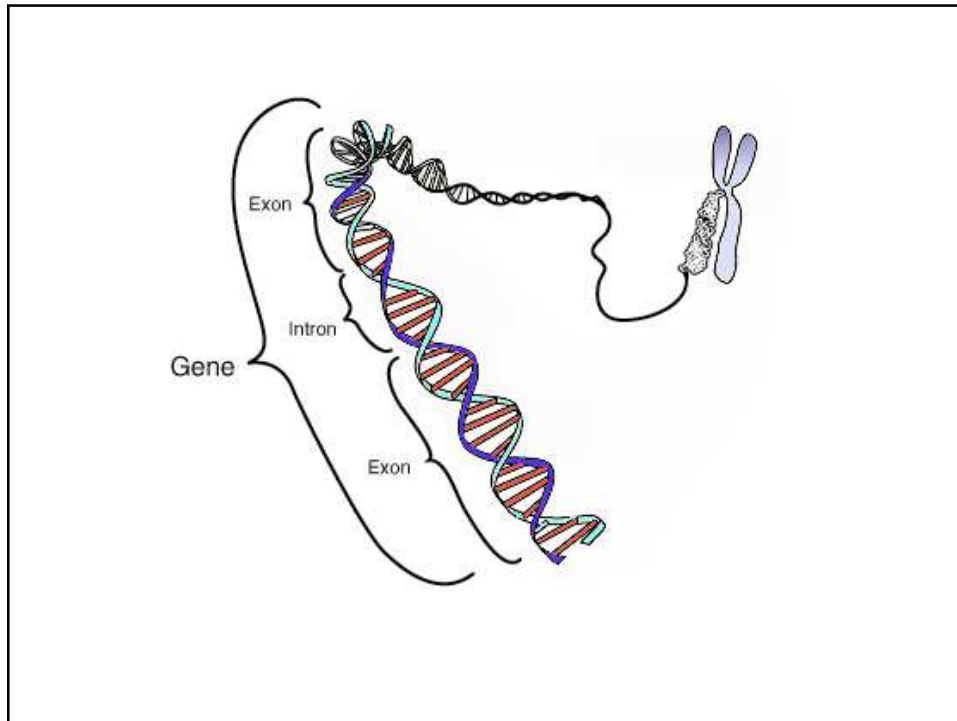


Kan je ALK TKI resistentie mutaties oppikken via NGS targeted sequencing van gDNA?



→ aanvraagformulier met zowel de keuze ALK translocatie (bvb bij IHC/FISH) als en NGS-long panel met als target EGFR en ALK:

als je enkel NGS-long aankruist, kans dat enkel de resistentiemutaties in ALK gen worden opgespoord



A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.

Chart Key: ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROXYLIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDIC ○ NON-ESSENTIAL ○ ESSENTIAL


Chemical Structure single letter code NAME three letter code DNA codons	ALANINE (A) Ala GCT, GCC, GCA, GCG	GLYCINE (G) Gly GGT, GGC, GGA, GGG	ISOLEUCINE (I) Ile ATT, ATC, ATA	LEUCINE (L) Leu CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	PROLINE (P) Pro CCT, CCG, CCA, CCG	VALINE (V) Val GTT, GTC, GTA, GTG
PHENYLALANINE (F) Phe TTT, TTC	TRYPTOPHAN (W) Trp TGG	TYROSINE (Y) Tyr TAC, TGC	ASPARTIC ACID (D) Asp GAT, GAC	GLUTAMIC ACID (E) Glu GAA, GAG	ARGININE (R) Arg CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	HISTIDINE (H) His CAT, CAC
LYSINE (K) Lys AAA, AAG	SERINE (S) Ser TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	THREONINE (T) Thr ACT, ACC, ACA, ACG	CYSTEINE (C) Cys TGT, TGC	METHIONINE (M) Met ATG	ASPARAGINE (N) Asn AAT, AAC	GLUTAMINE (Q) Gln CAA, CAG

Note: This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and glx (Z) are respectively used.

© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
 Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.

NGS – moleculair pathologie rapport ontcijferen

Soorten mutaties:



Original DNA code for an amino acid sequence.

DNA bases → CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT

↑ Amino acid

His His His His His His His

Replacement of a single nucleotide.

CAT CAT CAT C C T CAT CAT CAT

↑ Amino acid

His His His Pro His His His

Incorrect amino acid, which may produce a malfunctioning protein.

- 1 Silent mutatie
- 2 Nonsense mutatie
- 3 Missense mutatie

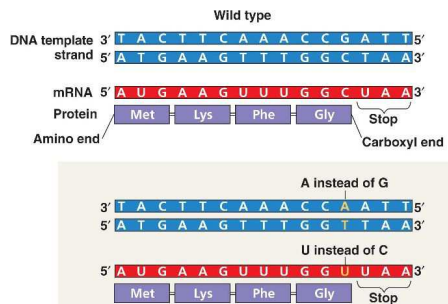
Mutatie van DNA veroorzaakt een verandering in de aminozuur sequentie (eiwit)

UZA

Kennis / Ervaring / Zorg

NGS – moleculair pathologie rapport ontcijferen

Soorten mutaties:



1 Silent mutatie

Mutatie van DNA veroorzaakt **geen verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)

2 Nonsense mutatie

3 Missense mutatie

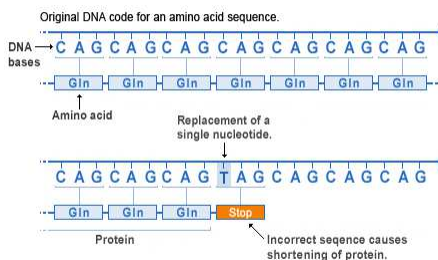
Mutatie van DNA veroorzaakt **een verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)

Kennis / Ervaring / Zorg



NGS – moleculair pathologie rapport ontcijferen

Soorten mutaties:



1 Silent mutatie

Mutatie van DNA veroorzaakt **geen verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)

2 Nonsense mutatie

Mutatie van DNA veroorzaakt **een STOP** van de aminozuur sequentie (= verkort eiwit)

3 Missense mutatie

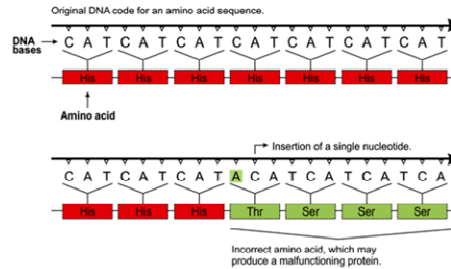
Mutatie van DNA veroorzaakt **een verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)

Kennis / Ervaring / Zorg



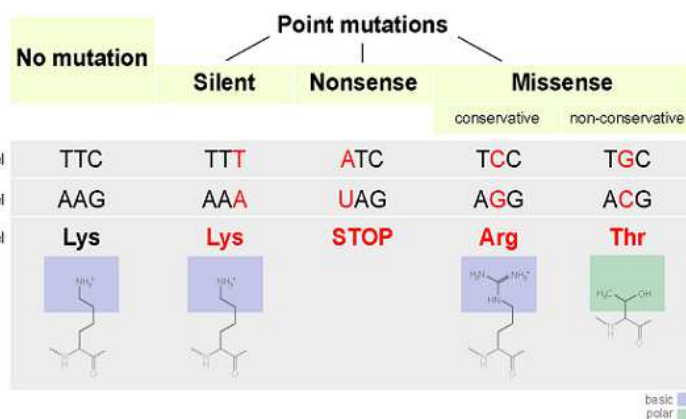
NGS – moleculair pathologie rapport ontcijferen

Soorten mutaties:



- 1 Silent mutatie Mutatie van DNA veroorzaakt **geen verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)
- 2 Nonsense mutatie Mutatie van DNA veroorzaakt **een STOP** van de aminozuur sequentie (= verkort eiwit)
- 3 Missense mutatie Mutatie van DNA veroorzaakt **een verandering** in de aminozuur sequentie (eiwit)
- 4 Frameshift mutatie Insectie of deletie ($n \neq 3 \cdot x$) van nucleotides op DNA niveau veroorzaakt **een shift bij vertaling naar de aminozuur sequentie** (eiwit)

Kennis / Ervaring / Zorg



NGS – moleculair pathologie rapport ontcijferen

Nomenclatuur waarin gerapporteerd wordt:

EGFR c.2573T>G, p.(Leu858Arg)



EGFR c.2235_2249del, p.(Glu746_Ala750del)



Maw, de officiële nomenclatuur refereert niet naar exonen, vandaar vele pathologie rapporten aangeven: Er werd door de test een mutatie aangetoond in exon 21 van het *EGFR* gen, nl c.2573T>G, p.(Leu858Arg).

Questions?

