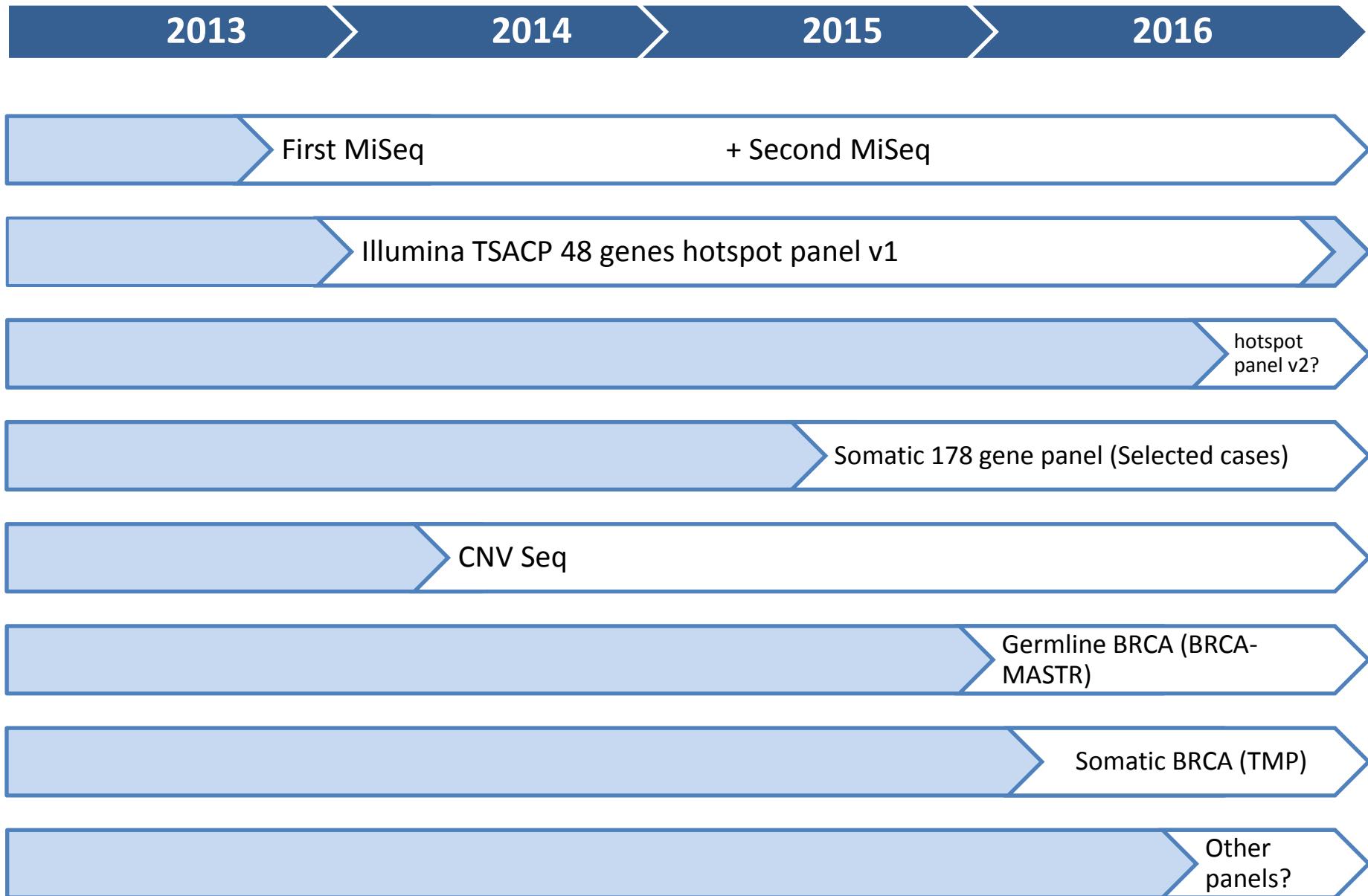


Implementatie en kwaliteit van NGS in de moleculaire diagnostiek

Maartje Vogel
Laboratoriumspecialist Klinische Genetica
Afd. Pathologie
NKI-AVL

NGS diagnostics





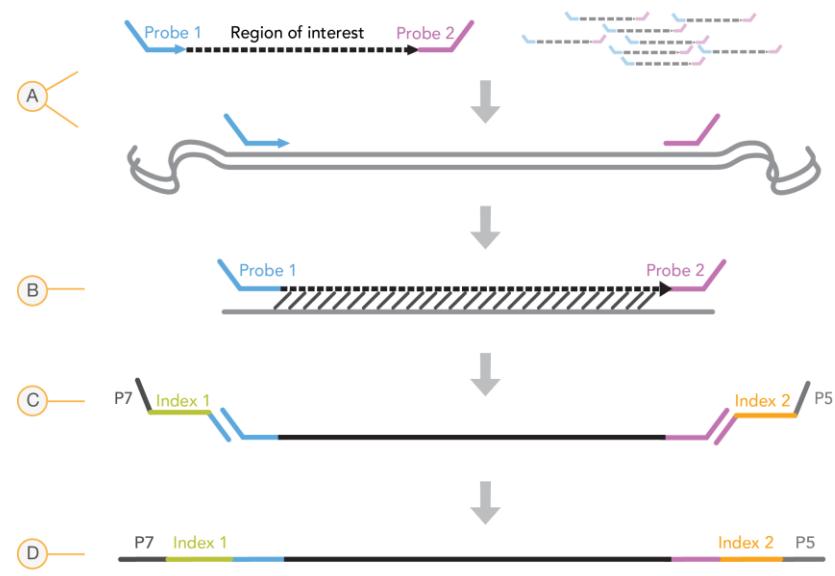
Validation of the Illumina TruSeq Amplicon Cancer Panel (TSACP)

NGS test to detect hotspot mutations in 48 genes

Illumina TruSeq Amplicon Cancer Panel (TSACP)

- Amplicon PCR
- 212 amplicons covering hotspots in 48 genes
- >35 kb target sequence
- Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE)
- Sequencing on the MiSeq

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	



(A) Hybridization of Cancer Panel oligonucleotide probes
(B) Extension and ligation
(C) Addition of indices and sequencing adaptors by PCR
(D) Final amplicon ready for sequencing with MiSeq

Assay validation (CCKL)

The process of proving that a procedure works as expected and consistently achieves the expected result.

- Accuracy
 - The ability of a test to detect a mutation that is present (Sensitivity)
 - The ability of a test to give a negative result in specimens without the mutation (Specificity)
- Limit of Detection
 - Dilution series
 - Percentage of malignant cells 'TCP'
- Reproducibility
- Robustness
 - Fixation methods
 - DNA Isolation methods
 - Age of tumor block
 - ...
- ...

Assay validation '3 phases'

Pre-validation

4 months, 5 runs

Intuitive

Develop protocols and data analysis pipeline

Results

- Lab and data analysis protocols (SOP)

Criteria for validation:

- 24 samples per run
- DNA input >100 ng (Quantus)
- QC: TSACP PCR yield >10 nM
- Data analysis filters:
 >200x & VAF >10%*

Validation

4 months, 5 runs

Structured

Results

- Knowledge on sensitivity, etc.
- Assay suitable for diagnostics?

Extended Validation

4 months, 7 runs

Routine tests are performed in parallel with NGS

Results

- Experience, Confidence
- TAT (max 10 days)
- Validation of procedures
- Automated reporting

* Currently we also report 5-10% and below 5% in special cases (e.g p.T790M)

Sensitivity Single Nucleotide Variants (SNV)

- 147 DNA samples with 114 SNV mutations

Results

- 110 True Positive
- 4 False Negative
- Sensitivity 96.4% (95% CI 0.91-0.99)

False negative mutations

- 4 SNVs with variant allele frequencies (VAF) < 10 %
 - *KRAS* c.35G>A (6.5%)
 - *KRAS* c.35G>A (7.7%)
 - *BRAF* c.1799T>A (10%)
 - *EGFR* c.2369C>T p.T790M (5.1%)

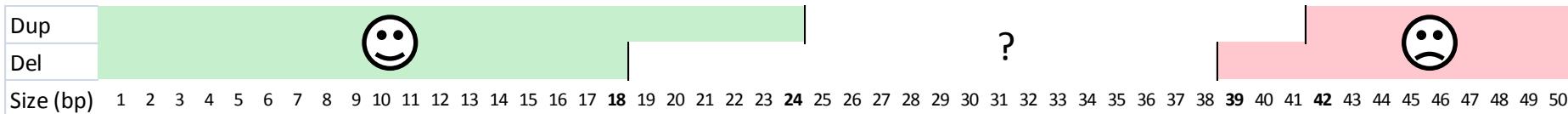
Sensitivity

Insertions/deletions/duplications (indels)

- 147 DNA samples with 37 indel mutations
 - *EGFR, KIT, TP53, PDGFR α , NRAS, KRAS, BRAF*
 - Deletions and duplications 1 - 49 bp

Results

- 29 True Positive
- 8 indels were not detected, why?
 - VAF: TP53 c.278_279insC (8,1%)
 - Location: KIT c.1504_1509dup has ‘unexpected’ overlap with DLSO
 - Size: KIT duplications of 39 bp, 42 bp, 48 bp and 49 bp
KIT deletions of 24 bp, 45 bp and 49 bp
- Conclusions (based on limited observations):



'Diagnostic yield' TSACP using COSMIC mutations

Gene	mutations in COSMIC (all)	COSMIC mutations (all) in TSACP target	DIAGNOSTIC YIELD
AKT1	494	443	90%
BRAF	37,417	37,229	99%
EGFR	16,445	15,808	96%
FGFR3	3,401	2,489	73%
ERBB2	514	288	56%
KIT	6,805	6,311	93%
KRAS	31,329	31,244	100%
NRAS	3,904	3,848	99%
PDGFRα	1,244	942	76%
PIK3CA	7,943	7,436	94%
PTEN	3,311	1,495	45%
TP53	19,922	18,830	95%

< 95%

> 95%

+ Low accuracy for indels >18 bp

Limit of detection

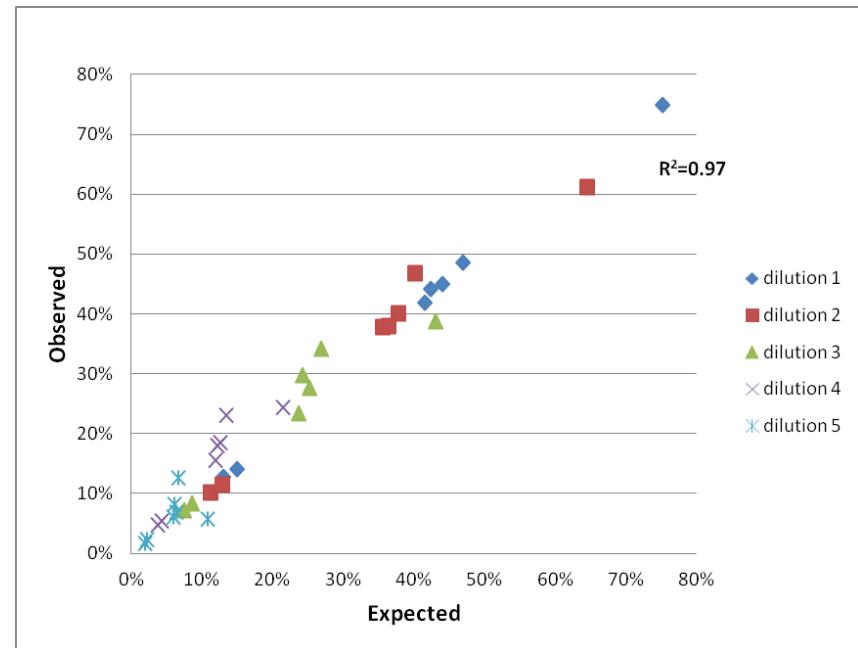
- Minimum percentage of neoplastic cells (TCP) that is needed?
 - The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate
- What is the analytic sensitivity variants with a low variant allele frequency (VAF)?
- Dilution series on FFPE samples (TCP 90 -> -> -> TCP 10)
- Compare expected vs observed VAF

M13-0886 TCP = 90			
Gene	cNomen	pNomen	VAF
<i>PIK3CA</i>	c.1059+62C>A		50%
<i>PDGFRA</i>	c.2472C>T	p.V824V	47%
<i>KIT</i>	c.1732_1755dup	p.Tyr578_Pro585dup	15%
<i>KIT</i>	c.1759A>C	p.N587H	17%
<i>KDR</i>	c.659-24G>A		48%
<i>HRAS</i>	c.-10C>T		86%
<i>ATM</i>	c.2572T>C	p.F858L	54%

Limit of detection

- Minimum percentage of neoplastic cells (TCP) that is needed?
 - The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate
- What is the analytic sensitivity variants with a low variant allele frequency (VAF)?
- Dilution series on FFPE samples (TCP 90 -> -> -> TCP 10)
- Compare expected vs observed VAF

M13-0886 TCP = 90			
Gene	cNomen	pNomen	VAF
<i>PIK3CA</i>	c.1059+62C>A		50%
<i>PDGFRA</i>	c.2472C>T	p.V824V	47%
<i>KIT</i>	c.1732_1755dup	p.Tyr578_Pro585dup	15%
<i>KIT</i>	c.1759A>C	p.N587H	17%
<i>KDR</i>	c.659-24G>A		48%
<i>HRAS</i>	c.-10C>T		86%
<i>ATM</i>	c.2572T>C	p.F858L	54%



Limit of detection

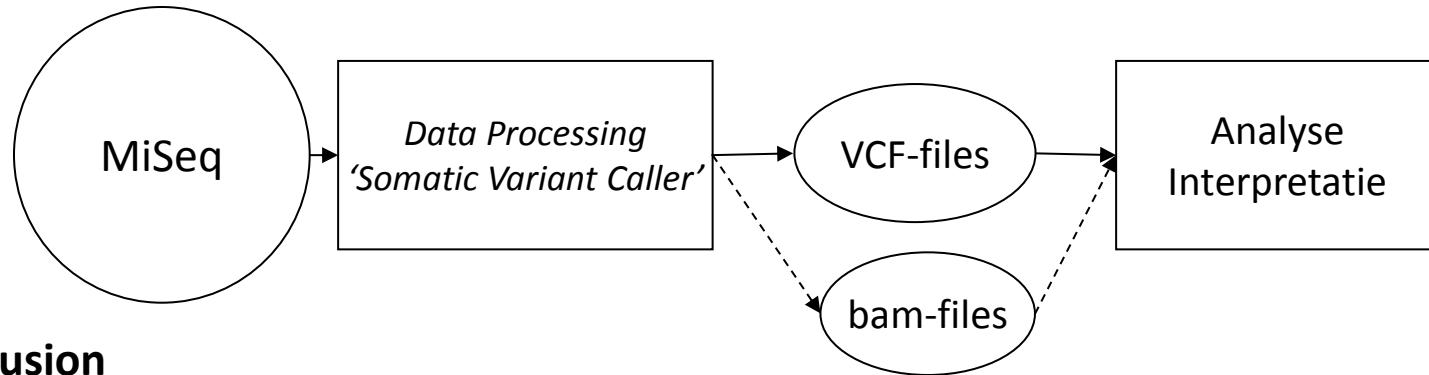
- High correlation between expected and observed VAF
- Expected variants were detected ~ 3 – 100 % VAF
- Below 3% expected VAF variants can be missed:

Gene	cNomen	AF expected	AF observed	Coverage	present in bam?
<i>EGFR</i>	c.2184+19G>A	3%	ND	4473	YES, 1% (45 reads)
<i>TP53</i>	c.672+31A>G	1%	ND	5328	YES, 1% (61 reads)

Limit of detection

- High correlation between expected and observed VAF
- Expected variants were detected ~ 3 – 100 % VAF
- Below 3% expected VAF variants can be missed:

Gene	cNomen	AF expected	AF observed	Coverage	present in bam?
<i>EGFR</i>	c.2184+19G>A	3%	ND	4473	YES, 1% (45 reads)
<i>TP53</i>	c.672+31A>G	1%	ND	5328	YES, 1% (61 reads)



Conclusion

- This assay + data analysis can be used to detect mutations between 5% and 100% VAF *

* our current 'limit of reporting' >10% VAF

Summary and Conclusions Validation (2014)

Assay validation TruSeq Amplicon Cancer Panel

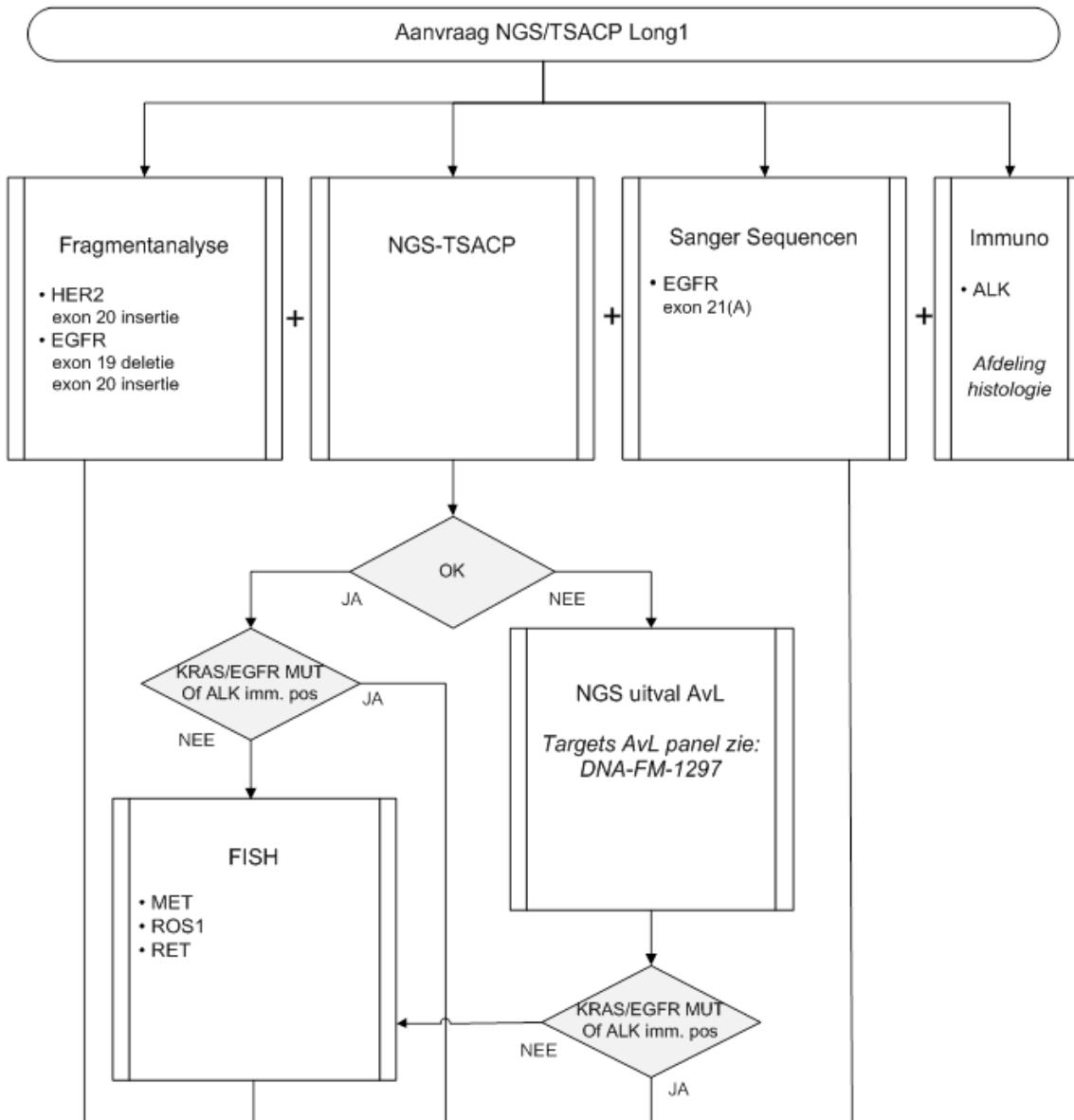
- Assay is suitable for routine diagnostic samples (FFPE)
- This assay + data analysis : detection of variants from 5 - 100% VAF
- Low accuracy for indels > 18 bp
- Some genes have a low 'diagnostic yield' -> additional tests are needed



Implementation of the Illumina TruSeq Amplicon Cancer Panel (TSACP)

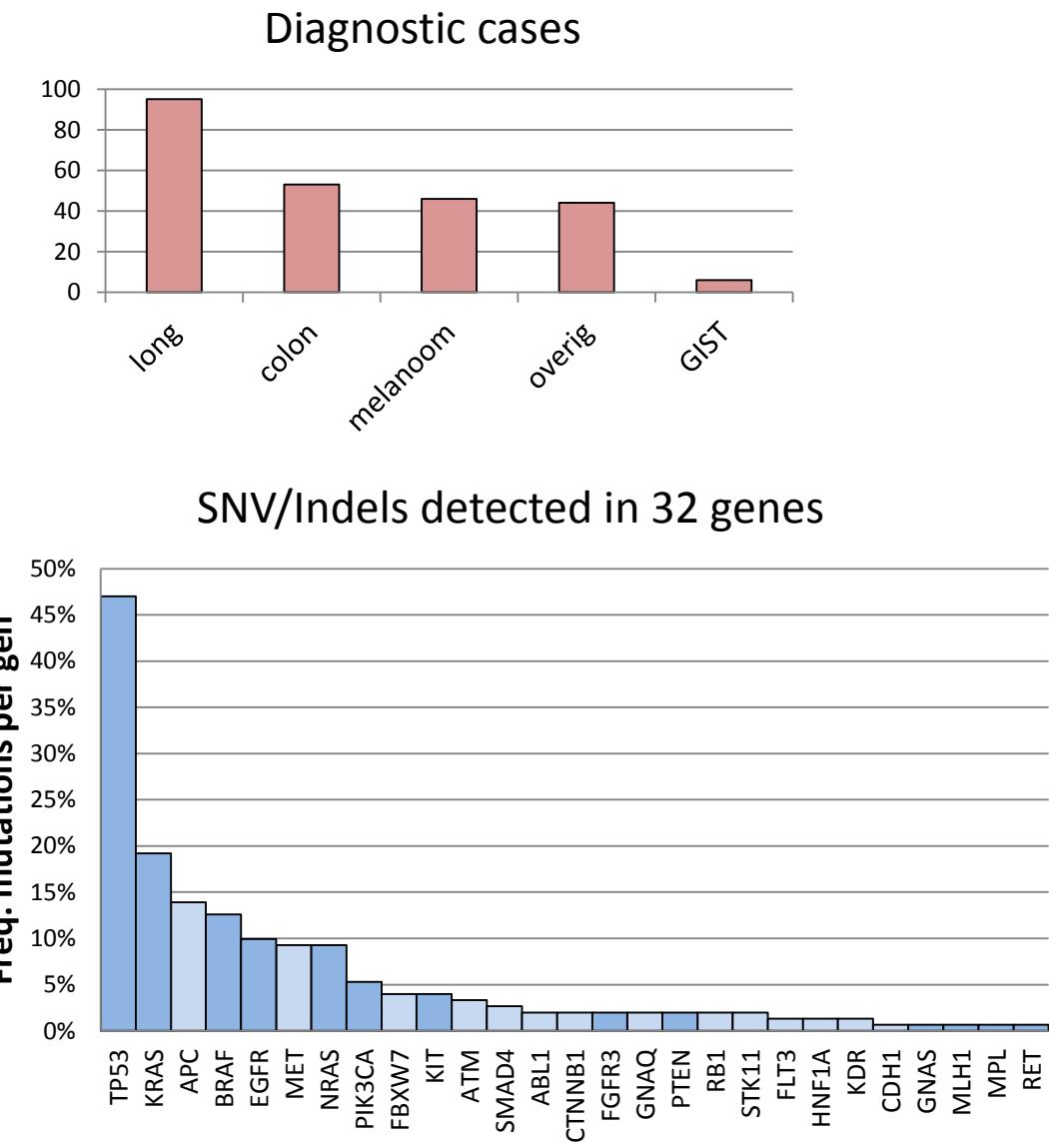
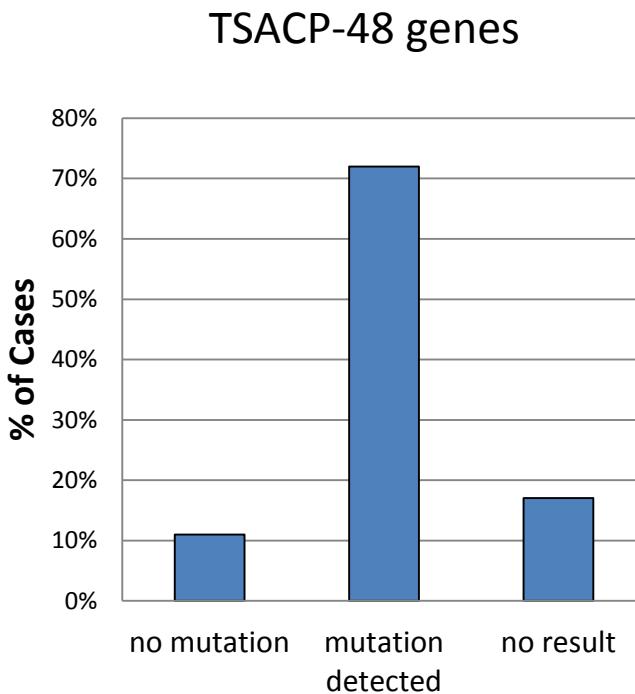
NGS test to detect hotspot mutations in 48 genes

Diagnostic routing



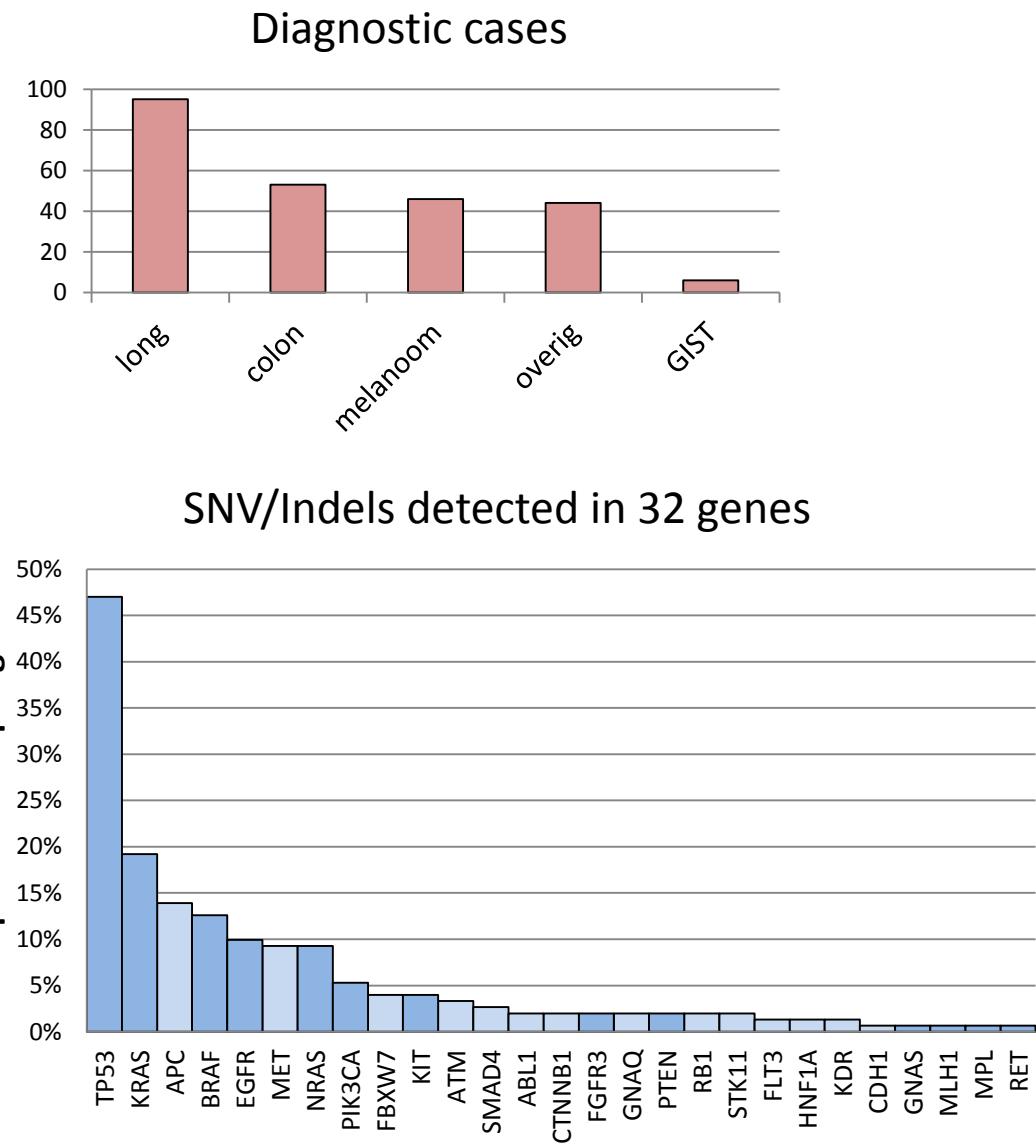
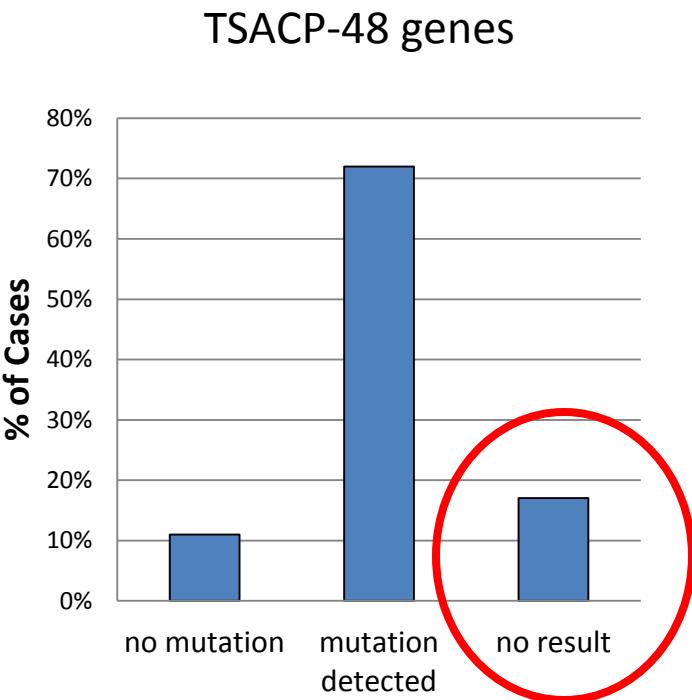
Results Dec. 2014 - May 2015 (5 months)

- ~1 run per week
- 329 tumors
 - 36 without SNV/Indel
 - 484 SNV/Indel reported



Results Dec. 2014 - May 2015 (5 months)

- ~1 run per week
- 329 tumors
 - 36 without SNV/Indel
 - 484 SNV/Indel reported



Kwaliteit

Verlagen uitval NGS

- Verlagen van de uitval van samples door:
 - Voorspellen welke samples gaan uitvallen
 - Optimaliseren protocol

Stap	Vereist QC	Verbetering
1 - Coupes + TCP	TCP >5%	
2 - FFPE DNA isolatie (KAPA Express Extract Kit)		
DNA concentratie Nanodrop	min ...ng en ...ul	
DNA concentratie Quantus	>10 ng/ul (totaal min 100 ng)	Indien mogelijk 250 ng inzetten
3 - Illumina FFPE QC test	$\Delta Ct < 2$	ook ΔCt 2-3 in NGS met hoge DNA input
4 - Sample prep		
Opbrengst Sample prep Bioanalyzer	minimaal 10 nM	Elueren met half volume
5 - Sequensen op de MiSeq		
6 - Analyse	aantal inputvarianten >>200	



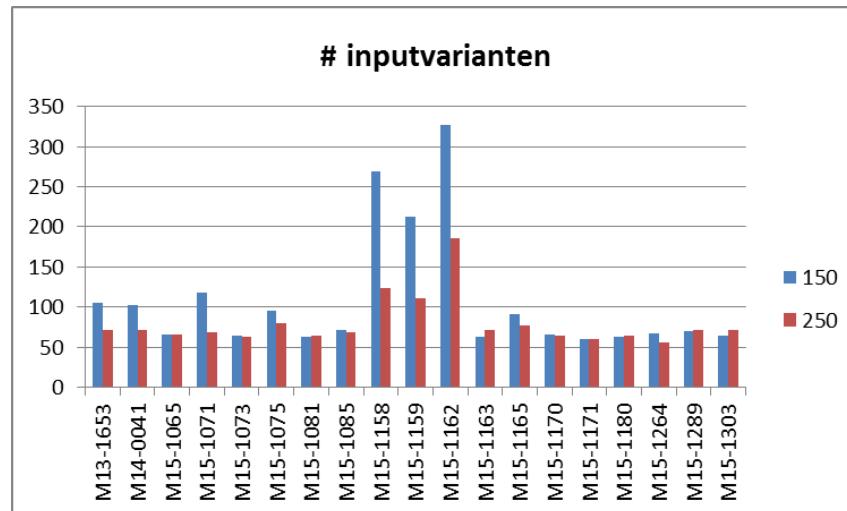
DNA input hoeveelheid

Validatie:

- input DNA 100-250 ng (Quantus)
- In praktijk zetten we 100 ng in

Aanvullende validatie:

- 250 ng input indien voldoende DNA aanwezig
 - Minder uitval (meer samples met opbrengst >10nM)
 - Kwalitatief betere data (minder input-varianten)



Verlagen uitval NGS

- Verlagen van de uitval van samples door:
 - Voorspellen welke samples gaan uitvallen
 - Optimaliseren protocol

Stap	Vereist QC	Verbetering
1 - Coupes + TCP	TCP >5%	
2 - FFPE DNA isolatie (KAPA Express Extract Kit)		
DNA concentratie Nanodrop	min ...ng en ...ul	
DNA concentratie Quantus	>10 ng/ul (totaal min 100 ng)	Indien mogelijk 250 ng inzetten
3 - Illumina FFPE QC test	$\Delta Ct < 2$	ook ΔCt 2-3 in NGS met hoge DNA input
4 - Sample prep		
Opbrengst Sample prep Bioanalyzer	minimaal 10 nM	Elueren met half volume
5 - Sequensen op de MiSeq		
6 - Analyse	aantal inputvarianten >>200	

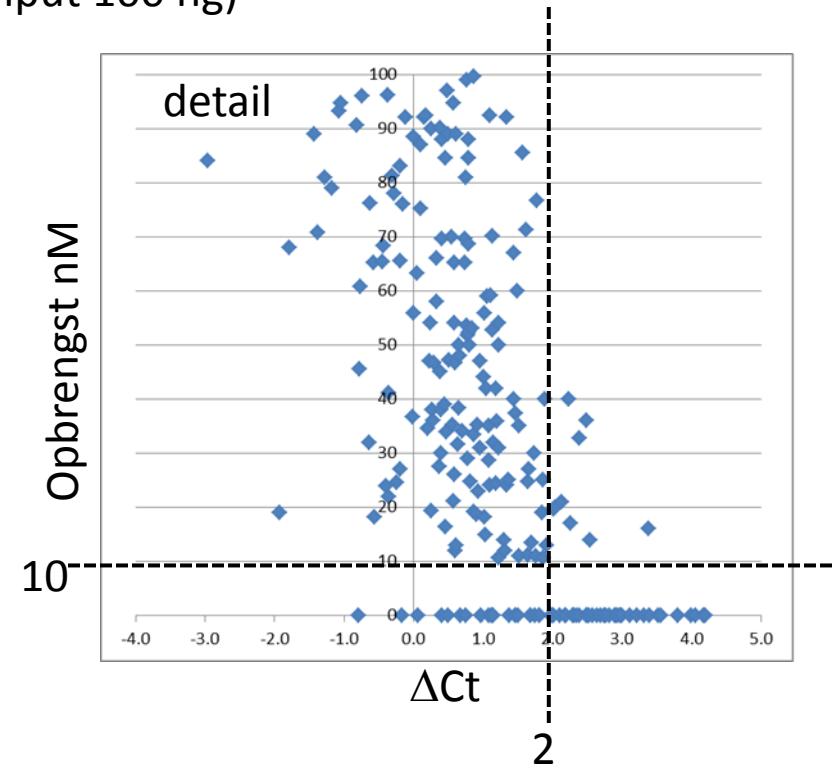
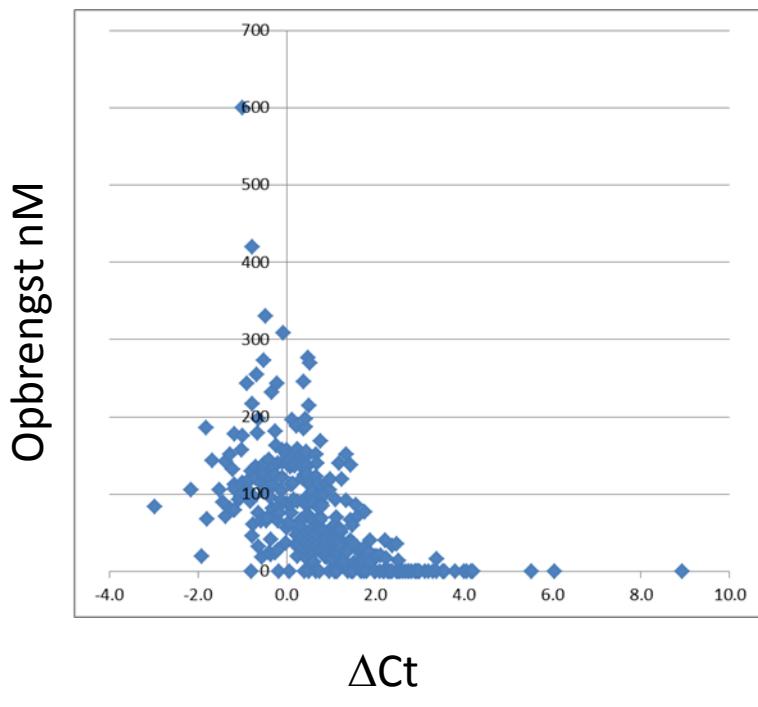


Invoer van een QC test

- Kwantitieve PCR om geschiktheid DNA voor TSACP te bepalen
- Illumina FFPE QC test Illumina:
 - ΔCt ($= Ct \text{ sample} - Ct \text{ QCT}$) $< 2 \Rightarrow$ succes in de TSACP-kit.

In onze handen:

- Definitie succes : opbrengst $> 10 \text{ nM}$ (bij input 100 ng)



Invoer van een QC test

Alle FFPE samples	348
onvoldoende PCR opbrengst (<10nM 'uitvaller')	19% (65/348)
voldoende PCR opbrengst (>=10nM 'succesvol')	81% (283/348)
Uitvallers (<10nM)	65
door QC test voorspeld ($\Delta Ct \geq 2$)	60% (39/65)
door QC test niet voorspeld ($\Delta Ct < 2$)	34% (22/65)
niet getest	6% (4/65)
Succesvol (>=10nM)	283
door QC test voorspeld ($\Delta Ct < 2$)	90% (255/283)
door QC test niet voorspeld ($\Delta Ct \geq 2$)	3% (9/283)
niet getest	7% (19/283)

Voorbeeld			Onze getallen:			
True Status			TSACP Uitkomst			
Test	D+	D-	QC Test	>=10nM	<10nM	
T+	TP	FP	delta Ct < 2	255	22	277
	FN	TN	delta Ct ≥ 2	9	39	48
	TP+FN	FP+TN		264	61	325
Se = TP / (TP + FN)			Sensitiviteit	97%		
Sp = TN / (TN + FP)			Specificiteit	64%		

Verlagen uitval NGS

- Verlagen van de uitval van samples door:
 - Voorspellen welke samples gaan uitvallen
 - Optimaliseren protocol

Stap	Vereist QC	Verbetering
1 - Coupes + TCP	TCP >5%	
2 - FFPE DNA isolatie (KAPA Express Extract Kit)		
DNA concentratie Nanodrop	min ...ng en ...ul	
DNA concentratie Quantus	>10 ng/ul (totaal min 100 ng)	Indien mogelijk 250 ng inzetten
3 - Illumina FFPE QC test	$\Delta Ct < 2$	ook ΔCt 2-3 in NGS met hoge DNA input
4 - Sample prep		
Opbrengst Sample prep Bioanalyzer	minimaal 10 nM	Elueren met half volume
5 - Sequensen op de MiSeq		
6 - Analyse	aantal inputvarianten >>200	



Analyse + Rapportage

Cartagenia Bench

https://nki.ngs.cartagenia.com/patient/analysis/view.html?analysisid=10216#genotype

CARTAGENIA Bench Lab NGS

Maartje Vogel | Configuration ▾

Patient: M16-0939 > Analysis: A_M16-0939-26447_Validatie v2

General Variant triage Variant review Reports

Triage & Classify - TSACP (cov>200, AF>0.05, MVL)

Input Variants (86)

Quality read depth >200x

Match (85)

No match (1)

Unknown (0)

Variant allele frequency VAF<0.05

Match (48)

No match (37)

Unknown (0)

Variant allele frequency VAF>0.05 <0.1

Match (4)

No match (33)

Unknown (0)

Pathogenic (2) Review TO INSPECT MUT

Likely benign (0) TO INSPECT

Benign (23) PMF

Match (1) Review TO INSPECT artifact

No match (7) Review TO INSPECT

Match (1) Review TO INSPECT MUT

No match (8)

Managed variant list MUT?

Managed variant list known PMF?

Managed variant list artifact?

Managed variant list known MUT?

Action Lab classification QC

TO INSPECT MUT PMF VAF5-10% artefact lowVAF

Variant List: 86 variants (total) ▶ 8 variants (2 classification tree bins)

Gene	Position	T	Ref	Patient	Read Depth	Type	Transcript	cDNA	Location	Exon	Effect	Protein	Labels	Classification	References	MVL	Info	Assessment				
NRAS	1:115,258,821	Q	G	A	41787	snp	NM_002524.4	c.17-23C>T	intronic	2			TO INSPE	Likely benign	MD	arte	M13-	M14-	Other	Simil.	Info	Assessment
ERBB4	2:212,530,083	Q	C	C	21509	snp	▶ NM_005235.2	c.1836G>T	exonic	15	synonymous	p.=	TO INSPE	VOUS	■	■	□	□	□	□	□	□
PDGFRA	4:55,144,235	Q	A	A	18230	snp	NM_006206.4	c.2002+62A>T	intronic	14			TO INSPE	Likely benign	■	■	□	□	□	□	□	□
KDR	4:55,853,807	Q	G	G	9793	snp	NM_002253.2	c.3629C>T	exonic	27	nonsynonymous	p.Pro1210Leu	TO INSPE	VOUS	■	■	■	■	■	■	■	■
BRAF	7:140,481,412	Q	C	C	64493	snp	NM_004333.4	c.1396G>A	exonic	11	nonsynonymous	p.Gly466Arg	TO INSPE	VOUS	■	■	■	■	■	■	■	■
GNAQ	9:80,343,483	Q	A	A	8273	snp	NM_002072.4	c.836T>C	exonic	6	nonsynonymous	p.Leu279Pro	Q	VAF5 TO I	■	■	■	■	■	■	■	■
PTEN	10:89,685,398	Q	G	G	27246	snp	NM_000314.4	c.209+84G>A	intronic	3			TO INSPE	Likely benign	■	■	■	■	■	■	■	■
TP53	17:7,577,120	Q	C	C	6278	snp	▶ NM_000546.5	c.818G>T	exonic	8	nonsynonymous	p.Arg273Leu	Q	TO I MUT Pathogenic	■	■	■	■	■	■	■	■

Show 20 results Page: 1 of 1

https://nki.ngs.cartagenia.com/patient/analysis/view.html?analysisid=10216#review

CARTAGENIA Bench Lab NGS

Maartje Vogel Configuration ▾

Patient: M16-0939 > Analysis: A_M16-0939-26447_Validatie v2

General Variant triage Variant review Reports

Molecular Variants

BRAF	c.1396G>A p.Gly466Arg
ERBB4	c.1836G>T p.=
GNAQ	c.836T>C p.Leu279Pro
HNF1A	c.872delC p.Pro291Glnfs*51
KDR	c.3629C>T p.Pro1210Leu
NRAS	c.17-23C>T
PDGFRα	c.2002+62A>T
PTEN	c.209+84G>A
SMARCB1	c.214delA p.Thr72Glnfs*13
TP53	c.818G>T p.Arg273Leu

Classification VOUS

Include in report Yes

Variant assessment

UITSLAG: BRAF NM_004333.4 c.1396G>A p.Gly466Arg (p.G466R), deze variant wordt geclassificeerd als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS). Opmerking: p.G466A op deze positie wordt geclassificeerd als een 'intermediate activity mutant', de p.G466E wordt geclassificeerd als een 'impaired activity mutant'

Gene information Variant information Annotations Links Previous occurrences

Gene	BRAF	Type	snp
Transcript	NM_004333.4	Location	exonic
CDNA	c.1396G>A	Exon	11
Protein	p.Gly466Arg	Effect	nonsynonymous
Read Depth	64493	Position	7:140,481,412
Call Quality	100	Allele	C T
Genotype Quality	100	AD	26423 38030
Filter status	PASS	AF	. 59.0

Labels TO INSPECT

Managed Variant Lists

Diagnostiek - MD	Classification
MD (MUT-VUS-PMF)	VOUS
artefact	<input type="checkbox"/>
M13-1653	<input type="checkbox"/>
M14-0041	<input type="checkbox"/>

Variant information

VUS 2016-05-17 PN volgens MD Anderson, op zelfde positie mutaties met zeer verschillend effect van 'increased activity' tot 'kinase death'.
 p.G466A: **intermediate activity mutant** (< 100 fold higher than wild-type BRAF activity) that moderately increases ERK activation, possibly through up-regulation of CRAF activity and/or suppression of BRAF autoinhibition.
 p.G466A: **impaired activity mutant** (less than wild-type BRAF activity) that moderately increases ERK activation, possibly through up-regulation of CRAF activity and/or suppression of BRAF autoinhibition.

Other domains

PFT (MUT-VUS-PMF)	Classification
artefact BM	<input type="checkbox"/>
artefact BRCA-TMP	<input type="checkbox"/>
genotype ID	<input type="checkbox"/>

Report abstract

UITSLAG : BRAF NM_004333.4 c.1396G>A p.Gly466Arg (p.G466R), deze variant wordt geclassificeerd als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS). Opmerking: p.G466A op deze positie wordt geclassificeerd als een 'intermediate activity mutant', de p.G466E wordt geclassificeerd als een 'impaired activity mutant'

Additional matches

NM_004333.4 c.1397G>T (p.Gly466Val)

Match type	Same AA position
Classification	Pathogenic
MV 2015-12-28: kinase impaired mutant.	
Van MD Anderson website:	
This variant is a kinase impaired mutant identified in lung cancer cell lines and with low frequency in non-small cell lung cancer samples that moderately activates the ERK and	

Analysis assessment

Findings Recommendations Remarks

Report



Pathologie
Moleculaire Diagnostiek
NGS Analyse

Datum rapport 2016-05-23

Gegevens patiënt en aanvraag		Materiaal
Patiëntnummer:	M16-0939	Avl PA-nummer:
Testnummer:	26447	Avl blokje:
Bepaling:	NULL	Extern PA-nummer:
Extern blokje:	NULL	M-nummer: M16-0939
Vraagstelling:	Validatie	% Neoplastische cellen: 80%
		Voldoet aan gestelde eisen: JA
Diagnoseregel PALGA:	diag1: lymfklier* oksel* rechts* puntie* metastase carcinoom* long* echografie* moleculaire biologie	
Analyse		
MiSeq runnummer:	MD107	
Analys pipeline (GCF):	AV (CallSomaticVariants 3.5.2.1, workflowtype 1.0.0.60, MiSeq 2.5.1.3)	
VCF naam:	MD107_AV_M16-0939-26447.vcf	
Target gene panel:	TSACP (48 genes)	
Run voldoet aan gestelde eisen:	NEE	
Resultaat van Sample voldoet aan gestelde eisen:	JA	
Gemiddelde coverage:	22063x	
Classification Tree (BENCH):	Validatie v2	
Analysenummer:	A_M16-0939-26447_Validatie v2	
Uitvallende amplicons:	null	
Opmerkingen		
van validate -> diagnostiek gezet 23/5 MV		

Disclaimer	
Methode - De test bestaat uit een multiplex PCR-amplificatie van tumor-DNA met het TruSeq Amplicon - Cancer Panel (TSACP) van Illumina. De PCR producten ('amplicons') zijn gesequenct op het Illumina MiSeq platform.	
Detectie van SNVs en Indels - De DNA wordt geanalyseerd met de Illumina 'Somatic Variant Caller' analyse software. Voor filtering en classificatie van varianten wordt een in huis ontwikkeld en gevalideerde analyse gebruikt. Deze test heeft bij een dekking van >200x en een VAF>10% een gevalideerde sensitiviteit van >> 95% voor SNVs en Indels tot 18 bp. Mutaties kunnen mogelijk gemist worden door een laag tumorcellpercentage en/of tumorheterogeniteit.	
Detectie van Genamplificatie - Door middel van een aanvullende data-analyse waarbij wordt gekeken naar het aantal reads (coverage) kunnen ook copy number veranderingen worden aangeboden. Deze analyse is gevalideerd voor de detectie van genamplificaties van ERBB2 (HER2), EGFR en MET. De gevoeligheid van deze analyse voor de detectie van hoge amplificaties is hoog. Met deze analyse kan geen onderscheid worden gemaakt tussen lagere amplificaties en polysomie, om dit onderscheid te maken is een aanvullende diagnostiek nodig.	
TSACP target panel v1.0 - Het target panel bestaat uit 212 amplicons verdeeld over 48 genen: ABL1, AKT1, ALKBH, APC, ATM, BRAF, CDH1, CSHN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL. Het panel is gericht op de detectie van mutaties in bepaalde gedeeltes van de genen (de 'hot spots'). Hierdoor zullen niet alle veranderingen in de betrokken genen met deze test kunnen worden aangegetoond.	
Rapportage - Alleen damaging/pathogenic mutaties (MUT) en DNA varianten waarvan de betekenis (nog) onbekend is (VOUS/VUS) worden gerapporteerd. Neutrale varianten (PMF) worden niet gerapporteerd. Naamgeving van DNA varianten is conform de HGVS richtlijn (http://www.hgvs.org/mutnomen). Afhankelijk van de vraagstelling worden relevante genen met aanvullende technieken 'dichtgelezen'. De resultaten van deze aanvullende analyses worden expliciet vermeld. Incidenteel zullen amplicons onvoldoende dekking hebben om een betrouwbare uitslag te kunnen geven, deze staan bij 'uitvallende amplicons' onder Analyse vermeld.	



Pathologie
Moleculaire Diagnostiek
NGS Analyse

DNA Varianten									
Gene	oNom	pNom	pNom	gNom	Cover.	VAF	Coding effect	Cosmic	Classificatie
ERBB4	NM_005235.2 c.T83G>T	p.=	p.=	NC_000002.11: g.212530083C>A	21509	19%	synonymous		VOUS
KDR	NM_002253.2 c.3629G>T	p.Pro1210Leu	p.P1210L	NC_000004.11: g.55953807G>A	9793	33%	nonsynonymous	COSM48460	VOUS
BRAF	NM_004333.4 c.T396G>A	p.Gly466Arg	p.G466R	NC_000007.13: g.140481412C>T	84493	59%	nonsynonymous	COSM253328	VOUS
TP53	NM_000546.5 c.818G>T	p.Arg273Leu	p.R273L	NC_000017.10: g.7577120C>A	6278	38%	nonsynonymous	COSM10779	Pathogenic

Toelichting

-

Uitslag

UITSLAG 1: BRAF NM_004333.4 c.1396G>A p.Gly466Arg (p.G466R), deze variant wordt geclasseert als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).
Opmerking: p.G466A op deze positie wordt geclasseert als een 'intermediate activity mutant', de p.G466E wordt geclasseert als een 'impaired activity mutant'
UITSLAG 2: ERBB4 NM_005235.2 c.1836G>T p. (?) deze variant wordt geclasseert als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).
Opmerking: deze variant leidt mogelijk tot foulteve splicing.
UITSLAG 3: KDR NM_002253.2 c.3629C>T p.Pro1210Leu (p.P1210L), deze variant wordt geclasseert als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).
UITSLAG 4: TP53 NM_000546.5 c.818G>T p.Arg273Leu (p.R273L), deze mutatie wordt in de IARC TP53 database vermeld als 'non-functional' eiwit.
UITSLAG 5: Het resultaat van dit sample toont copy number verandering(en) van het MET locus. Aanvullende diagnostiek is nodig om te bepalen of dit om genamplificatie of polysomie gaat.

DNA Varianten

Gene	cNomen	pNomen	pNomen	gNomen	Cover.	VAF	Coding effect	Cosmic	Classificatie
ERBB4	NM_005235.2 c.1836G>T	p.=	p.=	NC_000002.11: g.212530083C>A	21509	19%	synonymous		VOUS
KDR	NM_002253.2 c.3629C>T	p.Pro1210Leu	p.P1210L	NC_000004.11: g.55953807G>A	9793	33%	nonsynonymous	COSM48460	VOUS
BRAF	NM_004333.4 c.1396G>A	p.Gly466Arg	p.G466R	NC_000007.13: g.140481412C>T	64493	59%	nonsynonymous	COSM253328	VOUS
TP53	NM_000546.5 c.818G>T	p.Arg273Leu	p.R273L	NC_000017.10: g.7577120C>A	6278	38%	nonsynonymous	COSM10779	Pathogenic

Toelichting

Uitslag

UITSLAG 1: BRAF NM_004333.4 c.1396G>A p.Gly466Arg (p.G466R), deze variant wordt geklassificeerd als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).

Opmerking: p.G466A op deze positie wordt geklassificeerd als een 'intermediate activity mutant', de p.G466E wordt geklassificeerd als een 'impaired activity mutant'

UITSLAG 2: ERBB4 NM_005235.2 c.1836G>T p.? (p.?), deze variant wordt geklassificeerd als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).

Opmerking: deze variant leidt mogelijk tot foutieve splicing.

UITSLAG 3: KDR NM_002253.2 c.3629C>T p.Pro1210Leu (p.P1210L), deze variant wordt geklassificeerd als Variant of Unknown/Uncertain Significance (VUS/VOUS).

UITSLAG 4: TP53 NM_000546.5 c.818G>T p.Arg273Leu (p.R273L), deze mutatie wordt in de IARC TP53 database vermeld als 'non-functional' eiwit.

UITSLAG 5: Het resultaat van dit sample toont copy number verandering(en) van het MET locus. Aanvullende diagnostiek is nodig om te bepalen of dit om genamplificatie of polysomie gaat.

Variant classification and reporting

5 klassensytem (klinische genetica):

- | | |
|--|-------------|
| Pathogenic/damaging mutation | -> reported |
| Likely pathogenic/damaging | -> reported |
| Variant of Unknown Significance (VUS/VOUS) | -> reported |
| Likely benign | |
| Benign | |

Extra information:

'dit is een activerende mutatie'

'deze variant is bekend als een resistentie-mutatie'

Coding effect	Functional effect	Classification (AVL-NKI)	Classification (5 class)	Clinical implication	therapierespons
synonymous	gain of function	MUT (pathogenic)	Benign	yes	Sensitivity
non-synonymous	loss of function	VUS (unknown)	Likely benign	possible	Resistancy
stopgain	no effect	PMF (not pathogenic)	VOUS	no	Contra-indication
inframe	unknown		Likely Pathogenic		Possible
frameshift			Pathogenic		
startloss					
stoploss					

Dank

AVL - Department of Pathology

- Rubayte Rahman
- Els Verhoeven
- Miranda van Dongen
- Majella Boutmy
- Jasper Bouwman
- Abdel Ajouaou
- Roelof Pruntel
- Ivon van Tielen
- Jan-Nico Ridderbos
- Carla van Tiggelen
- Sonja Springer
- Petra Nederlof
- Efraim Rosenberg
- **And many others!!!**

NKI - Genomic Core Facility

- Daan Vessies
- Marielle Krete
- Stefan Lehnert
- Ron Kerkhoven

Research IT

- Rubayte Rahman
- Jelle ten Hoeve

DNA diagnostiek september 2015

