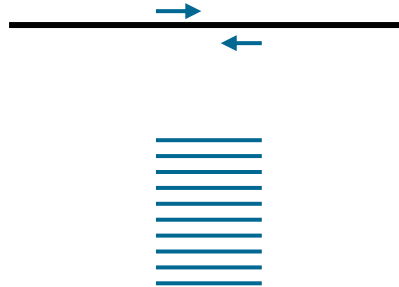


Moleculaire diagnostiek: Sequentie analyse m.b.v. smMIPs

Annemiek Kastner – van Raaij
Nijmegen, RadboudUMC
Afdeling Pathologie, LTG
26 mei 2016

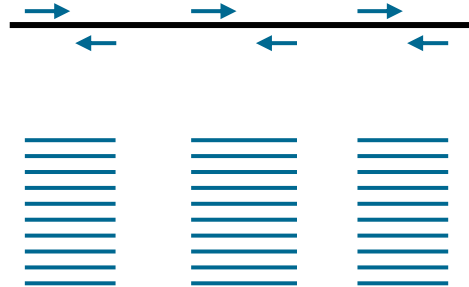
Moleculaire Diagnostiek: target sequencing

conventional PCR



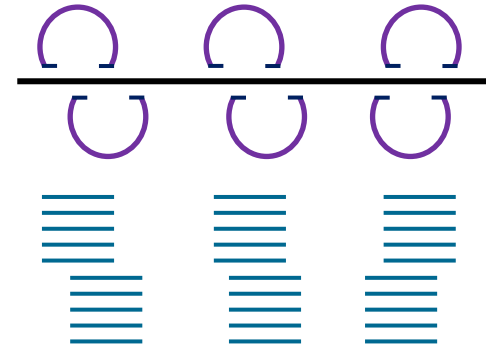
Sanger
sequencing

multiplex PCR



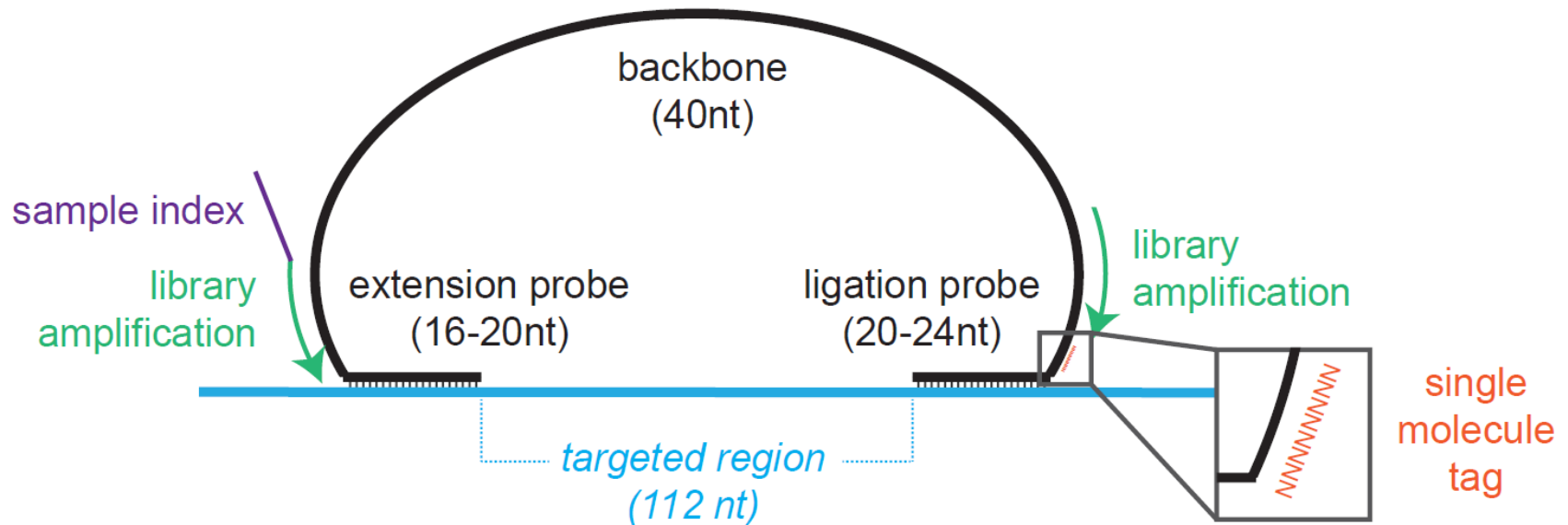
NGS

Molecular Inversion
Probes (MIPs)

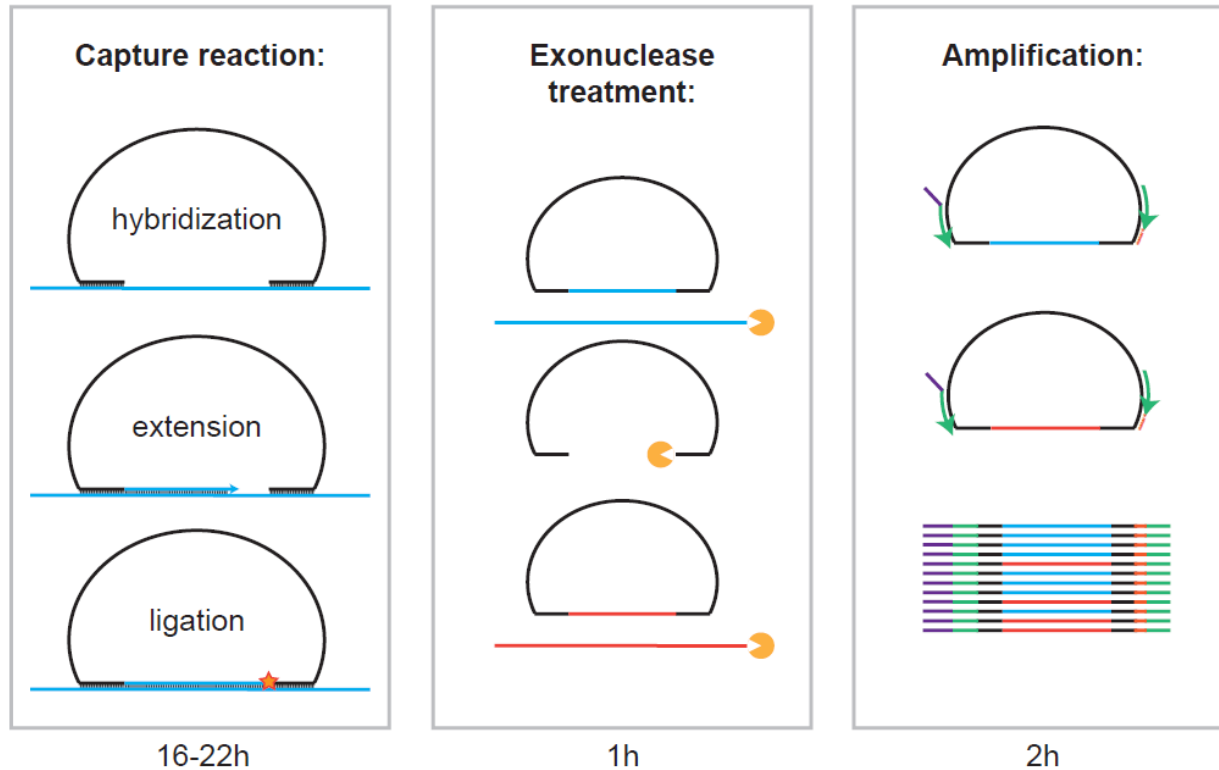


Sequentie analyse m.b.v. smMIPs

single molecule Molecular Inversion Probe (smMIP)



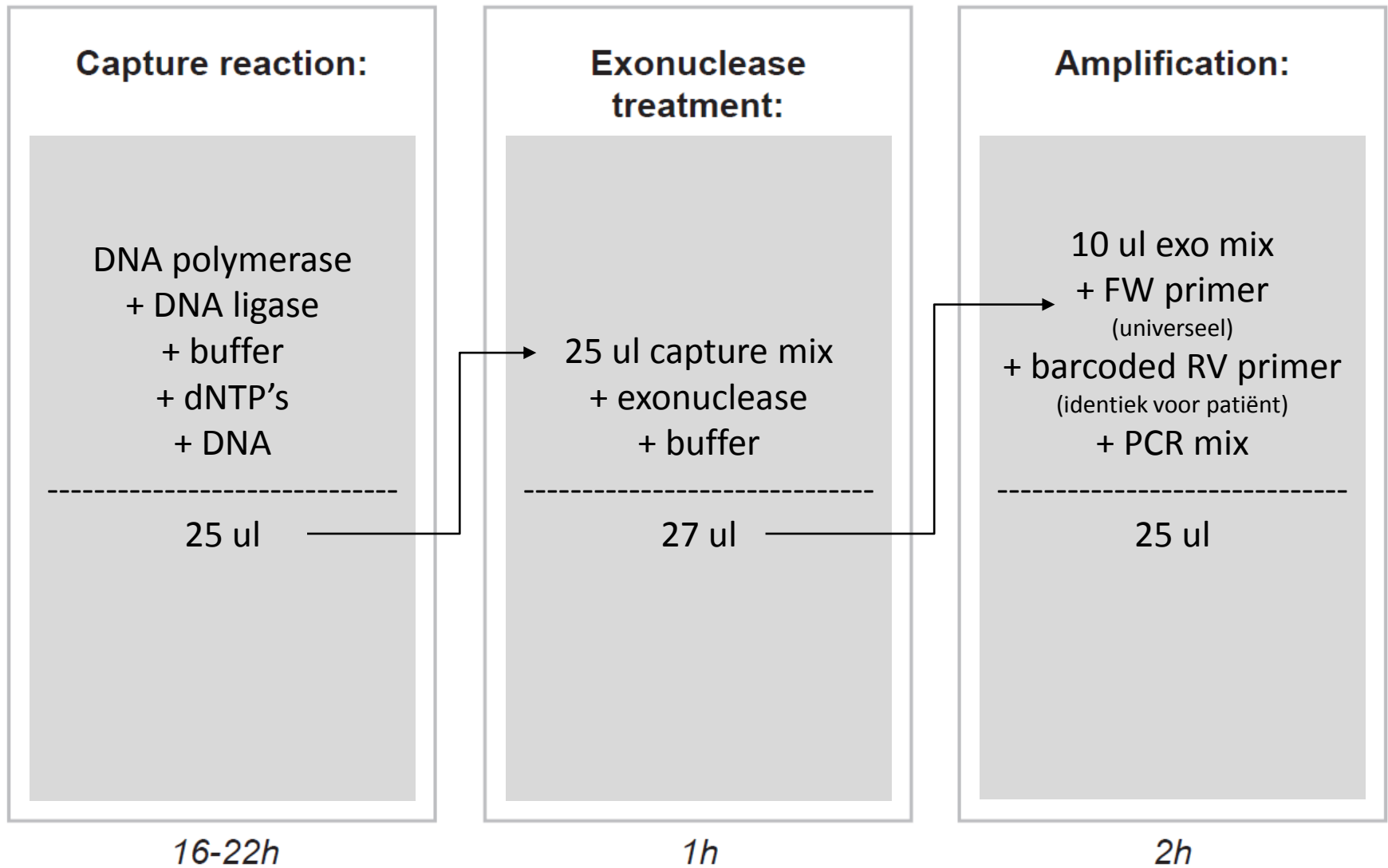
Sequentie analyse m.b.v. smMIPs



Molecular Inversion Probes:

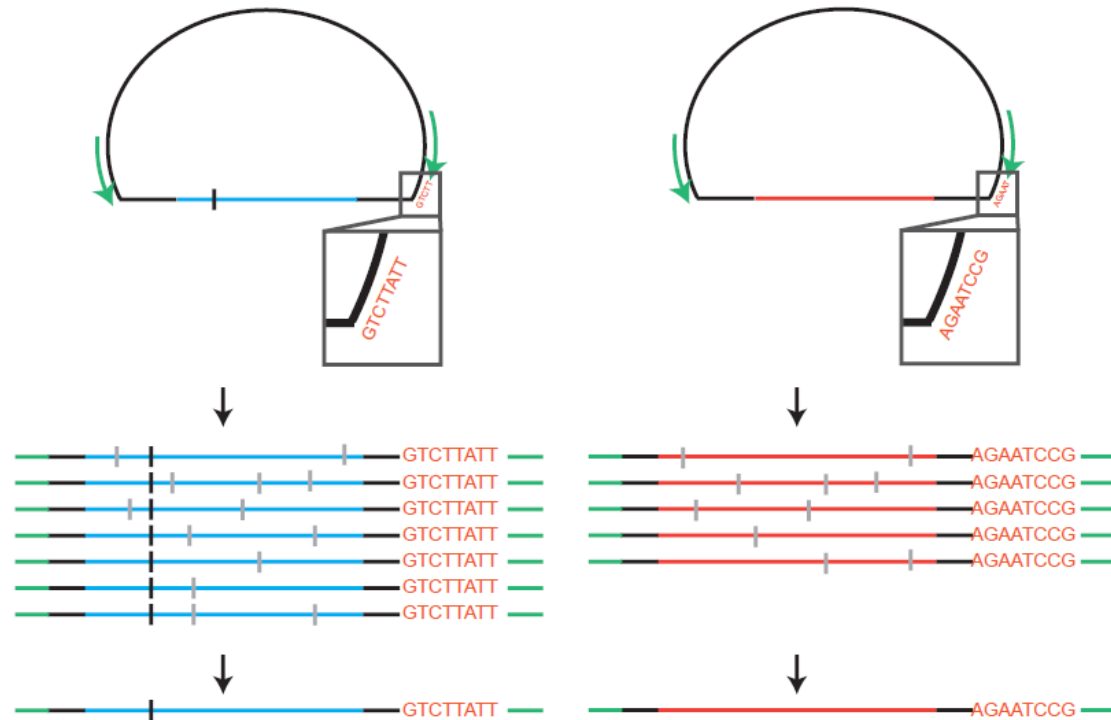
- Strand specifieke amplificatie
- Multiplexing (>1500 targets in een single reactie)
- Flexibel (relatief makkelijk een target toe te voegen)

Sequentie analyse m.b.v. smMIPs



Sequentie analyse m.b.v. smMIPs

Single-molecule-tag guided
assembly of consensus reads

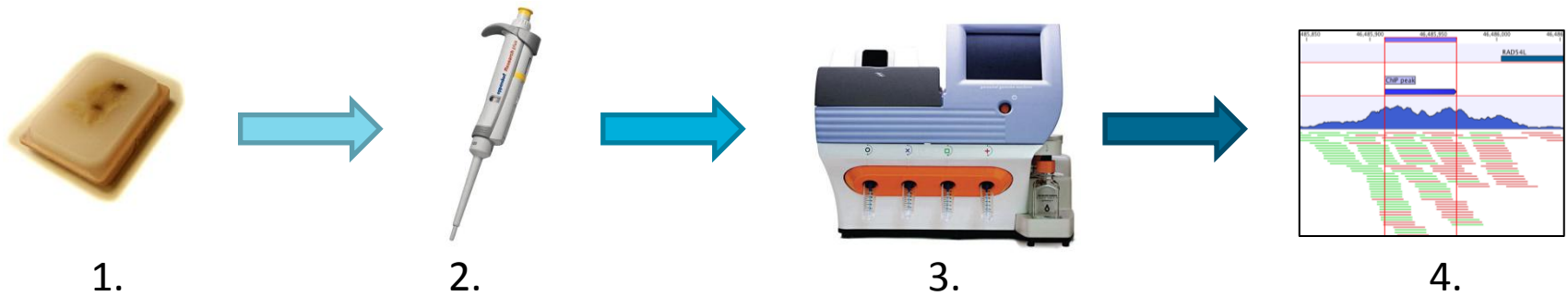


Samenvoegen van PCR duplicaten in consensus reads:

- bekend hoeveel unieke reads
- verminderen van het aantal fout positieve varianten van PCR/sequentie artefacten

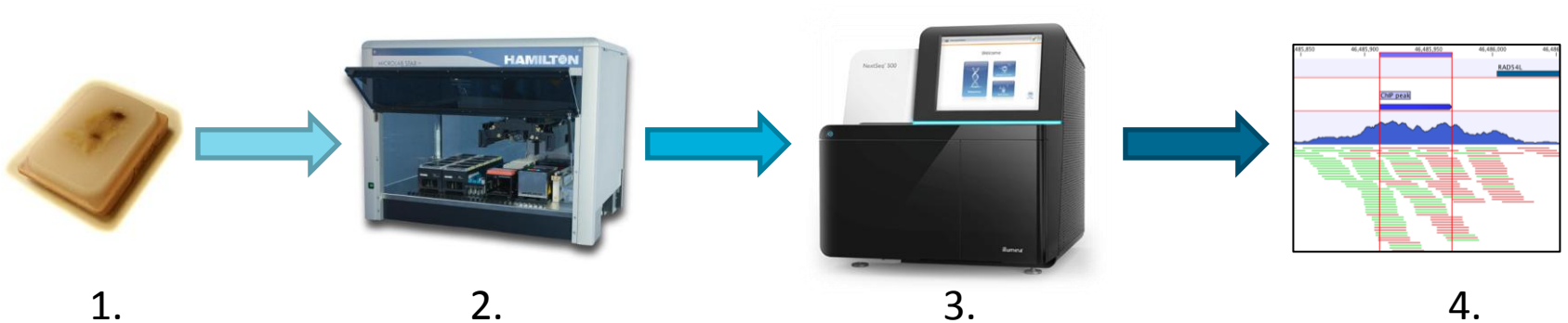
Validatie smMIP

3x / week



VS.

2x / week



Validatie smMIP: plan van aanpak

Pathologie Kwaliteitshandboek	
PLAN VAN AANPAK VALIDATIE	pagina 1 van 6
TITEL: Validatie SeqNext analyse van het Nijmegen smMIP Cancer Hotspot panel (LTG-P)	
Naam verantwoordelijk staflid: B. Tops Naam van degene die validatie gaat uitvoeren: A. Eijkelenboom / A. Kastner-van Raaij Naam van opsteller plan van aanpak: B. Tops / A. Eijkelenboom	
Reden validatie: Target enrichment m.b.v. smMIPs (single molecule molecular inversion probes) zou de gevoeligheid van de sequentie analyse (variant detectie) moeten verhogen. Daarnaast is het idee dat vooral de betrouwbaarheid van sequentie data van kwalitatief slecht DNA beter interpreteerbaar is door het gebruik 'molecular barcoding'. Ook de cytosine deaminering die de sequentie analyse van FFPE materiaal bemoeilijkt, kunnen met behulp van de strand-specifieke amplificatie onderscheiden worden van 'echte' C-G>T-A mutaties. De smMIP libraries zullen geanalyseerd worden op de NextSeq500 (Illumina) apparaten. De capaciteit van deze sequence apparaten is aanzienlijk hoger dan die van de huidige IonTorrent apparatuur, waardoor het sequencen voordeliger wordt. Echter, vanwege de grotere sequence capaciteit zal er maar 2x per week een LTG diagnostiek run worden uitgevoerd i.p.v. de huidige 3x per week. Beschrijving te valideren methode: Library prep met het smMIP Cancer Hotspot panel gevolgd door sequentie-analyse op de NextSeq500 Prestatiekenmerken nieuwe... 1. Alle huidige 'hotspot' panelen met bekende van... verschillende Ampliseq panels op de Ion Torrent... moeten als... geanalyseerd worden,... 2. >95% van de hotspot posities moeten zijn 'gecov...' minimaal 2 smMIPs, bij voorkeur... smMIP voor iedere strand. 3. Variant detectie (sensitiviteit) moet vergelijkbaar of hoger zijn dan de Ampliseq/Ion Torrent strategie 4. Aantal positieven (specificiteit) moet niet hoger... dan bij de Ampliseq/IT strategie 5. Bij een... analyse gedurende 6 weken moet het aantal uitvallers kleiner of gelijk zijn... bij de Ampliseq/IT strategie 6. Bij een... analyse gedurende 6 weken moet de doorlooptijd in de 2e maand bij >90% van de monsters ≤6 werkdagen zijn. De... dient ook om de flow binnen het CGAL te... Versie: 02	

Design:

- Alle diagnostisch relevante regio's in 1 panel
- >95% van de regio's getarget door ≥ 2 smMIPs (bij voorkeur op verschillende DNA strands)

Sensitiviteit:

NextSeq/smMIPs $\geq$ IonTorrent/Ampliseq

Specificiteit:

NextSeq/smMIPs $\geq$ IonTorrent/Ampliseq

Diagnostiek flow:

- Aantal uitvallers NextSeq/smMIPs $\leq$ IonPGM/Ampliseq
- Doorlooptijd ≤ 6 werkdagen voor > 90% monsters

Design

Cancer Hotspot Panel (CHPv1) (320 smMIPs):

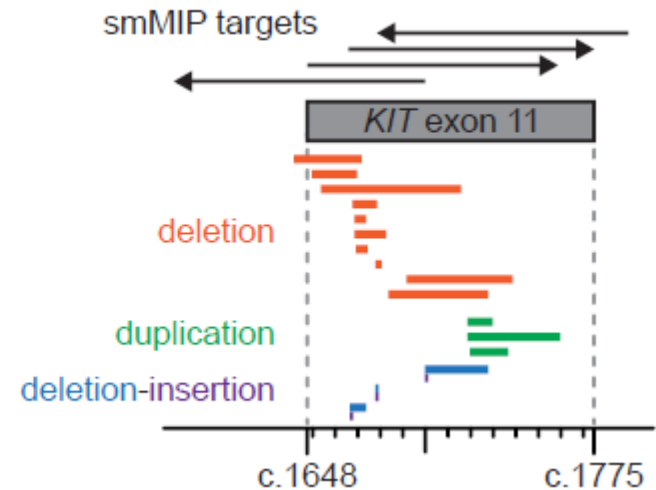
<i>AKT1</i> (exon 3)	<i>H3F3A</i> (exon 2)	<i>MPL</i> (exon 10)
<i>BRAF</i> (exon 15)	<i>H3F3B</i> (exon 2)	<i>MYD88</i> (exon 5)
<i>CTNNB1</i> (exon 3)	<i>HRAS</i> (exons 2,3)	<i>NRAS</i> (exons 2-4)
<i>EGFR</i> (exon 18-21)	<i>IDH1</i> (exon 4)	<i>PDGFRA</i> (exons 12,14,18)
<i>ERBB2</i> (exon 20)	<i>IDH2</i> (exon 4)	<i>PIK3CA</i> (exon 10,21)
<i>GNA11</i> (exons 4,5)	<i>JAK2</i> (exon 14)	<i>TP53</i> (whole gene)
<i>GNAQ</i> (exons 4,5)	<i>KIT</i> (exons 8,9,11,13,14,17)	<i>CDKN2A</i> (whole gene)
<i>GNAS</i> (exon 8)	<i>KRAS</i> (exons 2-4)	<i>AMELX/Y</i>

Implementatie van smMIPs

Parallel draaien:

- >200 samples getest
- 80 verschillende varianten geanalyseerd (100%):

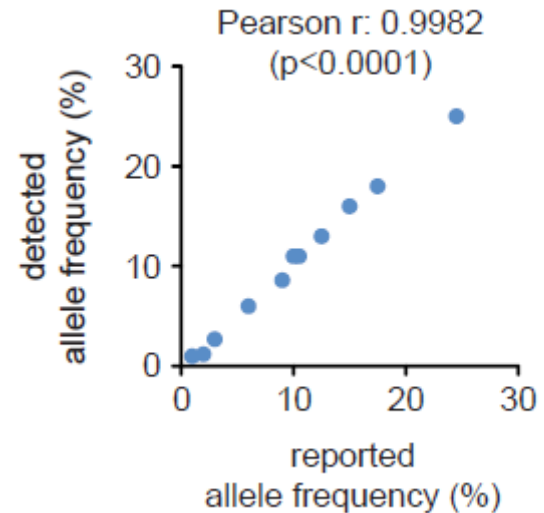
mutation type	number of variants	size
substitution	48	1 bp
deletion	13	3-63bp
duplication	6	2-42bp
deletion/insertion	13	2-29/2-11bp



Implementatie van smMIPs

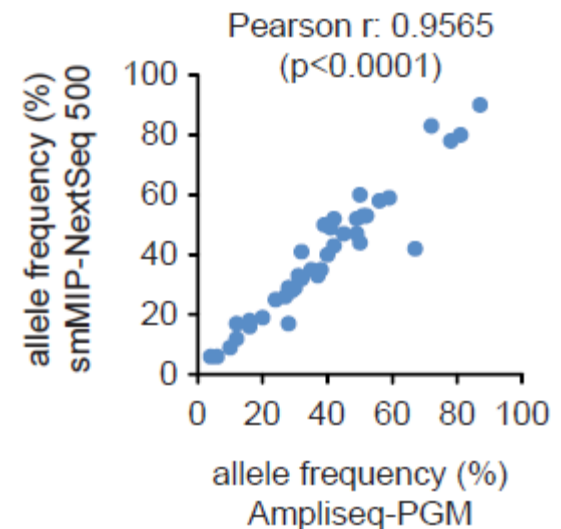
Horizon sample:

- Commercieel referentie sample
- 11 verschillende mutaties

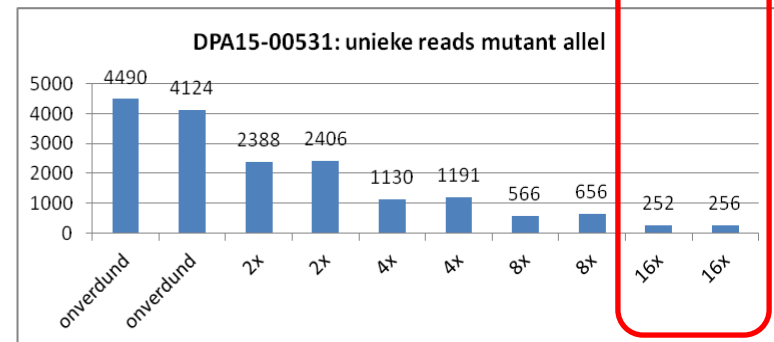
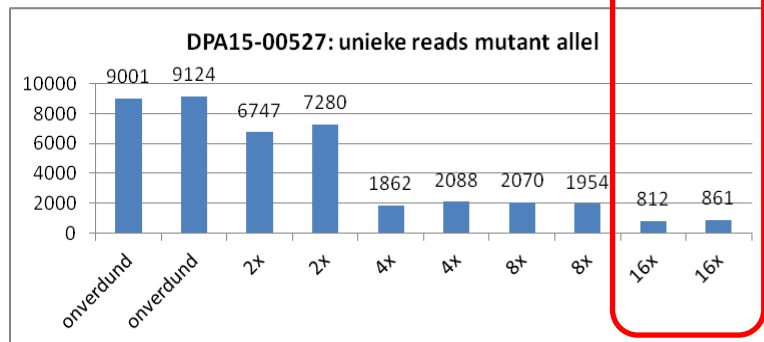
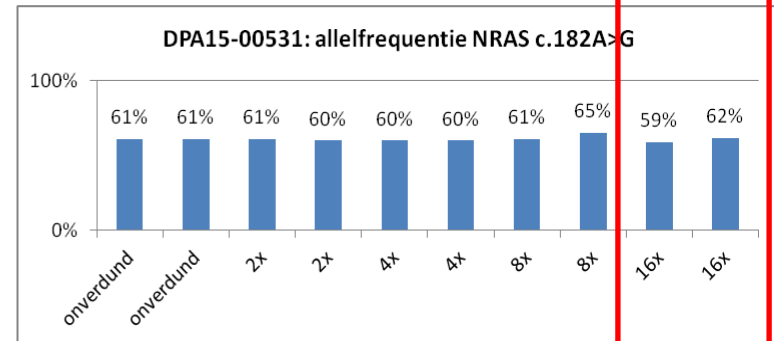
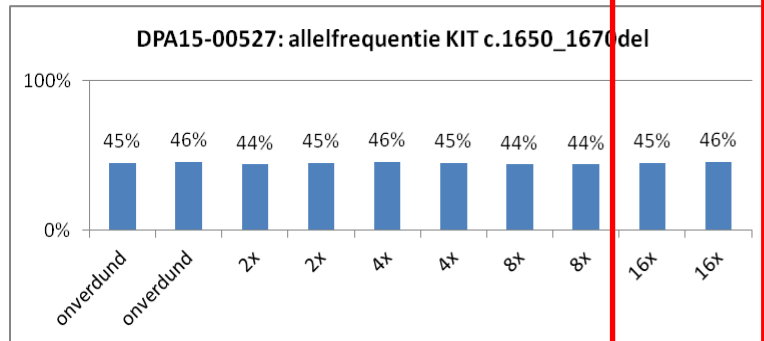
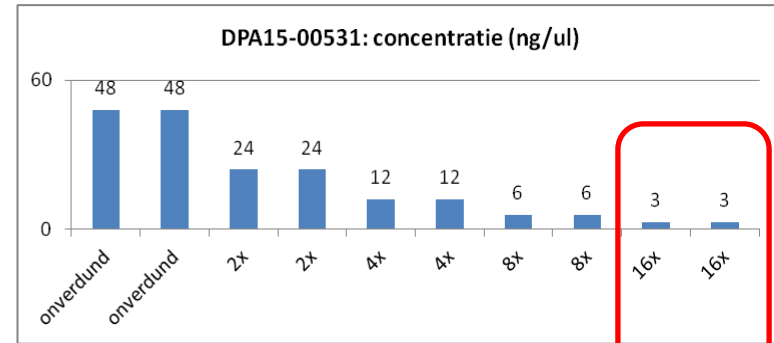
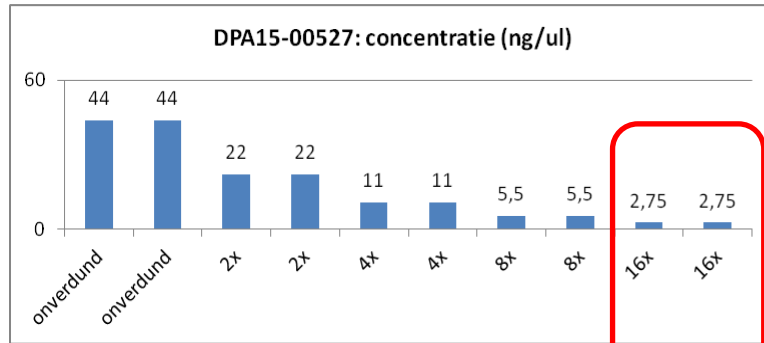


Diagnostiek samples:

- 67 samples
- Frequentie mutant allel:
Ampliseq-PGM vs. smMIP-NextSeq 500



Implementatie van smMIPs



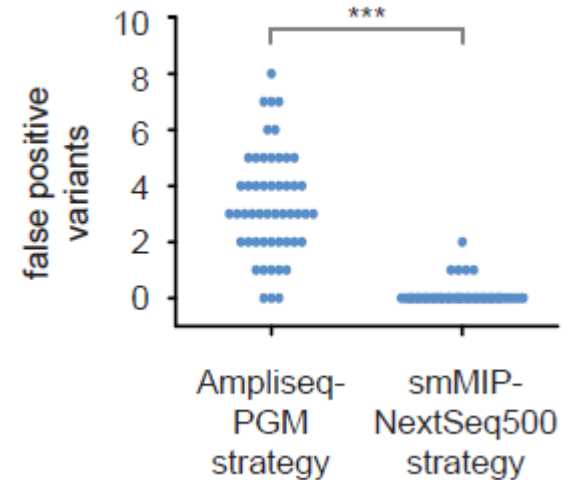
Sensitiviteit

		allelische ratio in sample					
JSI coverage	aantal mutante reads	3,0%	5,0%	10,0%	15,0%	20,0%	30,0%
20	2	0,003	0,012	0,070	0,180	0,322	0,617
40	2	0,021	0,075	0,323	0,595	0,794	0,965
60	2	0,060	0,188	0,589	0,849	0,956	0,998
80	2	0,118	0,323	0,777	0,951	0,992	1,000
100	2	0,189	0,459	0,888	0,986	0,999	1,000
120	2	0,269	0,583	0,947	0,996	1,000	1,000
122	2	0,277	0,594	0,951	0,997	1,000	1,000
160	2	0,432	0,769	0,989	1,000	1,000	1,000
180	2	0,509	0,834	0,995	1,000	1,000	1,000
200	2	0,580	0,882	0,998	1,000	1,000	1,000
248	2	0,722	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000
300	2	0,831	0,982	1,000	1,000	1,000	1,000
350	2	0,898	0,993	1,000	1,000	1,000	1,000
400	2	0,941	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000
450	3	0,908	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000
500	3	0,943	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000
514	3	0,951	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000
800	4	0,993	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1000	5	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2000	10	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Sensitiviteit

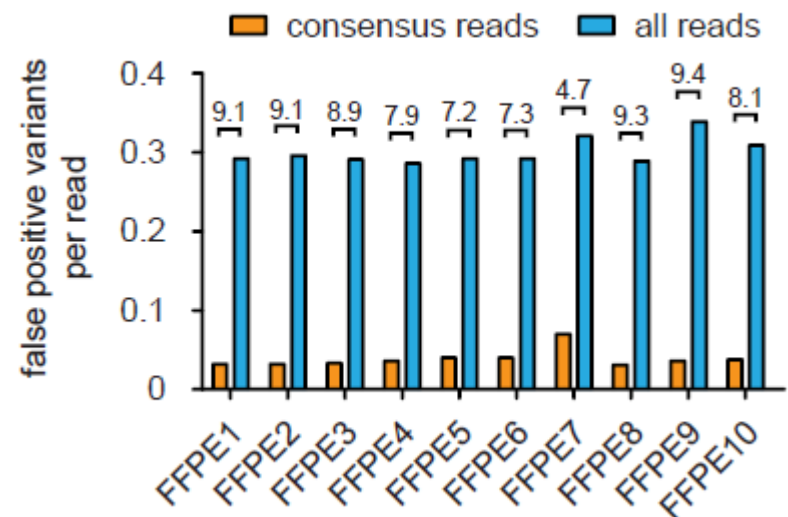
Fout-positieven:

- Ampliseq-PGM vs. smMIP-NextSeq500

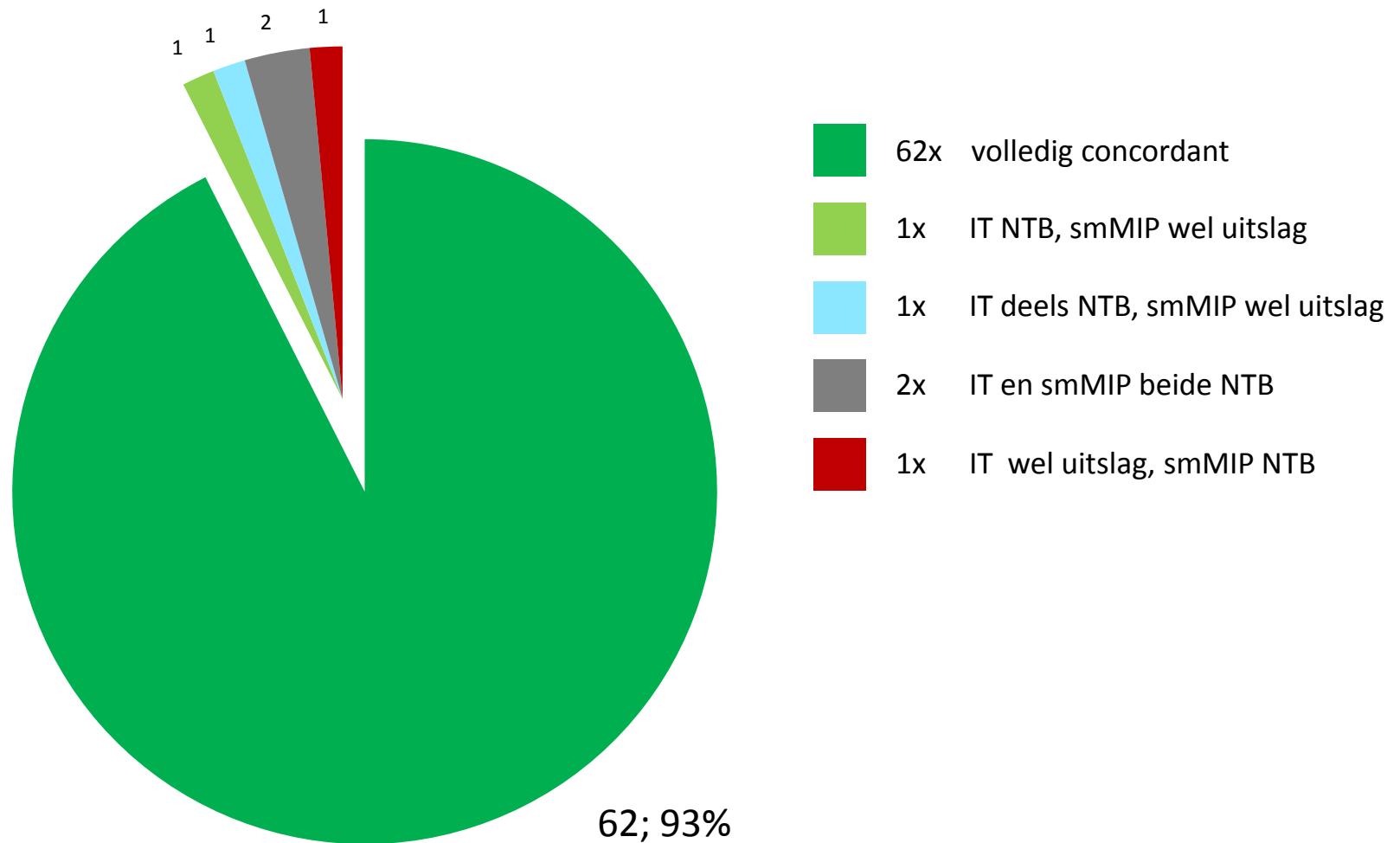


Fout-positieven:

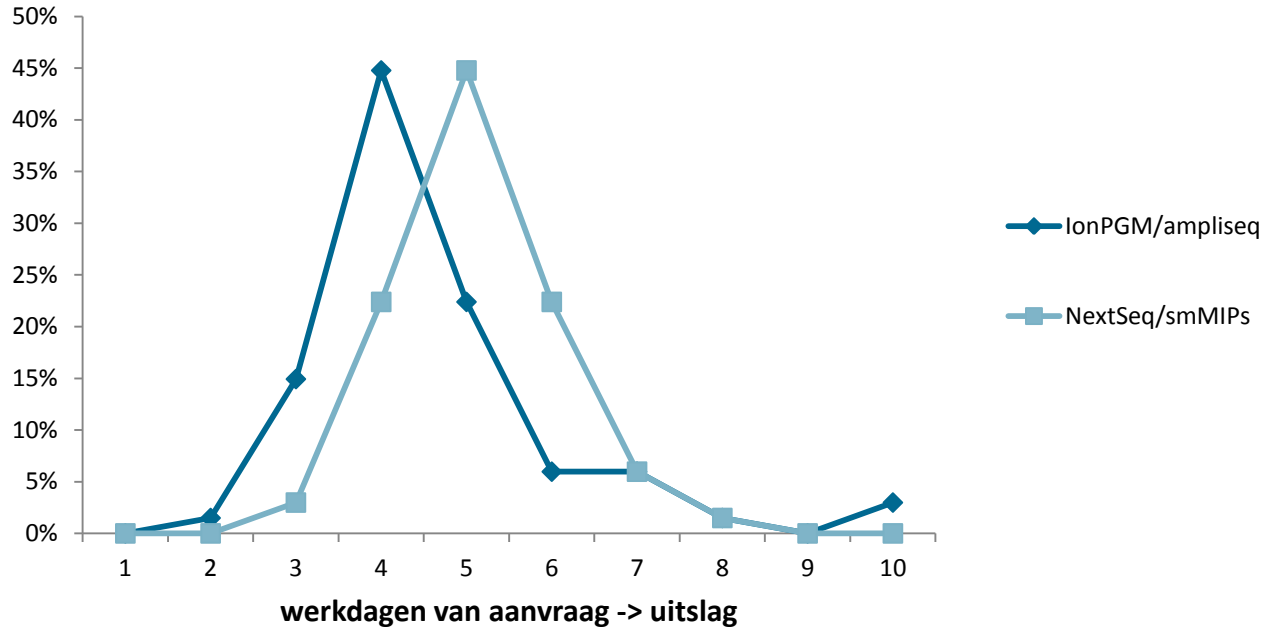
- Data smMIP/NextSeq
- Zonder en met single-molecule tag



Vergelijking gevonden mutaties



Doorlooptijden



- IonPGM Ampliseq > 3x per week
- NextSeq smMIPs > 2x per week

Validatie smMIP: plan van aanpak

Pathologie Kwaliteitshandboek	
PLAN VAN AANPAK VALIDATIE	pagina 1 van 6
TITEL: Validatie SeqNext analyse van het Nijmegen smMIP Cancer Hotspot panel (LTG-PA)	
Naam verantwoordelijk staffid: B. Tops Naam van degene die validatie gaat uitvoeren: A. Eijkelenboom / A. Kastner-van Raaij Naam van opsteller plan van aanpak: B. Tops / A. Eijkelenboom	
Reden validatie: Target enrichment m.b.v. smMIPs (single molecule molecular inversion probes) zou de gevoeligheid van de sequentie analyse (variant detectie) moeten verhogen. Daarnaast is het idee dat vooral de betrouwbaarheid van sequentie data van kwalitatief slecht DNA beter interpreteerbaar is door het gebruik 'molecular barcoding'. Ook de cytosine deaminering die de sequentie analyse van FFPE materiaal bemoeilijkt, kunnen met behulp van de strand-specifieke amplificatie onderscheiden worden van 'echte' C-G>T-A mutaties. De smMIP libraries zullen geanalyseerd worden op de NextSeq500 (Illumina) apparaten. De capaciteit van deze sequence apparaten is aanzienlijk hoger dan die van de huidige IonTorrent apparatuur, waardoor het sequencen voordeliger wordt. Echter, vanwege de grotere sequence capaciteit zal er maar 2x per week een LTG diagnostiek run worden uitgevoerd i.p.v. de huidige 3x per week.	
Beschrijving te valideren methode: Library prep met het smMIP Cancer Hotspot panel gevolgd door sequentie-analyse op de NextSeq500	
Prestatiekenmerken nieuwe 1. Alle huidige 'hotspot' panelen met bekende van verschillende Ampliseq panels op de Ion Torrent sequencer moet bekend van de Target enrichment geanalyseerd worden, moeten als referentie beschikbaar zijn. 2. >95% van de hotspot posities moeten zijn 'gecoverd' door minimaal 2 smMIPs, bij voorkeur 3 smMIP voor iedere strand. 3. Variant detectie (sensitiviteit) moet vergelijkbaar of hoger zijn dan de Ampliseq/Ion Torrent strategie 4. Aantal hotspot posities (specificiteit) moet niet hoger zijn dan bij de Ampliseq/IT strategie 5. Bij een volledige analyse gedurende 6 weken moet het aantal uitvallers kleiner of gelijk zijn aan de uitvallers bij de Ampliseq/IT strategie 6. Bij een volledige analyse gedurende 6 weken moet de doorlooptijd in de 2e maand bij >90% van de monsters ≤6 werkdagen zijn. De patiënt moet ook om de flow binnen het CGAL te weten komen om de diagnostiek te versnellen. Versie: 02 2015	

Design: ✓

- Alle diagnostisch relevante regio's in 1 panel
- >95% van de regio's getarget door ≥ 2 smMIPs (bij voorkeur op verschillende DNA strands)

Sensitiviteit: ✓

NextSeq/smMIPs $\geq$ IonTorrent/Ampliseq

Specificiteit: ✓

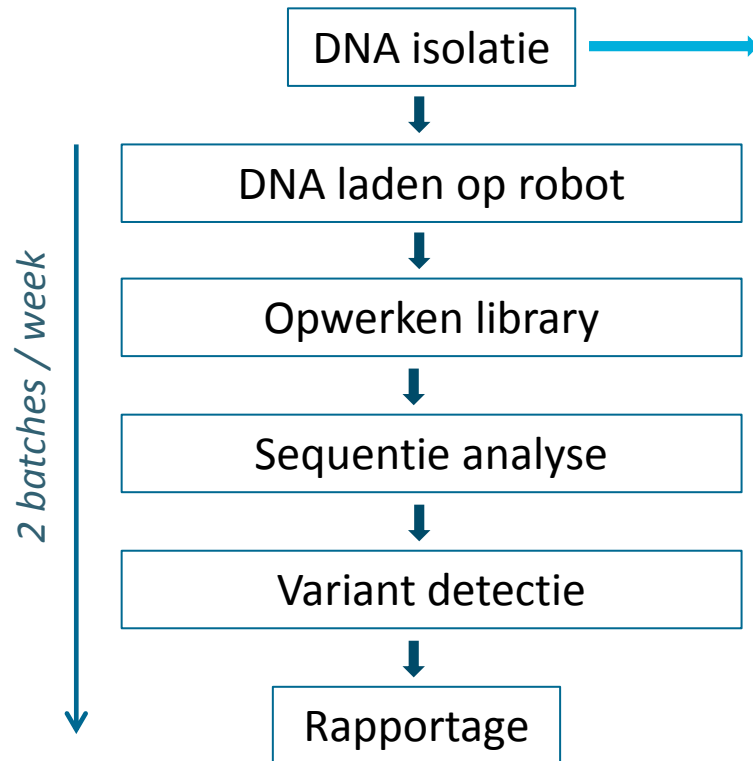
NextSeq/smMIPs $\geq$ IonTorrent/Ampliseq

Diagnostiek flow: ✓

- Aantal uitvallers NextSeq/smMIPs $\leq$ IonPGM/Ampliseq
- Doorlooptijd ≤ 6 werkdagen voor > 90% monsters

Flow van sequentie analyse (smMIPs)

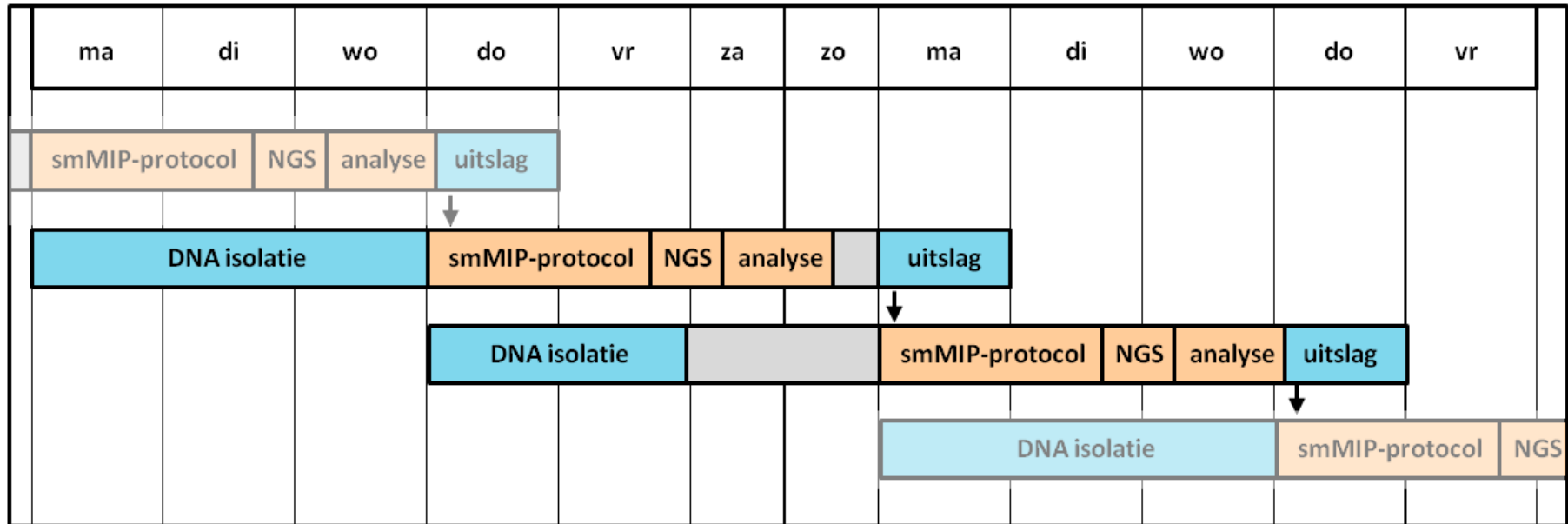
smMIP diagnostiek



Ingang materiaal:

- FFPE / vries / cytologische preparaten / agar cyto
- Input is 3-100ng DNA
- ≥ 500 cellen in smMIP reactie (≈ 3 ng)
- $>5-10\%$ tumorcellen

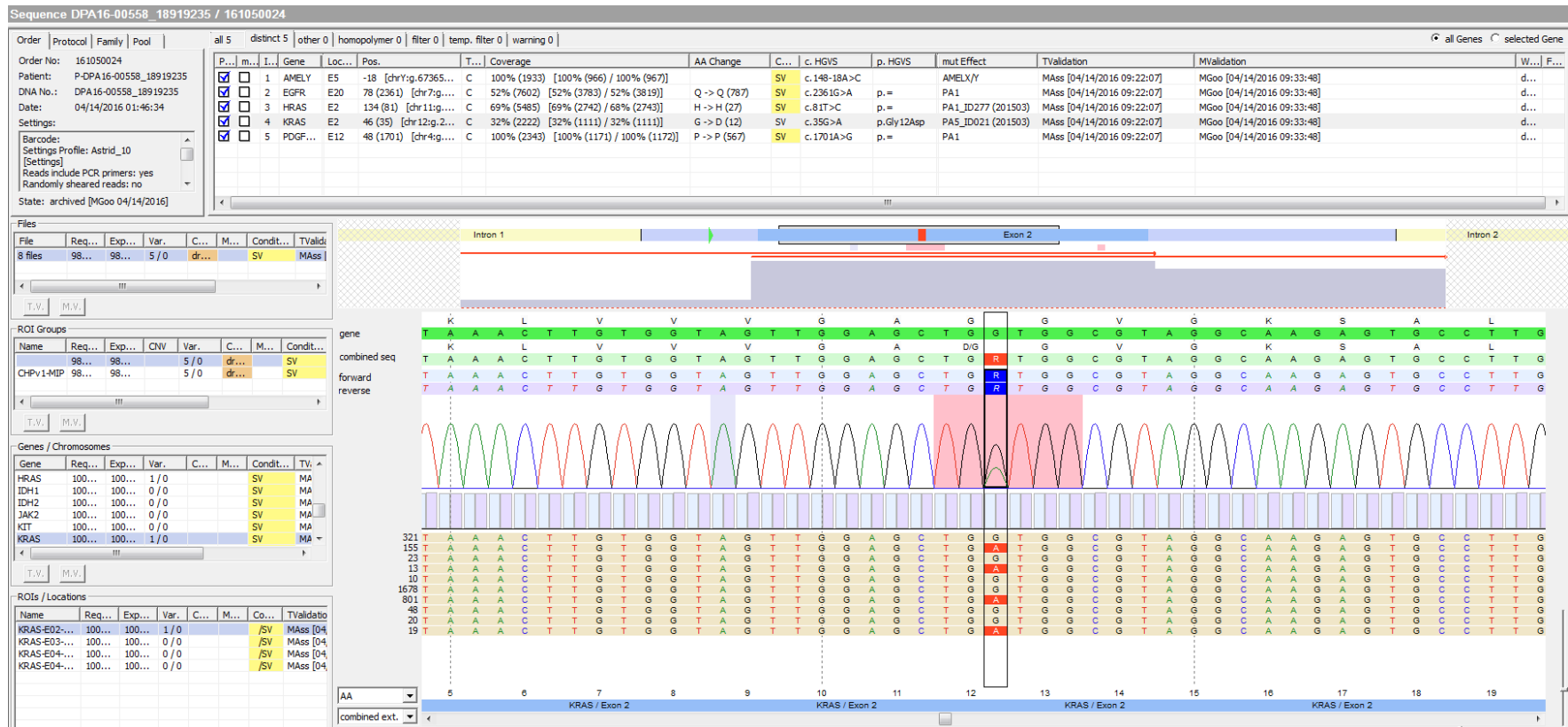
Flow van sequentie analyse (smMIPs)



 Pathologie

 Genetica (robot)

Analyse mbv SeqNext (JSI)



P...	m...	I...	Gene	Loc...	Pos.	T...	Coverage	AA Change	C...	c. HGVS	p. HGVS	mut Effect	TValidation	MValidation
☒		1	AMELY	E5	-18 [chrY:g.67365...	C	100% (1933) [100% (966) / 100% (967)]		SV	c.148-18A>C		AMELY/Y	MAss [04/14/2016 09:22:07]	MGoo [04/14/2016 09:33:48]
☒		2	EGFR	E20	78 (2361) [chr7:g....	C	52% (7602) [52% (3783) / 52% (3819)]	Q -> Q (787)	SV	c.2361G>A	p.=	PA1	MAss [04/14/2016 09:22:07]	MGoo [04/14/2016 09:33:48]
☒		3	HRAS	E2	134 (81) [chr11:g....	C	69% (5485) [69% (2742) / 68% (2743)]	H -> H (27)	SV	c.81T>C	p.=	PA1_ID277 (201503)	MAss [04/14/2016 09:22:07]	MGoo [04/14/2016 09:33:48]
☒		4	KRAS	E2	46 (35) [chr12:g.2...	C	32% (2222) [32% (1111) / 32% (1111)]	G -> D (12)	SV	c.35G>A	p.Gly12Asp	PA5_ID021 (201503)	MAss [04/14/2016 09:22:07]	MGoo [04/14/2016 09:33:48]
☒		5	PDGF...	E12	48 (1701) [chr4:g....	C	100% (2343) [100% (1171) / 100% (1172)]	P -> P (567)	SV	c.1701A>G	p.=	PA1	MAss [04/14/2016 09:22:07]	MGoo [04/14/2016 09:33:48]

UITSLAG DNA ONDERZOEK

Mw. Prof. dr. I.D. Nagtegaal
824 Pathologie
Alhier

Laboratorium Tumorgenetica
Radboudumc
848 Genoomdiagnostiek
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Tel: 024 - 3655722
Fax: 024 - 3616653
Email: itg@umcn.nl
www.umcn.nl/itg

en 227, H3F3A (NM_002107.4): codon 28 en 35, H3F3B (NM_005324.4): codon 37, HRAS (NM_005343.2): codon 12, 13, 59 en 61, IDH1 (NM_005896.3): codon 132, IDH2 (NM_002168.3): codon 140 en 172, JAK2 (NM_004972.3): codon 617, KIT (NM_000222.2): codon 412-513, 550-591, 628-713, 799-828, KRAS (NM_004985.4): codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146, MPL (NM_005373.2): codon 515, MYD88 (NM_002468.4): codon 265, NRAS (NM_002524.4): codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146, PDGFRA (NM_006206.4): codon 552-596, 632-667, 814-848, PIK3CA (NM_006218.2): codon 520-554, 1020-1069. Voor deze indicatie worden de relevante bevindingen in BRAF, KRAS, NRAS en PIK3CA gerapporteerd, aangevuld met gedetecteerde mutaties die voor andere vraagstellingen klinisch relevant zijn.

RESULTAAT EN MOLECULAIRE INTERPRETATIE

Analyses zijn uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit paraffine weefsel; T16-09000, Text15-39048 I-A (zkh Rijnstate, Amhem); 30% neoplastische cellen (gecontroleerd door ATil).

Single molecule Molecular Inversion Probe (smMIP) gebaseerde sequentie-analyse op een NextSeq 500 van het 'Radboud Cancer Hotspot genenpanel' (versie 1.0) waarbij mutaties met een analytische sensitiviteit van 1% kunnen worden aangetoond.

Voor dit monster geldt dat de kans kleiner is dan 5% dat mutaties met een allelfrequentie >3% zijn gemist voor de onderstaande genen.

KRAS (NM_004985.4)

codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146: c.35G>A (p.(Gly12Asp) alias p.G12D); 58% mutant allel

NRAS (NM_002524.4)

codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146: geen mutatie

BRAF (NM_004333.4)

codon 582-615: geen mutatie

PIK3CA (NM_006218.2)

codon 520-554, 1020-1069: geen mutatie

CONCLUSIE

Er is een activerende mutatie aangetoond in KRAS. Colorectaal carcinoom met een activerende mutatie in KRAS reageren relatief slecht op therapie gericht tegen EGFR.

TOELICHTING

Met het 'Radboud Cancer Hotspot genenpanel' (versie 1.0) worden de volgende gebieden geanalyseerd: AKT1 (NM_005163.2): codon 17, BRAF (NM_004333.4): codon 582-615, CTNNB1 (NM_001904.3): codon 19-48, EGFR (NM_005228.3): codon 465-499, 688-823, 849-875, ERBB2 (NM_004448.3): codon 770-785, GNA11 (NM_002067.4): codon 183 en 209, GNAQ (NM_002072.3): codon 183 en 209, GNAS (NM_000516.4): codon 201

Moleculaire Diagnostiek

Bastiaan Tops

Astrid Eijkelenboom

Sandra Hendriks-Cornelissen

Marjolijn Ligtenberg

Genetica CGAL (sequencing facility)

Hicham Ouchene

Ronny Derks

Marloes Tychon

Kornelia Neveling

Marcel Nelen