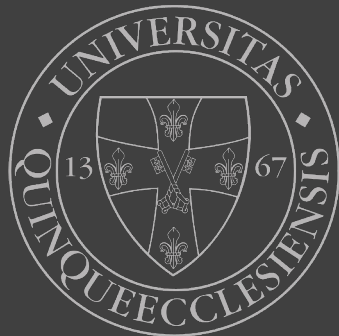


Útmutató az NGS adatok klinikai értelmezéséhez

**Az NGS nyújtotta lehetőségek a mindennapi
molekuláris diagnosztikában**



KAJTÁR BÉLA

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

PATHOLOGIAI INTÉZET

● NGS a PTE Pathologiai Intézetben
PTE Szentágothai Kutatóközpont
Genomika és Bioinformatika Core Facility

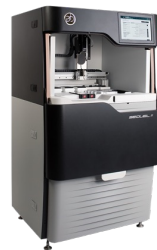
**Illumina
NovaSeq 6000**



**Illumina
NextSeq 550**



**PacBio
Sequel IIE**



**Oxford Nanopore
MinION**

**IonTorrent
Genexus**



**Hungarian Centre
for Genomics
and Bioinformatics**



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
SZENTÁGOTHAI JÁNOS
KUTATÓKÖZPONT**

**iBic
SCIENCE**



● NGS a PTE Pathológiai Intézetben

TP53 panel (1-génes)

BRCA panel (3-génes)

Solid tumor panel (52-génes)

Kiterjesztett solid tumor panel (523-génes)

Myeloid neoplázia panel (59-génes)

Fúziós panel (507-génes)

Szolid tumor panel MSI meghatározással (40-génes)

Nagy szolid tumor panel (110-génes)

Metilációs profil meghatározás (agytumorok, szarkómák)

Validáció

48 *minta*

16 *minta*

52 *minta*

1 *minta*

8 *minta*

5 *minta*

12 *minta*

12 *minta*

8 *minta*

Diagnosztika

175 *minta*

134 *minta*

296 *minta*

34 *minta*

122 *minta*

26 *minta*

57 *minta*

12 *minta*

8 *minta*

● Útmutató az NGS adatok klinikai értelmezéséhez

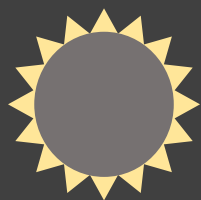
○ variáns nomenklatúra

○ variáns interpretáció

○ variáns allélfrekvencia

Variáns nomenklatúra

Gyakori genetikai variánsok az onkológiában



funkciónyerő



funkcióvesztő

amplifikáció

deléció

transzlokáció

inverzió

duplikáció

● Variáns nomenklatúra

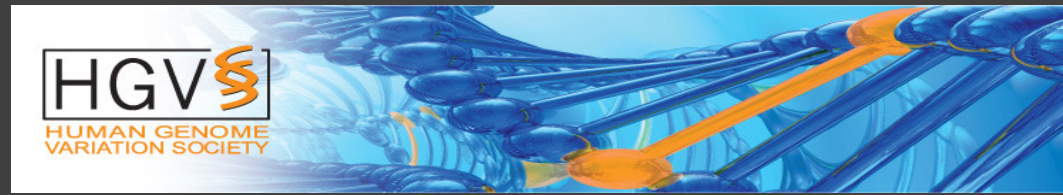
variáns = eltérés a referencia szekvenciához képest

Referencia genom meghatározása

hg19 (GRCh37) *vagy* hg38 (GRCh38)

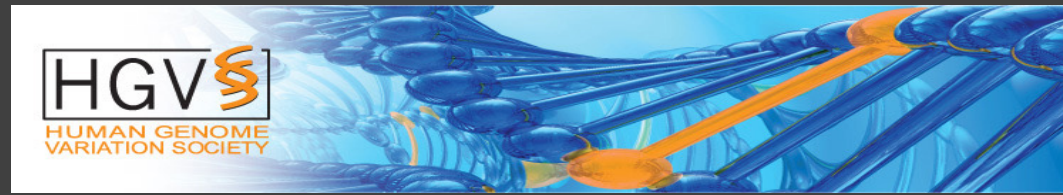
Chr12(hg19):g.111885286C>T = *Chr12(hg38):g.111447482C>T*

● Variáns nomenklatúra



EGFR NM_005228.5:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA(p.Glu746_Ala750del)

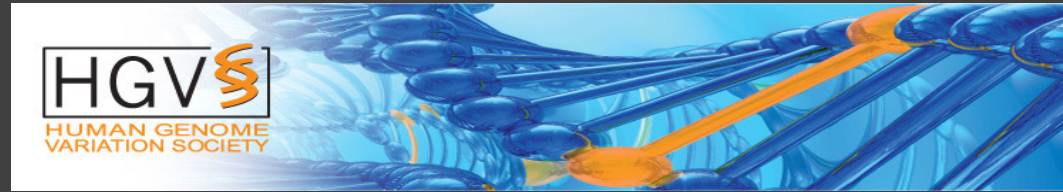
● Variáns nomenklatúra



EGFR NM_005228.5:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA(p.Glu746_Ala750del)

↙
gén neve

Variáns nomenklatúra



EGFR NM_005228.5:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA(p.Glu746_Ala750del)

gén neve

variáns leírása a kódoló szekvencia szintjén

WT1 c.1524A>G (p.Arg508=)

szinonim

ETV6 c.*5T>G

3' UTR

PTPN11 c.1271C>A (p.Pro424Gln)

missense

GATA2 c.-29A>T

5' UTR

DNMT3A c.283A>T (p.Lys95*)

nonsense

STK11 c.465-2A>T

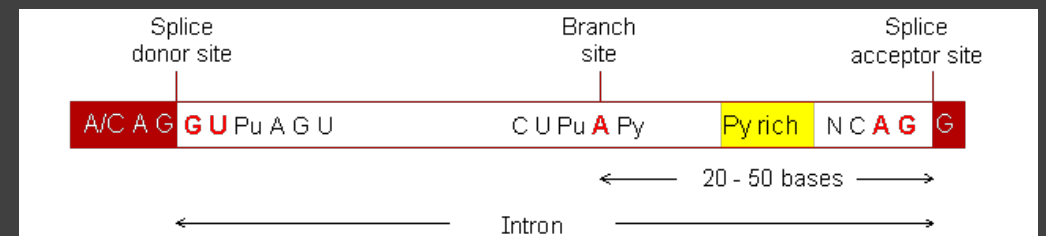
intronicus

NRAS c.154_155insCC (p.Leu52fs*17)

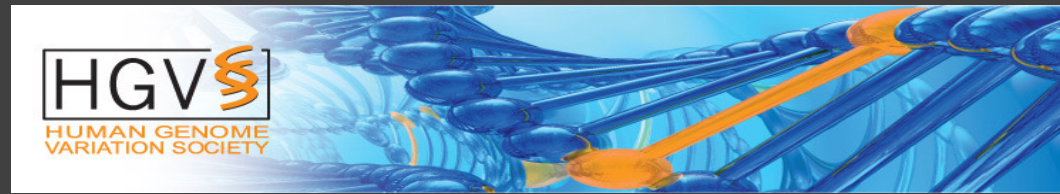
frameshift

CSFR3 c.844-54G>T

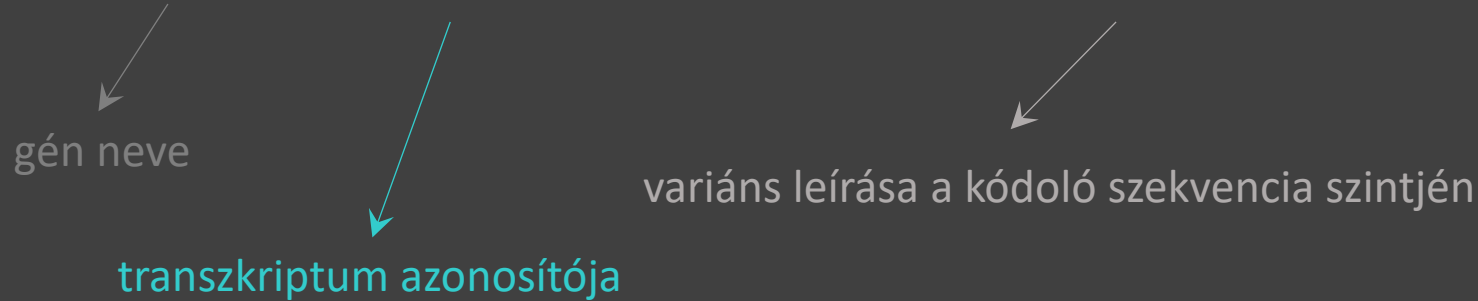
intronicus



Variáns nomenklatúra

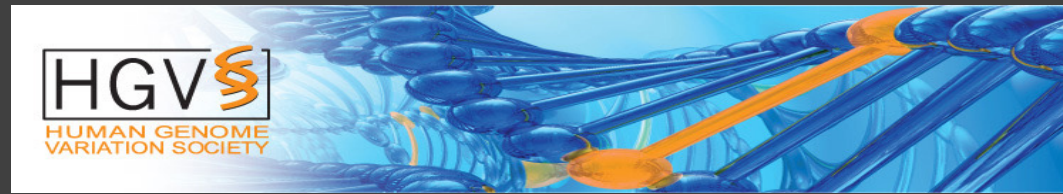


EGFR **NM_005228.5**:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA (p.Glu746_Ala750del)

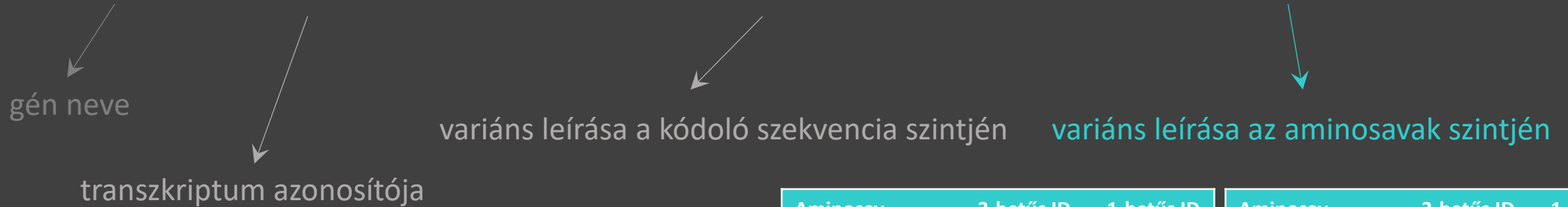


Transzkript ID	HGVS	Exon ID	Fehérje ID
NM_005228.5	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu746_Ala750del	19/28	NP_005219.2
NM_001346899.2	c.2101_2115delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu746_Ala750del	18/27	NP_001333828.1
NM_001346900.2	c.2077_2091delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu693_Ala697del	19/28	NP_001333829.1
NM_001346898.2	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu746_Ala750del	19/27	NP_001333827.1
NM_001346897.2	c.2101_2115delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu701_Ala705del	18/26	NP_001333826.1
NM_001346941.2	c.1435_1449delGAATTAAGAGAAGCA p.Glu479_Ala483del	13/22	NP_001333870.1

Variáns nomenklatúra



EGFR NM_005228.5:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA (p.Glu746_Ala750del)



Aminosav	3-betűs ID	1-betűs ID	Aminosav	3-betűs ID	1-betűs ID
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Methionie	Met	M
Aspartate	Asp	D	Phenylalanine	Phe	F
Cysteine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q	Serine	Ser	S
Glycine	Gly	G	Threonine	Thr	T
Glutamate	Glu	E	Tryptophan	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

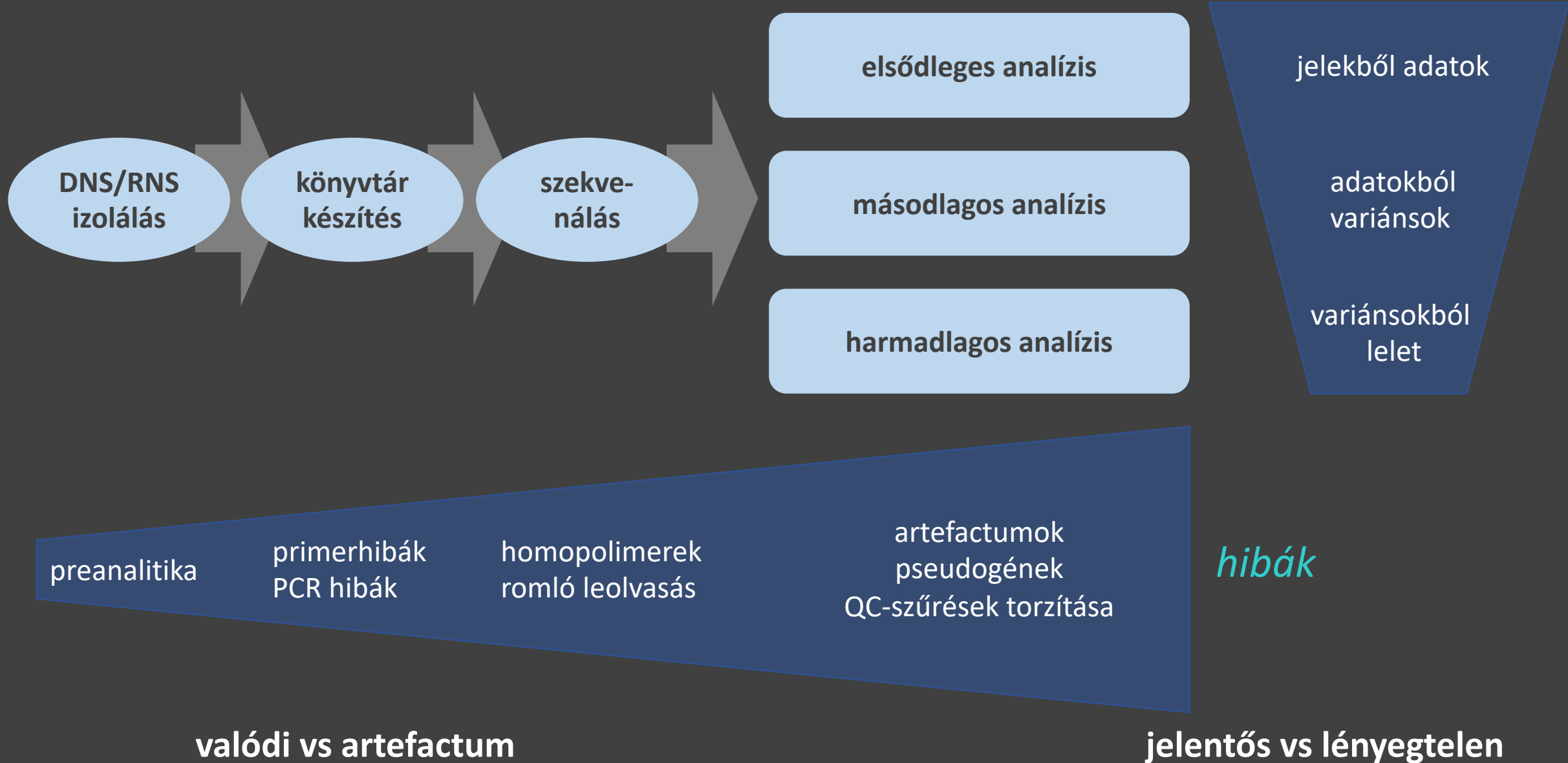
● Útmutató az NGS adatok klinikai értelmezéséhez

○ variáns nomenklatúra

○ variáns interpretáció

○ variáns allélfrekvencia

● Variáns interpretáció



● Variáns interpretáció

Átlagos mennyiség az emberi genomban



kb. 5 000 000



kb. 1000



kb. 100

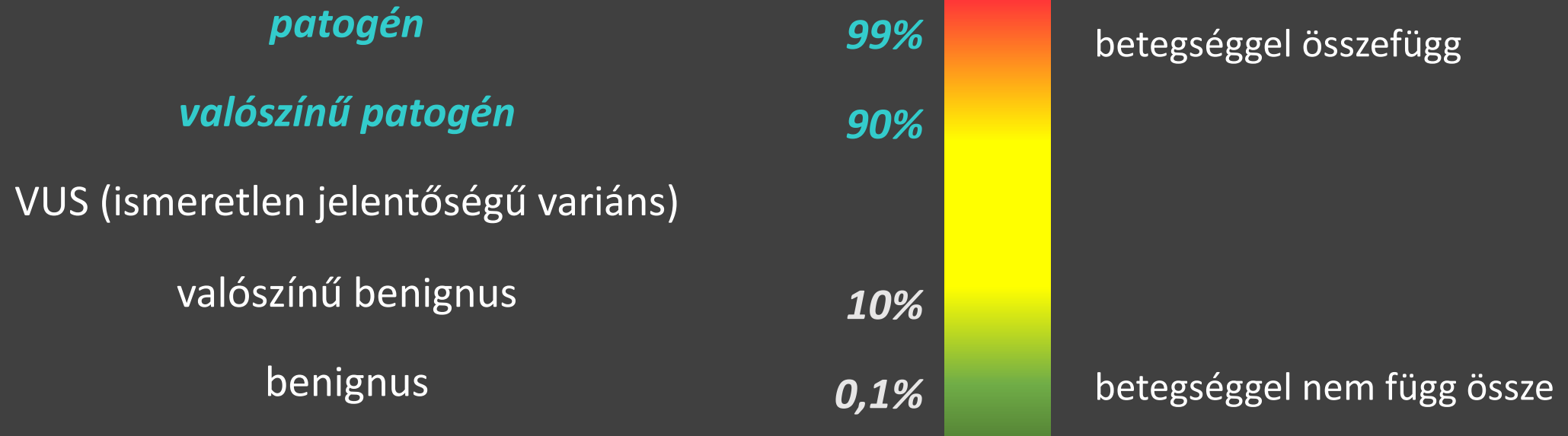
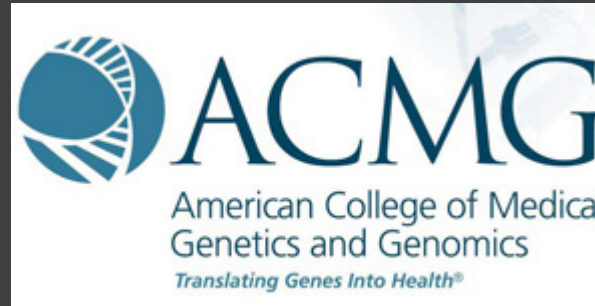
POLIMORFIZMUS

MUTÁCIÓ

≥ 1% gyakoriság az egészséges populációban

betegségre utaló elnevezés

● Variáns interpretáció



evidenciákon alapuló valószínűség számítás
örökletes betegségekre alkalmazható

● Variáns interpretáció – onkológiai jelentőség



1. szint

**kifejezett
klinikai
jelentőség**

**1A
1B**

2. szint

**potenciális
klinikai
jelentőség**

**2C
2D**

3. szint

**ismeretlen
klinikai
jelentőség**

*nincs adat gyakoriság
vagy jelentőség
kapcsán*

4. szint

**nincs
klinikai
jelentőség**

*gyakori
egészségesekben
nincs adat jelentőség
kapcsán*

● Variáns interpretáció – onkológiai jelentőség



	1A	1B	2C	2D
Terápia	<ul style="list-style-type: none">• guideline-kban ismertetett biomarker• FDA-által elfogadott terápia	szakmai konszenzus az adott tumortípus kapcsán, nagy tanulmányok alapján	<ul style="list-style-type: none">• 1A evidencia egy másik tumor kapcsán• klinikai tanulmányban beválogatási kritérium	preklinikai adatok alapján várható hatás
Diagnózis	guideline-kban ismertetett diagnosztikus marker	szakmai konszenzus az adott tumortípus kapcsán, nagy tanulmányok alapján	számos kisebb tanulmány alapján jelentőség	kis tanulmányok, esettanulmányok alapján jelentőség
Prognózis	guideline-kban ismertetett prognosztikus marker	szakmai konszenzus az adott tumortípus kapcsán, nagy tanulmányok alapján	számos kisebb tanulmány alapján jelentőség	kis tanulmányok, esettanulmányok alapján jelentőség

Variáns interpretáció – onkológiai jelentőség

TET2 p.H1380Y
(MDS)

egészségesekben



konzervált/jelentős



funkcionális vizsgálat



ACMG

VUS
(PP3, PS3)

NCCN Ajánlás

1134-1444 kodonban
missense variáns

1A szint

EGFR p.N473Ifs*3
(NSCLC)

egészségesekben



funkcióvesztés jelentős



ClinVarban patogén



ACMG

Valószínű patogén
(PM2, PVS1, PP5)

Tüdőrákban

EGFR funkcióvesztő

3 szint

● Variáns interpretáció – onkológiai jelentőség

	AMP / CAP / ASCO / ACMG		ESMO
JCR Tier 1	Strong clinical significance A: FDA approved therapy / professional guidelines B: Well-powered studies with expert consensus	ESCAT I	Ready for routine use A: Prospective randomized trial B: Prospective non-randomized trial C: Basket trials and trials across tumor types
JCR Tier 2	Potential clinical significance C: FDA approval in different entity / inclusion in clinical trial / multiple small studies with some consensus D: Preclinical trials / case reports	ESCAT II	Investigational therapeutic options A: Retrospective studies B: Prospective trials; endpoints not currently available
		ESCAT III	Hypothetical targets III A: As ESCAT I, but in different entity III B: Alteration with predicted impact in same pathway as ESCAT I
		ESCAT IV	Hypothetical targets IV A: <i>in vivo</i> or <i>in vitro</i> evidence IV B: <i>in silico</i> evidence
JCR Tier 3	Unknown clinical significance No convincing evidence of cancer association	ESCAT V	Combination development Objective response but not improved outcome
JCR Tier 4	Benign variants No existing evidence of cancer association	ESCAT X	Benign variants

AMP/CAP eredeti közlemény (2017):
SF3B1 mutáció AML/MDS-ben – **2C**

WHO HAEM5 (2022)
SF3B1 mutáció AML/MDS-ben – **1A**

● Variáns interpretáció – munkafolyamat

Valóban a mintában van?

térképezés QC, bázishívás QC, VAF, stb.

Egészséges adatbázisban gyakori?

gnomAD (nem-finn európai), 1000genome, ExAC adatbázis, stb.

Szerepel a szomatikus adatbázisokban?

COSMIC, TCGA, MSK, cBioportal, stb.

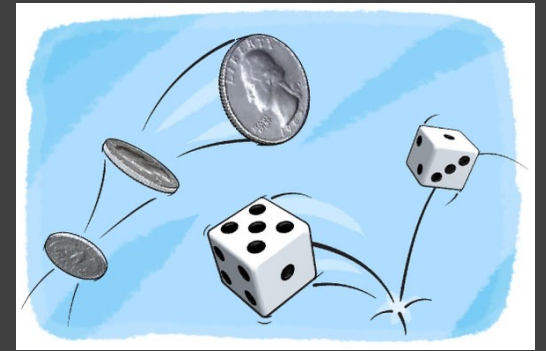
missense variáns

Konzervált a pozíció?/Jelenetős a változás?

PolyPhen2, SIFT, PhyloP, GERP++, stb.
funkcionális vizsgálatok

Intoleráns a gén a missense variánsokra?

gnomAD eloszlás



*funkcióvesztő variáns
(nonsense, frameshift, splicing)*





Jelentős a trunkáció hatása?

pozíció alapján, GeneSplicer, MaxEntScan, stb.
expressziós vizsgálatok

Lehet jelentősége a funkcióvesztésnek?

gnomAD eloszlás, cBioportal, Pubmed

● Variáns interpretáció – döntéstámogató rendszerek

 varsome	 Franklin by genoox
 QCI Interpret	
 ThermoFisher SCIENTIFIC	Oncomine Reporter

**GOLDEN HELIX**
Enabling Precision Medicine**varSEQ**TM

● Kópiaszám eltérések (CNV)

Változás aránya (fold change)

Változás aránya	Tumorsejt arány	Kópia tumorsejtenként
1,5	100%	3
1,5	20%	7

Amplifikáció definíciója:

nem egységes!

> 4 kópia / sejt

> 6 kópia / sejt

> 10 kópia / sejt

> 2 gén / kromoszóma arány

● Fúziós transzkriptumok (strukturális variánsok)

fúziós transzkriptumok nem ritkák

léteznek normális szövetben gyakori transzkriptumok (pl: *RP1-34H18.1::NAV3*)

variáns allélfrekvencia máshogy értelmezendő

kimutathatósági határ módszerfüggő

orthogonalis validáció javasolható

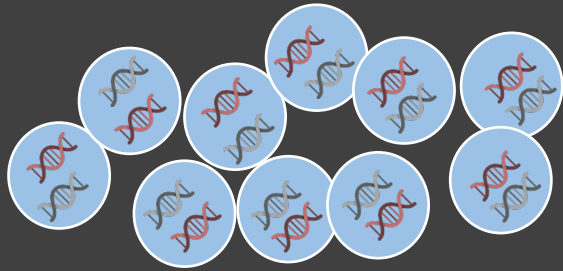
● Útmutató az NGS adatok klinikai értelmezéséhez

○ variáns nomenklatúra

○ variáns interpretáció

○ variáns allélfrekvencia

● Variáns allélfrekvencia

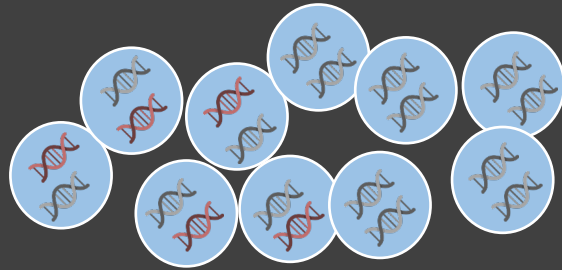


**Tumor-sejt
arány**

$$10/10 = 100\%$$

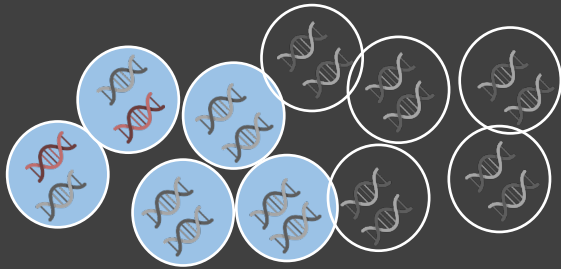
**VAF
(variáns / összes kópia)**

$$10/20 = 50\%$$



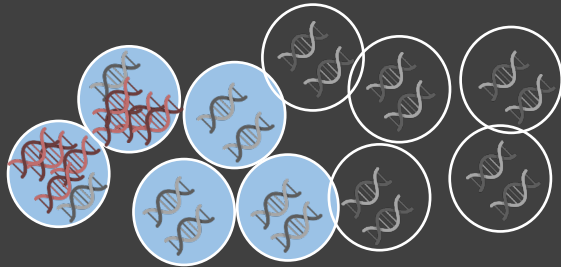
$$10/10 = 100\%$$

$$5/20 = 25\%$$



$$5/10 = 50\%$$

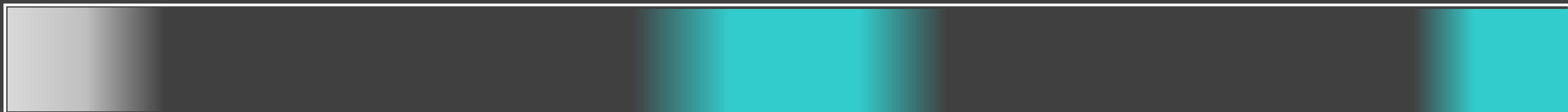
$$2/20 = 10\%$$



$$5/10 = 50\%$$

$$8/20 = 40\%$$

Variáns allélfrekvencia



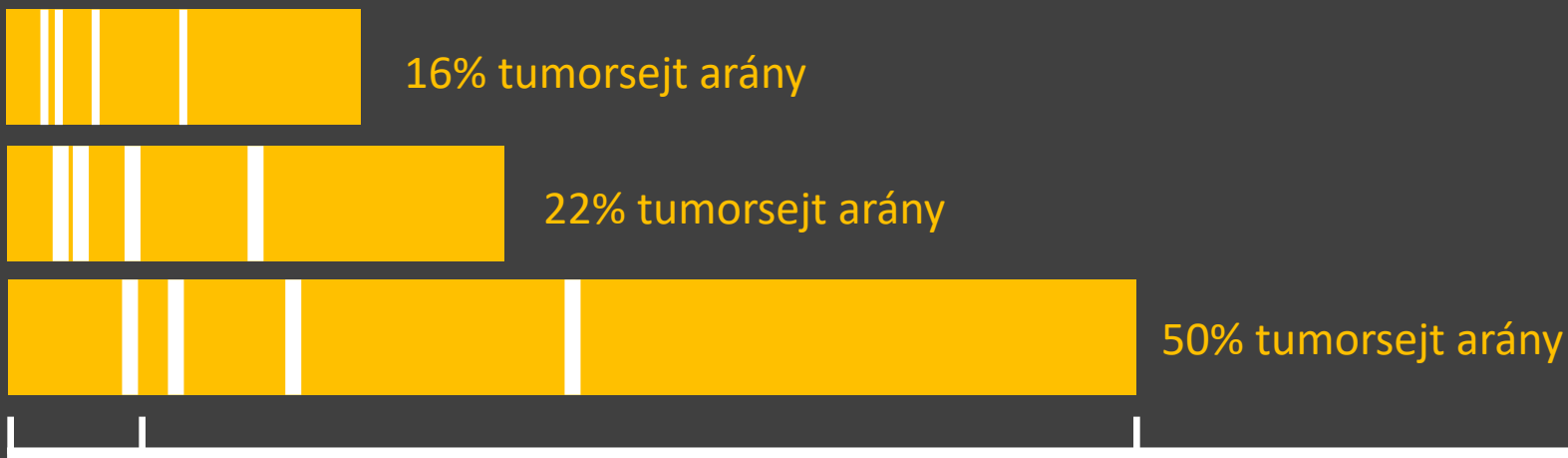
artefactumok

csírvonal
heterozigóta
mutációk

csírvonal
homozigóta
mutációk

nagy tumorsejt arány esetén
validálni érdemes

amplifikáció
normál allél deléciója



EGFR c.2254_2277del VAF: 84%
EGFR amplifikáció: 11,7 kópia/sejt
kb. 75% tumorsejt

0% 5%

50%

100%

The Atlantic

One Patient, Two Cancer DNA Tests, Two Different Results

What happens when cutting-edge medicine offers up conflicting answers?



A patient receives chemotherapy treatment for breast cancer.

Eric Gaillard / Reuters

SARAH ZHANG | DEC 15, 2016 | HEALTH

● NGS harmonizációja

külső minőségbiztosítási programokhoz csatlakozás

workshop az NGS munkafolyamat megbeszélésére

workshop a variáns interpretáció megbeszélésre

körvizsgálat jelleggel variánsinterpretáció harmonizációja



QIAGEN Custom
Myeloid Panel
(59-génes)

MHTT
Onkohaematológiai
Molekuláris
Diagnosztikai
Munkacsoport



SE



SZTE



DE



DPC



PTE