Význam molekulární patologie pro účely precizní onkologie

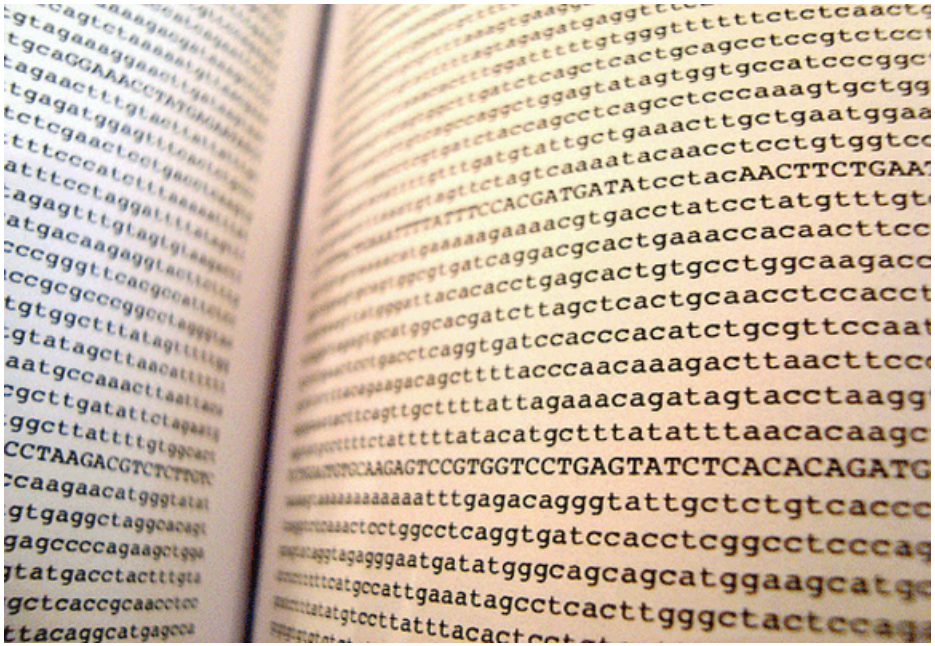
Slabý Ondřej

Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno
Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

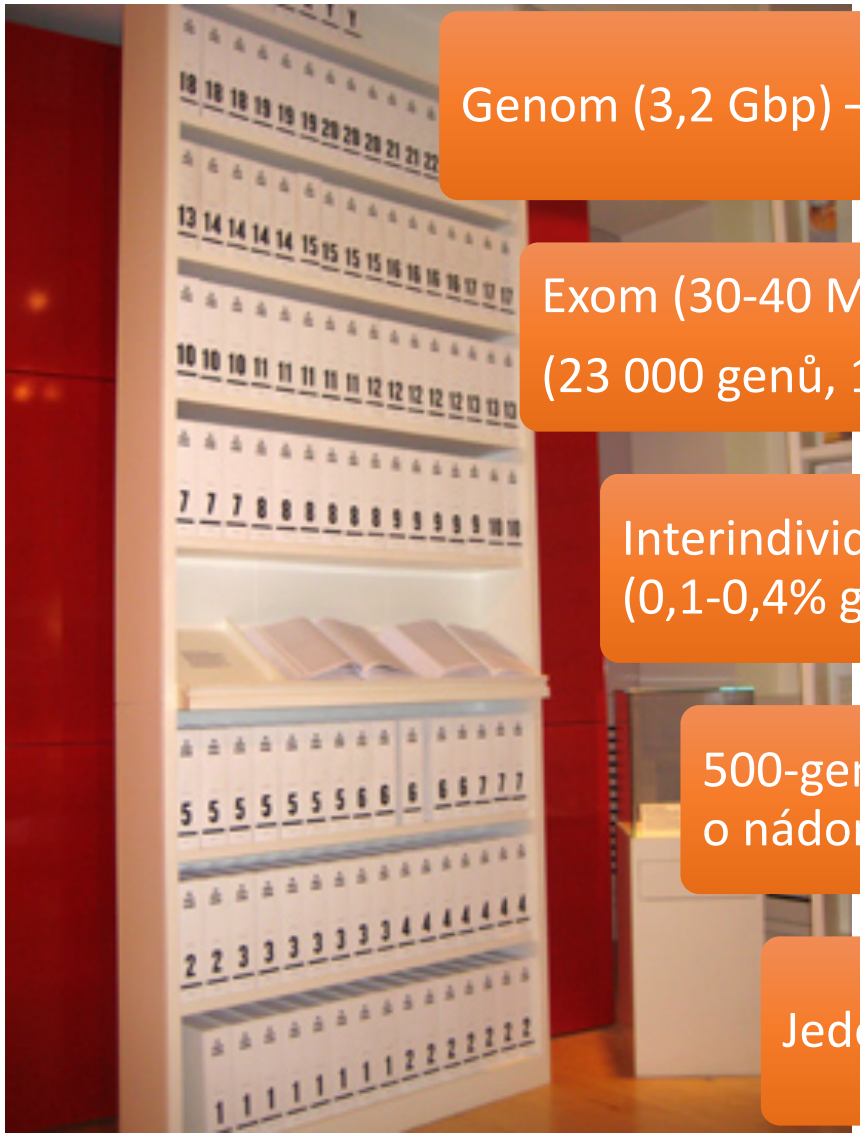
Informační obsah lidského genomu



3,2 miliard jednotek DNA kódu:

- 127 knih
- 1000 stran na knihu
- cca 25000 znaků na stranu

Informační obsah lidského genomu



Genom (3,2 Gbp) – 127 knih

Exom (30-40 Mbp) – 2,5 knihy
(23 000 genů, 180 000 exonů)

Interindividuální variabilita – 1 kniha
(0,1-0,4% genomu)

500-genový panel – 40 stran (kapitola
o nádorové biologii)

Jeden gen – <1/10 strany

Akumulace genetických změn vedoucí ke vzniku nádoru

Maligní transformace buněk je důsledek akumulace genetických změn

Doprovodné (passenger) mutace nejsou kauzálně zapojené do patogeneze nádoru

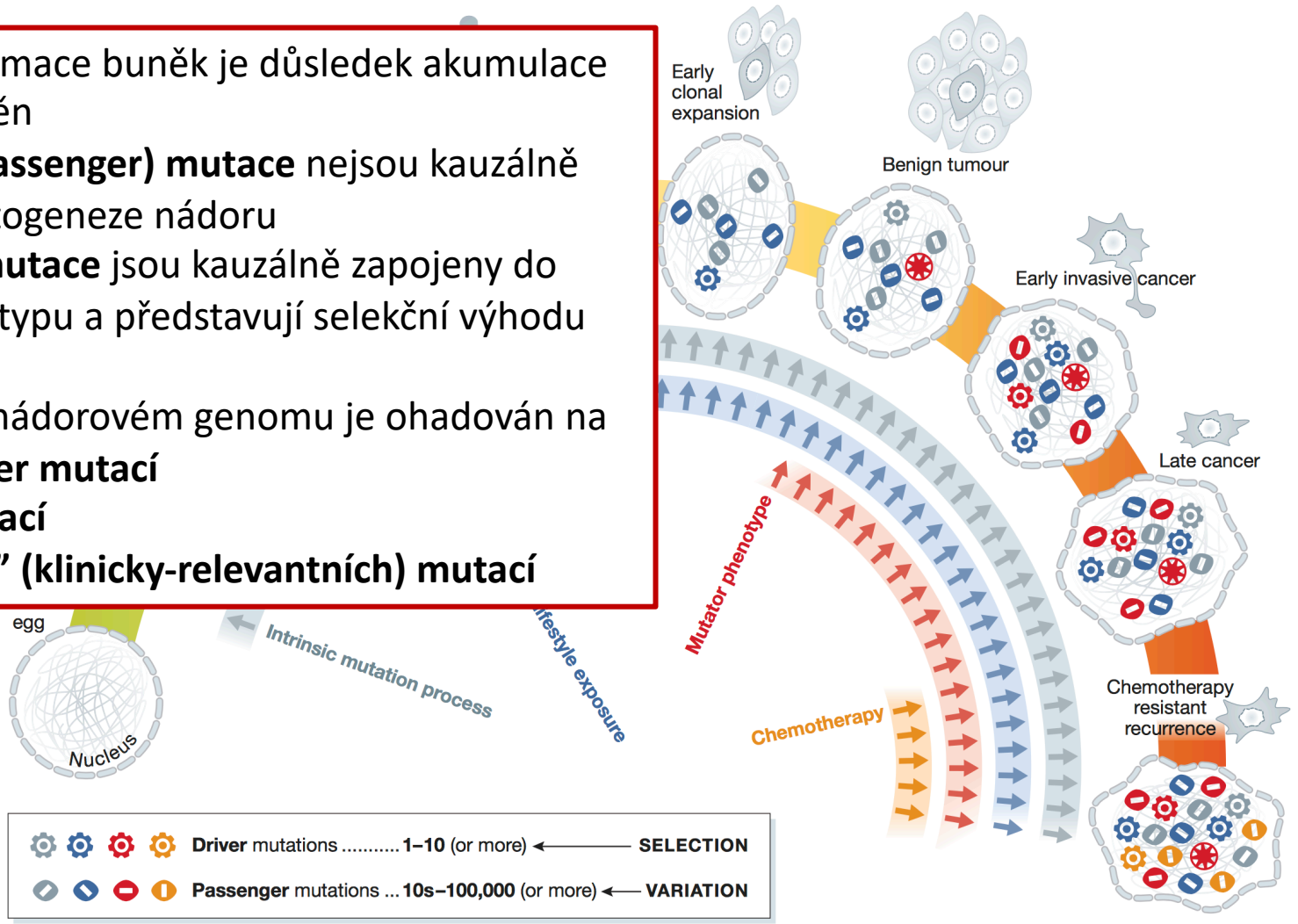
Řídící (driver) mutace jsou kauzálně zapojeny do maligního fentotypu a představují selekční výhodu

Počet mutací v nádorovém genomu je ohadován na

10 000 passenger mutací

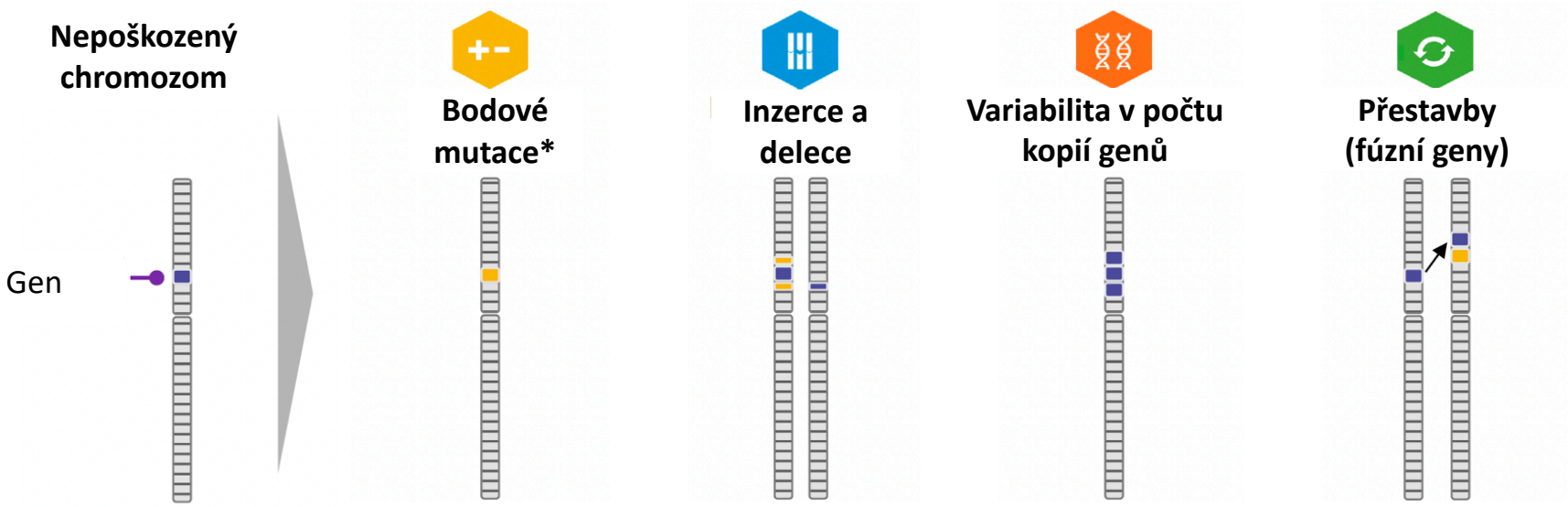
5-10 driver mutací

1-2 “actionable” (klinicky-relevantních) mutací



Stratton, M.R. (2013) *EMBO Mol Med.* 5(2):169-72.

Typy genetických změn v nádorovém genomu



* mutace nebo varianta?
historické zvyklosti versus
jasná názvoslovná pravidla

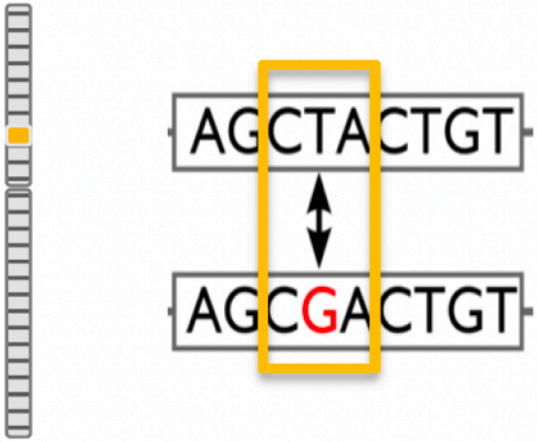
Stratton, M.R. (2013) *EMBO Mol Med.* 5(2):169-72.

Typy genetických změn v nádorovém genomu – bodové mutace

Záměna jedné báze v sekvenci DNA

Bodové mutace (SNV*)

** SNV = single nucleotide variation*

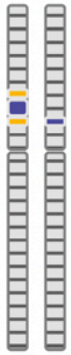


Klinicky významné příklady

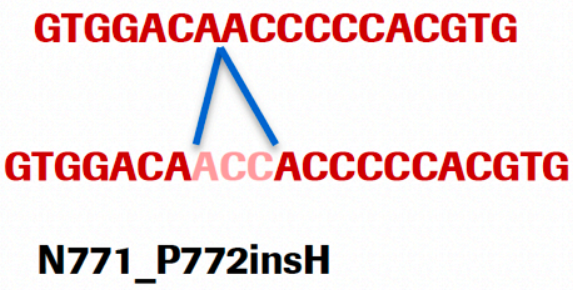
***EGFR* T790M**: rezistence k inhibitorům EGFR
***EGFR* L858R or L861Q**: citlivost k inhibitorům EGFR
***BRAF* V600E**: citlivost k inhibitorům BRAF

Typy genetických změn v nádorovém genomu – inzerce/delece

Inzerce a delece (indels)



Genové inzerce a delece (1-40 parů bází)



Klinicky významné příklady

***EGFR* delece v exonu 19:** citlivost k inhibitorům EGFR

Typy genetických změn v nádorovém genomu – variabilita v počtu kopií genů

Amplifikace nebo delece jednotlivého genu nebo chromozomální oblasti

→ amplifikace onkogenu
→ delece nádorového supresoru

Variabilita v počtu kopií genů (CNV*)

** CNV = copy number variation*

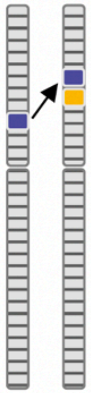
Klinicky významné příklady

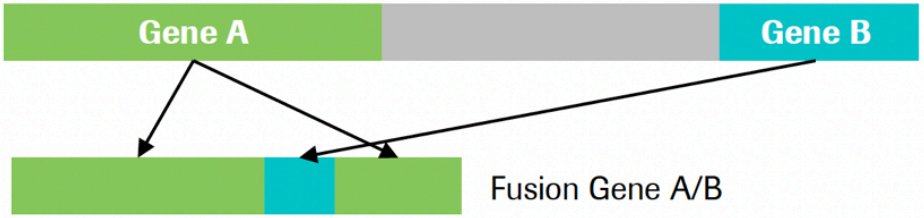
Amplifikace HER2: citlivost k herceptinu u karcinomu prsu
Delece CDKN2A: společně s inaktivací Rb je spojena s citlivostí k CDK4/CKD6 inhibitorům

Typy genetických změn v nádorovém genomu – přestavby (fúzní geny)

Chromozomové zlomy vedou ke kolokalizaci 2 genů nebo jejich částí, ktere normálně neleží blízko sebe

Přestavby (fúzní geny)

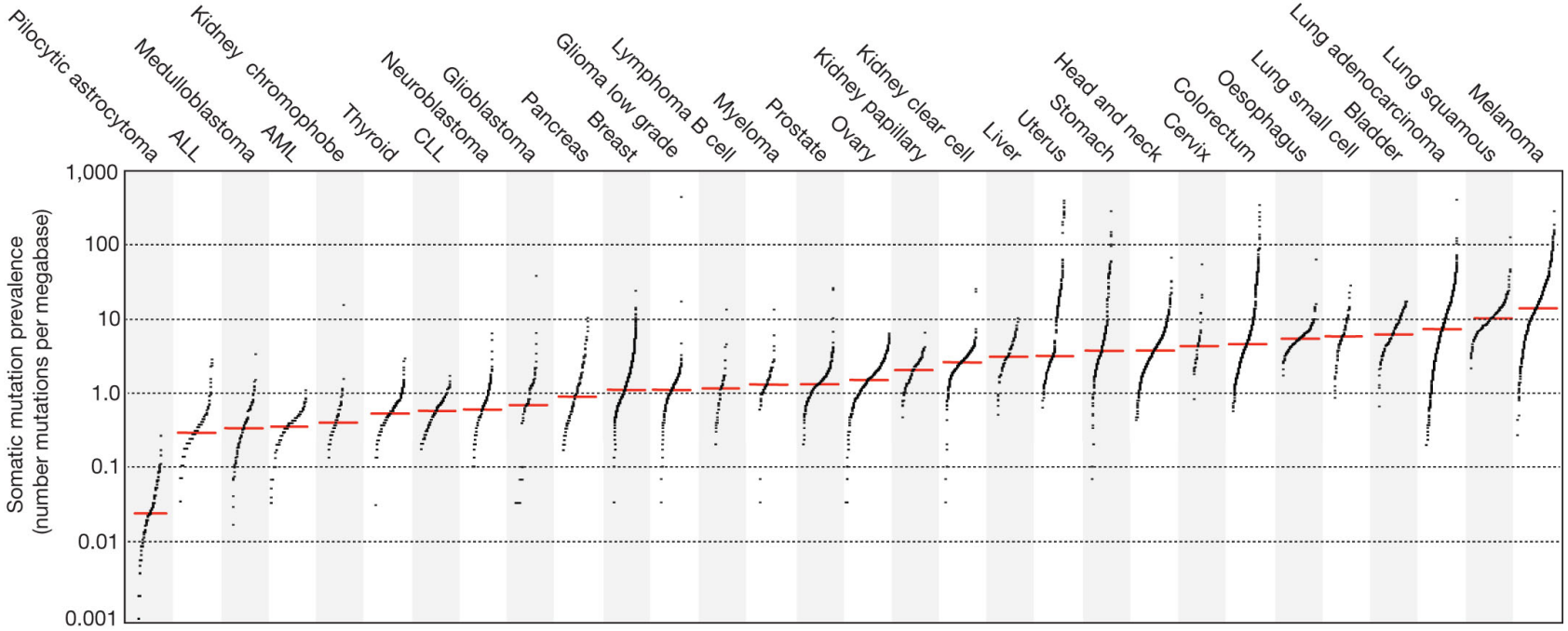




Klinicky významné příklady

ALK-EML4: karcinom plic, citlivost k ALK inhibitoru
TMPRSS-ERG: u karcinomu prostaty
***RET* fusions**: citlivost k RET inhibitorům u karcinomu plic a štítné žlázy

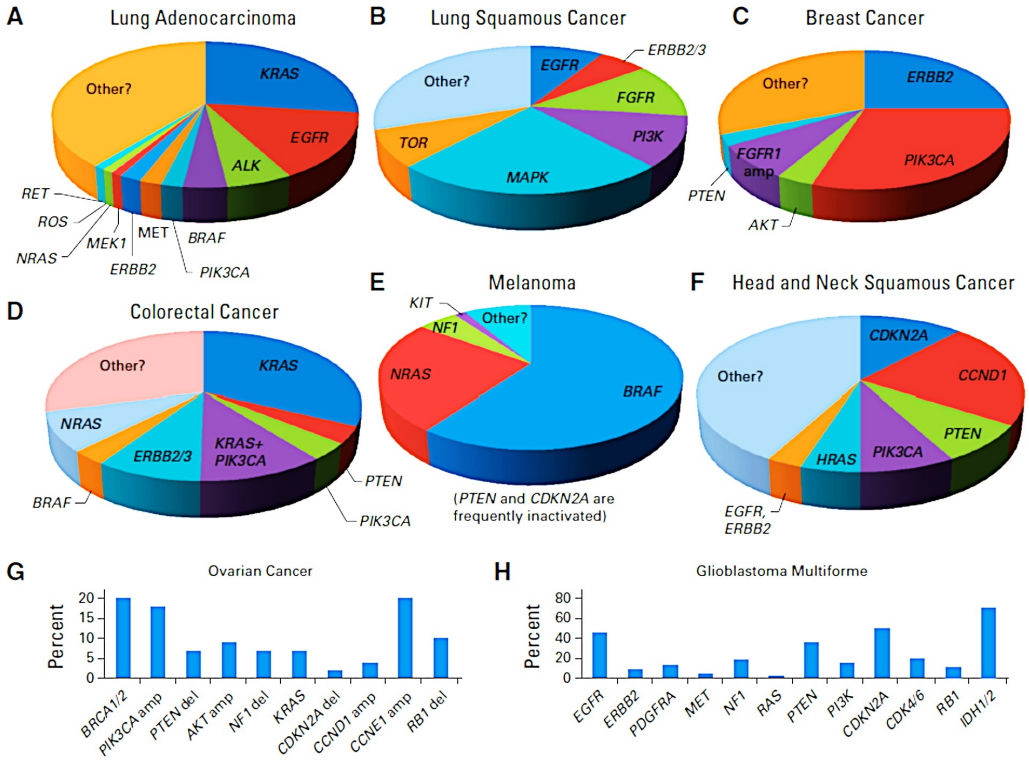
Inter-nádorová variabilita
Prevalence somatických mutací u různých nádorových onemocnění



Různé typy nádorů jsou charakteristické různou mírou genomové nestability a počtem somatických mutací v nádorovém genomu!

LB Alexandrov *et al. Nature* 1-7 (2013) doi:10.1038/nature12477

Intra-nádorová variabilita
Diverzita driverových mutací u jednoho typu nádorového onemocnění a koncept MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE NÁDORŮ



Histopatologicky definovaná diagnostická jednotka

=

skupina nemocí s rozdílnou molekulární patologií

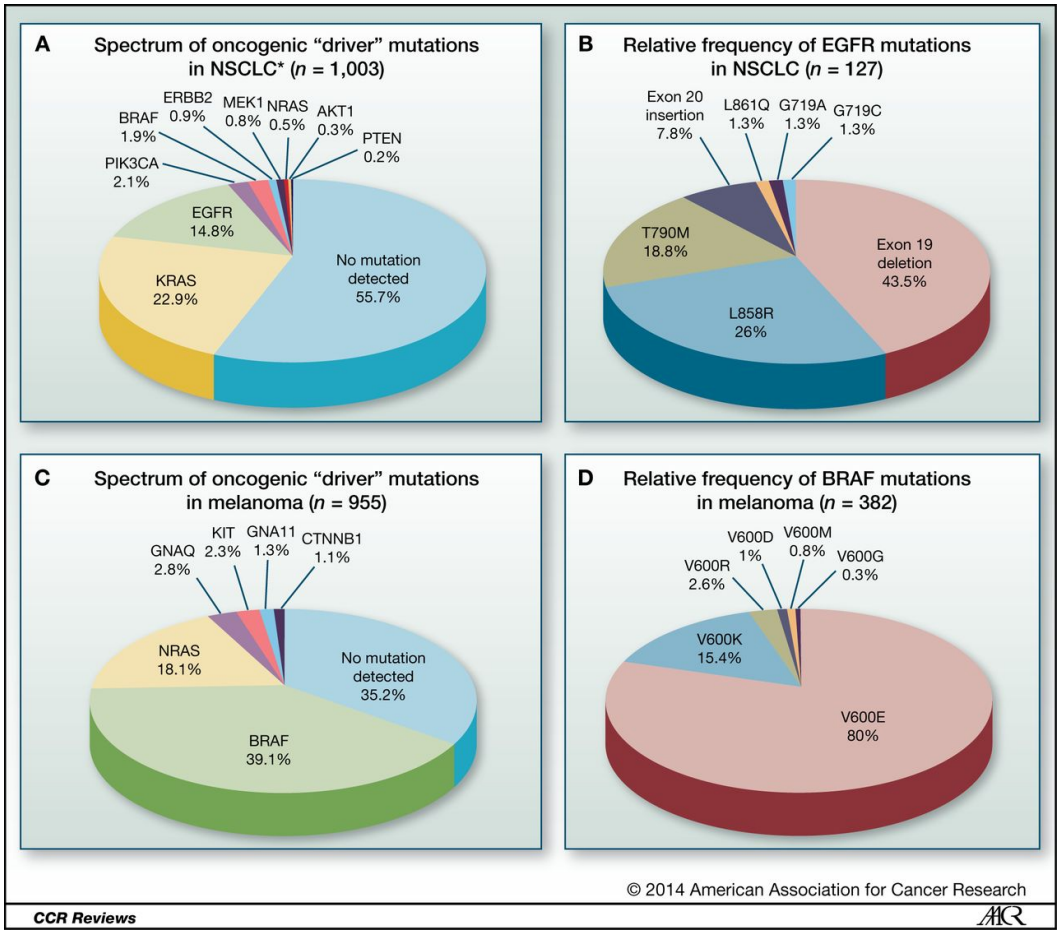
například

EGFR-řízený karcinom plic

ALK-řízený karcinom plic

Garraway LA. Journal of Clinical Oncology, 31(15), 1806-1814 (2013)

Intra-nádorová variabilita
Diverzita driverových mutací u jednoho typu nádorového onemocnění a koncept MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE NÁDORŮ



Histopatologicky definovaná diagnostická jednotka

=

skupina nemocí s rozdílnou molekulární patologií, a také s rozdílnou citlivostí k různým léčebným modalitám

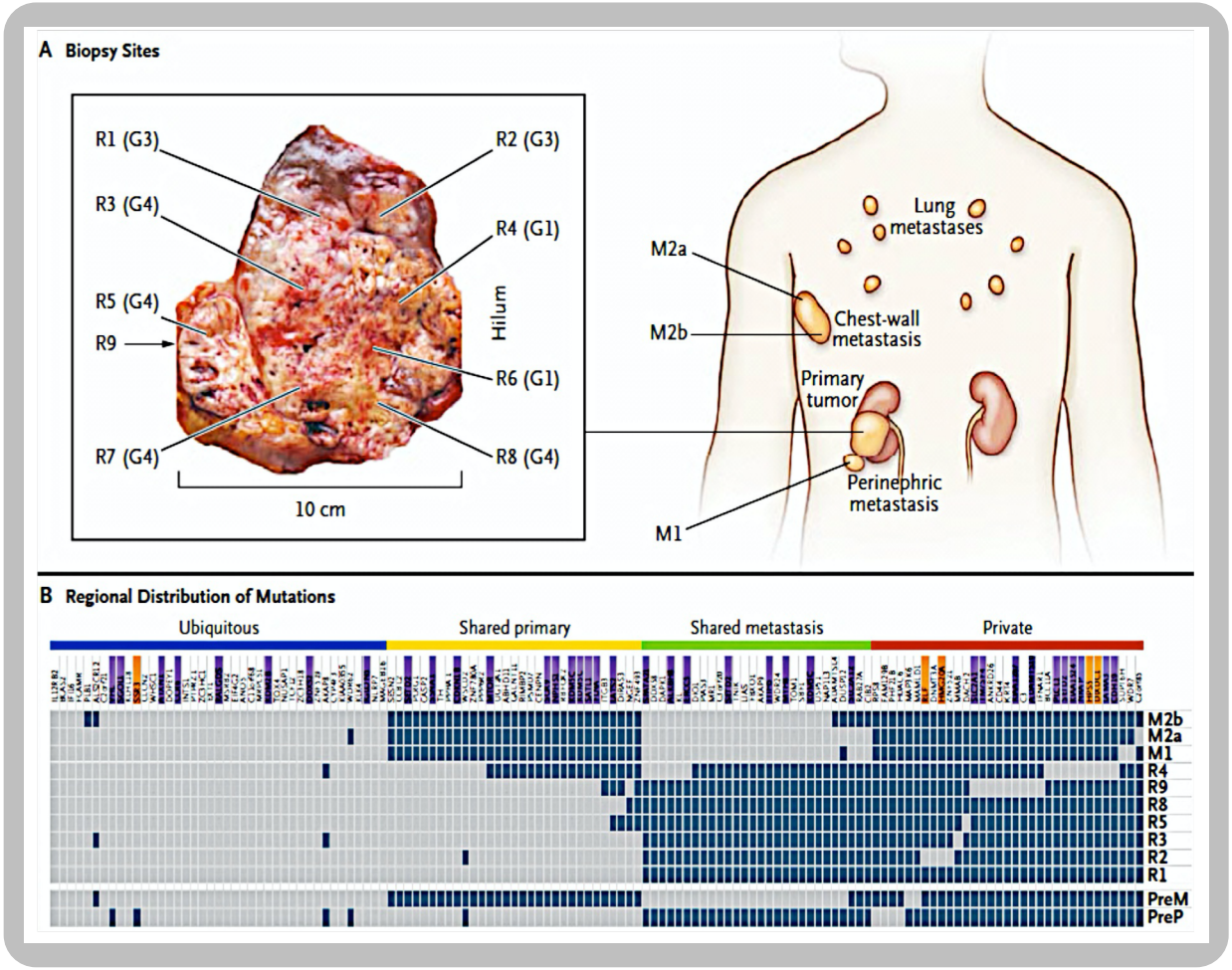
například

ALK-řízený karcinom plic = CRIZOTINIB

EGFR-řízený karcinom plic = ERLOTINIB

Catherine B. Meador et al. Clin Cancer Res 2014;20:2264-2275

Intra-individuální variabilita nádorového genomů - intratumorální heterogenita
Mutační topografie primárního tumoru a metastáz



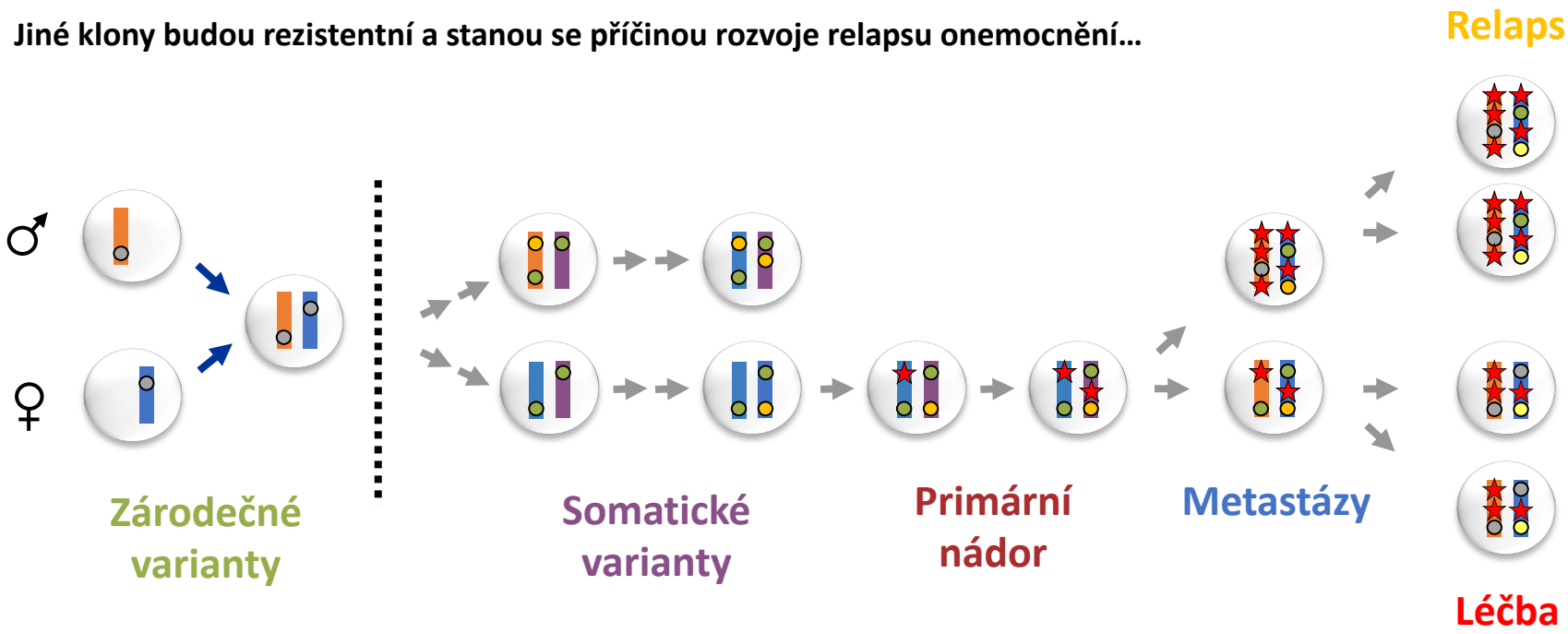
Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S *et al*. *The New England Journal of Medicine*, 366(10), 883-892 (2012)

Nadorový genom je extrémně dynamickou entitou

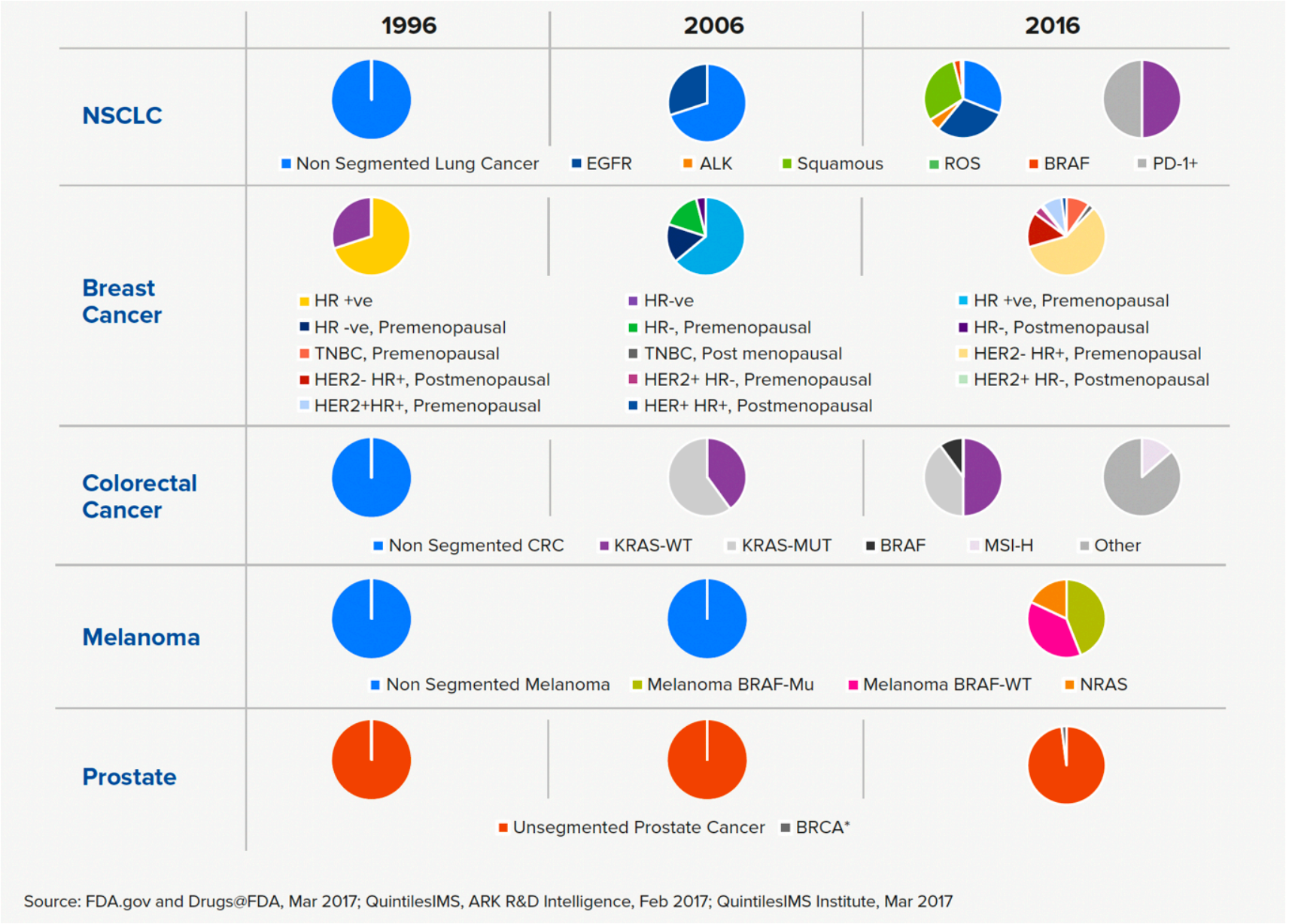
- Sekvence nádorového genomu je vždy “momentkou”
- Dědičné (zárodečné, germline) varianty odražejí paternální a maternální variabilitu
- Další somatické mutace se akumulují v průběhu života (životní styl, prostředí,…)
- Driverové mutace řídí nádorový růst, passenger mutace nejsou kauzální
- Vznikají další mutace zpusobující diverzitu nádorových buněk
- Některé klony nádorových buněk tak mohou být oslabeny
- …a být citlivé k protinádorové léčbě
- Jiné klony budou rezistentní a stanou se příčinou rozvoje relapsu onemocnění…

Nádorové genomy nejsou statické.

U nádorů jeden genomový “snímek” nemusí stačit.

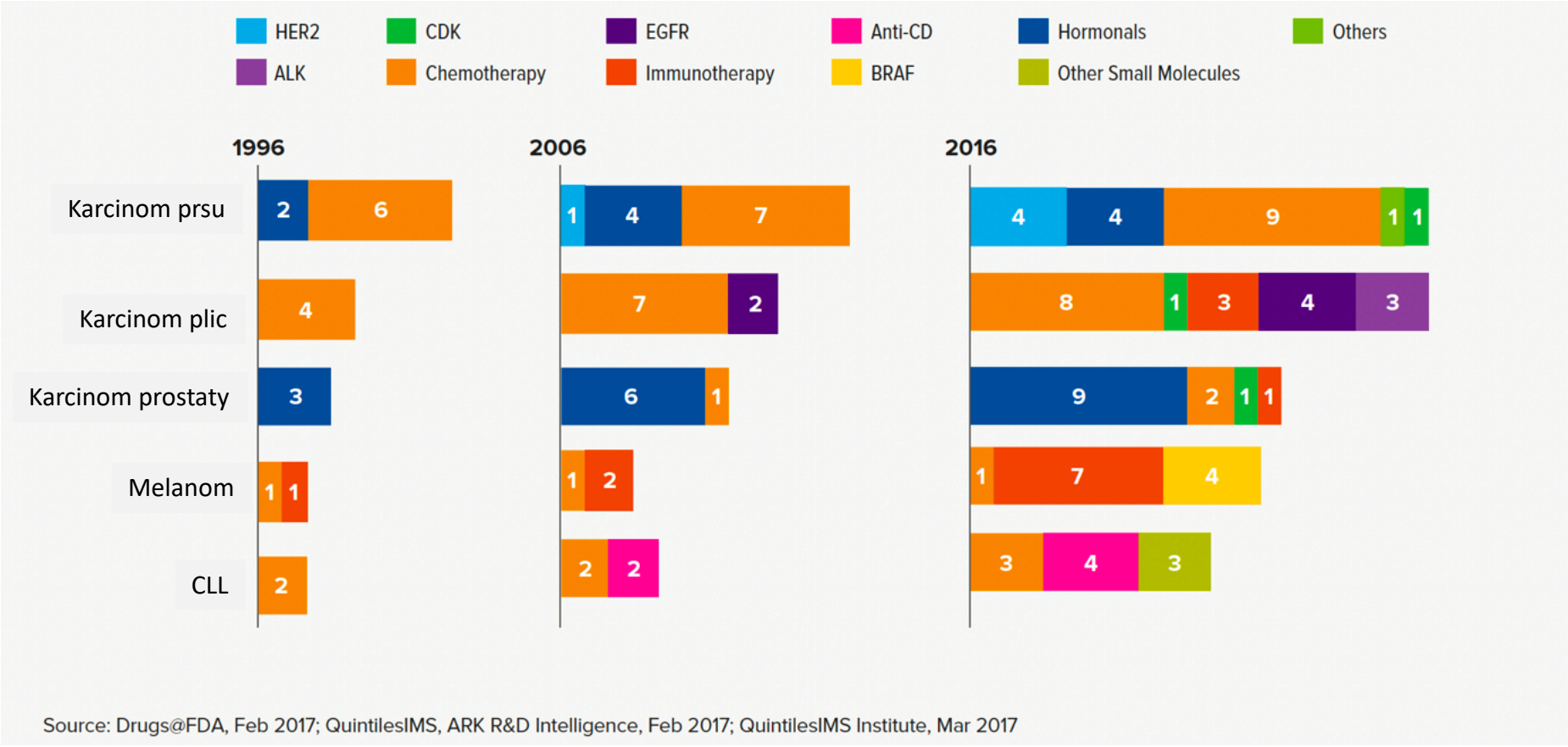


Histopatologická diagnostika nádorů získává molekulární rozměr



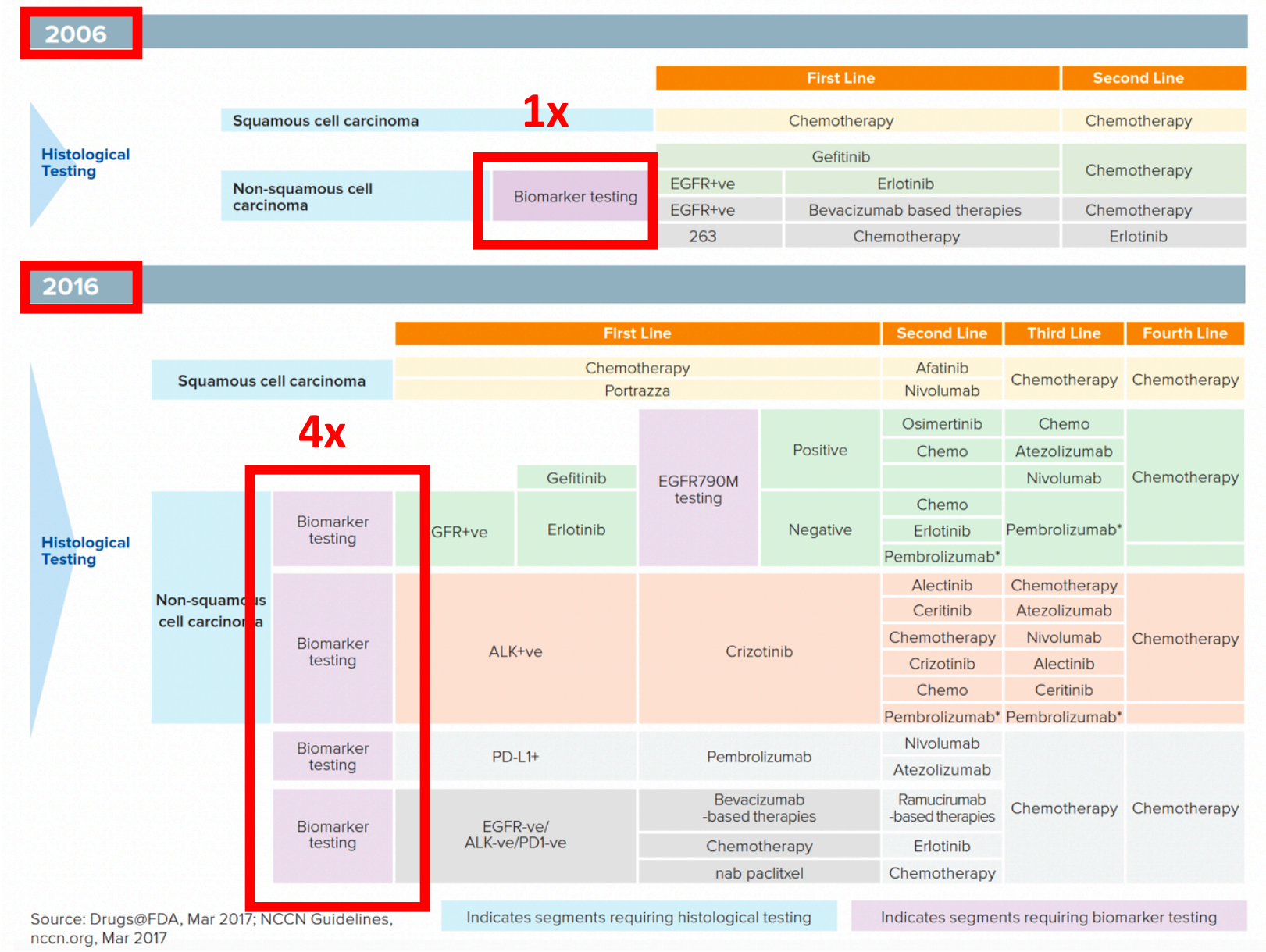
Source: FDA.gov and Drugs@FDA, Mar 2017; QuintilesIMS, ARK R&D Intelligence, Feb 2017; QuintilesIMS Institute, Mar 2017

Molekulární rozměr nádorové diagnostiky a narůstající počet cílených protinádorových léčiv zvyšuje komplexitu léčebných strategií



Molekulární rozměr nádorové diagnostiky a narůstající počet cílených protinádorových léčiv zvyšuje komplexitu léčebných strategií

NEMALOBUNĚČNÝ KARCINOM PLIC



Hematologické malignity v čase - důsledky molekularizace

PŘED 60 LETY
Onemocnění krve

PŘED 50 LETY
Leukémie
Lymfomy

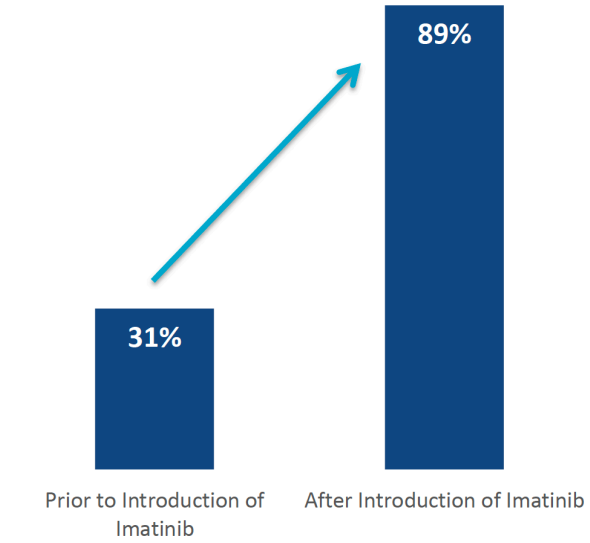
PŘED 40 LETY
Chronická leukémie
Akutní leukémie
Pre-leukémie
Indolentní lymfom
Agresigní lymfom

DNES
40 podtypů leukémie
50 podtypů lymfomů

Pětileté přežití vzrostlo na více než 70%

V současnosti je vyvíjeno přibližně 250 nových léčiv

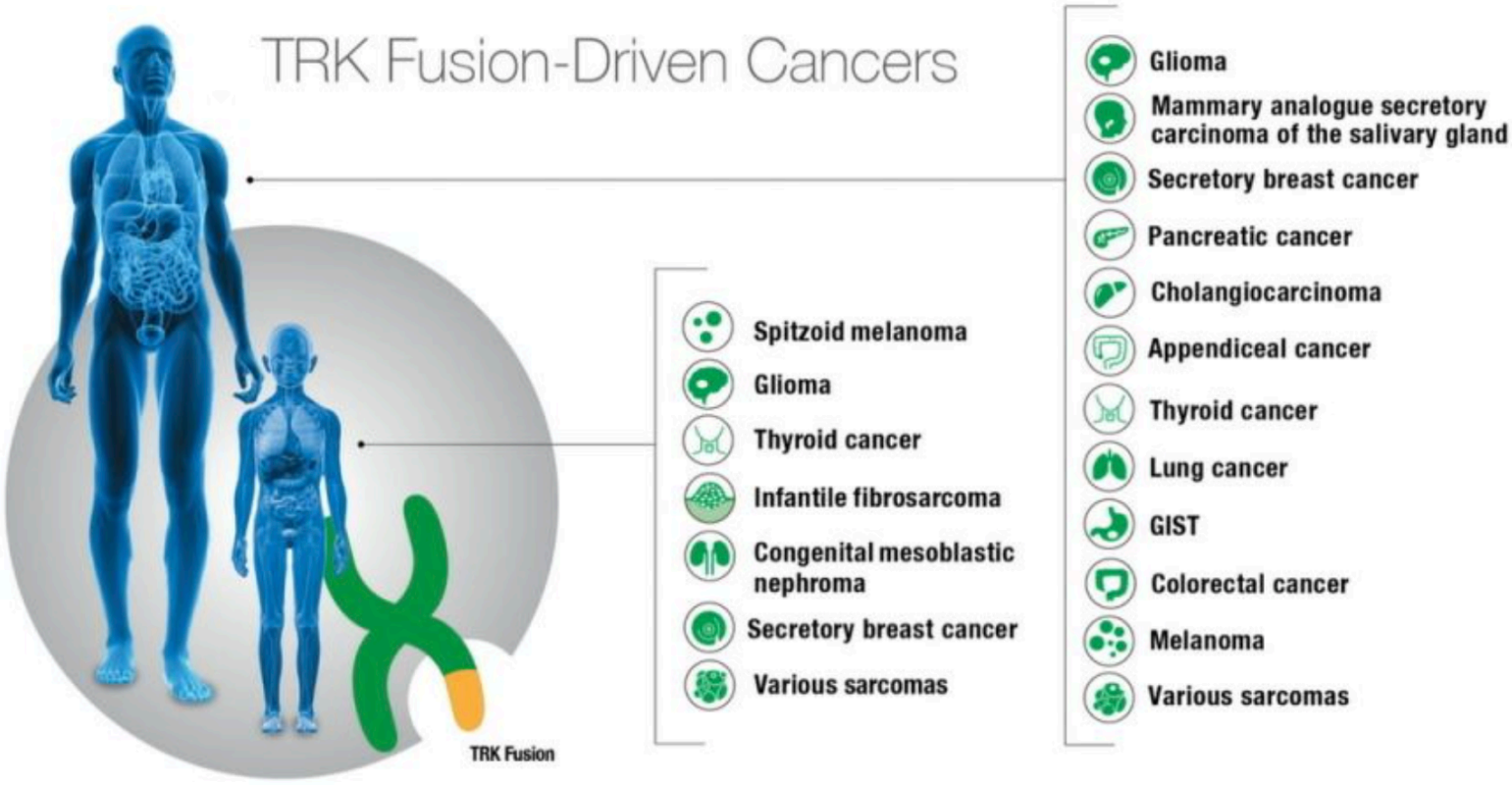
5-Year Survival Rates for CML Patients Nearly Triple After Introduction of Imatinib



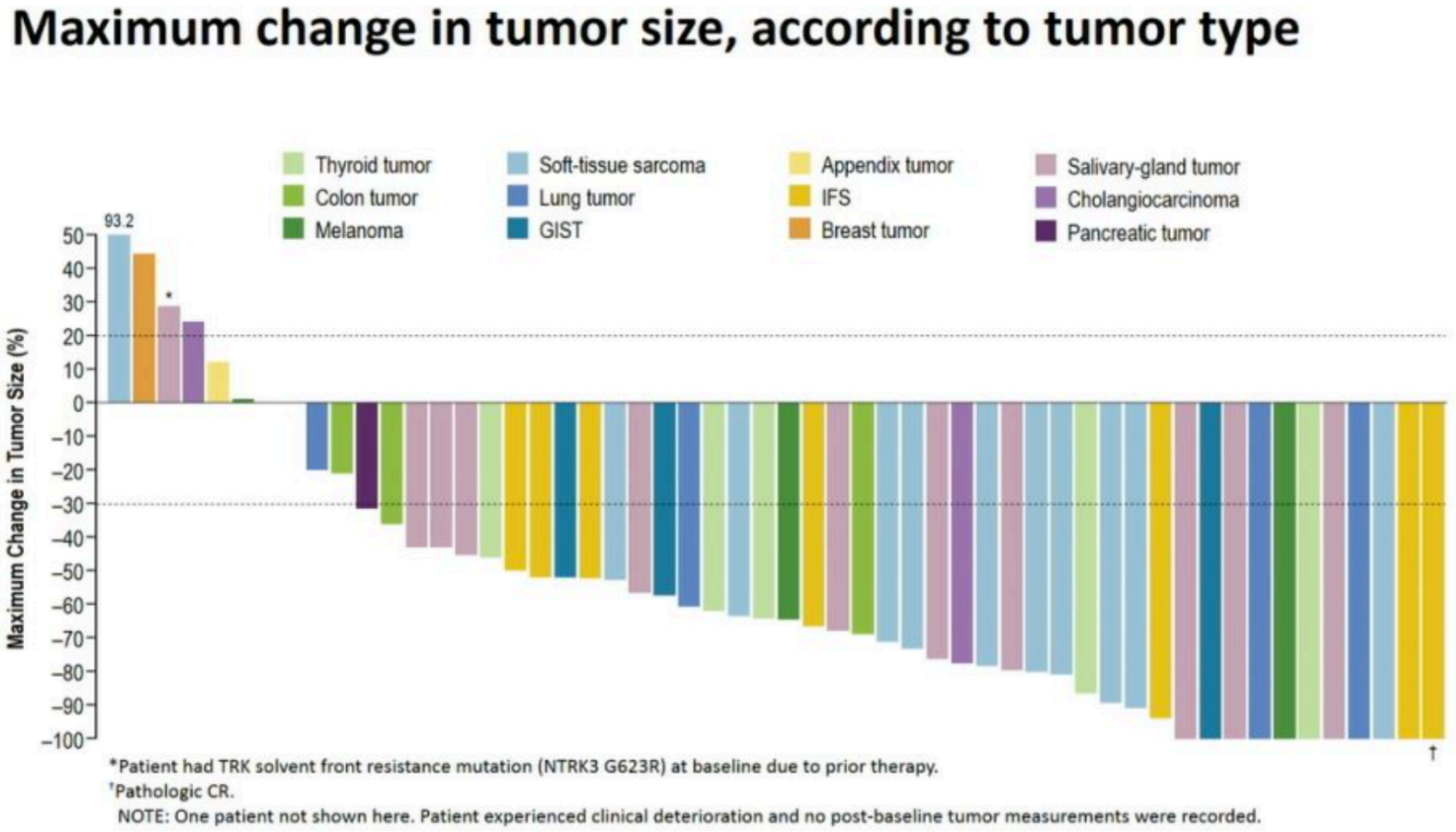
SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014;

NTRK inhibitor larotrectinib prototyp tumor-agnostického přístupu ve vývoji nových léčiv

Tumor and patient heterogeneity: TRK fusions are found in diverse cancer histologies, and in adults and children

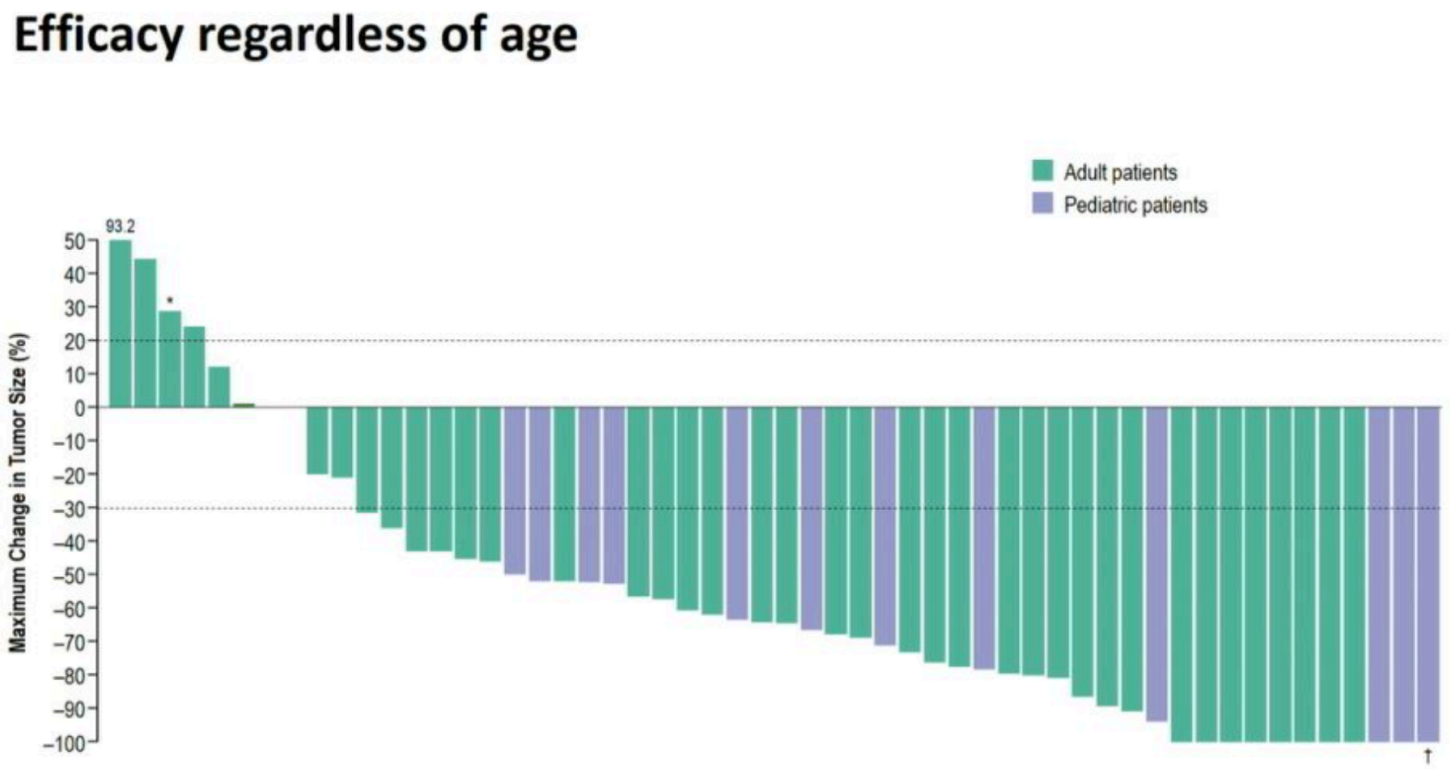


NTRK inhibitor larotrectinib/entrectinib u různých diagnóz s fúzním genem NTRK



Reference: Drilon et al. *N Engl J Med*.2018;378:731-9

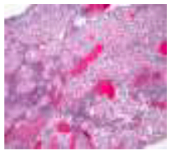
Odpověď na NTRK inhibitor larotrectinib u dětí a dospělých



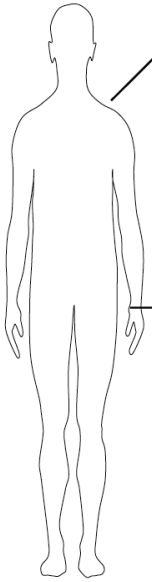
Reference: Drilon et al. *N Engl J Med*.2018;378:731-9

Molekulárně-onkologická indikační komise (Molecular Tumor Board) na Klinice dětské onkologie, FN BRNO, Ústav patologie FN Brno, spolupráce CEITEC MU

Biopsie nádoru



Vysoce rizikový/ refrakterní solidní tumor



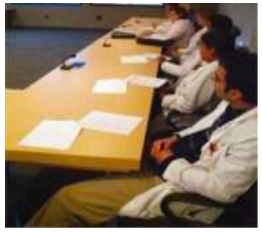
Informovaný souhlas

Bukální stěr
Odběr krve

Sekvenování zárodečného a nádorového exomu, Detekce fúzních genů

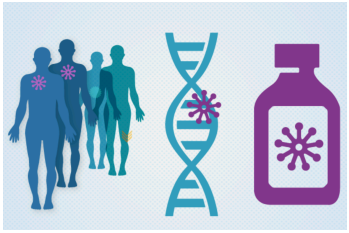
Analýza dat + příprava protokolů

Molekulárně-onkologická komise (jednou měsíčně) obvykle 6-7 pacientů



Actionable variany
Drug repurposing
Kombinovaná léčba
Schválení terapeutického plánu

Individualizovaná léčba



3-4 týdny

MOLELULÁRNÍ CHARAKTERIZACE TUMORU PRO POTŘEBY MTB – FN BRNO KDO / CEITEC MU

Tkáňový vzorek -resekát/biopsie
FFPE – DNA/exome, RNA/fúze
Nativní tkáň – RNA/transkriptom
Periferní krev – DNA/exom

DNA – EXOM/METYLACE

Izolace DNA
PBMC (zárodečné varianty)
Nádorá tkáň (somatické var.)

2 X celoexomové sekvenování
zárodečná DNA / nádorová DNA
Illumina TruSeq Exome Kit
Ilumina NextSeq 500

Metylační profily
-mozkové nádory
TruSeq Methyl Capture EPIC
Library Prep Kit
- 3,3 mil. CpGs míst

Bioinformatická analýza

Jednonukleotidové varianty, indels
–klasifikace dle klinické relevance
Mutační nálož (TMB)
Metylační profily – např. MBL SHH

RNA – FÚZNÍ GENY/TRANSKRIPTOM

Izolace RNA / kontrola kvality

Analýza fúzních genů
TruSight RNA
Pan-Cancer Panel
1385 transkriptů

Analýza transkriptom
Affymetrix GeneChip/
RNAseq

Bioinformatická analýza

Fúzní geny, deregulované geny/dráhy
Molekulární taxonomie MBL

Turnaround time:
3-4 týdny
Kapacita:
8-12 pac./měs.

INTEGRACE VÝSTUPŮ JEDNOTLIVÝCH ÚROVNÍ
CHARAKTERIZACE NÁDORU A PACIENTA
PŘÍPRAVA KOMPLEXNÍCH VÝSTUPNÍCH PROTOKOLŮ PRO POTŘEBY
MOLEKULÁRNĚ ONKOLOGICKÉ INDIKAČNÍ KOMISE KDO, FN BRNO

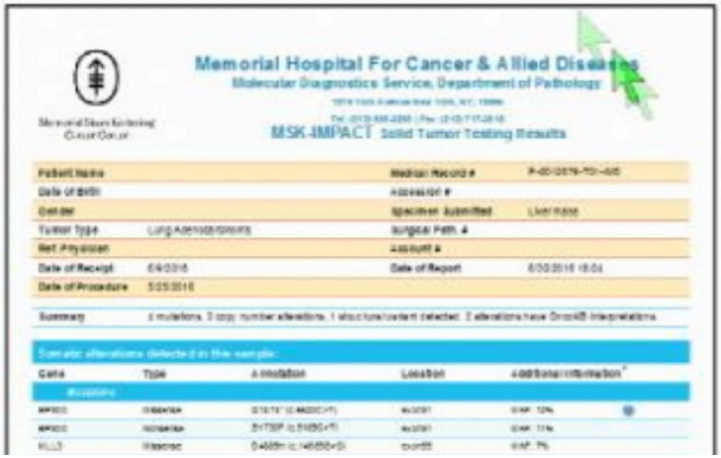
Klasifikace variant MATCH trial a MSKCC

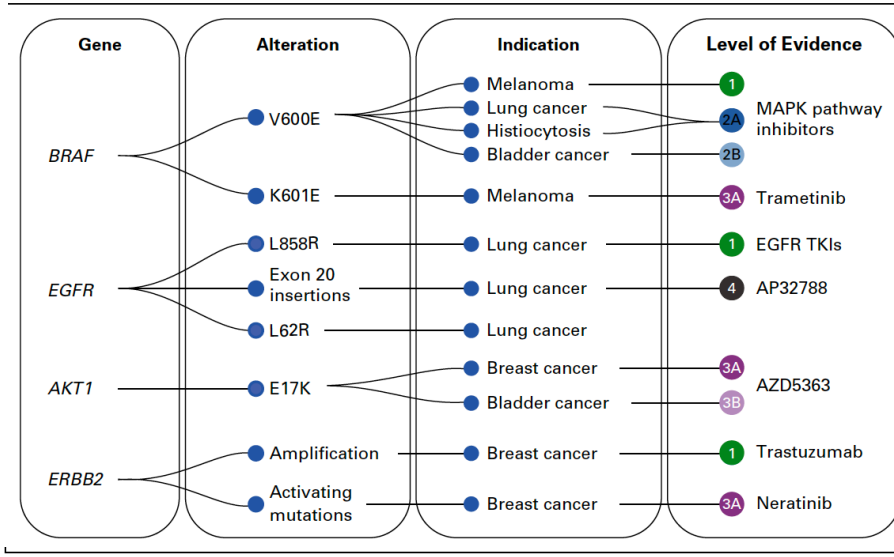
OncoKB Levels of Evidence

Standard and investigations therapeutic implications

Level 1	FDA-recognized biomarker predictive of response to an FDA-approved drug in this indication	**Standard Therapeutic Implications** *Includes biomarkers that are recommended as standard care by the NCCN or other expert panels but not necessarily FDA recognized for a particular indication
Level 2A	Standard care biomarker predictive of response to an FDA-approved drug in this indication*	
Level 2B	Standard care biomarker predictive of response to an FDA-approved drug in another indication but not standard care for this indication	
Level 3A	Compelling clinical evidence supports the biomarker as being predictive of response to a drug in this indication, but neither biomarker nor drug is standard care	**Investigational Therapeutic Implications** Possibly directed to clinical trials
Level 3B	Compelling clinical evidence supports the biomarker as being predictive of response to a drug in another indication, but neither biomarker nor drug is standard care	
Level 4	Compelling biologic evidence supports the biomarker as being predictive of response to a drug, but neither biomarker nor drug is standard care	**Hypothetical Therapeutic Implications** On the basis of preliminary, nonclinical data
Level R1	Standard care biomarker predictive of resistance to an FDA-approved drug in this indication	**Standard Therapeutic Implications**
Level R2	Compelling clinical evidence supports the biomarker as being predictive of resistance to a drug, but neither biomarker nor drug is standard care	**Hypothetical Therapeutic Implications** On the basis of preliminary, nonclinical data
Level R3	Compelling biologic evidence supports the biomarker as being predictive of resistance to a drug, but neither biomarker nor drug is standard care	

, *JCO Precision Oncology*, 2017





Klasifikace variant používaná v naší studii

Protocol supplement – Classification of somatic gene variants for therapeutic planning

Level I – Established clinical utility (clinical trial evidence) in gene variant

Ia – in tumor type tested (e.g. NRAS G12C in NSCLC or melanoma)
Ib – in other tumor type (e.g. NRAS G12C in RMS)

Level II – Clinical evidence (case series, case reports) in gene variant

IIa – in tumor type tested
IIb – in other tumor type

Level III – Experimental evidence (*in vitro, in vivo* animal models) in gene variant

IIIa – in tumor type tested
IIIb – in other tumor type

Level IV – No clinical or experimental evidence of variant in important cancer-related driver gene – functional consequences of variant predicted by bioinformatics algorithms

IVa – Gene variant predicted to be “damaging” / “pathogenic”
IVb – Gene variant predicted to be “benign”
IVc – Gene variant with conflicting evidence of pathogenicity based on prediction algorithms (p.e. PolyPhen-2 evaluates variant as „damaging“, SIFT as „tolerated“)
IVd – Gene variant where prediction is not available (splicing, non/frameshift insertions/deletions, nonsense variants)

Výsledky – soubor pacientů

Od 08/2016 - 08/2018 jsme provedli analýzu germinálního/somatického exomu a analýzu fúzních genů u celkem 109 dětí

42 tumorů CNS

11 Ewingových sarkomů

10 rhabdomyosarkomů

10 neuroblastomů

9 sarkomů z měkkých tkání

7 osteosarkomů

20 dalších typů solidních tumorů

Všechny sekvenační běhy prošly kvalitou kontroly a dosáhly požadovaného pokrytí

	Celkový počet readů	Median target coverage	Coverage mean	Coverage 20x (%)
Medián	144.763.142	95	173,2	90,8
Průměr	158.127.573,4	108,8	179,7	90,4

Výsledky molekulárního vyšetření

- **Actionable varianty (level I a II) byly nalezeny u celkem 29 pacientů (27 %)**
- **Klinicky významná fúze byla pomocí sekvenování RNA nalezena u 25 pacientů (23%), přičemž 7 z těchto fúzí bylo terapeuticky cílitelných.**
- **Kombinací WES a komplexní analýzy fúzních genů se podařilo nalézt terapeuticky ovlivnitelnou variantu celkem u 36 pacientů (33%).**
- U všech tumorů byla stanovená mutační nálož (Tumor Mutational Burden, TMB) a u tumorů s TMB>10 mut/Mb (celkem 8 - 7%) také mutační podpis (mutational signature).

- **Molekulárně řízená cílená léčba (či její kombinace) byla podána u celkem 40 pacientů (37%).**

Germinální varianty:

Např. pac s GBM - potvrzen Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome (AR dědičnost) - 2 zděděné varianty v PMS2 + mut.nálož 175 mutací/Mb - nivolumab

Mimo to nalezeny ještě prognosticko/diagnostické: H3F3A K27M, HIST1H3B K27M-DIPGs

Výsledky celoexomového sekvenování: ukázka protokolu

SOMAT

Patient code:
Diagnosis:
Material:
Date of biopsy
Cancer cells co
Date of sequer

Method:
Library prepara
Sequencing de

Results:

Gene	Var
NRAS	c.34
RARA	c.6
PIK3C2B	c.5
NFKB2	c.1

F = frequency of t

Tumor mutati

Fusion genes a
October 2019

Results are divided into the

1) Variant found

i. Protein functio
ii. Diseases (germ
iii. Variant descrip
novel variants
iv. Therapeutic po
v. Additional com

* Additional information (sequenci
system and variant classification sys

1) c.34G>T/p.G12C va

i) NRAS proto-on
oncogene encoc
the plasma m
depalmitoylatio
intrinsic GTPase
inactivated by
activation by gr
to promote cell

ii) Mutations in thi
cancer, autoim
myelomonocytic

iii) **c.34G>T/ p.G1**
Cbioportal.org
urothelial carci
carcinoma as "li
In colorectal ade
NRAS, a GTPase
and thyroid can
There is clinic
panitumumab a
there is promis

Variant has been
Clinical trials:
NRAS G12C serve
open and 5 are c
are phase 1 (3 op

Trials with NRAS
myeloid leukemia

Trametinib, binim
frequent therapie

Significance of NR

NRAS is mutated
0.55% of all malig
Project GENIE: po
Discovery. 2017;7

NRAS G12C is an
is open and 0 are
as inclusion criter

Variant has been
somatic mutation
Guo et al, 1998; F
cancer (Vaughn e
to its location wi
commonly found

Variant has been
predicted": NRAS
Nras protein (Un
confer a loss of f
G12C, which re
transformation of

Sequencing platform:

Whole exome sequencing (Truseq Exome kit, Illumina) was performed on the NextSeq (Illumina) device using a NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (150 cycles) (Illumina) cartridge.

Information about the sequencing run:

The patient was sequenced on the 24th of October 2019.
At least 85% of the target region was covered at least 20 times.
DNA was obtained from the frozen native tissue.

Bioinformatic workflow:

Alignment (GRCh
Quality Control:
Variant Calling:

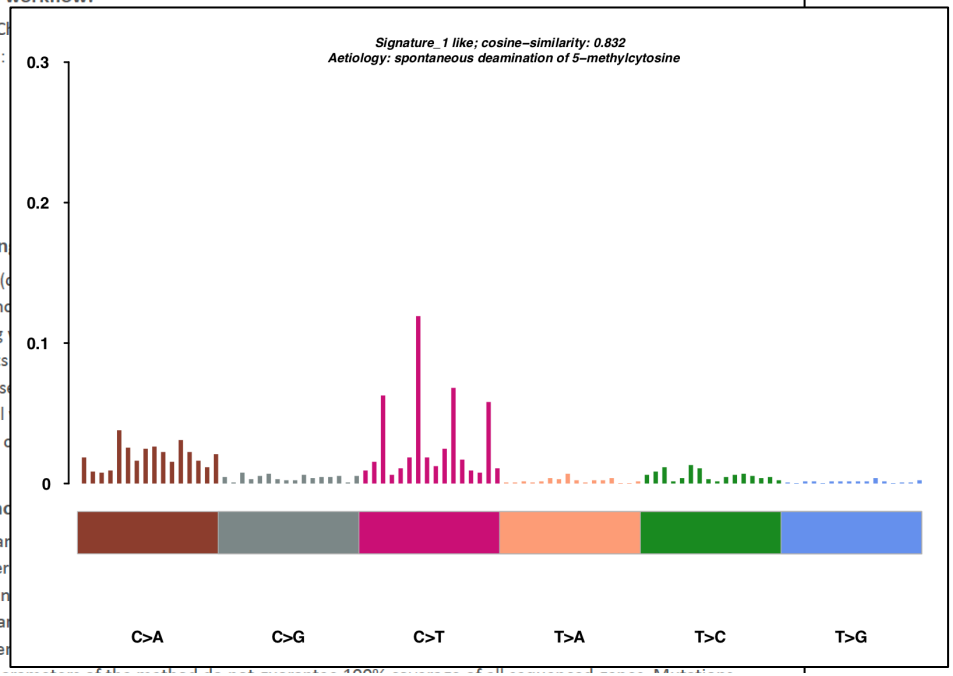
Annotation:

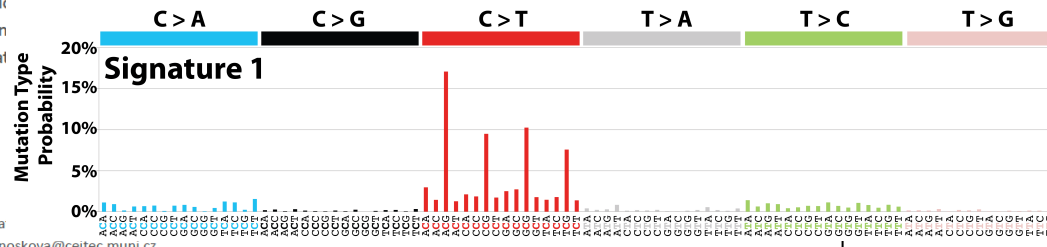
Variant filterin

- Exonic (
- Nonsync
splicing
- Variants
databas
- Manual
- Impact

Note on metho

Not all the var
mentioned filter
All variants foun
synonymous va
minimal numbe
The technic
in other (in
detected at





Protocol crea
Email: hana.noskova@ceitec.muni.cz
Phone: +420 728 840 567

CEITEC – Central European Institute of Technology
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech republic

SOMATIC EXOME ANALYSIS

Patient code: DI2008
Diagnosis: Diffuse intrinsic pontine glioma
Material: DNA isolated from the frozen native tissue
Sample quality: % of cancer cells is NA
Date of sequencing: 10.5.2018

Method: **Whole exome sequencing**
Library preparation: Truseq Exome kit (Illumina)
Sequencing device: NextSeq (Illumina)*

Results:

Gene	Variant (c.DNA/protein)	F (%)	Therapeutic plan	Variant classification*
H3F3A	c.83A>T/p.K28M **	47	Epigenetic treatment	Ia
BRAF	c.1799T>A/p.V600E	46	BRAF/MEK inhibitors	Ib
GNAQ	c.736-2_736-1insA ***	11	MEK inhibitors	IVe

F = frequency of variant in the tumor sample
** according to former nomenclature and literature referred to as p.K27M.
*** possibly false positive as variant lies in the homopolymer area. Confirmation with Sanger sequencing is recommended.

Tumor mutation burden (load): Low; 2 mutations/ Mb

Results are divided into the following sections:

1) Variant found

i. Protein function
ii. Diseases (germinal exome)/cancers (somatic exome) described in association with relevant gene
iii. Variant description (localization of mutation in protein structure – if available, associated fenotypes according to available databases). Prediction algorithms results (in novel variants or variants of uncertain significance).
iv. Therapeutic possibilities
v. Additional comments, alternative nomenclature (if relevant)

* Additional information (sequencing platform, information about the sequencing run, bioinformatic workflow, variant filtering system and variant classification system) is listed at the end of the protocol.

GERMLINE

Patient code:
Diagnosis:
Material:
Date of sequencing:

Method:
Library preparation:
Sequencing device:

Results:

Gene	Variant (
PMS2	c.2521d
	c.2T>A/p

MAF = minor allelic frequer

Classification of variants: *
pathogenic – pathogenic m
likely pathogenic variant (V
variant of uncertain signific
likely benign variant (VLB, c
benign – benign variant (cla

Results are divided into

1) Variant found

i. Protein fu
ii. Diseases
iii. Variant de
variants c
iv. Additiona

Protocol supp

Pathogenic (cl
scientific litera
mutation is alv
Example: hete

Likely pathoge
strong evidenc
protein synthe
VLP is always i
Example: c.288

Variant of unk
regarding path
SIFT, Mutation
Example:
- c.2473A>C/p
MutationTaste
- c.1162G>A/p
progression of
in advanced o
"polymorphism

Likely benign v
routinely inclu
Example: c.156
controversial p
(1x) and likely

Benign varian
alterations are
Example: c.54
colorectal canc

Classification cre
a joint consensu
Molecular
(http://www.am
Example variant

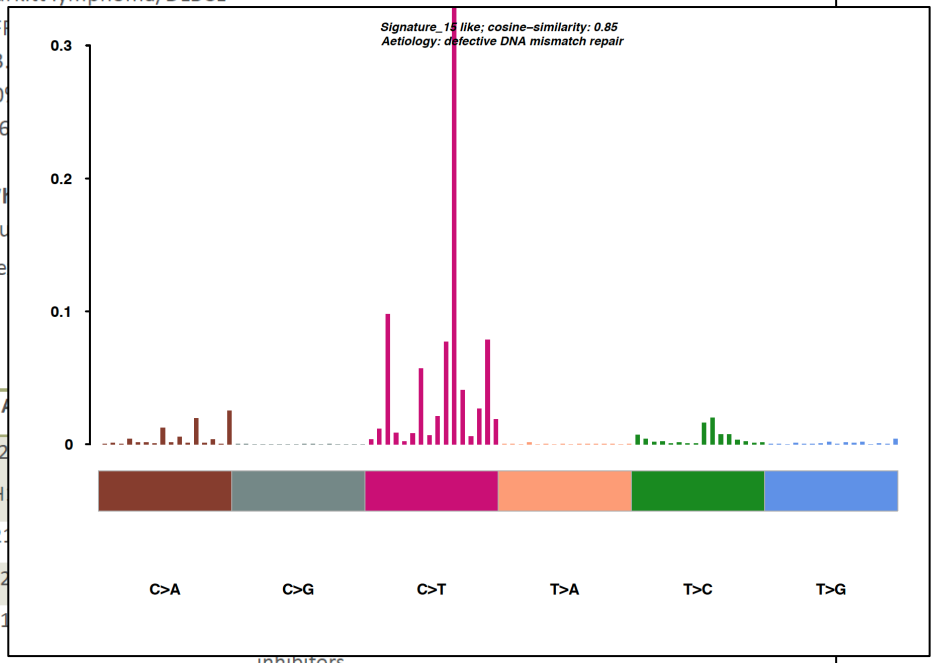
CEITEC

CEITEC – Central European Institute of Technology
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

SOMATIC EXOME ANALYSIS RESULTS

Patient code: **MB0705**
Diagnosis: Burkitt lymphoma/DLBCL
Material: FF
Date of biopsy: 13.
Cancer cells content: 90
Date of sequencing: 9.6

Method: Wh
Library preparation: Tru
Sequencing device: Ne



Results:

Gene	Variant (c.DNA				
TP53	c.821T>C/p.V2				
	c.503A>G/p.H				
ATM	c.640del/p.S21				
CCND3	c.811dup/p.R2				
PTEN	c.521A>G/p.Y1				
			inhibitors		
ROS1	c.3989A>T/p.N1330I	53	Cabozantinib,	ceritinib,	IVa
	c.2122T>C/p.S708P	48	crizotinib		IVa

F = frequency of the variant in the tumor sample

Other variants found with unknown significance can be found in the protocol supplement

Tumor mutation burden (load): High; 107 mutations/ Mb

Fusion genes analysis result: will be completed

Výsledky celoexomového sekvenování: ukázka protokolu

FUSION GENES ANAL

Patient code: **OD9908**
Diagnosis: Pilocytic astrocytoma
Material: RNA isolated from the F
Sample quality: Cancer cells is NA
Date of biopsy: 15.11.2017
Date of analysis: 30.7.2018

Method: **Gene expression analys**
Library preparation: TruSight RNA Pan-Cance
Sequencing device: NextSeq (Illumina)

Results:

FAM131B-BRAF fusion gene has been d tected

FAM131B-BRAF fusion has been originally de
fusion resulting from 7q34 deletion comprises
pilocytic astrocytoma. Acta Neuropathol (2011)

Targeted therapy

Jain et al, 2017 in Overcoming resistance to si
combinatorial targeting of MAPK and PI3K/mT
demonstrate effectiveness of multiple MEKi
partners, with trametinib being the most poter
increased RTK expression causing activation of
clones. To circumvent acquired resistance, we
and everolimus, an mTOR inhibitor (mTORi) a
and MEKi PLGG clinical trials are underway, ou
mTORi combinatorial therapy to stave off or
PLGGs."

Sample was evaluated on all genes analysed by

SOMATIC EXOME ANALYS

Patient code: **OH9610**
Diagnosis: Synovial sarcoma – lung me
Material: DNA isolated from the froze
Sample quality: % of cancer cells is NA
Number of biopsy: 08/2018
Date of sequencing: 18.9.2018

Method: **Whole exome sequencing**
Library preparation: Truseq Exome kit (Illumina)
Sequencing device: NextSeq (Illumina)*

Results:

Gene	Variant (c.DNA/protein)	F (%)	T
GNAQ	c.286A>T/p.T96S	6	

F = frequency of variant in the sample

Fusion genes a alysis result: GOPC-ROS1 positiv
RNA Pan-Cancer Panel, Illumina) – see detailed re

Tumor mutation burden (load): Low; 3 mutations/

Results are divided into the following sections:

1) Variant found

i. Protein function
ii. Diseases (germinal exome)/cancers (somat
iii. Variant description. Prediction algorith
significance).
iv. Therapeutic possibilities
v. Additional comments, alternative nomenc

* Additional information (sequencing platform, information abo
system and variant classification system) is listed at the end of the

CEITEC

CEITEC – Central European Institute of Technology
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

SOMATIC EXOME ANALYSIS RESULTS

Patient code: **JH1903**
Diagnosis: Kaposiform hemangioendothelioma/locally aggressive lipofibromatosis-like neural tumor
Material: DNA isolated from the FFPE sample (1267/19/DB bl.1)
Date of biopsy: 17.7.2019
Cancer cells content: 60%
Date of sequencing: 14.8.2019

Method: **Whole exome sequencing**
Library preparation: Truseq Exome kit (Illumina)
Sequencing device: NextSeq (Illumina)*

Results:

There are no variants found with known or potential clinical significance.

All alterations found are listed in the protocol supplement.

Tumor mutation burden (load): Low; 3 mutations/ Mb

Fusion genes a alysis result: **TPM3-NTRK1 positive** (sequenced o the 14th of August 2019 with the TruSight RNA P eport for fusions analysis

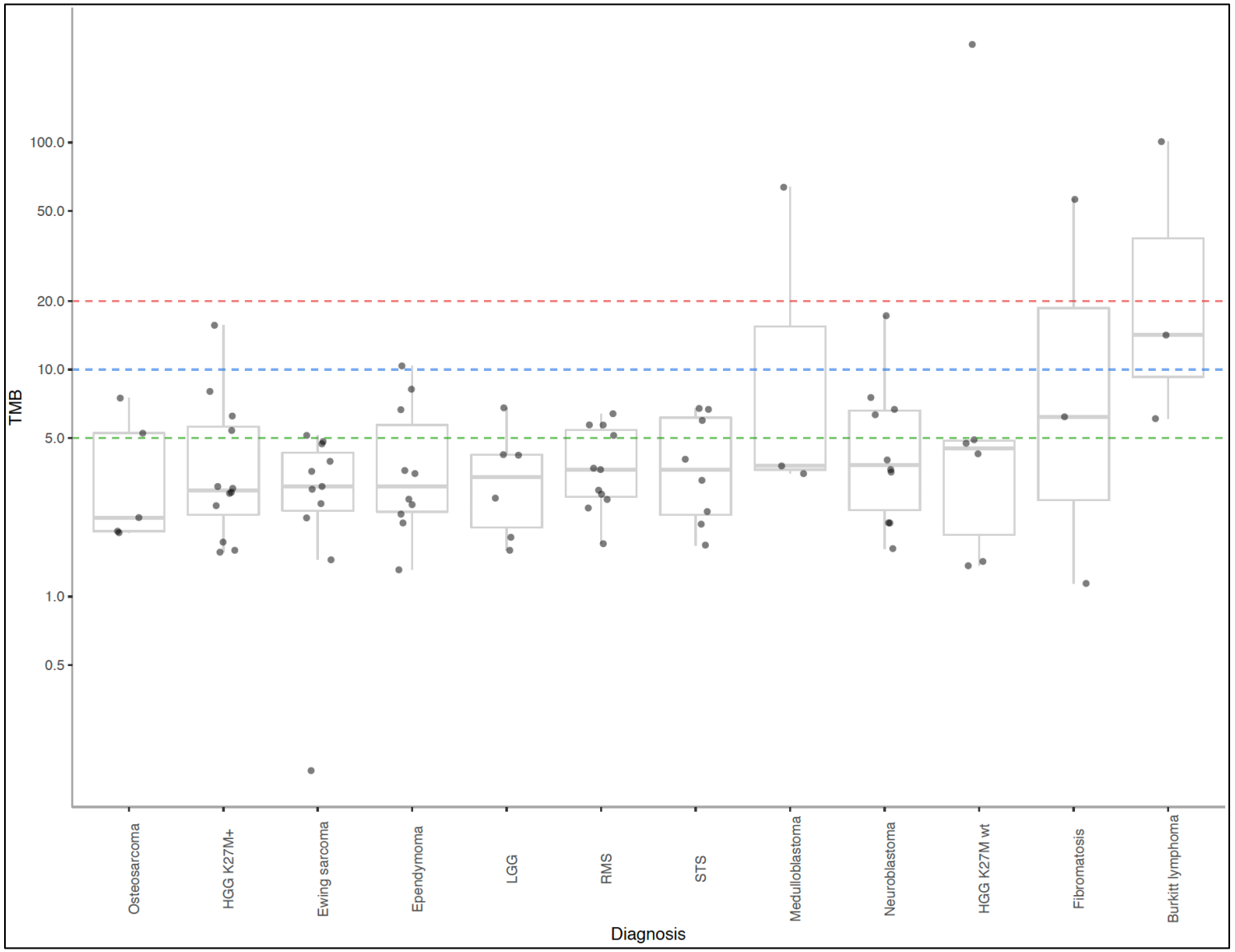
Results are divided into the following sections:

1) Variant found

i. Protein function
ii. Diseases (germline exome)/cancers (somatic exome) described in association with relevant gene
iii. Variant description and its effect on protein function (if available). Prediction algorithms results (in novel variants or variants of uncertain significance)
iv. Therapeutic possibilities
v. Additional comments, alternative nomenclature (if relevant)

* Additional information (sequencing platform, information about the sequencing run, bioinformatic workflow, variant filtering system and variant classification system) is listed at the end of the protocol.

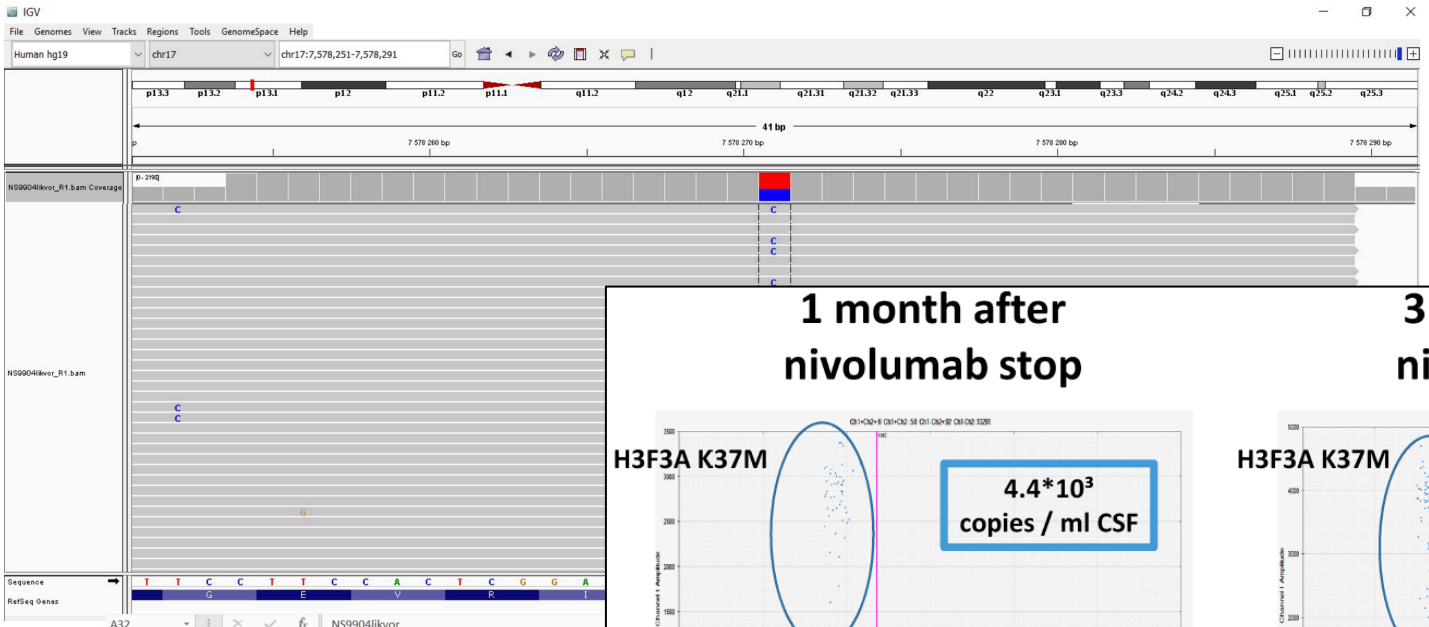
Výsledky celoexomového sekvenování: mutační nálože (TMB)

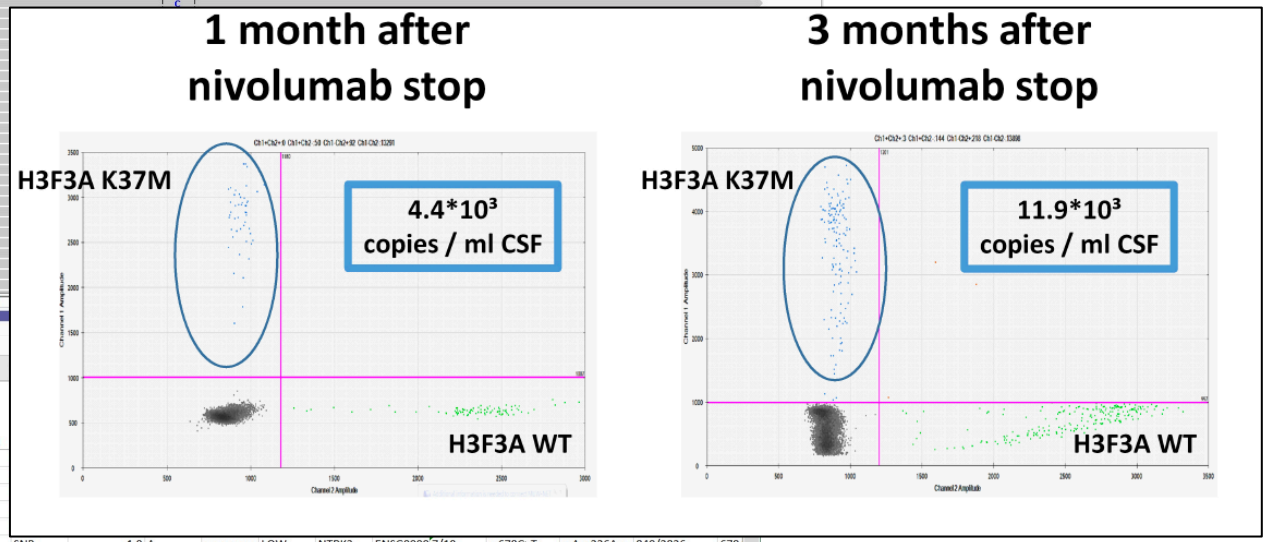


submitted

Tekutá biopsie : aktuální stav

Především u tumorů CNS z mozkomíšního moku
QIAseq Targeted DNA Panel - Human Lung Cancer Panel (72 genů)
Zavádíme systém Avenio Roche, droplet digital PCR pro monitoring (H3K27M)





A32 NS9904likvor

	read set	CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER									
24	NS9904likvor	chr14	105239894	rs1130233	C	T	121	PASS									
25	NS9904likvor	chr15	41991315	rs2178004	A	T	133	PASS									
26	NS9904likvor	chr15	42026764	rs1918314	C	T	57	PASS									
27	NS9904likvor	chr15	42041712	rs2695163	G	A	89	PASS									
28	NS9904likvor	chr15	88576185	rs2229910	G	C	187	PASS									
29	NS9904likvor	chr15	88679785	rs1863480	G	A	200	PASS	SNP	1,0	A	synonymo	LOW	NTRK3	ENSG0000	7/19	c.678C>T	p.Asn226Asn	840/2826	678/
30	NS9904likvor	chr15	88680684	rs1128994	G	A	70	PASS	SNP	0,4383562	A	synonymo	LOW	NTRK3	ENSG0000	6/19	c.573C>T	p.Asn191Asn	735/2826	573/
31	NS9904likvor	chr16	3828172	rs130003	A	G	115	PASS	SNP	0,5483871	G	synonymo	LOW	CREBBP	ENSG0000	10/31	c.1953T>C	p.Tyr651Tyr	2763/10803	195
32	NS9904likvor	chr17	7577018	COSM135!	C	A	33	PASS	SNP	0,3939394	A	splice_dor	HIGH	TP53	ENSG0000	8/10	c.919+1G>T			
33	NS9904likvor	chr17	7578271	COSM107	T	C	132	PASS	SNP	0,4050633	C	missense_	MODERAT	TP53	ENSG0000	6/11	c.578A>G	p.His193Arg	768/2579	578/
34	NS9904likvor	chr17	7579472	rs1042522	G	C	200	PASS	SNP	1,0	C	missense_	MODERAT	TP53	ENSG0000	4/11	c.215C>G	p.Pro72Arg	405/2579	215/
35	NS9904likvor	chr17	29508775	rs1801052	G	A	150	PASS	SNP	0,416185	A	synonymo	LOW	NF1	ENSG0000	7/58	c.702G>A	p.Leu234Leu	1085/12425	702/
36	NS9904likvor	chr17	29553485	rs2285892	G	A	126	PASS	SNP	0,5135135	A	synonymo	LOW	NF1	ENSG0000	18/58	c.2034G>A	p.Pro678Pro	2417/12425	203
37	NS9904likvor	chr17	37879588	rs1136201	A	G	85	PASS	SNP	1,0	G	missense_	MODERAT	ERBB2	ENSG0000	17/27	c.1963A>G	p.Ile655Val	2122/4545	196
38	NS9904likvor	chr17	37884037	rs1058808	C	G	126	PASS	SNP	0,406015	G	missense_	MODERAT	ERBB2	ENSG0000	27/27	c.3508C>G	p.Pro1170Ala	3667/4545	350
39	NS9904likvor	chr19	8961981	rs1035442	C	G	111	PASS	SNP	0,46	G	missense_	MODERAT	MUC16	ENSG0000	83/84	c.43396G>C	p.Val14466Le	43600/43816	433
40	NS9904likvor	chr19	8999453	rs1108576	C	T	74	PASS	SNP	0,3932584	T	synonymo	LOW	MUC16	ENSG0000	56/84	c.40722G>A	p.Leu13574Le	40926/43816	407
41	NS9904likvor	chr19	9001833	rs1297612	A	G	91	PASS	SNP	0,4516129	G	missense_	MODERAT	MUC16	ENSG0000	53/84	c.40415T>C	p.Met13472T	40619/43816	404
42	NS9904likvor	chr19	9001835	rs1298577	G	A	91	PASS	SNP	0,4516129	A	synonymo	LOW	MUC16	ENSG0000	53/84	c.40413C>T	p.Pro13471Pr	40617/43816	404
43	NS9904likvor	chr19	9002504	rs7832755	T	C	12	PASS	SNP	0,0661157	C	missense_	MODERAT	MUC16	ENSG0000	51/84	c.40312A>G	p.Asn13438As	40516/43816	403

submitted

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Patient presentation, initial diagnosis and treatment

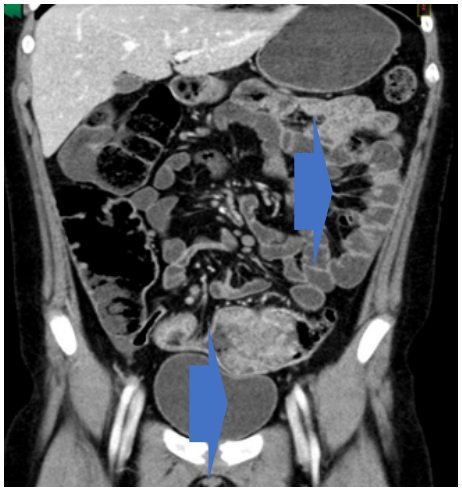
Jan 2014

- **Diagnosis:** bifocal invasive colon adenocarcinoma (G2, pT2, pN1a, pM0, IIIA)
- **Mutations:** *KRAS*
- **Treatment:** hemicolectomy + FOLFOX
  1. CCR OS 58 months

…but a very strange tumour for a child…

Patient profile

- Male, 14 years old



Case courtesy of Jaroslav Sterba, University Hospital Brno, Czech Republic.

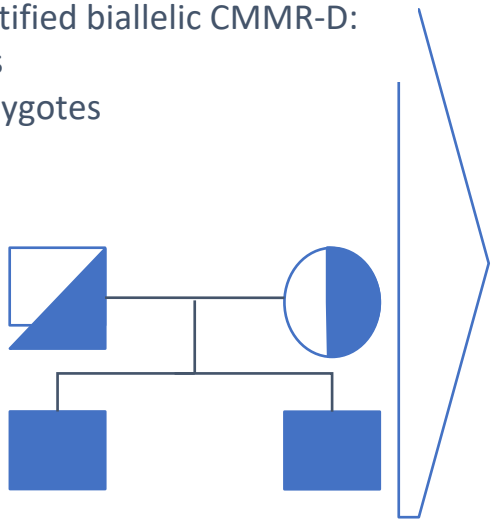
Patient case 3: Secondary glioblastoma

Medical background

Germinal exome sequencing identified biallelic CMMR-D:

- Both parents: healthy carriers
- Both sons: composed heterozygotes

Gene	Variant
PMS2	c.2521delT/p.W841fs c.2T>A/p.M1K
MET	c.2975C>T/p.T992I
NTRK1	c.1792C>T/p.H598Y c.1820G>T/p.G607V
MYC	c.1213G>T/p.A405S



Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome (CMMR-D)

- Syndrome related to changes in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* or *EPCAM* genes
- Frequent and early occurence of colon cancer, haematological malignancies and brain tumors (malignant gliomas, high grade glioma)
- Typically TMB-high

CMMR-D: constitutional mismatch repair deficiency syndrome; TMB: tumour mutational burden.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Diagnostic work-up on proven CMMR-D

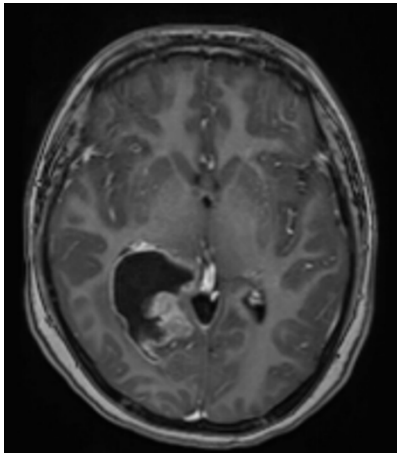
Jan 2014

Mar 2017

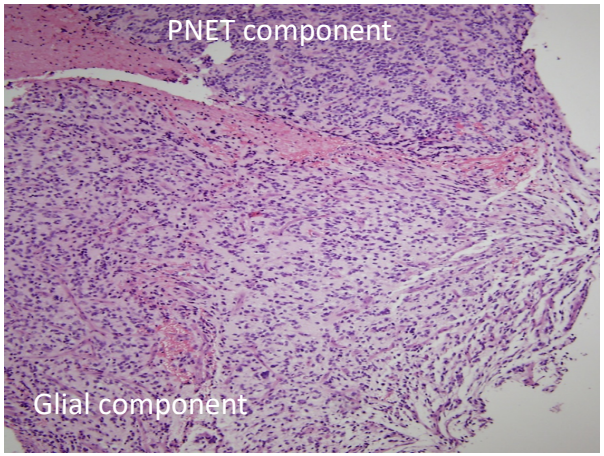
Secondary malignancy glioblastoma diagnosed

Based on proven bCMMR-D follow-up, paradigm changed to whole body MRI

Diagnostic MRI



Histopathology



CMMR-D: constitutional mismatch repair deficiency syndrome; MRI: magnetic resonance imaging;
PNET: primitive neuroectodermal tumour.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Treatment decision and early progression

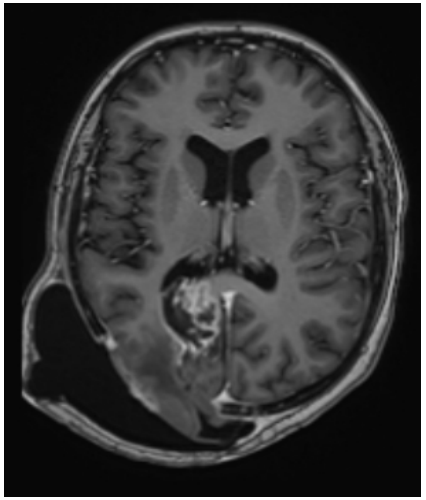
Jan 2014

Mar 2017

- Subtotal tumour resection with early postoperative progression
- Radiotherapy + concomitant alkylating chemotherapeutic agent /metronomic schedule/

April 2017

MRI scans revealed early progression



MRI: magnetic resonance imaging.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Genomic profiling performed

Germline exome analysis

- DNA purified from peripheral blood
- Whole dataset (exome) evaluated

Somatic exome analysis

- DNA purified from FFPE sample
- Whole dataset (exome) evaluated +
- Variants were filtered on the FoundationOne® gene set (315 genes)

Exome analysis methods: TruSeq® Exome kit, NextSeq™ 500 (Illumina®)

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Somatic mutations in glioblastoma sample

Gene	Variant
PIK3CA	c.1360G>T/p.D454Y c.2422C>T/p.R808W c.2746C>T/p.R916C
PIK3R1	c.37G>A/p.G13R c.418C>T/p.R140W
PDGFRA	c.863A>G/p.Y288C c.1715A>C/p.Y572S c.3265C>A/p.L1089M
PDGFRB	c.2765G>A/p.R922H
KDR	c.3352C>T/p.R1118X c.2830C>T/p.R944X

Gene	Variant
BRCA2	c.52C>T/p.R18C c.5292dupA/p.S1764fs c.6952C>T/p.R2318X
DNMT3A	c.2162C>T/p.A721V c.1679G>A/p.R560H c.1492G>A/p.V498I c.233C>T/ p.S78F
TP53	c.448C>T/p.R150W
RET	c.2437C>T/p.R813W
PTEN	c.180G>T/p.K60N c.922C>T/p.R308C

- MSI-high
- **TMB-high (384.23 / MB)**

MSI: microsatellite instability; TMB: tumour mutational burden.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

Molecularly-guided therapy

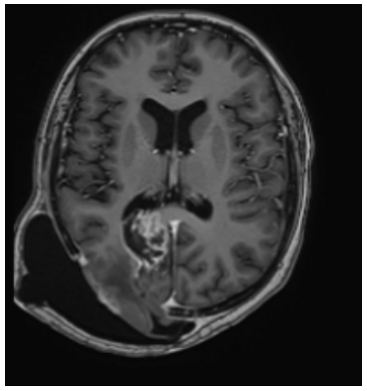
Prior immunotherapy

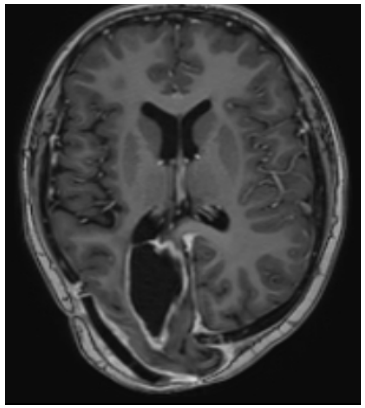
3 months

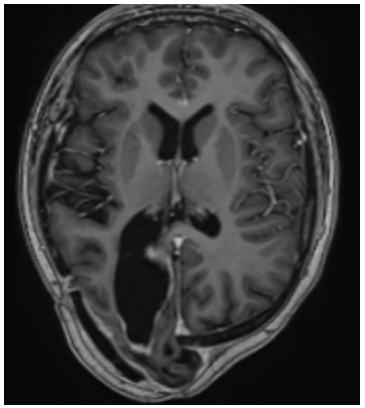
6 months

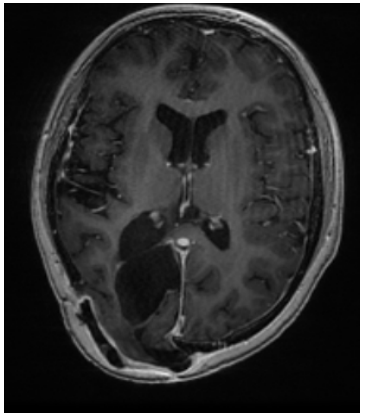
18 months

Based on high TMB: immune checkpoint inhibitor (anti PD-1) + autologous dendritic cell vaccine* producing IL-12 + valproic acid + metronomic low dose alkylating agent







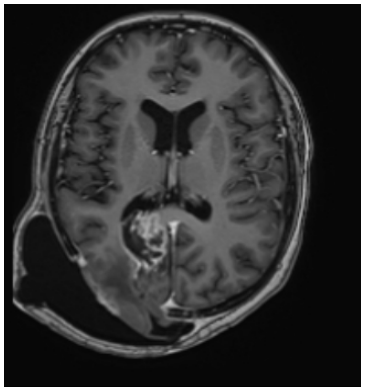


* EudraCT number 2014-003388-39.
TMB: tumour mutational burden.

Patient case 3: Secondary glioblastoma

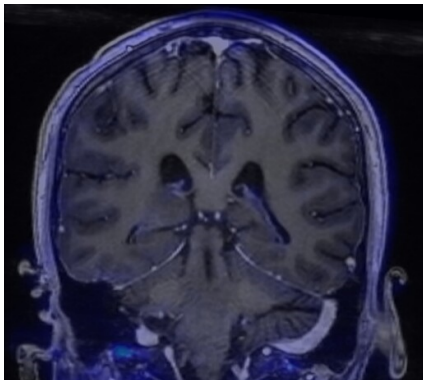
Patient follow-up

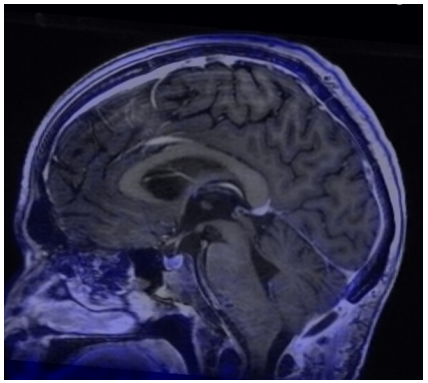
Prior immunotherapy



Recent follow-up (week 73)

- Gradual response on FLT-PET MRI
- Decreasing tumour size and PET avidity
- Able to attend school (outpatient treatment)
- Karnofsky 90





FLT-PET: fluoro-L-thymidine-positron emission tomography; MRI: magnetic resonance imaging;
PET: positron emission tomography.

Souhrn

- **Od 08/2016 - 08/2018 jsme provedli analýzu germinálního a somatického exomu, a komplexní analýzu fúzních genů u celkem 109 dětí**

- **Actionable varianty (level I a II) byly nalezeny u celkem 29 pacientů (27 %)**

- **Klinicky významná fúze byla pomocí sekvenování RNA nalezena u 25 pacientů (23%), přičemž 7 z těchto fúzí bylo terapeuticky cílitelných.**

- **Kombinací WES a komplexní analýzy fúzních genů se podařilo nalézt terapeuticky ovlivnitelnou variantu celkem u 36 pacientů (33%).**

- U všech tumorů byla stanovená mutační nálož (Tumor Mutational Burden, TMB) a u tumorů s **TMB>10 mut/Mb (celkem 8 - 7%)** také mutační podpis (mutational signature).

- **Molekulárně řízená cílená léčba (či její kombinace) byla podána u celkem 40 pacientů (37%).**

- **Při verifikaci nezávislou FDA-approved metodou jsme dosáhli 100% shody v identifikaci actionable mutací, a vysoké korelace TMB**

THANK YOU!

Molecular Oncology II (O. Slaby) group

CEITEC

Mgr. Hana Nosková, PhD
Mgr. Martina Rédová, PhD
Mgr. Jiří Šána, PhD
Mgr. Kamila Součková, PhD
Mgr. Jaroslav Juráček, PhD
Mgr. Petra Vychytilová-Faltejsková, PhD
Tina Catela Ivković , PhD
Mgr. Elleni Michu
Mgr. Soňa Klusová
MVDr. Martina Vodínská
Ing. Dana Knoflíčková

DEPT. OF PATHOLOGY

doc. MUDr. Leoš Křen, Ph.D.
MUDr. Marta Ježová, Ph.D.
MUDr. Zdeněk Pavlovský, Ph.D.

DEPARTMENT OF PEDIATRIC ONCOLOGY, UH BRNO
PROF. MUDr. JAROSLAV STERBA, PH.D.

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

CEITEC

Dr. Massimo Negrini
University of Ferrara

Prof. Klaus Jung
Charite, Berlin

Prof. George Calin
MD Anderson Cancer Center

Dr. Markus Kretz
University of Regensburg