



# **ctDNA analyse in de moleculaire pathologie**

**Winand N.M. Dinjens**

KMBP, Hoofd Moleculaire Diagnostiek

Afdeling Pathologie

Erasmus MC Kanker Instituut

w.dinjens@erasmusmc.nl

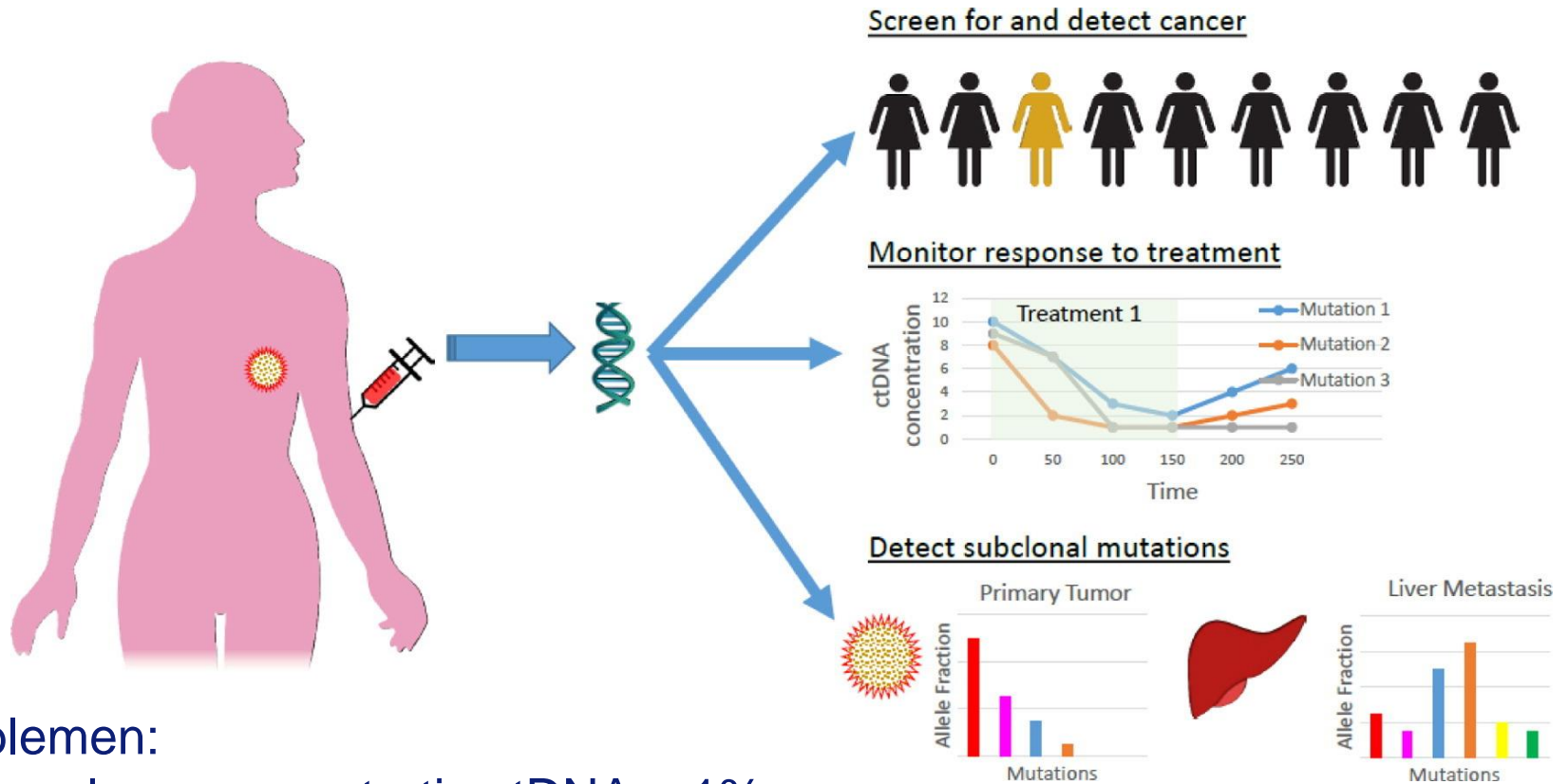
# Belangen Disclosure

**Sponsoring translationeel onderzoek: AstraZeneca**

**Lid adviesraad GI cancer, Amgen BV**

DNA in het bloed: cfDNA en ctDNA (normaal en tumor DNA: <math><0,1>50\%</math>)

Tumor-specifieke afwijkingen (mutaties, AI) kunnen gebruikt worden voor:



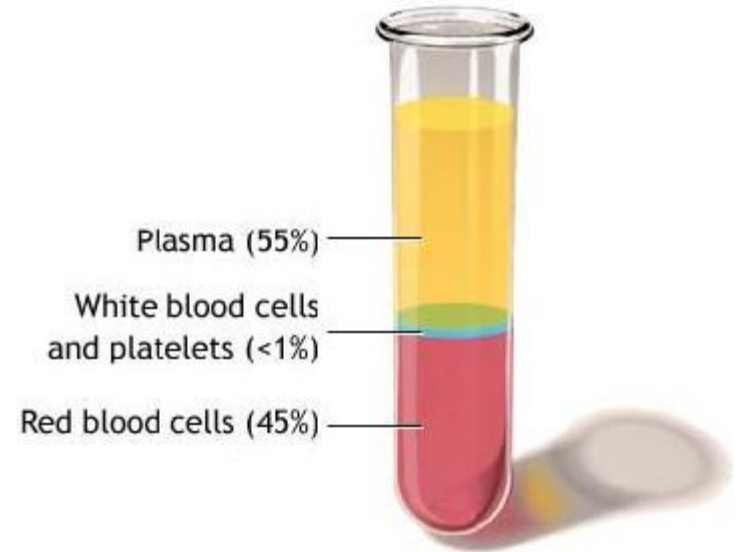
Problemen:

- Zeer lage concentratie ctDNA: <math><1\%</math>
- Sterk gefragmenteerd
- Gevoelige detectie nodig: <math><1\%</math>

**Bloedafname (liquid biopsy)**  
**Minimaal invasief: CellSave**

**Opslag: maximaal 96 uur K.T.**

**Verzamelen plasma: centrifugatie**



**DNA isolatie: 5 ml plasma**

QiaAmp Circulating Nucleic Acid (QiaAmp CNA) kit

DNA 20-60 $\mu$ l, totaal 10–100ng

Input S5XL 13 $\mu$ l, 5-50ng

Oncomine cfDNA panels:

**Lung:** ALK (25), NRAS (23), PIK3CA (3), ROS1 (1), EGFR (39), MET (18), BRAF (7), KRAS (12), MAP2K1 (13), TP53 (34), HER2 (1)  
**Totaal 176 hotspots**

**Breast:** SF3B1 (1), PIK3CA (18), FBXW7 (2), ESR1 (7), EGFR (7), KRAS (10), AKT1 (1), TP53 (97), HER2 (2), HER3 (16)  
**Totaal 161 hotspots**

**Colon:** NRAS (22), PIK3CA (14), FBXW7 (8), BRAF (3), APC (36), EGFR (10), KRAS (13), AKT1 (1), CTNNB1 (6), HER2 (9), MAP2K1 (10), TP53 (97), HER2 (9), SMAD4 (8), GNAS (5)  
**Totaal 242 hotspots**

# Workflow



DNA Isolation

Isolation of cfDNA from blood or DNA from tumor



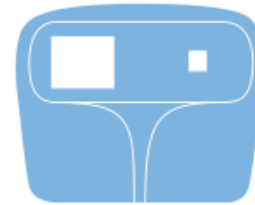
Library preparation

Oncomine™ cfDNA Assays



Template preparation

Ion Chef™ System



Next-generation sequencing

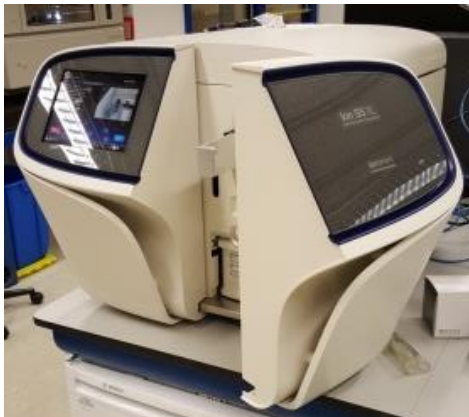
Ion S5/S5XL™ System



Post-sequencing analysis

TSS 5.2 variantCaller

Ion Reporter™ Software



Chips: 520: 5 miljoen reads output  
530: 20 miljoen reads output  
540: 80 miljoen reads output

# Unique Identifier Tagging (single molecule molecular tag)

1. **Start:**            **2 PCR cycli met “uniquely tagged primers”  
en A/P1 adaptors:** 4000 verschillende mogelijkheden
2. **Resultaat:**    Copie van elk origineel DNA fragment (template) wordt geflankeerd door de random sequences en A/P1 sequentie adaptors aan 5' en 3' uiteinde.  
4000 x 4000 = **16 miljoen unieke identifiers per amplicon**  
> Significant meer dan het aantal haploïde genomen  
input DNA: ~6000 haploïde genomen in 20 ng
3.            **Zuivering: verwijdering niet gebruikte tagged primers**
4.            **18 PCR cycli met universele A/P1 adaptors, daarna 2x zuivering**
5.            **Sequencing S5XL**

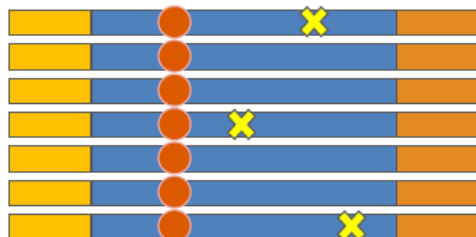
## cfDNA molecule with tumor variant



### 1) Tag labeling of each DNA molecule

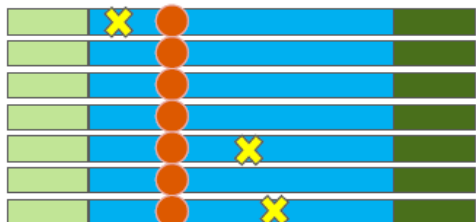


### 2) Tag family amplification and sequencing



● True Variant

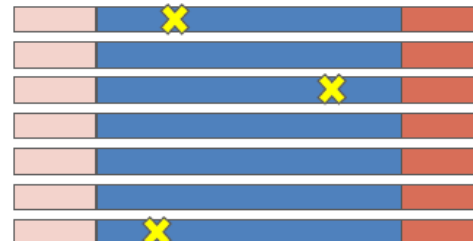
✕ Error



### 2) Error correction via consensus sequence

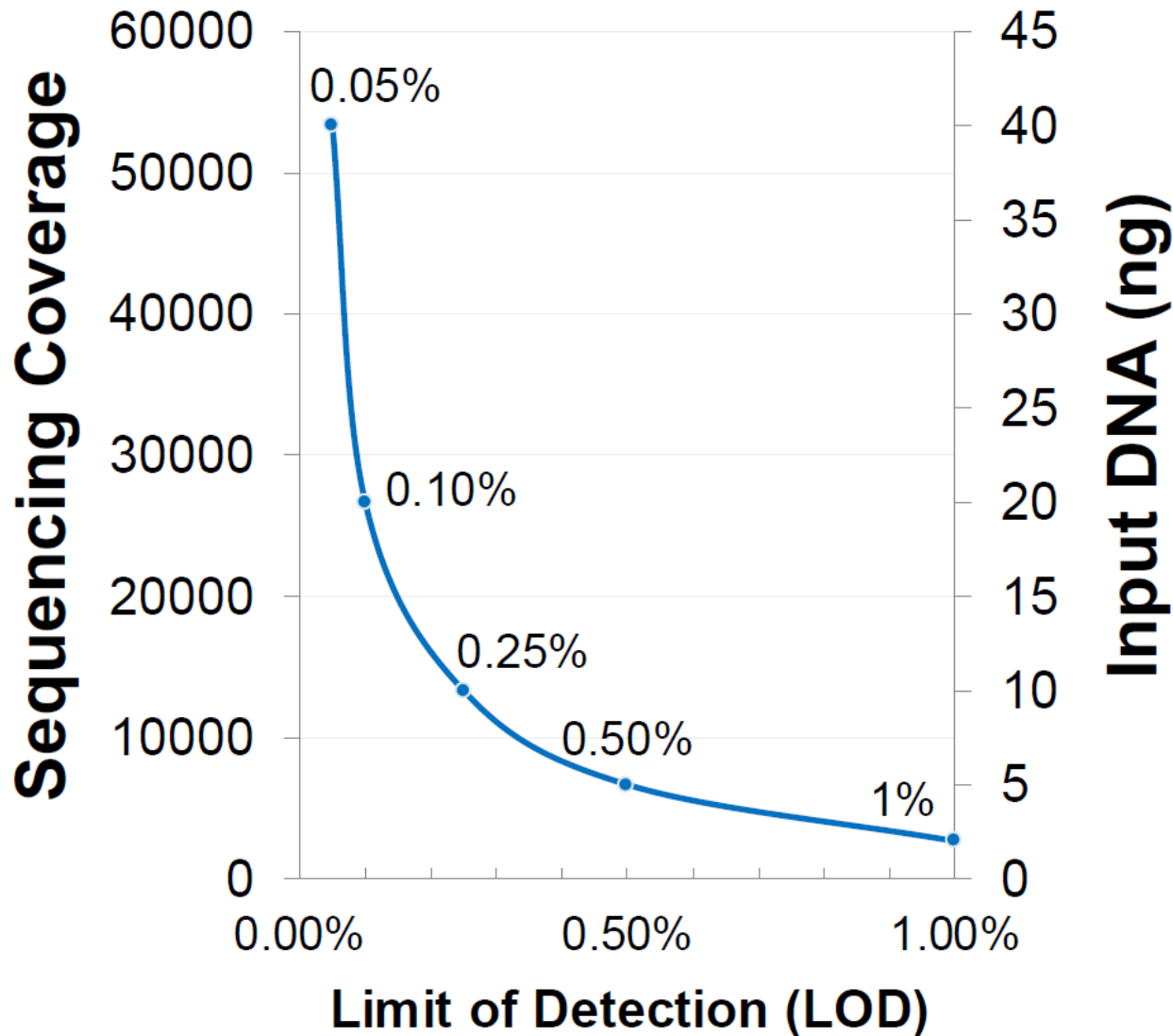


## Wild type cfDNA molecule

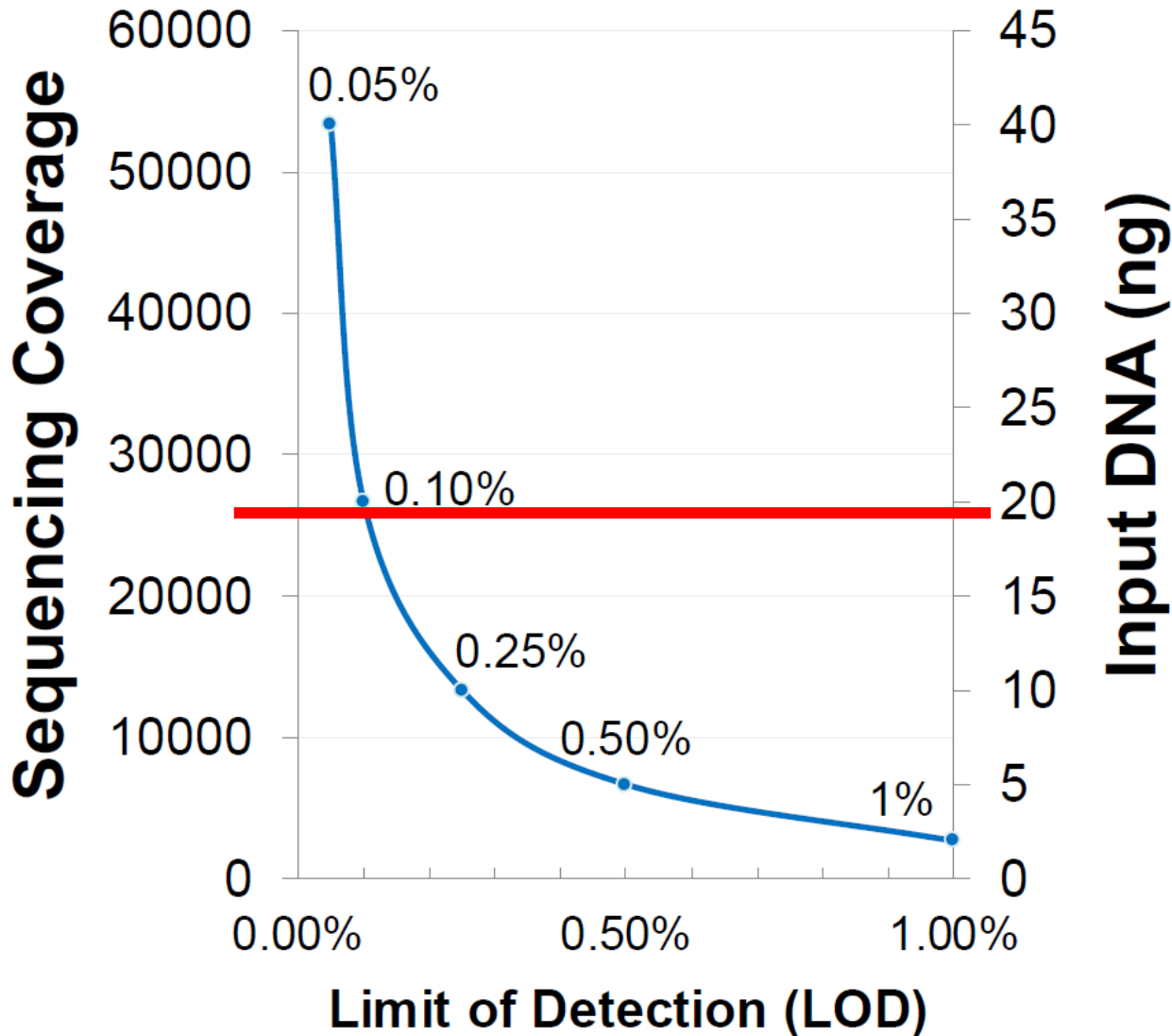




# Limit of detection



# Limit of detection



**Detectie 0,1% variant:**

**20ng input**

**~ 6000 haploïde genomen**

**~ 6000 templates**

**25000x coverage**

**6000 unieke moleculen**

**0,1% = 6 moleculen variant**

# Horizon multiplex cfDNA referentie

DNA samples die cfDNA monsters representeren.

Bevat 8 mutaties met 5%, 1% en 0,1% allel frequenties

Wildtype monster voor detectie achtergrond

Bepalen sensitiviteit en specificiteit

Bepalen limit of detection

Validatie en verificatie

**EGFR**

L858R

ΔE746-A750

T790M

V769-D770insASV

**KRAS**

G12D

**NRAS**

Q61K

A59T

**PIK3CA**

E5454K

Erasmus MC



Kanker Instituut

# Resultaat 0% mutant (wildtype)

## 20ng input

Gene	Variant	Horizon%	Coverage	AlleleReadCov	AlleleReadFreq	MolCov	AlleleMolCov	AlleleMolFreq
NRAS	Q61K	0.00%	29968	0	0.00%	4082	0	0.00%
NRAS	A59T	0.00%	29959	0	0.00%	4087	0	0.00%
PIK3CA	E545K	0.00%	27659	0	0.00%	3928	0	0.00%
EGFR	ΔE746 - A750	0.00%	31918	0	0.00%	4457	0	0.00%
EGFR	V769 - D770insASV	0.00%	34985	0	0.00%	4942	0	0.00%
EGFR	T790M	0.00%	35582	0	0.00%	4616	0	0.00%
EGFR	L858R	0.00%	21104	0	0.00%	2559	0	0.00%
KRAS	G12D	0.00%	33049	0	0.00%	4368	0	0.00%

# Resultaat 5% mutant 20ng input

Gene	Variant	Horizon%	Coverage	AlleleReadCov	AlleleReadFreq	MolCov	AlleleMolCov	AlleleMolFreq
NRAS	Q61K	6.30%	27151	1706	6.28%	3872	240	6.20%
NRAS	A59T	6.30%	27150	1738	6.40%	3877	240	6.19%
PIK3CA	E545K	6.30%	25833	1727	6.69%	3698	251	6.79%
EGFR	ΔE746 - A750	5.00%	29833	1316	4.41%	4113	234	5.69%
EGFR	V769 - D770insASV	5.00%	32856	1325	4.03%	4718	212	4.49%
EGFR	T790M	5.00%	32807	1481	4.51%	4410	194	4.40%
EGFR	L858R	5.00%	19648	1035	5.27%	2462	135	5.48%
KRAS	G12D	6.30%	31411	1854	5.90%	4127	254	6.15%

# Resultaat 1% mutant 20ng input

Gene	Variant	Horizon%	Coverage	AlleleReadCov	AlleleReadFreq	MolCov	AlleleMolCov	AlleleMolFreq
NRAS	Q61K	1.30%	26349	376	1.43%	3800	50	1.32%
NRAS	A59T	1.30%	26345	391	1.48%	3806	60	1.58%
PIK3CA	E545K	1.30%	26618	460	1.73%	3808	67	1.76%
EGFR	ΔE746 - A750	1.00%	28952	257	0.89%	4052	47	1.16%
EGFR	V769 - D770insASV	1.00%	34199	252	0.74%	4794	36	0.75%
EGFR	T790M	1.00%	31665	228	0.72%	4287	35	0.82%
EGFR	L858R	1.00%	19473	226	1.16%	2457	32	1.30%
KRAS	G12D	1.30%	31269	449	1.44%	4173	66	1.58%

# Resultaat 0,1% mutant 20ng input

Gene	Variant	Horizon%	Coverage	AlleleReadCov	AlleleReadFreq	MolCov	AlleleMolCov	AlleleMolFreq
NRAS	Q61K	0.13%	23932	39	0.16%	3587	7	0.20%
NRAS	A59T	0.13%	23929	21	0.09%	3589	3	0.08%
PIK3CA	E545K	0.13%	21881	12	0.05%	3289	2	0.06%
EGFR	ΔE746 - A750	0.10%	25860	30	0.12%	3875	5	0.13%
EGFR	V769 - D770insASV	0.10%	27916	0	0.00%	4257	0	0.00%
EGFR	T790M	0.10%	30505	23	0.08%	4262	4	0.09%
EGFR	L858R	0.10%	18319	21	0.11%	2454	3	0.12%
KRAS	G12D	0.13%	27944	70	0.25%	3977	9	0.23%

# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC



# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC

	EGFR	EGFR	TP53	EGFR	EGFR	PIK3CA	PIK3CA	TP53
	V834L	L858R	R248W	T790M	C797S	E545K	E542K	R175H
Cytologie-2010	60	56	75					
long-brush 2,1								

Aangegeven zijn percentages variant  
ng input DNA

# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC

	EGFR	EGFR	TP53	EGFR	EGFR	PIK3CA	PIK3CA	TP53
	V834L	L858R	R248W	T790M	C797S	E545K	E542K	R175H
Cytologie-2010	60	56	75					
long-brush 2,1								
Cytologie-2014	51	9	5	4				
Long spoeling 6,3								

Aangegeven zijn percentages variant  
ng input DNA

# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC

	EGFR V834L	EGFR L858R	TP53 R248W	EGFR T790M	EGFR C797S	PIK3CA E545K	PIK3CA E542K	TP53 R175H
Cytologie-2010 long-brush 2,1	60	56	75					
Cytologie-2014 Long spoeling 6,3	51	9	5	4				
Bloed-aug 2016 18	aanw.	1,6 (7)	3,2 (32)	3,74 (27)	3,19 (23)			

Aangegeven zijn percentages variant, (aantal unieke moleculen)  
ng input DNA

# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC

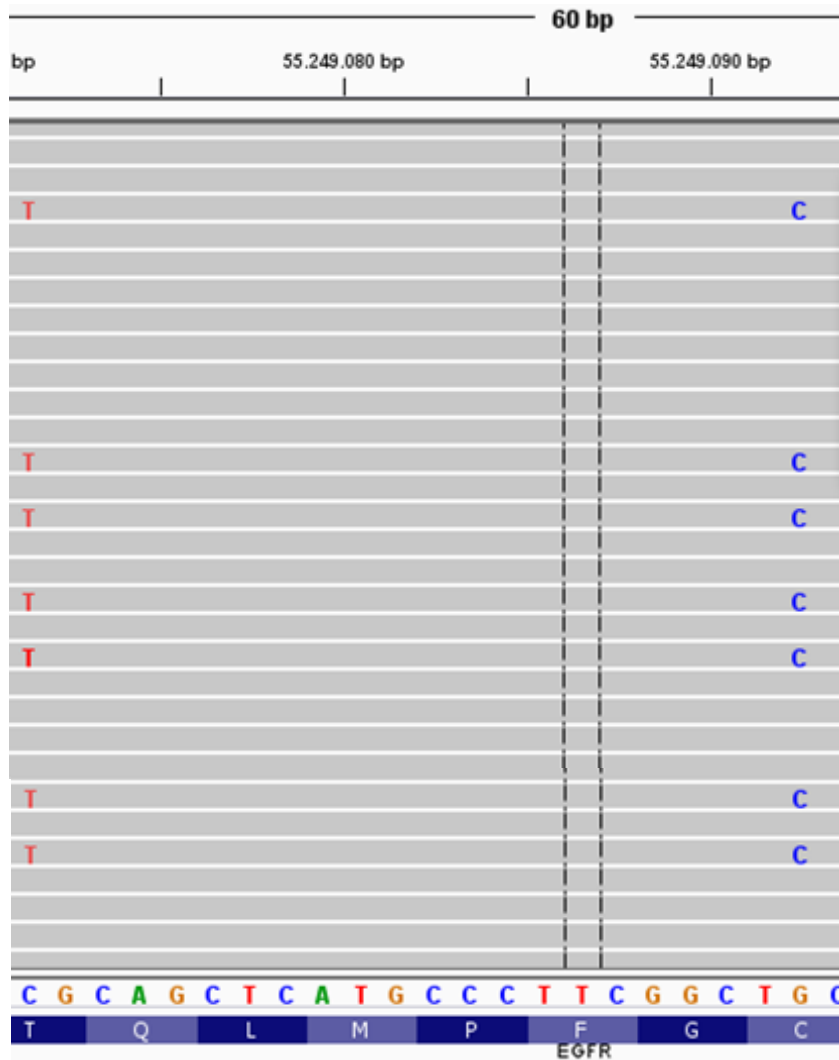
	EGFR V834L	EGFR L858R	TP53 R248W	EGFR T790M	EGFR C797S	PIK3CA E545K	PIK3CA E542K	TP53 R175H
Cytologie-2010 long-brush <b>2,1</b>	60	56	75					
Cytologie-2014 Long spoeling <b>6,3</b>	51	9	5	4				
Bloed-aug 2016 <b>18</b>	aanw.	1,6 (7)	3,2 (32)	3,74 (27)	3,19 (23)			
Bloed-okt 2016 <b>21</b>	aanw.	0,88 (12)	1,12 (30)	1,06 (20)	1,37 (NA)	0,1 (3)		

Aangegeven zijn percentages variant, (aantal unieke moleculen)  
ng input DNA

# Mevrouw, 57 jaar, in 2008 longcytologie: NSCLC

	EGFR V834L	EGFR L858R	TP53 R248W	EGFR T790M	EGFR C797S	PIK3CA E545K	PIK3CA E542K	TP53 R175H
Cytologie-2010 long-brush <b>2,1</b>	60	56	75					
Cytologie-2014 Long spoeling <b>6,3</b>	51	9	5	4				
Bloed-aug 2016 <b>18</b>	aanw.	1,6 (7)	3,2 (32)	3,74 (27)	3,19 (23)			
Bloed-okt 2016 <b>21</b>	aanw.	0,88 (12)	1,12 (30)	1,06 (20)	1,37 (NA)	0,1 (3)		
Bloed-nov 2016 <b>17</b>	aanw.	3,22 (27)	3,23 (62)	3,53 (58)	1,58 (26)	1,02 (24)	0,51 (12)	0,15 (2)

Aangegeven zijn percentages variant, (aantal unieke moleculen)  
ng input DNA



**T790M**

*in cis*

**C797S**

# Plasma ctDNA analyses moleculaire diagnostiek:

## *Patiëntenzorg (diagnostiek):*

1. Patiënten met longkanker Erasmus MC en perifere ziekenhuizen
2. NSCLC patiënten waarbij geen biopt kan worden genomen:  
ctDNA analyse
3. Bloed, plasma, NGS analyse ctDNA
4. 1x per 2 weken bespreking longoncologie MDO
5. Formulier wordt ingevuld door longarts: uitslag + behandeladvies

## *Research (pre-diagnostiek):*

1. 20 NSCLC patiënten met EGFR mutatie in tumor worden prospectief vervolgd: ctDNA analyse om de 6 weken **START-TKI project**
2. Andere oncologische patiënten met al dan niet aangetoonde mutatie(s) in de primaire tumor: ctDNA analyse

# Samenvatting:

- Multiplex NGS gebaseerde analyse van ctDNA mogelijk (mutaties, AI)
- Goede correlatie met digital PCR
- Combinatie met resultaten tumor analyse (mutaties)
- Voordeel simultane detectie meerdere varianten (primaire EGFR mutaties, TP53 mutaties, nieuwe) als marker voor ctDNA
- Hoeveelheid input DNA belangrijk: bepaalt gevoeligheid:  
5ng: 0,25%; 20ng: 0,1%
- Single molecule tags vergroot betrouwbare sensitiviteit tot 0,1% allel frequentie.
- Negatieve controles essentieel:  
achtergrond mutatie- en positie-afhankelijk.



- Pathologie, moleculaire diagnostiek:



*Ronald van Marion*



*Peggy Atmodimedjo*



*Erik Jan Dubbink*

- Longziekten: Prof dr. Joachim Aerts
- Interne Oncologie: Dr. Maurice Jansen
- Klinische Chemie: Prof. dr. Ron van Schaik  
Evert de Jonge