

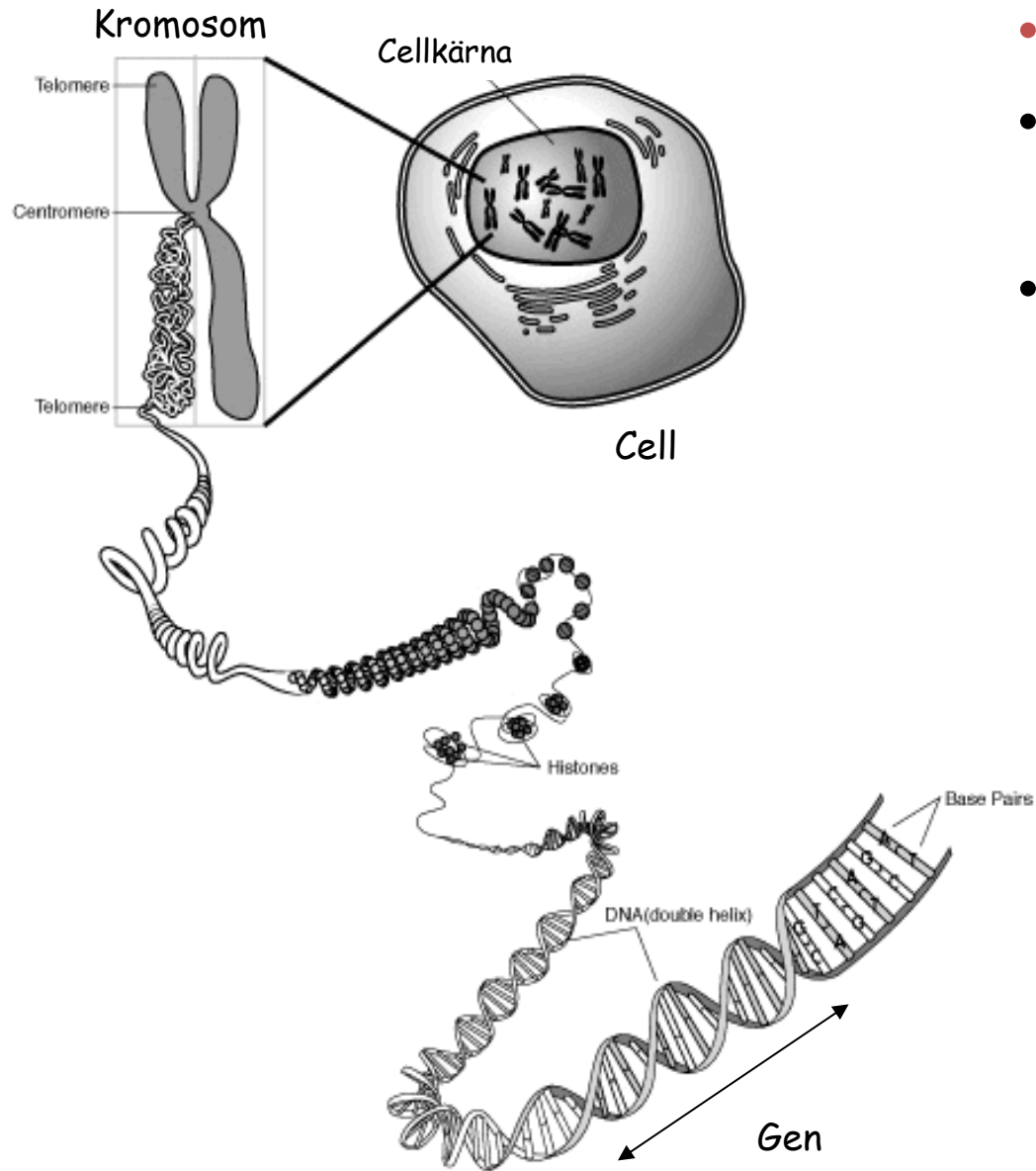
Genetisk diagnostik



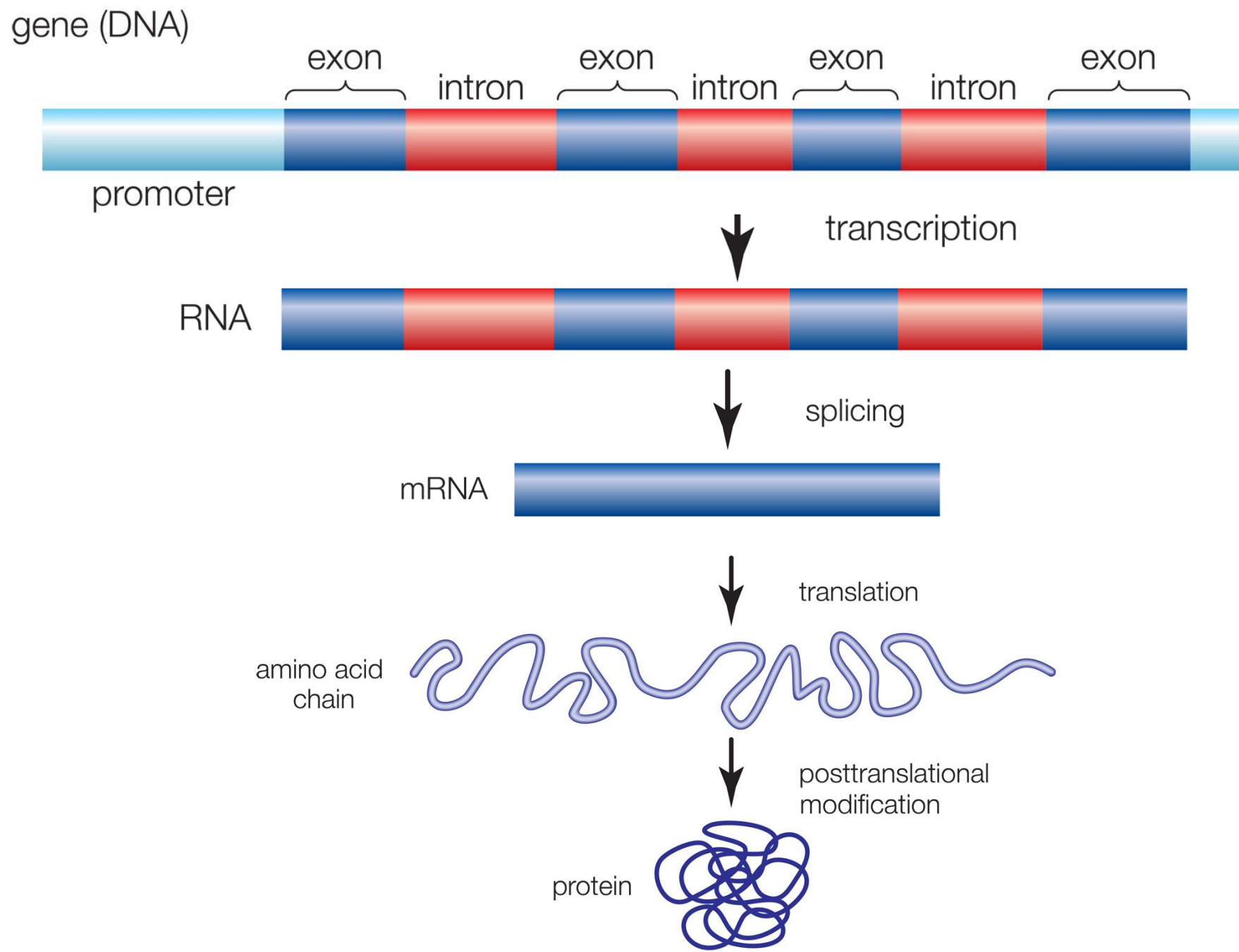
Ingegerd Öfverholm
Klinisk genetik och genomik
Karolinska Universitetssjukhuset

Dagens presentation

1. Grundläggande genetik
2. Tumörgenetik
3. Genetiska avvikelser
4. Genetiska metoder
5. Sammanfattning

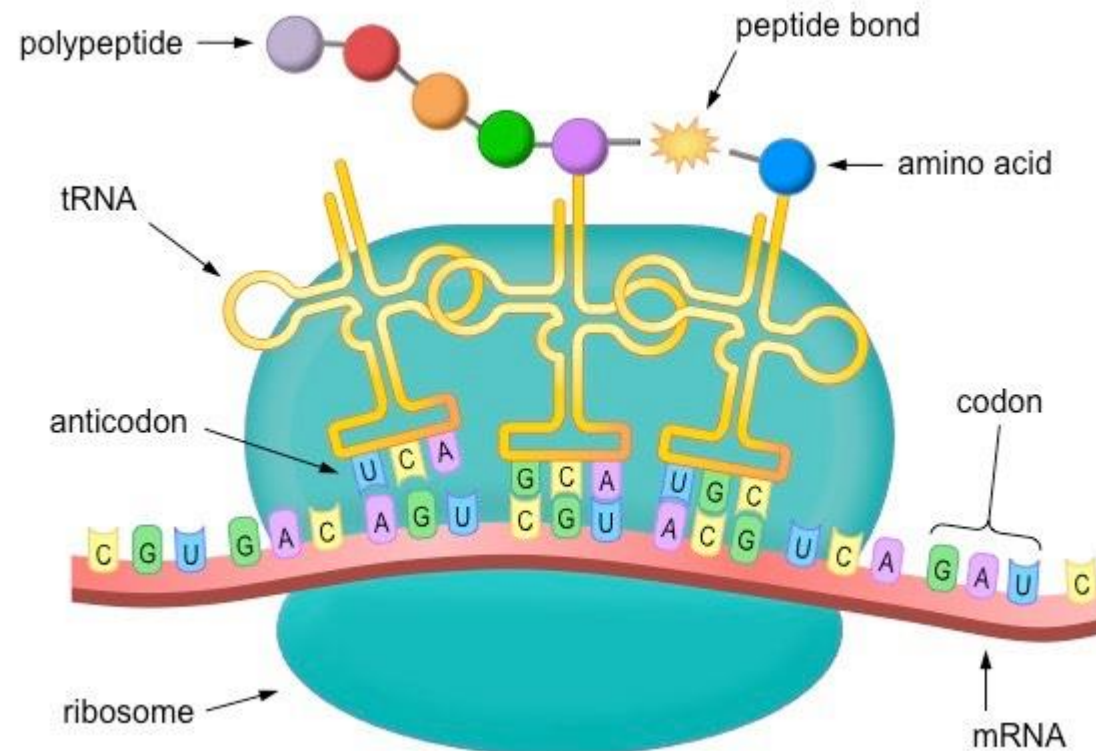


- 6,2 miljarder baspar i en cell
- Proteinkodande gener = 1-2% av hela genomet
- Mängder av andra regulatoriska regioner som påverkar transkription, tillgänglighet, lokalisation, splicing m.m.



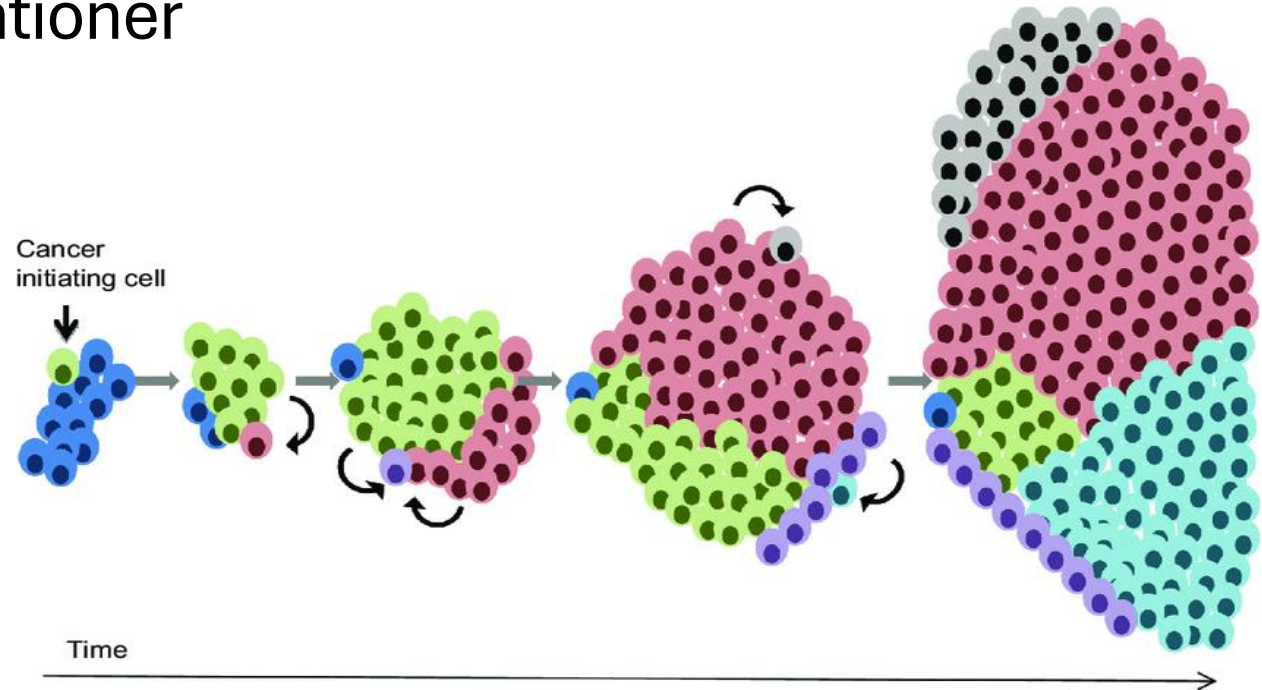
Translation

- **Kodon** = en följd av tre nukleotider som kodar för en aminosyra eller en stopp-signal



Cancer är en genetisk sjukdom

- Celltillväxt och differentiering kontrolleras av gener
- Gradvis ackumulering av mutationer
- Drivers och passengers

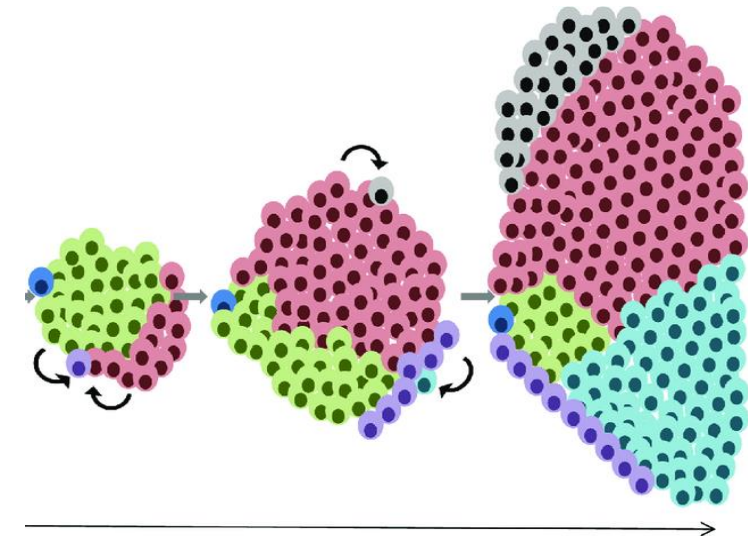


Gener i tumörutveckling

- Onkogener
 - Aktiverande genetiska varianter i tillväxtgener
 - Onkogen pathways: Tyrosinkinas, MAPK/ERK-, mTOR-, JAK-STAT
 - Inte nedärvda
- Tumörsuppressorer
 - Inaktiverande varianter i gener som reparerar, skyddar, hindrar delning
 - Two-hit-hypothesis
 - Första varianten kan vara nedärvd
 - Instabila genom, sekvenseringsfel, kromosombrott

Tumörgenetik i labbet

- Mixad cellpopulation
- Representativitet? Procent av maligna celler i provet?
- Kloner och subkloner? Variantallelfrekvens VAF
- Känslighet hos metoder att hitta de viktiga varianterna?
- En liten subklon kan vara viktig, t ex TP53!



Genetiska avvikelser i cancer

Aneuploidi

Tillkomst eller förlust av hela kromosomer

Strukturella rearrangemang

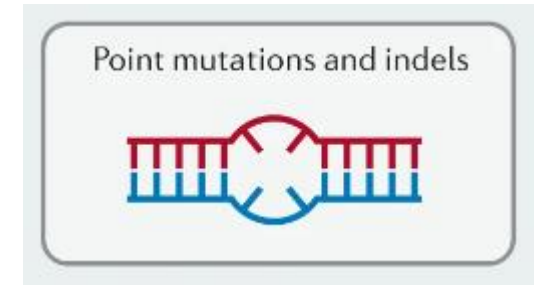
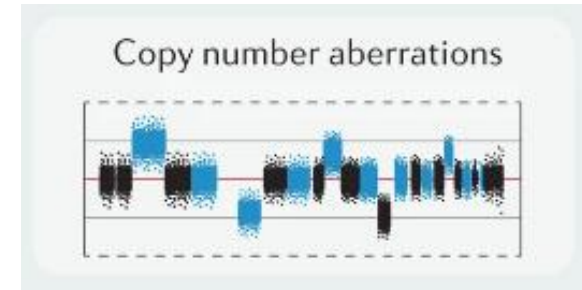
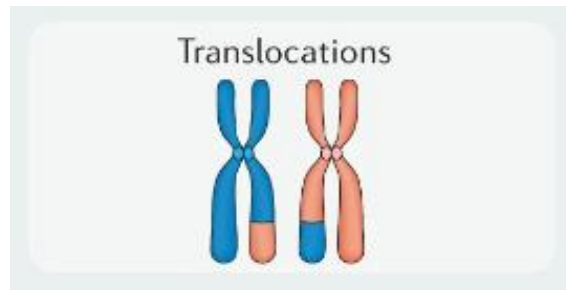
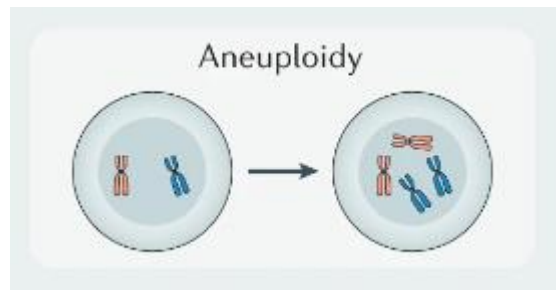
Translokationer som orsakar genfusioner

Kopienummeravvikelser

Deletioner eller duplikationer av DNA-segment

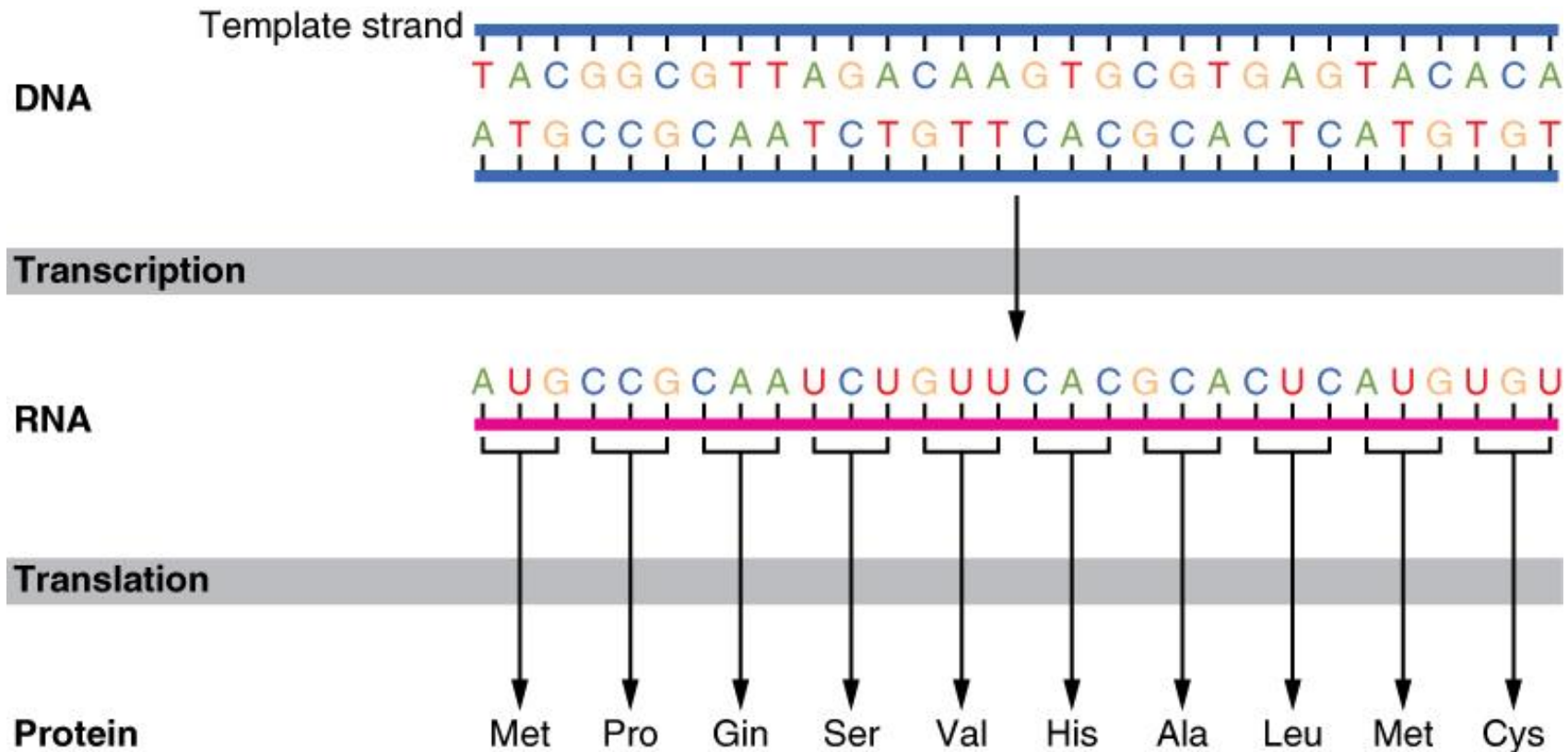
Sekvensvarianter

Single nucleotide variants (SNVs) och INDELs i viktiga gener



Sekvensavvikelser

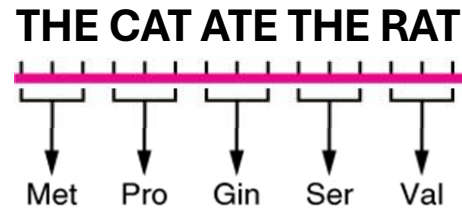
- Förändringar i DNA-sekvensen som påverkar den genetiska koden



Sekvensavvikelser

- **Synonymous** = ändrad nukleotid men samma aminosyra
- **Non-synonymous** = ändrad nukleotid som ändrar aminosyra
 - ✓ Missense = byte av en nukleotid som ger ändrad aminosyra
 - ✓ Nonsense = byte av en nukleotid som ger prematurt stoppkodon
- **In-frame** = deletion, duplikation eller insertion som inte påverkar läsramen men kan förändra polypeptiden (delbar med 3)
- **Frameshift** = deletion, insertion, duplikation som förskjuter läsramen (ej delbar med 3)
- **Silent** = förändring av DNA-sekvens som inte påverkar fenotypen
- **Gain-of-function** = variant som ökar aktivitet/ger ny funktion
- **Loss-of-function** = variant som minskar aktivitet
- **Dominant-negative** = variant som aktivt motverkar funktion av frisk kopia

Sekvensavvikelser



THE CAT ATE THE RA**t** tyst variant

THE CAT ATE THE **H**AT substitution av en nukleotid (varianter i TP53, NUDT15)

➤ Missense

THE CAT AT**T** **HEH** AT deletion av en eller flera nukleotider

➤ Inframe, frameshift/nonsense

THE **FAT** CAT ATE THE RAT insertion av en eller flera nukleotider (NPM1 vid AML)

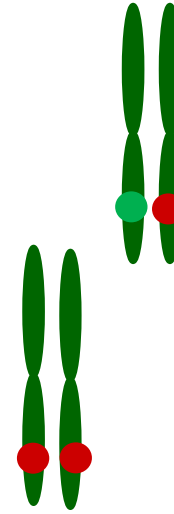
➤ Inframe, frameshift/nonsense

THE CAT ATE **THE CAT ATE** THE RAT duplikation (FLT3 ITD vid AML)

➤ Inframe, frameshift/nonsense

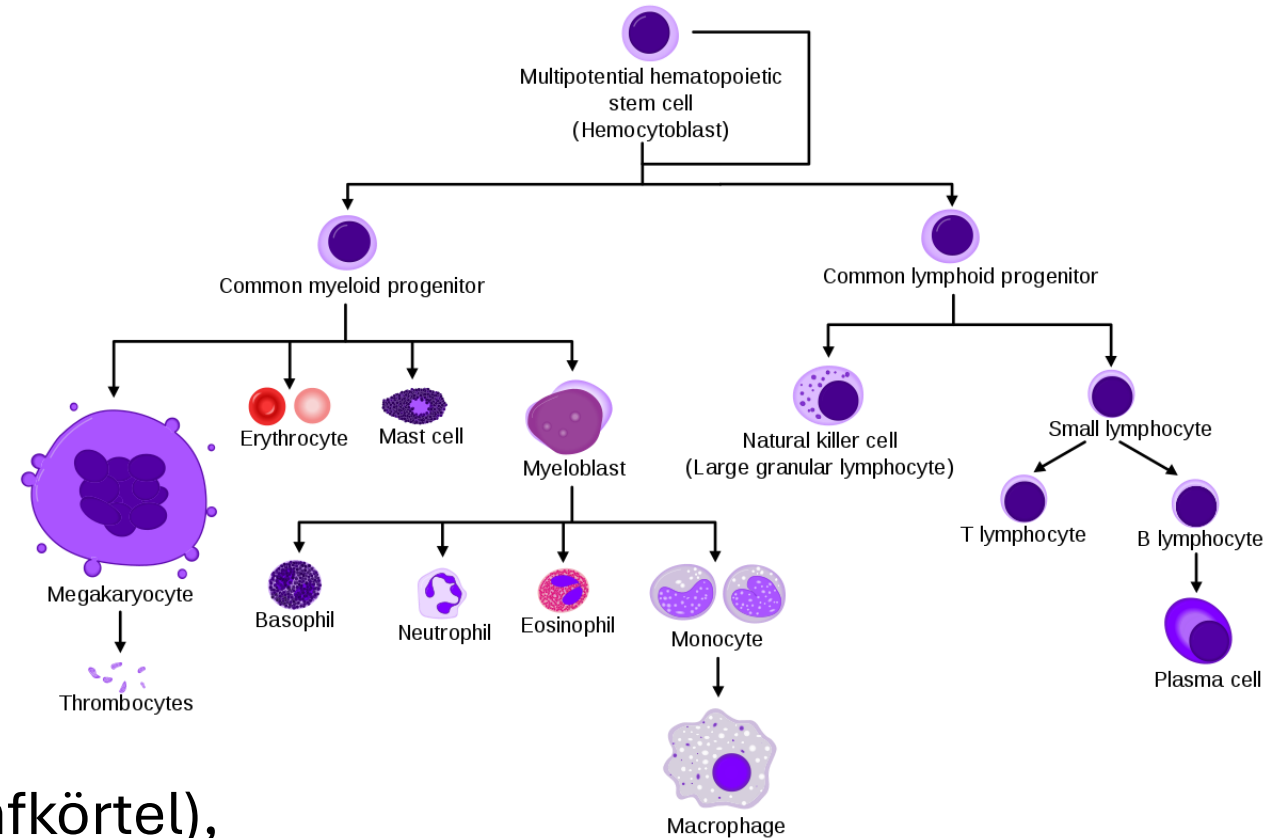
Sekvensavvikelser

- **Heterozygot** variant – förändring på ena genkopian
- **Homozygot** variant – förändring på båda genkopiorna
- **Hemizygot** variant – förlust av den friska genkopian
- **Loss of heterozygosity** – på grund av deletion eller uniparental disomi



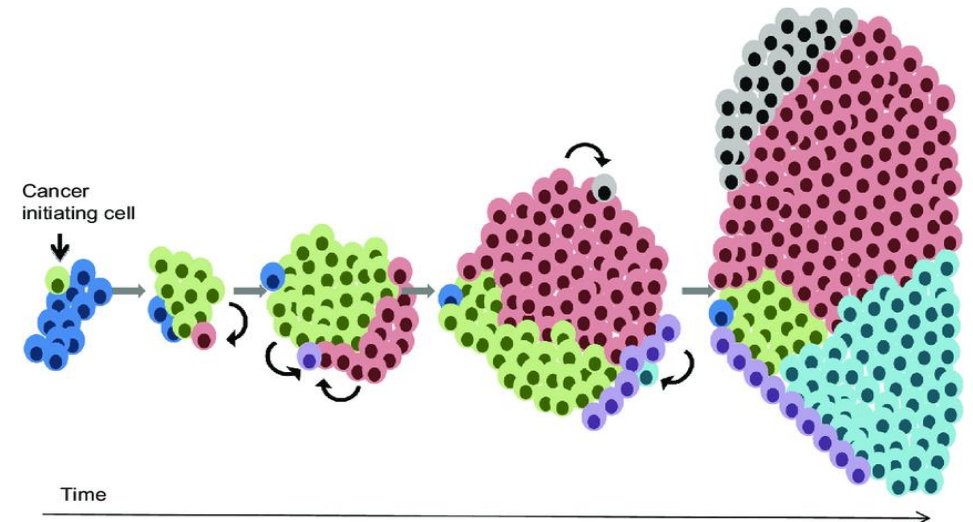
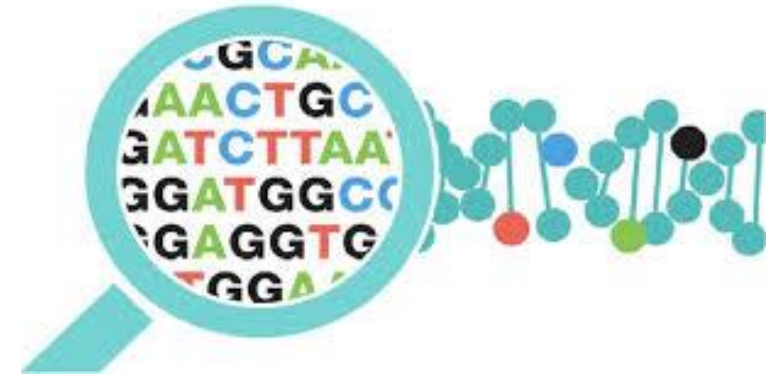
Genetisk utredning beror på diagnos

- Vilka analyser ska beställas??
- Avvakta PAD
- Myeloid eller lymfoid?
- Kronisk eller akut?
- Mixad fenotyp?
- Tumörlokalisering (benmärg/blod/lymfkörtel),
har vi representativt material?



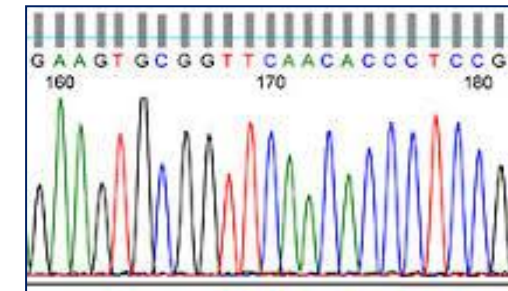
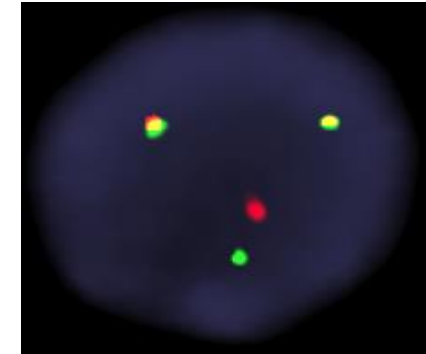
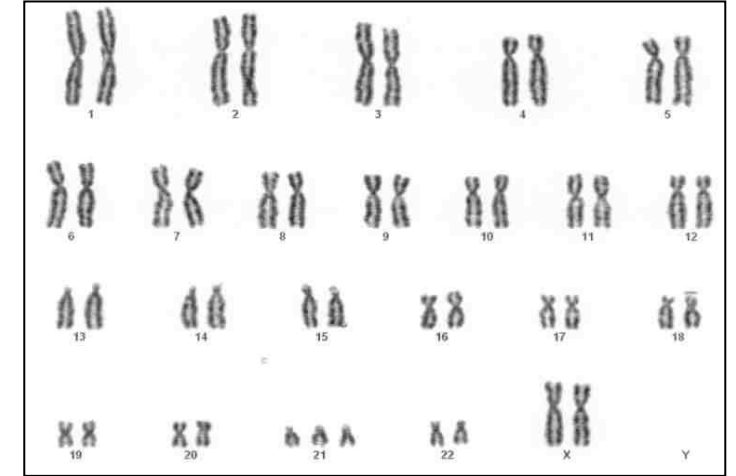
Syfte med genetisk diagnostik

- Diagnostisk klassificering
- Riskstratifiering
 - Prognostiska markörer
 - Prediktiva markörer
- Riktad behandling
- Följa klonal evolution
- Minimal kvarvarande sjukdom (MRD)



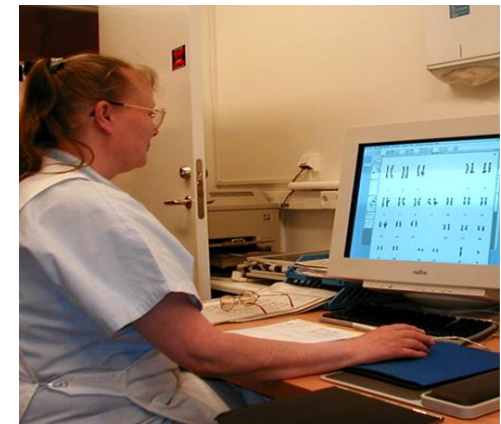
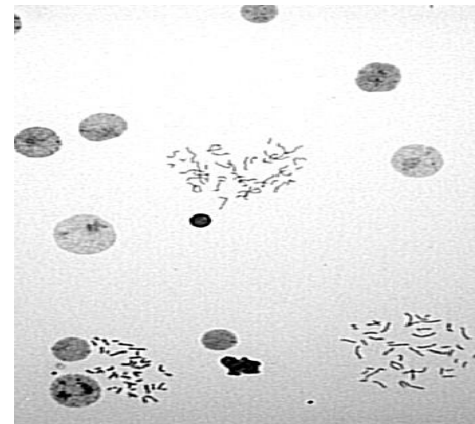
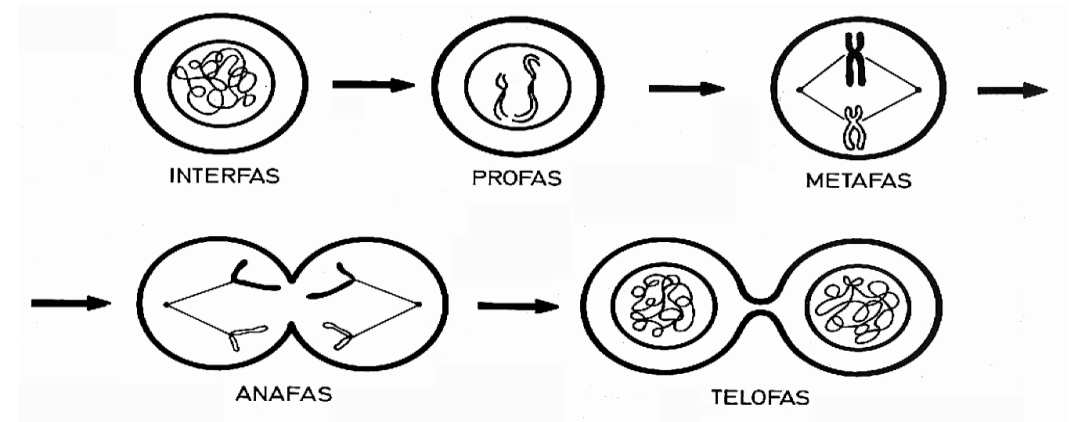
Metoder för cancergenetik

- Cytogenetik
 - ✓ *Kromosomanalys*
 - ✓ *FISH (fluorescence in situ hybridization)*
- DNA-baserad
 - ✓ *Genomiska arrayer*
 - ✓ PCR (*kvalitativ* eller *kvantitativ*)
 - ✓ DdPCR
 - ✓ *Sangersekvensering*
 - ✓ Massiv Parallell sekvensering
- RNA-baserad
 - ✓ Reverse Transcription PCR (*kvalitativ* eller *kvantitativ*)
 - ✓ RNA-sekvensering



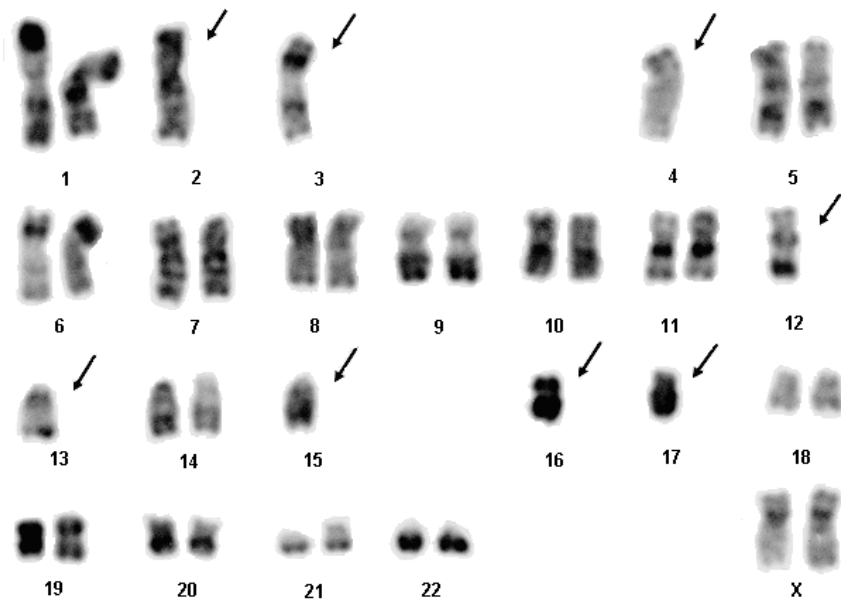
Kromosomanalys

- Benmärg eller lymfkörtel
- Cellodling
- Metafas-halt
- Undersöker förekomst av aneuploidier och strukturella varianter

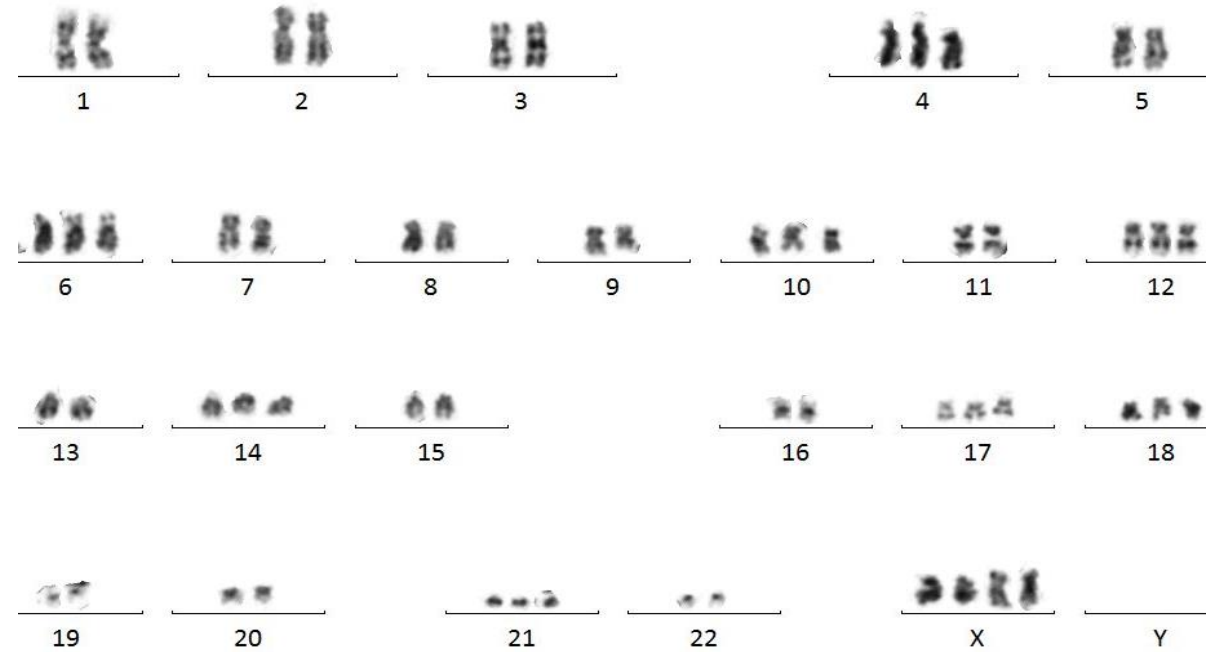


Kromosomanalys - aneuploidier

Hypodiploidi

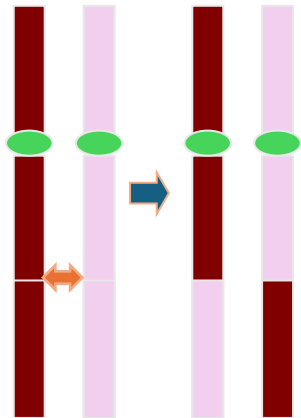


Hyperdiploidi

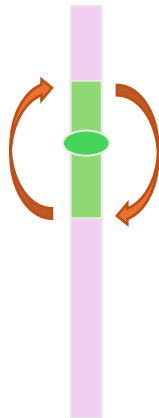


Kromosomanalys - strukturella varianter

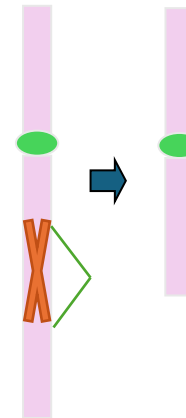
- Translokationer
- Inversioner
- Stora deletioner eller duplikationer



Translokation



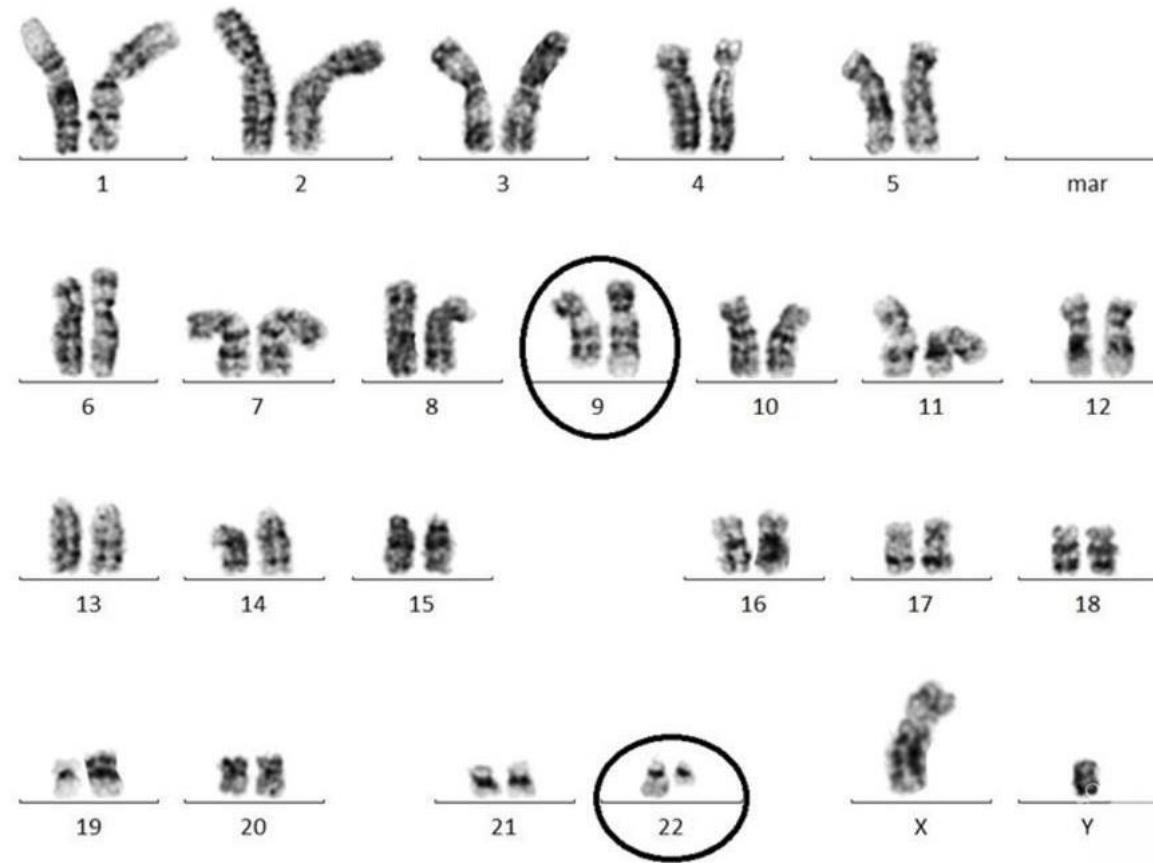
Inversion



Deletion

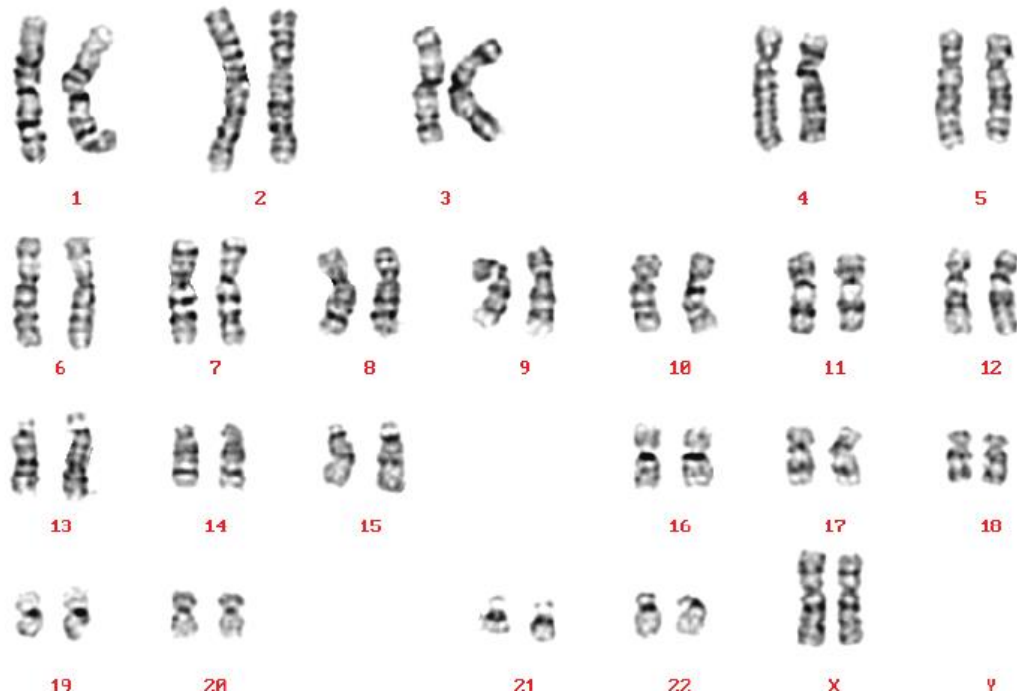
Kromosomanalys - strukturella varianter

Philadelphia+
vid KML

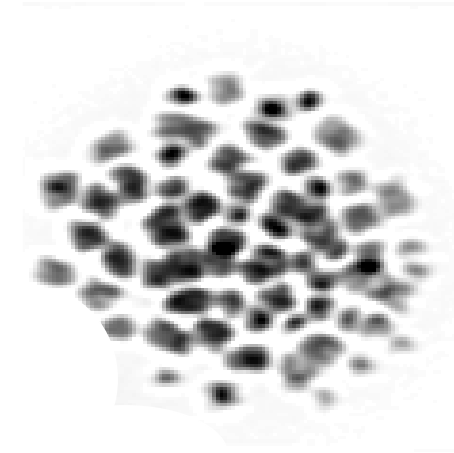


46,XY,t(9;22)(q34;q11)

Normala- vs leukemikromosomer...

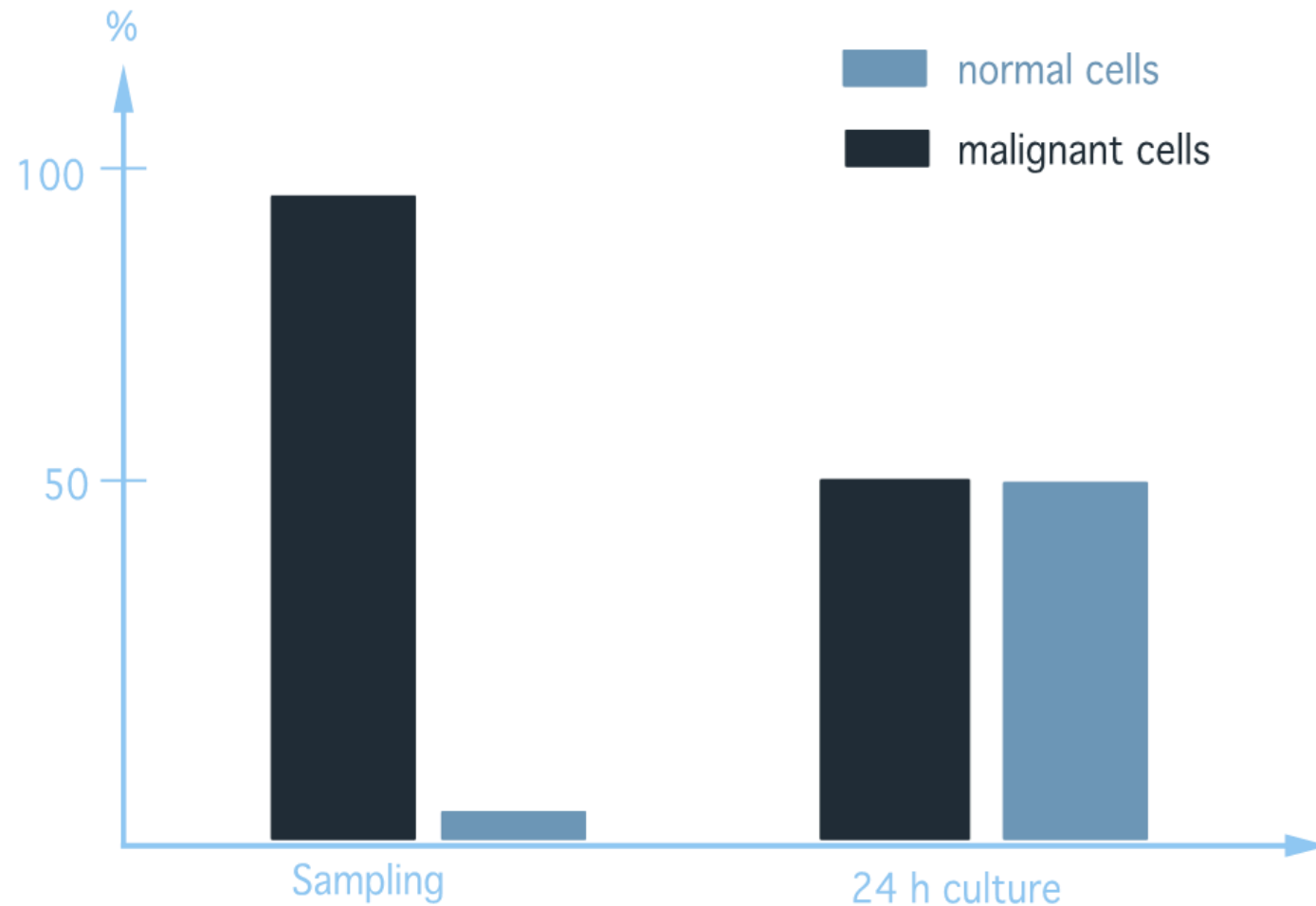


a) Frisk metafaser



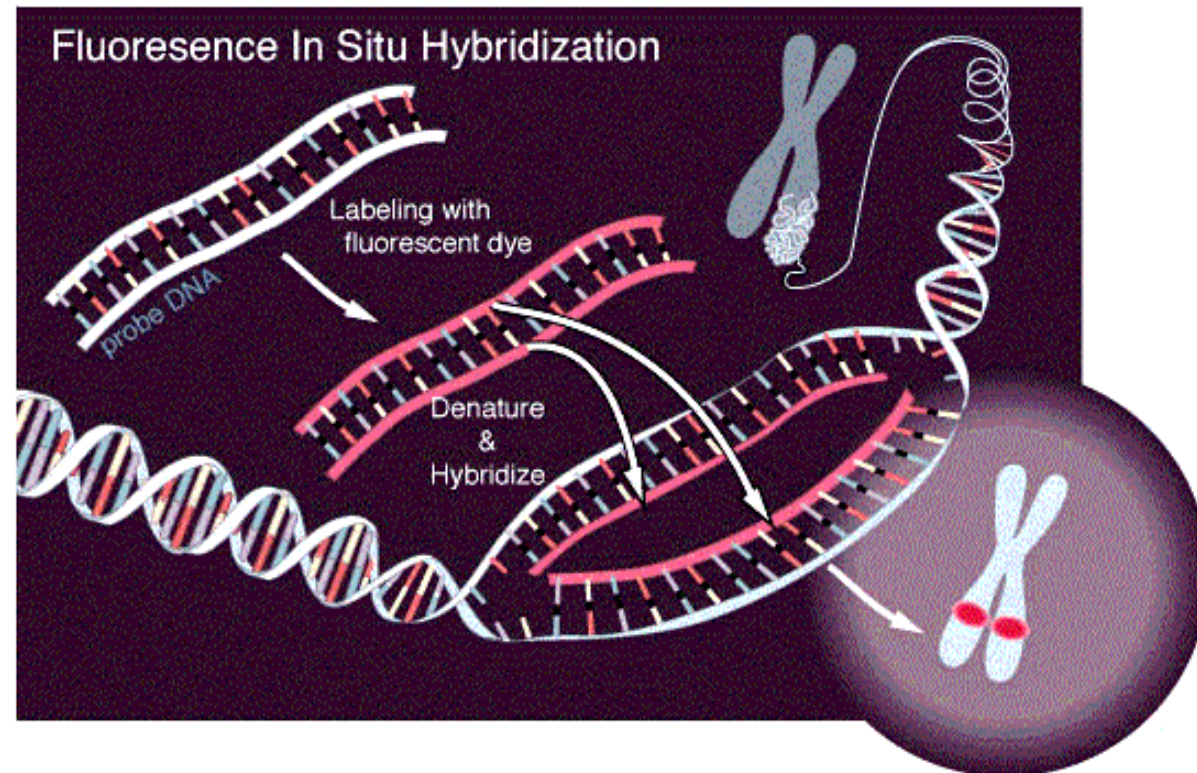
b) Leukemimetafaser

Odling kan påverka distribution av celler



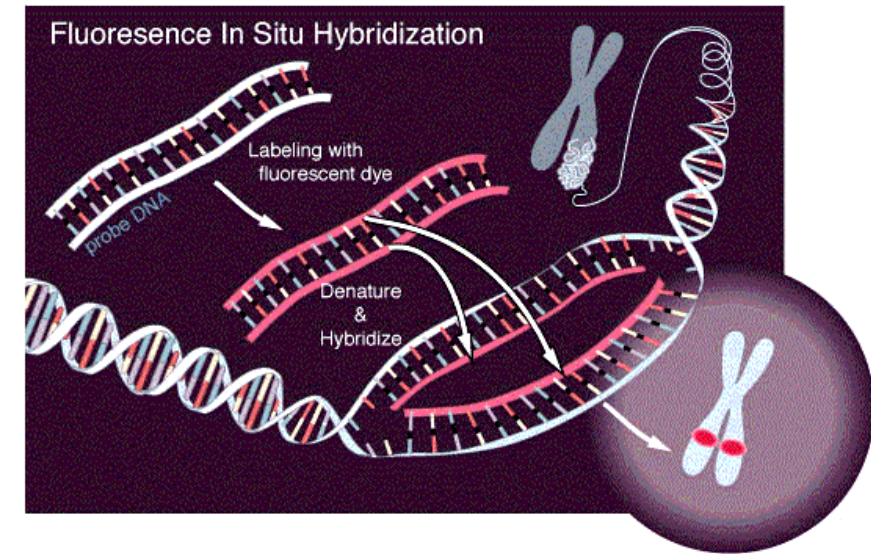
Fluorescence in situ hybridization (FISH)

- Benmärg, blod eller tumör
- Prober mot specifika gener/regioner



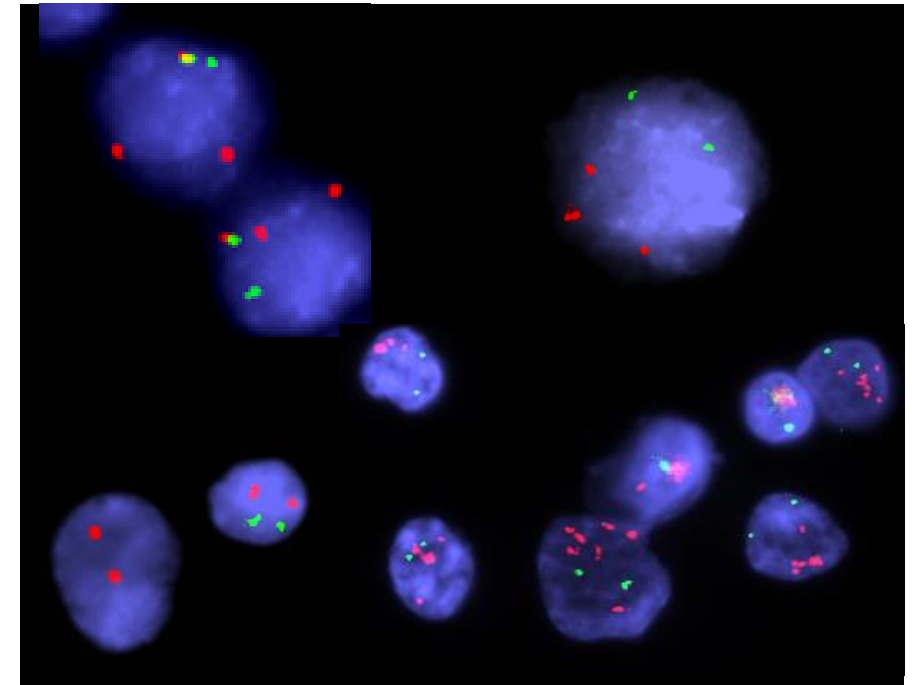
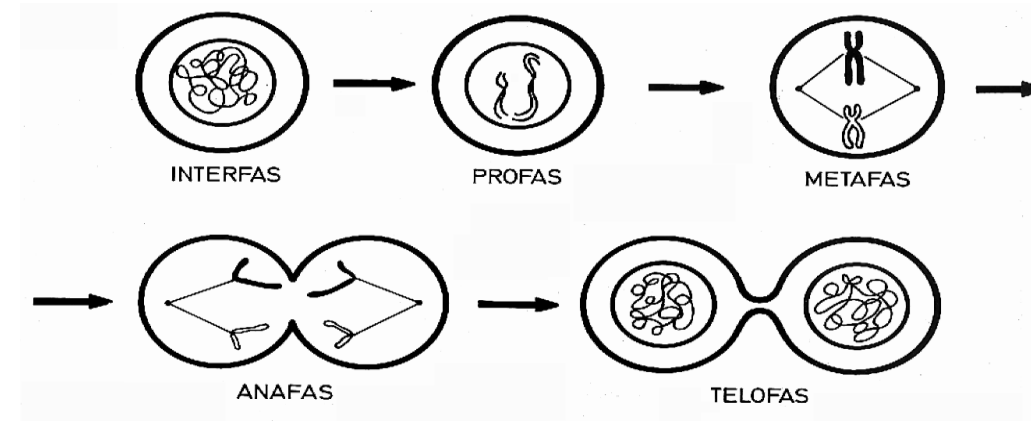
FISH

- Riktad analys av strukturella varianter
 - ✓ Translokationer
 - ✓ Deletioner
 - ✓ Inversioner
 - ✓ Amplifieringar
- Påvisar rearrangemang som är svåra att upptäcka med kromosomanalys



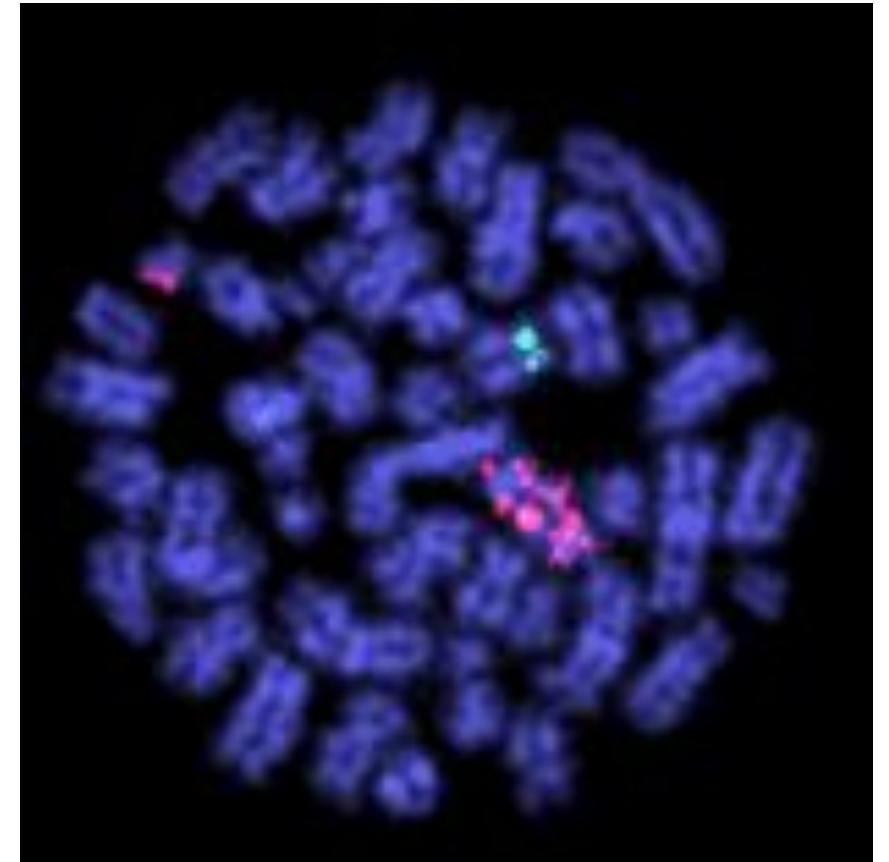
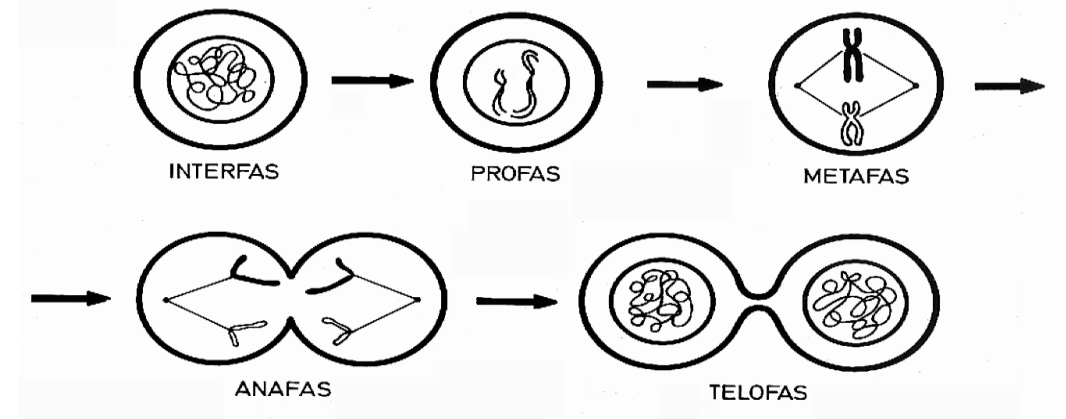
Interfas-FISH

- Direktutstryk
- Representativ fördelning friska/avvikande celler
- Många celler kan analyseras (400)
- Detekterar avvikelser i några procent av celler



Metafas-FISH

- Kräver odling
- Kromosomerna visualiseras
- Risk att odla bort avvikelserna
- Visar struktur och lokalisation
- Endast ca 20 metafaser analyseras



Metoder för cancergenetik

- ~~Cytogenetik~~

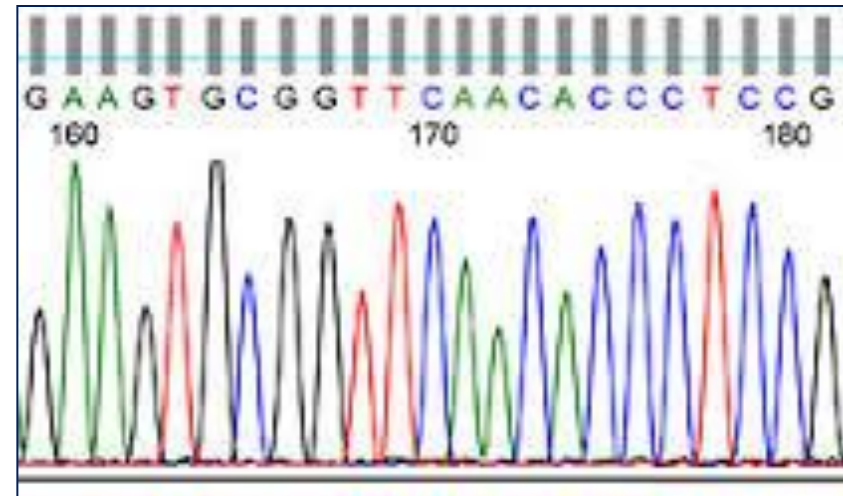
- ✓ ~~Kromosomanalys~~
- ✓ ~~FISH (fluorescence in situ hybridization)~~

- DNA-baserad

- ✓ Genomiska arrayer
- ✓ PCR (kvalitativ eller kvantitativ)
- ✓ DdPCR
- ✓ Sangersekvensering
- ✓ Massiv Parallell sekvensering

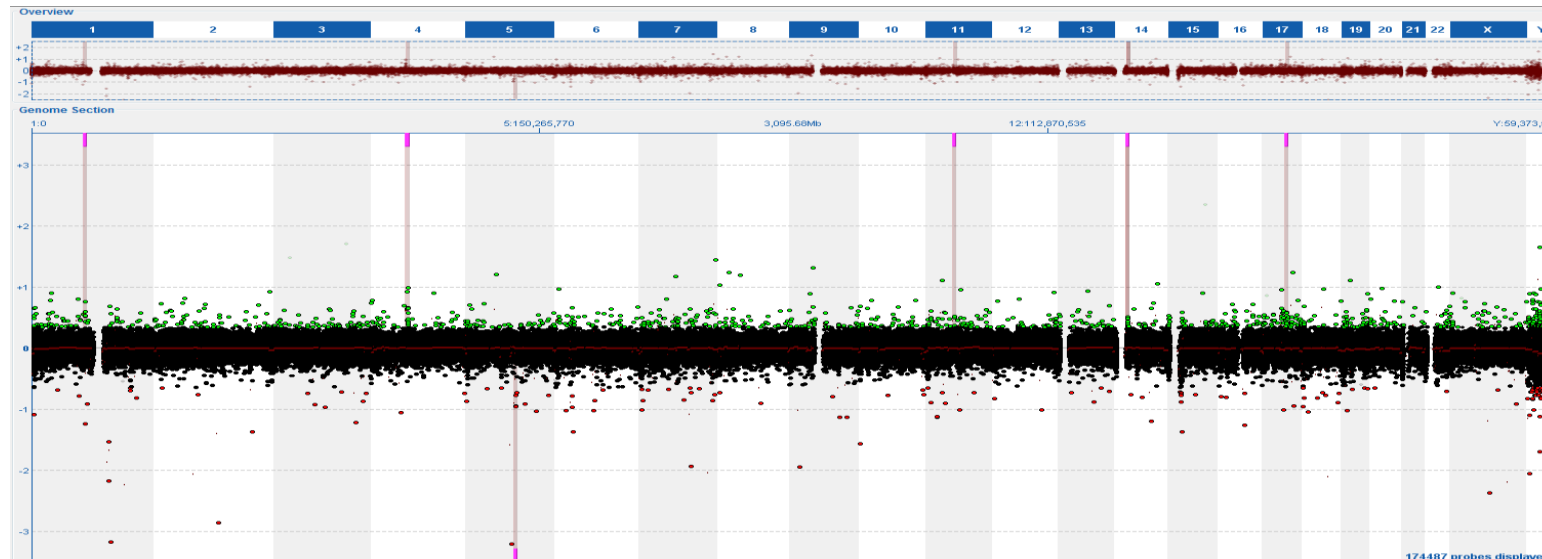
- RNA-baserad

- ✓ Reverse Transcription PCR
- ✓ RNA-sekvensering

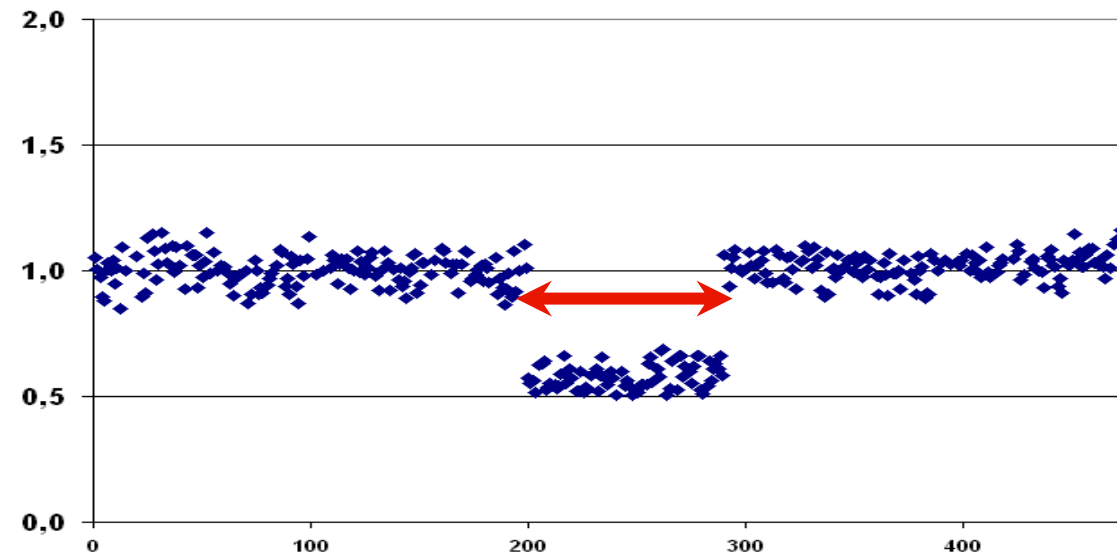


Array-CGH vid hematologiska maligniteter

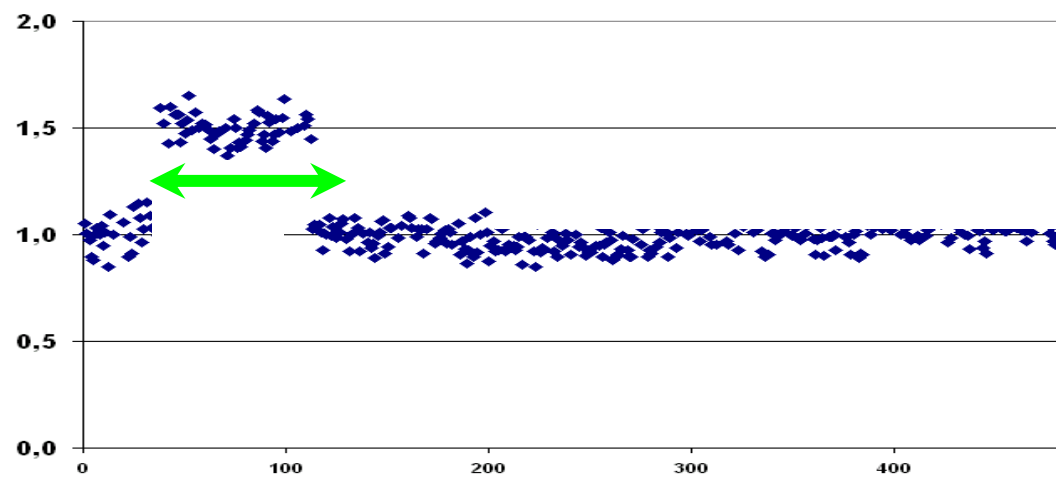
- Prober över hela genomet
- Jämför mängd tumör-DNA med normal-DNA
- CNVs = del, dup, amp
- Högre upplösning än kromosomanalys



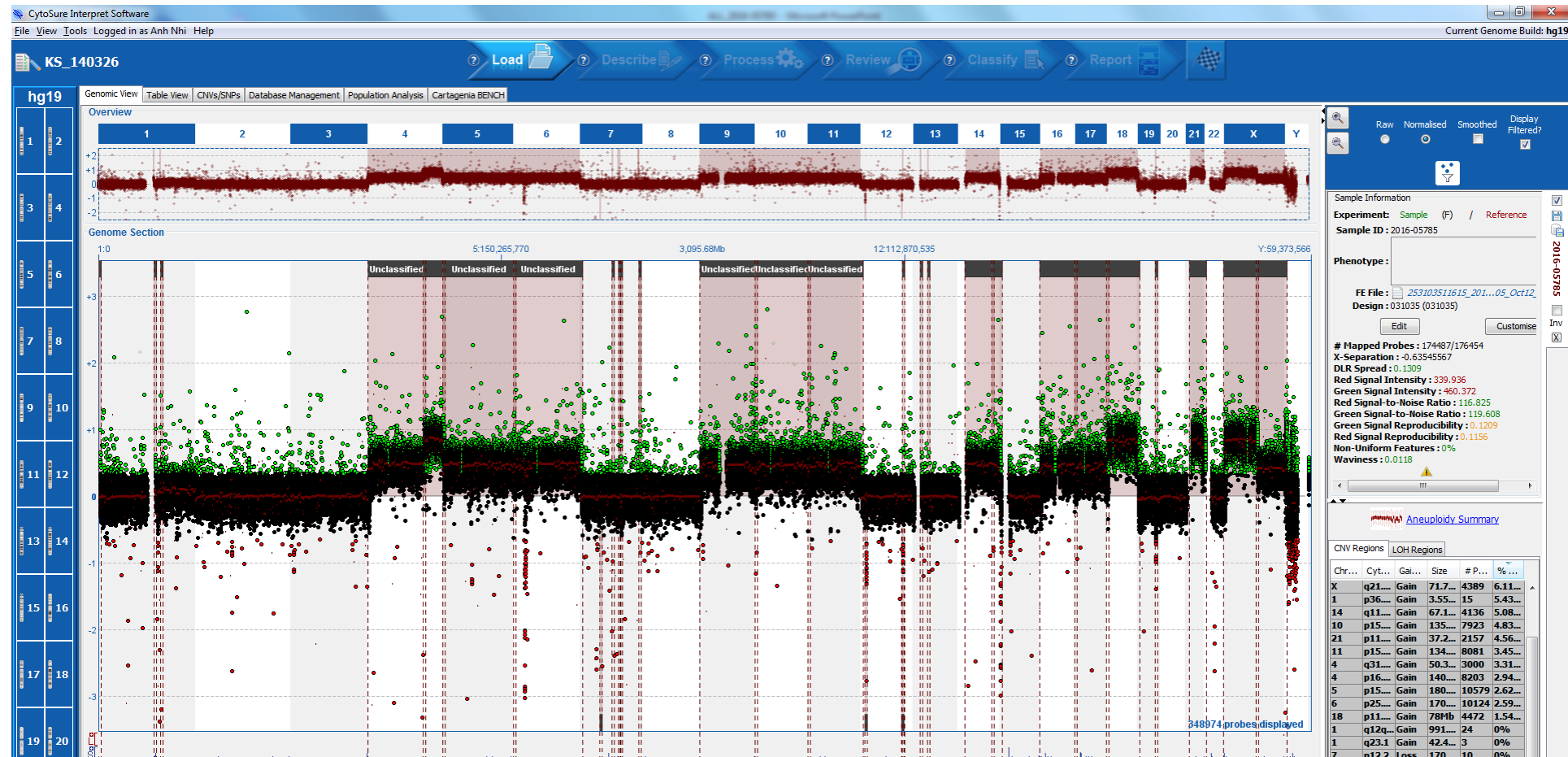
Deletion (förlust)



Duplikation (tillskott)

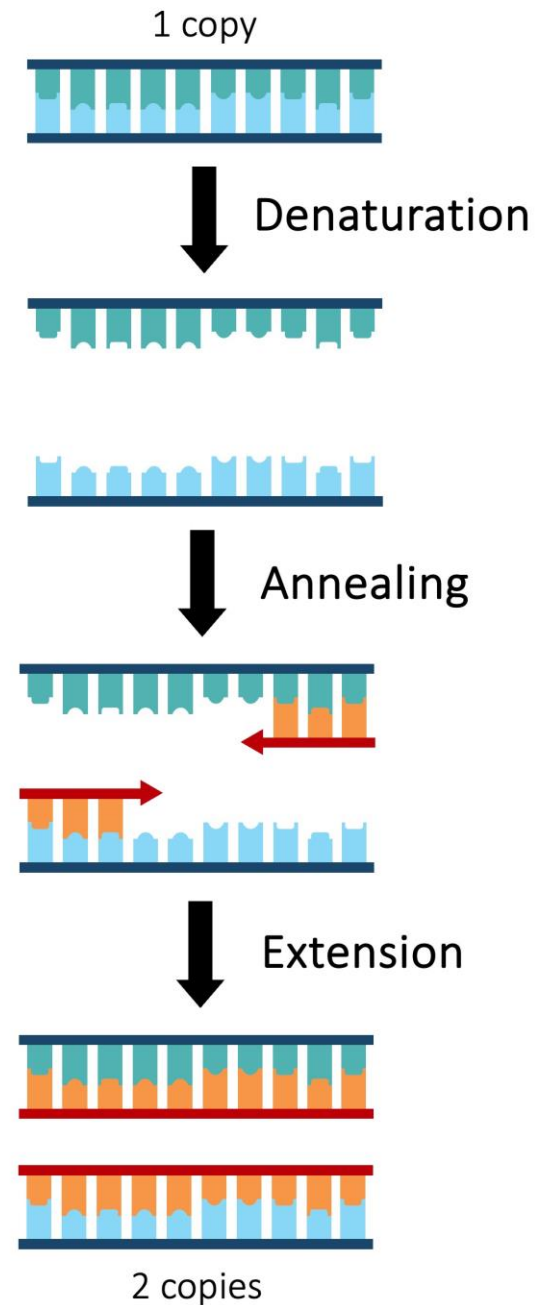


60,XX,+X,+X+4,dup4(q31.1q35.2),+5,+6,+9,+10,+11,del12(p13.2),+14,
+16,+17,+18,+18,+21,+21



Polymerase chain reaction (PCR)

- En teknik för att kopiera specifika DNA-sekvenser
- Utvecklades 1983
- Kary Mullis, amerikansk biokemist
- "The man who took LSD and changed the world"

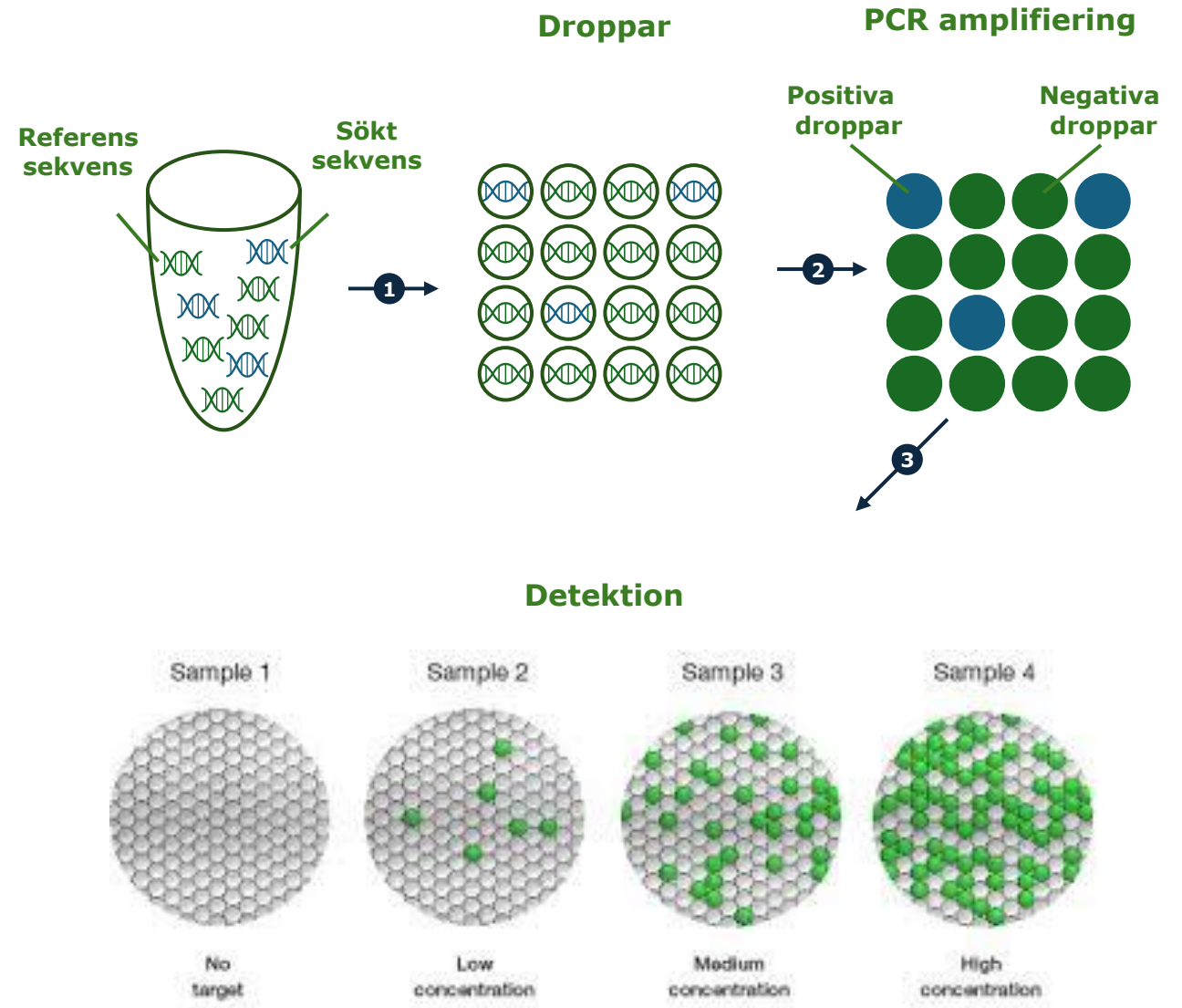


PCR vid hematologiska maligniteter

- DNA från blod, benmärg eller tumörvävnad
- Kvalitativ (PCR)
 - Diagnostiskt syfte
 - Primer för avvikelse - närvaro av specifik variant?
 - Sangersekvensering
- Kvantitativ (realtime-PCR)
 - Nivå av specifik variant?
 - Korrelerar till mängd av tumörceller
 - Tumörbörda vid diagnos eller kvarvarande tumörceller vid uppföljning (MRD)

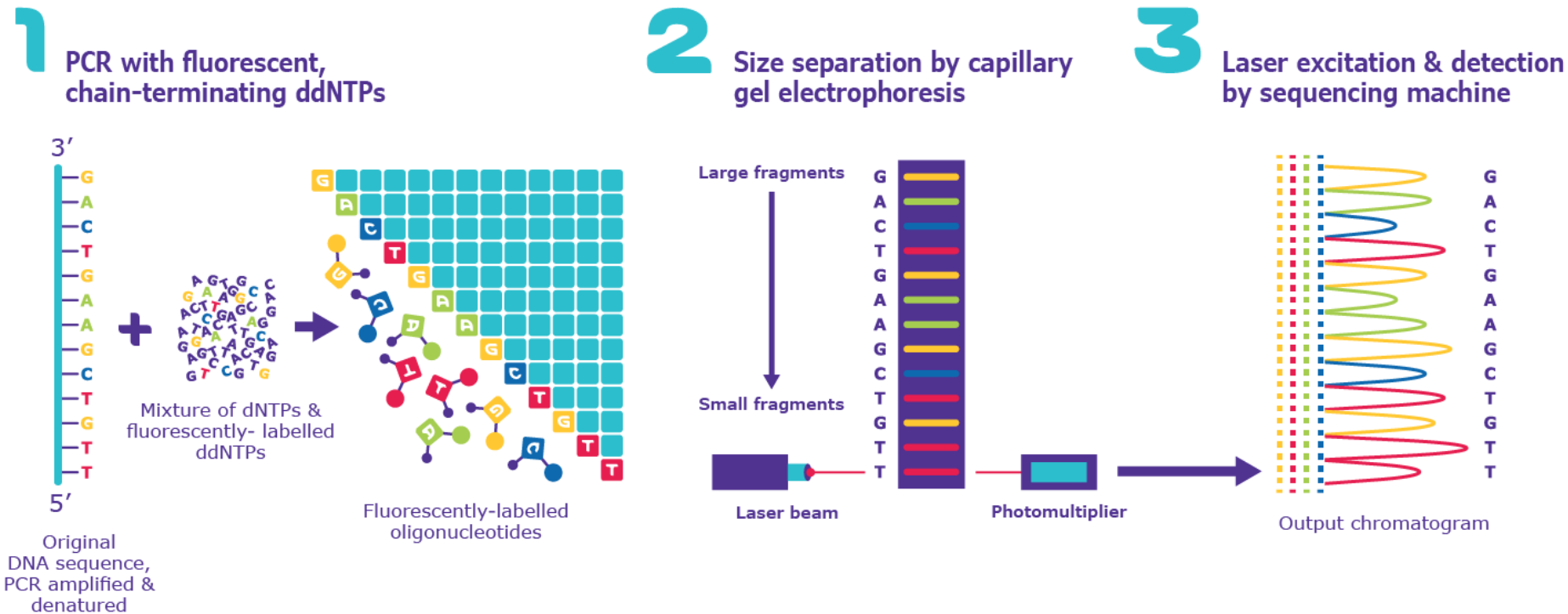
Digital/Droplet PCR

- DNA fördelas i tusentals droppar
- I varje droppe sker en oberoende PCR-reaktion
- Den sökta sekvensvarianten är märkt med en flouorofoer
- Droppar som innehåller den sökta sekvensen lyser
- Förhållandet positiva/negativa droppar används för att beräkna antal kopior av sökt sekvens i provet



Sangersekvensering

- Tidigare gold standard sekvensanalys
- PCR med DNA-polymeras som inkorporerar flourescerande nukleotider
- Flouescensen avläses för att rekonstruera ursprunglig DNA-sekvens



Massivt parallell sekvensering

Whole-genome

Exome

Gene panels
or hotspots



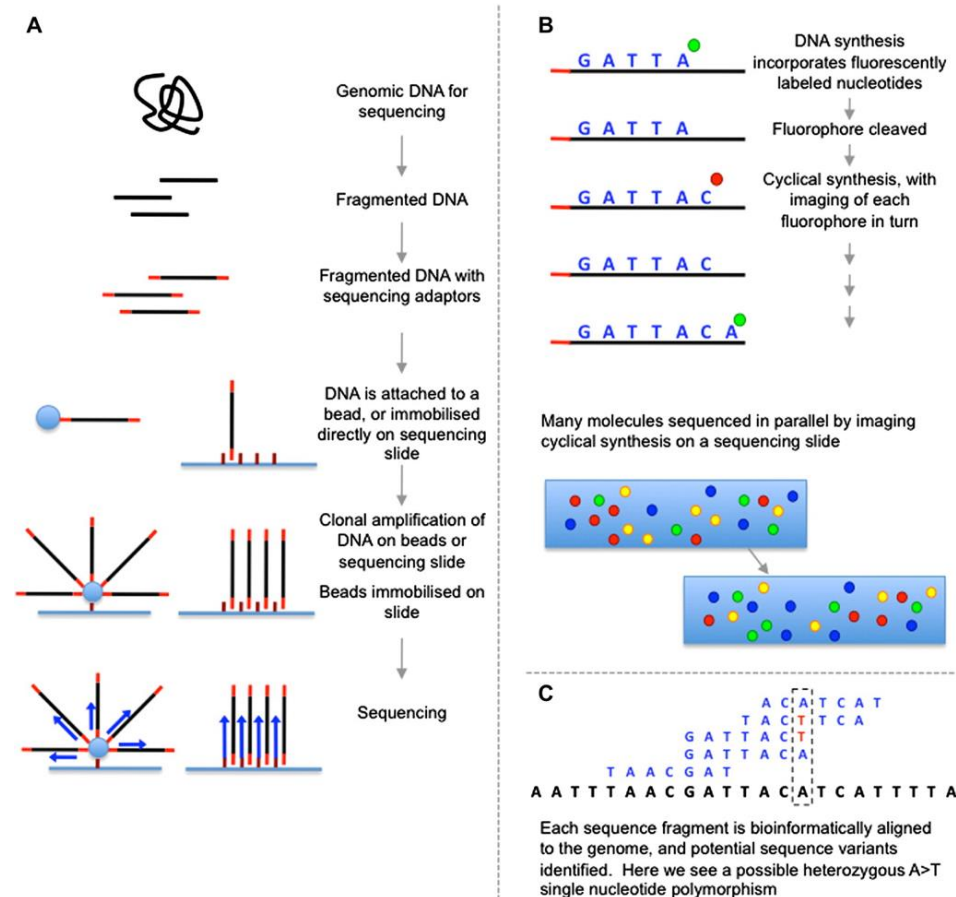
Datamängd

Djup

Massivt parallell sekvensering

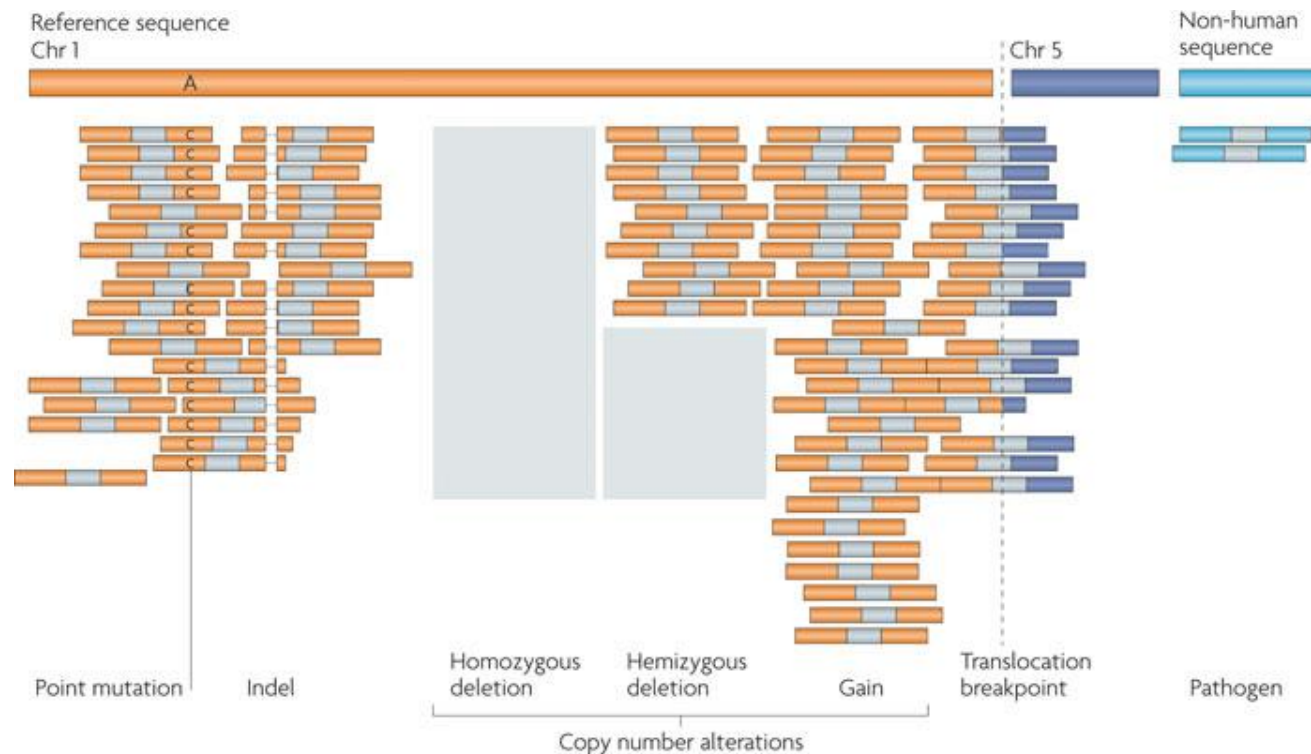
Gemensamt för de olika teknikerna

1. Slumpmässig fragmentering av DNA från patientprovet -> ett bibliotek
2. DNA-molekylerna fästs på en yta
3. Sekvensen läses av i realtid - parallellt för miljontals korta fragment
4. Sekvensen analyseras mot referensgenomet eller rekonstrueras



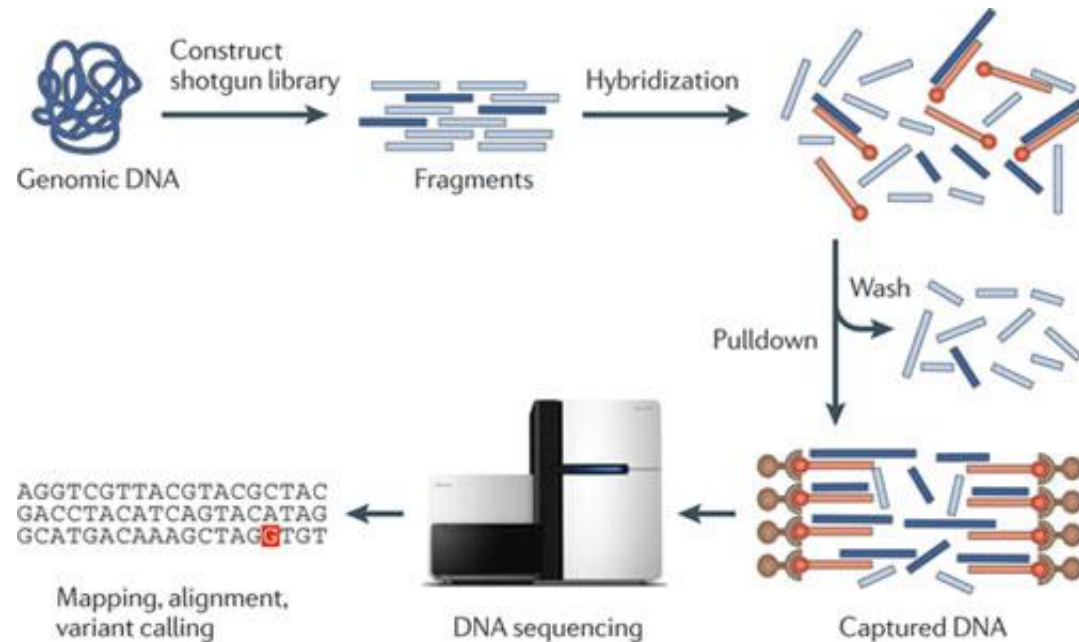
Helgenomsekvensering

- Alla typer av varianter (strukturella + sekvens) i hela genomet
- 30 x = varje position avläst i snitt 30 gånger
- Dyrt, stor datamängd, filtrering, täckning



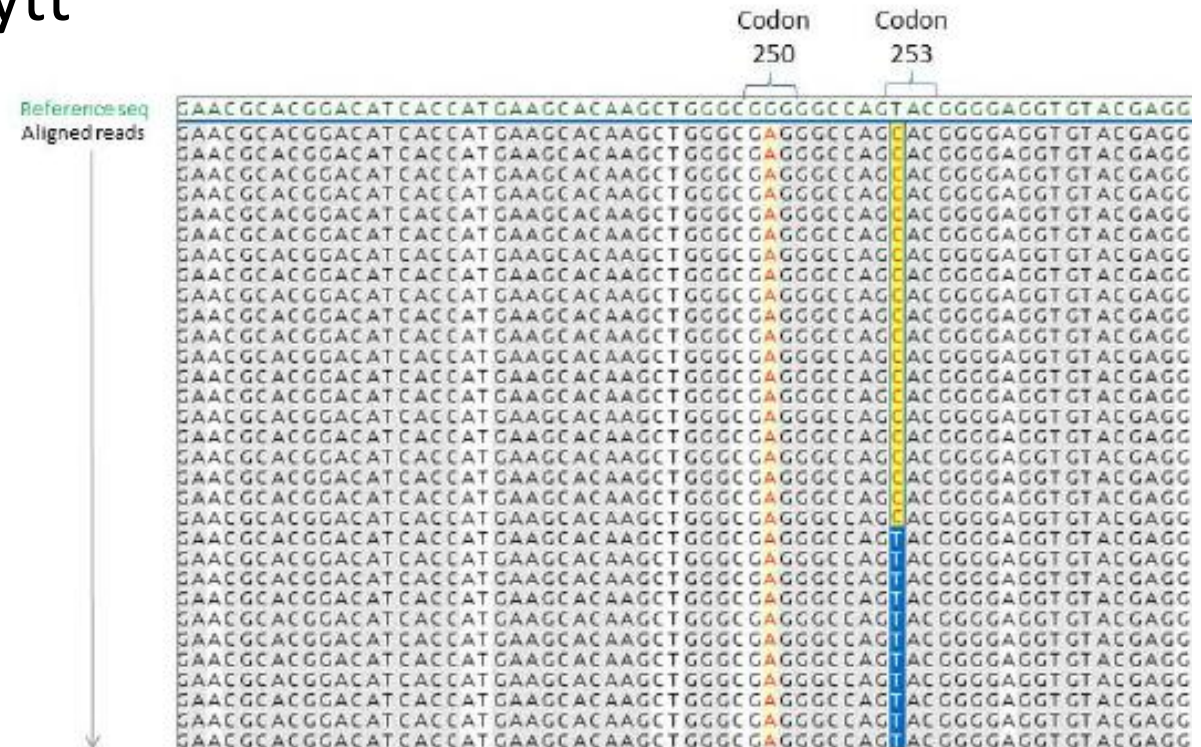
Helexomsekvensering

- Selektion av proteinkodande regioner (1,5 %) med capture-teknik
- Biologiskt relevanta förändringar, billigare, djupare
- Missar allt utanför det kodande, sämre på gendos



Panelsekvensering

- Riktad analys av begränsat antal gener
- Främst för SNVs och INDELs
- Billigt, djupt, snabbt och skräddarsytt
- Dålig på strukturella varianter och nytt
- GMS-paneler: Lymfoid och myeloid
- CNV-analys under utveckling



Dataanalys och filtrering

- Majoriteten av arbetet är filtrering och analys
- Hög bioinformatisk kompetens viktigt
- Cancergenomet skiljer sig från referensgenomet
- Vad är cancerspecifikt och vad är ovanliga medfödda varianter?
 - Jämföra med normalprov från samma patient – hudbiopsi när blodet är sjukt
 - Bedöma variantallelfrekvens
- Sjukhusgenetiker analyserar och svarar MPS-data
- Läkare korrekturläser svaret

Metoder för cancergenetik

- ~~Cytogenetik~~

- ~~✓ Kromosomanalys~~
 - ~~✓ FISH (fluorescence in situ hybridization)~~

- ~~DNA-baserad~~

- ~~✓ PCR (kvalitativ eller kvantitativ)~~
 - ~~✓ Genomiska arrayer~~
 - ~~✓ Sangersekvensering~~
 - ~~✓ Massiv Parallell sekvensering~~
 - ~~✓ DdPCR~~

- RNA-baserad

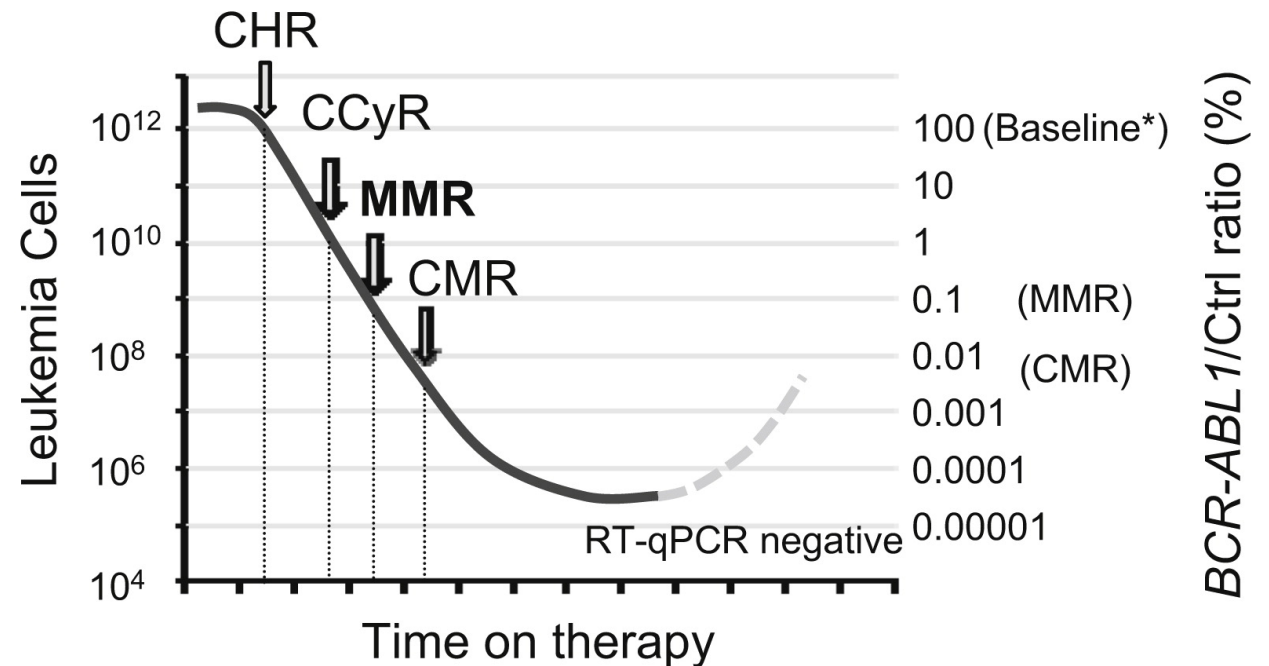
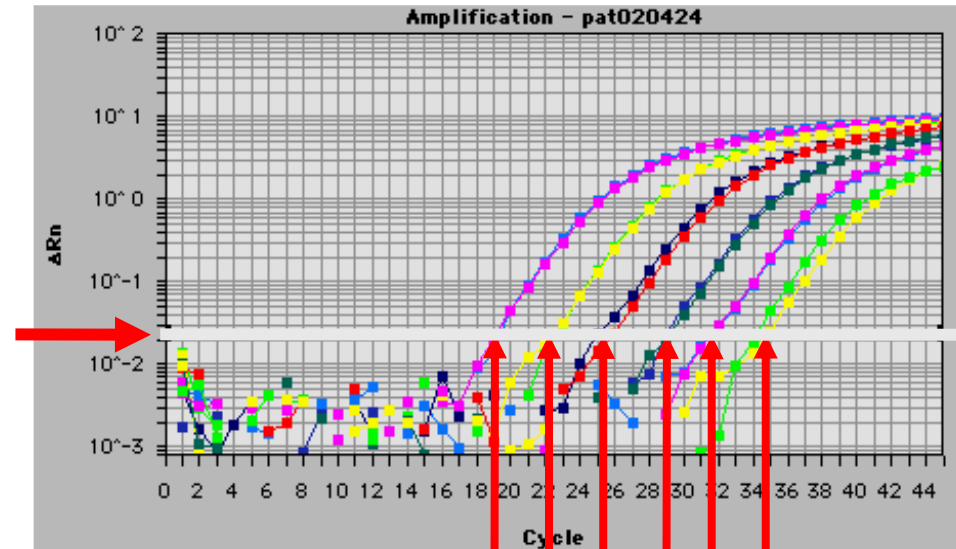
- ✓ Reverse transcriptase PCR (kvalitativ eller kvantitativ)
 - ✓ RNA-sekvensering

Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

- Blod, benmärg eller tumörvävnad
- WBC-isolering – inom 1 dygn efter provtagning
- RNA-isolering från WBC
- Enzym = reverse transcriptase
- RNA transkriberas till komplementärt DNA (cDNA) -> Vanlig PCR-analys

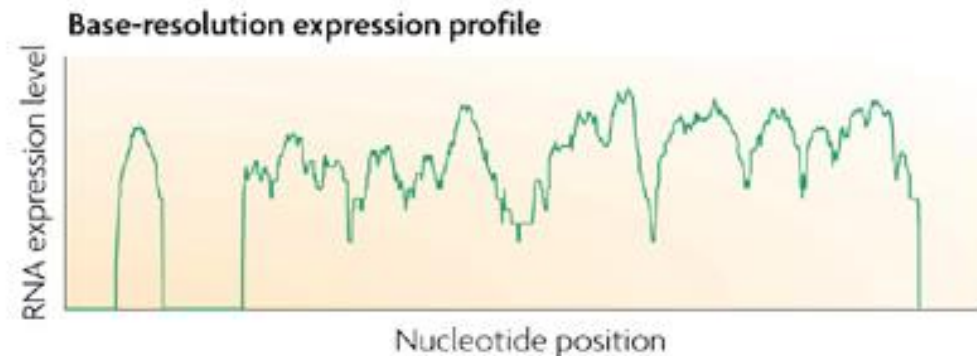
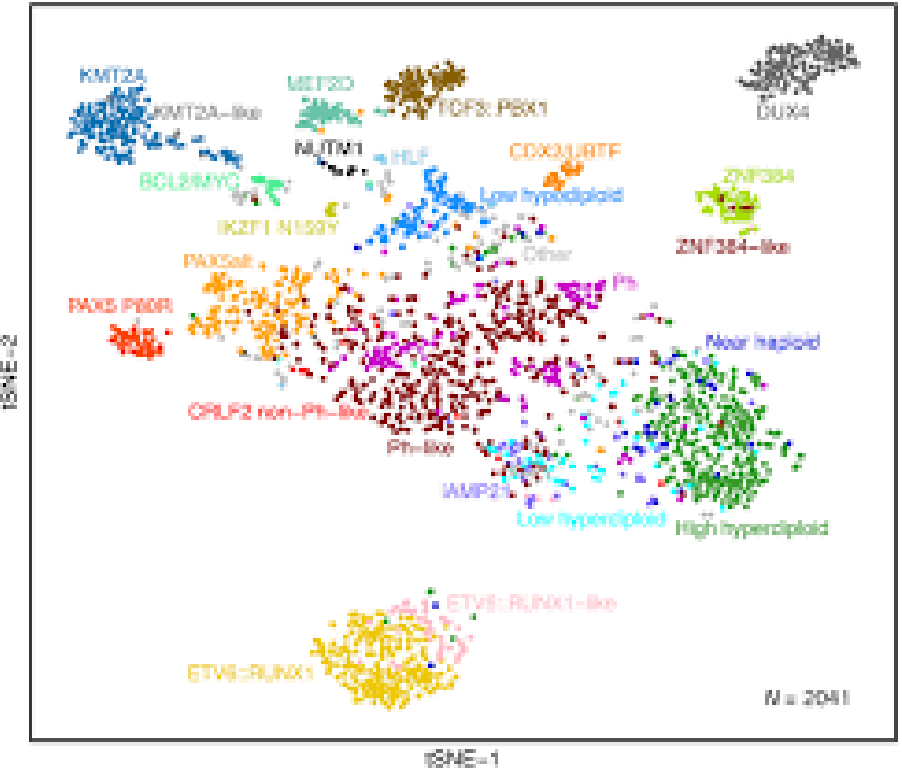
Real-time RT-PCR

- cDNA amplifieras i cykler
- Fluorescerande prober mot avvikelser och kontroll
- Ju mer produkt desto tidigare syns signal
- MRD-analys



Transkriptomsekvensering

- Funktionell effekt av avvikelser
- Fusionsgener
- Avvikande splicevarianter
- Kvantitativt genuttryck
 - Klusteranalys för diagnostik
 - Uttrycks genen i vävnaden?
 - Vad är normaluttryck i vävnaden?
Svårt med normalkontroll.



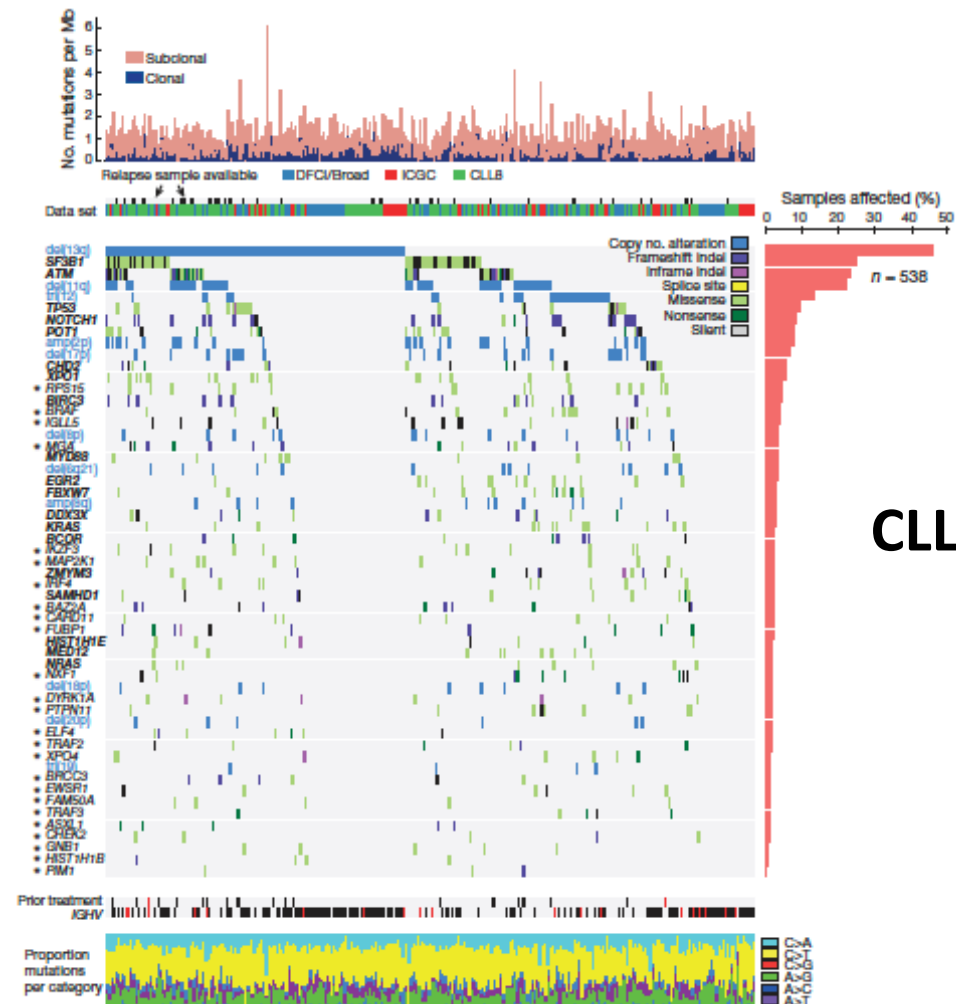
Tolkning av genetiska fynd

- Tidigare beskriven?
- Återkommande?
- Säkert patogen?
- Specifik för diagnos?
- Prognostisk betydelse?
- Risk-stratifierande?
- Prediktiv/målstyrd behandling?
- Hur starkt bevis? Meta-reviews, prediktionsprogram etc...
- Medfödd normalvariant?

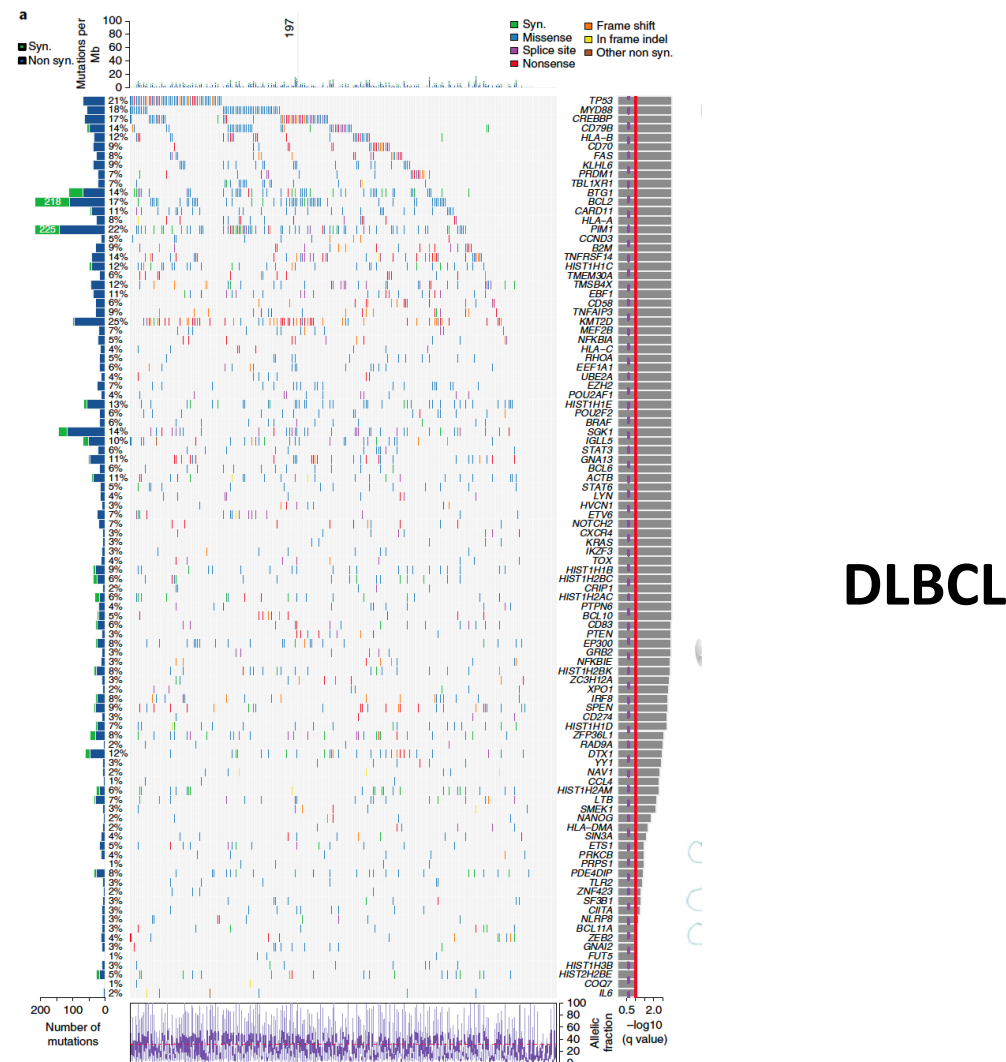
Lymfom och genetik

- Två separata system för klassificering av lymfoida neoplasier (2022)
- WHO 5th edition (WHO HAEM5)
- International Consensus Classification (ICC) *The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee 2022*
- Primär referens: De Laval 2022 *Genomic profiling for clinical decision making in lymphoid neoplasms*
- Solid tumör där DNA-extraktion sker hos patologen

Heterogent genetiskt landskap i lymfoida maligniteter



CLL



DLBCL

Landau et al, Nature 2015

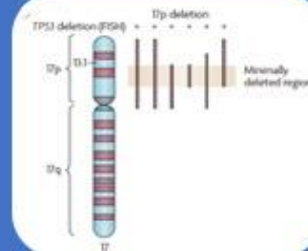
Chapuy et al, Nature 2018

GMS Lymphoid panel

Single nucleotide variants/indels



Copy-number aberrations



Structural variations



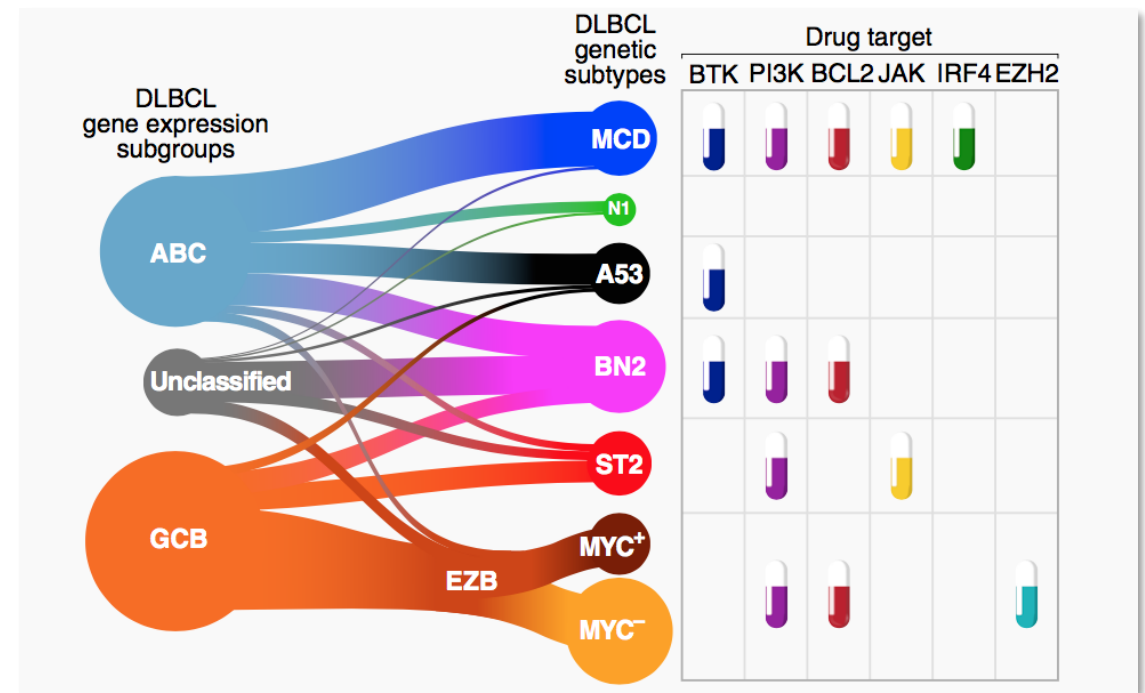
Broad NGS gene panels

SNVs, indels, CNAs

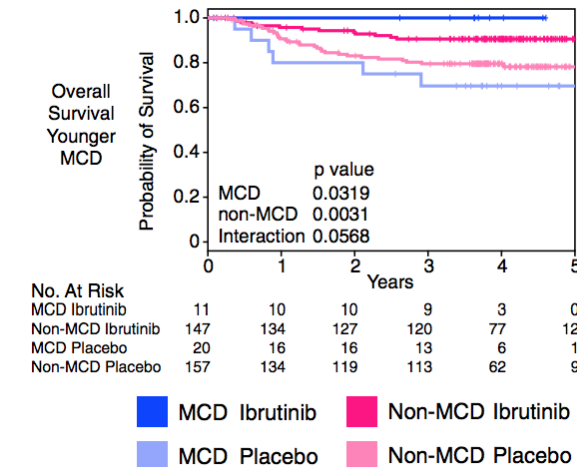
IGHV mutation status

Structural variation

- 60 year old man with testicular DLBCL
- Chemoimmunotherapy (R-CHOEP-14x6) and RT
- GMS Lymphoid panel
 - *MYD88* (p.(Leu265Pro), VAF 40%)
 - *CD79B* (p.(Tyr196Cys), VAF35%)
- LymphGen classifier: MCD type (=gain-of-function mutations in *MYD88* and *CD79B*)



Gene	Genetic feature	log pval	Prevalence (%)							MCD
			MCD	BN2	N1	EZB	ST2	A53		
MYD88 L265P	Mut	-31.0	66.2	6.5	0	0	0	21.1		
CD79B	Mut	-17.5	50.0	10.9	0	0	0	18.4		
PIM1	Mut	-34.4	92.5	26.1	18.8	13.2	40.7	23.7		
HLA-B	Mut HL HD	-19.5	73.8	33.3	6.2	10.0	38.5	18.4		
BTG1	Mut HL HD	-16.8	70.0	24.4	31.2	11.4	38.5	28.9		
CDKN2A	Mut HD	-12.6	62.0	28.9	25	11.4	7.7	15.8		
ETV6	Mut HL HD	-14.9	55.0	5.6	37.5	4.3	7.7	34.2		
SPIB	Gain Amp	-12.8	51.9	14.4	12.5	0	3.8	26.3		
OSBPL10	Mut	-15.5	51.2	21.7	12.5	6.6	25.9	5.3		
TOX	Trunc HL HD	-14.1	48.1	10.0	6.2	12.9	7.7	10.5		
BCL2	Gain Amp	-3.0	48.1	16.7	43.8	11.4	7.7	47.4		
BTG2	Mut	-5.4	43.8	33.7	0	10.5	37.0	18.4		
MPEG1	Mut	-15.3	43.8	6.5	0	1.3	11.1	5.3		
HLA-A	Mut HL HD	-6.9	43.0	23.3	25	7.0	23.1	18.4		



Wilson et al
Cancer Cell 2021

Viktiga mål med genetisk diagnostik

- Ökad förståelse för biologiska processer
- Bättre prediktion och detektion av relaps
- Minskad behandlingsintensitet, riktad behandling
- Hitta medfödda varianter och förstå etiologi
- Farmakogenomik

Sammanfattning

- PAD är viktigt för val av genetisk analys och tolkning av fynd
- Genetiska markörer för diagnos, prognos, riskstratifiering, behandlingsval, riktad behandling och uppföljning
- Strukturella varianter vs sekvensvarianter
- WGS, panelsekvensering och RNA-sekvensering kan ersätta riktade analysmetoder

TACK!

