

Whitepaper:

Herausforderungen in der Molekularpathologie: Bewertung von NGS-Varianten und Berichten von therapie relevanten Befunden



Übersicht

Diese Fallstudie zeigt, ...

- ...wie Pathologie-Labore NGS-Technologie einsetzen, um die Bearbeitungszeiten durch Automation der Auswertung und Befundungsprotokolle bedeutend zu reduzieren;
- ...wie Alissa Interpret Laboren bei der Entwicklung von Standardarbeitsanweisungen zur Automation der Variantenbewertung und dem Erstellen von Befunden über therapie relevante Befunde hilft.

Einführung

Die Einführung der Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS) in klinischen Genetik- und Molekularpathologie-Laboren ist mit neuen Herausforderungen verbunden. Agilent Alissa Interpret ist ein Modul zur Variantenbewertung der Agilent Clinical Informatics Plattform. In diesem kurzen Whitepaper wird dargestellt, wie die benutzerfreundlichen Funktionen dieses Moduls die Anforderungen an die Automation der Probenanalyse und die Laborberichterstellung effizient erfüllen. Zur Illustration zeigen wir diese Automationsfunktionen im Zusammenhang der Molekularpathologie.

Fall

Als Beispiel haben wir die Ergebnisse eines Capture-Kits für ein Gen-Panel gewählt, das 50 gut bekannte und charakterisierte Krebsgene repräsentiert. Nach der Nasslaborverarbeitung wurden die Sequenzierergebnisse einer Rohdatenanalyse unterzogen, um SNP- und InDel-Varianten zuzuordnen. Die so identifizierten Varianten (in einer VCF-Datei) wurden entweder als Einzelprobe oder in größeren Fallzahlen in Alissa Interpret geladen. Die so erhaltenen Varianten werden dem Patientendatensatz unter Lab Results (Laboregebnisse) hinzugefügt (siehe **Abb. 1**).

Status	Source	Sample ID	# Variants	Actions
Ready	HandDel.vcf	HP01	52	
Ready	HandSNP.vcf	HP01	117	

Abbildung 1: VCF-Dateien mit SNP- und InDel-Daten sind mit dem onkologischen Patientendatensatz verknüpft. Insgesamt stehen 169 Varianten zur Analyse zur Verfügung.

Zusammenfassende Schlussfolgerung

Alissa Interpret erlaubt eine Standardisierung und deutliche Beschleunigung der Arbeitsabläufe im Zusammenhang mit der klinischen Onkologie.



Fallstudie zu Alissa Interpret

Die Analysefunktion erlaubt die automatische Ausführung einer Standardarbeitsanweisung mit den identifizierten Varianten. Die Analyse- und Interpretationsschritte sind als Entscheidungsbaum aufgebaut. Dieser Entscheidungsbaum wurde zu einem früheren Zeitpunkt auf Grundlage von Krebsproben mit bekannten Ergebnissen erstellt und validiert. Die Varianten fließen durch den Entscheidungsbaum und werden gemäß Protokoll klassifiziert.

Labore möchten typischerweise Filterschritte wie in **Abb. 2** durchführen:

- Vorhandensein einer Variante in einer öffentlichen Datenbank, was auf eine häufige Variante verweist. In diesem vorliegenden Protokoll werden Varianten als „benign“ (gutartig) markiert, wenn sie in 2 von 3 Datenbanken (Exome Variant Server, 1000 Genomes und dbSNP) mit einer MAF (Minor Allele Frequency, Frequenz des zeithäufigsten Allels) über 1 % vorkommen;
- Transkriptionswirkung „nichtsynonym“ (synonym), damit nur Varianten berücksichtigt werden, die wahrscheinlich eine Auswirkung auf Proteine haben;
- Vergleich mit einer Reihe von kundenspezifischen Datenbanken. In dem vorliegenden Fall wurden die folgenden Datenbanken konfiguriert:
 - die Datenbank mit Krebsvarianten COSMIC,
 - eine Auswahl von Varianten, die das Labor aus Online-Ressourcen wie PubMed extrahiert und kuratiert hat,
 - bekannte und kuratierte TP53- und BRCA1-Varianten aus lokusspezifischen Datenbanken, die das Labor gewählt und validiert hat,
 - eine Auswahl von ClinVar-Varianten, die für die Onkologie relevant sind,
 - eine laborspezifische Datenbank mit genetischen Markern für bekannte Arzneimittel.

Dieser Klassifikationsbaum dient lediglich zur Illustration – die Alissa Interpret Clinical Informatics Plattform bietet zahlreiche weitere gebrauchsfertige Filter, Datenbanken, Algorithmen und Strategien. Dazu gehören beispielsweise Probenvergleiche von Tumor und gesundem Gewebe, Vererbungsanalyse für Keimbahnmarker, verschiedene Vorhersagealgorithmen, Berechnung der Frequenzstatistik, umfangreiche Probensätze und vieles mehr. Darüber hinaus kann die Plattform spezifisch z. B. an die Anforderungen des Labors angepasst werden.

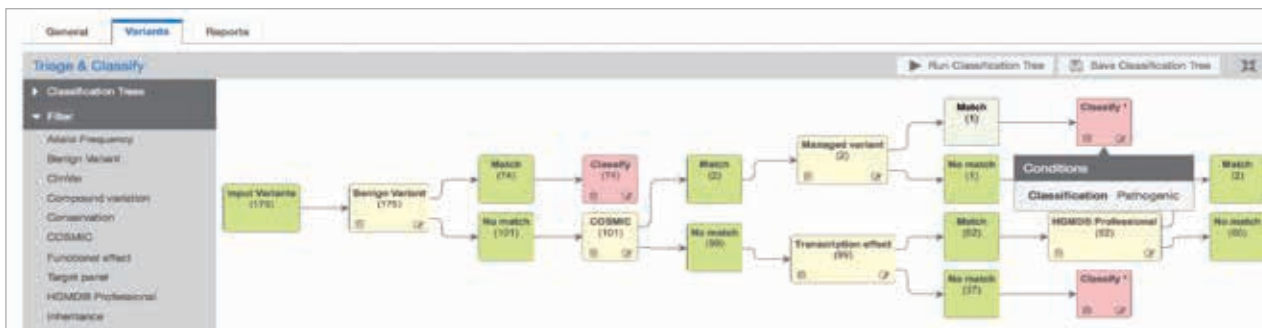


Abbildung 2: Eine grundlegende Filterstrategie, repräsentiert als validierter und gespeicherter Entscheidungsbaum. Die Varianten fließen durch den Baum und werden auf dem Weg entsprechend klassifiziert. Sie können anschließend geprüft und befundet werden.

Das Protokoll identifiziert beim vorliegenden Fall sofort eine pathogene Variante, die für die manuelle Prüfung und Befunderstellung gekennzeichnet wird. In **Abbildung 3** ist die Kurzliste dargestellt. In dem vorliegenden Fall wurde eine gut bekannte Variante im Zusammenhang mit einem bekannten Arzneimittel identifiziert, die in der Datenbank des Labors mit Annotation vorhanden ist.

Effect	Benign	Likely benign	VOUS	Likely pathogenic	Pathogenic	Not Classified	Total
frameshift	0	0	0	0	0	41	41
nonsynonymous	31	0	0	1	1	19	52
stopgain	0	0	0	0	0	2	2
synonymous	31	18	0	0	0	0	49
Not specified	12	19	0	0	0	0	31
Total	74	37	0	1	1	62	175

Gene	Position	Ref	Patient	Depth	Type	Transcript	cDNA	Location	Exon	Effect	Protein	Classification	Confirmed Classification	References	Blom	BRCA	Canc	Clin	Cover	Other	Similarities	Info	Report	Actions
BRAF	7:140,455,535			100	srp	NM_004333.8	c.1799T>A	exonic	15	nonsynonymous	p.Val600Glu	Pathogenic	Pathogenic											

Abbildung 3: Die sich ergebenden Varianten werden für die Berichterstellung gekennzeichnet, in dem hier vorliegenden Fall wurde nur eine Variante identifiziert. Es stehen viele Tools zur Verfügung: (a) Prüfung, ob das Labor dieser Variante bereits begegnet ist, (b) Links zu vielen Internet-Ressourcen, (c) Übersicht über alle Variantendaten, (d) Nomenklaturen mit c. und p. und (e) Balkengrafiken, die das Vorkommen bei anderen Proben in der Datenbank sowie bei kuratierten Datenbanken (den so genannten bearbeiteten Variantenlisten [Managed Variant Lists, MVL]) anzeigen.

Als abschließender Schritt des Arbeitsablaufs erlaubt Alissa Interpret die Erstellung von Laborberichten über ein bequemes Vorlagensystem. Es stehen Standardvorlagen zur Verfügung, Labors verwenden aber häufig Vorlagen, die gemäß den speziellen Anforderungen an die Befunderstellung und das Befundlayout angepasst wurden.

Der Vorteil dieses Vorlagensystems liegt in den Möglichkeiten der Automation:

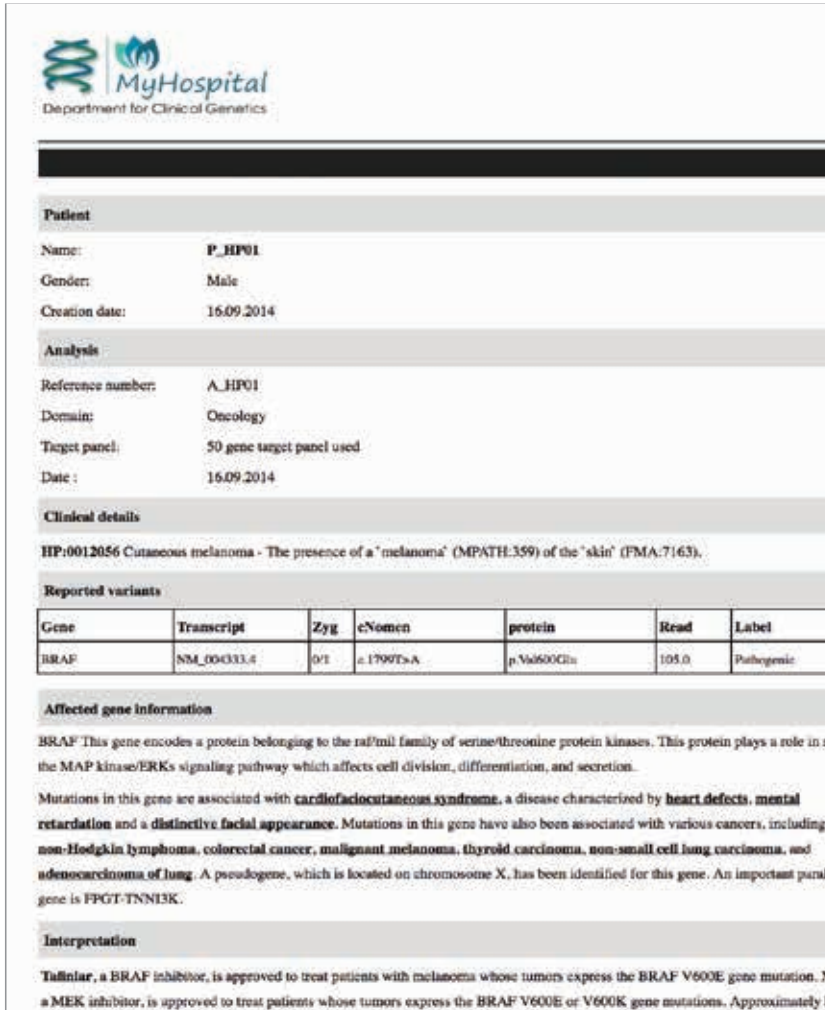
- automatisches Einfügen von Textsegmenten auf Grundlage der Inhalte der Analyse. Beispielsweise kann die Berichtvorlage so konfiguriert sein, dass bei Vorhandensein dieser speziellen BRAF p.Val600Glu-Variante automatisch Angaben aus einer internen Datenbank zum BRAF-Gen, über diese Variante, über Arzneimittel für diese Variante oder über klinische Studien in den Bericht eingefügt werden;
- automatische Erstellung von Befundabschnitten;
- automatische Erstellung von Übersichtstabellen von Varianten, die als relevant gelten;
- automatisches Einfügen von Protokollen, Haftungsausschlüssen und Vorschlägen zur Folgebehandlung;
- automatisches Einfügen von Angaben zur Datenbank- und Protokollversionen, damit die Rückverfolgbarkeit im klinischen Zusammenhang vollständig gegeben ist.

Ein automatisch erstellter Bericht – angepasst an die Anforderungen eines Labors und für die Prüfung und Weiterverarbeitung sowie bereit zum Herunterladen bzw. Exportieren als PDF- oder Word-Datei– wird in **Abb. 4** auf der letzten Seite dieser Fallstudie dargestellt.

Alissa Interpret NGS - Schlussfolgerung

Alissa Interpret ermöglicht eine Standardisierung und sehr deutliche Beschleunigung der Arbeitsabläufe in der klinischen Onkologie. Alissa Interpret unterstützt Pathologie- und Genetiklabore und liefert Onkologen informative und speziell angepasste Berichte.

Sie möchten mehr erfahren? Erkundigen Sie sich nach einer Demonstration des Systems unter www.agilent.com/lifesciences/alissa.



MyHospital
Department for Clinical Genetics

Patient
Name: P_HP01
Gender: Male
Creation date: 16.09.2014

Analysis
Reference number: A_HP01
Domain: Oncology
Target panel: 50 gene target panel used
Date: 16.09.2014

Clinical details
HP:0012056 Cutaneous melanoma - The presence of a 'melanoma' (MPATH:359) of the 'skin' (FMA:7163).

Reported variants

Gene	Transcript	Zyg	eNomen	protein	Read	Label
BRAF	NM_003333.4	0/1	c.1799T>A	p.V600Glu	105.0	Pathogenic

Affected gene information
BRAF This gene encodes a protein belonging to the raf/mil family of serine/threonine protein kinases. This protein plays a role in the MAP kinase/ERKs signaling pathway which affects cell division, differentiation, and secretion.
Mutations in this gene are associated with **cardiofaciocutaneous syndrome**, a disease characterized by **heart defects, mental retardation** and a **distinctive facial appearance**. Mutations in this gene have also been associated with various cancers, including **non-Hodgkin lymphoma, colorectal cancer, malignant melanoma, thyroid carcinoma, non-small cell lung carcinoma, and adenocarcinoma of lung**. A pseudogene, which is located on chromosome X, has been identified for this gene. An important paralog gene is **FPGT-TNN13K**.

Interpretation
Tafinlar, a BRAF inhibitor, is approved to treat patients with melanoma whose tumors express the BRAF V600E gene mutation. **Mekinist**, a MEK inhibitor, is approved to treat patients whose tumors express the BRAF V600E or V600K gene mutations. Approximately h

Abbildung 4: Beispiel für einen automatischen Berichtsentwurf auf Grundlage einer Berichtsvorlage.

Hinweis: Berichte können vollständig an die Anforderungen des jeweiligen Labors an Berichtsinhalte sowie -layout angepasst werden.

(a) Alle Informationen über die Probe, Befunde, veröffentlichten Daten, Datenbanken, Literatur-Annotationen...können einer Vorlage hinzugefügt werden.

(b) Auch gut lesbare Variantenübersichten können hinzugefügt werden. Diese Übersichten enthalten verschiedene Merkmale wie Ablesetiefe, Nomenklatur, Transkripte, Gendefinitionen und Klassifikation in einem Tabellenformat.

(c) Es kann automatisch erstellter Text auf kontextempfindliche Weise eingefügt werden: Befinden sich Variante x oder Gen Y unter den zu berichtenden Befunden, wird ein passender, vorkonfigurierter Text hinzugefügt. Im vorliegenden Fall enthält der Bericht unter der Überschrift „Affected gene information“ (Informationen zu betroffenen Genen) einen Abschnitt über das BRAF-Gen, da diese Variante berichtet wird.

Erklärung des Verwendungszwecks

Alissa Interpret Software ist zur Speicherung, visuellen Darstellung und Annotation von Varianten bei Verwendung von öffentlichen, kommerziellen und internen Kundendatenquellen vorgesehen. Mit dieser Software können Endnutzer Pipelines einrichten, die eine automatische Sichtung und Klassifizierung von genetischen Varianten erlauben. Sie stellt Funktionen zur Erstellung von Variantenbeurteilungen und zur Erstellung von vorläufigen Variantenanalyseberichten zur Verfügung. Dank der Integrationsfunktionen können Varianten- und Berichtsdaten automatisch mit externen Software-Systemen verglichen werden.

Alissa Interpret Software richtet sich an geschulte Laborfachkräfte, klinische Genetiker und Molekularpathologen und dient als unterstützende Software-Plattform in der Entscheidungsfindung. Bei dieser geht es um die Analyse und Interpretation von in Humanproben festgestellten genetischen Varianten im Zusammenhang mit den für eine Probe aufgezeichneten klinischen Daten.

MEHR INFOS:

www.agilent.com/lifesciences/alissa

E-Mail an cad.info@agilent.com

PR7000-0745

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Gedruckt in den USA.

Veröffentlichung des Originaldokuments: 27. September 2016

Überarbeitung: 30. Juni 2017

5991-8534DEE

Zuverlässige Antworten. **Gemeinsam.**

In den USA ist Alissa Interpret als ein „Class I Exempt Medical Device“, in Europa als „CE-IVD“ und in Kanada und Australien als „IVD Device“ eingestuft.



Agilent Technologies