

Bachelorproef

Optimalisatie en validatie van KRAS mutatie
screening via ddPCR

Dr. Annelies Crabbe

MSc. Freya Vaeyens, Sectorverantwoordelijke
Tumorprofilering, CMG UZ Brussel

Wout Rathé

Departement GDT

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Medische Laboratoriumtechnologie

2023-2024

Voorwoord

In deze bachelorproef ga ik de Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) mutatie screening via digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) optimaliseren en analytisch valideren voor gebruik in de diagnostiek.

Ik schrijf deze paper in het teken van mijn bachelorproef om af te studeren als medisch laborant technoloog aan Erasmus Hogeschool te Brussel. Dit onderzoek werd uitgevoerd op mijn stageplaats te UZ Brussel labo Centrum voor Medische Genetica (CMG) in Jette.

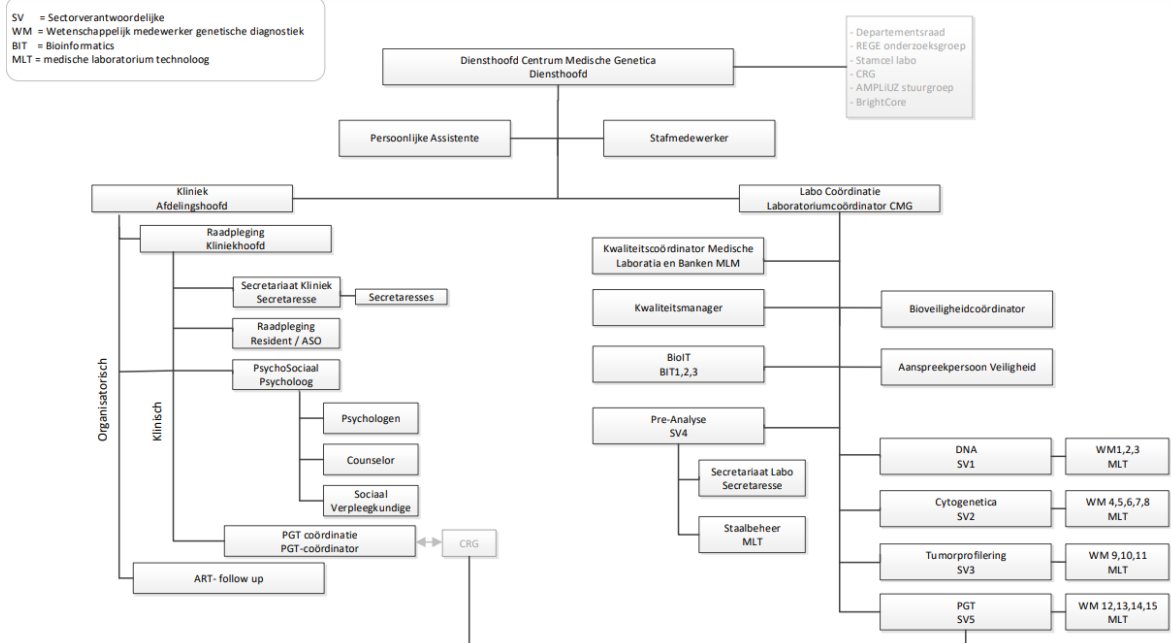
Ik ben op deze stageplaats terecht gekomen, doordat ik deze als nummer één van mijn top vijf had doorgestuurd naar mevrouw Crabbe. Ik had dit op nummer één gezet, vermits ik al van kinds af aan gefascineerd ben door genetica. Op de stageplaats had mijn stagebegeleidster dit onderzoek voorgeschoteld om uit te voeren als bachelorproef. Ik vond dit een zeer goed idee, vermits dit mij wel een interessant onderzoek leek.

Om dit onderzoek uit te voeren heb ik mij verdiept in de theorie van deze proef en heb ik veel achtergrond informatie opgezocht. Eenmaal ik mij verdiept had, was ik begonnen aan de literatuurstudie, hiervoor heb ik verschillende papers gelezen over o.a. het KRAS gen en ddPCR. Ondertussen waren we ook begonnen met de eerste experimenten van het optimalisatieproces uit te voeren, dit verliep redelijk goed. Eenmaal de optimalisatie af was werden er nog enkele experimenten uitgevoerd met de geoptimaliseerde condities, deze experimenten verliepen goed.

Het schrijven van deze bachelorproef verliep redelijk vlot, enkel had ik wat moeite met de verwerking van de statistiek bij het validatieproces. Dit kwam omdat ik niet altijd even goed wist hoe ik eraan moest beginnen, gelukkig had ik hierbij hulp van mijn promotor.

Mijn dank gaat in eerste plaats naar mijn promotor mevrouw Vaeyens voor het helpen bij het schrijven en uitvoeren van deze bachelorproef. Daarnaast zou ik mijn promotor mevrouw Crabbe willen bedanken voor het helpen regelen van deze stageplaats en voor haar feedback bij het schrijven van deze bachelorproef. Ook wil ik het UZ Brussel labo CMG willen bedanken dat ik bij hun stage mocht lopen. Daarnaast wil ik de laboranten, waarmee ik samengewerkt heb, bedanken voor mij te ondersteunen in het labo waar nodig. Tot slot zou ik graag mijn vriendin en familie willen bedanken voor mij te steunen, zowel bij mijn ups als downs, tijdens deze periode.

Organigram



FUNCTIES	NAAM
Diensthooft	F.Hes
Afdelingshooft	K.Keymolen
Laboratoriumcoördinator CMG	P.Giron
Coördinator PGT	P. De Becker Helena Deryckere
Sectorverantwoordelijke 1	S.Seneca
Sectorverantwoordelijke 2	A.Vandenbogaert
Sectorverantwoordelijke 3	F.Vaeyens
Sectorverantwoordelijke 4	D.De Smedt
Sectorverantwoordelijke 5	M.Derycke
Wetenschappelijk Medewerker DNA 1	A. Gheldof
Wetenschappelijk Medewerker DNA 2	L.Van Droogenbroeck
Wetenschappelijk Medewerker DNA 3	B.Dequeker
Wetenschappelijk Medewerker CYTOGENTICA 4	E.Sammels
Wetenschappelijk Medewerker CYTOGENTICA 5	A. Fieuw
Wetenschappelijk Medewerker CYTOGENTICA 6	N.Fieremans
Wetenschappelijk Medewerker CYTOGENTICA 7	E.Vantroys
Wetenschappelijk Medewerker CYTOGENTICA 8	E.De Schutter
Wetenschappelijk Medewerker TUMOR PROFILERING 9	K.Maes
Wetenschappelijk Medewerker TUMOR PROFILERING 10	J.Vlaminck
Wetenschappelijk Medewerker TUMOR PROFILERING 11	C.Helsen
Wetenschappelijk Medewerker PGT 12	P.Verdyck
Wetenschappelijk Medewerker PGT 13	V.Berckmoes
Wetenschappelijk Medewerker PGT 14	E.Fernandez Gallardo
Wetenschappelijk Medewerker PGT 15	K.Stouffs
Stafmedewerker	V.Vanderstraeten
Bioinformaticus 1	D. Daneels
Bioinformaticus 2	B.Hinckel
Bioinformaticus 3	H. Imamura
Kwaliteitsmanager	D.De Smedt
Aanspreekpunt veiligheid en hygiëne	D. De Smedt
Bioveiligheidsverantwoordelijke	D.De Smedt
Personal Assistent	M. Cuevas

Figuur 1. Organigram Centrum voor Medische Genetica

Inhoudsopgave

Voorwoord.....	
Organigram	
Lijst van afkortingen	
Abstract (Nederlands)	1
Abstract (Engels).....	1
1. Inleiding	2
2. Literatuurstudie	3
2.1. Signaaltransductie	3
2.1.1. EGFR.....	4
2.1.2. KRAS.....	5
2.1.3. BRAF	6
2.1.4. MEK.....	7
2.2. Mutatie detectie op Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) materiaal	7
2.3. Digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR)	8
2.3.1. dPCR techniek.....	8
3. Experimenteel deel.....	13
3.1. Materiaal en methode.....	13
3.1.1. DNA extractie.....	13
3.1.2. ddPCR	13
3.2. Resultaten en bespreking	15
3.2.1. Optimalisatie	15
3.2.2. Validatie	31
4. Algemene Conclusie	39
5. Referentielijst.....	
6. Bijlagen	

Lijst van afkortingen

Ala = alanine

AREG = amphireguline

Arg = arginine

Asp = asparaginezuur

BRAF = B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

CMG = Centrum voor Medische Genetica

cPCR = conventionele polymerase chain reaction

CRC = colonkanker

Cys = cysteine

CV% = variatiecoëfficiënt

ddPCR = digital droplet polymerase chain reaction

DNA = desoxyribonucleïnezuur

dPCR = digital polymerase chain reaction

EGF = epidermal growth factor

EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor

ERK = extracellular signal-regulated kinase

FFPE = formalin-fixed and paraffin-embedded

G12 = codon 12

G13 = codon 13

GAP = GTPase-activerende proteïnen

GDP = guanosinedifosfaat

GEF = guanosine-nucleotide-uitwisselingsfactor

Gly = glycine

GTP = guanosinetrifosfaat

HER = human epidermal growth factor receptor

KRAS = Kirsten Rat Sarcoma

LOB = limit of blanc

LOQ = kwantificatielimiet/ limit of quantification

MEK = mitogen-activated protein kinase

NF1 = neurofibromine 1

NGS = Next Generation Sequencing

NSCLC = non-small cell lung cancer

NTC's = no-template controles

p= aantal positieve druppels

PCR = polymerase chain reaction

Q61 = codon 61

qPCR = quantitative polymerase chain reaction

RE = restrictie enzyme

RSD = relatieve standaarddeviatie

rt-PCR = real-time PCR

sd = standaarddeviatie

Ser = serine

TAT = turnaround time

TGF- α = transformerende groeifactor- α

TKI's = Tyrosine Kinase Inhibitoren

UDG = Uracil-DNA-Glycosylase

v= aantal geaccepteerde druppels

VAF = Variant Allel Frequentie

Val = valine

wt = wildtype

λ = gemiddeld aantal kopieën per druppel

Abstract (Nederlands)

Het doel van deze bachelorproef is het optimaliseren en valideren van de Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) screening test via digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR). De stalen die gebruikt worden in deze bachelorproef zijn formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) patiëntenstalen waarvan de fractionele abundanties reeds bekend zijn met behulp van Next Generation Sequencing (NGS). De resultaten van deze studie werden verkregen via de QX600 Droplet Reader (Bio-Rad), dat gebruik maakt van de QuantaSoft™ software. De resultaten van het optimalisatie gedeelte geven aan dat deze methode het meest optimaal werkt bij een annealings/elongatie temperatuur van 53°C en zonder gebruik van restrictie enzymen (RE) en uracil-DNA-glycosylase (UDG). Daarnaast werkt deze methode ook het best bij een lagere DNA-input en bedraagt de limit of blank (LOB) 0,9% variant allel frequentie (VAF). De resultaten van het validatie gedeelte geven aan dat deze methode een kwantitatieve detectielimiet (LOQ) van 1% heeft, hierbij kan deze methode lineair, precies en accuraat meten. In het algemeen kan er geconcludeerd worden dat deze methode zeer lage fractionele abundanties kan detecteren in FFPE stalen, ook met lagere DNA-input hoeveelheden. Deze gevalideerde methode kan in de routine ingezet worden als verificatie methode voor NGS borderline varianten in het KRAS gen.

Sleutelwoorden: KRAS mutatie screening, ddPCR, optimalisatie, validatie, fractionele abundanties.

Abstract (Engels)

The purpose of this thesis is to optimize and validate Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) screening via digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR). The samples used in this thesis are formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) patient samples whose fractional abundances are already known using Next Generation Sequencing (NGS). The results of this study were obtained via the QX600 Droplet Reader (Bio-Rad), which uses the QuantaSoft™ software. The results of the optimization section indicate that this method works most optimally at an annealing/elongation temperature of 53°C and without the use of restriction enzymes (RE) and uracil-DNA glycosylase (UDG). In addition, this method also works best at lower DNA-input and the limit of blank (LOB) is 0.9% variant allele frequency (VAF). The results of the validation part indicate that this method contains a limit of quantification (LOQ) of 1% VAF, where this method can measure linearly, precisely and accurately. Overall, it can be concluded that this method can detect very low fractional abundances in FFPE samples, even with low DNA-inputs. This validated method can be routinely used as a verification method for NGS borderline variants in the KRAS gene.

Keywords: KRAS mutation screening, ddPCR, optimization, validation, fractional abundances.

1. Inleiding

In het Centrum voor Medische Genetica (CMG) van het UZ Brussel wordt er mee gewerkt aan de tumordiagnostiek door het opstellen van een genetisch profiel van de tumoren. Hierbij gaat men opzoek naar verworven genetische afwijkingen, die een rol spelen bij de tumorontwikkeling. Door de tumor op genetisch niveau te bestuderen, kan men gemakkelijker de patiënt diagnosticeren, een prognose stellen en een specifieke behandeling voor de patiënt aanraden. De RAS/MAPK/ERK signaalweg is een belangrijke signaalweg die verstoord is in meerdere kankertypes. Pathogene varianten in belangrijke genen van deze signaalweg, zoals epidermal growth factor receptor (EGFR) en Kirsten Rat Sarcoma (KRAS), kunnen de tumor aansporen en geven mogelijks een indicatie voor toedienen van bepaalde therapie.

Pathogene mutaties in het KRAS gen komen vaak voor zoals bij colonkanker (CRC) (40%), bij non-small cell lung cancer (NSCLC) (30%) en bij pancreaskanker (90%). Monoclonale antilichamen en Tyrosine Kinase Inhibitoren (TKI's), die gericht zijn tegen EGFR en respectievelijk gebruikt worden bij CRC en NSCLC, hebben geen respons-effect als de tumor een pathogene KRAS mutatie heeft. Hierom is het belangrijk om deze mutatie op te sporen, zodat men de patiënt een specifieke therapie kan aanraden.

Bij de tumorprofilering in het CMG worden deze genetische afwijkingen gedetecteerd via Next Generation Sequencing (NGS), waarbij de exonen van 380 kankergenen (zoals KRAS) in kaart worden gebracht. De reproduceerbare gevoeligheid van NGS bij kankerstalen bedraagt 5% variant allel frequentie (VAF) bij tumorstalen met minimum 10% tumorcellen. Regelmatig worden ook varianten aan lagere allel frequenties gevonden (1-5%) die eerder als echt aanzien worden, ondanks hun aanwezigheid in een NGS achtergrond van artefacten. Deze borderline varianten kunnen bij een laag tumorpercentage wel klinisch relevant zijn zodat het belangrijk kan zijn om de aanwezigheid van deze varianten te controleren met een andere gevoelige methode zoals quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en digital polymerase chain reaction (dPCR).

In de routine is er een samenwerking tussen het labo tumorprofilering en labo anatomo-pathologie. Bij het labo anatomo-pathologie bestaat er een snelle qPCR methode nl. Idylla, waarbij KRAS varianten opgespoord worden aan 3-5% allel frequentie bij voldoende tumorhoeveelheden. Deze test wordt gebruikt ter verificatie van de borderline varianten, die bekomen werden met NGS. Soms kunnen discrepanties optreden tussen Idylla en NGS die mogelijks te wijten zijn aan de heterogeniteit van het tumormateriaal, waarbij Idylla en NGS vertrekken van andere formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) coupes binnen het tumormateriaal. Een mogelijke aanpak is dPCR, gebaseerd op qPCR maar in compartimenten. Door deze compartimentering is er een zeer sensitieve mutatie detectie mogelijk met desoxyribonucleïnezuur (DNA), komende van dezelfde FFPE coupes als gebruikt voor NGS. Een dPCR toestel is recent ter beschikking in het CMG labo, meer bepaald een digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) toestel. Deze methode is trouwens ook geschikt indien er zeer kleine hoeveelheden materiaal worden aangeleverd.

Om te anticiperen op bovenstaande problemen, wordt in deze bachelorproef een ddPCR test geoptimaliseerd en gevalideerd voor de betrouwbare detectie van 7 pathogene KRAS varianten.

2. Literatuurstudie

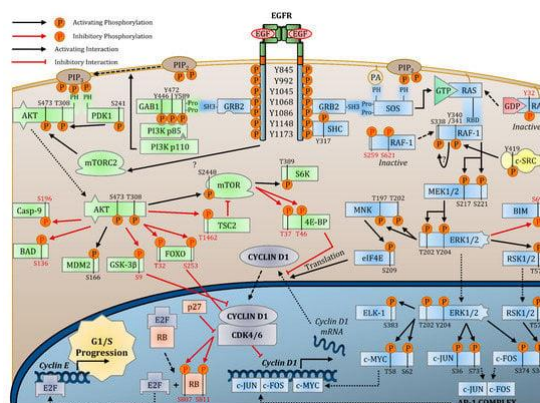
Kanker is een aandoening gekenmerkt door een ongecontroleerde celgroei dat ontstaat door afwijkingen in de genen en epigenetische veranderingen. Contact met kankerverwekkende stoffen, persoonlijke gezondheid en levensstijl spelen een belangrijke rol bij carcinogenese. Zo kan roken leiden tot carcinogenese. Genetische afwijkingen worden varianten of mutaties genoemd en kunnen optreden in twee groepen genen; tumor suppressor genen die de celgroei remmen en (proto-)oncogenen die de celdeling bevorderen. Mutaties in (proto-)oncogenen zorgen dat het eiwit constant geactiveerd wordt en op die manier voor ongecontroleerde celproliferatie zorgt. Voorbeelden van (proto-)oncogenen zijn het RAS gen, EGFR gen en het B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (BRAF) gen. Mutaties in een tumor suppressor gen zorgen ervoor dat de remmende functie van de suppressor niet meer werkt, waardoor celproliferatie bevordert wordt. Een voorbeeld van een tumorsuppressor-gen is het P53 gen (Erfelijke Aanleg Voor Kanker | Erfelijkheid.NI, n.d.; Hoe Ontstaat Kanker?, n.d.; Oncogenes and Tumor Suppressor Genes: Video & Anatomy | Osmosis, n.d.).

De meest voorkomende en dodelijkste kankers zijn NSCLC, CRC, pancreaskanker en melanoma. Deze kankers zijn vaak gemuteerd in het KRAS gen en in het BRAF gen. Deze (proto-)oncogenen coderen voor eiwitten die behoren tot de RAS/MAPK/ERK signaalweg. Deze signaalweg is één van de signaalwegen die volgt uit de EGFR (Ihle et al., 2014; Montes et al., 2023; Reita et al., 2022; Wang et al., 2022).

2.1. Signaaltransductie

De signaaltransductie start doordat er een ligand gebonden wordt aan de EGFR, hierdoor wordt EGFR geactiveerd via fosforylatie. Specifieke liganden om deze receptor te activeren zijn epidermal growth factor (EGF), transformerende groeifactor- α (TGF- α) en amphireguline (AREG) (Wee & Wang, 2017).

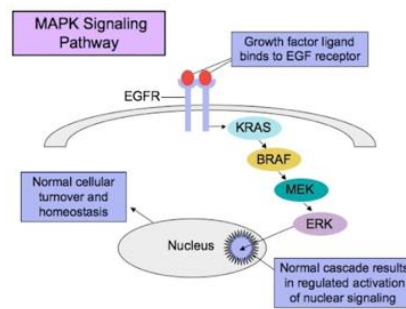
Hierna plant het signaal zich intracellulair voort via verschillende fosforylatie-gemedieerde signaalwegen naar de celkern. Enkele signaalwegen zijn de RAS/MAPK/ERK signaalroute, de PI3K-AKT signaalroute, de JAK-STAT signaalroute en de PLC signaalroute. Het extracellulair signaal dat aankomt in de celkern, zorgt voor een aangepaste transcriptie van genen, wat dan leidt tot o.a. proliferatiemetastase en het remmen van apoptose (Wee & Wang, 2017). Een overzicht van de EGFR signaaltransductie wordt weergegeven op figuur 2. In dit verslag wordt enkel de RAS/MAPK/ERK signaalroute besproken.



Figuur 2. EGFR signaaltransductie. Overgenomen van (Wee & Wang, 2017).

Eenmaal de EGFR receptor geautofosforyleerd is, zal dit een signaal doorsturen naar verschillende signaalroutes, waaronder de KRAS signaalroute. Hierdoor gaat de inactieve KRAS, geactiveerd worden. Deze gaat op zijn beurt BRAF activeren, door BRAF te fosforyleren. BRAF gaat vervolgens MEK activeren door te fosforyleren en MEK gaat op analoge wijze ERK activeren. ERK gaat vervolgens het signaal naar

de celkern brengen waar de fosforylatie van transcriptie factoren de transcriptie van genen beïnvloedt ten voordelen van celproliferatie (Wee & Wang, 2017). Dit wordt weergegeven op figuur 3.



Figuur 3. RAS/MAPK/ERK signaalroute. Overgenomen van (APMG Colon Molecular Pathways, n.d.).

2.1.1. EGFR

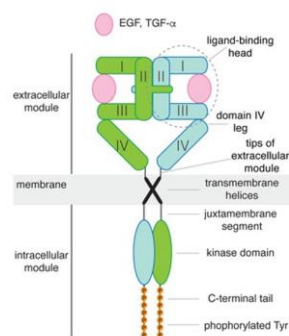
EGFR is een receptor die zich bevindt op het celmembraan van de cel. Een andere benaming voor EGFR is human epidermal growth factor receptor (HER).

De EGFR receptor bestaat uit 3 regio's nl.: een extracellulaire ligand-bindende regio, een hydrofobische transmembranaire regio en een intracellulaire tyrosine kinase regio (Wee & Wang, 2017). Dit wordt weergegeven op figuur 4.

De extracellulaire regio wordt onderverdeeld in 4 domeinen. Domein I en domein III nemen deel aan de ligand binding. De binding van de ligand aan de receptor leidt tot EGFR dimerisatie, hierbij gaan 2 receptoren met elkaar "versmelten". Daarnaast leidt de ligand-binding en de dimerisatie tot autofosforylering, hierbij worden tyrosine residu's gefosforyliseerd in de C-terminale staart van de intracellulaire regio van de EGFR. Domein II zorgt voor dimeer vorming met andere analoge domeinen van familieleden. Familieleden zijn receptoren die tot dezelfde familie behoren als het EGFR. Tot slot is domein IV de verbinding tussen de extracellulaire regio en de transmembranaire regio. Ook kan domein IV disulfide bindingen vormen met domein II (Huang et al., 2021; Wee & Wang, 2017).

De transmembranaire regio zorgt ervoor dat de receptor in het membraan vast geankerd is. Daarnaast is dit de plaats waar dat de dimerisatie plaatsvindt met andere EGFR, wanneer er een ligand gebonden is aan de EGFR (Wee & Wang, 2017).

De intracellulaire regio bevat onder andere een tyrosine kinase domein en een C-terminale staart. De C-terminale staart bevat tyrosine residu's, wanneer er een ligand gebonden wordt aan de receptor, worden deze tyrosine residu's automatisch gefosforyleerd, waardoor er intracellulaire proteïne kunnen verankeren aan de geactiveerde receptor. Deze proteïnen nemen vervolgens deel aan het doorgeven van de signaaltransductie (Wee & Wang, 2017).



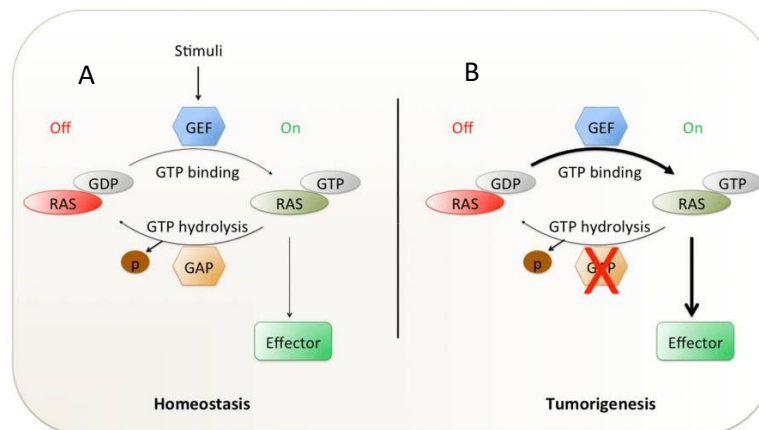
Figuur 4. EGFR structuur. Aangepast uit (Huang et al., 2021).

EGFR mutaties kunnen ontstaan op zo gehete hotspots. Deze hotspots bevinden zich in de extracellulaire regio, het tyrosine kinase domein en de C-terminale staart. De locaties waar de mutaties plaatsvinden, is specifiek voor sommige type kankers. Zo heeft bijvoorbeeld NSCLC bijna enkel mutaties in het tyrosine kinase domein ter hoogte van exon 18-21 (Wee & Wang, 2017).

Activerende EGFR mutaties zoals L858R in exon 21, in-frame deleties in exon 19 zijn de meest voorkomende EGFR mutaties in NSCLC en zijn een indicatie voor anti-EGFR therapie gevoeligheid meer bepaald EGFR tyrosine kinase inhibitoren (Wee & Wang, 2017).

2.1.2. KRAS

Wanneer het KRAS eiwit een signaal ontvangt van de EGFR, dan wordt het KRAS eiwit geactiveerd. Dit gebeurt doordat de guanosinedifosfaat (GDP) wordt omgezet naar een guanosinetrifosfaat (GTP) door een guanosine-nucleotide-uitwisselingsfactor (GEF). Als het KRAS eiwit geactiveerd is wordt het signaal doorgestuurd naar het BRAF eiwit. Wanneer de cel genoeg geprofileerd is gaat in een normale situatie de GTPase-activerende proteïnen (GAP) het KRAS eiwit weer inactiveren door GTP om te zetten naar GDP. Een voorbeeld van een GAP is neurofibromine 1 (NF1) (Uras et al., 2020; Wee & Wang, 2017). Dit proces wordt schematisch weergegeven op figuur 5a.



Figuur 5. a) KRAS activatie/deactivatie normaal proces. b) KRAS activatie/deactivatie gemuteerd proces. Aangepast uit (Uras et al., 2020).

Bij de gekende hotspot mutaties in KRAS, gaat het KRAS eiwit irreversibel actief blijven. Deze mutaties hebben een impact op de GTP hydrolyse. Hierdoor ontstaat er een constante signaaltransductie naar het BRAF eiwit, wat uiteindelijk gaat leiden tot een ongecontroleerde celproliferatie (Uras et al., 2020; Wee & Wang, 2017). Dit wordt weergegeven op figuur 5b.

Het KRAS gen heeft verschillende hotspot mutaties; 98% van de KRAS mutaties vinden plaats in codon 12 (G12), codon 13 (G13) en codon 61 (Q61) (Uprety & Adjei, 2020). Over alle tumortypes heen is G12 de voornaamste hotspot, gevolgd door G13 en Q61 (respectievelijk: 89%, 8% en 1% van alle KRAS mutaties) (Huynh et al., 2022; Lu et al., 2016).

In totaal zijn er 6 soorten mutaties die in codon 12 kunnen plaatsvinden bekend nl. G12A, G12R, G12D, G12C, G12S en G12V. In codon 13 is de meest voorkomende mutatie G13D (Yoon et al., 2014). In tabel 1 wordt er een overzicht weergegeven van de respectievelijke aminozuurswijzingen en het percentage voorkomen in colonkanker, NSCLC en pancreaskanker.

Tabel 1. KRAS mutaties en voorkomen in colonkanker, NSCLC en pancreaskanker (László et al., 2021; Luo, 2021; Montes et al., 2023; Reita et al., 2022; Ruppert et al., 2020; Yoon et al., 2014).

Mutatie	Nucleotide wijziging	Aminozuur Wijziging*	% voorkomen colonkanker	% voorkomen NSCLC	% voorkomen pancreaskanker
G12A	G <u>G</u> T→G <u>C</u> T	Gly→Ala	33,8	7	1,4
G12D	G <u>G</u> T→G <u>A</u> T	Gly→Asp	21,4	17	39,2
G12V	G <u>G</u> T→G <u>T</u> T	Gly→Val	21,4	21	32,5
G12R	G <u>G</u> T→G <u>C</u> T	Gly→Arg	1,8	2	17,1
G12C	G <u>G</u> T→G <u>T</u> C	Gly→Cys	5,9	42	1,7
G12S	G <u>G</u> T→G <u>A</u> T	Gly→Ser	4,7	2	1,4
G13D	G <u>G</u> C→G <u>A</u> C	Gly→Asp	7,31	3,4	1,2

*Gly=glycine; Ala=alanine; Asp=asparaginezuur; Val=valine; Arg=arginine; Cys=cysteine; Ser=serine

Een therapie dat vaak toegepast wordt bij CRC is het gebruik maken van monoclonale antilichamen, deze zijn gericht tegen het EGFR. De monoclonale antilichamen gaan binden aan de EGFR en zorgen ervoor dat er een blokkage ontstaat, waardoor er geen door ligand geïnduceerde fosforylatie van de EGFR plaatsvindt. Dit heeft als gevolg dat er geen tumorgroei zal ontstaan. Voorbeelden van anti-EGFR monoclonale antilichamen zijn cetuximab en panitumumab (Lièvre et al., 2006; Zhu et al., 2021).

Daarnaast bestaat er ook een andere therapie waarbij er gebruik gemaakt wordt van TKI's. Deze gaan de tyrosine-kinase van de EGFR inhiberen, waardoor er geen fosforylatie van de EGFR ontstaat. Hierdoor zal er geen tumorgroei ontstaan. TKI's worden vaak toegepast bij NSCLC (Yang & Tam, 2018).

Bovenstaande therapieën hebben geen effect wanneer er een KRAS mutatie optreedt, vermits hierbij het KRAS eiwit geactiveerd blijft onafhankelijk van de EGFR. Momenteel wordt er volop onderzoek gedaan naar therapieën gericht tegen KRAS mutaties. Een therapie dat voorlopig goede resultaten oplevert is de therapie dat gebruik maakt van specifieke inhibitoren tegen de G12C KRAS mutatie, voorbeelden van zo'n inhibitoren zijn sotorasib en adagrasib. Sotorasib wordt in de Verenigde Staten al gebruikt als behandeling tegen NSCLC, het gebruik van adagrasib is aan het doorbreken in de Verenigde Staten als behandeling tegen NSCLC. Ook bij CRC wordt er volop onderzoek gedaan naar therapieën voor de G12C KRAS mutatie (Zhu et al., 2021). Voorlopig zijn sotorasib en adagrasib nog niet zo effectief bij CRC volgens Ciardiello et al. (2023).

KRAS mutaties komen voor 90% voor bij pancreaskanker. De meest voorkomende mutatie is de G12D mutatie. Ook naar therapieën voor deze mutatie wordt er onderzoek gedaan, hierbij wordt er namelijk gebruik gemaakt van MRTX1133. Deze bindt aan de G12D mutatie en inhibeert de signaaltransductie naar het BRAF eiwit (Bannoura et al., 2022).

2.1.3. BRAF

Zoals eerder vermeld wordt het signaal bij activatie van het KRAS eiwit doorgestuurd naar het BRAF eiwit. Dit signaal zorgt voor de activatie van het serine/threonine kinase in het BRAF eiwit, waardoor het BRAF eiwit geactiveerd en gefosforyleerd wordt. Wanneer het BRAF eiwit geactiveerd en gefosforyleerd is zal deze het signaal verder doorsturen naar het MEK eiwit (Roza & Bidshahri, 2017).

Om het BRAF eiwit in inactieve vorm te houden, indien er geen signaal wordt ontvangen van het KRAS eiwit, suggereren de kristal structuren van het BRAF eiwit dat op positie 600 het aminozuur valine vereist is. Indien op deze positie een aminozuur wijziging plaats vindt, dan zal het BRAF eiwit geactiveerd worden, ongeacht of het BRAF eiwit een signaal ontvangt van het KRAS eiwit. Deze aminozuur wijziging wordt ook wel het BRAF V600 mutatie genoemd. In een normale situatie wordt het BRAF eiwit dus enkel geactiveerd door een signaal van het KRAS eiwit (Roza & Bidshahri, 2017).

BRAF mutaties treden op bij 7% van de humane kankers en meer dan 90% van die mutaties worden geobserveerd als een V600E mutatie. Daarnaast bestaan er ook nog andere BRAF mutaties zoals V600K, V600R, V600D en non-V600 mutaties (Ascierto et al., 2012; Śmiech et al., 2020).

2.1.4. MEK

Er bestaan twee isoformen van het mitogen-activated protein kinase (MEK) eiwit nl. MEK1 en MEK2. Vermits deze isoformen zo goed als identiek zijn op vlak van functionaliteit en het behouden van hoge sequenties, worden deze isoformen als één geheel beschouwd en wordt dit geheel MEK1/2 of gewoonweg MEK genoemd. MEK is een serine/threonine kinase dat de fosforylatie van het ERK eiwit katalyseert, eenmaal MEK geactiveerd wordt door het BRAF eiwit. De fosforylatie vindt plaats op de tyrosine en threonine residu's van het ERK eiwit (Barbosa et al., 2021).

Voor het MEK eiwit zijn er ook mutaties gekend. Deze mutaties zijn onder meer deleties en substituties. Deze mutaties leiden tot een continue activatie van het MEK eiwit (Barbosa et al., 2021).

2.1.5. ERK

Ook van het extracellular signal-regulated kinase (ERK) eiwit bestaan er twee isoformen nl. ERK1 en ERK2. Voor dezelfde redenen als bij MEK, worden deze isoformen als één geheel beschouwd en wordt dit geheel ERK1/2 of kortweg ERK genoemd. Eenmaal het ERK eiwit gefosforyleerd wordt door het MEK eiwit, zal het ERK eiwit het signaal doorsturen naar de kern van de cel. Hierdoor gaan transcriptiefactoren geactiveerd worden en zal er cel proliferatie plaatsvinden (Barbosa et al., 2021).

Vermits ERK mutaties zeer zelden oorzaak zijn van kanker, is hier nog niet veel onderzoek naar gedaan en is hier dus weinig over bekend (Barbosa et al., 2021).

2.2. Mutatie detectie op Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) materiaal

In het labo CMG van het UZ Brussel wordt in de diagnostiek aan mutatie detectie op FFPE materiaal gedaan via NGS. Het labo heeft deze methode in huis ontwikkeld en gevalideerd op DNA niveau.

In de klinische pathologie is het gebruik maken van formaline fixatie en paraffine inbedding van tumorweefsel, een obligatoire aanpak omdat deze methode de cel morfologie van het weefsel goed behoudt en omdat het staal hierdoor lang op kamertemperatuur kan bewaard worden. Uit FFPE tumorweefsel wordt vaak DNA gehaald voor het detecteren van somatische mutaties en het kiezen van een goede doelgerichte therapie in de kankerbehandeling (Berra et al., 2019; Guo et al., 2022).

Tijdens het proces van weefselmateriaal te fixeren en in te bedden met paraffine, zijn er enkele stappen die ervoor zorgen dat het DNA een slechtere kwaliteit heeft. Zo gaat formaline tijdens de fixatiestap ervoor zorgen dat er kruisverbindingen tussen intracellulaire macromoleculen (DNA-DNA, DNA-RNA en DNA-eiwit) ontstaan, waardoor de DNA-polymerase geblokkeerd wordt tijdens de amplificatie. Ook fragmentatie van DNA treedt op door fixatie waardoor ook de daaropvolgende toepassingen van FFPE-DNA negatief beïnvloed kunnen worden. Daarnaast veroorzaakt formaline ook voor at-random deaminatie van nucleotiden waarbij de hydrolytische deaminering van cytosine-basen naar uracil-basen, één van de voornaamste is. Zo ontstaan er foutieve U:G combinaties, waarbij DNA polymerase een adenine-base zal incorporeren in het amplicon, waardoor er C:G > T:A artefacten ontstaan (Berra et al., 2019; Guo et al., 2022). Volgens Kim et al. (2017) nemen deze artefacten toe bij uitgestelde fixatie, verlengde fixatie tijden (meer dan 48 uren) en langdurig bewaren van FFPE materiaal.

Ook in vivo kan deaminatie van nucleotiden optreden, door bijvoorbeeld externe factoren zoals UV bestraling, waarbij uracil-DNA-glycosylase (UDG) een belangrijke functie heeft in het verwijderen van de uracil-basen en het starten van een herstelling van het DNA. In vitro wordt een UDG-behandeling

van FFPE-DNA ook gebruikt om fixatie-geïnduceerde artefacten te verwijderen, hetgeen vooral efficiënt is bij zeer oude FFPE blokken (> 10jaar) of bij slechte fixatie-condities. Deaminatie ter hoogte van gemethyleerde cytosine (CpG eilanden), waarbij onmiddellijke omschakeling gebeurt naar een thymine-base, blijft echter onaangeroerd bij UDG behandeling (Kim et al., 2017).

Gezien de voordelen van FFPE voor het pathologisch labo wordt er ondanks de reeds beschreven fixatie-nadelen, toch wel succesvol gebruik gemaakt van FFPE-DNA in moleculaire technieken zoals polymerase chain reaction (PCR) en NGS methoden. Een goede verwerking van het weefselmateriaal is wel een voorwaarde om de hoeveelheid aan vals-positieve mutaties zo laag mogelijk te houden (Kerick et al., 2011; Yost et al., 2012).

2.3. Digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR)

Het vermogen om mutaties accuraat en efficiënt te detecteren met behulp van moleculaire technieken zoals PCR en NGS heeft het mogelijk gemaakt om meer zicht te krijgen op de genetische basis van kanker en de persoonlijke behandeling van kankerpatiënten. NGS geeft de mogelijkheid om een uitgebreide en gelijktijdige analyse te doen van een groot aantal mutaties in tal van genen en is veelzijdiger dan PCR die in oncologie gebruikt wordt voor gerichte mutatiedetectie. De gevoeligheid in het detecteren van mutaties is afhankelijk van verschillende factoren maar over het algemeen heeft PCR een lagere detectielimiet dan NGS, aangezien NGS karakteristiek gekenmerkt wordt door een zekere mate van achtergrond, veroorzaakt door sequencing artefacten. Deze kunnen voorkomen in elke stap van NGS (weefsel processing, weefsel bewaring, DNA isolatie, DNA fragmentatie, probe hybridisatie, library amplificatie, sequencing en data analyse) (Ou et al., 2023; Singh, 2020; Tanaka et al., 2020).

Het concept van dPCR is ontstaan uit de klassieke PCR, voor het eerst uitgewerkt in het jaar 2012 en is populair geworden bij het commercialiseren van dergelijke platforms. Het laatste decennium heeft dPCR een waardevolle aanvulling gemaakt op de bestaande PCR-en NGS technologieën in de oncologie (Bai et al., 2018; Galimberti et al., 2022; Lee et al., 2023; Tong et al., 2017).

2.3.1. dPCR techniek

dPCR is een techniek waarbij gebruik gemaakt wordt van compartimenten en waarbij in elke compartiment apart een DNA amplificatie wordt gedaan, die real-time gemeten wordt. De meest bekende vorm is ddPCR, waarbij qPCR reacties plaatsvinden in duizenden kleine druppels. In dit deel wordt eerst dieper ingegaan op de vergelijking van conventionele polymerase chain reaction (cPCR), qPCR en ddPCR. Vervolgens wordt de ddPCR techniek meer gedetailleerd besproken.

2.3.1.1. Conventionele polymerase chain reaction (cPCR)

Het amplificeren van het DNA gebeurt a.d.h.v. een PCR. PCR is een techniek waarbij een klein stukje DNA kan geamplificeerd worden, dit stukje wordt afgebakend door primers. Primers zijn korte DNA fragmenten die complementair zijn aan de enkelstrengige DNA streng, waarvan de sequenties gekend zijn (Mahanama & Wilson-Davies, 2021).

Een PCR bestaat uit 3 stappen nl. denaturatie, annealing en elongatie. Bij denaturatie gaat de PCR cyclus verhit worden tot 95°C, waardoor de waterstofbrugverbindingen, van de dubbelstrengige DNA streng, breken. Hierdoor ontstaan er dus 2 enkelstrengige DNA strengen. Nadien treedt de annealing stap op, hierbij wordt de PCR cyclus afgekoeld tot 45-70°C. In deze stap gaan de DNA-primers vasthechten op de enkelstrengige DNA strengen. Tot slot gaat de elongatie stap invoegen. In de elongatie stap gaat de temperatuur van de PCR cyclus stijgen tot 72-80°C. Hierbij gaat de DNA-polymerase binden aan de primer en de DNA streng verlengen, door gebruik te maken van losse complementaire nucleotiden. De DNA-polymerase gaat de nucleotiden dus vasthechten aan de enkelstrengige DNA strengen, waardoor

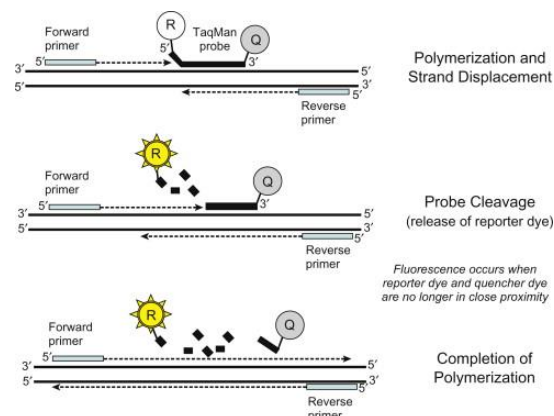
er 2 dubbelstrengige DNA strengen gevormd worden als eindproduct. Deze 3 stappen worden 30-40 keer herhaald, waardoor het aantal dubbelstrengige DNA strengen exponentieel stijgt (Mahanama & Wilson-Davies, 2021).

Bij de klassieke of conventionele PCR gebeurt de detectie van geamplificeerd DNA na de PCR reactie door het uitvoeren van een DNA-kleuring en het scheiden met agarose gel elektroforese. Visueel inschatten van de bandbreedte en bandintensiteit werd gebruikt om de kwantiteit in te schatten t.o.v. een controle DNA staal. Deze relatieve methode kent een grote meetfout (Wittmeier & Hummel, 2022).

2.3.1.2. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

qPCR of real-time PCR (rt-PCR) is gelijkaardig aan een gewone PCR, hierbij wordt er ook cycli uitgevoerd van een denaturatie stap, annealing stap en elongatie stap. Het grootste verschil is dat bij qPCR de detectie van het target DNA tegelijkertijd gebeurt met de amplificatie (real-time), hierdoor moet er na de PCR reactie geen gelelektroforese meer uitgevoerd worden (Galimberti et al., 2022).

Bij qPCR gebeurt de real-time detectie doorgaans aan de hand van fluorescent gelabelde Taqman probes. Deze probes bestaan uit een oligonucleotiden sequentie met daaraan een quencher en een reporter vastgebonden. De reporter is een fluorescente kleurstof. Zolang dat de quencher aan de probe is vastgebonden, zal door de nabijheid van de quencher ervoor gezorgd worden dat de fluorescente kleurstof niet zal gedetecteerd worden door de sensors. Wanneer DNA polymerase deze binding verbreekt, komt de reporter los van de quencher en zal de reporter fluorescentie wel gedetecteerd kunnen worden door de sensor in de qPCR cyclus. Voor de verduidelijking wordt de werking van een probe in beeld gebracht op figuur 6 (Mahanama & Wilson-Davies, 2021).



Figuur 6. Werking TaqMan probes. Overgenomen van (TaqMan - an Overview | ScienceDirect Topics, n.d.).

De Taqman probes kunnen bijvoorbeeld gelabeld worden met fluorescente groepen zoals FAM en HEX. Het punt waar de fluorescentie detecteerbaar wordt geeft een idee hoeveel DNA aanwezig is bij de start van de reactie. Een kwantificatie kan gebeuren aan de hand van de fluorescentie van een standaardcurve als referentiemateriaal. Deze relatieve meting kent een veel kleinere foutmarge dan bij cPCR. (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).

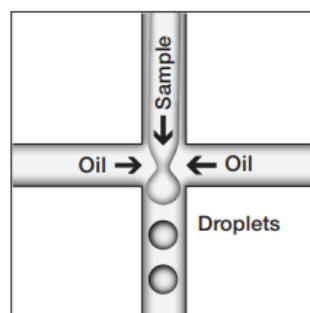
2.3.1.3. ddPCR

Bij ddPCR wordt de reactiemix eerst verdeeld over duizenden individuele druppels (water-in-olie emulsiedruppels), waarbij in iedere druppel een qPCR reactie kan plaatsvinden. Detectie van het signaal gebeurt bij ddPCR niet tijdens maar na de PCR amplificatie, zodat absoluut geteld wordt nl. het aantal positieve (target aanwezig), het aantal negatieve (target afwezig) en het aantal lege druppels in plaats van een relatieve vergelijking met een controlestaal of standaardcurve (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.; Kojabad et al., 2021).

Omdat de verdeling van het DNA over de druppels at-random is, kan het aantal positieve en negatieve reacties in een gegeven volume van het staal beschreven worden door een Poisson verdeling. De verhouding tussen het aantal positieve en negatieve druppels wordt gebruikt om de concentratie van het target-DNA in het staal te berekenen. Lege druppels zijn essentieel voor het bepalen van de achtergrondruis (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).

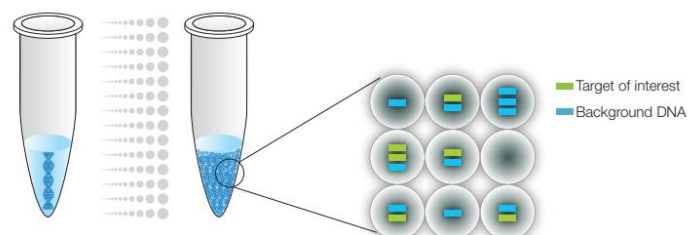
2.3.1.3.1. QX600 ddPCR systeem (Bio-Rad)

Bio-Rad introduceerde voor het eerst de ddPCR technologie met de QX100. Later volgde verbeterde versies met de QX200 en QX600. De QX600 ddPCR beschikt over 6 fluorescentiekanalen en biedt de mogelijkheid om te multiplexen, zodat meerdere targets tegelijk kunnen gedetecteerd worden in één druppel. Een absolute target-kwantificatie zou mogelijk zijn tot 0,1% of lager. De druppels bij ddPCR worden gevormd door een automatische droplet generator, zoals te zien is op figuur 7 (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).



Figuur 7. Droplet vorming door droplet generator. Overgenomen van (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).

Per staal worden er 20 000 uniforme (één nanoliter) druppels gevormd. Naast het vormen van druppels, zorgt de droplet generator er ook voor dat het staal verdeeld wordt over de verschillende druppels. Het kan zijn dat sommige druppels geen staal bevatten, andere druppels kunnen ook enkel target DNA bevatten of enkel background DNA (target afwezig) of beide. Om dit te verduidelijken wordt de verdeling van het staal weergegeven op figuur 8. Belangrijk om te weten is dat dit allemaal plaatsvindt in één eppje. De droplet generator gaat dus voor de verschillende stalen apart, druppels maken en het staal hierover verdelen (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).



Figuur 8. Verdelen van het staal over de droplets, blauw= background DNA, groen= target DNA. Overgenomen van (Droplet Digital TM PCR Droplet Digital TM PCR Applications Guide, n.d.).

2.3.1.3.2. Toepassing

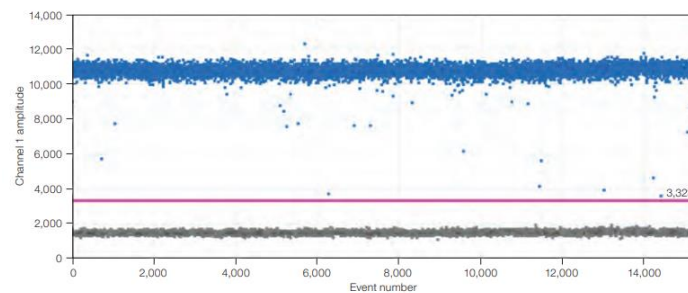
De ddPCR kan in kader van de oncologie toegepast worden bij het gebruik van verschillende soorten stalen zoals bloedstalen, urinestalen, cerebrospinaal vocht, etc. Daarnaast wordt er voor betere resultaten te verkrijgen, aangeraden om een restrictie digestie uit te voeren. Dit geldt bijvoorbeeld niet voor FFPE stalen, hierbij zou een voorafgaande restrictie digestie niet direct een meerwaarde geven

om een betere resultaat te bekomen (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.; Olmedillas-López et al., 2017).

2.3.1.3.3. Interpretatie

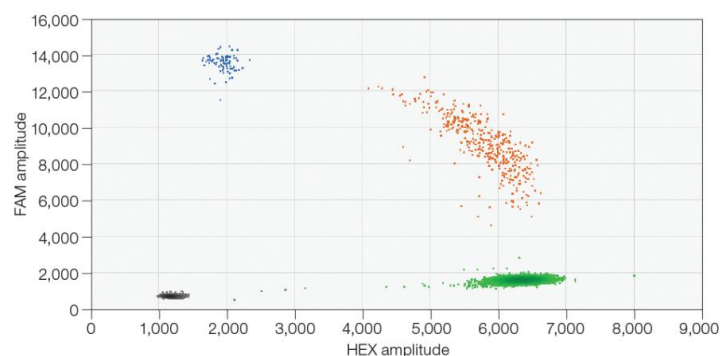
De droplet reader is het toestel dat iedere druppel individueel beoordeelt of deze een specifiek het target DNA bezitten of niet. Hierbij houdt de droplet reader enkel rekening met acceptabele druppels, dit zijn druppels met een sferische vorm en een volume van één nanoliter. Om een betrouwbare analyse te bekomen dient er minstens 10 000 druppels per well aanwezig te zijn. De droplet reader gebruikt een 6-kleurig detectiesysteem en de QuantaSoft™ Software voor een duidelijke visualisatie van de data (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.).

Per fluorescentiekanaal worden positieve (minstens één kopie van het specifiek target DNA aanwezig) en negatieve druppels uitgezet in een 1-D plot, waarbij de fluorescentie intensiteit wordt uitgezet t.o.v. het aantal druppels. De positieve druppels krijgen een score van 1, deze bevinden zich boven de threshold. De druppels onder de threshold worden als negatief beschouwd en krijgen een score van 0. Figuur 9 is een weergave van hoe zo'n 1-D plot eruit ziet (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.).



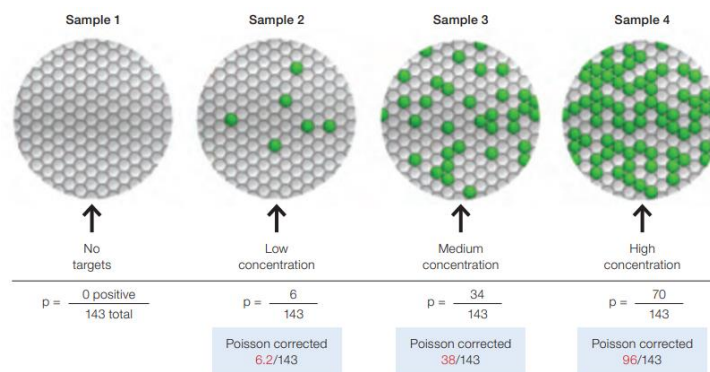
Figuur 9. Voorbeeld 1-D plot. Overgenomen van (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.).

Wanneer meer dan één fluorescentiekanaal gebruikt wordt, kunnen de resultaten ook weergegeven worden in een 2-D plot, deze grafiek zet de fluorescentie van kleurstof 1 (bv. FAM voor mutant target) uit in functie van fluorescentie van kleurstof 2 (bv. HEX voor wildtype target). Hierdoor worden er clusters gevormd, zoals weergegeven op figuur 10. De blauwe FAM cluster zijn alle positieve druppels, deze bevatten dus een mutatie in het target DNA. De groene HEX cluster zijn positieve druppels dat het wildtype target DNA bevatten, deze hebben geen mutatie. De oranje cluster zijn druppels die zowel mutant als wildtype target DNA bevatten. De grijze cluster zijn negatieve druppels, deze bevatten geen target DNA (DdPCR Mutation Detection Assays | Bio-Rad, n.d.).



Figuur 10. Voorbeeld 2-D plot. Overgenomen van (DdPCR Mutation Detection Assays | Bio-Rad, n.d.).

De QuantaSoft™ Software maakt gebruik van de statistische Poisson verdeling. De Poisson verdeling wordt toegepast omdat, zoals eerder vermeldt, bij ddPCR er druppels zijn waar geen DNA in aanwezig is, daarnaast zijn er druppels met enkel mutant DNA of enkel background DNA (wildtype DNA), maar ook druppels dat zowel target als background DNA bezitten. De verdeling van het staal over de druppels gebeurt dus willekeurig. De software berekent het gemiddeld aantal kopieën per druppel (λ) gebruik makende van volgende formule: $\lambda = -\ln((v-p)/v)$ met v = aantal geaccepteerde druppels en p = aantal positieve druppels. Rekening houdende met het aantal druppels en het druppelvolum, kan de uiteindelijke concentratie (kopies/ μ L) berekend worden. Naast de concentratie kan ook de fractionele abundantie gebruikt worden om de proportie mutant target DNA te bepalen in de totale hoeveelheid target DNA (mutant + wildtype). Enkele voorbeelden van de Poisson verdeling worden weergegeven op figuur 11 (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.).



Figuur 11. Voorbeelden Poisson verdeling. Overgenomen van (Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide, n.d.).

3. Experimenteel deel

3.1. Materiaal en methode

3.1.1. DNA extractie

De DNA extracties werden door de afdeling staalbeheer uitgevoerd. Hierbij werd er vertrokken van FFPE weefselcoupes, die verkregen zijn van het labo anatomo-pathologie. De DNA extracties werden automatisch uitgevoerd door gebruik te maken van de Maxwell® RSC DNA FFPE Plus Kit (Promega) op de Maxwell® Rapid Sample Concentrator RSC 48 (Promega). Dit toestel voert de DNA-extracties uit aan de hand van magnetische beads. Hierbij worden de weefselcellen gelyseerd en vervolgens gaat het vrijgekomen DNA, vasthechten aan de magnetische beads. Op deze manier wordt het DNA gescheiden van de andere stoffen zoals proteïnen. Met behulp van een elutiebuffer wordt het DNA tot slot geëluëerd van de magnetische beads.

3.1.2. ddPCR

Als eerste werd er indien van toepassing een verdunning gemaakt van de DNA stalen dat in het experiment gebruikt werden. De hoeveelheden dat hiervan gepipetteerd werden zijn afhankelijk van experiment tot experiment en van de DNA-input dat gebruikt werd in het experiment.

Vervolgens werd de PCR mix gemaakt, deze werd gemaakt met behulp van de ddPCR™ KRAS Screening Multiplex Kit (Lot.:64572062). Met deze kit kunnen de G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V en G13D KRAS mutaties opgespoord worden. In het algemeen bestond de PCR mix uit 2x ddPCR Supermix for probes (no dUTP) (Lot.: 64551810), 20x multiplex primers/probes (Lot.: 528796419) en nuclease-vrij water. Zeven probes zijn gelabeld met FAM (voor de zeven verschillende KRAS mutanten op te sporen) en één probe met HEX (voor het wildtype KRAS gen op te sporen). Afhankelijk van het experiment werd hier ook DNA, restrictie enzymen (RE) of UDG aan toegevoegd. De hoeveelheden die nodig waren voor één reactie worden weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Hoeveelheden PCR mix.

Component	Concentratie	Volume 1 reactie (µL)
2x ddPCR Supermix for probes (no dUTP) (Lot.: 64551810)		11
20x multiplex primers/probes (FAM+HEX) (Lot.: 528796419)	900nM primers/ 250nM probes	1,1
nuclease-vrij water		variabel**
DNA*	variabel**	variabel**
MseI (RE)*	2-5U	variabel**
UDG*	2-5U	variabel**
TOTAAL		22

*Afhankelijk van experiment werd dit toegevoegd in de PCR mix

** Verschillend van experiment tot experiment

Nadien werd de PCR mix gevortexd en kort gespind. Daarna werd de PCR mix gepipetteerd in een 96-well plaat (rijen worden aangeduid met letters, kolommen worden met cijfers aangeduid), de hoeveelheid PCR mix hing van het experiment af. Het totaal volume per well bedroeg 22µL inclusief DNA. Vervolgens werd er, indien er nog geen DNA aanwezig was in de PCR mix, DNA toegevoegd aan de 96-well plaat (Indien er met één staal gewerkt werd en overal dezelfde DNA concentratie aanwezig

moest zijn, werd het DNA aan de PCR mix toegevoegd). Nadien werd de plaat gesealed met behulp van een automatische sealer (Bio-Rad PX1™ PCR Plate Sealer), dit gebeurde voor 5 sec op 180°C. Daarna werd de plaat op 6 plaatsen gevortexd nl. de 4 hoeken en 2 plaatsen in het midden. Vervolgens werd de plaat gespind voor 1min op 1200rcf. Ondertussen werd de droplet generator (Bio-Rad Automated Droplet Generator) klaar gezet, de cartridge en tipjesdoos op geplaatst voordat deze behoren in het toestel. Eenmaal de 96-well plaat gespind geweest is, werd deze in de droplet generator geplaatst. Vervolgens werd er een koelblok met een lege 96-well plaat op desbetreffende plaats in de droplet generator geplaatst. Nadien werd de droplet generator ingesteld en werd deze gestart. De droplet generator gebruikt 20µL van elke well om de druppels te vormen.

Terwijl de droplet generator de druppels aan het maken was, werd de thermal cycler ingesteld. De thermal cycler dat gebruikt werd was de Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cyclor. De instellingen waren afhankelijk van het experiment, bij sommige experimenten werd er een temperatuurgradiënt gebruikt bij de annealing stap, bij andere experimenten vond er nog een incubatie van 30 min op 37°C plaats voor dat de PCR startte. De algemene instellingen worden weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Thermal cycler instellingen.

Cycle stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Ramp rate	#Cycli
Incubatie*	37	30min	~2°C/sec	1
Enzyme activatie	95	10min		1
Denaturatie	94	30sec	~2°C/sec	40
Annealing/elongatie	variabel**	1min		
Enzyme deactivatie	98	10min		1
Hold	4	30min	~1°C/sec	1
Hold	4	∞	~1°C/sec	1

**Niet bij elk experiment*

*** Verschillend van experiment tot experiment*

Wanneer de droplet generator klaar was, werd de 96-well plaat dat de druppels bevat gesealed met behulp van de automatische sealer. Vervolgens werd de 96-well plaat in de thermal cycler geplaatst. Nadien werd er op run gedrukt en runde de thermal cycler volgens de reeds ingestelde gegevens (Tabel 3).

Na de run werd de 96-well plaat overgezet naar de droplet reader (Bio-Rad QX600 Droplet Reader). Met behulp van de droplet reader werden de resultaten bekeken en geïnterpreteerd. De droplet reader maakt gebruik van speciale software (QuantaSoft), waardoor deze stap eenvoudig verliep.

3.2. Resultaten en bespreking

3.2.1. Optimalisatie

Bio-Rad heeft zelf een zeer beperkte validatie (wetlab-validatie) uitgevoerd op de KRAS screening assay. Bij deze validatie heeft de firma de reagentia getest op een positieve controle, gespiked in wildtype genomisch DNA. De optimale annealing/elongatie temperatuur wordt door Bio-Rad op 55°C gesteld, hierbij wordt een detectie gegarandeerd (per well) van 0,1% mutant DNA in een wildtype achtergrond.

Wel adviseert de firma om toch een temperatuursgradiënt uit te voeren gedurende de annealing/elongatie stap, om zo de meest optimale temperatuur te bekomen bij het specifiek gebruikte staalsoort (in dit geval FFPE). Bij de meest optimale temperatuur wordt er een maximale scheiding tussen de positieve en negatieve druppels bekomen, dit wil zeggen dat er nl. weinig regen (intermediaire fluorescentie zonder uitgesproken distributie, liggen verspreid tussen positieve en negatieve druppels), een goede resolutie, geen aspecifieke banden (intermediaire fluorescentiebanden die uniform zijn) en de verwachte fractionele abundantie (uitgedrukt in % VAF) moet bekomen worden.

Daarnaast raadt Bio-Rad ook aan om gebruik te maken van een restrictie-enzyme (RE) dat buiten de amplicon regio werkt (in dit geval MseI), om zo de bereikbaarheid van de template te vergroten en de accurateheid te doen toenemen. Hoewel dit niet noodzakelijk is voor gefragmenteerd DNA, zoals DNA geëxtraheerd uit FFPE materiaal, of lage input hoeveelheden (<60ng/reactie) wordt het effect van een restrictie-enzyme toch uitgetest. Het uitvoeren van de restrictie-enzyme reactie gebeurt volgens de Bio-Rad procedure (in de PCR mix met een concentratie van 2-5U/reactie).

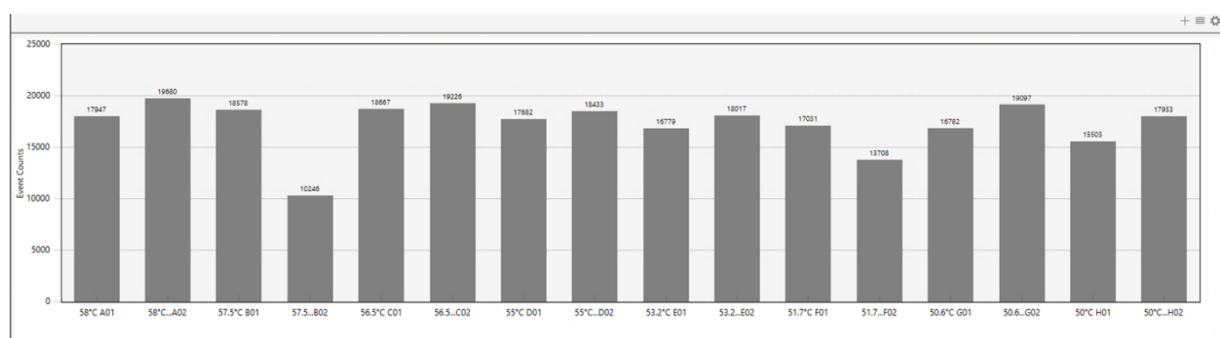
3.2.1.1. Temperatuursgradiënt met en zonder RE op FFPE

3.2.1.1.1. Opzet

Er werd gebruik gemaakt van een temperatuursgradiënt rond de door Bio-Rad geadviseerde 55°C (50°C (rij H); 50,6°C (rij G); 51,7°C (rij F); 53,2°C (rij E); 55°C (rij D); 56,5°C (rij C); 57,5°C (rij B); 58°C (rij A)), deze werd gelopen op DNA van staal T23.1036 (KRAS G12C mutatie, 23% VAF bepaald via NGS). Daarnaast werd in kolom 1 deze temperatuursgradiënt gelopen zonder RE, in kolom 2 werd deze gelopen met RE nl. MseI (3,5U/reactie). Per well was er een DNA-input van 30ng.

3.2.1.1.2. Resultaten en bespreking

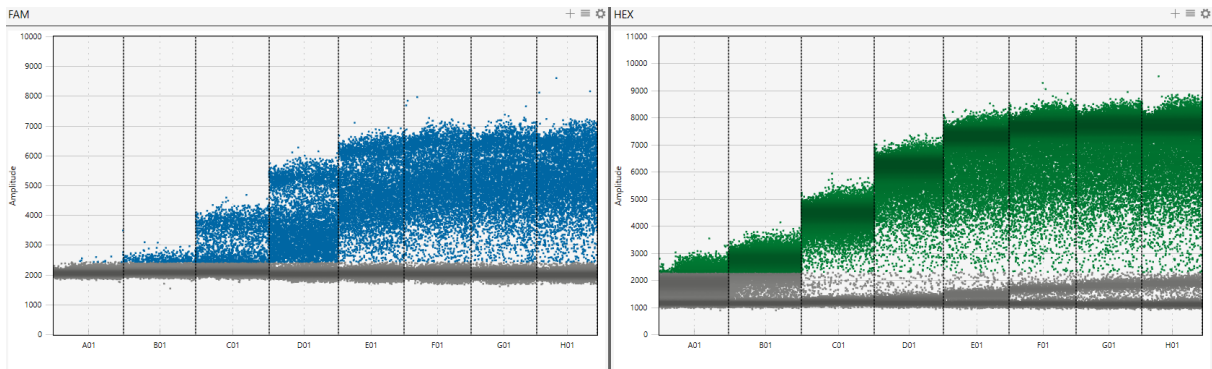
Zoals weergegeven op figuur 12 voldoet elke well aan de vereiste van het minimum aantal acceptabele druppels van 10 000 druppels, in de well van 57,5°C met RE (well B02) wordt hier nipt aan voldaan.



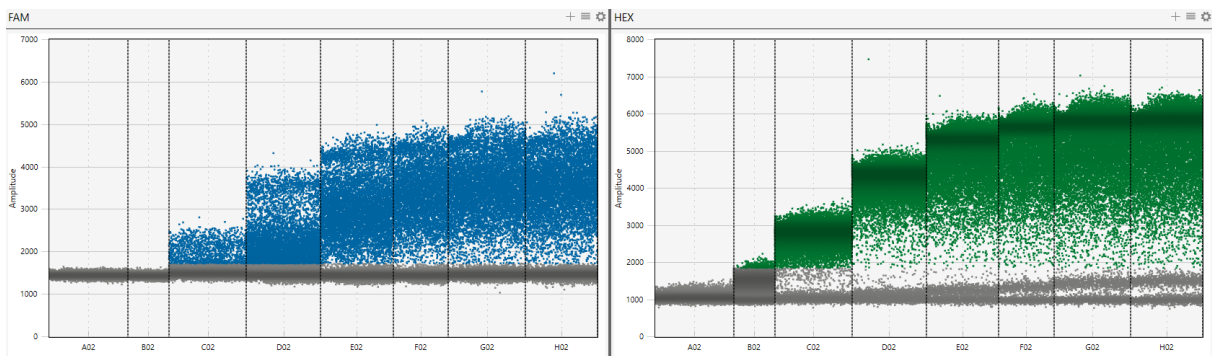
Figuur 12. Aantal acceptabele druppels temperatuursgradiënt met en zonder RE op FFPE.

Figuur 13 en figuur 14 tonen aan dat over de hele temperatuursgradiënt (58°C tot 50°C) de FAM en HEX fluorescentie amplitude hoger ligt zonder RE dan met RE. De amplitude ligt zonder RE bij FAM tot 7000 en bij HEX tot 8000, met RE ligt de amplitude bij FAM tot 5000 en bij HEX tot 6000. Hierdoor wordt er bij afwezigheid van RE een betere scheiding bekomen in beide kanalen naarmate de

temperatuur daalt, ondanks er een hogere FAM achtergrondfluorescentie vertoont wordt bij de negatieve druppels in deze conditie. Bij de door Bio-Rad aangeraden temperatuur van 55°C (rij D) is er in het FAM kanaal geen scheiding te zien, wel is er bij deze temperatuur een scheiding te zien in het HEX kanaal. Vanaf 53,2°C (rij E) en lager begint er een scheiding te ontstaan in het FAM kanaal. Ook wordt er vanaf deze temperatuur en lager steeds een duidelijkere scheiding zichtbaar in het HEX kanaal. Naarmate de temperatuur verder daalt wordt de scheiding duidelijker, maar begint er ook een aspecifieke band te vertonen bij de negatieve druppels in het HEX kanaal. De scheiding is degelijk over een brede temperatuursrange vanaf 53,2°C en lager, met uitzondering van de optredende aspecifieke band. Hoewel de scheidingstrend tussen positieve en negatieve druppels in beide kanalen groter wordt naarmate de temperatuur daalt, is de grote hoeveelheid aan regen nog een storende factor.

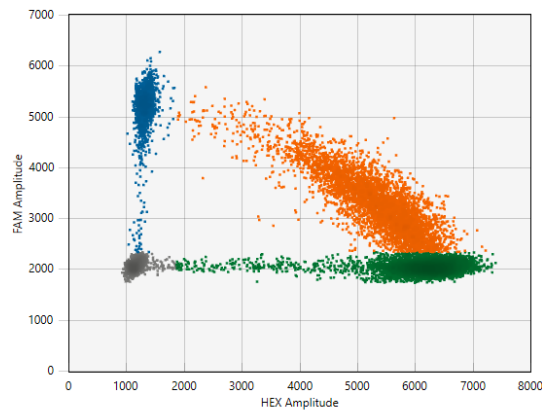


Figuur 13. FAM en HEX grafiek temperatuursgradiënt zonder RE op FFPE.

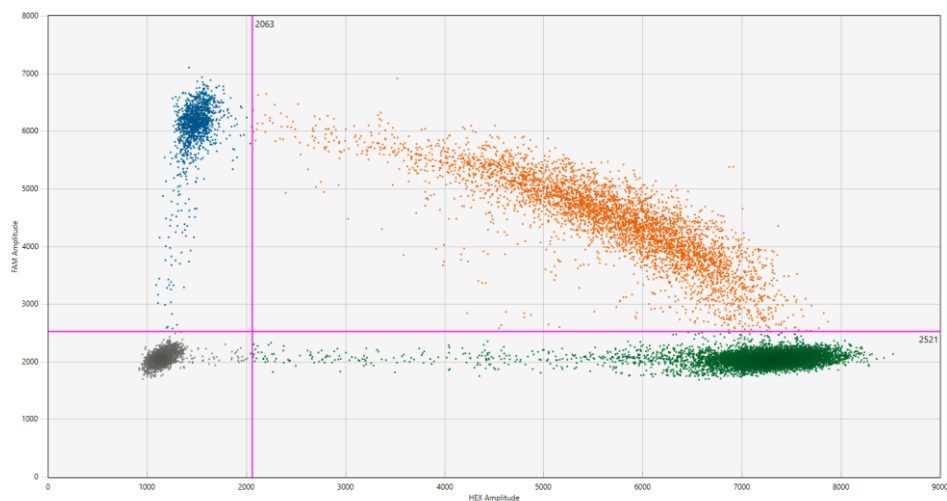


Figuur 14. FAM en HEX grafiek temperatuursgradiënt met RE op FFPE.

Voor een duidelijkere visuele weergave wordt op figuur 15 en figuur 16 de 2-D plot weergegeven van de scheiding tussen positieve druppels en negatieve druppels bij de aangeraden temperatuur van 55°C zonder RE en bij 53,2°C zonder RE. In deze 2-D weergave wordt de FAM amplitude uitgezet t.o.v. de HEX amplitude.

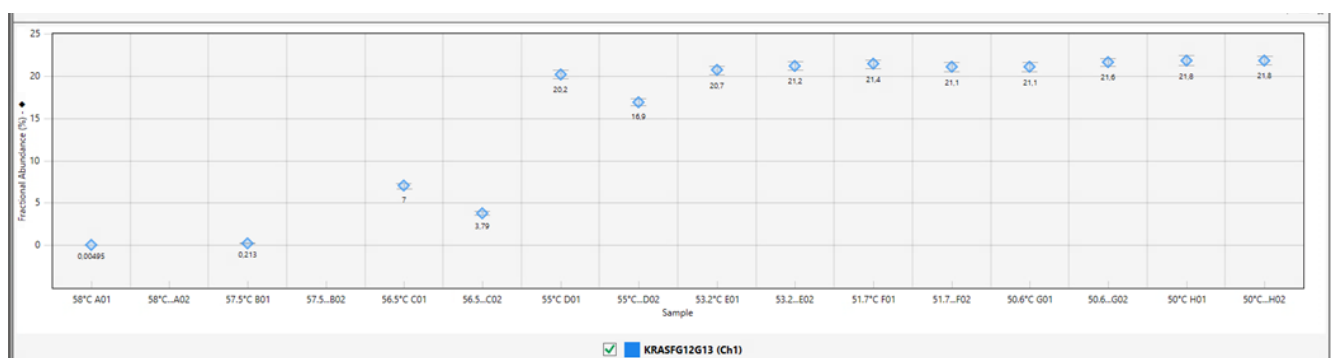


Figuur 15. 2-D plot zonder RE bij 55°C.



Figuur 16. 2-D plot zonder RE bij 53,2°C.

De fractionele abundanties zouden nabij 23% VAF moeten liggen en deze komen pas in de buurt vanaf 55°C en lager zoals weergegeven op figuur 17. De fractionele abundantie lijkt, ondanks de aspecifieke band, redelijk gelijkaardig over een brede temperatuursrange vanaf 53,2°C en lager.



Figuur 17. Fractionele abundantie temperatuursgradiënt met en zonder RE.

3.2.1.1.3. Conclusie

Uit de experimenten blijkt dat de optimale temperatuur (voor de annealing/elongatie stap) niet bij 55°C (zoals aangeraden door Bio-Rad), maar eerder bij 53,2°C ligt. Dit is de temperatuur waarbij de scheiding optreedt en waarbij de aspecifieke band in het HEX kanaal nog deels versmolten is met de negatieve druppels. Een betere scheiding bij lagere temperaturen wordt verklaard doordat er bij deze

temperaturen een efficiëntere binding van primers en probes aan het target DNA plaatsvindt. Maar vermits bij deze temperaturen een aspecifieke band in het HEX kanaal optreedt, wordt er niet verder gewerkt met deze temperaturen. Ook liggen de fractionele abundanties vanaf 53,2°C en lager in lijn met de verwachte fractionele abundanties die eerder via NGS bekomen werden.

Daarnaast zorgt de aanwezigheid van een RE (MseI) niet voor een betere scheiding en vermindert deze ook niet de aanwezigheid van regen.

Aangezien er veel regen aanwezig is, wordt er verondersteld dat dit te wijten is aan het FFPE-materiaal (mogelijks in combinatie met de redelijk hoge DNA-input van 30ng). Maar aan basis ligt ook het feit dat er competitie optreedt door de duplexreactie met een wildtype en verschillende mutante probes voor dezelfde targetlocatie. Om het effect van het materiaalsoort uit te testen wordt het experiment herhaald op een heterozygoot Horizon staal van een betere DNA kwaliteit (HD269).

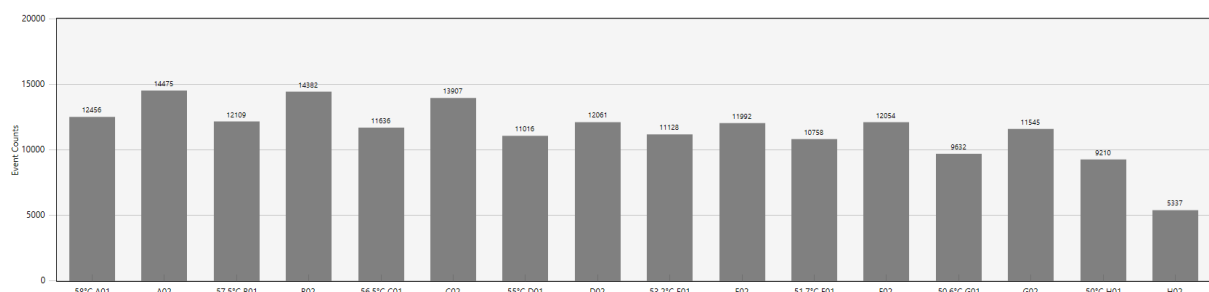
3.2.1.2. Temperatuursgradiënt met en zonder RE op Horizonstaal

3.2.1.2.1. Opzet

Er werd gebruik gemaakt van een temperatuursgradiënt rond de door Bio-Rad geadviseerde 55°C (50°C (H); 50,6°C (G); 51,7°C (F); 53,2°C (E); 55°C (D); 56,5°C (C); 57,5°C (B); 58°C (A)), deze werd gelopen op staal HD269 (KRAS G12C mutatie, 50% VAF, lot.: 59466). Daarnaast werd in kolom 1 deze temperatuursgradiënt gelopen zonder RE, in kolom 2 werd deze gelopen met RE nl. MseI (3,5U/reactie). Per well was er een DNA-input van 20ng.

3.2.1.2.2. Resultaten en bespreking

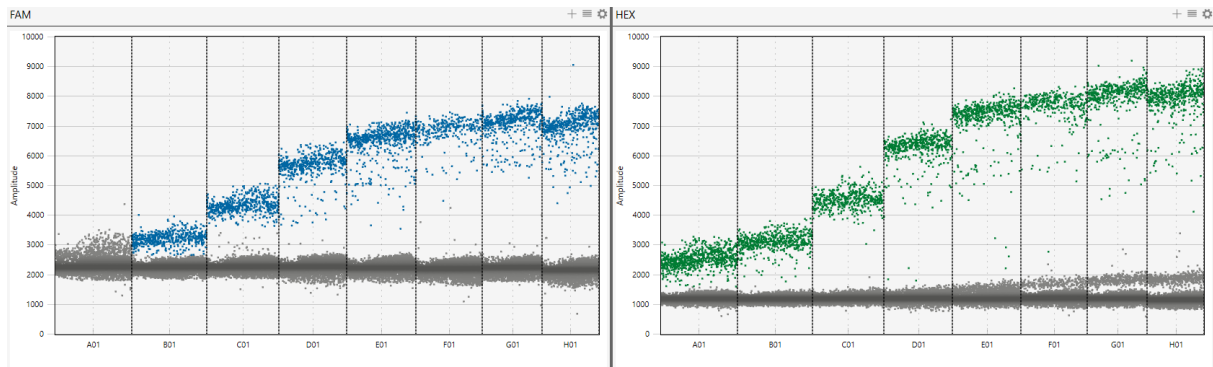
De meeste wells bekomen een betrouwbare analyse (meer dan 10 000 druppels per well), met uitzondering op well G01 (50,6°C zonder RE), H01 (50°C zonder RE) en H02 (50°C met RE). Bij well G01 en H01 is het aantal nipt onder de 10 000 druppels per well, bij well H02 is het aantal acceptabele druppels enorm laag (ongeveer 5000). Dit wordt weergegeven op figuur 18.



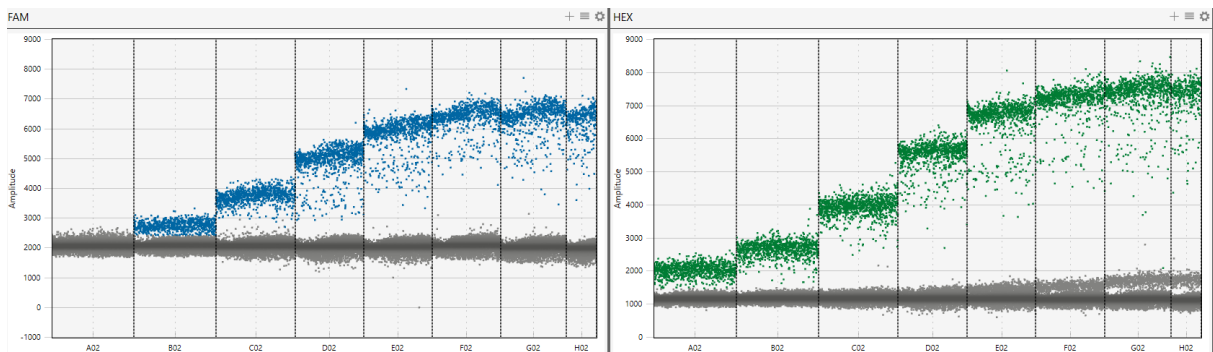
Figuur 18. Aantal acceptabele druppels temperatuursgradiënt met en zonder RE op horizonstaal.

Figuur 19 en figuur 20 tonen aan dat over de hele temperatuursgradiënt (58°C tot 50°C) de FAM en HEX fluorescentie amplitude hoger ligt zonder RE dan met RE. De amplitude ligt zonder RE bij FAM tot 7000 en bij HEX tot 8000, met RE ligt de amplitude bij FAM tot 6500 en bij HEX tot 7000. Hierdoor wordt er bij afwezigheid van RE een betere scheiding bekomen in beide kanalen naarmate de temperatuur daalt. In het FAM kanaal is er al een zekere scheiding te zien vanaf 57,5°C (rij B), in het HEX kanaal is er al een zekere scheiding te zien vanaf 58°C (rij A). Bij de door Bio-Rad aangeraden temperatuur van 55°C (rij D) is er een duidelijkere scheiding te zien, zowel in het FAM kanaal als in het HEX kanaal. Vanaf 53,2°C (rij E) begint er een betere scheiding te ontstaan in het FAM kanaal en het HEX kanaal. Naarmate de temperatuur verder daalt wordt de scheiding nog duidelijker, maar begint er ook een aspecifieke band te verschijnen bij de negatieve druppels in het HEX kanaal. De scheiding is degelijk over een brede temperatuursrange vanaf 53,2°C en lager, met uitzondering van de optredende

aspecifieke band. In vergelijking met de temperatuursgradiënt op FFPE materiaal, is hier een kleinere hoeveelheid regen.

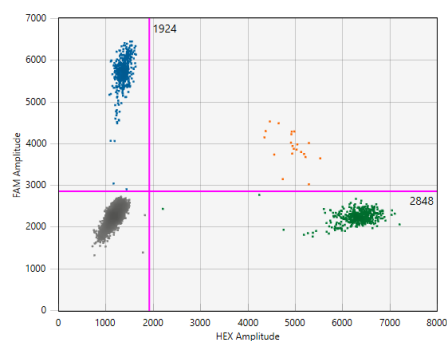


Figuur 19. FAM en HEX grafiek temperatuursgradiënt zonder RE op horizonstaal.

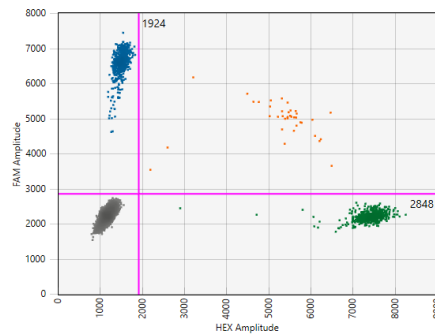


Figuur 20. FAM en HEX grafiek temperatuursgradiënt met RE op horizonstaal.

Net zoals in de temperatuursgradiënt op FFPE, wordt een duidelijkere visuele weergave op figuur 21 en figuur 22 de 2-D plot weergegeven van de scheiding tussen positieve druppels en negatieve druppels bij de aangeraden temperatuur van 55°C zonder RE en bij 53,2°C zonder RE. In deze 2-D weergave wordt de FAM amplitude uitgezet t.o.v. de HEX amplitude.

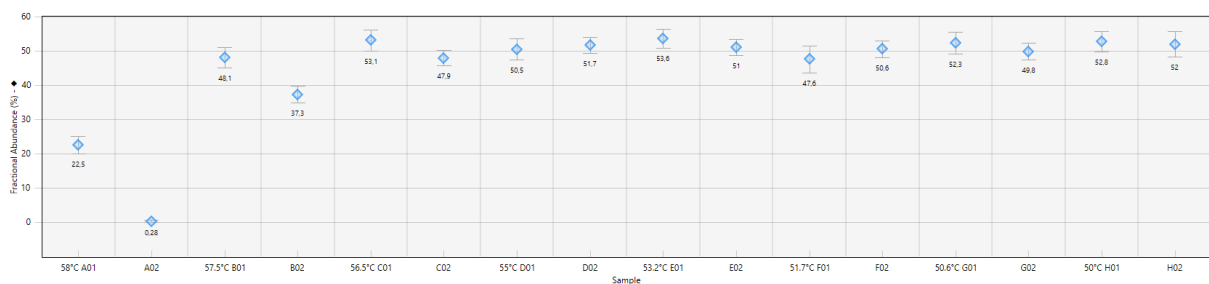


Figuur 21. 2-D plot zonder RE 55°C.



Figuur 22. 2-D plot zonder RE 53,2°C.

De fractionele abundanties zouden in de buurt moeten liggen van 50% VAF, deze worden pas bekomen vanaf 57,5°C en lager zoals weergegeven op figuur 23. De fractionele abundantie lijkt, ondanks de aspecifieke band, redelijk gelijkaardig over een brede temperatuursrange vanaf 56,5°C en lager.



Figuur 23. Fractionele abundantie temperatuursgradiënt met en zonder RE op horizonstaal.

3.2.1.2.3. Conclusie

Uit de experimenten blijkt dat voor kwaliteitsvol DNA een temperatuur (voor de annealing/elongatie stap) bij 55°C mogelijk is, maar ook zeker bij 53,2°C. Bij beide temperaturen treedt de scheiding op en bij beide is de aspecifieke band in het HEX kanaal nog deels versmolten is met de negatieve druppels. Maar zowel de FAM amplitude als de HEX amplitude liggen hoger bij 53,2°C dan bij 55°C. Gezien er in de routine gewerkt zal worden met minder kwaliteitsvol DNA van FFPE materiaal waarbij al een optimale temperatuur van 53,2°C werd bepaald in vorig experiment, wordt er voor verdere experimenten gekozen voor 53,2°C (in praktijk 53°C) als annealing/elongatie temperatuur. Het optreden van de aspecifieke band bij de negatieve druppels in het HEX kanaal, treedt zowel bij het Horizon staal als bij het FFPE staal. Dit verschijnsel is dus onafhankelijk van het materiaalsoort en eerder eigen aan de test.

Net zoals in het vorig experiment heeft de aanwezigheid van een RE (MseI) geen beter effect op de scheiding noch op de aanwezigheid van regen, daarom wordt er besloten om verder te werken zonder RE.

Aangezien er bij dit Horizon staal opvallend minder regen aanwezig is dan bij het FFPE staal, wordt er vanuit gegaan dat de regen in het vorig experiment te wijten is aan het FFPE-materiaal, waarbij ook het gebruik van een RE geen oplossing biedt. Mogelijks heeft de hoeveelheid DNA ook een rol in de hoeveelheid regen. Hierdoor wordt in het volgende experiment een DNA-gradiënt uitgevoerd op FFPE-materiaal.

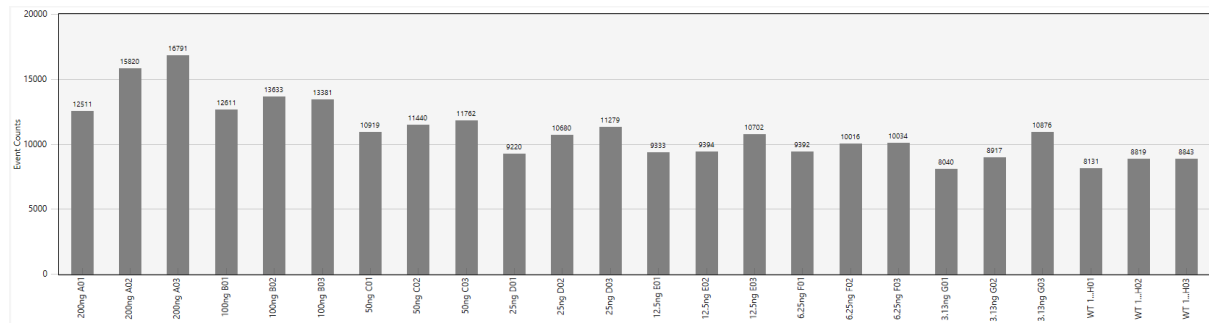
3.2.1.3. DNA-gradiënt op FFPE

3.2.1.3.1. Opzet

Er werd gebruik gemaakt van het mutant staal T23.1006 (KRAS G12C mutatie, 23% VAF via NGS) om een seriële verdunningsreeks te maken in nuclease-vrij water. Voor volgende DNA-gradiënt werd in triplo de ddPCR uitgevoerd zonder RE en met 53°C als annealing/elongatie temperatuur: 200ng/reactie (rij A); 100ng/reactie (rij B); 50ng/reactie (rij C); 25ng/reactie (rij D); 12,5ng/reactie (rij E); 6,25ng/reactie (rij F); 3,13ng/reactie (rij G). Daarnaast werd er in rij H ook het wildtype staal T23.1325 gepipetteerd met een concentratie van 100ng/reactie, om te zien of er mogelijks vals-positieve druppels ontstaan zijn omwille van FFPE-artefacten.

3.2.1.3.2. Resultaten en bespreking

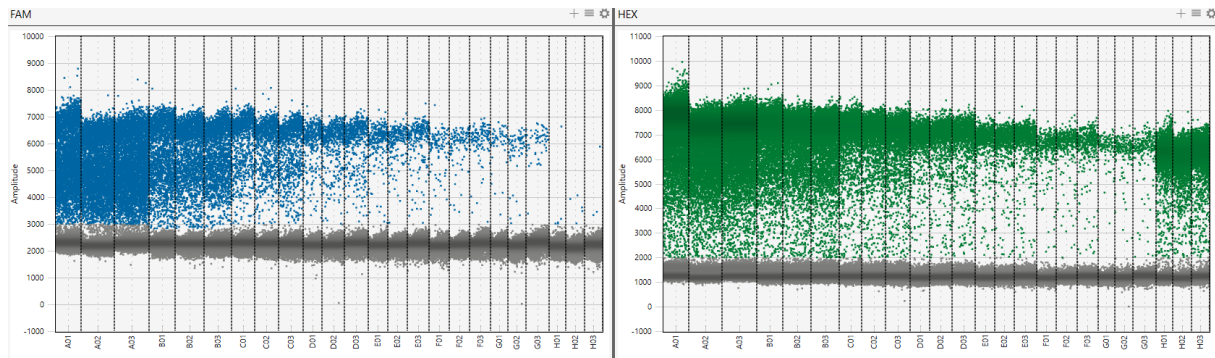
Het aantal acceptabele druppels per well is niet in elke well boven de grens van 10 000 acceptabele druppels, zie figuur 24. Wells D01, E01, E02 en F01 liggen nipt onder de grens van 10 000 acceptabele druppels. Wells G01, G02, H01, H02 en H03 liggen iets meer onder de grens, op deze wells kunnen geen betrouwbare analyses uitgevoerd worden.



Figuur 24. Aantal acceptabele druppels DNA gradiënt op FFPE.

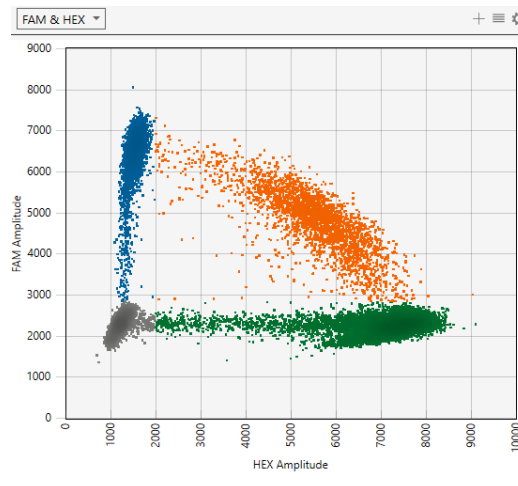
Figuur 25 toont aan dat de wells met hogere DNA-input (200ng/reactie tot en met 50ng/reactie), een hogere FAM en HEX fluorescentie amplitude bevatten dan de wells met lagere DNA-input (25ng/reactie tot en met 3,13ng/reactie). De fluorescentie amplitude ligt bij FAM tot 7000 en bij HEX tot 8000. Bij de wells met lagere DNA-input ligt de fluorescentie amplitude bij FAM tot 6500 en bij HEX tot 7000. De variatie in fluorescentie amplitude is beperkter dan in vorige experimenten waar de temperatuursgradiënt een rol speelde terwijl in dit experiment de DNA-gradiënt een rol speelt; hoe lager de DNA-input, hoe minder positieve druppels. Hoewel de scheidingstrend tussen positieve en negatieve druppels in beide kanalen minimaal kleiner wordt naarmate de DNA-input daalt, neemt de hoeveelheid regen wel af.

De wells waar het wildtype staal gepipetteerd werd (rij H) bevatten respectievelijk 5, 5 en 3 positieve druppels. Hierbij bedraagt het gemiddelde 4,3 positieve druppels en met een standaarddeviatie van 1,2.

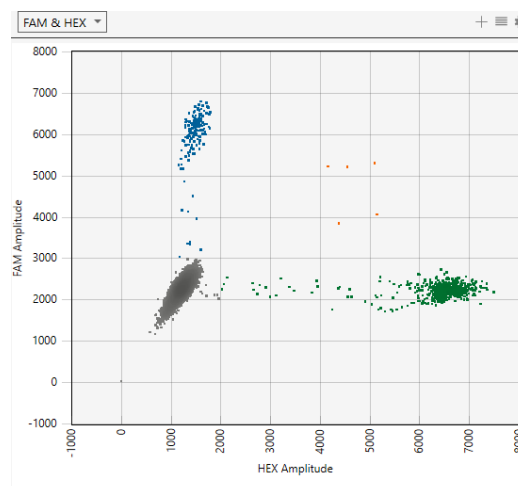


Figuur 25. FAM en HEX grafiek DNA gradiënt op FFPE.

Voor een duidelijkere visuele weergave van de scheiding, wordt er op figuur 26 en figuur 27 de 2-D plot van de wells met een DNA-input van 100ng/reactie en 3,13ng/reactie weergegeven. Hier is duidelijk veel regen en positieve druppels zichtbaar bij een DNA-input van 100ng/reactie en veel minder bij een DNA-input van 3,13ng/reactie.

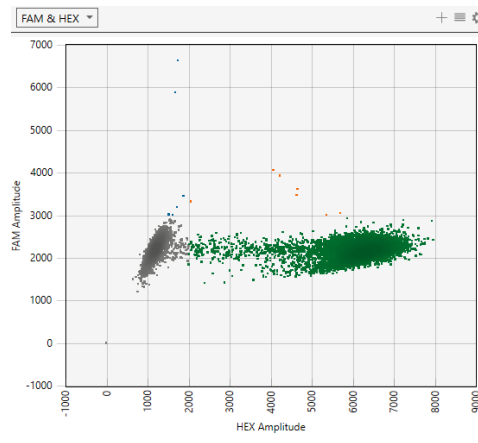


Figuur 26. 2-D plot 100ng/reactie.



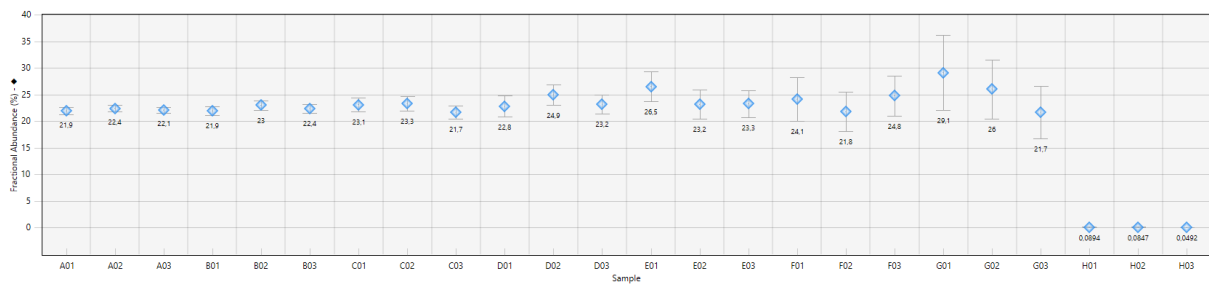
Figuur 27. 2-D plot 3,13ng/reactie.

Op figuur 28 wordt er de 2-D plot van het wildtype staal weergegeven. Hierdoor zijn de positieve druppels duidelijker zichtbaar (blauwe en oranje druppels). Daarnaast is ook hier te zien dat bij een DNA-input van 100ng/reactie veel regen aanwezig is.



Figuur 28. 2-D plot wildtype T23.1325.

De fractionele abundantie ligt in de buurt van 23% VAF bij elke DNA-input van de DNA-gradiënt, maar naarmate de DNA-input daalt, wordt de fout wel groter zoals te zien op figuur 29. Dit heeft vermoedelijk ook te maken met het lager aantal acceptabele druppels waardoor deze kwantitatieve analyses niet betrouwbaar zijn. Daarnaast ligt de VAF bij het wildtype staal (rij H) zeer laag, gemiddeld bedraagt de VAF 0,07% met een standaarddeviatie van 0,02. De wells bevatten in rij H te weinig acceptabele druppels, waardoor ook hier de kwantitatieve analyses niet betrouwbaar zijn.



Figuur 29. Fractionele abundantie DNA gradiënt op FFPE.

3.2.1.3.3. Conclusie

Uit de experimenten kan afgeleid worden dat er een beter resultaat bekomen wordt bij een lagere DNA-input, dan bij een hogere DNA-input. Dit kan besloten worden vermits er veel minder regen aanwezig is bij een lagere DNA-input, waardoor makkelijker thresholds kunnen gelegd worden tussen de clusters. Gezien het verlagen van de DNA-input een positief effect heeft op de regen, zal in de routine eerder gestreefd worden naar een maximale input van 10-15ng per reactie/well (indien voldoende materiaal aanwezig).

Daarnaast werd in het wildtype staal bij een hoge DNA-input van 100ng een laag aantal vals-positieve druppels bekomen. Een mogelijke verklaring hiervoor is contaminatie afkomstig van het mutant staal in de naburige wells (kruiscontaminatie). Een andere mogelijke verklaring is de aard van het materiaal. FFPE-materiaal ondervindt door fixatie deaminatie van cytosine waarbij uracil ontstaat zodat C>T-artefacten ontstaan bij het uitvoeren van de PCR reactie. Hierdoor wordt in het volgende experiment enerzijds getest op de gevoeligheid voor kruiscontaminatie met behulp van no-template controles (NTC's) en anderzijds getest wat de artefacten achtergrond van wildtype FFPE stalen (blanco stalen) is.

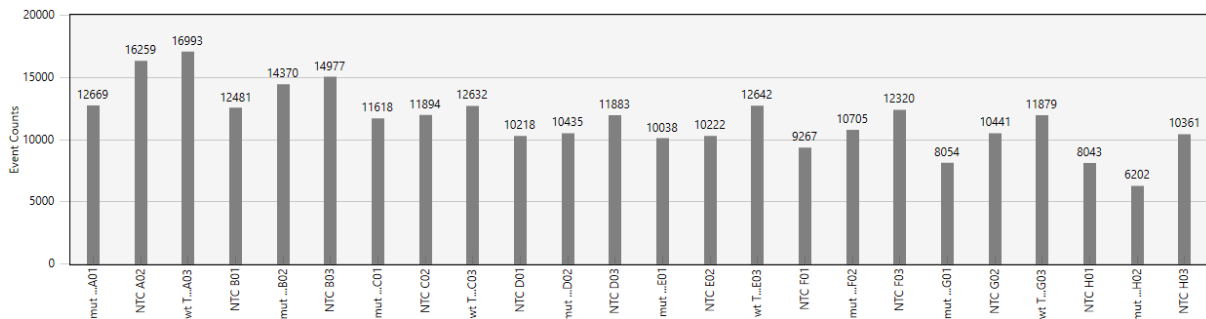
3.2.1.4. Gevoeligheid voor Kruiscontaminatie en blanco stalen

3.2.1.4.1. Opzet

Er werd gebruik gemaakt van 4 mutant stalen in duplo (nl. T23.1143 (KRAS G12A mutatie, 39% VAF via NGS), T23.1268 (KRAS G12A mutatie, 35% VAF via NGS), T23.1297 (KRAS G12A mutatie, 19% VAF via NGS) en T24.0021 (KRAS G12A mutatie, 17% VAF via NGS)) en 2 wildtype stalen (nl. T23.1089 en T23.1220) om de gevoeligheid voor kruiscontaminatie en de blanco stalen te testen. De mutante stalen worden (in kolom 1 en 2) alternerend afgewisseld met NTC's, waarbij er geen DNA gebruikt werd maar nuclease-vrij water. In kolom 3 werden de wildtype stalen in duplo alternerend met NTC's gepipetteerd. De DNA-input wordt redelijk hoog genomen nl. 50ng/well.

3.2.1.4.2. Resultaten en bespreking

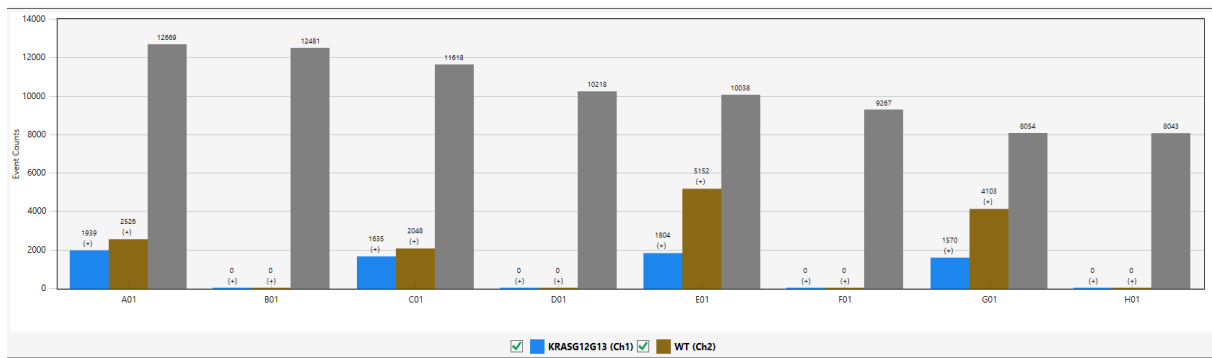
Het minimum aantal acceptabele druppels van 10 000 wordt niet in elke well gehaald, zoals weergegeven op figuur 30. Het aantal acceptabele druppels in well F01 ligt net onder 10 000. In wells G01, H01 en H02 liggen het aantal acceptabele druppels meer onder de grens van 10 000. Hierdoor kunnen op deze wells geen betrouwbare analyses uitgevoerd worden.



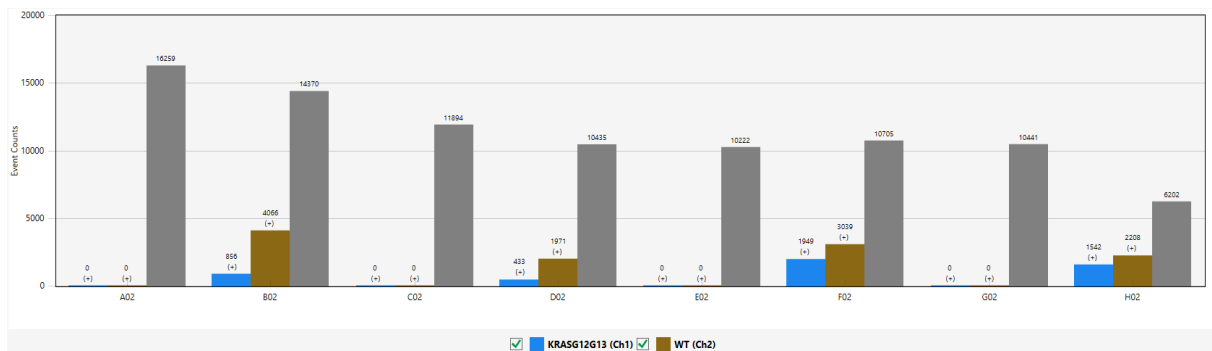
Figuur 30. Aantal acceptabele druppels gevoeligheid voor kruiscontaminatie op FFPE.

Figuur 31, figuur 32 en figuur 33 geven het aantal positieve druppels per well weer. In dit experiment zijn er 12 NTC-condities getest in een dambordpatroon. Deze wells bevatten meestal nul een maximaal 3 positieve druppels. Enkel rekening houdend met de 10 aanvaardbare NTC wells (aantal acceptabele druppels) is dit gemiddeld 0,90 positieve druppels met een standaarddeviatie van 0,99. Een contaminatiegrens kan vastgelegd worden volgens het 'gemiddelde + 2x standaarddeviatie' zodat 3 positieve druppels bekomen wordt. Deze bekomen NTC-waarde komt overeen met de doorgaans aanvaarde regel van minimum 4 druppels om de well positief te beschouwen.

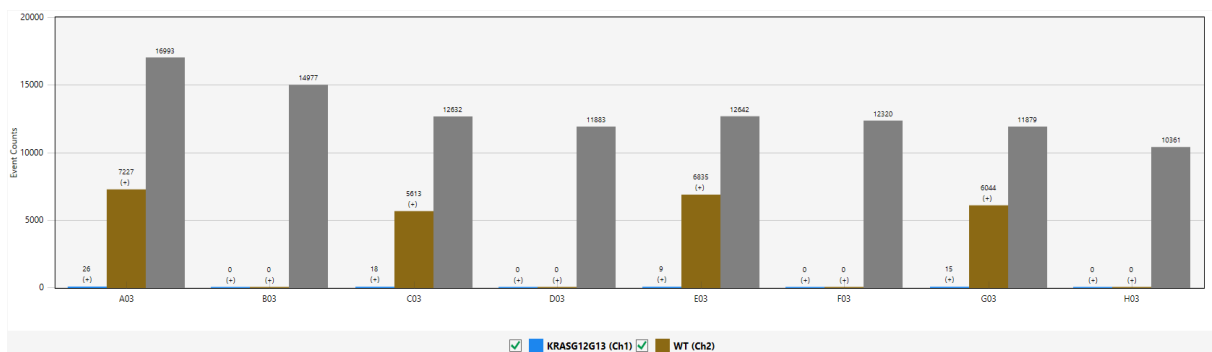
Gemiddeld worden er 9,5 druppels positief beschouwd voor een KRAS mutatie bij het wildtype staal T23.1089, bij het wildtypestaal T23.1220 zijn dit gemiddeld 23 positieve druppels. Bij beide wildtype stalen ligt het aantal positieve druppels boven de berekende contaminatiegrens van 3 positieve druppels met een maximum van 27 positieve druppels.



Figuur 31. Aantal positieve druppels per well van kolom 1.



Figuur 32. Aantal positieve druppels per well van kolom 2.



Figuur 33. Aantal positieve druppels per well van kolom 3.

De fractionele abundanties van de duplo's gemuteerde stalen ligt steeds in lijn van de verwachting op basis van de VAF, bekomen met de NGS-analyse. De gemiddelde fractionele abundantie voor mutant staal T23.1143 bedraagt 43,05% VAF, voor mutant staal T23.1268 bedraagt deze 37,65% VAF, voor mutant staal T23.1297 bedraagt deze 21,8% VAF en voor mutant staal T24.0021 bedraagt deze 16,25% VAF.

Alle blanco wells met wildtype staal hebben aanvaardbare druppel aantallen waarbij de fractionele abundantie voor het wildtype staal T23.1089 0,09% en 0,10%, terwijl deze voor het wildtype staal T23.1220 0,28% en 0,25% bedraagt.

3.2.1.4.3. Conclusie

Zowel de NTC's als de beide wildtype stalen bevatten positieve druppels. Een lichte kruiscontaminatie wordt vastgesteld met 3 positieve druppels als bovengrens. Er is geen consensus omtrent het aantal positieve druppels die nodig zijn om een reactie als positief aan te zien, maar doorgaans worden minimum 4 druppels genomen voor positiviteit. De bekomen bovengrens van 3 positieve druppels is

dus aanvaardbaar. Zo een lage contaminatie zal dus niet de analyse van andere stalen beïnvloeden maar een NTC controle dient standaard wel meegenomen te worden om hogere contaminatie uit te sluiten.

Maar deze waarde ligt lager dan de vals positiviteit van blanco stalen. Een mogelijke verklaring is het FFPE-materiaal dat gebruikt wordt, waar zoals eerder beschreven een deaminatie van nucleotiden plaatsvindt. De 'limit of blanc' (LOB) is het hoogst aantal positieve druppels of fractionele abundantie die teruggevonden wordt bij meerdere metingen van een blanco (wildtype staal). Dit experiment toont aan dat hiervoor variabele waarden bekomen kunnen worden (hier maximaal 27 positieve druppels en 0,3% fractionele abundantie bij 50ng DNA-input), afhankelijk van het staal en mogelijks ook afhankelijk van de DNA-input. Daarom wordt er in het volgend experiment een test uitgevoerd met UDG, om de vaak voorkomende cytosine deaminatie trachten om te keren.

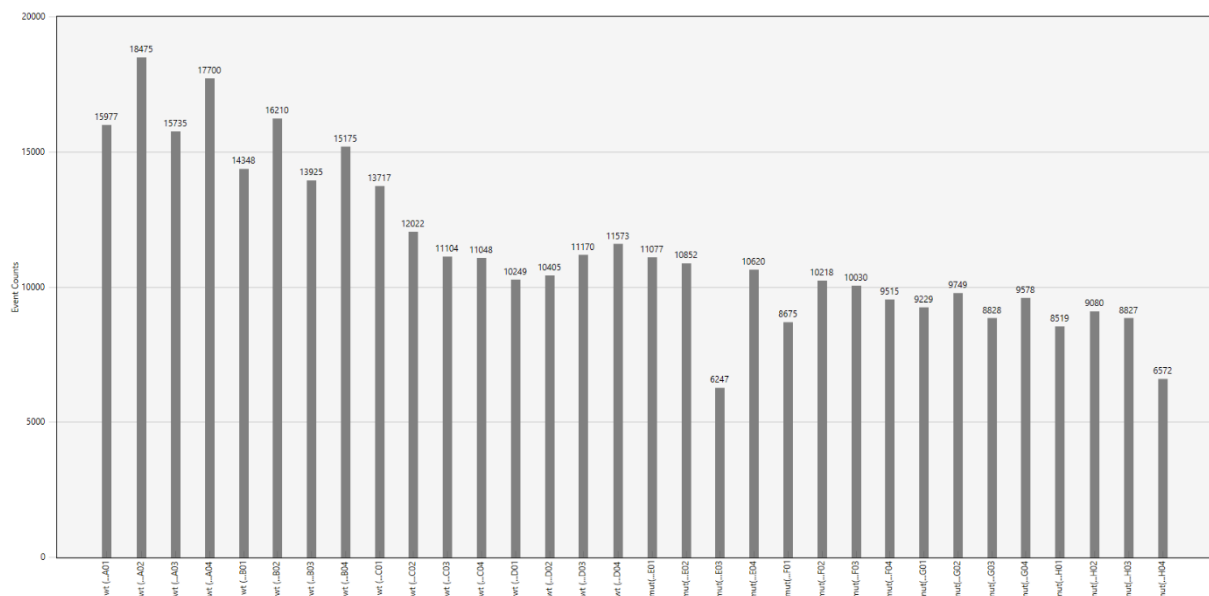
3.2.1.5. UDG

3.2.1.5.1. Opzet

In het protocol van Bio-Rad wordt de mogelijkheid beschreven om UDG toe te voegen aan de PCR-reactie (2-5U/reactie). In dit experiment wordt UDG (3,5U/reactie) aan de PCR-mix toegevoegd, deze zou de deaminatie van cytosine moeten omkeren. Er wordt gebruik gemaakt van 2 mutante stalen (nl. T23.1006 en T23.1143) en van 2 wildtype stalen (nl. T23.1220 en T23.1325). Elke staal wordt getest met een DNA-input van 50ng/reactie en een DNA-input van 10ng/reactie. In kolom 1 en 2 werden de stalen getest met UDG, in kolom 3 en 4 zonder UDG.

3.2.1.5.2. Resultaten en bespreking

Zoals weergegeven op figuur 34 ligt in wells E03, F01, G03, H01, H03 en H04 het aantal acceptabele druppels onder de grens van 10 000, in wells F04, G01, G02, G04 en H02 ligt dit net onder de grens. Enkel op de mutante wells met minder dan 10 000 positieve druppels, kunnen geen betrouwbare analyses uitgevoerd worden. In vergelijking met vorige experimenten begint dit een trend te worden en moet er een oplossing gezocht worden.



Figuur 34. Aantal acceptabele druppels UDG-experiment 1.

Tabel 4 geeft het aantal positieve druppels van elk wildtype staal weer, zowel voor een DNA-input van 50ng/reactie als voor een DNA-input van 10ng/reactie. Het wildtype staal T23.1220 vertoont zowel bij

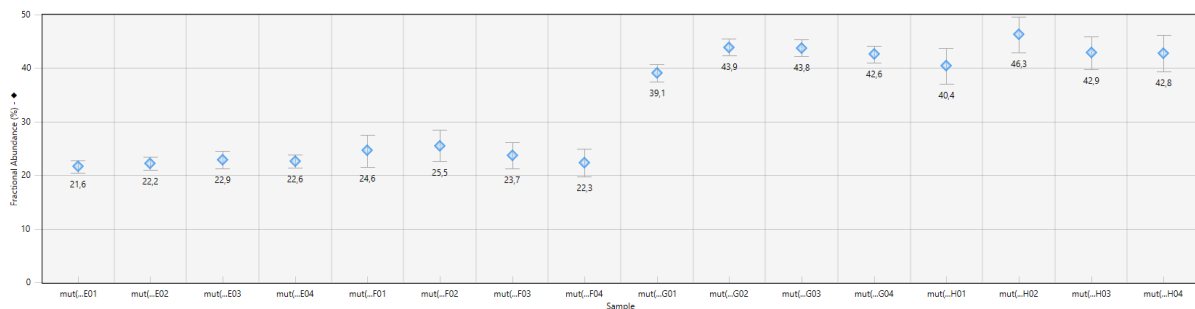
50ng als 10ng DNA-input de trend van een lager aantal positieve druppels wanneer UDG in de PCR mix wordt toegediend. Het aantal positieven druppels met UDG ligt nog steeds boven de bovenste contaminatiegrens. Maar het andere wildtypestaal T23.1325 vertoont bij 50ng DNA-input een stijging in het aantal positieve druppels bij de UDG toevoeging terwijl het status quo blijft bij 10ng DNA-input. Het aantal positieve druppels in de blanco stalen is in lijn met de DNA-input.

Tabel 4. Aantal positieve druppels in wildtype stalen T23.1220 en T23.1325 met en zonder UDG.

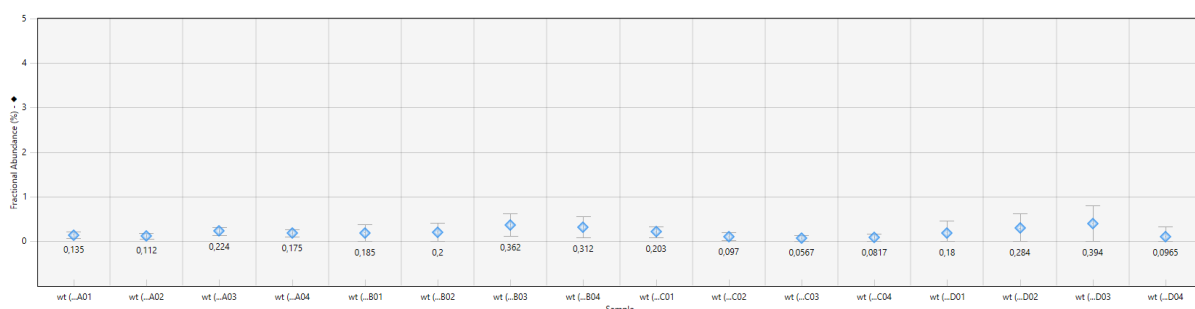
Staal	DNA-input (ng/reactie)	Gemiddeld #positieve druppels met UDG	Gemiddeld #positieve druppels zonder UDG
T23.1220	50	14	22
	10	4	7,5
T23.1325	50	8,5	3,5
	10	2,5	2,5

Zoals te zien op figuur 35 ligt bij beide mutante stalen zowel met UDG als zonder UDG, de fractionele abundantie in de buurt van de VAF dat bekomen werd via NGS (ondanks net te weinig aanvaardbare druppels). Voor staal T23.1006 (50ng/reactie DNA-input) met UDG is de VAF gemiddeld 21,90%, zonder UDG is dit gemiddeld 22,75%. Bij 10ng/reactie is de VAF gemiddeld 25,05% met UDG en 23% zonder UDG. Voor staal T23.1143 (50ng/reactie) ligt de VAF gemiddeld 41,5% met UDG en 43,2% zonder UDG. Bij een DNA-input van 10ng/reactie is de VAF gemiddeld 43,35% met UDG en 42,85% zonder UDG.

Figuur 36 toont de fractionele abundantie van de wildtype stalen met en zonder UDG bij een DNA-input van 50ng/reactie en 10ng/reactie, deze liggen allemaal redelijk laag. Voor staal T23.1220 (50ng/reactie) bedraagt de gemiddelde VAF 0,12% met UDG en 0,2% zonder UDG. Met een DNA-input van 10ng/reactie bedraagt de gemiddelde VAF 0,19% met UDG en 0,34% zonder UDG. Daarnaast bedraagt de gemiddelde VAF, voor staal T23.1325 (50ng/reactie), 0,15% met UDG en 0,07% zonder UDG. Bij een DNA-input van 10ng/reactie bedraagt deze 0,23% met UDG en 0,24% zonder UDG.



Figuur 35. Fractionele abundantie mutante stalen UDG-experiment 1.



Figuur 36. Fractionele abundantie wildtype stalen UDG-experiment 1.

3.2.1.5.3. Conclusie

Er treedt een trend op, over de verschillende experimenten heen, waarbij de laatste rijen steeds onder het minimum van 10 000 acceptabele druppels zit. Om dit probleem proberen op te lossen, wordt er in volgend experiment de 96-well plaat grondig gevortexd (15") voor dat deze in de droplet generator geplaatst wordt. Daarnaast worden de reagentia uit de kit ook 30 minuten voor gebruik op kamertemperatuur gebracht en worden deze ook zeer goed gevortexd (30").

Het aantal positieve druppels bij de blanco stalen is staalafhankelijk en ook gecorreleerd met de DNA-input.

Er is niet echt een reproduceerbaar positief effect van UDG bekomen op het aantal positieve druppels in de blanco. Daarnaast heeft UDG ook geen positief effect op de hoeveelheid regen, noch op de aanwezigheid van de specifieke band bij de negatieve druppels in het HEX-kanaal (data niet getoond).

Mogelijks zien we geen effect van UDG omdat UDG bij een temperatuur van 37°C optimaal werkt en voor 95% geïnactiveerd wordt bij een temperatuur van 95°C. Hierdoor wordt er in volgend experiment de werking van UDG in de PCR-mix getest, waarbij er voor de PCR cyclus eerst een incubatiestap plaatsvindt van 30 minuten op 37°C.

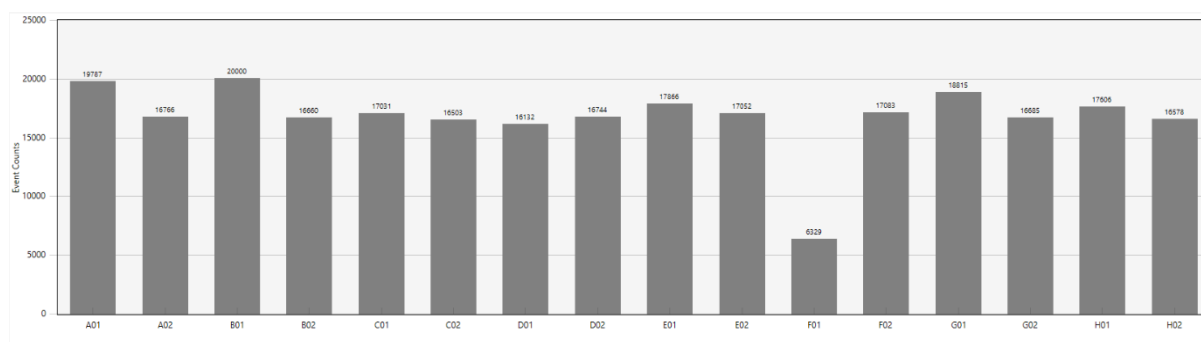
3.2.1.6. UDG met pre-PCR incubatiestap

3.2.1.6.1. Opzet

In dit experiment wordt, net zoals in vorig experiment, UDG aan de PCR-mix toegevoegd. Er wordt gebruik gemaakt van 2 mutante stalen (nl. T23.1006 en T23.1143) en van 2 wildtype stalen (nl. T23.1220 en T23.1325). Elke staal wordt getest met een DNA-input van 20ng/reactie. In kolom 1 werden de stalen getest met UDG, in kolom 2 werden deze getest zonder UDG. Daarnaast werd er voor de eigenlijke PCR-cyclus een incubatiestap toegevoegd, namelijk 30 minuten op 37°C. Dit is de optimale temperatuur waarbij UDG in werking treedt.

3.2.1.6.2. Resultaten en bespreking

Zoals te zien op figuur 37 wordt er in elke well bijna 20 000 acceptabele druppels behaald behalve in well B01 en well F01. Bij well F01 ligt het aantal acceptabele druppels onder de minimale grens van 10 000 acceptabele druppels. Opmerkelijk is dat well B01 het maximale aantal acceptabele druppels bevat van 20 000 druppels. Hieruit kan er afgeleid worden dat de maatregelen die genomen zijn (reeds besproken in vorig experiment), geholpen hebben.



Figuur 37. Aantal acceptabele druppels UDG-experiment 2.

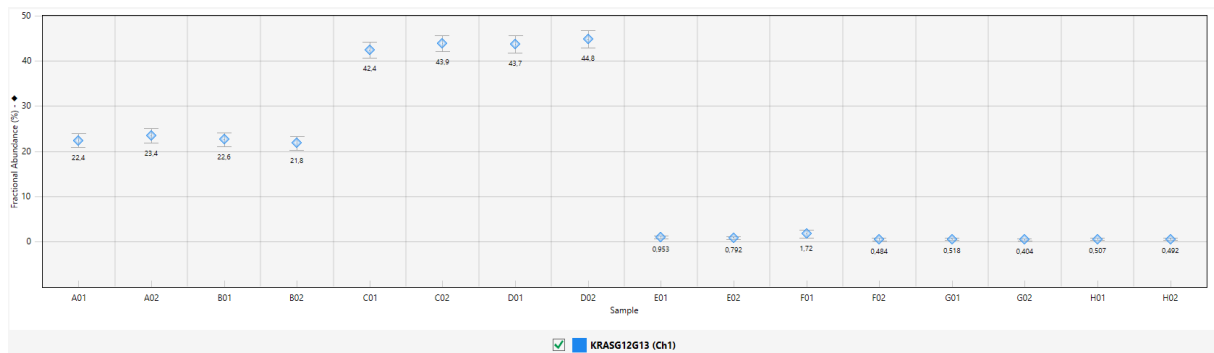
Tabel 5 geeft het aantal positieve druppels van de wildtype stalen weer. Hier geldt hetzelfde als bij het vorig experiment: bij het wildtype staal T23.1220 is het aantal positieve druppels lager met UDG dan zonder UDG, bij het wildtype staal T23.1325 is dit het omgekeerde.

Tabel 5. Aantal positieve druppels wildtype stalen T23.1220 en T23.1325 UDG-experiment 2.

Staal	Gemiddeld #positieve druppels met UDG	Gemiddeld #positieve druppels zonder UDG
T23.1220	4,5	7,0
T23.1325	7,0	6,0

Ook in dit experiment is er niet echt een reproduceerbaar positief effect van UDG bekomen op het aantal positieve druppels in de blanco. Daarnaast heeft UDG ook geen positief effect op de hoeveelheid regen, noch op de aanwezigheid van de aspecifieke band bij de negatieve druppels in het HEX-kanaal (data niet getoond).

De fractionele abundantie van beide mutante stalen (zowel met als zonder UDG) liggen in de buurt van de VAF die eerder bepaald werd via NGS. Voor het mutant staal T23.1006 met UDG bedraagt de VAF gemiddeld 22,4%, zonder UDG bedraagt deze 22,6%. Bij het mutant staal T23.1143 met UDG bedraagt de gemiddelde VAF 43,05% en zonder UDG 44,55%. Daarnaast liggen de VAF's redelijk laag bij de wildtype stalen (zowel met als zonder UDG). Dit wordt weergegeven op figuur 38.



Figuur 38. Fractionele abundantie UDG-experiment 2.

3.2.1.6.3. Conclusie

Het op kamertemperatuur brengen van de kit en het vortexen van de reagentia en van de plaat voor deze in de droplet generator te plaatsen, heeft (op 1 uitzondering na) geholpen om meer acceptabele druppels te bekomen.

Ook in dit experiment is er niet echt een reproduceerbaar positief effect van UDG bekomen op het aantal positieve druppels in de blanco stalen. Daarnaast heeft UDG ook geen positief effect op de hoeveelheid regen, noch op de aanwezigheid van de aspecifieke band bij de negatieve druppels in het HEX-kanaal (data niet getoond).

Daarnaast heeft de pre-PCR stap met UDG, niet geholpen om het aantal positieve druppels in de wildtype stalen te verminderen. Er wordt in volgend experiment nog een extra poging gedaan door het DNA een UDG-voorbehandeling te geven. Hierbij wordt UDG samen geïncubeerd met het DNA, vooraleer deze aan de 96-well plaat wordt toegevoegd en dus voor dat deze in de droplet generator geplaatst wordt.

3.2.1.7. UDG-DNA incubatie voor compartimentalisatie

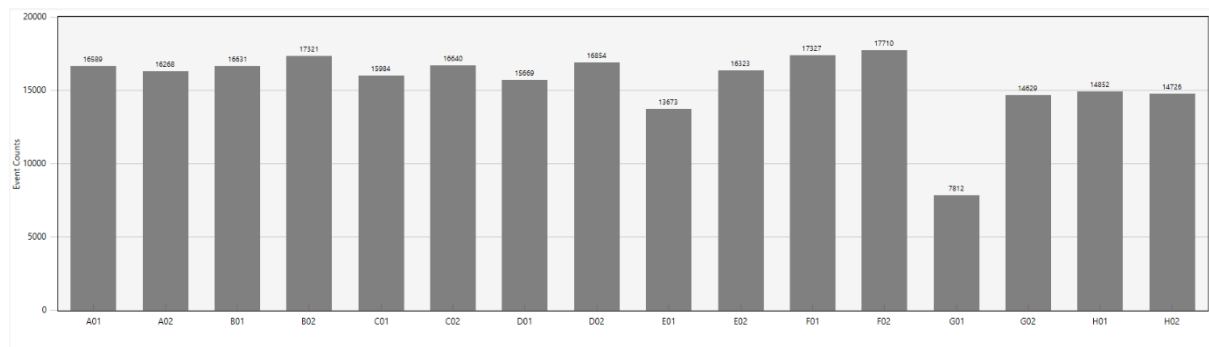
3.2.1.7.1. Opzet

In dit experiment werd geen UDG aan de PCR-mix toegevoegd. Eerst werd er voor elk staal een mix gemaakt met UDG, DNA (staal), UDG-buffer en nuclease-vrij water (1U UDG/30ng DNA). Er wordt gebruik gemaakt van 2 mutante stalen (nl. T23.1006 en T23.1143) en van 2 wildtype stalen (nl.

T23.1220 en T23.1325). Vervolgens ondergingen deze 4 mixen een incubatie van 30 minuten op 37°C. De DNA-input van elk staal voor de ddPCR reactie bedraagt 15ng/reactie. In kolom 1 werd aan de PCR mix, de geïncubeerde UDG-DNA reactie toegevoegd. In kolom 2 werd onbehandeld DNA aan de PCR-mix toegevoegd.

3.2.1.7.2. Resultaten en bespreking

Het aantal acceptabele druppels ligt, zoals weergegeven op figuur 39, bij de meeste wells ver boven de minimale grens van 10 000 acceptabele druppels, enkel in well G01 ligt dit onder de grens. Hierdoor kunnen er geen betrouwbare analyses worden uitgevoerd op well G01.



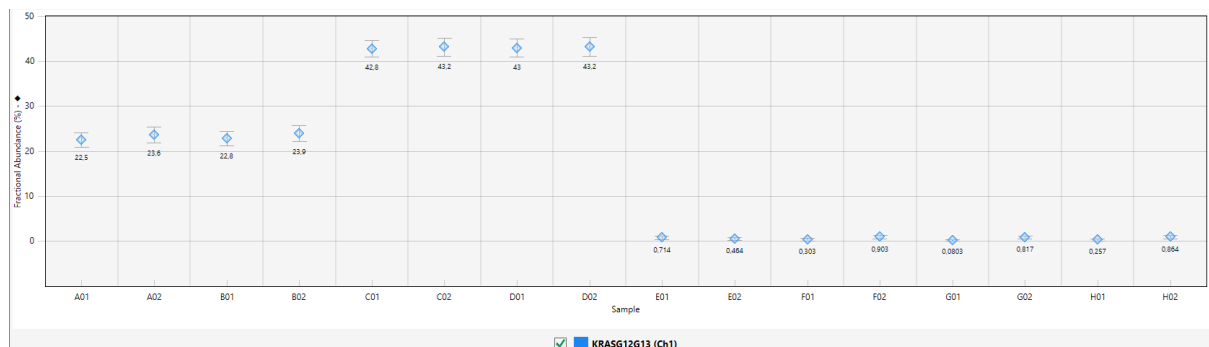
Figuur 39. Aantal acceptabele druppels UDG-experiment 3.

Tabel 6 geeft het gemiddeld aantal positieve druppels weer van de wildtype stalen, zowel met voorafgaande UDG behandeling, als zonder UDG behandeling.

Tabel 6. Aantal positieve druppels wildtype stalen T23.1220 en T23.1325 UDG-experiment 3.

Staal	Gemiddeld #positieve druppels met UDG	Gemiddeld #positieve druppels zonder UDG
T23.1220	2,5	4
T23.1325	2	2

De fractionele abundantie van de mutante stalen ligt dicht bij de VAF dat eerder bepaald werd bij NGS, dit is te zien op figuur 40. Gemiddeld is de VAF voor staal T23.1006 met UDG 22,65%. Voor hetzelfde staal zonder UDG bedraagt de VAF 23,75%. Voor staal T23.1143 bedraagt de gemiddelde VAF 42,9%, zonder UDG bedraagt deze 43,2%. Daarnaast liggen de VAF's redelijk laag bij de wildtype stalen (zowel met als zonder UDG).



Figuur 40. Fractionele abundantie UDG-experiment 3.

3.2.1.7.3. Conclusie

Ook in dit experiment is er geen reproduceerbare verbetering zichtbaar in het aantal positieve druppels wanneer het DNA een UDG-voorbehandeling krijgt. Wel zien we een opvallend lager aantal vals-positieve druppels in de wildtype stalen door een lager DNA-input. Hierdoor wordt er besloten om geen UDG te gebruiken.

3.2.1.8. Algemene conclusie optimalisatie

Tijdens de optimalisatie experimenten is het probleem omtrent de vals positiviteit van de blanco stalen niet opgelost. Om deze reden wordt de optimalisatie van de test afgerond. De optimale condities zijn: een annealings/elongatie temperatuur van 53°C, geen RE en geen UDG.

De enige beperking van de test is dus een LOB waarde waarmee rekening moet gehouden worden bij de kwantificatie. De LOB waarde wordt hieronder verder uitgewerkt en zal verder bepalend zijn voor de bepaling van de kwantificatielimiet (LOQ) in het validatie gedeelte.

Tijdens de optimalisatie experimenten werden drie blanco stalen (met acceptabele hoeveelheid druppels en in geoptimaliseerde condities) herhaaldelijk getest over 4 experimenten aan verschillende DNA-inputs (50ng/reactie, 20ng/reactie, 15ng/reactie en 10ng/reactie). De resultaten hiervan worden weergegeven in tabel 7.

Tabel 7. Positieve druppels en fractionele abundantie van de blanco stalen in optimalisatie experimenten.

DNA-input (ng)	Positieve druppels (aantal)						Fractionele abundantie (VAF%)					
	wt T23.1220*		wt T23.1325		wt T23.1089		wt T23.1220		wt T23.1325		wt T23.1089	
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
50,00	22,5	3,7	3,5	0,71	9,5	0,71	0,23	0,05	0,07	0,05	0,1	0,02
20,00	7	2,83	6	1,41	/	/	0,31	0,15	0,19	0,04	/	/
15,00	13,5	6,36	20	0	/	/	0,68	0,31	0,84	0,03	/	/
10,00	7,5	0,71	2,5	2,12	/	/	0,34	0,04	0,24	0,21	/	/

*wt= wildtype

Binnen éénzelfde staal, aan éénzelfde DNA-input, treedt er al een zekere variatie op in de fractionele abundantie. In de literatuur wordt aangenomen dat de vals positiviteit stijgt bij een hogere DNA-input. In de kleine regio die hier getest werd (10-50ng DNA-input) wordt die correlatie niet waargenomen. Bovendien zijn de waarden bij een bepaalde DNA-input ook staal afhankelijk.

De maximale fractionele abundantie was bij T23.1325 (15ng) nl. 0,87% (0,84+/-0,03). Net zoals de contaminatiegrens vastgesteld werd volgens het principe 'gemiddelde +2x standaarddeviatie', betekent dit een maximale LOB waarde van 0,9% fractionele abundantie. Deze LOB waarde zal in acht genomen worden bij het bepalen van de LOQ waarden in de verdere validatie. Het blijft echter belangrijk om bij elke run blanco stalen mee te nemen aan redelijk hoge DNA-input.

3.2.2. Validatie

De procedure is geoptimaliseerd, er wordt een annealings/elongatie temperatuur van 53°C, geen RE, geen UDG en een LOB waarde van 0,9% fractionele abundantie gebruikt. Nu wordt deze procedure gevalideerd. Bij de validatie wordt de lineariteit, accuraatheid, specificiteit, sensitiviteit en precisie getest. Daarnaast wordt ook de limit of quantification (LOQ) bepaald.

3.2.2.1. Validatieparameters

3.2.2.1.1. Lineariteit en LOQ

3.2.2.1.1.1. Opzet

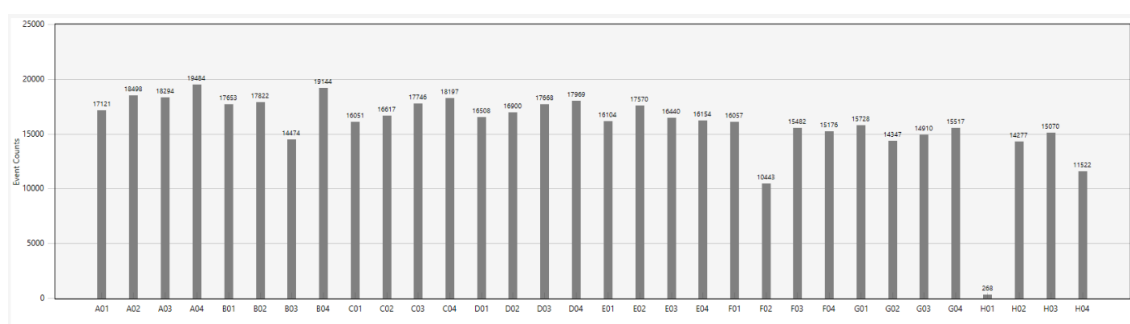
Er wordt een verdunningsreeks (100%-60%-40%-20%-10%-5%-2,5%-1%-0%) gemaakt van het mutant staal T23.1006 (KRAS G12C, 23% VAF via NGS) in het wildtype staal T23.1089. Deze wordt in triplo geanalyseerd met een DNA-input van 14ng/reactie. Ook worden er 4 wildtype stalen en 1 NTC meegenomen in deze run.

Nadien wordt deze test herhaald met een verdunningsreeks (100%-60%-40%-20%-10%-5%-2,5%-1%-0%) van het mutant staal T23.1226 (KRAS G12D, 32% VAF via NGS) in het wildtype staal T23.1001. Deze verdunningsreeks wordt ook in triplo geanalyseerd met een DNA-input van 14ng/reactie. Hierbij worden ook 3 wildtype stalen en 2 NTC's meegenomen.

Het doel van deze test is om de lineariteit, LOQ in relatie met LOB en de repeteerbaarheid (intra-run) te verifiëren. De test dient lineair te zijn tussen de gemeten en de verwachten fractionele abundantie nl. correlatiecoëfficiënt $R^2 > 0,9$. De maximaal toegelaten intra-run precisie is 1sd op de fractionele abundantie. Er wordt gestreefd naar een LOQ van 1% fractionele abundantie.

3.2.2.1.1.2. Resultaten en bespreking

Zoals weergegeven op figuur 41 wordt in elke well van de verdunningsreeks van staal T23.1006 in het wildtype staal T23.1089 de minimale hoeveelheid acceptabele druppels behaald, met uitzondering van well H01. Deze well bevat maar 268 acceptabele druppels, wat extreem laag is. Uit deze well kunnen geen betrouwbare analyses uitgevoerd worden. In onderstaande tabel (tabel 8) wordt de data van deze verdunningsreeks weergegeven.



Figuur 41. Aantal acceptabele druppels verdunningsreeks T23.1006 in wildtype T23.1089.

Tabel 8. Data verdunningsreeks T23.1006 in wildtype T23.1089 (G12C verdunningsreeks).

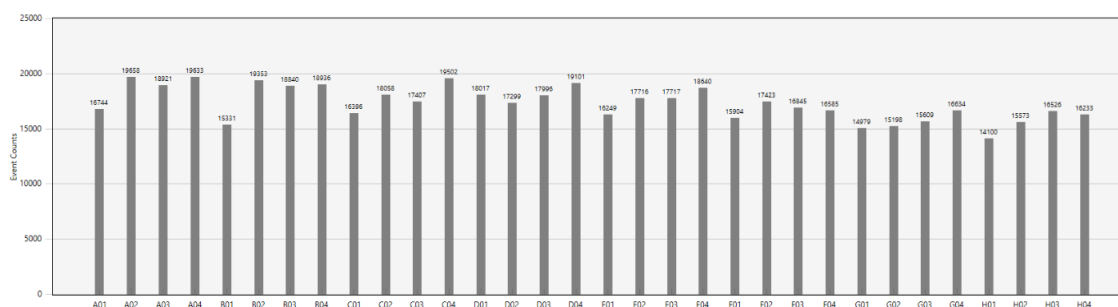
Hoeveelheid mutant staal	Verwachte fractionele abundantie via NGS (%VAF)	Gemiddelde bekomen fractionele abundantie via ddPCR (%VAF)	sd*	CV%**
100%	23,0	23,10	0,62	2,70
60%	13,8	9,96	0,84	8,43
40%	9,2	5,87	0,23	3,90
20%	4,6	2,73	0,32	11,85
10%	2,3	1,55	0,35	22,64
5%	1,2	0,65	0,02	2,55
2,5%	0,6	0,55	0,11	19,67
1%	0,2	0,34***	0,07	21,69
0%	0,0	0,20	0,07	34,20

*sd = standaarddeviatie

** CV% = variatiecoëfficiënt

*** Dit gemiddelde is berekend met maar slechts 2 meetwaarden, dit is dus niet betrouwbaar.

Bij de verdunningsreeks van staal T23.1226 in het wildtype T23.1001 wordt er in elke well de minimale hoeveelheid acceptabele druppels van 10 000 druppels behaald, zoals weergegeven op figuur 42. Op deze wells kunnen betrouwbare analyses uitgevoerd worden. In tabel 9 wordt de data van deze verdunningsreeks weergegeven.

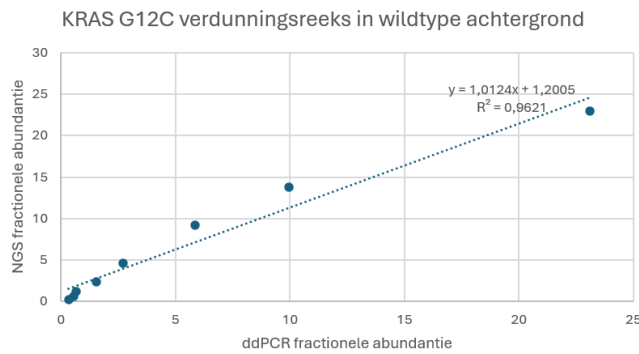


Figuur 42. Aantal acceptabele druppels verdunningsreeks T23.1226 in wildtype T23.1001.

Tabel 9. Data verdunningsreeks T23.1226 in wildtype T23.1001 (G12D verdunningsreeks).

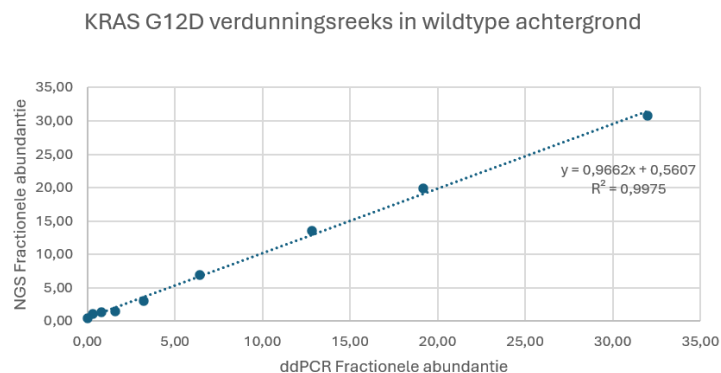
Hoeveelheid mutant staal	Verwachte fractionele abundantie via NGS (%VAF)	Gemiddelde bekomen fractionele abundantie via ddPCR (%VAF)	sd	CV%
100%	32,0	30,80	0,82	2,66
60%	19,2	19,90	1,65	8,30
40%	12,8	13,53	1,15	8,53
20%	6,4	6,97	0,68	9,76
10%	3,2	3,39	0,96	28,26
5%	1,6	1,53	0,38	25,04
2,5%	0,8	1,37	0,11	8,16
1%	0,3	1,13	0,33	29,13
0%	0,0	0,46	0,24	52,17

Op figuur 43 wordt van de eerste verdunningsreeks (staal T23.1006 in staal T23.1089) de fractionele abundantie dat bekomen werd via NGS uitgezet in functie van de gemiddelde fractionele abundantie dat bekomen werd via ddPCR. De rechte die bekomen wordt heeft een R^2 -waarde van 0,9621, dit betekent dat de lineariteit redelijk goed is.



Figuur 43. KRAS G12C verdunningsreeks in wildtype achtergrond lineariteit.

Figuur 44 geeft de bekomen fractionele abundantie via NGS in functie van de gemiddelde bekomen fractionele abundantie via ddPCR van de tweede verdunningsreeks (staal T23.1226 in staal T23.1001) weer. De rechte die bekomen wordt heeft een R^2 -waarde dat 0,9975 bedraagt. Dit betekent dat de lineariteit van deze verdunningsreeks ook goed is.



Figuur 44. KRAS G12D verdunningsreeks in wildtype achtergrond lineariteit.

3.2.2.1.1.3. Conclusie

Uit figuur 43 en 44 kan er geconcludeerd worden dat de R^2 -waarde en dus ook de lineariteit goed ligt voor beide reeksen. De R^2 -waarde ligt telkens hoger dan de vooropgestelde waarde dat 0,9 bedraagt. Daarnaast wordt er ook voldaan aan de vereiste van maximale sd <1sd (intra-run) op 2 uitzonderingen na in de G12D verdunningsreeks bij de gemiddelde fractionele abundantie van 19,90% en 13,53%. Een mogelijke reden hiervoor is dat de meetresultaten te verschillend van elkaar zijn.

De LOQ van de fractionele abundantie bij de G12C verdunningsreeks bedraagt 0,55% (boven 0,20+/- 0,07% VAF van de LOB conditie) en bij de G12D verdunningsreeks ligt deze bij 1,19% (boven 0,46+/- 0,24% VAF van de LOB conditie) aangezien geen lagere conditie getest is. De vereiste van 1% detectielimiet lijkt gehaald te zijn bij beide verdunningsreeksen en is mogelijks ook lager, maar in de routine is deze setup echter niet te bereiken en dient er rekening gehouden te worden met de algemene LOB waarde van 0,9% zodat besloten wordt dat de kwantitatieve detectielimiet bij 1% fractionele abundantie ligt. Alvorens de analyse in de routine geïmplementeerd zal worden, dient er nog met zekerheid bepaald te worden bij welk %VAF een resultaat positief is voor de mutatie en dus significant verschilt van de LOB. Hiervoor zal een uitgebreidere statistische analyse uitgevoerd worden waarbij wordt verwezen naar Holstein et al. (2015).

3.2.2.1.2. Precisie

De precisie is de mate van spreiding in de meetresultaten die verkregen worden door de meting een aantal keer te herhalen met dezelfde methode, op hetzelfde staal en onder vastgelegde condities. Als er een grote spreiding vastgesteld wordt, dan is de methode weinig precies en dus niet betrouwbaar. Om dit te bepalen wordt de toevallige fout berekend, deze wordt uitgedrukt door de standaarddeviatie (sd) of door de relatieve standaarddeviatie (RSD). Ook kan deze procentueel uitgedrukt worden, dan wordt dit de variatiecoëfficiënt (CV%) genoemd. Om de RSD te berekenen wordt de standaarddeviatie gedeeld door het gemiddelde. Om de CV% te berekenen wordt de RSD 100 keer vermenigvuldigt.

De precisie kan onderverdeeld worden in verschillende types nl. instrument precisie, repeteerbaarheid, intermediaire precisie, reproduceerbaarheid en robuustheid. In deze bachelorproef wordt enkel de repeteerbaarheid, intermediaire precisie en de robuustheid getest.

3.2.2.1.2.1. Repeteerbaarheid (intra-run)

De repeteerbaarheid is de precisie wanneer herhaalde metingen worden uitgevoerd op aliquots van eenzelfde staal in (zoveel mogelijk) identieke omstandigheden (zelfde toestel, zelfde analist,...) en over een kort tijdsinterval. De repeteerbaarheid moet voldoen aan één vereiste om betrouwbaar te zijn nl. de standaarddeviatie moet kleiner zijn dan 1.

De repeteerbaarheid voor deze methode wordt bepaald bij 4 verschillende DNA-inputs van staal T23.1006 nl. 200ng/reactie, 100ng/reactie, 50ng/reactie en 10ng/reactie, deze worden elk in triplo getest. Daarnaast wordt de repeteerbaarheid ook bepaald aan de hand van de triplo's die bekomen werden in de verdunningsreeksen, die reeds besproken werden (3.2.2.1.1. Lineariteit/LOQ). Hiervan wordt de gemiddelde VAF, de standaarddeviatie, de RSD en de CV% berekend en weergegeven in tabel 10.

Tabel 10. Repeteerbaarheid.

DNA-input (ng/reactie)	Gemiddelde VAF (%)	standaarddeviatie	RSD	CV% (%)
200*	22,13	0,25	0,01	1,14
100*	22,43	0,55	0,02	2,46
50*	22,70	0,87	0,04	3,84
10*	22,87	0,74	0,03	3,22
126**	30,80	0,82	0,03	2,66
75,6	19,90	1,65	0,08	8,30
50,4	13,53	1,15	0,09	8,53
25,2	6,97	0,68	0,10	9,76
12,6	3,39	0,96	0,28	28,26
6,3	1,53	0,38	0,25	25,04
3,2	1,37	0,11	0,08	8,16
1,3	1,13	0,33	0,29	29,13
126	23,10	0,62	0,03	2,70
75,6	9,96	0,84	0,08	8,43
50,4	5,87	0,23	0,04	3,90
25,2	2,73	0,32	0,12	11,85
12,6	1,55	0,35	0,23	22,64
6,3	0,65	0,02	0,03	2,55
3,2	0,55	0,11	0,20	19,67
1,3	0,3	0,07	0,22	21,69

*Afkomstig van staal T23.1006

***Vanaf hier afkomstig van de 2 verdunningsreeksen*

Zoals weergegeven in tabel 10 voldoen alle 4 de DNA-inputs van staal T23.1006 aan de vooropgestelde vereiste, hieruit kan afgeleid worden dat de methode een goede repeteerbaarheid bevat.

Uit tabel 10 kan ook afgeleid worden dat de verdunningsreeksen aan de vooropgestelde vereiste voldoen, op 2 uitzonderingen na. Deze 2 uitzonderingen komen mogelijks door problemen bij het pipetteren. Hieruit kan afgeleid worden dat bij een lagere DNA-input de methode in het algemeen een goede repeteerbaarheid bevat.

3.2.2.1.2.2. Intermediaire precisie (inter-run)

De intermediaire precisie is de precisie wanneer herhaalde metingen worden uitgevoerd op een staal in één labo met zoveel mogelijk variaties in omstandigheden binnen één laboratorium (verschillende dagen, verschillende analisten, verschillende apparatuur, ...). De intermediaire precisie moet voldoen aan één vereiste om betrouwbaar nl. de standaarddeviatie moet kleiner zijn dan 1.

Om dit te bepalen wordt er gebruik gemaakt van verschillende DNA-inputs (nl. 25ng/reactie, 20ng/reactie, 15ng/reactie en 10ng/reactie) van staal T23.1006. Ook wordt elke DNA-input op een andere dag getest. Net zoals bij de repeteerbaarheid wordt de gemiddelde VAF, standaarddeviatie, RSD en CV% berekend. De gemiddelde VAF bedraagt 23,48% met een standaarddeviatie van 0,22. De RSD bedraagt 0,0094 en de CV% bedraagt 0,94%. De intermediaire precisie voldoet aan de vooropgestelde vereisten.

3.2.2.1.2.3. Robuustheid

De robuustheid is een maat voor de ongevoeligheid van een methode voor al dan niet doelbewuste variaties in de omstandigheden of in de variabelen bij de uitvoering. De robuustheid moet een standaarddeviatie kleiner dan 1,5 bevatten, om betrouwbaar te zijn.

Deze parameter wordt bepaald door gebruik te maken van staal T23.1006 en hierbij doelbewust de hoeveelheid DNA-input te wijzigen. In totaal wordt dit staal 22 keer gemeten over vier verschillende runs, de laagste DNA-input dat getest wordt bedraagt 3,13ng/reactie en de hoogste DNA-input bedraagt 200ng/reactie. Hiervan wordt de gemiddelde VAF%, de standaarddeviatie en de CV% berekend via Excel. De gemiddelde VAF% bedraagt 22,85% met een standaarddeviatie van 0,96 en een CV% van 4,20%. De standaarddeviatie voldoet aan de vooropgestelde vereisten. Uit deze resultaten kan er geconcludeerd worden dat de methode robuust is.

Aan de hand van staal T23.1143 kan deze parameter ook bepaald worden. Bij dit staal wordt, net zoals bij staal T23.1006, doelbewust de hoeveelheid DNA-input gewijzigd. In totaal wordt dit staal zes keer gemeten over drie verschillende runs, de laagste DNA-input bedraagt 15ng/reactie en de hoogste DNA-input bedraagt 50ng/reactie. Hiervan wordt de gemiddelde VAF%, de standaarddeviatie en de CV% via berekend via Excel. De gemiddelde VAF% bedraagt 43,60% met een standaarddeviatie van 0,89 en een CV% van 2,05%. De standaarddeviatie voldoet aan de vooropgestelde vereisten. Uit deze resultaten kan er geconcludeerd worden dat de methode robuust is, wel moet er rekening gehouden met het feit dat het aantal metingen niet zo hoog is.

3.2.2.1.3. Accuraatheid

De accuraatheid is de mate van overeenstemming tussen één meetresultaat en de werkelijke waarde van de te bepalen grootte. Dit wordt bepaald op niveau van overeenkomst tussen positieve stalen (KRAS G12 en G13D mutatie) onderling en tussen negatieve stalen (KRAS wildtype of andere KRAS mutaties dan G12 en G13D) onderling. Hierbij wordt er ook gekeken naar de specificiteit en de sensitiviteit. De specificiteit toont aan hoe goed de methode erin slaagt om de afwezigheid van de KRAS G12 of G13D mutatie aan te tonen. De sensitiviteit toont aan hoe goed de methode erin slaagt de

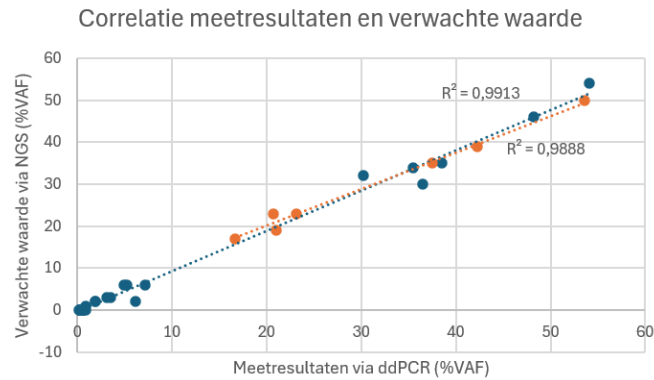
aanwezigheid van de KRAS G12 of G13D mutatie aan te tonen. Het criterium ligt op minimaal 95% overeenkomst.

Om de accuraatheid te bepalen werd er gebruik gemaakt van 22 positieve stalen en 13 negatieve stalen, afkomstig zowel uit het optimalisatie gedeelte als het validatie gedeelte. Alle 22 positieve stalen testen positief voor de KRAS G12 of G13D mutatie (fractionele abundantie >1%), zoals weergegeven in tabel 11. Daarnaast toont deze tabel ook aan dat de fractionele abundantie van de 13 negatieve stalen onder de LOB van 0,9% ligt, waardoor deze allemaal negatief testen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de accuraatheid, specificiteit en sensitiviteit elk 100% bedragen, deze voldoen aan het criterium >95%.

Tabel 11. Accuraatheid uit stalen voor validatie en optimalisatie.

Staal	DNA-input (ng)	Soort KRAS mutatie	Soort staal	Meetresultaat via ddPCR (%VAF)	Verwachte waarde via NGS (%VAF)
T23.1089	14	wildtype	negatief	0,20	0
T23.1001	14	wildtype	negatief	0,73	0
T23.1220	14	wildtype	negatief	0,54	0
T23.1225	14	wildtype	negatief	0,46	0
T23.1325	14	wildtype	negatief	0,25	0
T23.0997	14	G12A	positief	7,13	6
T23.1226	14	G12A	positief	30,20	32
T23.1195	14	Gln61Arg	negatief	0,31	0
T23.1030	14	G12V	positief	35,50	34
T23.1229	14	G12V	positief	1,88	2
T23.1208	14	Ala146Thr	negatief	0,36	0
T23.1051	14	G12A/G12V	positief	1,94	2
T23.1268	14	G12A	positief	38,50	35
T23.1251	14	Lys117Asn	negatief	0,61	0
T23.1054	14	G12V	positief	54,10	54
T23.1276	14	G12A	positief	48,20	46
T23.1277	14	Ala146Thr	negatief	0,29	0
T23.1065	14	G12V	positief	3,56	3
T23.1284	14	G12A	positief	3,12	3
T23.1328	14	Gln61His	negatief	0,28	0
T23.1080	14	G12S	positief	0,89	1
T24.0001	14	G12A	positief	5,20	6
T23.1040	14	wildtype	negatief	0,51	0
T23.1200	14	G12A	positief	4,88	6
T24.0004	14	G12A	positief	6,18	2
T23.1048	14	wildtype	negatief	0,86	0
T23.1212	14	G12A	positief	36,50	30
T23.1166	14	Gln61Lys	negatief	0,50	0
T23.1297	50	G12A	positief	21,00	19
T23.1268	50	G12A	positief	37,50	35
T24.0001	50	G12A	positief	16,70	17
T23.1006	50	G12C	positief	23,10	23
T23.1143	50	G12A	positief	42,30	39
HD269	30	G12C	positief	53,60	50
T23.1036	30	G12C	positief	20,70	23

Er is een mooie overeenkomst tussen positieve en negatieve stalen en bovendien is er een lineaire correlatie tussen de meetresultaten en de verwachte waarden. Dit wordt weergegeven op figuur 43. Op onderstaande grafiek worden de correlaties van het optimalisatieproces en validatieproces apart bekeken. De trendlijn voor het optimalisatieproces (oranje trendlijn) bedraagt een R^2 -waarde van 0,9888 en voor het validatieproces (blauwe trendlijn) bedraagt de R^2 -waarde 0,9913. Vermits beide trendlijnen een R^2 -waarde groter dan 0,9 bedragen, betekent dit dat de accuraatheid voor beide goed is.



Figuur 45. Correlatie meetresultaten en verwachte waarde. Oranje trendlijn = optimalisatie, blauwe trendlijn = validatie.

4. Algemene Conclusie

Tijdens de optimalisatie van de KRAS mutatie screening test via ddPCR werd de 'regen' in de 1-D en 2-D plots, als een storende factor waargenomen. Oorzaken hiervoor zijn de competitie door duplex reactie en vermoedelijk ook het materiaalsoort dat gebruikt wordt nl. FFPE. Om de regen zo veel mogelijk te voorkomen, werd er gebruik gemaakt van een restrictie enzyme (RE), dit had geen beter effect op de resultaten. Ook werd de DNA-input verlaagt, hierdoor werd er wel al veel regen voorkomen. Naast de 'regen', was het aantal vals positieve resultaten ook een probleem tijdens de optimalisatie. Gezien kruiscontaminatie uitgesloten werd, werd geprobeerd om de deaminatie, eigen aan FFPE materiaal, aan te pakken door gebruik van uracil-DNA-glycosylase (UDG) in verschillende experimentele settings. Vermits er geen positief effect is van het gebruik van UDG, wordt er gewerkt met een limit of blanc (LOB) waarde van 0,9% VAF. Uit de optimalisatie kan er geconcludeerd worden dat deze methode optimaal werkt bij een annealings/elongatie temperatuur van 53°C, zonder het gebruik van RE en UDG.

Bij de validatie werden verschillende parameters gecontroleerd nl. lineariteit, precisie, accuraatheid (sensitiviteit en specificiteit) en de kwantificatielimiet LOQ. Al deze parameters voldoen aan de vooropgestelde vereisten, met uitzondering van 2 te hoge standaarddeviaties. In de routine zal de implementatie gebeuren na een extra statistische analyse te verfijnen van de LOQ-waarde in relatie met de LOB-waarde.

De gevalideerde methode heeft een gevoeligheid (LOQ) van 1% variant allel frequentie, waarbij het lineair, precies en accuraat kan meten. Hierdoor is het mogelijk om de borderline varianten, die bekomen werden via NGS (1-5% VAF), te verifiëren op hetzelfde DNA extract als voor NGS gebruikt werd. De methode heeft dus een gevoeligheid die verder gaat dan bij Idylla PCR en kan bovendien betrouwbare resultaten geven met lagere DNA-inputs dan NGS.

Nog een voordeel t.o.v. NGS is dat bij de ddPCR methode weinig staalvoorbereiding nodig is, het DNA hoeft enkel geëxtraheerd te worden en vervolgens kan de test worden gestart, waardoor deze methode veel gebruiksvriendelijker is en voor een kortere turn-around tijd (TAT) zorgt.

Nadelig aan deze KRAS test (t.o.v. NGS) is dat dit een screening is, waardoor indien er een positief resultaat verkregen wordt, er een onwetendheid is over welke specifieke mutatie van de 7 onderzochte KRAS mutaties het gaat. Hierdoor zal in de routine een positief staal steeds moeten worden geverifieerd via NGS, om na te gaan welke KRAS mutatie er effectief aanwezig is. Dit is enkel noodzakelijk indien er KRAS specifieke medicatie overwogen wordt zoals bv. medicatie tegen KRAS G12C mutatie.

Nog een nadeel is dat er via ddPCR maar een aantal specifieke mutaties per test gedetecteerd kunnen worden, vermits de beperkte hoeveelheid fluorescentiekanalen aanwezig in het toestel. Terwijl via NGS er veel meer verschillende mutaties per test opgespoord kunnen worden.

Uiteindelijk is de oorspronkelijke doelstelling van deze bachelorproef behaald. De KRAS mutatie screening is geoptimaliseerd en gevalideerd op FFPE materiaal en kan gebruikt worden in routine om NGS borderline varianten te verifiëren of in geval van lage DNA opbrengsten toch een betrouwbare KRAS status te bekomen met behulp van ddPCR. In de toekomst kunnen er in het labo ook methoden geoptimaliseerd en gevalideerd worden voor andere veel voorkomende mutaties binnen de RAS/MAPK/ERK signaalweg, zoals de BRAF V600E mutatie en mogelijks ook op andere materiaalsoorten. Ook kan er een optimalisatie en validatie proces opgestart worden voor andere genetische mutaties buiten de RAS/MAPK/ERK signaalweg, zoals mutaties in de PI3K/AKT/mTOR signaalweg dat ook celproliferatie en kanker veroorzaakt.

5. Referentielijst

- APMG Colon Molecular Pathways. (n.d.). Retrieved January 24, 2024, from http://www.apmggroup.net/innovation/molecular_testing/Colon_Pathways/colon.html
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J. J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-85>
- Bai, Y., Orfao, A., & Chim, C. S. (2018). Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 181(1), 11–26. <https://doi.org/10.1111/BJH.15075>
- Bannoura, S. F., Khan, H. Y., & Azmi, A. S. (2022). KRAS G12D targeted therapies for pancreatic cancer: Has the fortress been conquered? *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.1013902>
- Barbosa, R., Acevedo, L. A., & Marmorstein, R. (2021). The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 19(3), 361. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0687>
- Berra, C. M., Torrezan, G. T., de Paula, C. A., Hsieh, R., Lourenço, S. V., & Carraro, D. M. (2019). Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. *Applied Cancer Research* 2019 39:1, 39(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S41241-019-0075-2>
- Ciardello, D., Maiorano, B. A., & Martinelli, E. (2023). Targeting KRASG12C in colorectal cancer: the beginning of a new era. *ESMO Open*, 8(1), 100745. <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2022.100745>
- ddPCR Mutation Detection Assays | Bio-Rad. (n.d.). Retrieved April 4, 2024, from <https://www.bio-rad.com/en-be/life-science/digital-pcr/digital-pcr-assays/ddpcr-mutation-detection-assays>
- Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide. (n.d.).
- Erfelijke aanleg voor kanker | Erfelijkheid.nl. (n.d.). Retrieved February 13, 2024, from <https://www.erfelijkheid.nl/ziektes/erfelijke-aanleg-voor-kanker>
- Galimberti, S., Balducci, S., Guerrini, F., Del Re, M., & Cacciola, R. (2022). Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS12061305>
- Guo, Q., Lakatos, E., Bakir, I. Al, Curtius, K., Graham, T. A., & Mustonen, V. (2022). The mutational signatures of formalin fixation on the human genome. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32041-5>
- Hoe ontstaat kanker? (n.d.). Retrieved January 24, 2024, from <https://www.kanker.nl/algemene-onderwerpen/wat-is-kanker/algemeen/hoe-ontstaat-kanker>
- Holstein, C. A., Griffin, M., Hong, J., & Sampson, P. D. (2015). Statistical method for determining and comparing limits of detection of bioassays. *Analytical chemistry*, 87(19), 9795–9801. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02082>

- Huang, Y., Ognjenović, J., Karandur, D., Miller, K., Merk, A., Subramaniam, S., & Kuriyan, J. (2021). A molecular mechanism for the generation of Ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.73218>
- Huynh, M. V., Hobbs, G. A., Schaefer, A., Pierobon, M., Carey, L. M., Diehl, J. N., DeLiberty, J. M., Thurman, R. D., Cooke, A. R., Goodwin, C. M., Cook, J. H., Lin, L., Waters, A. M., Rashid, N. U., Petricoin, E. F., Campbell, S. L., Haigis, K. M., Simeone, D. M., Lyssiotis, C. A., ... Der, C. J. (2022). Functional and biological heterogeneity of KRASQ61 mutations. *Science Signaling*, 15(746), eabn2694. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.ABN2694>
- Ihle, M. A., Fassunke, J., König, K., Grünewald, I., Schlaak, M., Kreuzberg, N., Tietze, L., Schildhaus, H. U., Büttner, R., & Merkelbach-Bruse, S. (2014). Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer*, 14(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-13>
- Kerick, M., Isau, M., Timmermann, B., Sülthmann, H., Herwig, R., Krobitch, S., Schaefer, G., Verdorfer, I., Bartsch, G., Klocker, H., Lehrach, H., & Schweiger, M. R. (2011). Targeted high throughput sequencing in clinical cancer Settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Medical Genomics*, 4, 68. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-68>
- Kim, S., Park, C., Ji, Y., Kim, D. G., Bae, H., van Vrancken, M., Kim, D. H., & Kim, K. M. (2017). Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(1), 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2016.09.006>
- Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology*, 93(7), 4182. <https://doi.org/10.1002/JMV.26846>
- László, L., Kurilla, A., Takács, T., Kudlik, G., Koprivanacz, K., Buday, L., & Vas, V. (2021). Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/CELLS10030667>
- Lee, C. J., Shin, W., Song, M., Shin, S. S., Park, Y., Srikulnath, K., Kim, D. H., & Han, K. (2023). Comparison of digital PCR platforms using the molecular marker. *Genomics & Informatics*, 21(2). <https://doi.org/10.5808/GI.23008>
- Lièvre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., Côté, J. F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F., & Laurent-Puig, P. (2006). KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 66(8), 3992–3995. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0191>
- Lu, S., Jang, H., Nussinov, R., & Zhang, J. (2016). The Structural Basis of Oncogenic Mutations G12, G13 and Q61 in Small GTPase K-Ras4B. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP21949>
- Luo, J. (2021). KRAS mutation in Pancreatic Cancer. *Seminars in Oncology*, 48(1), 10. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2021.02.003>
- Mahanama, A., & Wilson-Davies, E. (2021). Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery (Oxford, Oxfordshire)*, 39(11), 759. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2021.09.016>

- Montes, A. F., Orduña, V. A., Martínez, E. A., Salas, N. R., Torres, E., Lavín, D. C., Rodríguez Alonso, R. M., Falcó, E., Oliva, J. C., Cirera, L., Gómez, J. G., & Pericay, C. (2023). The Frequency of Specific KRAS Mutations, and Their Impact on Treatment Choice and Survival, in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *The Oncologist*, 28(10), e902. <https://doi.org/10.1093/ONCOLO/OYAD117>
- Olmedillas-López, S., Lévano-Linares, D. C., Alexandre, C. L. A., Vega-Clemente, L., Sánchez, E. L., Villagrasa, A., Ruíz-Tovar, J., García-Arranz, M., & García-Olmo, D. (2017). Detection of KRAS G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR. *World Journal of Gastroenterology*, 23(39), 7087. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I39.7087>
- Oncogenes and tumor suppressor genes: Video & Anatomy | Osmosis*. (n.d.). Retrieved February 13, 2024, from https://www.osmosis.org/learn/Oncogenes_and_tumor_suppressor_genes
- Ou, S. H. I., Hong, J. L., Christopoulos, P., Lin, H. M., Vincent, S., Churchill, E. N., Soeda, J., Kazdal, D., Stenzinger, A., & Thomas, M. (2023). Distribution and Detectability of EGFR Exon 20 Insertion Variants in NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 18(6), 744–754. <https://doi.org/10.1016/J.JTHO.2023.01.086>
- Reita, D., Pabst, L., Pencreach, E., Guérin, E., Dano, L., Rimelen, V., Voegeli, A. C., Vallat, L., Mascaux, C., & Beau-Faller, M. (2022). Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. *Cancers*, 14(5), 1321. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14051321>
- Roza, A. (, & Bidshahri,). (2017). *NOVEL ULTRA-SENSITIVE DIGITAL PCR ASSAYS FOR SCREENING AND DETECTION OF RARE MISSENSE MUTATIONS IN (PROTO-)ONCOGENES*.
- Ruppert, A. M., Beau-Faller, M., Debieuvre, D., Ouafik, L. H., Westeel, V., Rouquette, I., Mazières, J., Bringuier, P. P., Monnet, I., Escande, F., Ricordel, C., Merlio, J. P., Janicot, H., Lemoine, A., Foucher, P., Poudenx, M., Morin, F., Langlais, A., Souquet, P. J., ... Wislez, M. (2020). Outcomes of Patients With Advanced NSCLC From the Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique Biomarkers France Study by KRAS Mutation Subtypes. *JTO Clinical and Research Reports*, 1(3). <https://doi.org/10.1016/J.JTOCRR.2020.100052>
- Singh, R. R. (2020). Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors: Challenges, Advances, and Applications. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 22(8), 994–1007. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2020.04.213>
- Śmiech, M., Leszczyński, P., Kono, H., Wardell, C., & Taniguchi, H. (2020). Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes*, 11(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/GENES11111342>
- Tanaka, N., Takahara, A., Hagio, T., Nishiko, R., Kanayama, J., Gotoh, O., & Mori, S. (2020). Sequencing artifacts derived from a library preparation method using enzymatic fragmentation. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227427>
- TaqMan - an overview | ScienceDirect Topics*. (n.d.). Retrieved January 17, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taqman>
- Tong, Y., Shen, S., Jiang, H., & Chen, Z. (2017). Application of Digital PCR in Detecting Human Diseases Associated Gene Mutation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(4), 1718–1730. <https://doi.org/10.1159/000484035>

- Upreti, D., & Adjei, A. A. (2020). KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target. *Cancer Treatment Reviews*, 89, 102070. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2020.102070>
- Uras, I. Z., Moll, H. P., & Casanova, E. (2020). Targeting KRAS Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 4325, 21(12), 4325. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124325>
- Wang, R., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, Z., Chen, Q., Duan, Y., Xiong, S., Luan, Z., Wang, J., & Cheng, B. (2022). Diagnostic and Prognostic Values of KRAS Mutations on EUS-FNA Specimens and Circulating Tumor DNA in Patients With Pancreatic Cancer. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 13(5), e00487. <https://doi.org/10.14309/CTG.0000000000000487>
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS9050052>
- Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155–158. <https://doi.org/10.2144/BTN-2021-0094/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG>
- Yang, Z., & Tam, K. Y. (2018). Combination Strategies Using EGFR-TKi in NSCLC Therapy: Learning from the Gap between Pre-Clinical Results and Clinical Outcomes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(2), 204. <https://doi.org/10.7150/IJBS.22955>
- Yoon, H. H., Tougeron, D., Shi, Q., Alberts, S. R., Mahoney, M. R., Nelson, G. D., Nair, S. G., Thibodeau, S. N., Goldberg, R. M., Sargent, D. J., & Sinicrope, F. A. (2014). KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 Alliance). *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(11), 3033. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3140>
- Yost, S. E., Smith, E. N., Schwab, R. B., Bao, L., Jung, H., Wang, X., Voest, E., Pierce, J. P., Messer, K., Parker, B. A., Harismendy, O., & Frazer, K. A. (2012). Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Research*, 40(14), e107. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS299>
- Zhu, G., Pei, L., Xia, H., Tang, Q., & Bi, F. (2021). Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 20(1), 143. <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01441-4>

6. Bijlagen