



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Technological advances in molecular pathology : a journey into the archives

Eijk, R. van

### Citation

Eijk, R. van. (2013, May 8). *Technological advances in molecular pathology : a journey into the archives*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20866>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20866>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20866> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Eijk, Ronald van

**Title:** Technological advances in molecular pathology : a journey into the archives

**Issue Date:** 2013-05-08

## Nederlandse samenvatting

In de weefsel archieven van de afdeling Pathologie bevinden zich grote aantallen “blokjes” met formaline gefixeerd en in paraffine ingebed (FFPE) weefsel. Dit proefschrift beschrijft recente technologische vooruitgang in de moleculaire tumorpathologie waardoor de toegankelijkheid van deze archieven sterk is verbeterd en de mogelijkheden voor moleculaire tumor diagnostiek en wetenschappelijk onderzoek sterk zijn toegenomen. Aangetoond wordt hoe belangrijk het is voldoende kwalitatief goed DNA van kleine fracties FFPE materiaal te isoleren. Voorbeelden worden gegeven van laboratorium-methoden en analyse tools die bijdragen aan verbeterde diagnose, prognose en therapie van kanker.

In **hoofdstuk 1** worden belangrijke ontwikkelingen in de pathologie vanuit een algemeen en lokaal toegepast historisch perspectief beschreven. Een overzicht wordt gepresenteerd van verschillende pathologische onderzoeksvragen en er wordt een korte introductie gegeven van de meest gebruikte moleculaire technieken in onderzoek en diagnostiek. Analyse-strategieën, te beginnen met de binnenkomst van het weefsel in het laboratorium, tot aan de rapportage van de testresultaten, worden besproken aan de hand van een schematische DNA-analyse workflow.

In **hoofdstuk 2** laten we zien dat als gevolg van vroege diagnose en adjuvante therapieën, moleculaire tumor diagnostiek zich heeft ontwikkeld in de richting van analyses op uiterst kleine hoeveelheden pre-operatief materiaal. Dit maakt het isoleren van DNA van voldoende kwaliteit een uitdaging, vooral als zowel het aantal patiënten als het aantal consulten dat op het materiaal wordt aangevraagd toeneemt. Een moleculaire analyse kan alleen worden uitgevoerd als DNA van voldoende kwaliteit en kwantiteit wordt geïsoleerd uit het gearchiveerde FFPE weefsel. Daarom is een volledig geautomatiseerd DNA-isolatie systeem uitgetest en vergeleken met de klassieke DNA-isolatie methode. We stellen vast dat de volledig automatische methode DNA van hoge kwaliteit oplevert als het wordt geïsoleerd uit kleine hoeveelheden materiaal uit FFPE blokjes of gemicrodissecteerd materiaal van weefsel coupes. Als het DNA vervolgens wordt gebruikt in de zogenaamde hydrolyse probe assays wordt de doorloop tijd met 24 uur verkort terwijl de “hands-on” tijd 80% minder wordt.

Multiplex ligatie-afhankelijke probe amplificatie (MLPA) wordt geïntroduceerd in **hoofdstuk 3**. MLPA kan worden gebruikt om een relatief groot aantal chromosomale afwijkingen tegelijkertijd te onderzoeken in een enkel experiment. Een MLPA test is ontwikkeld om verlies van heterozygositeit in FFPE materiaal van oligodendrogiale tumoren (OGT) te bepalen. De MLPA resultaten zijn gevalideerd door ze te vergelijken met “fluorescentie in situ hybridisatie” (FISH) experimenten. De resultaten zijn reproduceerbaar en we concluderen dat MLPA een betrouwbare methode is voor de detectie van 1p/19q chromosomale deleties in OGT.

Voor een goede MLPA-workflow is een geautomatiseerd data-analyse systeem van groot belang. In **hoofdstuk 4** beschrijven we een zelfontwikkeld MLPA data management systeem waarin een statistische benadering wordt toegepast voor de normalisatie en de analyse van MLPA patronen. Deze geïntegreerde aanpak helpt bij de administratieve ondersteuning, normalisatie, visualisatie, rapportage en interpretatie van grote series MLPA gegevens.

De nauwkeurige detectie van mutaties in het *KRAS* gen is van groot belang voor de moleculaire diagnose van verschillende typen kanker en kan helpen bij de keuze van de behandelingstrategie van de patiënt. In **hoofdstuk 5** introduceren we een protocol voor het screenen van somatische mutaties in *KRAS*. Hierin wordt aansluitend aan een volledige genoom-amplificatie (WGA) een hoge-resolutie smelt analyse (HRM) uitgevoerd, die dient als mutatie pre-screenings methode. Vervolgens wordt op de monsters met een afwijkend smeltpatroon de specifieke *KRAS* mutatie vastgesteld met behulp van sequentiebepaling volgens de Sanger methode. We concluderen dat deze methode geschikt is voor de screening van klinische monsters pancreaskanker en dat de methode potentieel kan worden toegepast op vrijwel elk mogelijk gemuteerd gebied in het genoom.

Endobronchiale echogeleide transbronchiale naald aspiratie (EBUS-TBNA) en trans-oesofageale echografie met fijne naald aspiratie (EUS-FNA) zijn belangrijke technieken voor de diagnose en stadiëring van niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC). In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat allel-specifieke kwantitatieve real-time PCR met hydrolyse probes betrouwbaar kan worden toegepast op vaak minimale hoeveelheden via EBUS-TBNA en EUS-FNA verkregen cytologisch materiaal van NSCLC patiënten, en dat de gedetecteerde mutaties overeenkomen met de mutaties in het histologische materiaal van primaire tumoren van dezelfde patiënt.

De toekomstige ontwikkelingen in de moleculaire pathologie en enkele concluderende overwegingen worden beschreven in **Hoofdstuk 7**. In de afgelopen decennia zijn belangrijke verbeteringen in moleculaire technologieën verwezenlijkt. De klinische waarde van verschillende moleculair pathologische testen is bewezen. “Next-generation”-sequentiebepaling en digitale pathologie zijn belangrijke nieuwe methodes die in de nabije toekomst in de kliniek zullen worden toegepast waarbij de huidige archieven met FFPE materiaal op een nog betere manier gebruikt zullen worden in het voordeel van de individuele patiënt.

