



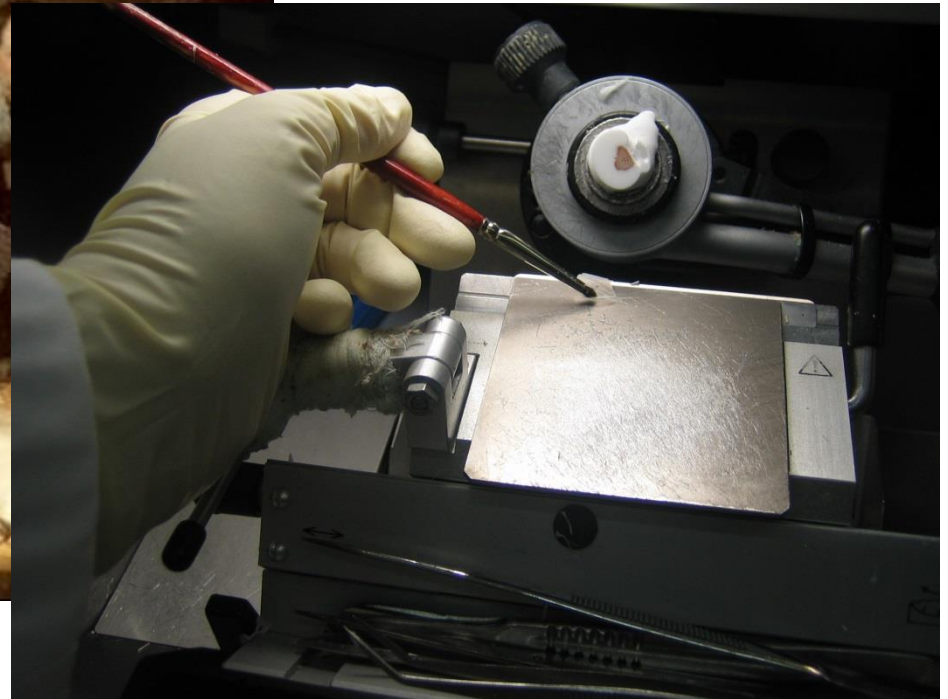
Medical University of Graz

# MOLEKULAR- PATHOLOGIE

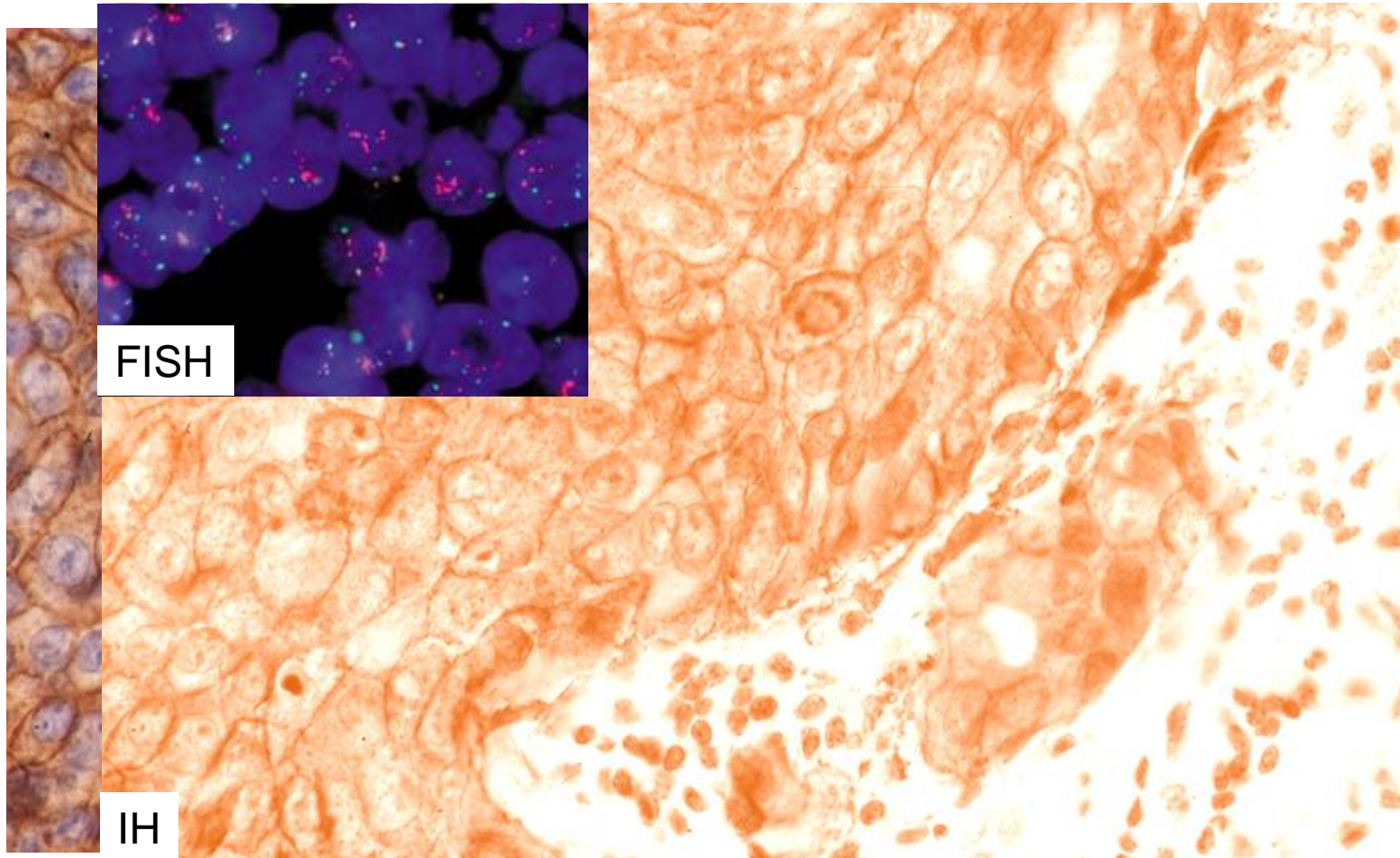
Univ. FA Dr. Christian Viertler  
Diagnostik- und Forschungs-  
Institut für Pathologie  
Medizinische Universität Graz  
*christian.viertler@medunigraz.at*



# Pathologie - Diagnostik für die klinische Medizin



# Zunehmende Komplexität - zunehmende klinische Relevanz



# IHC Allgemeinpathologie

A-AT	DOG-1	KOC- 1	
AE 1/3	EBER	LCA	
AFP	EBV	Mammaglobin	
ALK D5F3	E-Cadherin	MAP-2	
Amyloid ( )	EMA	MCT	PSA
Androgen Rezeptor	ERG	Melan A	RCC
BerEP-4	F Xllla	Mel A / S100 Cocktail	Retinoblastom
Brachyury	Fibrinogen	Mesothelin	ROS-1
BRST-2	Fibronectin	MGB	S-100
c1q	GAL3	MIT F	S-100P
c3c	Gastrin	MLH1	SALL-4
c4d	GATA-3	MSH2	SATB-2
c5b-9	GFAP	MSH6	SMA
CA-125	Glut-1	Muc ( )	SM-Myosin
CA-19-9	GS (Glutaminsynt.)	MyoFD5	SOX 10
Caldesmon	5 HT (Serotonin)	NANOG	SOX 9
Calponin	HBME-1	Napsin A	SRIF (Somatostatin)
Calretinin	beta HCG	Nestin	STAT -6
CAM5.2	Heliobacter	Neuroblastom (NB84)	Surf. Apo ( )
CD 3	Hep cell AG	NF	SV -40 BK
CD 10	HHF35	NSE	SYN
CD 20	HMB45	NUT	Tenascin
CD 31	HMW	OCT 3/4	TFE3
CD 34	HPV ( )	Olig2	Thrombomodulin
CD 56 / NCAM	HSP-70	p16	TLE1
CD 68	HSV ( )	p40	Trypsin
CD 99	IgA	p53	TTF-1
CD 117 (c-KIT)	IgG	p57	TTF-1 / CK5
CD 146	IgG4	p62CT	Tyrosinase
CD 163	IgM	p63	Ubiquitin
CDX-2	Inhibin	PAX ( )	Vim
CEA ( )	INI 1 (BAF47)	PD-L1 22C3	WT-1
CG	Involucrin	PGP-9,5	<b>Sonderwünsche</b>
Claudin ( )	JC	pHist H3	
CMV	Ker ( pan )	PIN -4 Cocktail	
D2-40	Ker ( )	PLAP	HE
Desmin	Ki-67	PMS-2	Leerschnitte ( )

E-Nr.  
BARCODE

# IHC Hämatopathologie

B-Zellen	T-Zellen	Epithelial/mesenchymal	
CD 10	CD 1a	CD 34	Lab.-Nr.: .....
CD 19	CD 2	CK AE1/3	
CD 20	CD 3	CK	Sonstige
CD 21	CD 4	Fascin	E-Cadherin
CD 22	CD 5	EMA	Calreticulin2
CD 23	CD 7	<b>Erythropoese</b>	Clusterin
CD 38	CD 8	CD 71	c-Myc
CD 79a	CD 16	Gly A	CD 25
CD 103	CD 27	Gly C	CD 30
Annexin A1	CD 43	Spectrin	CD 54
CD 138	CD 278(ICOS)		ZAP-70
IgG	CD 279(PD1)		CD 117
IgA	CD 52	<b>Myelo-/ Monopoes</b>	HLA-DR
IgM	CD 56	CD 11c	Tdt
IgD	CD 57	CD 13	Mastzell – Tryptase
κ	TIA 1	CD 14	HIV
λ	Perforin	CD 15	Basophile (2D7)
bcl 6	Granzym B	CD 31	bcl 2
J-Chain mono	CXCL - 13	CD 33	STAT 3
OCT 2	TCR β F1	CD 45LCA	ALK 1
BOB 1	BMI 1	CD 59	NPM-ALK
MUM 1		CD 61	MIB
Vs38c		CD 63	FOXP1
Cycl D1		CD 66	Sox11
Cycl D2		CD 123	Langerin (CD207)
Cyclin E		F VIII	Neuroblastom
PAX 5		Myel AB <sub>1</sub>	Retinoblastom
HCL		Gran AB <sub>1</sub>	HBA 71
IgG - 4		Myeloperoxidase	HHV 8
GCET 1		CD 36	BRAF
<b>DC-Marker</b>		PML	CD 273(PD-L2)
CD 35		EPX	CD 274(PD-L1)
CD 106		CD 41	p-53
S-100		CD 42b	LEF1
<b>Makrophagen</b>		G-CSF	
Lysozym		CD 69	
CD 68		CD 11b	
CD 140α			
CD 140β			



# Molekularpathologie

## Hämatologische Neoplasien:

### **NGS Panel Analysen**

- Myeloische Neoplasie (inkl.  CEBPA,  FLT3,  NPM1)
- Myeloproliferative Neoplasie (inkl. Jak2, CALR, MPL, CSFR3)

### **Einzelmutationen**

- Jak2 Exon14 V617F \*       Jak2 Exon12
- Kit Exon17 D816V
- CALR Exon9 Ins./Del.
- MYD88 Exon5 L265P
- BRAF Exon15 V600

### **Translokationen**

- BCR-ABL Int. Scale \*
- Lymphoma Fusion NGS Panel
- Translokationen NGS Panel     Hemavision
- FIP1L1-PDGFR $\alpha$
- PML-RAR $\alpha$
- BCL1-Immunglobulin-Schwerkettengen
- BCL2- Immunglobulin-Schwerkettengen

### **Klonalitätsanalysen**

- Immunglobulin-Schwerkettengen R. (IGH)     IG $\kappa$ / $\lambda$
- T-Zell-Rezeptorgen R. (TCR $\beta$ / $\gamma$ )

## Chimärismusanalyse:

- Prä-KMT       Spender Nr: .....
- Post-KMT:      Tage nach KMT.....

## Gastrointestinale Neoplasien:

- Colon NGS Panel (inkl. KRAS, NRAS, BRAF)
- GIST NGS Panel (inkl. KIT, PDGFRA, RAS, RAF)
- Mikrosatelliteninstabilität (HNPCC)
- MLH1 Promotor-Methylierung

## Lungentumore:

- Lung NGS Panel (inkl. EGFR, ERBB2, BRAF)
- NGS Mutations-Panel ccfDNA \*\* (inkl. ALK, BRAF, EGFR T790)
- Translokationen NGS Panel (ALK, RET, ROS, NTRK1)

## Melanome:

- NGS Mutations-Panel (inkl. BRAF Exon11/15, NRAS, KIT)
- Uveales Melanom (NGS Panel + CNV)

## Gehirntumore:

- NGS Mutations-Panel (inkl. IDH1/IDH2)
- CNV Kopienzahlveränderung (inkl. 1p19q)
- MGMT Promotor-Methylierung

## Knochen-/Weichteiltumore:

- Knochentumor NGS Panel (inkl. GNAS, IDH1/2)
- Weichteiltumor NGS Panel (inkl. KIT, GNAS, GNAQ, CTNNB1, BRAF)
- Sarkoma Fusion NGS Panel

## Weitere Analysen:

- BRCA1/2 (full coding)
- TP53 (full coding) \*\*\*
- CNV Kopienzahlveränderung
- NGS Cancer Hotspot Panel (50 onkol. rel. Gene)
- NGS Comprehensive Cancer Panel (409 onkol. rel. Gene)
- Endopredict
- BRAF Fusion NGS Panel

## Stoffwechselerkrankungen:

- Hämochromatose (C282Y, H63D) + Einverständniserklärung!
- Mb. Wilson (ATP7B H1069Q) + Einverständniserklärung!

## Erregerdiagnostik:

- Herpes simplex Virus Typ 1+2 \*
- Cytomegalie Virus \*
- Epstein Barr Virus \*
- Varizella zoster Virus \*
- Parvovirus B19 \*
- Mykobakterium tuberculosis Komplex
- Mykobakterien (inkl. atypische/MOTT)
- Bartonella species
- Toxoplasma gondii
- Tropheryma whipplei
- HPV (high risk/low risk + Subtypisierung)
- Helicobacter pylori (inkl. Clarithromycin Resistenzmut.)
- NGS Panbakterielle PCR (16s rRNA Gen)
- NGS Panfungale PCR (ITS)

\* quantitativ    \*\* Abnahme und Versandkriterien siehe Homepage

\*\*\* bei hämatologischer Fragestellung Differentialblutbild mitschicken

# Diagnostische Schritte

- ▶ Fragestellung - adequate Analyse
- ▶ Gewebeauswahl, Gehalt an Tumorzellen
  - ▶ Tumorheterogenität
- ▶ Analytische Methoden
- ▶ Technische Aspekte
  - ▶ Analytische Instrumente
  - ▶ Reagentien (Kits, home brew)
- ▶▶ Interpretation der Ergebnisse
- ▶▶ Befund
- ▶ Gentechnikgesetz, Datenschutz
  - ▶ Einverständniserklärung, genetische Beratung
- ▶ Qualitätskontrolle

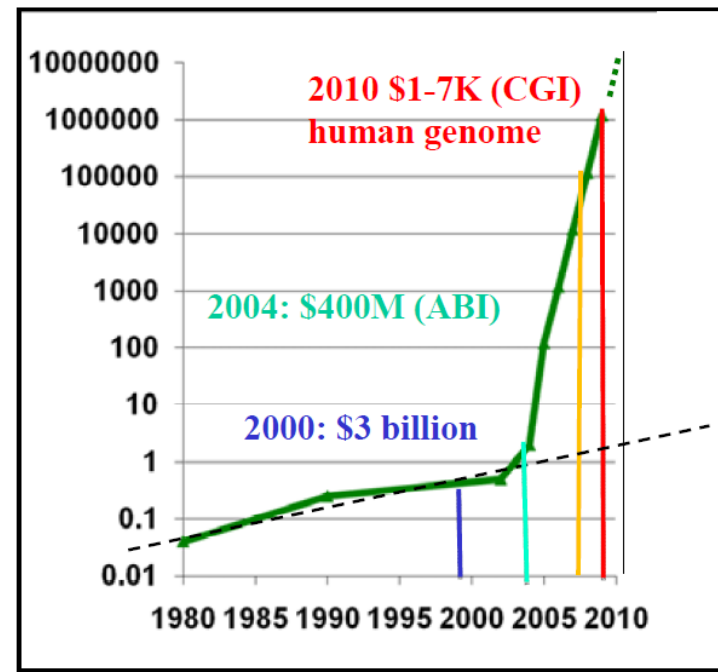
# Advances in sequencing technology

## ► Whole exome/genome sequencing

Factors of 10  
since 2005 for  
genomics

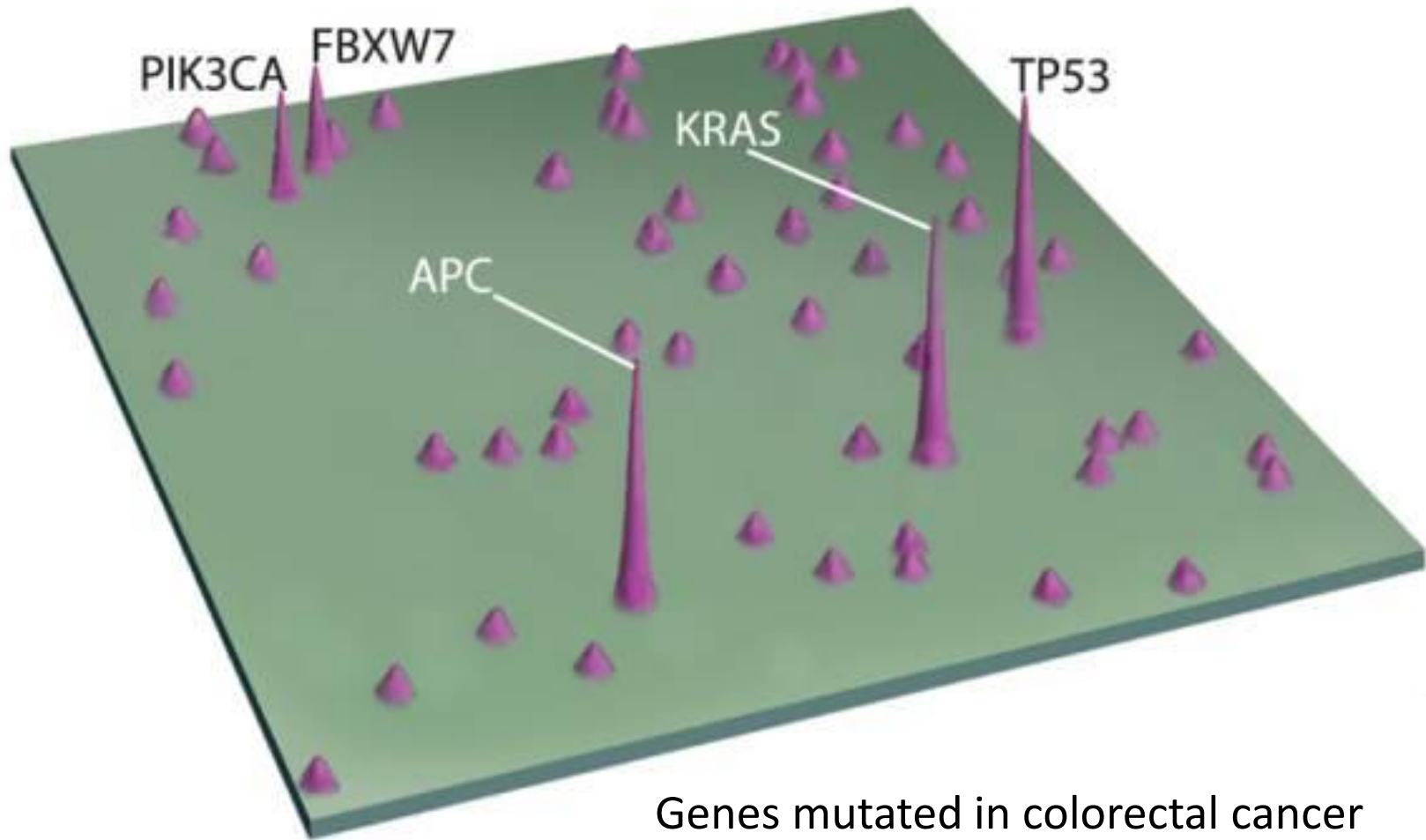


Moore's law  
1.5x/yr for  
electronics

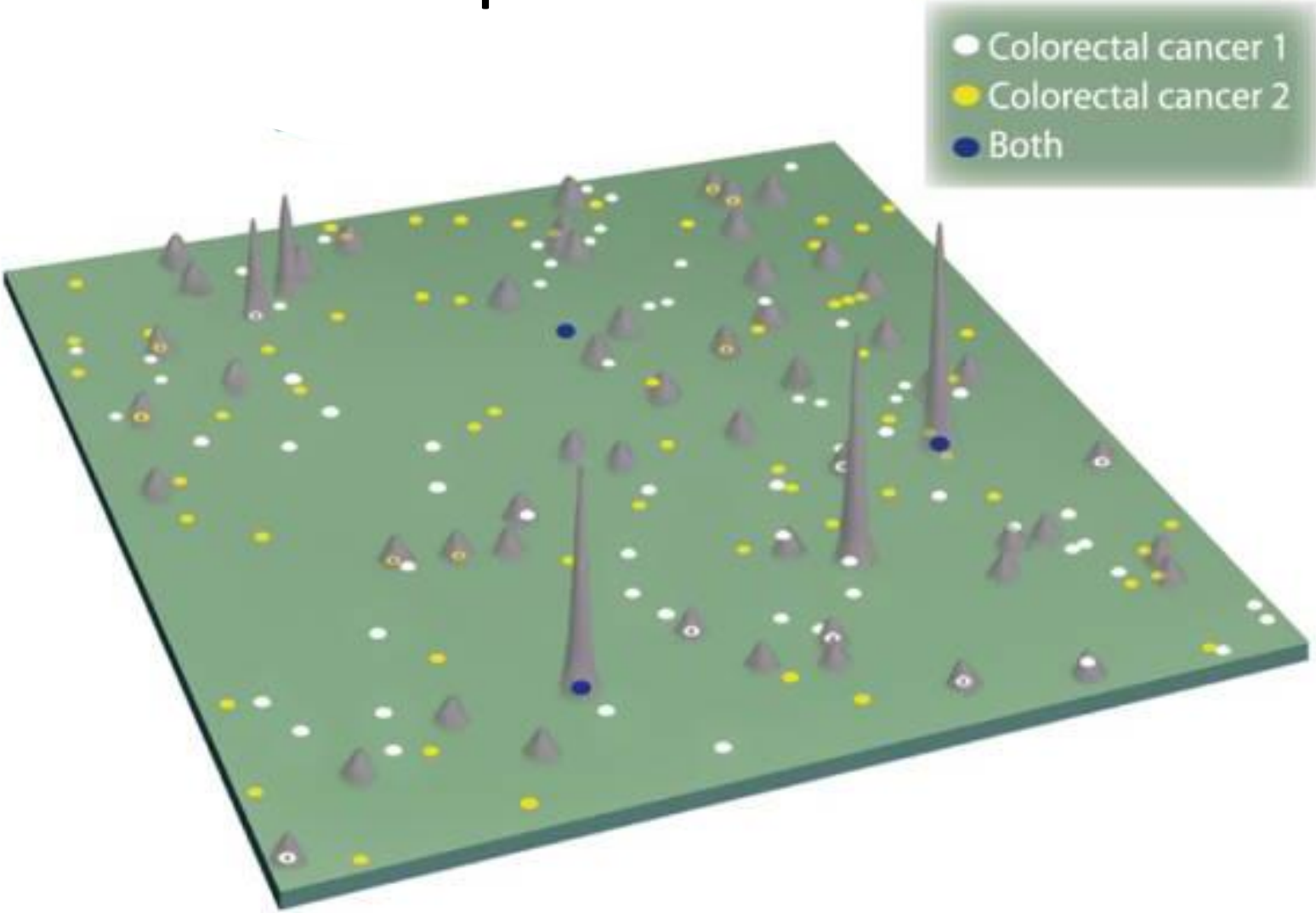




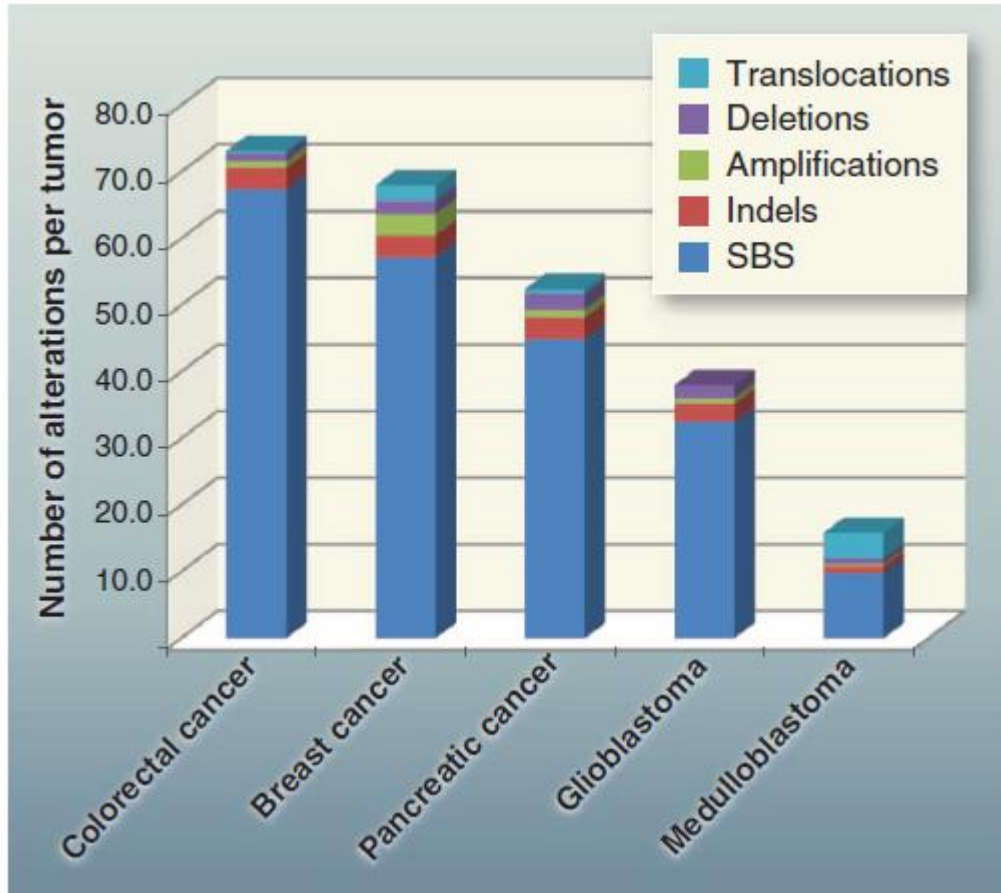
# Cancer Genome Landscapes



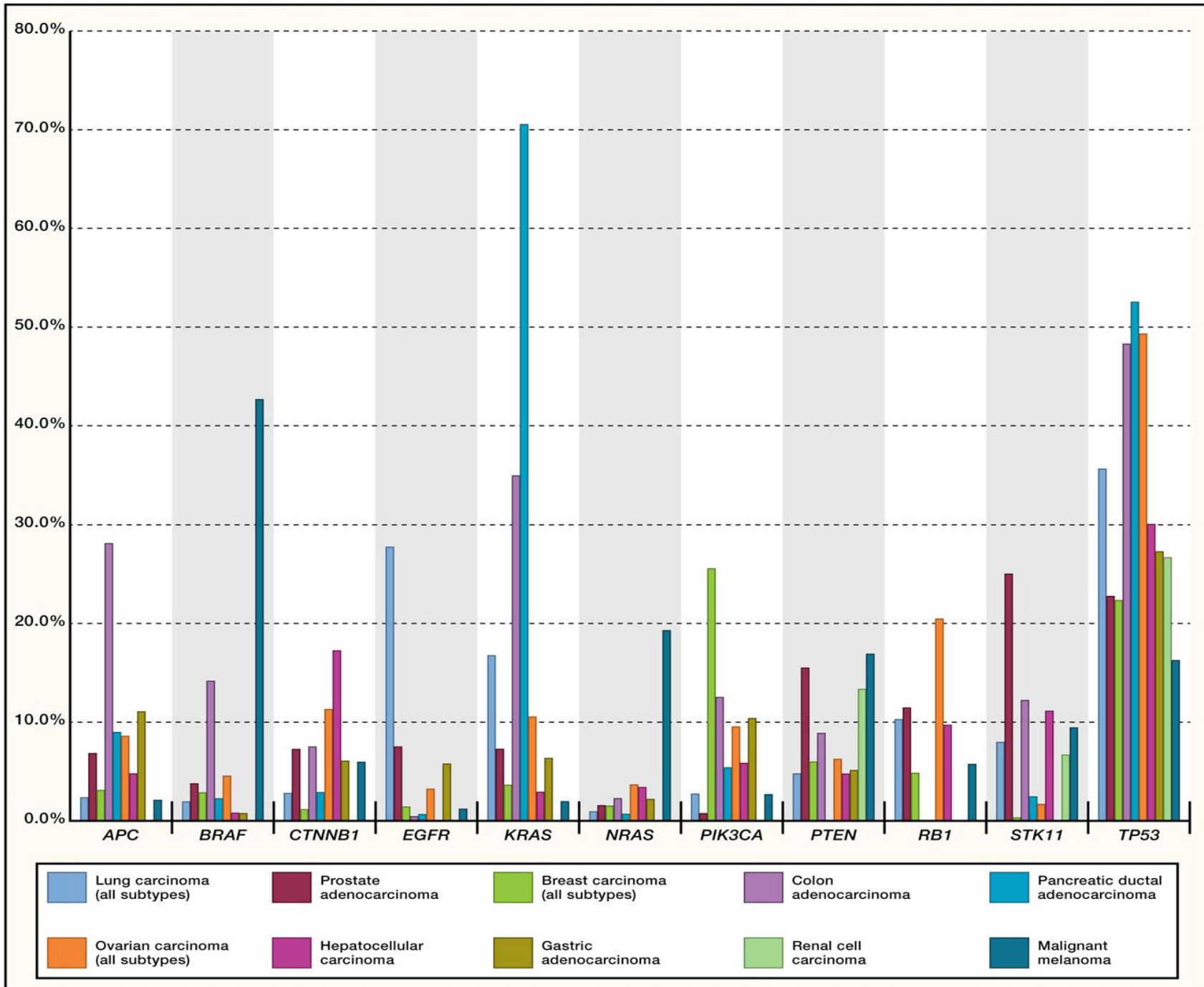
# Cancer Genome Landscapes



# Distribution of genetic changes



*B. Vogelstein et al., Science 2013*



# Molekulare Untersuchungen in der Pathologie

## ▶ Diagnostische Tests

### ▶ Erkrankungsspezifische genetische Veränderungen

- ▶ Translokationen bei Weichgewebstumoren und malignen Lymphomen
- ▶ Spezifische Mutationen z.B.. myeloproliferative Neoplasien.

### ▶ Minimal residual disease

## ▶ Prognostische Tests

## ▶ Prädiktive Tests

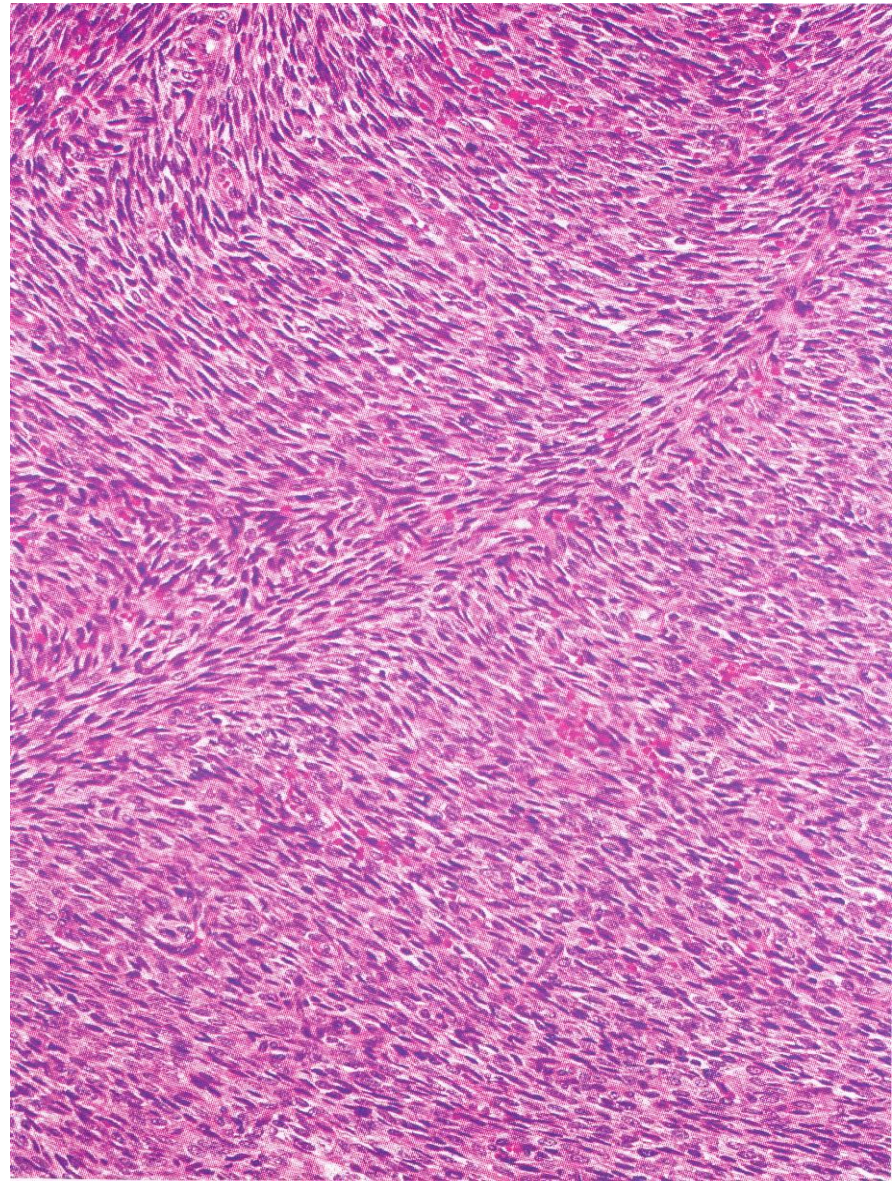
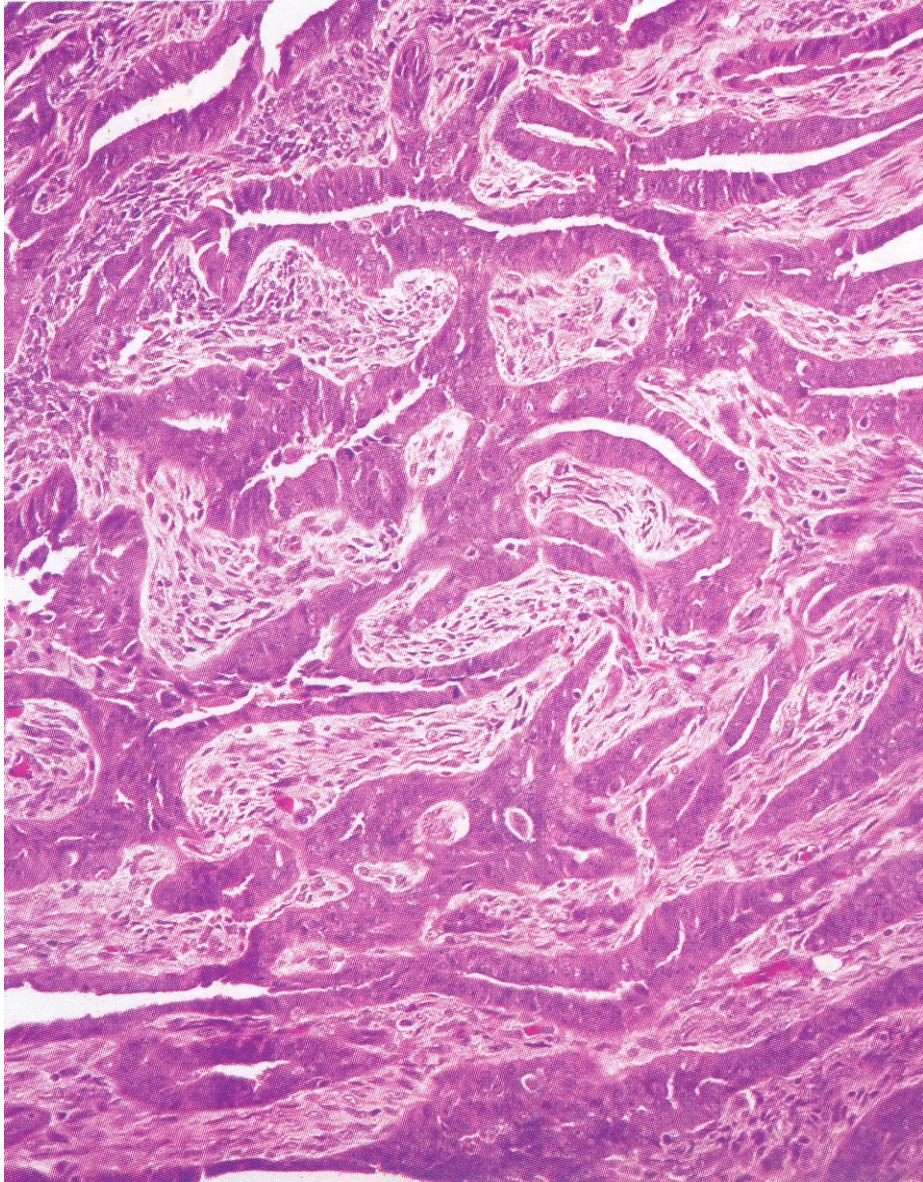
- ▶ Vorhersage des Therapieansprechens
- ▶ Therapiemonitoring: liquid biopsy

# Diagnostische Tests

- ▶▶ Erkrankungsspezifische genetische Veränderungen
  - Sarkome:
    - ▶ SYT/SSX: Synovialsarkom
- ▶▶ Hämatologie:
  - ▶ BCR/ABL Translokation bei CML (auch für minimale Resterkrankung)
  - ▶ PML/RAR $\alpha$  Translokation bei AML FABM3
  - ▶ JAK2 V600E Mutation bei myeloproliferativen Neoplasien
- ▶ Klonalitätsanalyse (Immunglobulin-Gene, T-Zell-Rezeptor-Gene):
  - ▶ Abgrenzung malignes Lymphom - reaktive Veränderung



# Synovial sarcoma





# Translokationsanalyse - Molekulare Methoden

## ▶ FISH

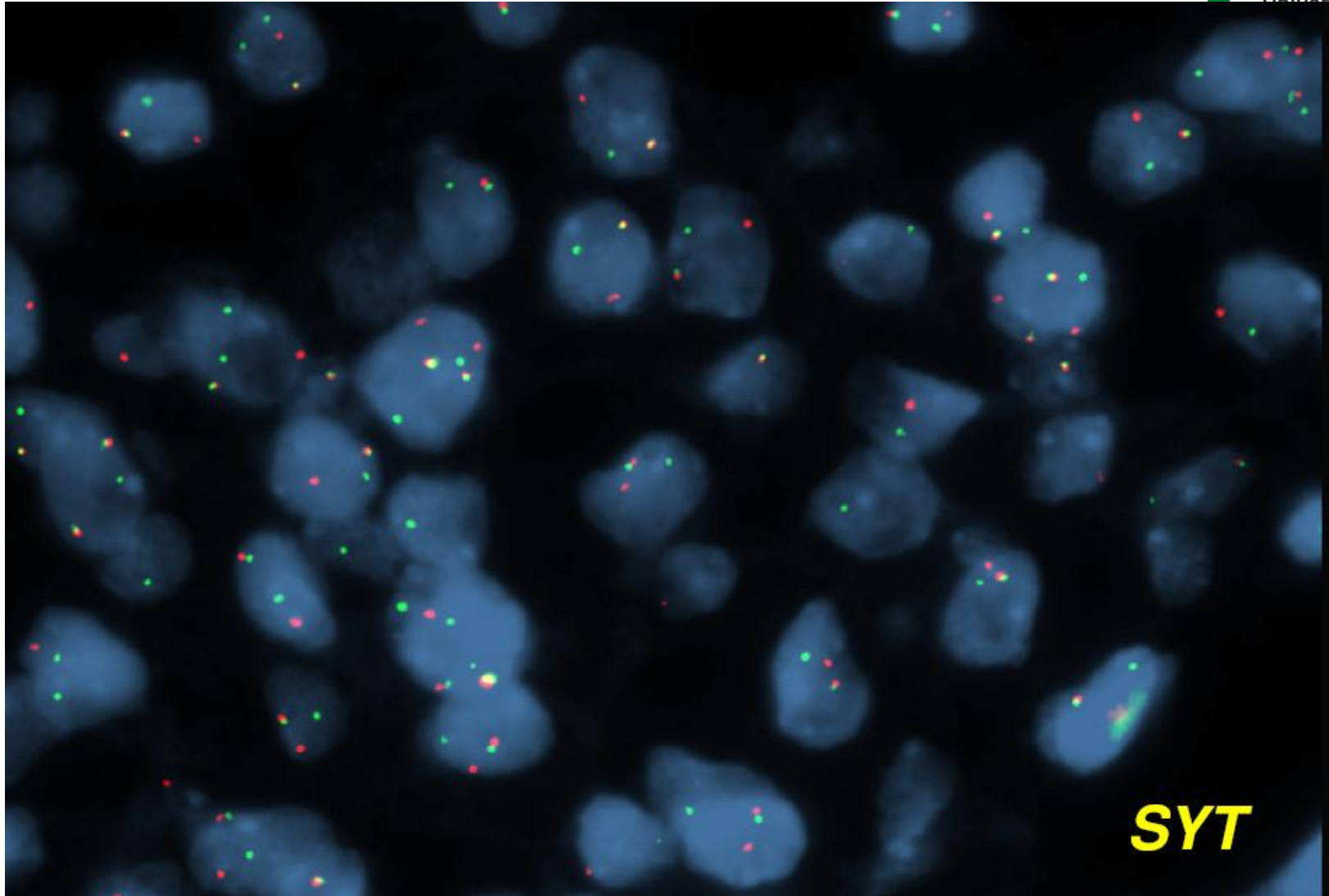
- ▶ Break apart vs. fusion probes

## ▶ RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

## ▶ Spezifische chimäre RNA Transkripte

- ▶ Bekannte Translokationspartner
- ▶ Multiplexing möglich, (auch für NGS)
- ▶ Länge der Produkte abhängig von RNA Qualität
- ▶ Kontaminationsgefahr, besonders bei “nested PCR”

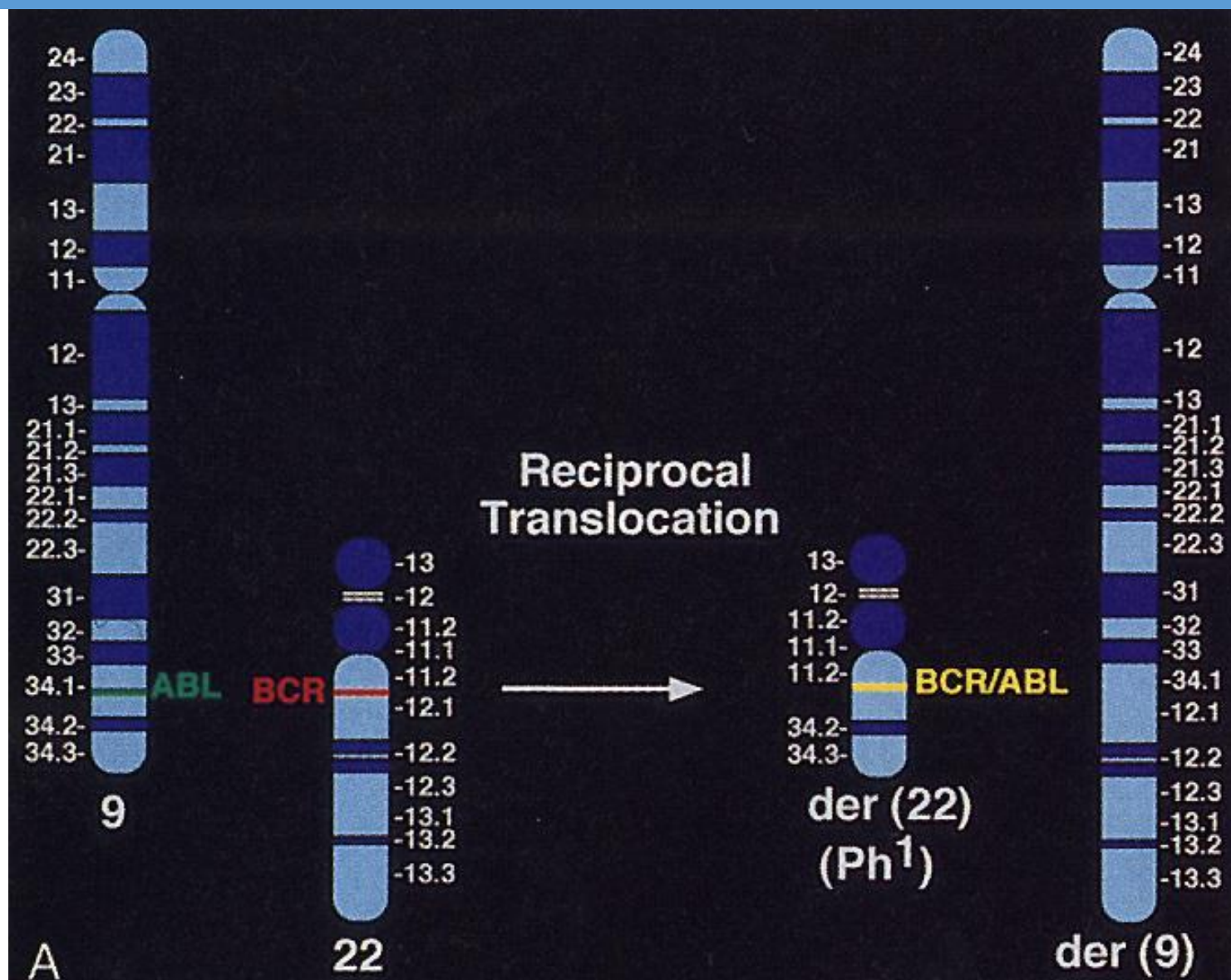
# Fusion probe SYT - SSX



# Translokation BCR-ABL



University of Graz

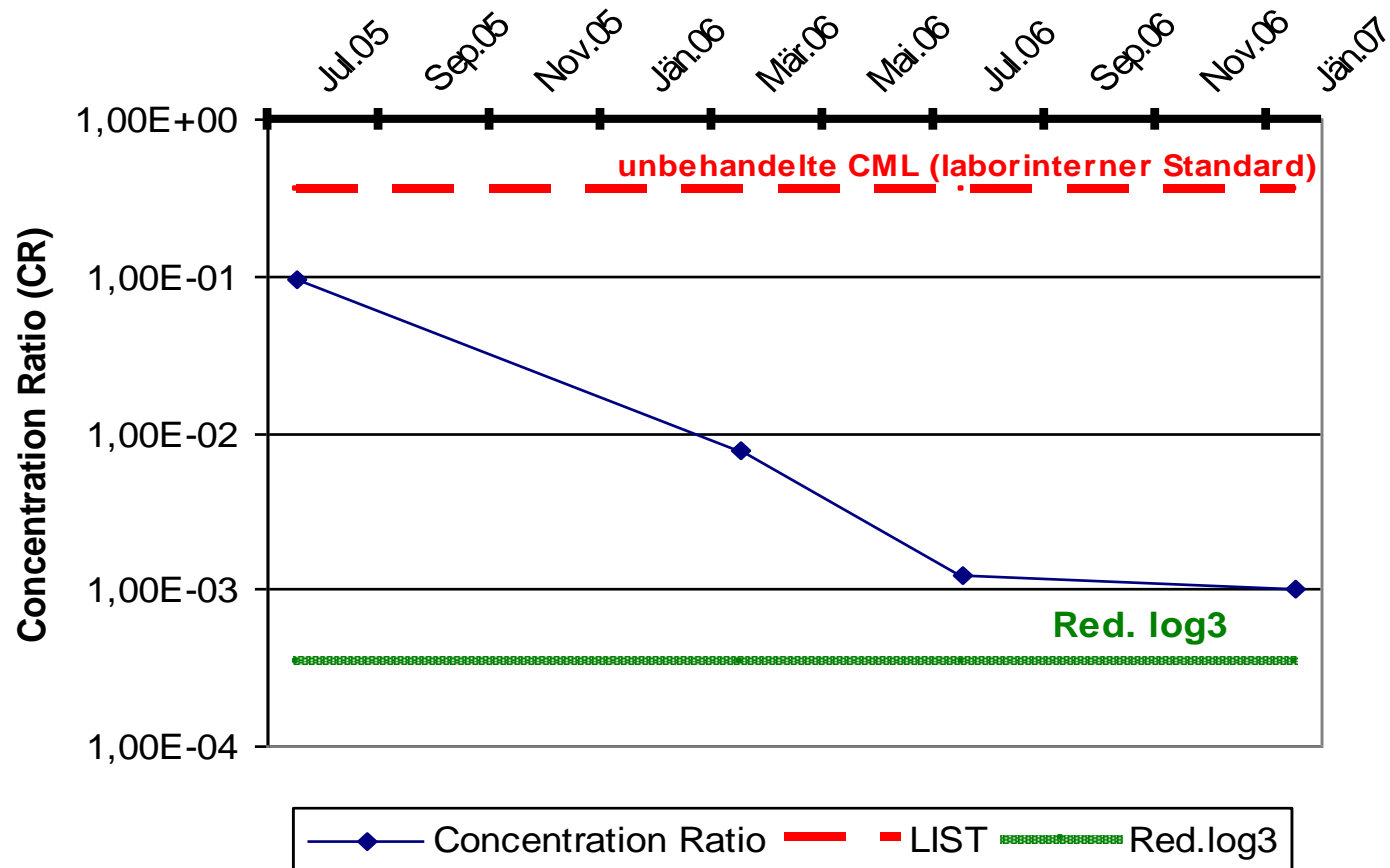


# Therapie-Monitoring

- ▶ Verlaufskurve, nicht Einzelwert sollte zur Therapieüberprüfung verwendet werden
- ▶ Zeitpunkte für das MRD testing
  - ▶ Am Beginn 3-6 Monate
  - ▶ Nach molekularer Remission jährlich
- ▶ Knochenmarkstransplantation (BMT)
  - ▶ Wenn nach 6 Monaten noch detektierbar - hohes Risiko für einen Relaps
- ▶ Gutes Ansprechen auf imatinib mesylate
  - ▶ 3 log Reduktion (1000-fach) innerhalb eines Jahres
  - ▶ Nur 5% zeigen eine molekulare Remission (BCR-ABL nicht detektierbar)

# Typical response

9.2.1949 Relat. Quantifizierung BCR/Abi-G6PDH

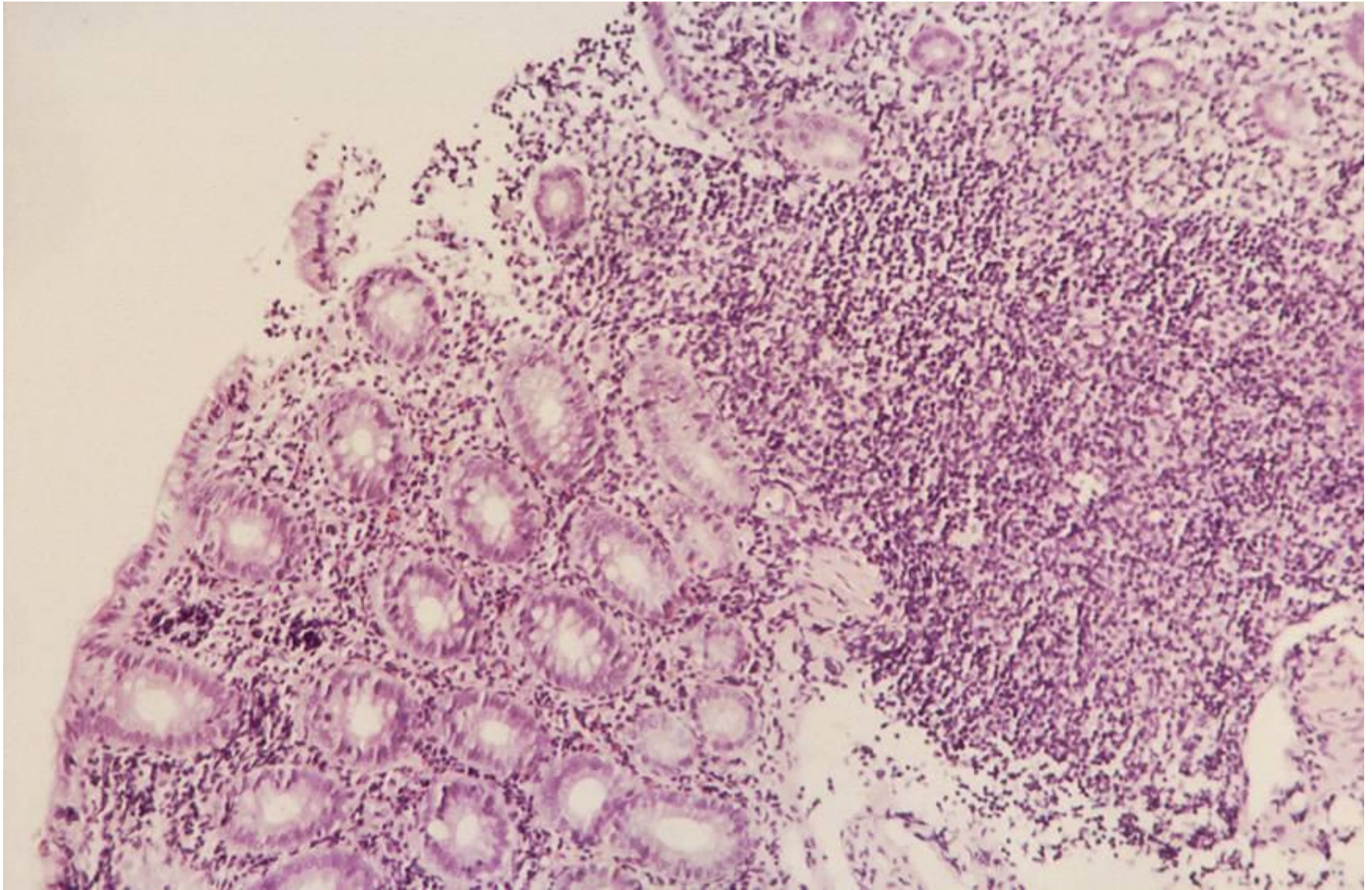




# Diagnostik maligner Lymphome

- ▶ Bestimmung der Klonalität
- ▶ Unterscheidung von reaktiven (polyklonalen) und neoplastischen (monoklonalen) Prozessen
- ▶ Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe
- ▶ Unterscheidung von Rezidiven und Zweittumoren
  - ▶ Immunglobulin Schwerketten Gene
  - ▶ T-Zell Rezeptor Gene

# Reaktiv ? CLL ?



# Klonalitätsanalyse

- ▶ Sehr gut geeignet zur Unterscheidung klonaler (meist maligner) Population lymphatischer Zellen
- ▶ Vorsicht bei:
  - ▶ Störungen des Immunsystems
    - ▶ HIV-Infektion
    - ▶ Immunsuppression nach Organtransplantation
    - ▶ Knochenmarkstransplantation
  - ▶ Infektionen, die eine starke Immunantwort auslösen
    - ▶ z.B. Epstein Barr Virus

# Molekulare Untersuchungen in der Pathologie

## ▶ Diagnostische Tests

- ▶ Erkrankungsspezifische genetische Veränderungen
  - ▶ Translokationen bei Weichgewebstumoren und malignen Lymphomen
  - ▶ Spezifische Mutationen z.B.. myeloproliferative Neoplasien.
- ▶ Minimal residual disease

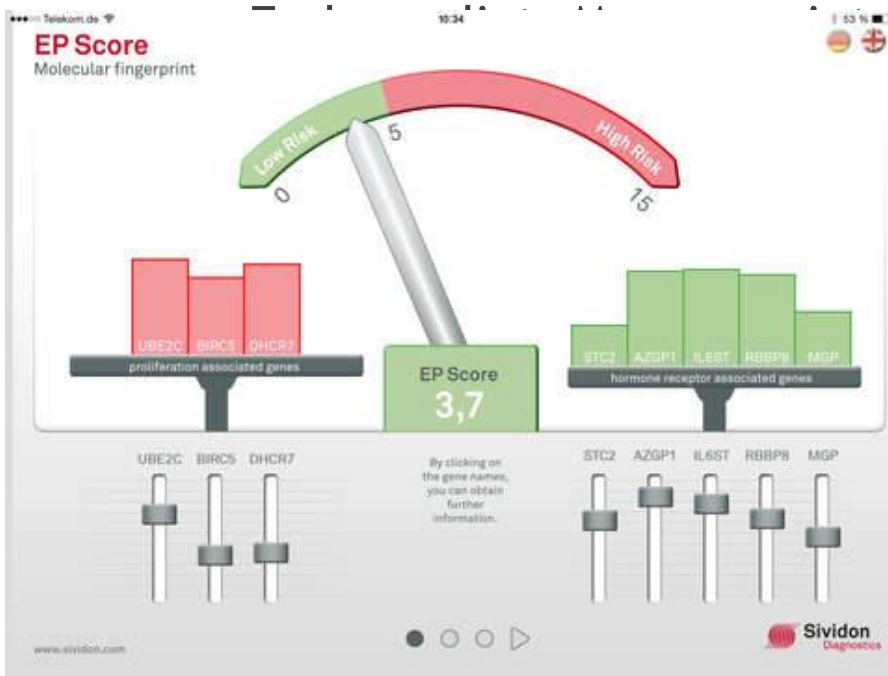
## ▶ Prognostische Tests

## ▶ Prädiktive Tests

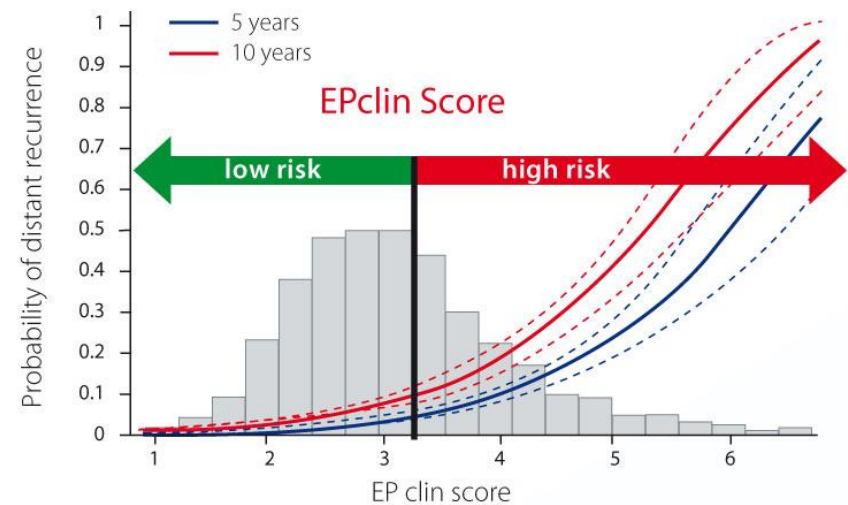
- ▶ Vorhersage des Therapieansprechens
- ▶ Therapiemonitoring: liquid biopsy

# Prognostische Tests

- ▶ Sehr große Zahl prognostischer Tests - limitierte praktische Verwendung
- ▶ Mammakarzinom



EndoPredict Indicates 10 year Risk of Distant Metastasis



Clear risk stratification based on 10% threshold



# Molekulare Untersuchungen in der Pathologie

## ▶ Diagnostische Tests

- ▶ Erkrankungsspezifische genetische Veränderungen
  - ▶ Translokationen bei Weichgewebstumoren und malignen Lymphomen
  - ▶ Spezifische Mutationen z.B.. myeloproliferative Neoplasien.
- ▶ Minimal residual disease

## ▶ Prognostische Tests

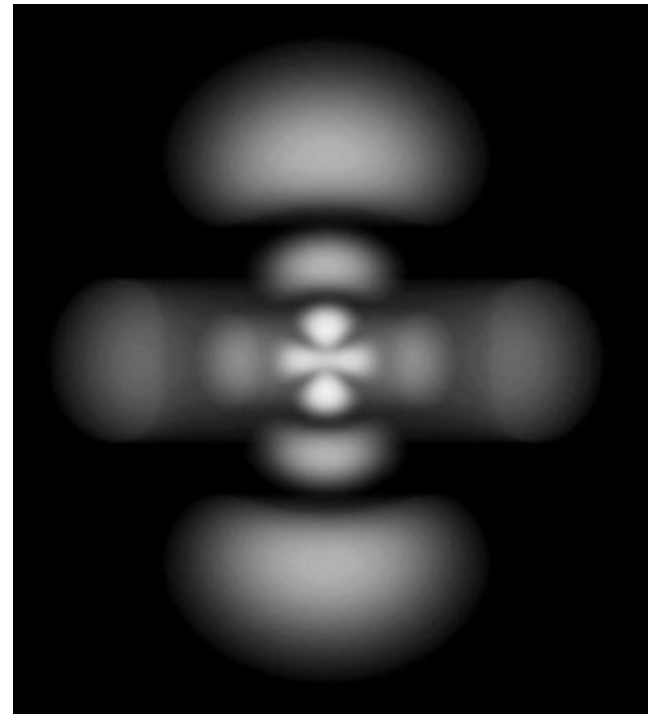
## ▶ Prädiktive Tests

- ▶ Vorhersage des Therapieansprechens
- ▶ Therapiemonitoring: liquid biopsy



**Prediction is very difficult,  
especially about the future**

Niels Bohr, 1885-1962



# Predictive tissue-based biomarkers for targeted therapies

## FDA/EMA-approved drug related eligibility tests according to Drug-Diagnostic Co-Development Initiative (selection)

- ▶ Tr
- ▶ Ta **Bereits jetzt ist bei 35% aller malignen Tumore ein**
- ▶ La
- ▶ Co **prädiktiver Test angebracht. Die Vorhersage des**
- ▶ Pa
- ▶ N **Ansprechverhaltens basiert exklusiv auf der Analyse**
- ▶ G
- ▶ E **von Tumorgewebe.**
- ▶ C
- ▶ Vemurafenib (PX4032) → **malignant melanoma** with mutated B-RAF
- ▶ Imatinib → **CML**, *bcr/abl*-positive (activated PK)
- ▶ Rituximab (+ CHOP), Y90-Ibritumomab, I131-Tositumomab → **Lymphoma** with CD20
- ▶ Gemtuzumab-Ozogamicin → **AML** with **CD33** ( > 60 yrs.), mal. Melanoma
- ▶ Imatinib → **GIST** with activated c-kit receptor tyrosine kinase/CD117, exon 9 mut
- ▶ ...

# Molekulare Untersuchungen in der Pathologie

## ▶ Prädiktive Tests

- ▶ Vorhersage des Therapieansprechens
- ▶ Therapiemonitoring: liquid biopsy

## ▶ Der erste Test - KRAS beim Dickdarmkarzinom

## ▶ Weitere Beispiele:

- ▶ Lungenkarzinom (EGFR, ALK, ROS1)
- ▶ Ovarialkarzinom (BRCA)
- ▶ Melanom (BRAF, NRAS, KIT)

# Gewebsbasierende molekularpathologische Analyse: „Schritt für Schritt“

- ▶ Klinische Fragestellung (z.B. RAS Mutationsanalyse für EGFR AB Therapie)
- ▶ Auswahl de geeigneten Gewebsblocks
  - ▶ Primärtumor - Metastase
- ▶ Areal am HE Schnitt markieren
  - ▶ beachte: Größe des Areals, Anteil an Tumorzellen, Nekroseareale...
- ▶ Prozentueller Anteil der Tumorzellen am Anweisungszettel vermerken
  - Anteil an Tumorzellen sollte mindestens doppelt so hoch sein, wie die Sensitivität der Methode
  
- ▶ ... Analyse ...

# Teil 2

▶ ... Analyse ...

▶ Diagnose:

▶ Neuen HE Schnitt prüfen - adäquates Gewebe, Anzahl an Tumorzellen ausreichend

▶ Schnitt wird nach den Schnitten für die molekulare Analyse angefertigt

▶ % Zahl der mutierten Allele mit % Zahl der Tumorzellen vergleichen

▶▶ Wenn die Anzahl der Tumorzellen unter dem zweifachen des Dektionslimits ist und keine Mutation nachgewiesen werden konnte

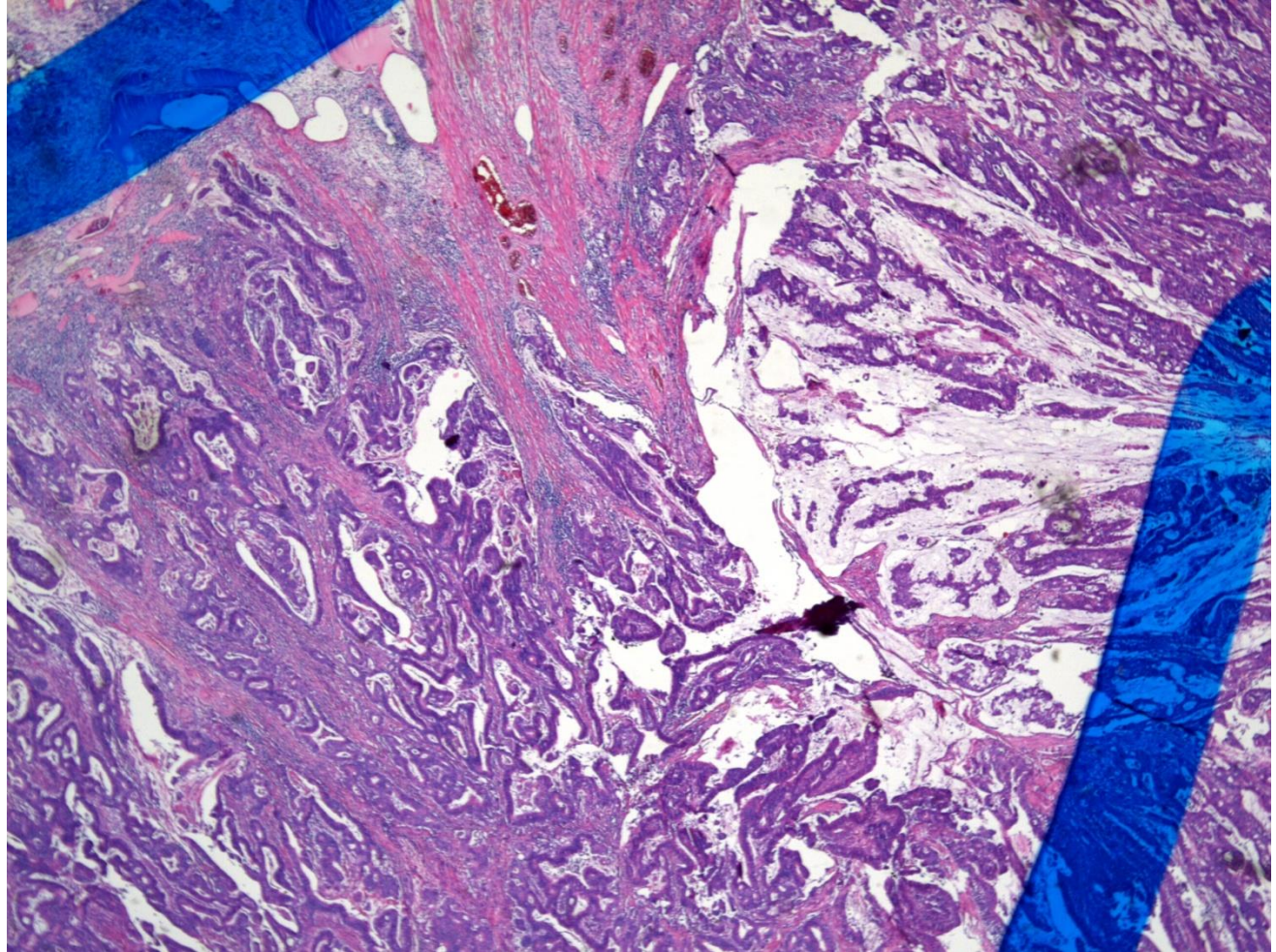
- eingeschränkte Beurteilbarkeit - muss in der Diagnose vermerkt werden

# Welche Markierungen sind sinnvoll?

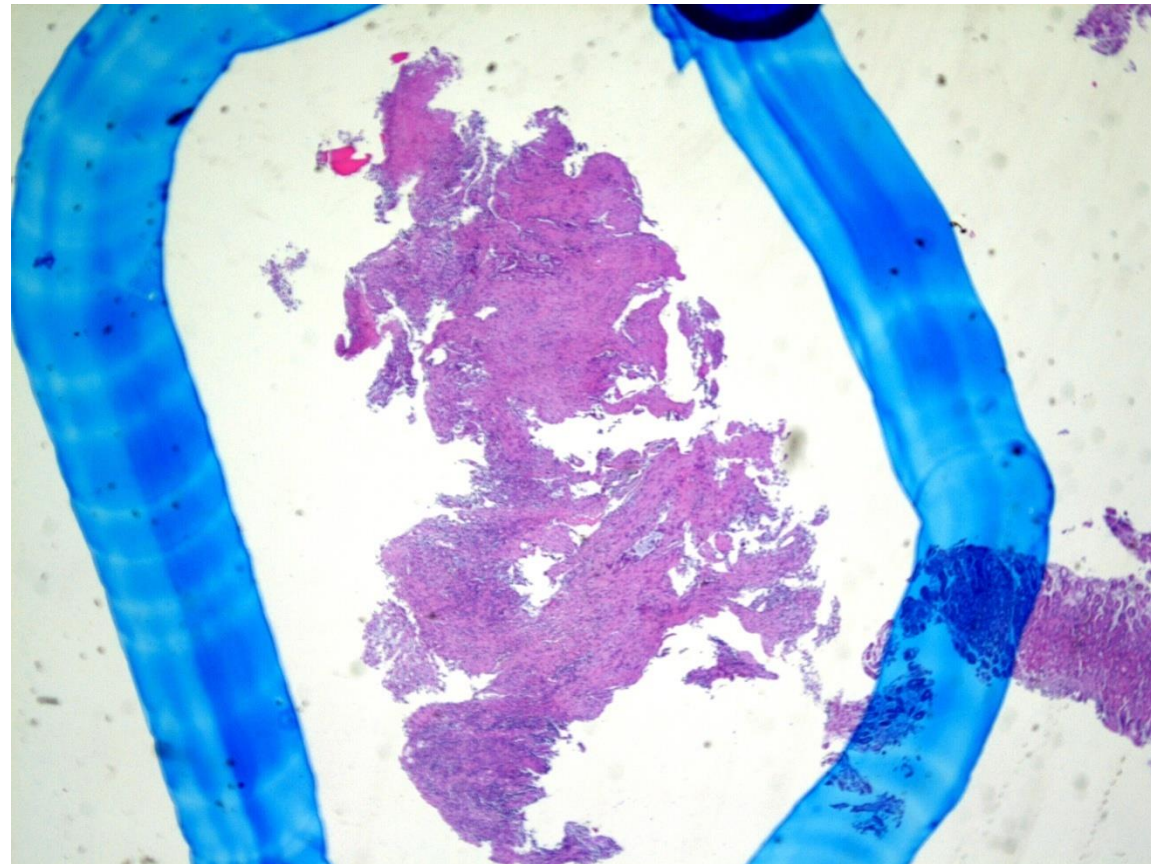




# Unnötig große Areale vermeiden

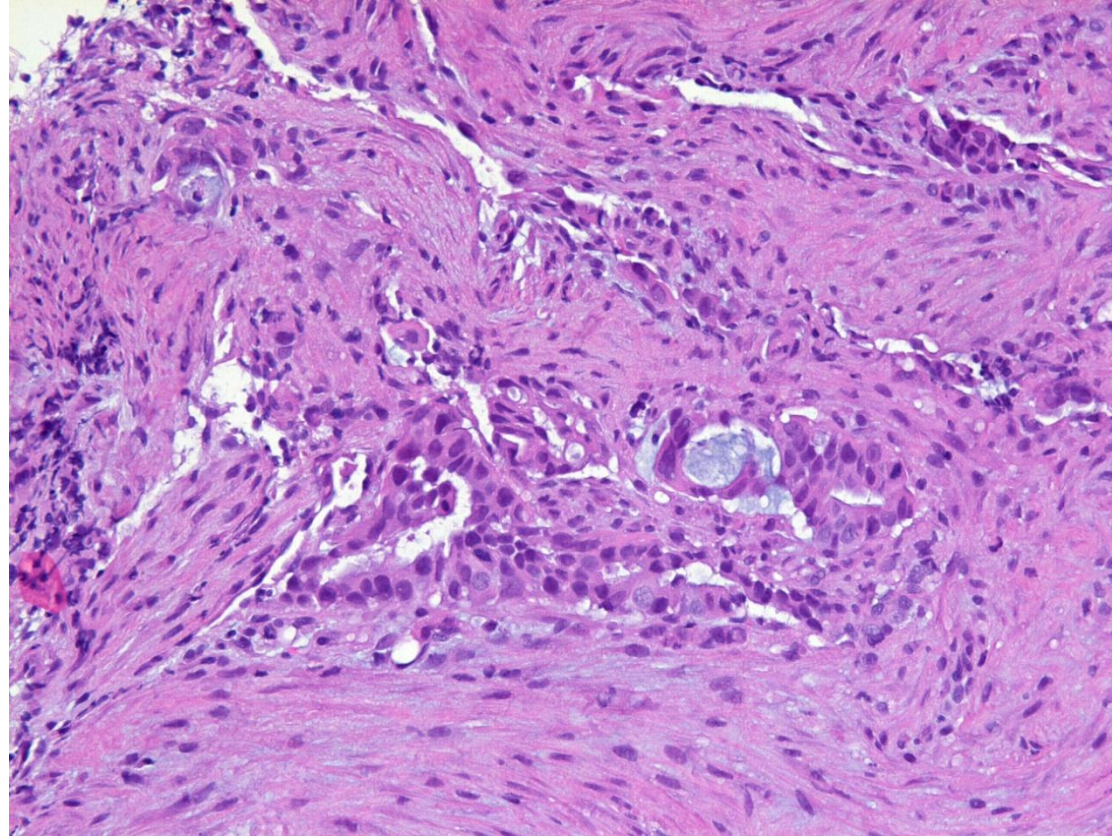


# Geringe Anzahl an Tumorzellen





# Geringe Anzahl an Tumorzellen

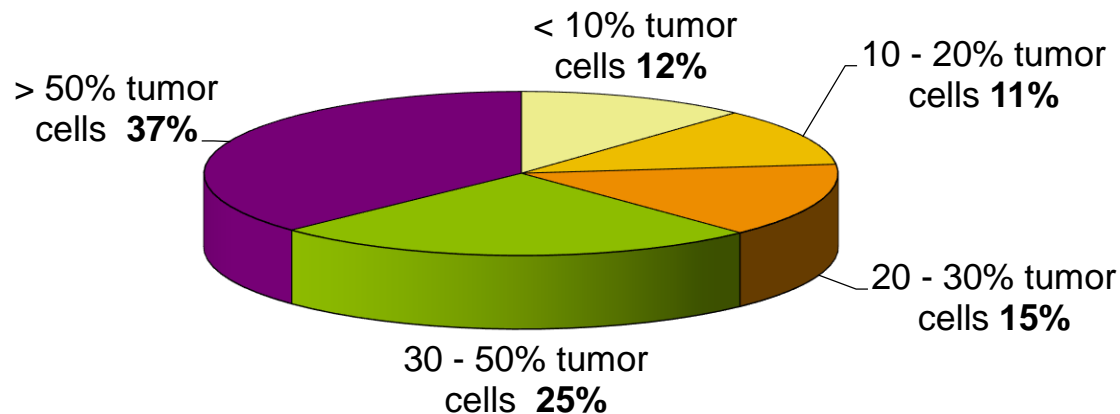


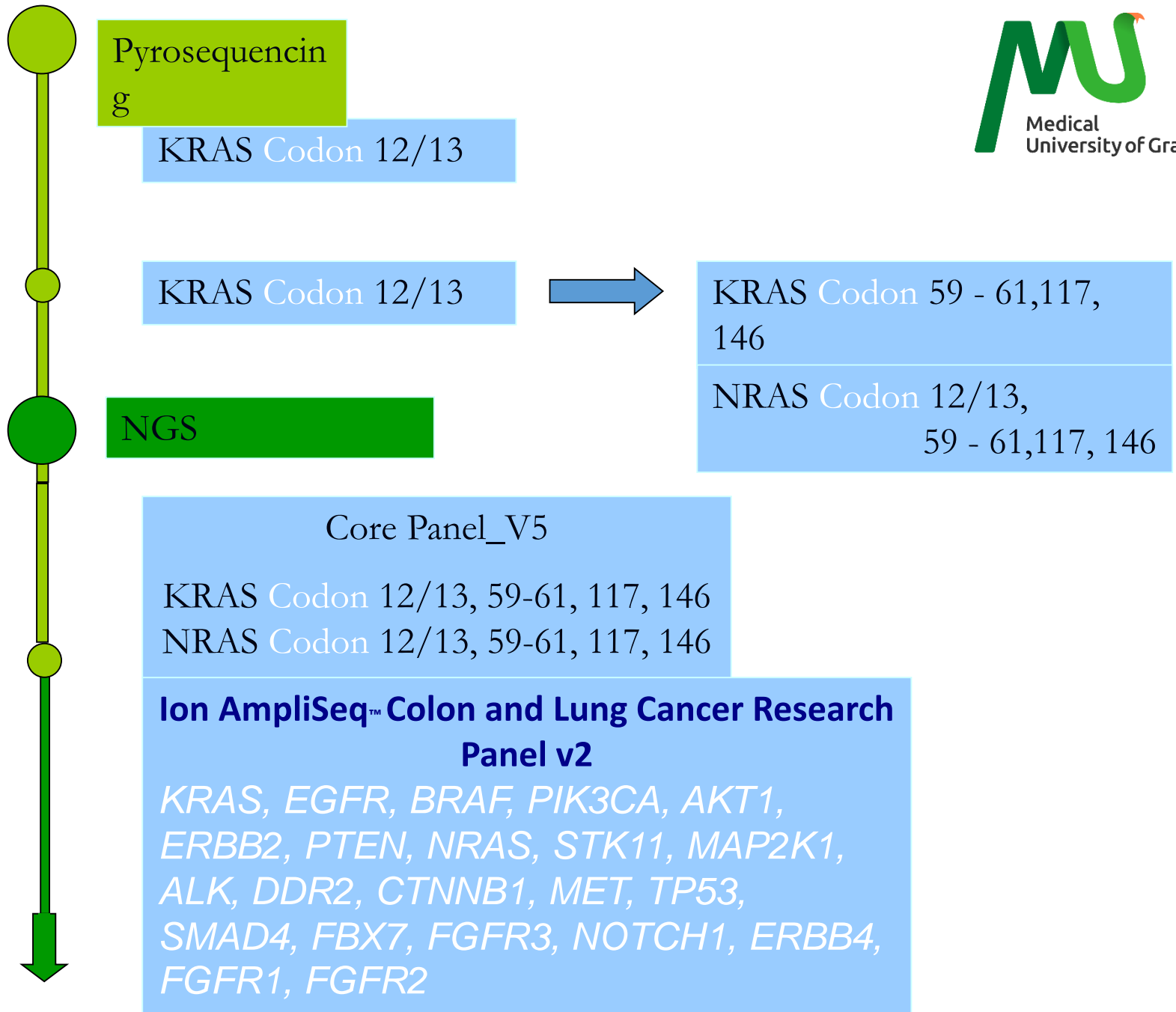
**Tumorzellgehalt 5-10%. EGFR wt.**  
**Abhängig von der Sensitivität der Methode**  
**- Eingeschränkte Beurteilbarkeit in der Diagnose anführen**

# Anteil der Tumorzellen im markierten Areal:

950 samples for KRAS – testing (2009 – 2011)

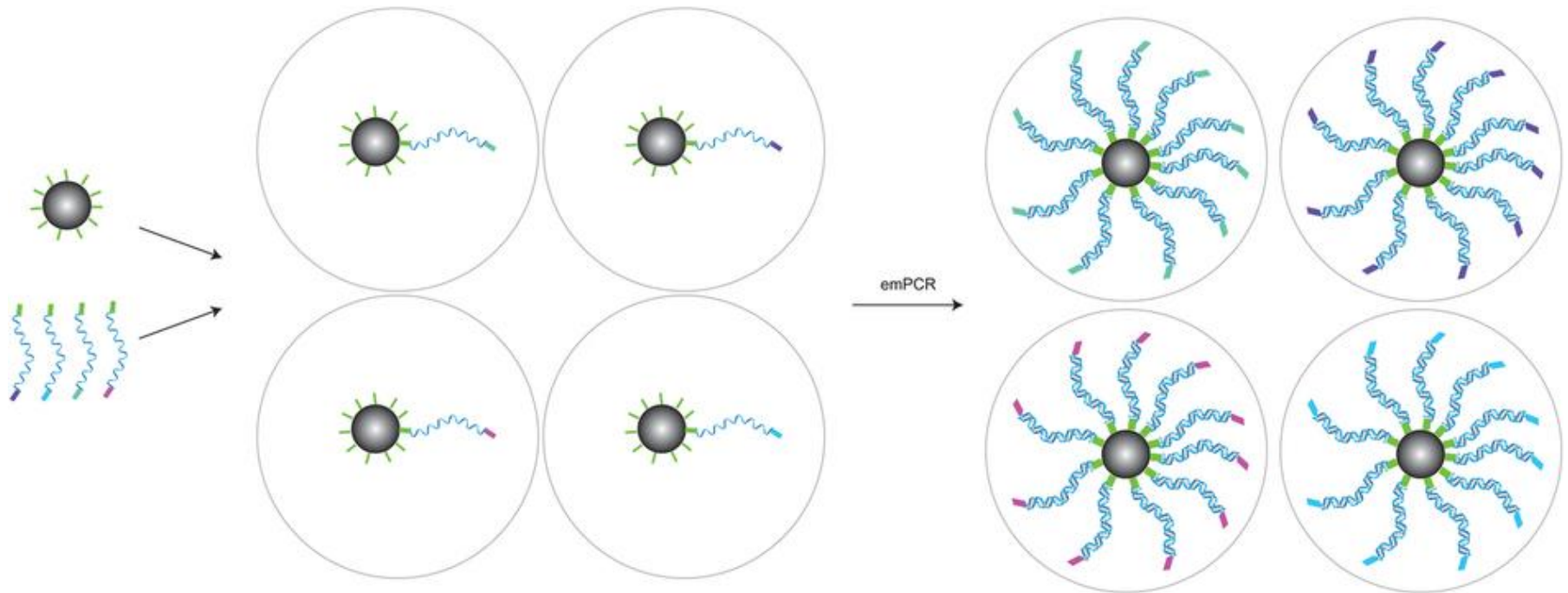
**23% aller Proben enthalten 20% oder weniger Tumorzellen**



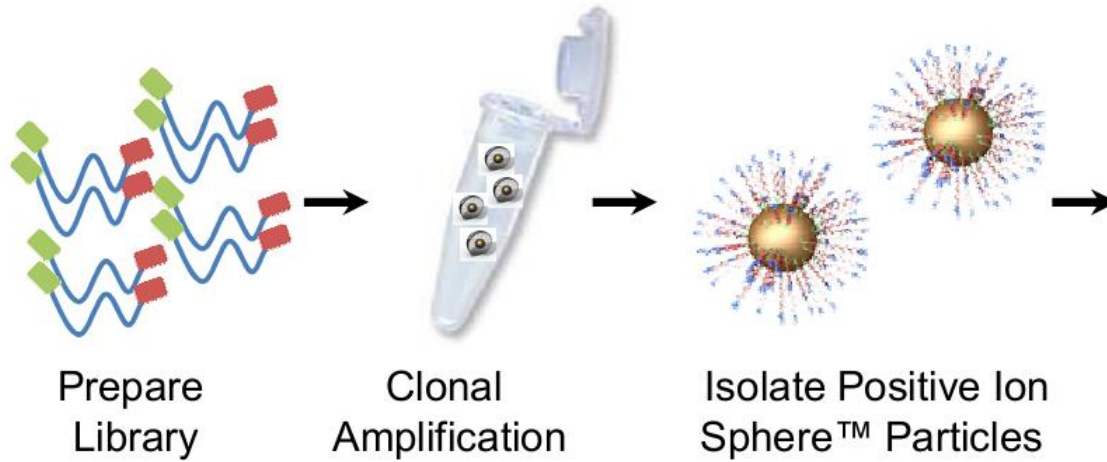




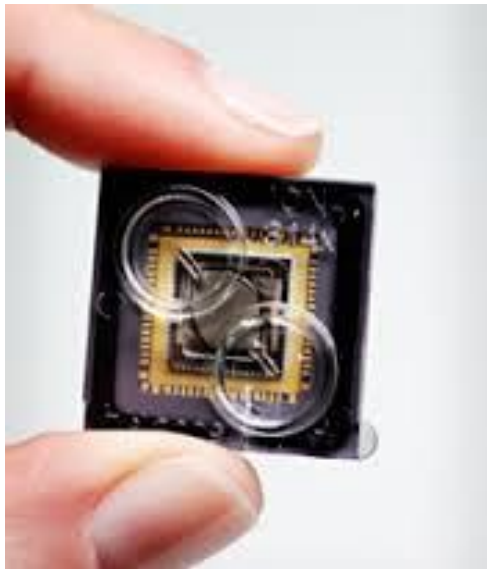
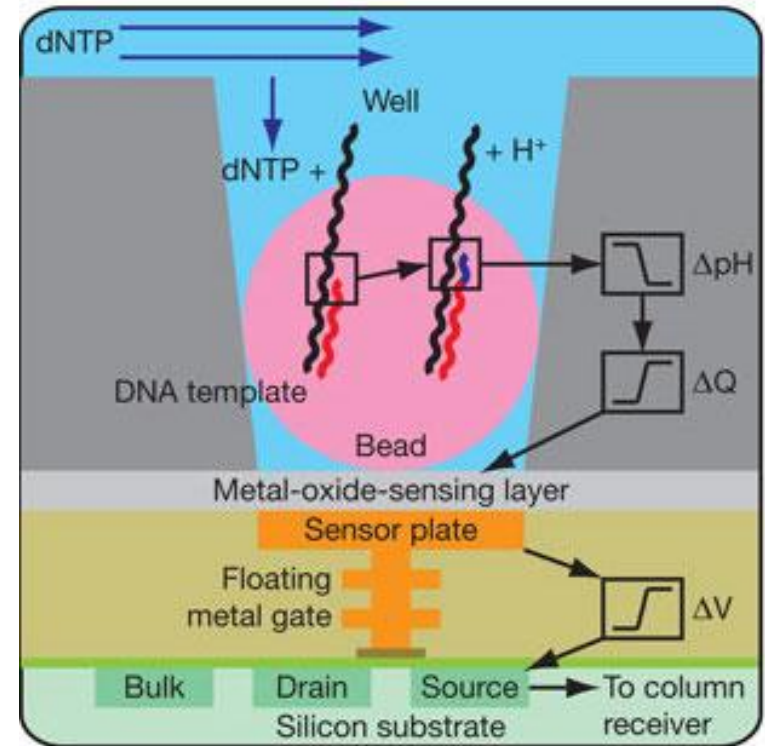
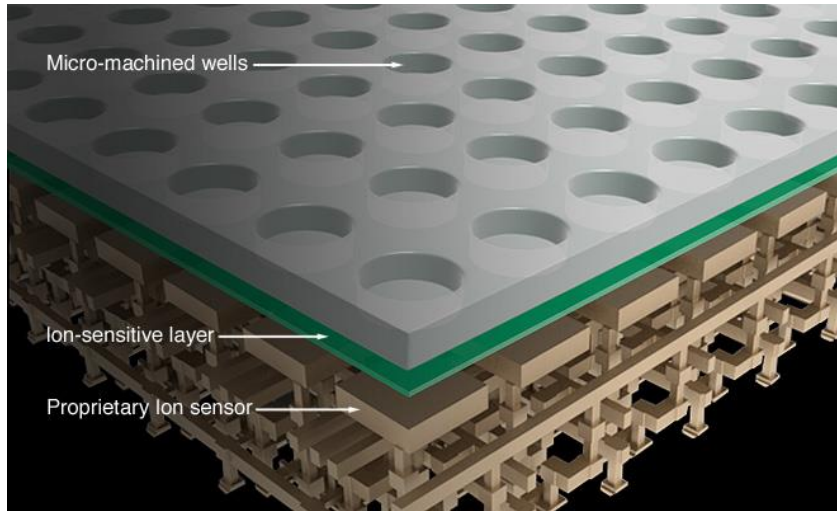
# Emulsion PCR



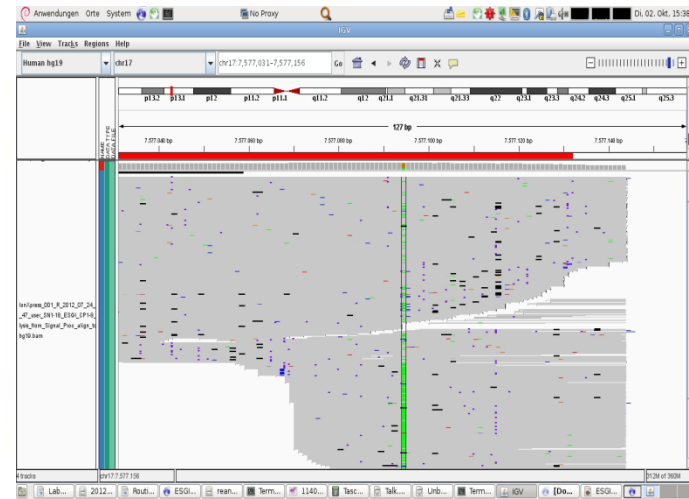
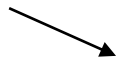
# Emulsion PCR



# Sequencing

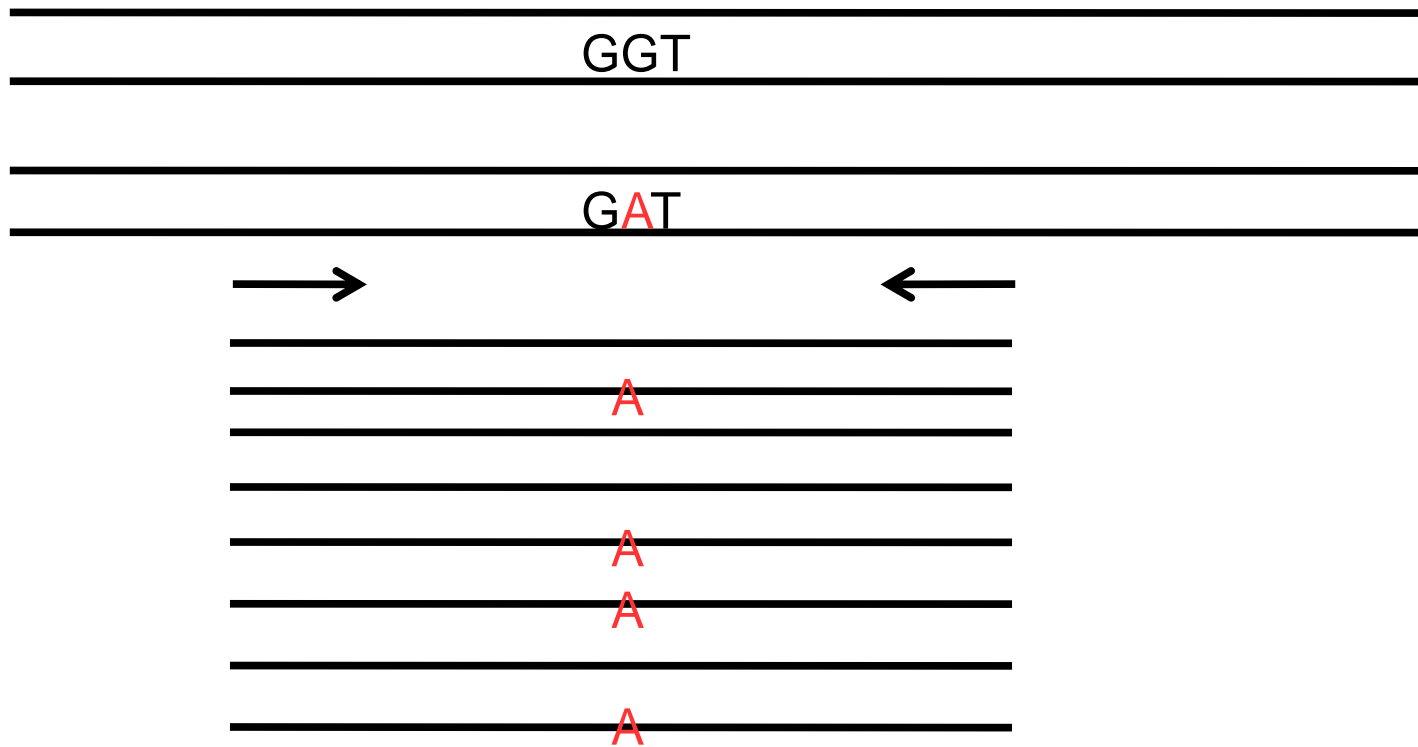


# Sequencing

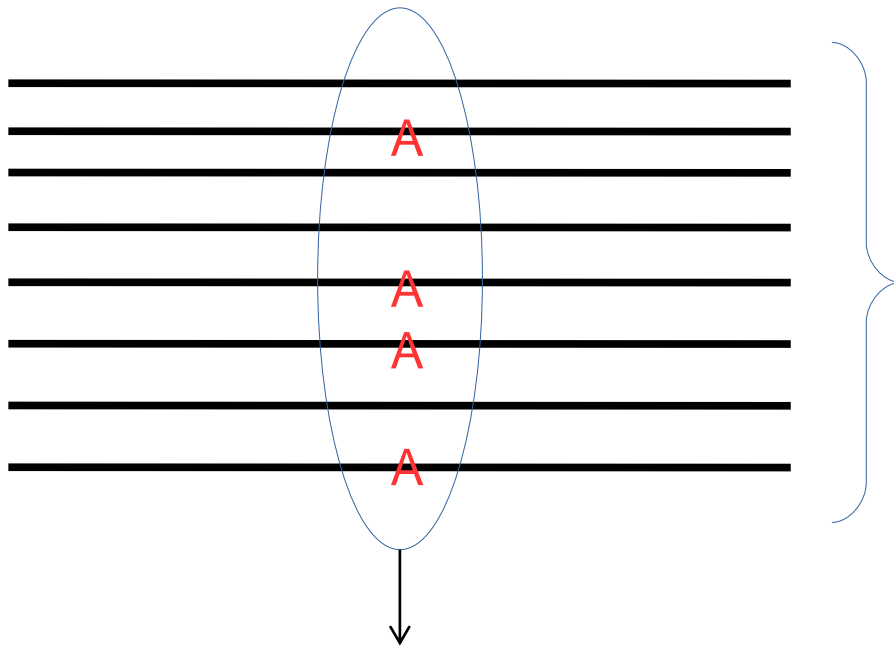


# Amplify Target Region

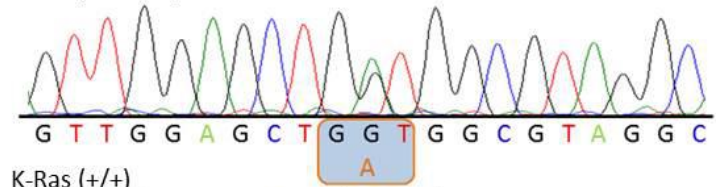
Glycine (G) => Aspartic Acid (D)



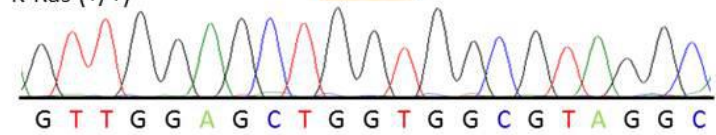




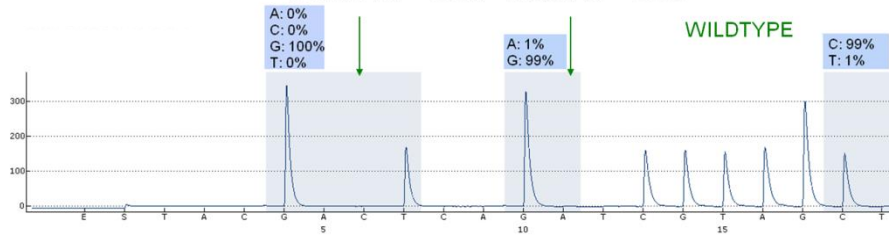
K-Ras (G12D/+)



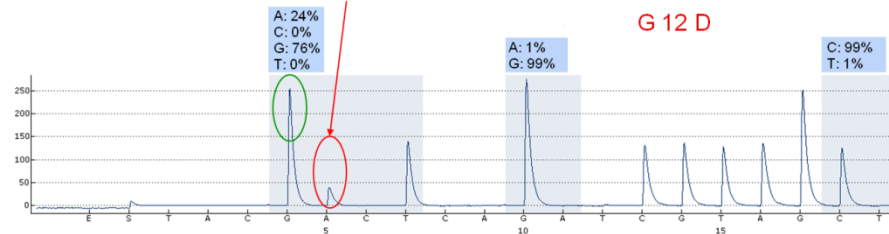
K-Ras (+/+)



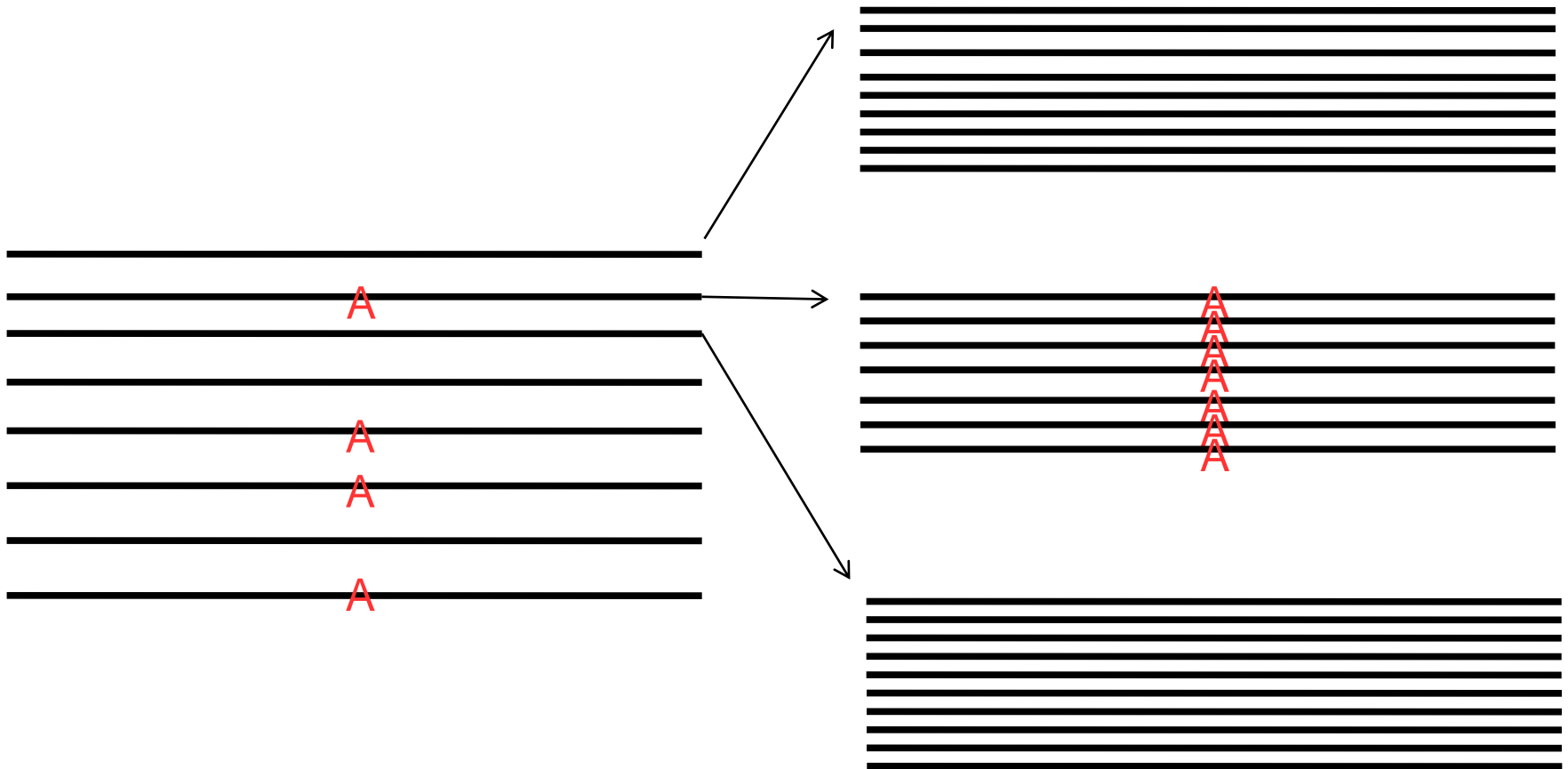
Codon 12 – GGT Codon 13 – GGC



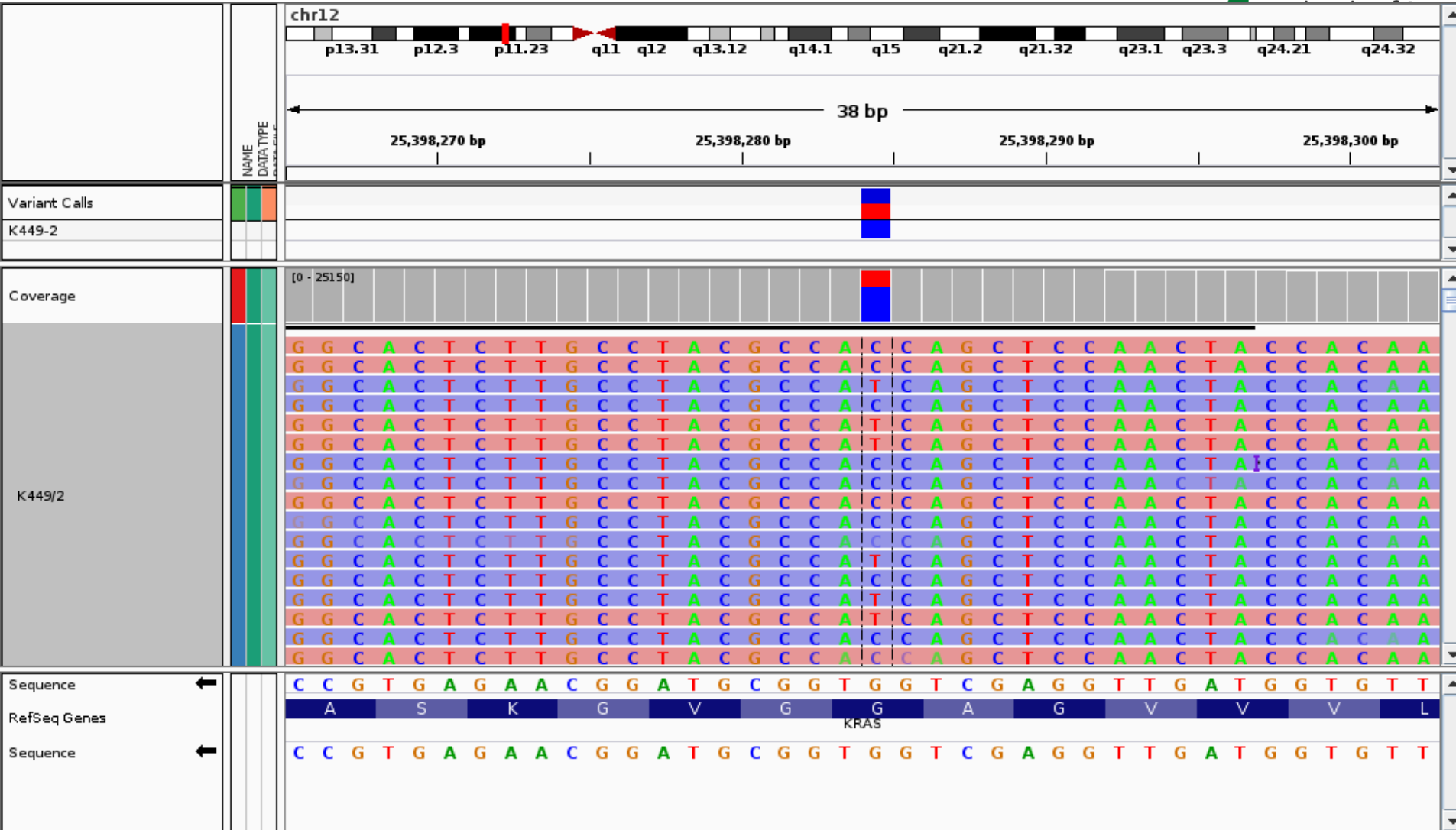
Codon 12 – GGT > GAT GLY 12 ASP  
G 12 D



# NGS: Clonal amplification



# NGS Data





## SPECIAL ARTICLE

# Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer



## *A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists*

Marilyn M. Li,<sup>\*†</sup> Michael Datto,<sup>\*‡</sup> Eric J. Duncavage,<sup>\*§</sup> Shashikant Kulkarni,<sup>\*¶</sup> Neal I. Lindeman,<sup>\*||</sup> Somak Roy,<sup>\*...\*</sup> Apostolia M. Tsimberidou,<sup>\*††</sup> Cindy L. Vnencak-Jones,<sup>\*‡‡</sup> Daynna J. Wolff,<sup>\*§§</sup> Anas Younes,<sup>\*¶¶</sup> and Marina N. Nikiforova<sup>\*...\*</sup>

## Tier I: Variants of Strong Clinical Significance

*Therapeutic, prognostic & diagnostic*

### Level A Evidence

FDA-approved therapy  
Included in professional guidelines

### Level B Evidence

Well-powered studies with consensus from experts in the field

## Tier II: Variants of Potential Clinical Significance

*Therapeutic, prognostic & diagnostic*

### Level C Evidence

FDA-approved therapies for different tumor types or investigational therapies  
Multiple small published studies with some consensus

### Level D Evidence

Preclinical trials or a few case reports without consensus

## Tier III: Variants of Unknown Clinical Significance

Not observed at a significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases, or pan-cancer or tumor-specific variant databases

No convincing published evidence of cancer association

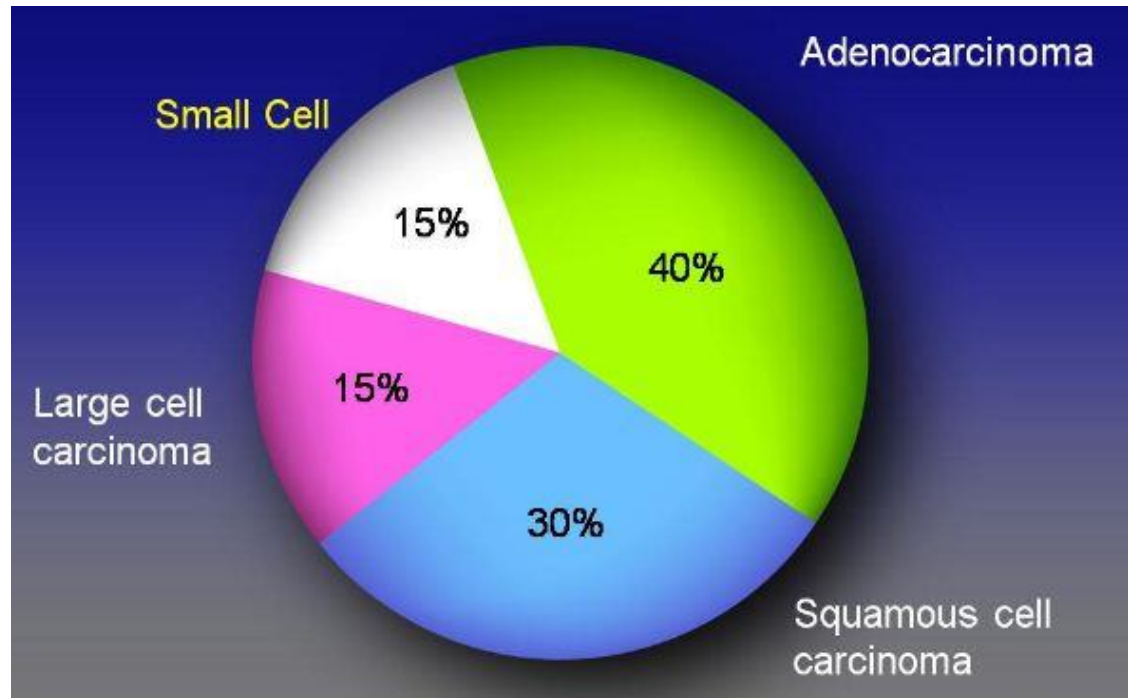
## Tier IV: Benign or Likely Benign Variants

Observed at significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases

No existing published evidence of cancer association

# Lungenkarzinom

## ► Kollektiv an heterogenen Tumorentitäten





# Adenokarzinom - derzeitige Situation

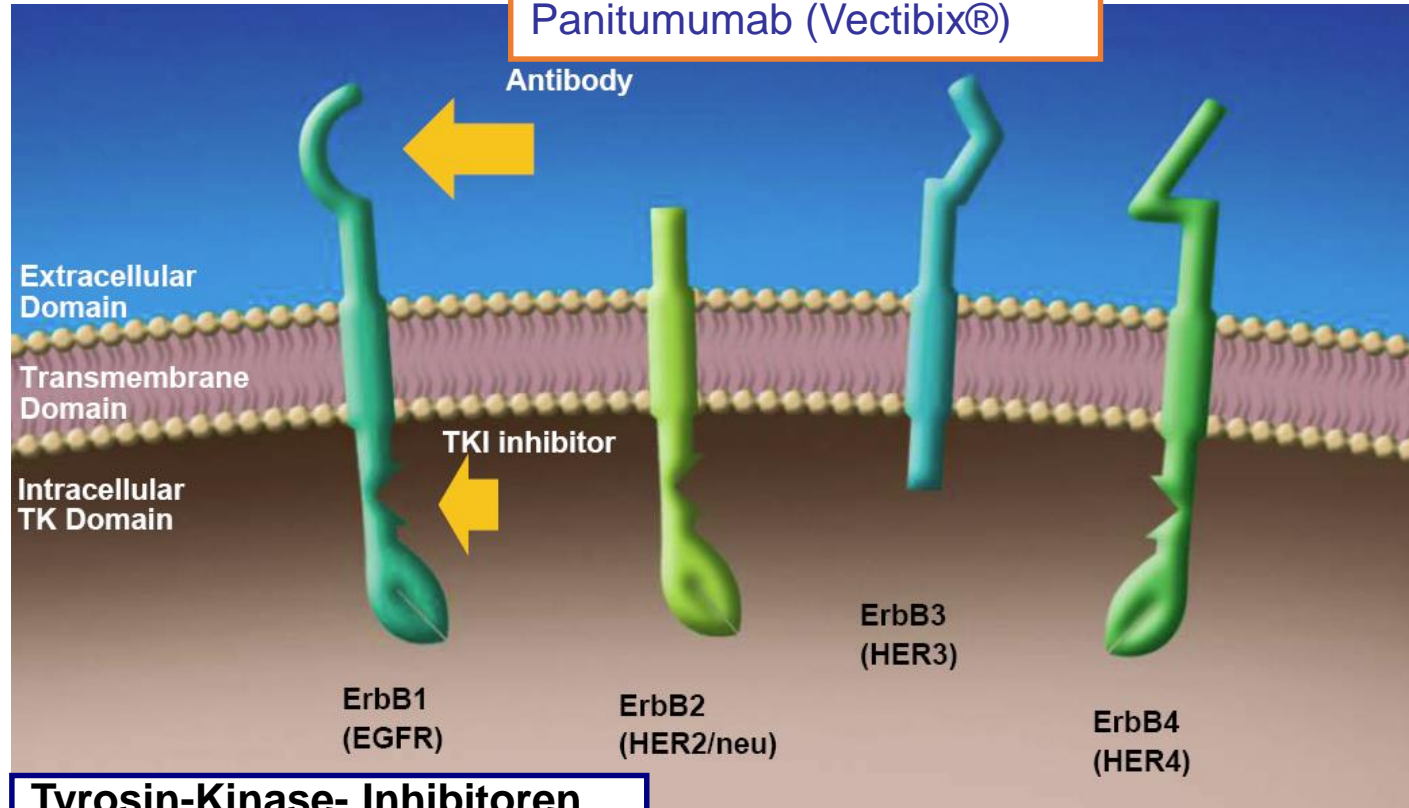
- ▶ Targeted therapy des Adenokarzinoms
- ▶ Prospektiv nachgewiesene prädiktive Biomarker mit Therapiemöglichkeit
  - EGFR (ca. 8-12% der Adenokarzinome)
  - ALK (ca. 4-7% der Adenokarzinome)
  - ROS1

# Mechanismen der EGFR gerichteten Therapie

## Antikörper

Cetuximab (Erbix®)

Panitumumab (Vectibix®)



## Tyrosin-Kinase- Inhibitoren

Erlotinib (Tarceva®)

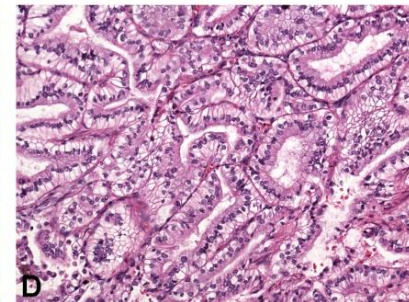
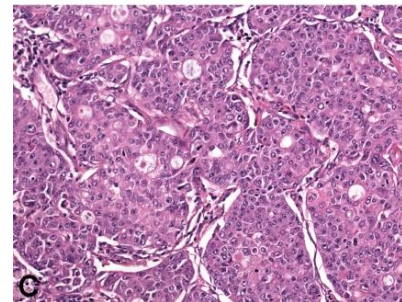
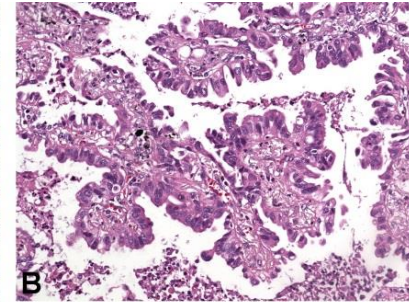
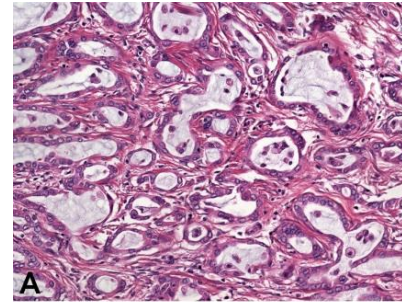
Gefitinib (Iressa®)

Lapatinib (Tyverb®)

AMGEN

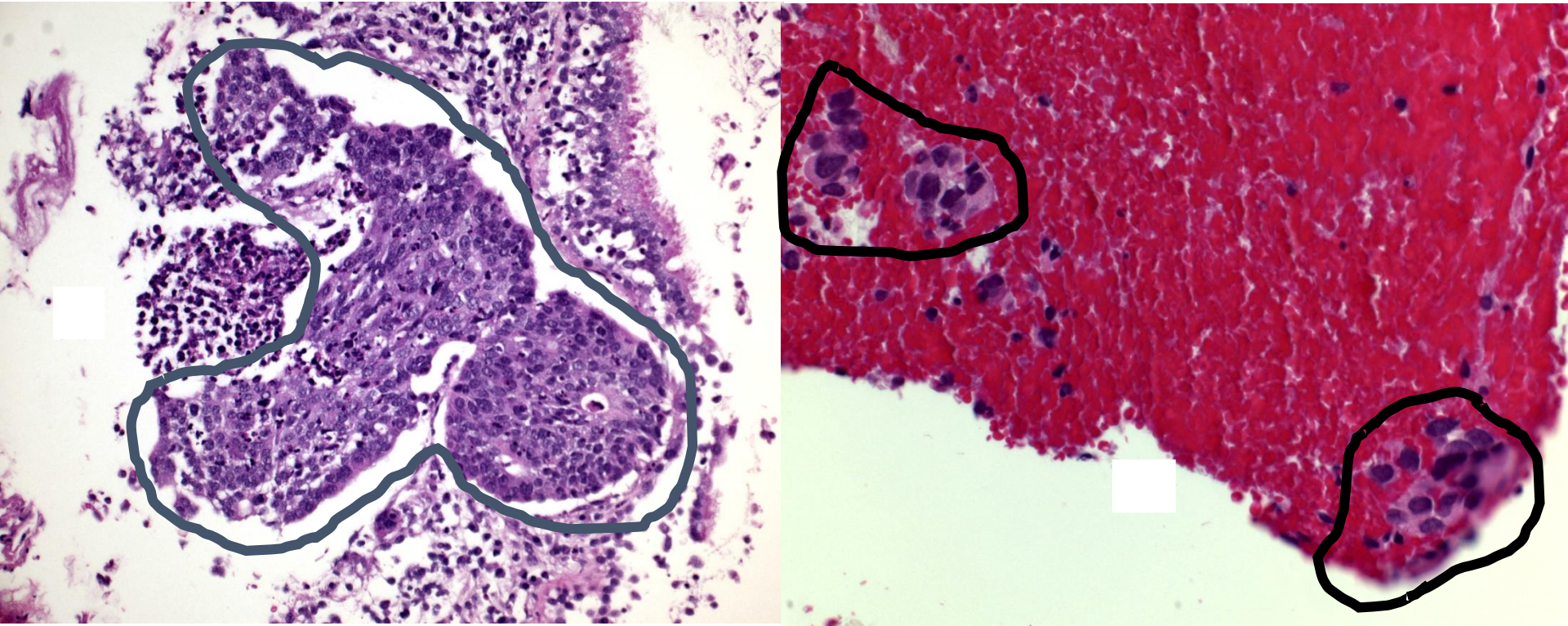
# Tests bei Adenokarzinomen - derzeitige Situation

- ▶ **Reflextestung**
  - ▶ Unabhängig von histologischem Subtyp (papillär / azinär / muzinös...)
- ▶ Immunhistochemie -> Mol.path.
- ▶ Mutationen NGS Panel (inkl. EGFR, ERBB2, BRAF, MET)
- ▶ Translokationen NGS Panel (inkl. ALK, RET, ROS, NTRK1-3)





# The tissue is the issue



- ▶ NGS: 20ng DNA entspricht ca. 300 Zellen
- ▶ Pyrosequencing: 5ng DNA entspricht ca. 75 Zellen

# Ion Ampliseq Lung Cancer Panel

- Ion Ampliseq Lung Panel (22 genes)
  - EGFR (Exons 18,19,20,21)
  - ALK (Exon 22, 23)
  - MET Exon 14
  - KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, STK11, MAP2K1, DDR2, CTNNB1, TP53, SMAD4, FBX7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2
- All hotspots sequenced from 5ng DNA

# Befund (entsprechend den ESP Guidelines)

- ▶ Stammdaten (Name, Geburtsdatum, Probennummer)
- ▶ Materialart
- ▶ % Tumorzellen im Untersuchungsmaterial
- ▶ Klinische Fragestellung, Indikationsstellung für die Untersuchung
- ▶ Untersuchungsmethode
  - ▶ Liste der untersuchten Mutationen inkl. Referenzsequenz
  - ▶ Sensitivität
- ▶ Ergebnis
  - ▶ Mutationstyp, standardisierte Nomenklatur HGVS - human genome variation society
  - ▶ COSMIC (catalogue of somatic mutations in cancer) ID
- ▶ Interpretation des Ergebnisses in Bezug auf die Fragestellung





## Molekularpath. Beschreibung

**Ausgangsmaterial:** Paraffinblock "42226/15 6xLS Landeskrankenhaus Graz West - Pathologie"  
Tumoranteil im markierten und manuell mikrodissoziierten Areal 15%

**Methode:** Das Ion AmpliSeq<sup>®</sup> Colon/Lung Cancer Panel V2 ist ein Multiplex-Panel mit 92 Amplicons für die Analyse von Hotspots in 22 in Lungen- und Colonkarzinomen relevanten Genen: ALK, AKT1, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11 und TP53

### **Ergebnis:**

Im untersuchten Material konnten im Doppelansatz in den Hotspotregionen der Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR Gens keine Mutationen nachgewiesen werden.

Es ist folgende Mutation nachweisbar:

**TP53:** NM\_000546:exon8:c.G800C:p.R267P, (hg19:chr17, 7577138) MAF: 22.35 und 20.28%

In den übrigen untersuchten Genabschnitten sind keine Mutationen nachweisbar.

## Molekularpath. Diagnose

Im vorliegenden Untersuchungsmaterial sind die häufigsten Mutationen im EGFR Gen nicht nachweisbar.

## Molekularpath. Beschreibung

**Ausgangsmaterial:** Paraffinblock "20178/15 III 5" Tumoranteil im markierten und manuell mikrodissoziierten Areal **70%**

**Methode:** Das Ion AmpliSeq<sup>®</sup> Colon/Lung Cancer Panel V2 ist ein Multiplex-Panel mit 92 Amplicons für die Analyse von Hotspots in 22 in Lungen- und Colonkarzinomen relevanten Genen: ALK, AKT1, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11 und TP53

### **Ergebnis:**

Im untersuchten Material konnte folgende Mutation im EGFR Gen nachgewiesen werden:

EGFR:NM\_005228:exon20:c.2300\_2301insCAGCGTGGA:p.A767delinsASVD, (hg19:chr7, 55249002) **MAF: 29.31 und 35.24%**

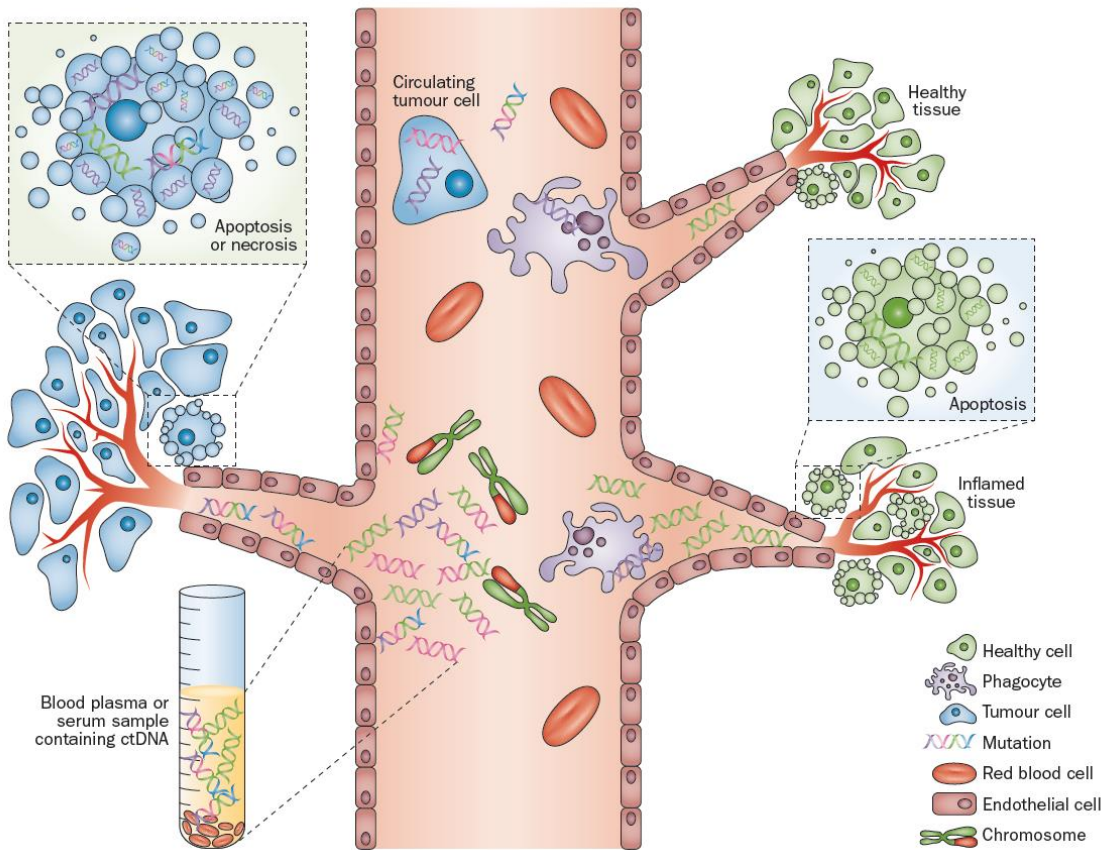
in den übrigen Genabschnitten sind keine Mutationen nachweisbar.

## Molekularpath. Diagnose

Die molekularpathologischen Untersuchung zeigt die **Mutation p.A767delinsASVD** im **Exon 20** des EGFR Gens im Tumorgewebe.

Nach derzeitigem Wissensstand entspricht dies einer **Resistenzmutation.**

# Liquid Biopsy



Crowley et al, Nat Rev Clin Oncol 10:472, 2013.

# Problem: Sensitivität

- ▶ Zerfall von Leukozyten
  - ▶ Erhöhung des Hintergrunds (normale DNA)
- ▶ Adsorption von DNA an Plastik (Bluttröhrchen)
  - ▶ Reduktion des Signals

## Lösungsmöglichkeiten

- ▶ Besseres sampling
  - ▶ Streck-tubes (DNA Stabilisierung - analog RNA later)
- ▶ Sensitivere Methodik
  - ▶ Suppressions-PCR, Digitale PCR Verfahren, ...

# Proposed testing scheme

