

Leistungsspektrum

MPN:

Jak2, MPL und CALR: Die hämatologischen Erkrankungen Polycythaemia vera (PV), essenzielle Thrombozythämie (ET) und die primäre Myelofibrose (PMF) sowie die Post-PV-/Post-ET-Myelofibrose sind klonale Knochenmarkserkrankungen, die zu der Gruppe der BCR-ABL-negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) gezählt werden. Durch die Entdeckung wichtiger Treiber-Mutationen in den hämatopoetischen Zellen von MPN-Patienten ist in den letzten Jahren ein wesentlicher Schritt für die molekulare Charakterisierung und Diagnose der BCR-ABL-negativen MPN gelungen. Die häufigste Genmutation ist die JAK2 p.V617F, weitere Treiber-Mutationen werden in den Genen Calretikulin (CALR) oder Thrombopoietin-Rezeptor (MPL) nachgewiesen. Funktionell führt sowohl die CALR- als auch die MPL-Mutation zu einer onkogenen Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs. Ein tripel-negativer MPN-Phänotyp lässt sich in 10 bis 15 % aller ET- und PMF-Erkrankungen nachweisen.

Gen	Häufigkeit			
	PV	ET	PMF	Häufig detektierte Mutationen
JAK2 (Exon 14)	95 %	50 – 60 %	55 – 60 %	p.V617F
JAK2 (Exon 12)	1-2 %			K539L, R541-E543delinsK, H538-K539delinsL, E543-D544del
CALR (Exon 9)		20 - 30 %	20 - 30 %	L367fs*46, K385fs*47
MPL (Exon 10)		5 %	5 – 10 %	p.W515K/L

Für den Nachweis der Hotspot-Mutationen JAK2 p.V617F und MPL p.W515K / L wird eine real time PCR (allelic discrimination) durchgeführt. Bei JAK2-negativen Patienten kann weiterhin das Exon 12 des JAK2-Gens mittels PCR amplifiziert werden um mittels Sanger-Sequenzierung die Region 538 bis 543 auf Mutationen zu untersuchen. Der Nachweis von somatischen Deletions- und

Insertionsmutationen im Exon 9 des CALR-Gens erfolgt ebenfalls über eine PCR-Amplifikation mit anschließender Sanger-Sequenzierung. Um die Präsenz seltener MPL-Mutationen zu sichern (W515R, W515S, W515G, W515A, W515*, S505N, A506T, A519T, L510P) können die relevanten MPL-Exone mittels Next-Generation Sequencing analysiert werden.

CML:

BCR-ABL qualitative PCR: Bei über 95 % der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und bei ca. 40 % der Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) ist die zytogenetische Veränderung t(9;22)(q34;q11), das sogenannte Philadelphia-Chromosom, nachweisbar. Dabei handelt es sich um eine Translokation der breakpoint cluster region (BCR) einschließlich des dazugehörigen Promoters auf Chromosom 22 und dem 3'-Bereich der ABL-Tyrosinkinase auf Chromosom 9. Das dadurch entstehende BCR-ABL-Fusionsgen führt zu einer konstitutiven Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase, was eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren indiziert.

Im ABL-Gen befindet sich der Bruchpunkt normalerweise im Intron 1, wobei der Bruchpunkt im BCR-Gen variiert. Bei der CML liegt dieser am häufigsten im Intron 13 (ehemals b2) oder 14 (ehemals b3), was zu einem 210 kDa großen Fusionsprotein (p210) führt und jeweils als major breakpoint bezeichnet wird. Liegt der Bruchpunkt in Intron 1 des BCR-Gens, dem sogenannten minor breakpoint, führt dies zu einem 190 kDa großen Protein (p190), was bei ca. 1 % der CML-Fälle zutrifft.

Zur Primärdiagnostik (Nachweis bzw. Ausschluss einer CML) erfolgt die Detektion der häufigsten BCR-ABL-Translokationen (major und minor breakpoint) mittels einer qualitativen One-Step-RT-PCR.

Klonalitätsanalysen:

IgH/TCR: Die histologisch exakte Diagnose von T-/ und B-Zelllymphomen stellt einer Herausforderung dar, Klonalitätsanalysen der variablen Regionen der T- und B-Zellrezeptorgene können zur Diagnosesicherung beitragen. Die PCR-basierte Fragmentanalyse (nach dem BIOMED-2 Protokoll) ist bislang die Standardmethode für den Nachweis von T/B-Zell-Rezeptor Klonalität. Für die Untersuchung der B-Zellrezeptor-Klonalität werden die Schwerkettenregionen Regionen FR1/2/3 Regionen sowie die Leichtketten kappa und lambda mittels Multiplex-PCR amplifiziert und ausgewertet. Die Untersuchung der TCR Rezeptorkette gamma (genauer die Regionen VA und VB) findet ebenfalls mittels Multiplex-PCR statt. Eine relativ neue, bei uns im Labor etablierte Methode (Lymphotrack®) basiert auf einer NGS-Sequenzierung und deckt zusätzlich die TCR beta Rezeptorkette ab. Der Hauptvorteil dieser Methode gegenüber der Multiplex-PCR liegt in der höheren diagnostischen Auflösung. Durch die Sequenzanalyse sind klonale Amplifikate eindeutig bestimmbar und in Verlaufskontrollen leichter dem Ursprungsklon zuzuordnen. Zudem ist diese Methode technisch sensitiver als die PCR, was vor allem bei Proben mit geringem Gehalt an malignen Zellen vorteilhaft ist.

Solide Tumoren:

EGFR: Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) weist in ca. 10% der Lungenkarzinome aktivierende Mutationen in der Kinase-Domäne (Exons 18-21) auf. Diese Mutationen sind sensitiv gegenüber EGFR-Tyrosinkinase-Inhibition. Im Exon 20 finden sich zudem primäre Resistenzmutationen (Exon 20 Insertionen) die eine Therapieresistenz gegenüber TKI der ersten, zweiten und dritten Generation bewirken. Im Exon 20 befindet sich zudem die häufigste Resistenzmutation gegenüber TKI der ersten und zweiten Generation p.T790M. Wir führen den Test auf EGFR-Mutationen mittels hybrid capture NGS durch werden und alternativ im *fast track* Verfahren via cobas® (Roche Diagnostics).

KRAS/NRAS: Mutationen in KRAS und NRAS kommen in unterschiedlicher Frequenz in einer Vielzahl solider Tumoren vor, insbesondere beim metastasierten kolorektalen Karzinom (mCRC) (KRAS und NRAS Codons

12/13/59/61/146) und beim malignen Melanom (hier vor allem NRAS Codon Q61), seltener bei Lungenkarzinomen und anderen Tumoren. Die KRAS/NRAS-Mutationen kommen an genau definierten Hotspots vor, weshalb sich auch ein Nachweis mittels Sanger Sequenzierung anbietet. Alternativ sind diese Gene bereits in verschiedenen NGS-Panels der HpH integriert und können im Verbund mit weiteren genetischen Alterationen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Ein prädiktiver Wert der NRAS/KRAS-Mutationen ist vor allem für das mCRC gezeigt worden, therapeutische EGFR-Antikörper sind nur indiziert wenn beide Gene in der Tumorprobe Wildtypkonfiguration zeigen.

BRAF: Im BRAF-Gen ist es vor allem das Codon V600 welches beim malignen Melanom mit 50% am häufigsten mutiert vorliegt und als prädiktiver Marker auf das Ansprechen von BRAF-Inhibitoren bekannt ist. Dieser Biomarker wird üblicherweise über RT-PCR basierte Verfahren nachgewiesen, BRAF ist aber mittlerweile auch ganzheitlich (alle Exons) Teil unserer NGS-Panels, denn erstens sind bereits weitere Mutationen (ausserhalb V600) zumindest präklinisch als sensitiv gegenüber zielgerichteter Inhibition beschrieben worden. Dies wird in Zukunft die Testung des gesamten BRAF-Gens nötig machen. Zweitens reicht die isolierte Betrachtung des BRAF-Mutationsstatus in einigen Fällen nicht aus und sollte in Zusammenschau mit weiteren Genen erfolgen (siehe Beispiel Mikrosatelliten-Instabilität).

Mikrosatelliten-Instabilität: Bei dem Test auf Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) handelt es sich um Nachweis von Mutationen in nicht-codierenden Regionen deren Ursache in einem fehlerhaften DNA-Reparatursystem begründet ist. Einer MSI-Untersuchung „vorgeschaltet“ ist daher üblicherweise eine immunhistochemische Analyse bestimmter DNA-Reparaturenzyme (v.a. MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2). Wenn mehrere dieser Proteine nicht exprimiert werden, ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer MSI (definiert als mind. 2 von 5 Markern BAT25, BAT26, NR21, NR24, Mono27 positiv) hoch.

KIT und PDGFRA: Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) zeichnen sich häufig (ca. 85%) durch Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT aus. Vor allem Exon 11 (~70%), Exon 9 (10–15%), Exon 13 (1–3%), und Exon 17 (1–3%) sind

durch Mutationen gekennzeichnet, die prädiktiv auf das Ansprechen von ABL-TKI (z.B. Imatinib) beschrieben wurden. Seltener finden sich KIT-Mutationen auch bei malignen Melanomen (2-6%). PDGFRA-Mutationen sind bei GIST mit einer Häufigkeit von etwa 10-15% beschrieben worden. PDGFRA-Mutationen befinden sich häufig in den Exons 12/18 und seltener im Exon14. Generell zeichnen sich PDGFRA-mutierte GIST durch eine relativ gute Prognose aus und zeigen sich zudem sensitiv auf das Ansprechen von ABL-TKI. Eine wichtige Ausnahme findet sich im Exon 18: die Punktmutation D842V bewirkt eine primäre Resistenz gegenüber Imatinib. Die bekannten Mutationen in KIT und PDGFRA sind über einen relativ großen exonischen Bereich verteilt, weshalb Sequenzierungsmethoden den PCR-basierten Tests vorgezogen werden. In der HpH erfolgt der Mutationsnachweis daher entweder mittels Sanger Sequenzierung oder dem Hybrid Capture-NGS. Letztere Methodik bietet den Vorteil der Abbildung der gesamten Gensequenz und damit die Sicherheit alle denkbaren, auch selteneren Mutationen nachzuweisen.

Hybrid Capture-NGS-Analyse für Lungenkarzinome und andere solide Tumorentitäten:

Das hier zum Einsatz kommende NEOselect-Panel umfasst insgesamt 39 Gene und wurde entwickelt, um Punktmutationen, kleine Insertionen und Deletionen (InDels), Kopienzahlveränderungen, sowie Gentranslokationen (z.B. ALK) an einer Probe zu detektieren (siehe Tab. A). Zusätzlich zu den beim Lungenkarzinom relevanten Genen können mithilfe dieses Panels weitere auch für andere Tumorentitäten wichtige prädiktive oder prognostische Biomarker analysiert werden, unter anderem BRCA1/2, TP53, KEAP und STK11. KEAP und STK11 Mutationen wurden mit einer primären Resistenz gegenüber immunonkologischen Therapien in Zusammenhang gebracht. Basierend auf diesem NGS-Panel sind zwei Erweiterungen verfügbar (NEOPlus/LEOLiquid). Diese Panels erlauben zum einen den Mutationsnachweis an der Liquid Biopsy und zum anderen zusätzlich den Nachweis komplexerer Biomarker wie NTRK, und TMB (Tumor Mutational Burden).

Tab. A: Auf Punktmutationen, InDels und Kopienzahlveränderungen untersuchte Gene.

ALK	Exon 1 bis 29	KEAP1	Exon 2 bis 6
ARAF	Exon 2 bis 16	KIT	Exon 1 bis 21
ATM	Exon 2 bis 63	KRAS	Exon 2 bis 5
ATR	Exon 1 bis 27	MAP2K1	Exon 1 bis 11
BRAF	Exon 1 bis 18	MDM2	Exon 1 bis 11
BRCA1	Exon 2 bis 24	MET	Exon 2 bis 21
BRCA2	Exon 2 bis 3, 5 bis 27	MTOR	Exon 2 bis 58
CDK4	Exon 2 bis 8	NFE2L2	Exon 1 bis 5
CDKN2A	Exon 1 bis 3	NRAS	Exon 2 bis 5
CDKN2B	Exon 1 bis 2	PDGFRA	Exon 2 bis 23
CTNNB1	Exon 2 bis 15	PIK3CA	Exon 2 bis 21
DDR2	Exon 4 bis 19	PTEN	Exon 1 bis 9
EGFR	Exon 1 bis 28	RB1	Exon 1 bis 27
ERBB2	Exon 1 bis 27	RET	Exon 1 bis 20
FGFR1	Exon 3 bis 19	ROS1	Exon 1 bis 43
FGFR2	Exon 2 bis 18	STK11	Exon 1 bis 9
FGFR3	Exon 2 bis 18	TP53	Exon 2 bis 11
HRAS	Exon 2 bis 5	TSC1	Exon 3 bis 23
IDH1	Exon 3 bis 10	TSC2	Exon 2 bis 42
IDH2	Exon 1 bis 11		

Tab. B: Gene, die auf Genfusionen untersucht wurden.

ALK	FGFR3
BRAF	RET
FGFR1	ROS1
FGFR2	

Mit dem NEOplus-Panel kann neben den oben genannten Genen auch die Tumormutationslast (TMB) in insgesamt 340 Gene und einem exonischen Territorium von > 1,1 Mb bestimmt werden.