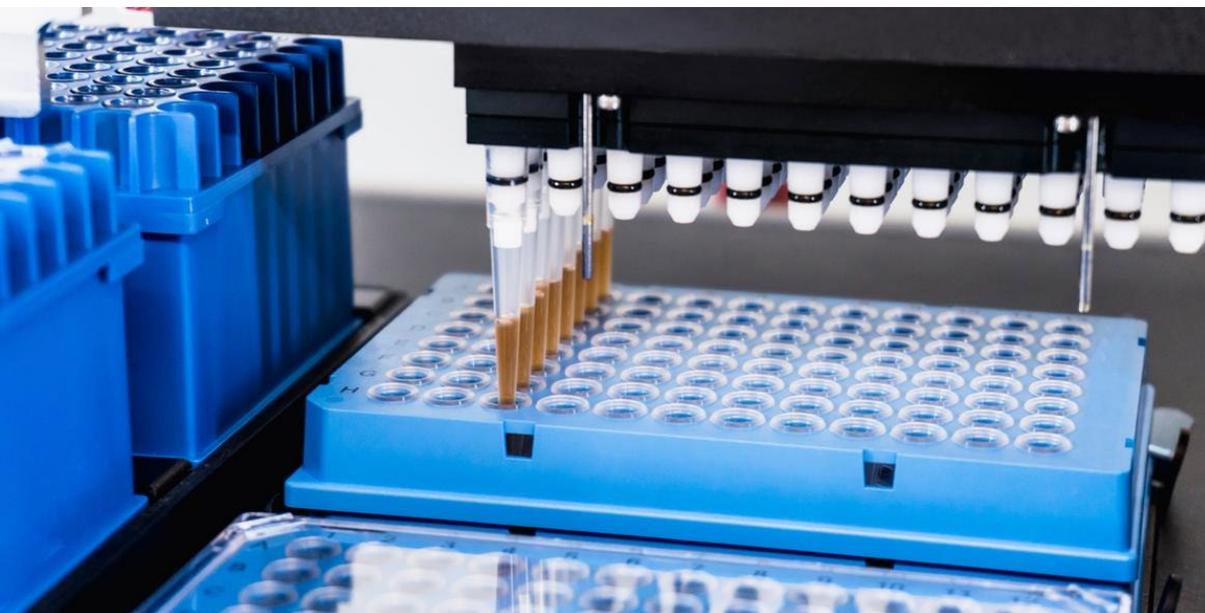




Molekularpathologie / Onkologie

## Panel-Diagnostik statt Hot-Spot? Das sind die Unterschiede

NGS, WGS, SNV – Was steckt hinter diesen Abkürzungen aus der molekular-pathologischen Diagnostik? Welchen Nutzen bringt NGS-basierte Panel-Diagnostik in der Onkologie? Antworten rund um Methoden der molekularen Tumordiagnostik gibt diese Übersicht.



### Pfade der molekularen Tumordiagnostik auf einen Blick

Eine erste Antwort auf die Eingangsfragen bietet diese strukturierte Einordnung der Methoden in der Tumordiagnostik:

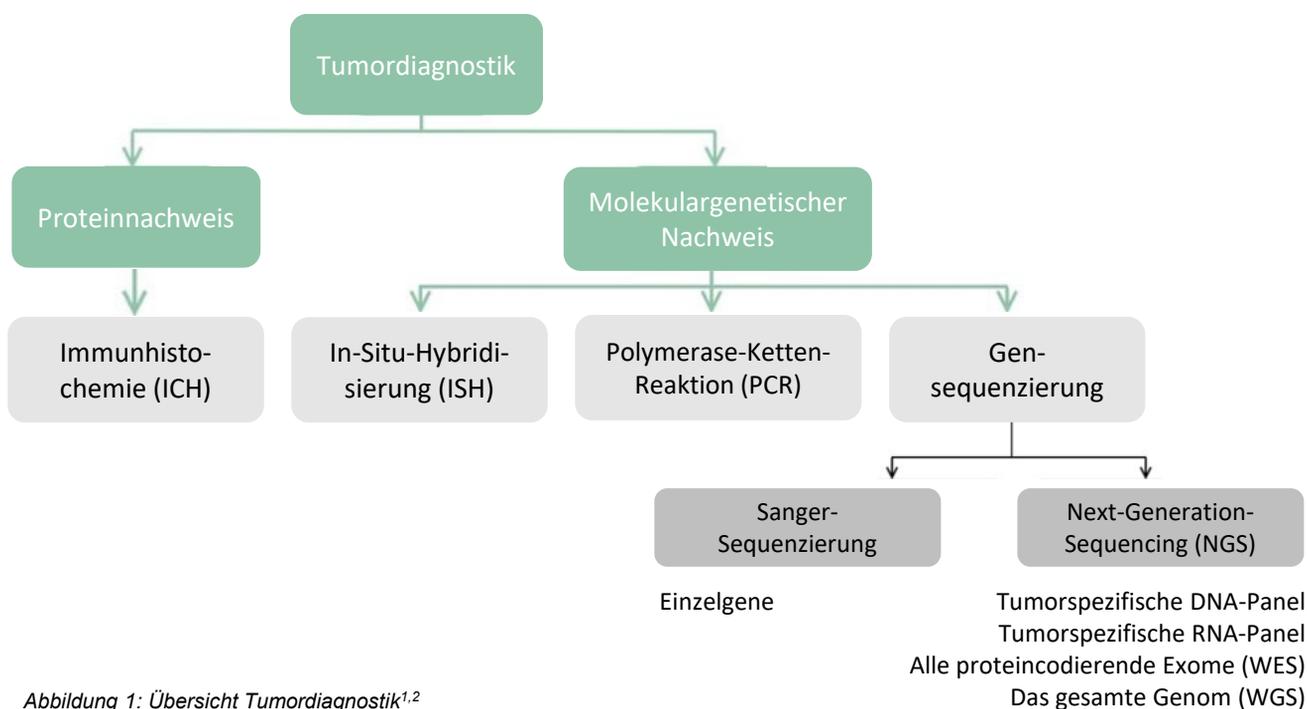


Abbildung 1: Übersicht Tumordiagnostik<sup>1,2</sup>



## NGS erweitert die molekulare Tumordiagnostik

Next-Generation Sequencing (NGS) umfasst Hochdurchsatz-Methoden, die in kurzer Zeit und parallel Millionen von Gensequenzen analysieren.<sup>2</sup> Abhängig von der klinischen Fragestellung ermöglicht die NGS-gestützte molekulare Diagnostik die Analyse

- einer bestimmten Anzahl an Genen auf DNA- oder RNA-Ebene (Panel-Diagnostik),<sup>2</sup>
- der mehr als 20.000 funktionellen Gene, d.h. aller proteincodierenden Exome (Whole Exome Sequencing, WES),<sup>2</sup>
- des gesamten Genoms, d.h. aller proteincodierenden (1,2 %) und nicht-codierenden DNA-Sequenzen (Whole Genome Sequencing, WGS).<sup>2</sup>

### Mutationen liegen auch außerhalb der „klassischen“ Hot Spots

Für das metastasierte Kolorektalkarzinom (mKRK) zeigte eine retrospektive Analyse der PRIME Studie, dass RAS<sup>a</sup> Mutationen in 17 % der Fälle nicht erkannt wurden, da sie außerhalb des KRAS<sup>a</sup>-Mutations-Hot-Spots Exon 2 liegen. Das hat große Bedeutung für die Therapie: Der Ausschluss einer RAS<sup>a</sup>-Mutation ist notwendig, um festzustellen, welche Patienten von einer zielgerichteten EGFR<sup>b</sup>-Antikörper-Therapie, z.B. mit Cetuximab oder Panitumumab, profitieren. Durch die NGS-basierte Panel-Diagnostik ist es heutzutage möglich mehrere Mutationen in einem Schritt zu beurteilen.<sup>3</sup>

a (Kirsten) rat sarcoma viral oncogene homolog

b Epidermal growth factor receptor

## Was ist der Unterschied zwischen PCR, IHC und FISH?

### PCR:

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt einen genau gewählten DNA-Abschnitt. Aus wenigen Gen-Kopien entstehen so Millionen, die anschließend detektiert und analysiert werden können. Eine Analyse von RNA ist durch Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription und anschließender PCR ebenfalls möglich.<sup>1</sup> Für die Detektion krebsspezifischer Mutationen werden z.B. beim NSCLC<sup>c</sup> als Primer Sonden verwendet, die sich gegen bekannte Hotspot-Mutationen im Gen des EGFR-Rezeptors richten.<sup>4</sup>

### IHC:

Die Immunhistochemie (IHC) umfasst Methoden, um bestimmte Proteine in Gewebeschnitten zu detektieren. Zum Einsatz kommen Antikörper, die an das relevante Protein binden und durch Kopplung mit einem Farbstoff visuell Aufschluss über die Proteinmenge des gesuchten Markers geben.<sup>5</sup>



## FISH:

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ermöglicht die Detektion von spezifischen DNA- oder RNA-Sequenzen. Zudem werden markierte, komplementäre DNA- oder RNA-Sonden eingesetzt, die an einen entsprechenden DNA-/RNA-Abschnitt im Gewebeschnitt binden.<sup>1</sup> Translokationen lassen sich so durch ein Entfernen ursprünglich benachbarter Signale nachweisen („break apart“ Signal), Amplifikationen durch den Vergleich der Signalstärke des gesuchten Gens mit einem Vergleichsmarker.<sup>4</sup> Wenn Fluoreszenz-markierte Sonden verwendet werden, ist die Reaktion mit dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, FISH).<sup>1</sup>

### → Anwendungsbeispiel HER2-positives Mammakarzinom

Beim invasiven Mammakarzinom ist der Nachweis von HER2<sup>d</sup>-Genamplifikation mittels FISH oder von HER2<sup>d</sup>-Protein-Überexpression mittels IHC die Voraussetzung für eine gezielte Therapie mit HER2<sup>d</sup>-spezifischen Antikörpern.<sup>6</sup>

c Non-small cell lung cancer

d Human epidermal growth factor receptor 2

## Welche klinisch relevanten Erkenntnisse bringt die Panel-Diagnostik?

Durch internationale Bemühungen zur Sequenzierung von Krebsgenomen sind heute eine Vielzahl krebisrelevanter Genveränderungen bekannt. Für mehrere Entitäten liegen umfassende genomische Daten vor, welche die Entwicklung tumorspezifischer Genpanels zur Analyse der individuellen Tumorbiologie ermöglichen.<sup>7</sup> Die Panel-Diagnostik liefert abhängig von den gewählten Gen-panels eine umfassende Analyse von genetischen Veränderungen wie<sup>8</sup>

- Einzelnukleotid-Austauschen (Single Nucleotide Variants, SNV)
- Insertionen/Deletionen (Indels)
- Änderung der Kopienzahl (Copy Number Variation, CNV)
- Chromosomale Aberrationen, wie Chromosomenbrüche und -umlagerungen

Die Analyse mittels Panel-Diagnostik beschränkt sich nicht nur auf bekannte Hot Spots wie onkogene Treibermutationen, sondern sie ermöglicht die umfassende Betrachtung aller Exone klinisch relevanter Onkogene und Tumorsuppressorgene. Der Abgleich des Mutationsmusters aus Tumorbiopsien mit Datenbanken leitet klinisch relevante Empfehlungen ab.<sup>8</sup>

## 5 Anwendungsbereiche der Panel-Diagnostik in der Onkologie<sup>1,2</sup>

- Identifikation von klinisch relevanten Genvarianten und Biomarkern im Tumor
- Bestimmung des Tumor Mutational Burden und MSI<sup>e</sup> Status
- Identifikation von passenden zielgerichteten Therapien und immunonkologischen Therapien
- Identifizierung von möglichen Resistenzen und Nebenwirkungen bei den Patienten
- Testung behandlungsrelevanter Keimbahnvarianten

<sup>e</sup> Mikrosatelliten-Instabilität



## Fokus Panel-Diagnostik: 4 Gründe für den Einsatz

Für die meisten klinischen Anwendungen in der Tumordiagnostik reicht die Panel-Diagnostik mittels NGS-basierter Analyse aus. Eine überschaubare Anzahl an Zielgenregionen (ROIs) mit bekannter Relevanz für die entsprechende klinische Fragestellung wird dafür angereichert und anschließend mehrfach sequenziert. Das ermöglicht eine breite Abdeckung der ROIs mit einer hohen Anzahl an individuellen Sequenzierungen der einzelnen Nukleotide innerhalb der Sequenz (Coverage). Im Gegensatz zu WES/WGS bringt die Panel-Diagnostik vier Vorteile:<sup>2</sup>

1. Sie ist kosteneffizienter.
2. Sie beansprucht ein kleineres Datenspeichervolumen.
3. Sie erleichtert die Rohdatenanalyse (Qualitätskontrolle).
4. Sie erleichtert die Analyse der DNA-Sequenzvarianten und deren klinische Interpretation.

Nachteil der Panel-Diagnostik ist, dass sich genetische Veränderungen auch außerhalb der gewählten ROIs befinden können. Komplexe WES/WGS-Analysen können hier helfen.<sup>2</sup> Sie spielen aber aufgrund der komplexeren Datenanalyse derzeit vor allem eine Rolle in der Forschung, um beispielsweise die Tumorbilologie besser zu verstehen.<sup>8</sup>

---

## Quellen

1. El-Deiry WS, Goldberg R et al. The current state of molecular testing in the treatment of patients with solid tumors, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:305-343.
2. Kamps R, Brandão RD et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):308.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie S3 Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1. Januar 2019. AWMF Registernummer: 021/007OL; unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales\\_Karzinom/Version\\_2/LL\\_KRK\\_Langversion\\_2.1.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Langversion_2.1.pdf) (abgerufen am: 08.05.2020).
4. Khoo C, Rogers T et al. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Translational Lung Cancer Research* 2015;4(2):126-141.
5. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med* 2016;50(6):411-418. doi:10.4132/jptm.2016.08.08
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.3. Februar 2020. AWMF Registernummer: 032-045OL; unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.3/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.3.pdf) (abgerufen am: 08.05.2020).
7. National Cancer Institute. The Cancer Genome Atlas Program; unter: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> (abgerufen am: 20.05.2020).
8. Sobottka B, Weber A. Molekulare Tumordiagnostik – aktuelle Methoden, Anwendungsbeispiele und Ausblick. *Onkologie* 2020;26:373–386.