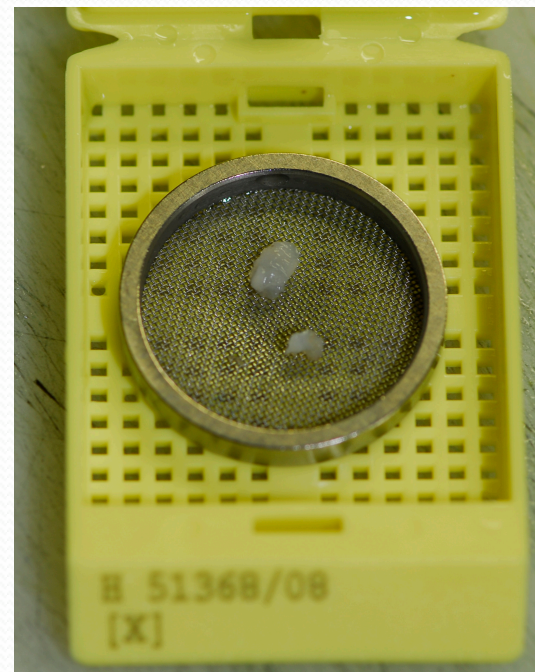


# Die Rolle der Pathologie

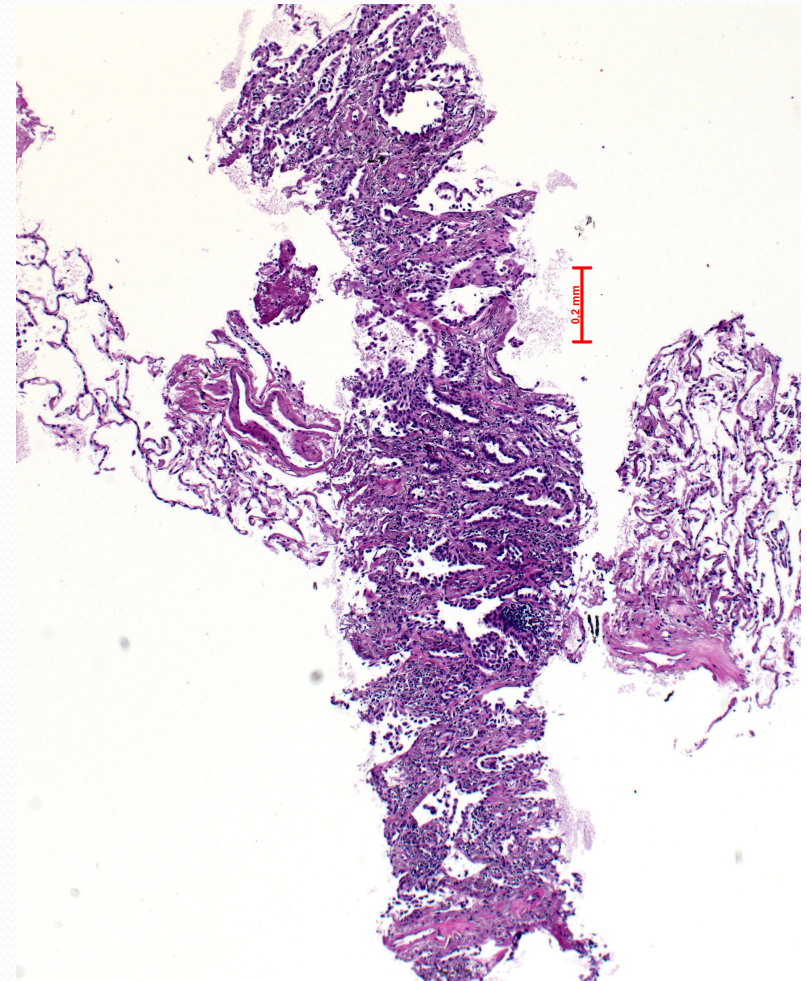
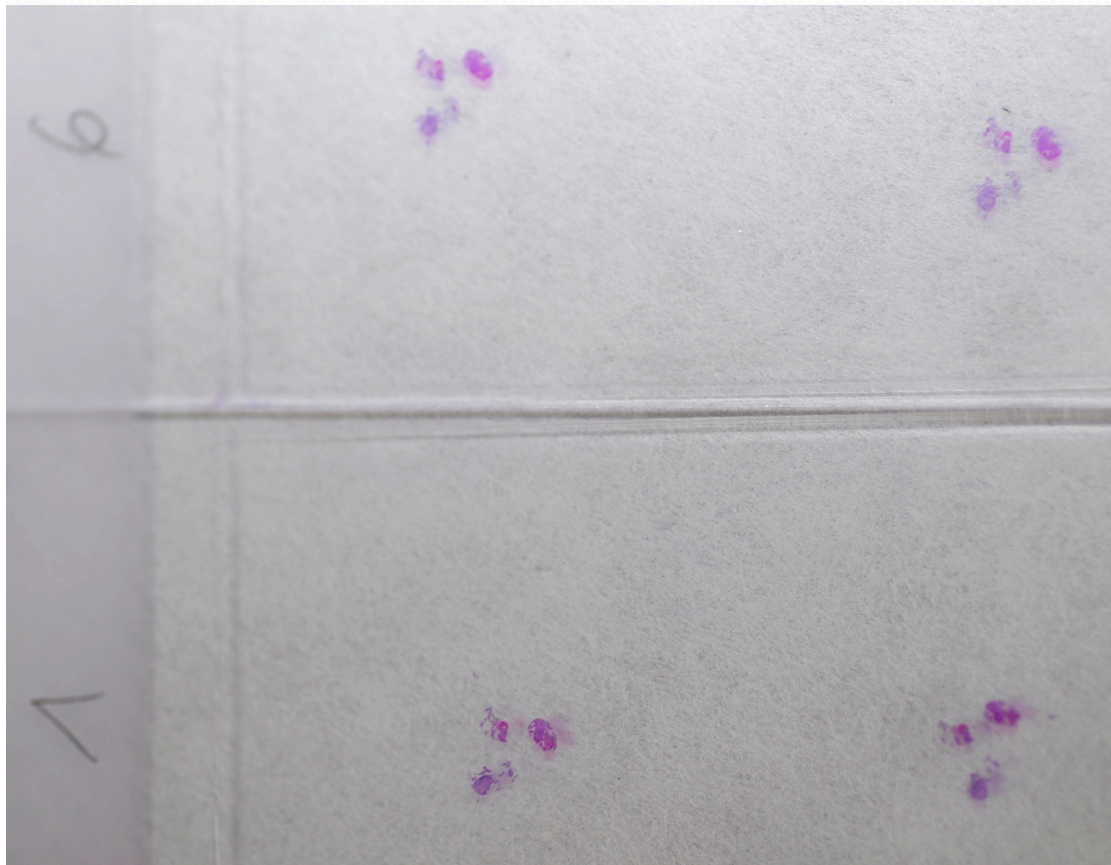
- Die Diagnostik
- EGFR Hintergrund, Struktur, Signaling,
- Methoden
  - IHC
  - CISH
  - FISH
  - Mutationsanalyse
- Prognosefaktoren und Therapieempfehlungen

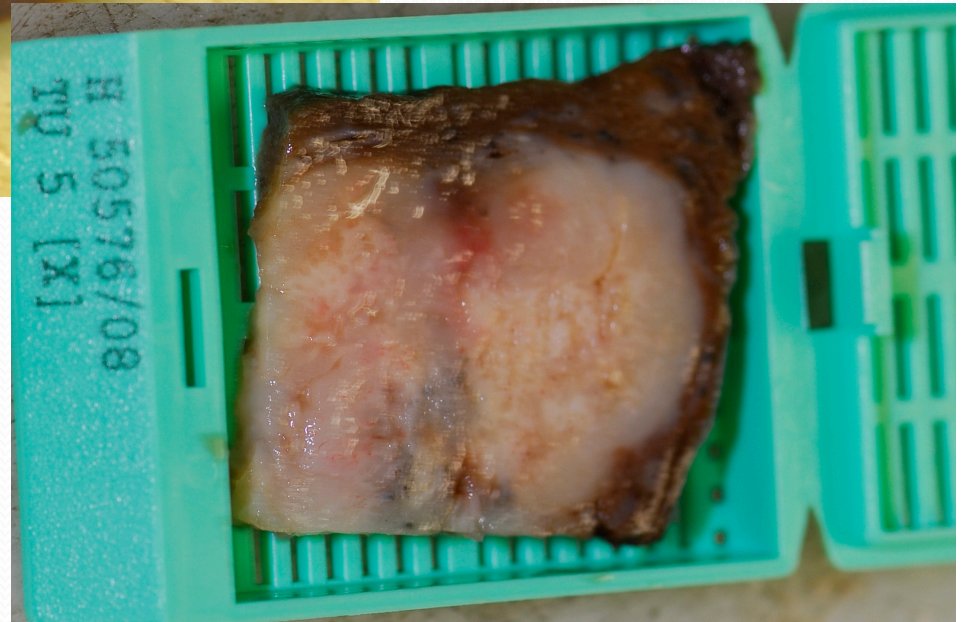
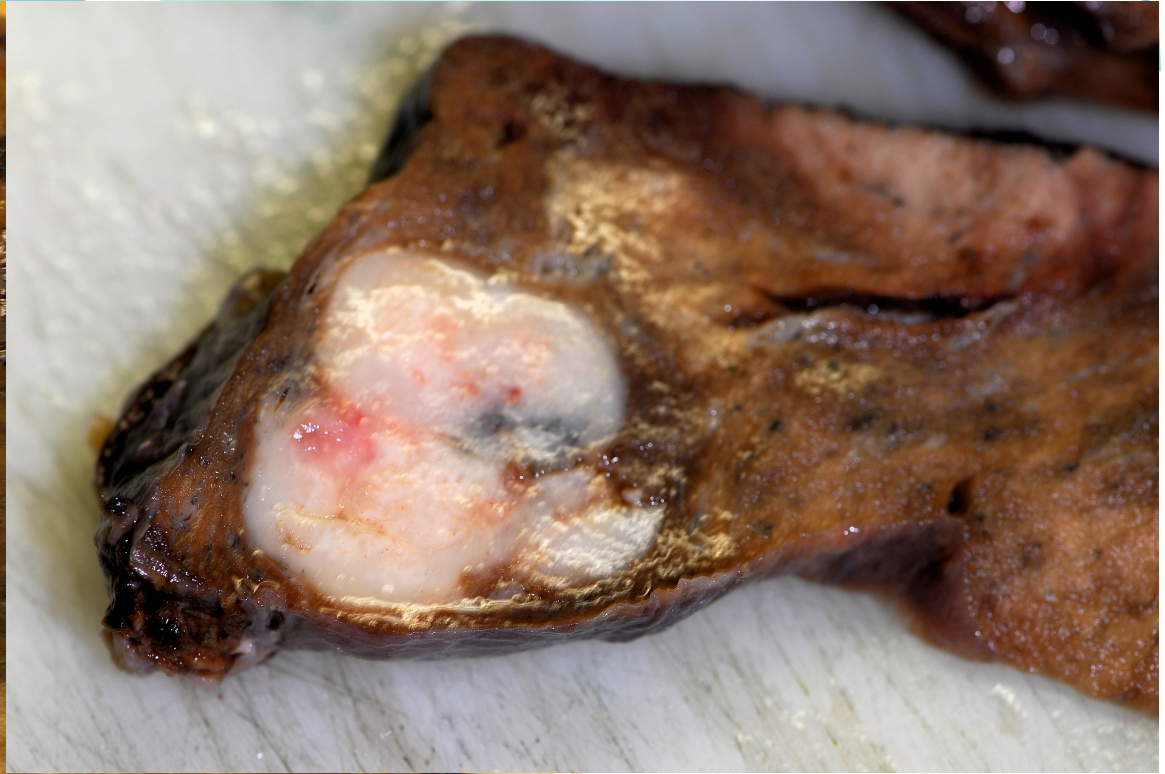
# Die Biopsiediagnostik

- Bronchialschleimhautbiopsien
- Transbronchiale Biopsien
- Transthorakale Nadelbiopsien



# Biopsiediagnostik

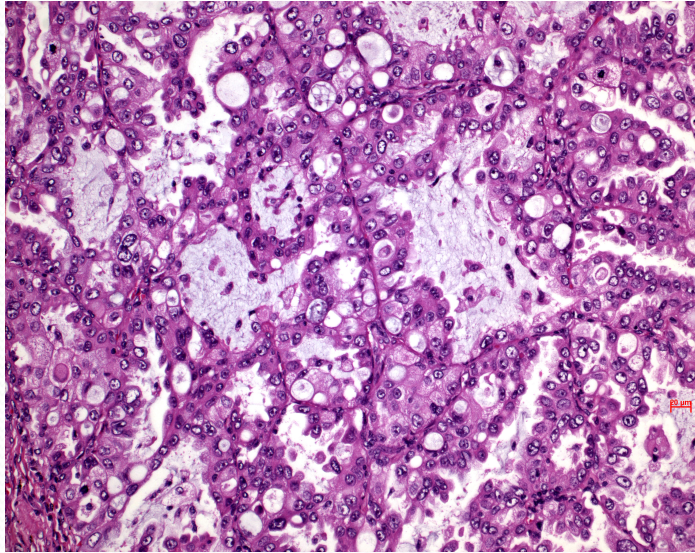




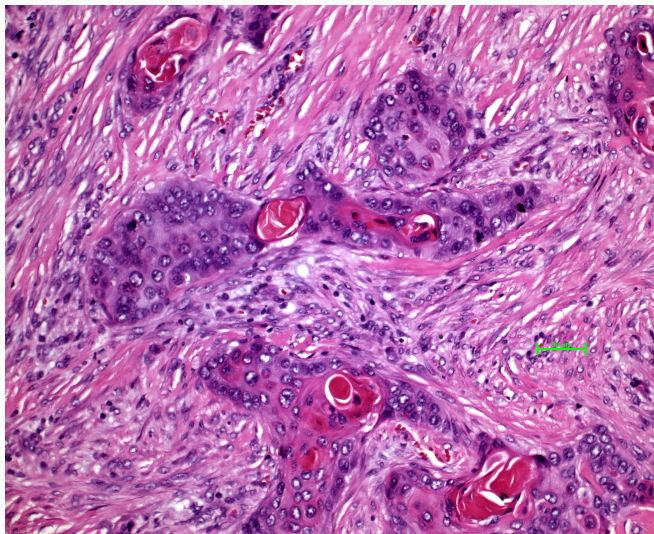
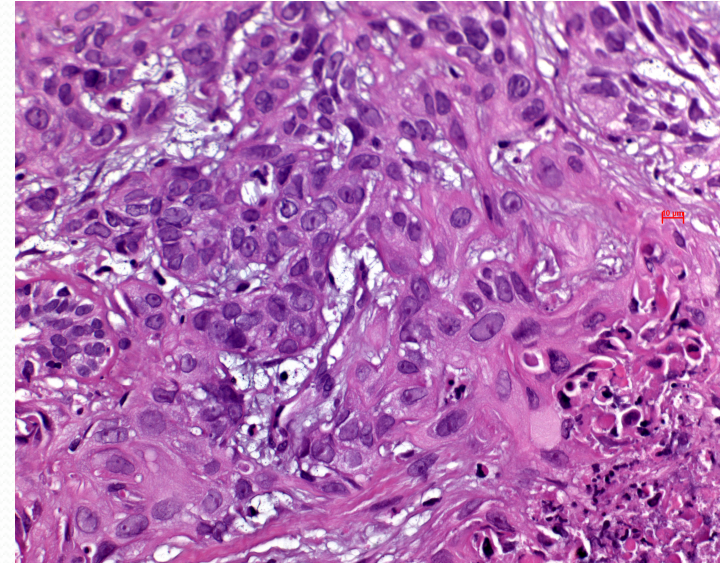
# Die Operationshistologie

# Die Klassifikation

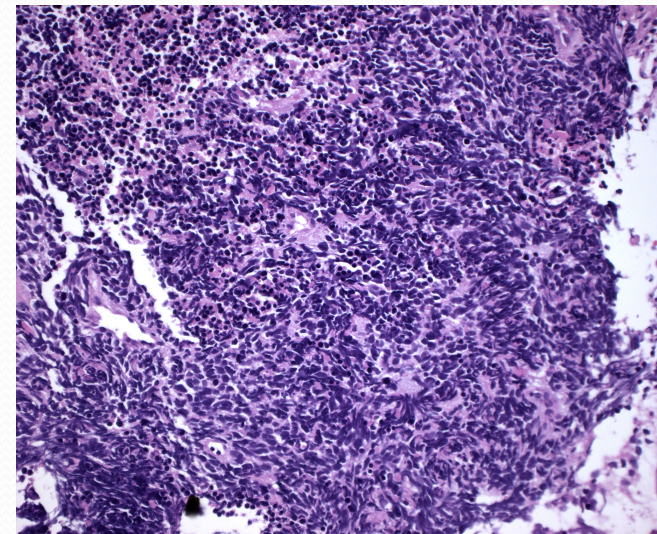
Adenokarzinom



Großzelliges Karzinom



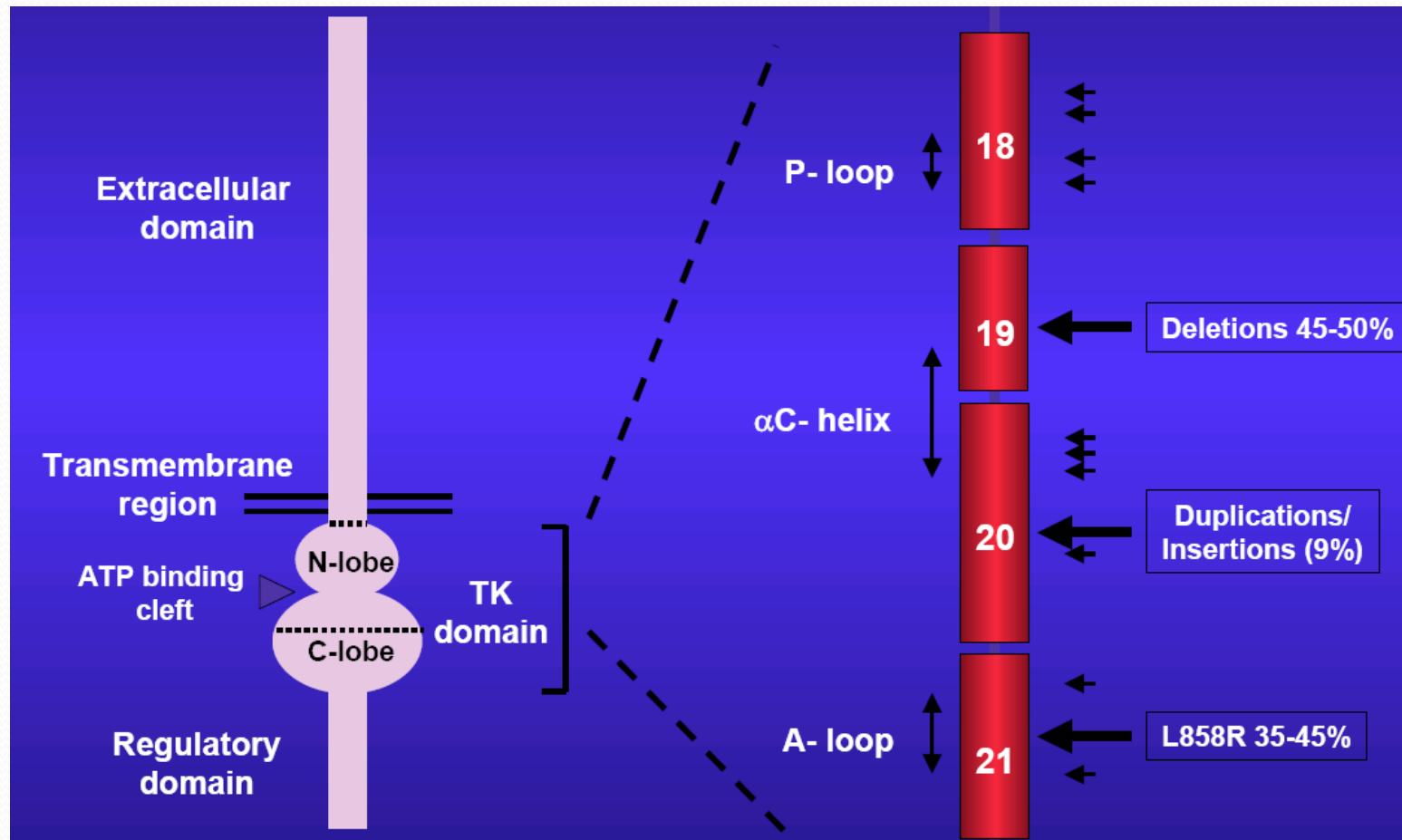
Plattenepithelkarzinom



Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom

# EGFR Mutationen

## Tyrosin-Kinase Domäne (TK)



# **Welche Methoden können wir anwenden - Bestimmung EGFR Status**

- **Mutationsanalysen**
  - **Punkt Mutationen (in Exons 18-21)**
  - **Deletionen (in Exon 19)**
  - **Methoden:**
    - **PCR und Sequenzierung**
    - **Real Time Assay**
    - **In-situ Hybridisierung: Gen-Amplifikation, -  
CISH / FISH**
    - **Immunhistochemie: Proteinexpression**

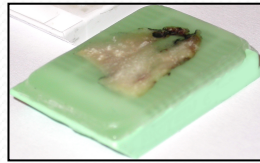
# Methoden für die Detektion von EGFR Mutationen in Lungenkarzinomen

Technique	Sensitivity (% mutant DNA)	Mutations identified
Direct sequencing	25	Known and new
PCR-SSCP	10	Known and new
TaqMan PCR	10	Known only
Loop-hybrid mobility shift assay	7,5	Known only
Cycleave PCR	5	Known only
PCR-RFLP and length analysis	5	Known only
MALDI-TOF MS-based genotyping	5	Known only
PNA-LNA PCR clamp	1	Known only
Scorpions ARMS	1	Known only
dHPLC	1	Known and new
Single-molecule sequencing	0.2	Known and new
Mutant-enriched PCR	0.2	Known only
SMAP	0.1	Known only

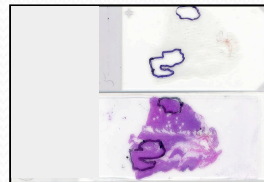
Pao W. and Ladanyi M,  
Clinical Cancer Research  
13, 4954, 2007



# Workflow: EGFR-Sequenzierung

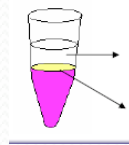


NSCLC Patientengewebe



~10 konsekutive Schnitte 4-5 µm auf Objektträger

Pathologe kennzeichnet den zu analysierenden Tumorbereich am gefärbten Schnitt, ~60% Tumoranteil



DNA-Extraktion

„home-made Protokoll“, Kit (Qiagen, Ambion)

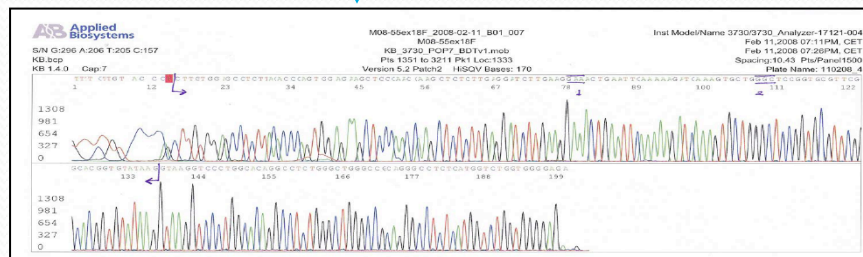
**PCR**

Exon 18	137 bp
Exon 19	230 bp
Exon 20	248 bp
Exon 21A	220 bp
Exon 21B	238 bp

**PCR**

(Forward- und Revers Primer)

Exon 18, Exon 19, Exon 20, Exon 21

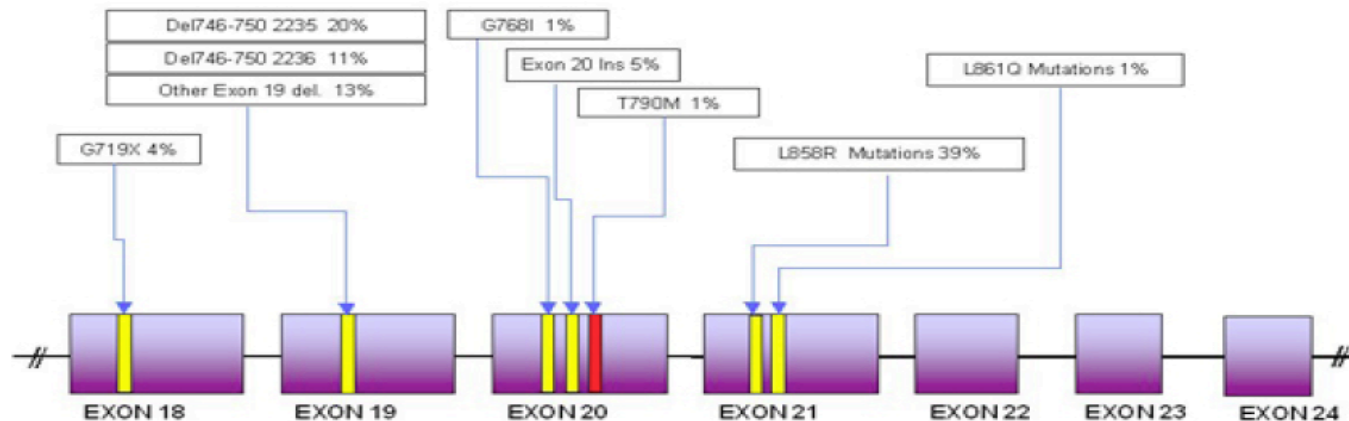


Sequenzierung der PCR Produkte  
Vergleich mit wt-Sequenz

# Real Time PCR Assay

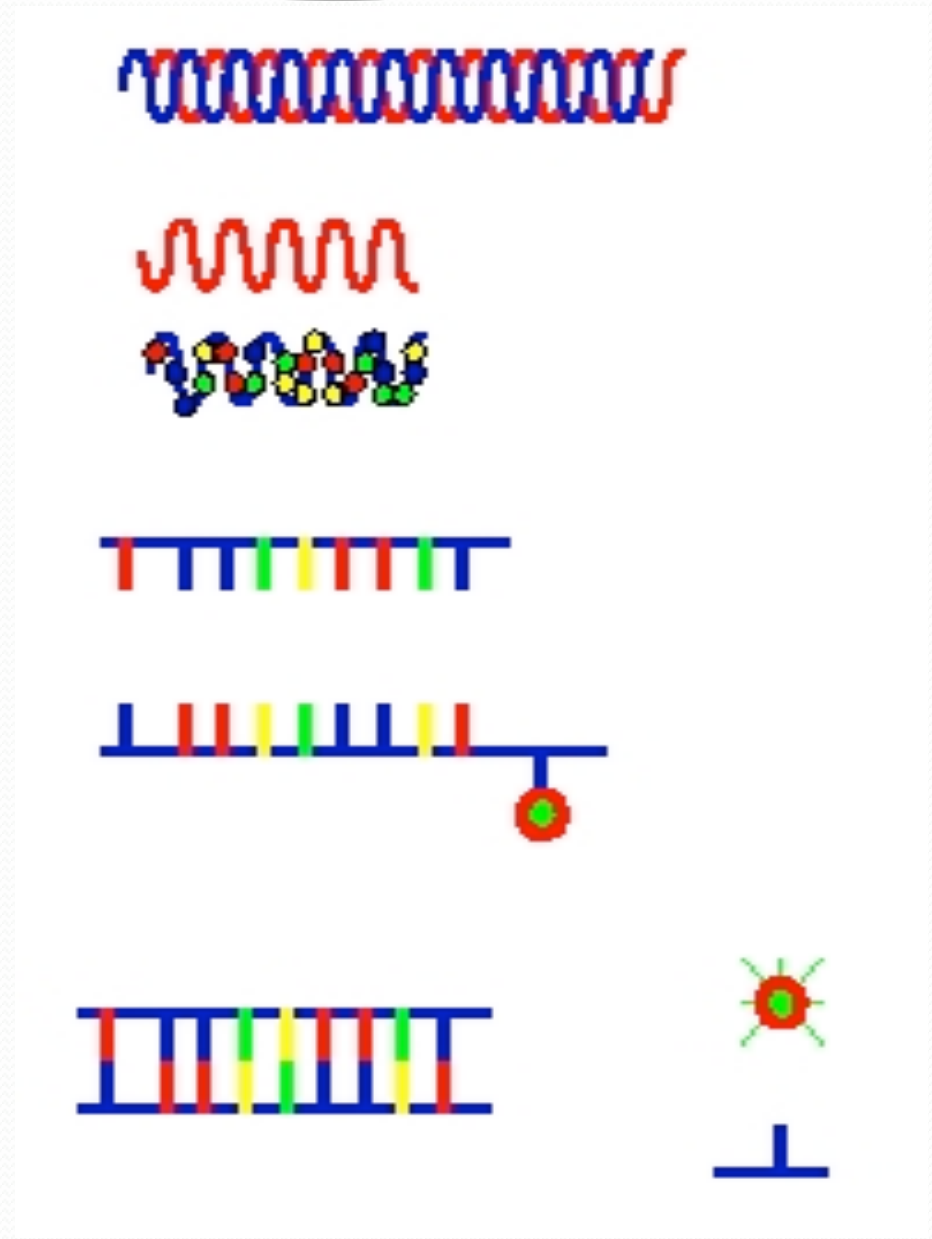
## DsX EGFR29 Mutations Test Kit

- für FFPE-Gewebe geeignet: DNA-Extraktion – Real Time PCR – Vergleich Kontrolle und Probe
- detektiert 29 bekannte Mutationen im EGFR-Gen
- hohe Sensitivität : erkennt 1% mutierte DNA aus Gemisch mit wt DNA



- Vorteile: sensitiv, geringer Zeitaufwand, hoher Durchsatz möglich, kompatibel mit den gängigen Real Time PCR Geräten
- Nachteil: Preis €3360,-/20 Proben (Materialkosten€168/Probe)

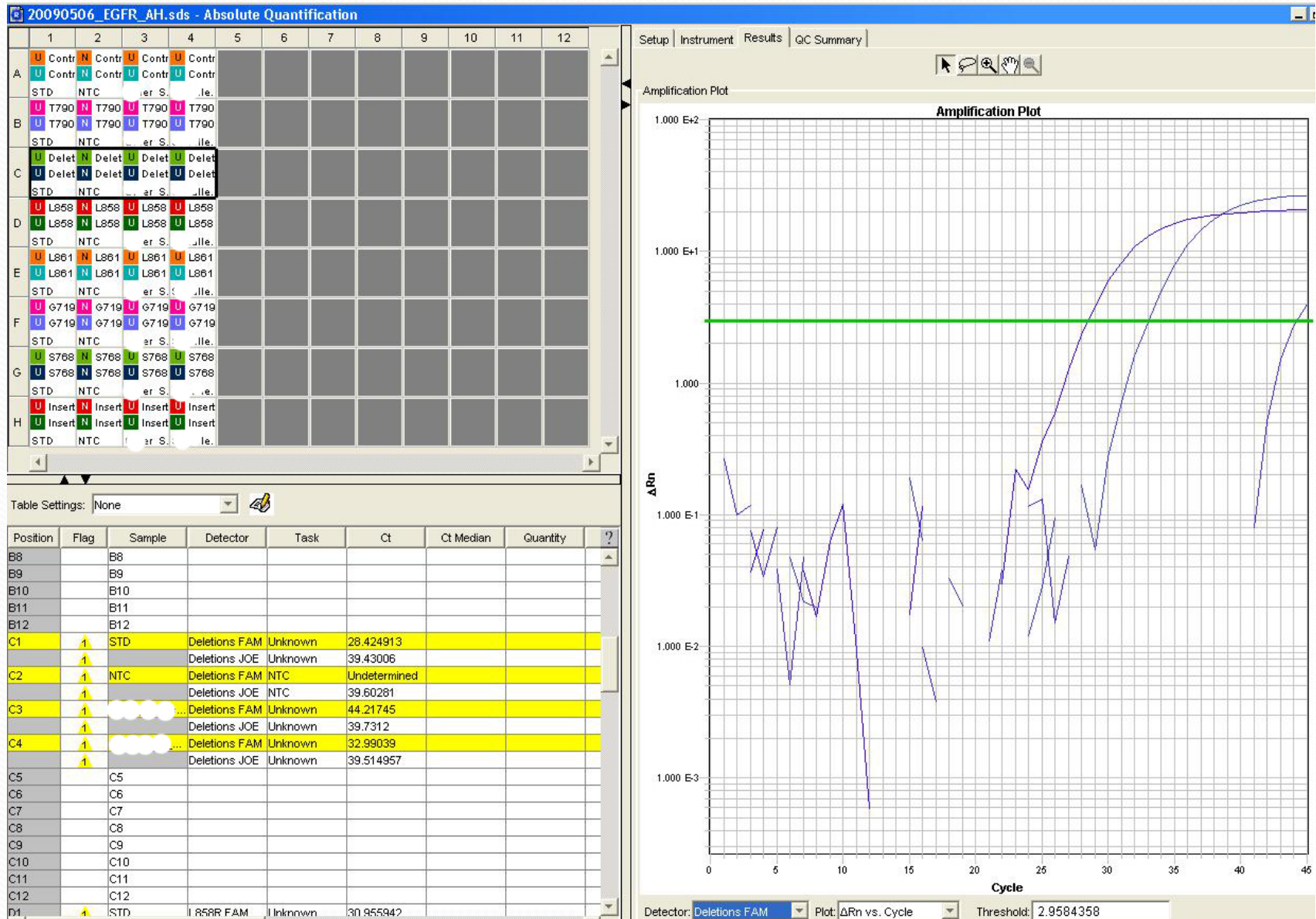
# Prinzip der quantitativen RT-PCR



# Ablauf der Testung

- Diagnose durch den Pathologen/in
- Anforderung des EGFR-Mutationsstatus durch die Abt. Onkologie/Pulmologie
- Selektion des Gewebes durch Pathologie
- Mikrodissektion
- Mutationsuntersuchung
- Ergebnis wird zusammen mit dem histopathologischen Befund interpretiert
- Dauer der Untersuchung: 4 Tage (wir untersuchen derzeit 1x wöchentlich)

# RT-PCR für EGFR



Welche Mutationen  
können detektiert  
werden

## Appendix I – Mutation Details

Cosmic ID's are taken from the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer  
<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

Mutation	Exon	Base Change	Cosmic ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Insertions	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Deletions	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complex)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complex)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complex)	12422
		2238_2252>GCA (complex)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complex)	12382
		2239_2258>CA (complex)	12387
		2240_2251del12	6210
2240_2257del18	12370		
2240_2254del15	12369		
2239_2251>C (complex)	12383		

# Voraussetzungen von Seiten der Pathologie vorhanden!

- Nahezu alle pathologischen Institute haben Erfahrungen mit der HER2Neu Testung beim Mammakarzinom (Immunhistologie, FISH/CISH)
- Mehrere Institute haben bereits Erfahrungen bei der Testung des KRAS Status für die Therapie des Dickdarmkarzinoms (ein Ringversuch zur Qualitätskontrolle wurde bereit von der ÖGP durchgeführt)
- Einige Institute haben bereits mit der Testung des EGFR begonnen, in einzelnen wird die Untersuchungs bereits routinemäßig angeboten
- Ein Ringversuch zur Qualitätssicherung ist in Vorbereitung

# Diagnostik und das Netz der Lungenpathologie

- 1997 wurde die Arbeitsgruppe Lungen- und Pleurapathologie bei der Europäischen Gesellschaft für Pathologie gegründet
  - Mehrere österreichische Lungenpathologen haben in dieser Arbeitsgruppe aktiv mitgearbeitet
- Jänner 2007 wurde die Arbeitsgruppe Lungen- und Pleurapathologie bei der österreichischen Gesellschaft für Pathologie gegründet (Vorsitzende Dr. Ulrike Gruber-Mösenbacher)
- Die Typendiagnostik der Lungenkarzinome ist schon immer Bestandteil der Diagnostik gewesen
- Aufgrund der Bedeutung der Typendiagnostik für die Therapieentscheidung und auch für Prognostik, wird in der Lungenpathologie zunehmend die Immunhistochemie eingesetzt, um in jedem Fall eine Typendiagnose abgeben zu können – entsprechende Richtlinien werden vorbereitet