

Methodik:

Next-Generation Sequencing im Rahmen des molekularen Tumorboards Düsseldorf für das ZPM Onkologie Düsseldorf

Next-Generation Sequencing genomischer DNA:

- Histologische Untersuchung der eingesandten Tumorprobe anhand eines HE-Präparates mit Bestimmung des Tumorzellgehaltes.
- DNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Gewebe mit Mikrodisektion der Tumorzellen. Fluorometrische Quantifizierung doppelsträngiger DNA und Bestimmung des amplifizierbaren DNA-Anteils durch einen Custom qPCR Assay.
- Erstellung der Library mittels eines im nNGM-Verbund erstellten Custom-Panels (nNGMv3 Panel, siehe unten) und Ion AmpliSeq Library Kit Plus (ThermoFisher Scientific) mit anschließender Sequenzierung auf einem Ion S5 Sequenziergerät (ThermoFisher Scientific).

Die Auswertung erfolgt mithilfe der Softwarepakete Torrent Suite, Ion Reporter und IGV in ihren aktuellen Versionen. Für die Interpretation der Varianten werden folgende öffentliche Datenbanken in ihrer jeweils aktuellen Version herangezogen: ClinVar, cBioportal (inkl. OncoKB, CIVIC und cancerhotspot.org), dbSNP, COSMIC. Nach Herausfiltern von Artefakten und anzunehmenden Keimbahnvarianten werden Varianten mit Allelfrequenzen $\geq 3\%$ berichtet, die die Aminosäuresequenz verändern und als pathogen bzw. vermutlich pathogen beschrieben sind.

OncoPrint Comprehensive Assay PLUS (DNA, ThermoFisher Scientific)

Liste der ~500 untersuchten Gene:

A1CF, ABCB1, ABL1, ABL2, ABRAXAS1, ACSM2B, ACVR1, ACVR1B, ACVR2A, ADAM18, ADAMTS12, ADAMTS2, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AMER1, ANO4, APC, AR, ARAF, ARHGAP35, ARID1A, ARID1B, ARID2, ARID5B, ARMC4, ASXL1, ASXL2, ATM, ATP1A1, ATR, ATRX, AURKA, AURKC, AXIN1, AXIN2, AXL, B2M, BAP1, BARD1, BCL2, BCL2L12, BCL6, BCOR, BCR, BLM, BMP5, BMPR2, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRINP3, BRIP1, BTK, C6, C8A, C8B, CACNA1D, CALR, CANX, CARD11, CASP8, CASR, CBF, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD163, CD274, CD276, CD79B, CDC73, CDH1, CDH10, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CHD4, CHEK1, CHEK2, CIC, CIITA, CNTN6, CNTNAP4, CNTNAP5, COL11A1, CREBBP, CSF1R, CSMD3, CTCF, CTLA4, CTNNA1, CTNNA2, CUL1, CUL3, CUL4A, CUL4B, CYLD, CYP2C9, CYP2D6, CYSLTR2, DAXX, DCAF4L2, DCDC1, DDR1, DDR2, DDX3X, DGCR8, DICER1, DNMT3A, DOCK3, DPYD, DROSHA, DSC1, DSC3, E2F1, EGFR, EIF1AX, ELF3, EMSY, ENO1, EP300, EPAS1, EPCAM, EPHA2, ERAP1, ERAP2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC2, ERCC4, ERCC5, ERFF1, ESR1, ETV6, EZH2, FAM135B, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAS, FAT1, FBXW7, FGF19, FGF23, FGF3, FGF4, FGF7, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, FLT4, FOXA1, FOXL2, FOXO1, FUBP1, FYN, GALNT17, GATA2, GATA3, GLI1, GLI3, GNA11, GNA13, GNAQ, GNAS, GPR158, GPS2, GRID2, H3F3A, H3F3B, HCN1, HDAC2, HDAC9, HIF1A, HIST1H2BD, HIST1H3B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HNF1A, HRAS, ID3, IDH1, IDH2, IGF1R, IKKB, IL6ST, IL7R, INPP4B, IRF4, IRS4, JAK1, JAK2, JAK3, KCND2, KCNH7, KDM5C, KDM6A, KDR, KEAP1, KEL, KIR3DL1, KIT, KLF4, KLF5, KLHL13, KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, KNSTRN, KRAS, KRTAP2-1, KRTAP6-2, LARP4B, LATS1, LATS2, LRRC7, MAGOH, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP2K7, MAP3K1, MAP3K4, MAPK1, MAPK8, MARCO, MAX, MCL1, MDM2, MDM4, MECOM, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MGA, MITF, MLH1, MLH3, MPL, MRE11, MSH2, MSH3, MSH6, MTAP, MTOR, MTUS2, MUTYH, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, MYO1D, NBN, NCOR1, NF1, NF2, NFE2L2, NLRC5, NOL4, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NRAS, NRXN1, NSD2, NT5C2, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUP93, NYAP2, OR10G8, OR2G6, OR2L13, OR2L2, OR2L8, OR2M3, OR2T3, OR2T33, OR2T4, OR2W3, OR4A15, OR4C15, OR4C6, OR4M1, OR4M2, OR5D18, OR5F1, OR5L1, OR5L2, OR6F1, OR8H2, OR8I2, OR8U1, ORC4, PAK5, PALB2, PARP1, PARP2, PARP3, PARP4, PAX5, PBRM1, PCBP1, PCDH17, PDCD1, PDCD1LG2, PDE1A, PDE1C, PDGFRA, PDGFRB, PDIA3, PGD, PHF6, PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PIM1, PLCG1, PLXDC2, PMS1, PMS2, POLD1, POLE, POM121L12, POT1, PPF1A2, PPM1D, PPP2R1A, PPP2R2A, PPP6C, PRDM1, PRDM9, PRKACA, PRKAR1A, PSMB10, PSMB8, PSMB9, PTCH1, PTEN, PTPN11, PTPRD, PTPRT, PXDN, RAC1, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54L, RAF1, RARA, RASA1, RASA2, RB1, RBM10, RBP3, RECQL4, REG1A, REG1B, REG3A, REG3G, RET, RGS7, RHEB, RHOA, RICTOR, RIT1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF43, ROS1, RPA1, RPL10, RPL22, RPL5, RPS6KB1, RPTN, RPTOR, RUNDC3B, RUNX1, RUNX1T1, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SETBP1, SETD2, SF3B1,

SH3RF2, SIX1, SIX2, SLC15A2, SLC8A1, SLCO1B3, SLX4, SMAD2, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMC1A, SMO, SNCAIP, SOCS1, SOS1, SOX2, SOX9, SPEN, SPOP, SRC, SRSF2, STAG2, STAT1, STAT3, STAT5B, STAT6, STK11, SUFU, SYT10, SYT16, TAF1, TAP1, TAP2, TAPBP, TBX3, TCF7L2, TERT, TET2, TGFBR1, TGFBR2, TMEM132D, TNFAIP3, TNFRSF14, TOP1, TP53, TP63, TPMT, TPP2, TPTE, TRHDE, TRIM48, TRIM51, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1, UGT1A1, USP8, USP9X, VHL, WAS, WT1, XPO1, XRCC2, XRCC3, YAP1, YES1, ZBTB20, ZFH3, ZIM3, ZMYM3, ZNF217, ZNF429, ZNF479, ZNF536, ZRSR2

Genfusionsdiagnostik mittels Next-Generation Sequencing

- Histologische Untersuchung der eingesandten Tumorprobe anhand eines HE-Präparates mit Bestimmung des Tumorzellgehaltes.
- RNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Gewebe mit Mikrodisektion der Tumorzellen.
- Fluorometrische Quantifizierung der RNA und Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkriptase.
- Erstellung der Library mittels Oncomine Focus Assay RNA (ThermoFisher Scientific, siehe unten) und Ion AmpliSeq Library Kit Plus (ThermoFisher Scientific) mit anschließender Sequenzierung auf einem Ion S5 Sequenziergerät (ThermoFisher Scientific).

Die Auswertung erfolgt mithilfe der Softwarepakete Torrent Suite und Ion Reporter in ihren aktuellen Versionen. Für die Interpretation der Varianten werden folgende öffentliche Datenbanken in ihrer jeweils aktuellen Version herangezogen: ClinVar, cBioportal (inkl. OncoKB, CIVIC und cancerhotspot.org), COSMIC.

Oncomine Comprehensive Assay PLUS (RNA, ThermoFisher Scientific)

Fusionsgene	Fusionsgene	Fusionsgene
AKT1	MAP3K8	RARA
AKT2	MET	RELA
AKT3	MTAP	RET
ALK	MYB	ROS1
AR	MYBL1	RSPO2
BRAF	NOTCH1	RSPO3
BRCA1	NOTCH2	STAT6
CDKN2A	NOTCH3	TERT
EGFR	NRG1	TFE3
ERBB2	NTRK1	YAP1
ERBB4	NTRK2	
ERG	NTRK3	
ESR1	NUTM1	
ETV1	PIK3CA	
ETV4	PIK3CB	
ETV5	PPARG	
FGFR1	PRKACA	
FGFR2	PRKACB	
FGFR3	RAF1	