



W. Dietmaier¹ · S. Merkelbach-Bruse² · A. Jung³ · U. Lehmann⁴

¹ Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland

² Institut für Pathologie, Universität zu Köln, Köln, Deutschland

³ Institut für Pathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland

⁴ Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

Bericht über die Sitzungen und die Mitgliederversammlung der AG Molekularpathologie

Die Arbeitsgemeinschaft Molekularpathologie stellte insgesamt 40 Präsentationen im Rahmen von 5 Vortragssitzungen und einer Postersitzung vor.

Die *erste Sitzung* beinhaltete methodischerseits insbesondere NGS (*next generation sequencing*). Dazu wurden verschiedene interessante Themen behandelt: M. Bihl (Basel) berichtete zum Thema Qualitätsstandard von NGS und ging dabei auf wichtige Faktoren wie Tumorzellgehalt, *Coverage*, Uniformität und *Cut-Off*-Werte in der Routinediagnostik ein. M. Jesinghaus (TU München) berichtete über eine NGS-basierte Genotypisierung beim CRC mit 30 CRC-bezogenen Genen und MSI-Analysen und zeigte therapeutisch relevante Mutationsergebnisse auf, wie z. B. Mehrfachmutationen und Mutationen in BRAF, NRAS und PIK3CA bei wt-KRAS-Tumoren. M. Ihle (Köln) präsentierte Daten zum RNA-NGS-basierten Nachweis von ALK-, RET- und ROS-Translokationen am MiSeq-System und diskutierte anhand von interessanten und schwierigen Fallbeispielen vergleichende Analysen von FISH vs. NGS mit z. T. diskordanten Ergebnissen. V. Endris (Heidelberg) gab einen Überblick über den aktuellen Stand der BRCA-Mutationsanalytik von Ovarial- und Mammakarzinom in der Routinediagnostik in Heidelberg. Dabei zeigte er Daten zu Mutationshäufigkeiten und Allelfrequenzen/-fraktionswerte, die meist über 60 % lagen, aber auch unter 10 % liegen können. Zuletzt wurde auch das Thema LOH/Deletionen von BRCA diskutiert.

Jesinghaus (TU München) berichtete über genetische Heterogenität bezüglich des KRAS-Status bei Patienten mit synchronen kolorektalen Mehrfachkarzinomen sowie über Mehrfachmutationen von KRAS, APC, TP53, PIK3CA und TGFBR2 und diskutierte deren Bedeutung für die Therapie. M. Hühns (Rostock) präsentierte interessante Daten zur genetischen Heterogenität beim primären kolorektalen Karzinom und Metastasen in denselben Patienten. Dabei zeigten sich Mutationsunterschiede in Primärtumoren gegenüber Metastasen vorwiegend in weniger häufig mutierten Genen (*Hills*).

In der *zweiten Vortragssitzung* wurde zunächst im Rahmen eines *Gastvortrages* das Thema Epigenetik von Manel Esteller behandelt. Manel Esteller, Direktor des „Cancer Epigenetics and Biology Program of the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)“ in Barcelona und einer der produktivsten und meistzitierten Autoren auf dem Gebiet der medizinischen Epigenetik, präsentierte in gewohnt schwungvoller Manier einen inhaltsreichen Überblick über Ergebnisse aus seiner Arbeitsgruppe und zahlreichen Kooperationsprojekten, die die Bedeutung epigenetischer Mechanismen und deren Störung für menschliche Erkrankungen eindrucksvoll dokumentieren. Angefangen bei schon etwas älteren Arbeiten zur aberranten DNA-Methylierung in Krebszellen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann, über die Bedeutung von Histonmodifikationen, die Rolle

akkumulierender epigenetischer Defekte für den Prozess der Alterung (und damit auch Krebsentstehung), die Identifizierung unbekannter Primärtumoren mithilfe des DNA-Methylierungsprofils der Metastasen, bis hin zu aktuellen therapeutischen Strategien, die auf Erkenntnissen der Epigenetikforschung beruhen, wurde ein hochinteressanter und sehr anregender Bogen geschlagen. Die weit überdurchschnittliche Zahl an Zuhörern im Saal zeigte großes Interesse am Sprecher und für diese Thematik. Die AG Molekularpathologie schätzte sich glücklich, dass es ihr gelungen war, mit einem so renommierten internationalen Sprecher einen herausragenden inhaltlichen Akzent gesetzt zu haben. In den folgenden beiden Vorträgen der zweiten Vortragssitzung wurden interessante Beiträge zu Mutationsuntersuchungen an zirkulierender zellfreier DNA bei kolorektalem Karzinom (CRC) und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC, A.-L. Volckmar, Heidelberg) und Ösophaguskarzinom (H. Pastermack, Lübeck) vorgestellt und technische Punkte zur DNA-Präparation und Analytik (z. B. digitale PCR) sowie deren Einsatzmöglichkeiten diskutiert.

In der *dritten Vortragsreihe* stellte V. Seitz (Berlin) ein System aus Primern vor, die spezifische Sequenzen in PCR-Produkte einführen, sodass sich diese nur mit einem korrespondierenden Primerpaar amplifizieren lassen. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass es zu Kreuzkontaminationen in (semi-) nested PCRs kommt: Dieses Verfahren

ist mittlerweile patentiert. F. Klauschen (Berlin) startete seinen Vortrag mit einem Fall, der im *New Engl. J. of Medicine* beschrieben wurde. An diesem Fall wurde gezeigt, dass eine tumorgenetische Klassifikation der pathologischen Klassifikation überlegen sei. Er konnte zeigen, dass es sich bei diesem Fall um eine falsche histopathologische Klassifikation handelte und stellte sich dann die Frage, welchen Wert tumorgenetische Klassifikation grundsätzlich haben können, indem er Datensätze der TCGA (The Cancer Genome Atlas) einsetzte. Es zeigte sich, dass sich für bestimmte kleine Gruppen ein Zusammenhang mit einer tumorgenetischen Klassifikation herstellen ließ, dieses System jedoch momentan ungeeignet ist, die histopathologische Klassifikation abzulösen. E. Bellini (Zürich, Schweiz) stellte die Ergebnisse einer Expressionsanalyse (Transkriptom) einer Vielzahl von Endometriumkarzinomen dar. Die Daten wurden bioinformatisch ausgewertet (*heatmap, principal component analysis, signaling pathway attribution*), um auf diese Weise Endometriumkarzinome molekular besser klassifizieren zu können. Diese molekularen Subgruppen wurden durch *tumor driver* charakterisiert, die in weiteren funktionellen Untersuchungen charakterisiert und in die Klinik translatiert werden sollen. R. Casadonte (Trier) zeigt auf, dass IMG (*imaging mass spectrometry*) dazu eingesetzt werden kann, verschiedene Tumorentitäten voneinander abzugrenzen. Dazu wurden dem IMS-System Proteinprofile bekannter Adenokarzinomen des Kolorektums und der Lunge als Datenbasis eingegeben, um anschließend einen Validierungssatz an Fällen zu charakterisieren. Zwar war die Erkennung noch nicht perfekt (100 %), doch konnte als *proof of concept* gezeigt werden, dass eine massenspektroskopische Untersuchung von Geweben machbar ist. Größere Sätze an Profilen sollen zum einen die Treffsicherheit erhöhen, zum anderen sollen auch Subgruppen klassifiziert werden, z. B. kolorektale Karzinome vom MSI- oder MSS-Typ. H. Bohnenberger (Göttingen) stellte einen proteomischen Ansatz vor, indem Zellysate aus formalinfixierten

paraffineingebetteten (FFPE) Geweben mit SILAC (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*)-markierten Zellysaten gemischt wurden, die jeweils mittels Trypsin hydrolysiert worden waren. Diese Mischung wurde quantitativ mittels Hybrid-Quadrupole-Orbitrap-Massenspektroskopie untersucht, die neben der Menge an Protein auch eine Identifikation der Proteine erlaubt. Auf diese Weise lassen sich FFPE-Gewebe so analysieren, dass sich Änderungen in der Expression sowie posttranslationale Modifikation einzelner Proteine nachweisen lassen. R. Longuespée (Trier) stellte eine Erweiterung der von Frau Casadonte beschriebenen, massenspektroskopischen Methode vor, in der der Nachteil der reinen Profilierung von Geweben oder Proteinmischungen durch einen massenspektroskopischen Mikrosequenzierungsansatz bis hin zur Identifikation einzelner Proteine getrieben werden kann. Auf diese Weise wird es möglich, Proteine, die mit verschiedenen Subtypen oder Stadien einer Erkrankung assoziiert sind, zu identifizieren.

In der vierten Vortragssitzung berichtete A. Segler (TU München) über molekulare und morphologische Untersuchungen beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Korrelation mit dem Krankheitsverlauf. Im nachfolgenden Vortrag von S. Weiler (Heidelberg) wurden interessante Daten zur Rolle von YAP (yes-assoziiertes Protein) und dessen Downstream-Effektor FOXM1 als wichtige Regulatoren der chromosomalen Instabilität (CIN) vorgestellt. Ein *What's-new*-Vortrag hatte die Weiterentwicklung der Parallelsequenzierung und einen kurzen Überblick über den aktuellen Stand der *Liquid-Biopsy*-Diagnostik zum Thema (S. Merkelbach-Bruse). Kurz zusammengefasst wurden 3 Entwicklungen aus dem Bereich der Parallelsequenzierung dargestellt, die auch Thema bei anderen Beiträgen der diesjährigen Tagung waren. Zunehmend an Bedeutung gewinnt die RNA-Sequenzierung, die zur Detektion von Fusionsereignissen dienen kann, z. B. bei ALK- oder ROS1-rearrangierten Lungenkarzinomen. Amplifikationsereignisse können bioinformatisch aus den Daten der Parallelsequenzierung detektiert wer-

den, auch ohne eine Normalisierung auf das zugehörige Normalgewebe. Ein entsprechendes Softwaretool wurde bereits im letzten Jahr vorgestellt. In diesem Jahr wurden Anwendungsdaten präsentiert, die eine sehr gute Übereinstimmung der gewonnenen Daten mit der parallel durchgeführten FISH-Diagnostik zeigten. Werden geeignete Mononukleotidmarker amplifiziert, so kann auch eine Mikrosatelliteninstabilität berechnet werden. Nach Parallelsequenzierung von 5 Markerregionen wird der Verlust von Nukleotiden in den repetitiven Regionen quantifiziert. Ein Probenkollektiv, das mit den klassischen Bethesda-Primern analysiert worden war, diente der Festsetzung eines Schwellenwertes.

Eine entscheidende Weiterentwicklung stellt die Anreicherung durch Hybridisierung dar, das sog. *Hybrid-Capture*-Verfahren. Nach einer gleichmäßigen Fragmentierung durch Ultraschall werden dabei die gewünschten Fragmente durch Hybridisierung an spezifische Sonden angereichert, aufgereinigt, mit Adapter- und Barcode-Sequenzen versehen und anschließend sequenziert. PCR-basierte Verfahren bieten zwar Vorteile wie geringeren Materialbedarf und höhere *On-target*-Rate, sind aber auch anfällig für die Amplifikation von Fixierungsartefakten. Da im *Hybrid-Capture*-Verfahren weniger Amplifikationsschritte notwendig sind, wird die Anzahl der Artefakte minimiert. Die Anzahl der Zielregionen kann bei dieser Methode im Gegensatz zur PCR-basierten Anwendung beliebig erweitert werden. Dadurch wird es möglich, auch Sonden für Fusionsregionen zu integrieren, die häufig in intronischen Genregionen liegen. Mit dem geeigneten Sonden-Design wird so die gleichzeitige Analyse von Mutationen, Fusionen und Amplifikationen möglich. Ein identisches Sonden-Design wurde von 2 verschiedenen Anbietern bestellt und mit den jeweils zugehörigen Reagenzien an vorcharakterisiertem FFPE-Material getestet. Zur Auswertung struktureller Varianten wurde zusätzlich zur bereits vorhandenen Analysepipeline mit dem frei verfügbaren Softwaretool „Lumpy“ gearbeitet, das zur Detektion und Lokalisation der Fusionsereignisse sogenannte *split reads* und *discordant reads*

berücksichtigt. Mit beiden Sondenpanels konnten die bekannten Mutationen detektiert werden. Zur Einschätzung der Qualität sind aber auch die Verteilung der *reads* auf die Proben innerhalb eines Laufes, die Duplikatrate, die gleichmäßige Abdeckung aller Zielregionen und die *On-target*-Rate wichtig. Hier zeigten sich gravierende Unterschiede zwischen den Panels, sodass eine Entscheidung für einen der beiden Anbieter getroffen werden konnte.

Über den Ringversuch „T790M-Testung an Blut und Gewebe“ wurde bereits bei 2 anderen Veranstaltungen ausführlich berichtet, sodass hier lediglich eine kurze Zusammenfassung gegeben wurde. Inklusiv der Panelinstitute wurde das Ringversuchsmaterial von 48 Teilnehmern bearbeitet. Davon haben 38 Teilnehmer beide Teile bestanden. Es wurde ein breites Methodenspektrum eingesetzt: Die häufigsten Methoden waren Pyrosequenzierung und allelspezifische PCR, bei der Bluttestung auch Parallelsequenzierung. Hinsichtlich der Methodik kann aus den Ergebnissen keine Empfehlung abgeleitet werden. Lediglich die seltener eingesetzte Sanger-Sequenzierung führte aufgrund fehlender Sensitivität überproportional häufig zu falsch negativen Ergebnissen am Blut.

Einen Ausblick auf die Posterpräsentationen gab C. Wickenhauser (Halle) mit einem interessanten Überblick zur Statistik bezüglich der Institute, der verwendeten Methoden, Anwendung (Qualitätssicherung, Grundlagen, Anwendung) sowie der untersuchten Organe/Entitäten und ging beispielhaft auf einzelne Poster ein, wies aber darauf hin, dass aus Zeitgründen nicht alle Poster erwähnt werden könnten, jedoch nicht weniger interessant seien.

Die *Mitgliederversammlung* fand als letzter Punkt der vierten Sitzung statt. Dabei wurde auf verschiedene Veranstaltungen hingewiesen: Die Herbsttagung 2016 der AG-Molekularpathologie wird am 21./22. November 2016 in Karlsruhe stattfinden. Weitere Informationen sind bei S. Lassmann (Freiburg) oder den AG-Sprechern erhältlich. Auch die Herbsttagung 2017 der AG Molekularpathologie ist bereits geplant und soll am 09./10. November 2017 in Hal-

le stattfinden. Es wurde darauf hingewiesen, dass am 13. Oktober in Frankfurt das 3. „Update prädiktive molekularpathologische Diagnostik“ stattfindet. Die Association for Molecular Pathology (AMP) mit Sitz in Bethesda (USA) plant ihren jährlichen Weltkongress 2017 *Global Congress on Molecular Pathology: Diagnostic Technologies and Clinical Applications* im Frühjahr 2017 in Berlin durchzuführen. Die Veranstaltung richtet sich an Forscher und Mitarbeiter auf dem Gebiet der Molekularpathologie weltweit. Die Teilnehmerzahl in 2015 betrug über 3000 Personen. Die DGP ist seit dem Frühjahr 2015 Affiliate Member der AMP. Letzter Punkt der Mitgliederversammlung war die Mitteilung, dass der erste Sprecher der AG Molekularpathologie, W. Dietmaier (Regensburg), aktuell bei der DGP-Mitgliederversammlung als Vorstandsmitglied der DGP gewählt wurde.

Die *fünfte Sitzung* umfasste 2 Vorträge. Prof. Sasano vom Institut für Pathologie der Tohoku University School of Medicine in Sendai, Japan, gab ein Update über die molekulare Pathologie von Neoplasien der Nebennierenrinde. Insbesondere ging er auf die Unterschiede im genetischen Profil von Adenomen und Karzinomen dieser Lokalisation ein. Die molekulare Klassifikation der Nebennierenrindenzellkarzinome unterscheidet sich nicht von der histopathologischen und bislang konnten keine potenziellen Therapieziele identifiziert werden. Prof. Schmid vom Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Essen stellte neue Entwicklungen in der molekularen Diagnostik von Schilddrüsenneoplasien vor. Neue Erkenntnisse über die genetischen Veränderungen dieser Tumoren erlauben eine präzisere Diagnostik und Unterscheidung der verschiedenen Tumorentitäten. Für das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom liegen erfolgreiche Studienergebnisse zielgerichteter Therapien vor.

In der *Postersitzung* wurden insgesamt 19 Poster präsentiert. Beiträge kamen von B. Schneider (Rostock) über die Aktivierung des miR-183-Clusters in Glioblastomen mit EGFR-Amplifikationen, von F. Lämmer (TU München) über die prognostische Relevanz der

Aldehyddehydrogenase-Expression im Glioblastoma multiforme, von M. Frölich (LMU München) über RS849142 SNP als ein prädiktiver Biomarker für Hauttoxizität bei einer Anti-EGFR-Cetuximab-Therapie beim metastasierenden kolorektalem Karzinom, von C. Lucena-Porcel über den Einfluss von Fixierung und Lagerdauer auf die Qualität von DNA- und RNA-Isolaten, von D. Mönch über einen neuen, sensitiven RT-qPCR zur Detektion von Translokationen und Genexpression von ALK und ROS1 im Adenokarzinom der Lunge, von D. Hirsch (Mannheim) über molekulare Veränderungen in neu etablierten gastrointestinalen Karzinomzelllinien im Vergleich mit den zugehörigen Primärtumoren, K. F. Becker (TU München) über intratumorale Heterogenität im CRC durch quantitative multiregionale Proteomanalysen, von F. Wager (Inst. für Gewebediagnostik/MVZ, Berlin) über arraybasierte Detektion von ALK-Fusionsvarianten bei Lungenkrebs, von P. Wanderorth (Trier) über den HPV-Nachweis und Subtypisierung durch Massenspektrometrie in der Routinediagnostik, von P. Braubach (Hannover) über FiSH als Hilfsmittel für die Diagnose von M. Whipple, von B. Kraczyk (Freiburg) über Erfahrungen des Molekularen Tumorboards Freiburg (CC-CF), von E. Moskalev (Erlangen) über einen Vergleich verschiedener Methoden (nCounter vs. RT-NGS) zur Detektion von Genfusionen an FFPE-Präparaten, von R. Longuespee (Trier) über Proteomanalytik (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung [LC/MS und MALDI Imaging]) von Echinokokkose, von V. Sailer (Weill Cornell Universität für Medizin, New York, USA) über einen neuen RNA-ISH-Assay von IGF-1/IR, von J. Seitz (Erlangen) über die Etablierung des MLH1-Methylierungsnachweises mittels Pyrosequenzierung in Erlangen, von N. Ortiz Brühle (Aachen) über BRCA-NGS-Analytik, von S. Brajkovic (Lausanne) über den Nachweis von ALK durch MTP (*microfluidic tissue processor*)-Immunfluoreszenzanalyse, von M. C. Demes (Wiesbaden) über FGFR1-Genamplifikation mit FiSH-Technik, von M. Odenthal (Köln) über die Tu-

morevolution von NSCLC durch *ultra-deep sequencing* des mitochondrialen Genoms.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. W. Dietmaier

Institut für Pathologie, Universität Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regens-
burg, Deutschland
wolfgang.dietmaier@klinik.uni-regensburg.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. W. Dietmaier, S. Merkelbach-Bruse, A. Jung und U. Lehmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

The supplement containing this article is not sponsored by industry.