

Methodik:

Next-Generation Sequencing im Rahmen des Nationalen Netzwerk Genomische Medizin (nNGM) Lungenkrebs

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 Mikrodissektion 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.

nNGMv3 Panel; Custom nNGM-Verbund

Gen	Transcript	Exon
ALK	NM_004304.5	20 (Ende), 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
BRAF	NM_004333.6	11, 12, 14, 15
CTNNB1	NM_001904.4	3
EGFR	NM_005228.5	18, 19, 20, 21
ERBB2	NM_004448.4	8, 19, 20, 21
FGFR1	NM_023110.3	4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16
FGFR2	NM_000141.4	6, 7, 8(b), 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18
FGFR2	NM_022970.3	8(a)
FGFR3	NM_000142.4	3, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18
FGFR4	NM_213647.1	3, 6, 9, 12, 13, 15, 16
IDH1	NM_005896.2	4
IDH2	NM_002168.2	4
KRAS	NM_033360.2	2, 3, 4
MAP2K1	NM_002755.3	2, 3
MET	NM_001127500.2	14, 16, 17, 18, 19
MET	NM_001127500.2	Intron 13, ersten 100 bp von Intron 14
NRAS	NM_002524.4	2, 3, 4
PIK3CA	NM_006218.2	8, 10, 21
PTEN	NM_000314.4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
ROS1	NM_002944.2	34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41

TP53	NM_000546.5	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
NTRK1	NM_002529.3	13, 14, 15, 16, 17
NTRK2	NM_006180.3	14, 15, 16, 17, 18, 19
NTRK3	NM_001012338.2	15, 16, 17, 18, 19, 20
RET	NM_020975.6	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
	NM_005343.4,	
HRAS	NM_001130442.1	2, 3, 4
STK11	NM_000455.4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
KEAP1	NM_203500.2	2, 3, 4, 5, 6
NFE2L2	NM_006164.5	1, 2, 3, 4, 5#
CUL3	NM_003590.5	1 - 16
RB1	NM_000321.3	1 - 27
SMARCA4	NM_003072.5	2 - 35

NTRK1-3- und NRG1-Fusionsdiagnostik mittels Next-Generation Sequencing

- Histologische Untersuchung der eingesandten Tumorprobe anhand eines HE-Präparates mit Bestimmung des Tumorzellgehaltes.
- RNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Gewebe mit Mikrodissektion 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	