



# Corso di Laurea in Tecniche di laboratorio biomedico C sede ASL di Latina



Corso integrato  
TECNOLOGIE AVANZATE NELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO  
III° anno I° semestre

DIAGNOSTICA MOLECOLARE SU TESSUTO

## *Metodiche di tipo estrattivo*

**Dott. Claudio Di Cristofano**

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Anatomia Patologica  
Sapienza, Università di Roma - Polo Pontino  
I.C.O.T., Latina

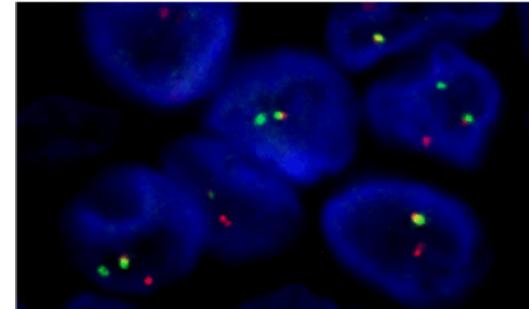
# Approccio Molecolare nei tumori

**BRCA1 & BRCA2**  
AMBRY IS PLEASED TO OFFER MULTIPLE BRCA TESTING OPTIONS

TESTS INCLUDE:  
▶ BRCA 1&2  
▶ BRCAPlus  
▶ BreastNext  
▶ CancerNext  
▶ OvaNext  
▶ GYNplus

Genetic testing for hereditary breast and ovarian cancer syndromes.

**Ambry Genetics**



## PREVENZIONE

BRCA1 e 2 ca. mammella

## DIAGNOSI

Traslocazione EWS sarcoma di Ewing

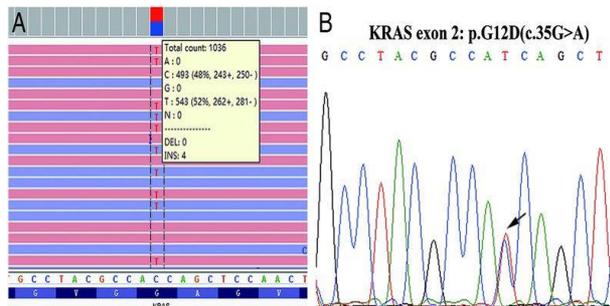
# GENOMICA

## FATTORI PREDITTIVI

KRAS ca colon-retto

## MONITORAGGIO DELLA MALATTIA

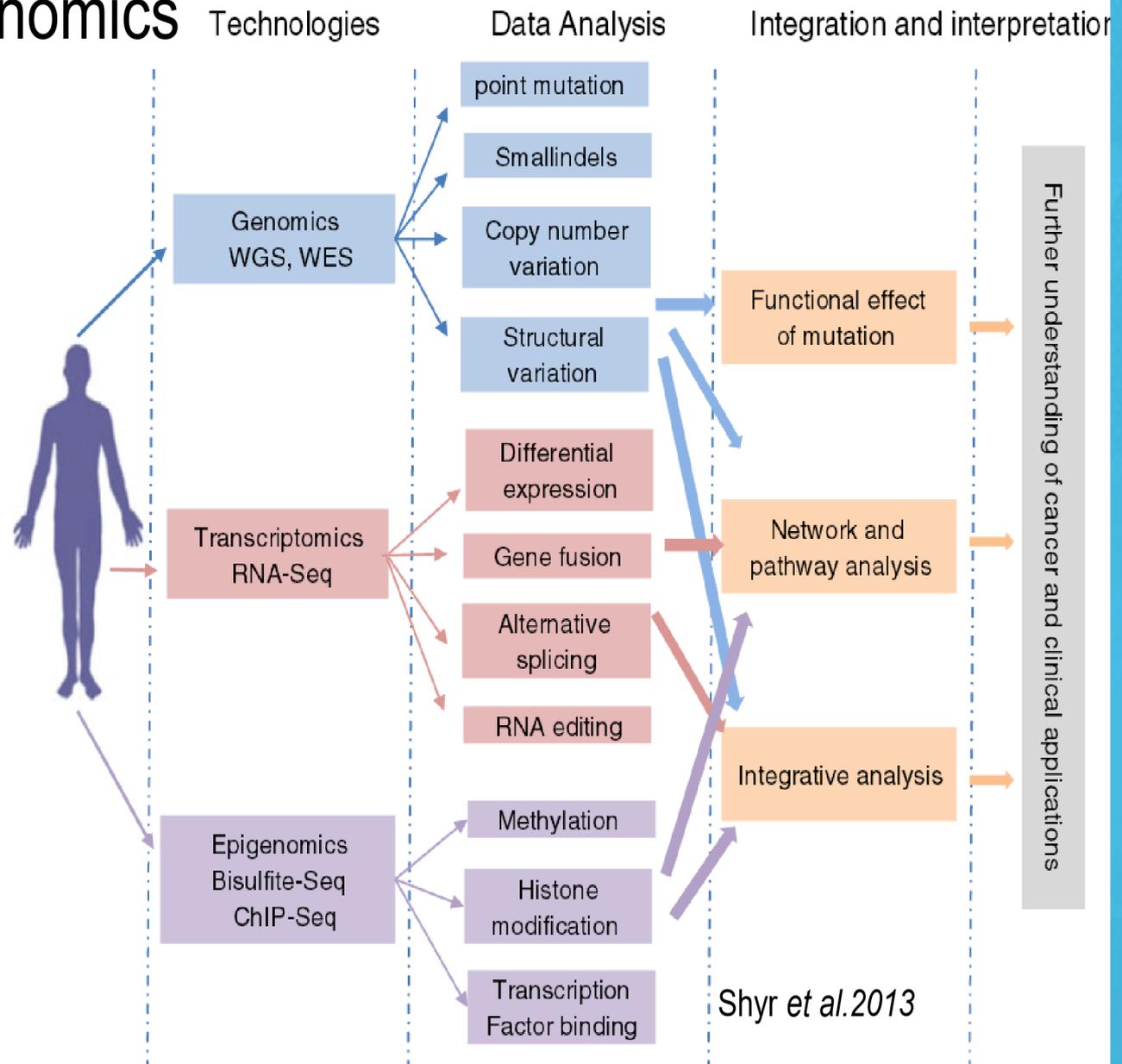
Bx liquida (EGFr) ca polmone



Liquid Biopsy for monitoring lung cancer



# Cancer Genomics



# Classificazione molecolare dei tumori

Cell Reports

Resource

ARTICLE

Inca

The Can

A cat  
impr  
expr  
DNA  
canc  
soma  
copy  
canc  
signa  
BRC  
defec  
canc

Ovarian  
women  
estimate  
patients  
cancer<sup>2</sup>  
followe  
resistan  
months  
Approx  
tions in  
for by ot  
attribut

AF

Co  
hu

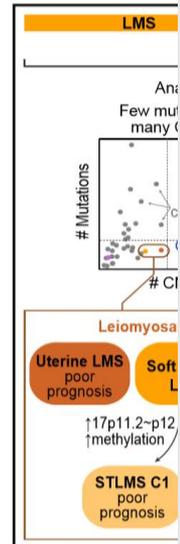
The Canc

We an  
messa  
across  
of four  
hetero  
breast  
of spe  
protein  
analysi  
HER2/  
breast  
actiolo  
differe  
plastic

Breast car  
1,300,000  
this heter  
groups. T  
numerous  
ing outco  
HER2 (als  
because o

Cell  
Compreh  
Character

Graphical Abst



Highlights

- Multiplatform genomics shows their divergence

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript



HHS Public Access

Author manuscript

Nat Genet. Author manuscript; available in PMC 2016 November 09.

Published in final edited form as:

Nat Genet. 2016 June ; 48(6): 607–616. doi:10.1038/ng.3564.

## Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas

Joshua D. Campbell<sup>1,2</sup>, Anton Alexandrov<sup>3,4</sup>, Jaegil Kim<sup>1</sup>, Jeremiah Wala<sup>1,2</sup>, Alice H. Berger<sup>1,2</sup>, Chandra Sekhar Pedamallu<sup>1,2</sup>, Sachet A. Shukla<sup>1,2</sup>, Guangwu Guo<sup>1,2</sup>, Angela N. Brooks<sup>1,2</sup>, Bradley A. Murray<sup>1,2</sup>, Marcin Imielinski<sup>1,2,5</sup>, Xin Hu<sup>6</sup>, Shiyun Ling<sup>6</sup>, Rehan Akbani<sup>6</sup>, Mara Rosenberg<sup>1</sup>, Carrie Cibulskis<sup>1</sup>, Aruna Ramachandran<sup>1,2</sup>, Eric A. Collisson<sup>7</sup>, David J. Kwiatkowski<sup>1,8</sup>, Michael S. Lawrence<sup>1</sup>, John N. Weinstein<sup>6</sup>, Roel G. W. Verhaak<sup>6</sup>, Catherine J. Wu<sup>1,2</sup>, Peter S. Hammerman<sup>1,2</sup>, Andrew D. Cherniack<sup>1</sup>, Gad Getz<sup>1,9</sup>, Cancer Genome Atlas Research Network<sup>10</sup>, Maxim N. Artyomov<sup>3</sup>, Robert Schreiber<sup>3</sup>, Ramaswamy Govindan<sup>11</sup>, and Matthew Meyerson<sup>1,2,12</sup>

<sup>1</sup>Cancer Program, The Eli and Edythe L. Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, Massachusetts, USA

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA

<sup>3</sup>Department of Pathology and Immunology, Washington University, St. Louis, Missouri, USA

<sup>4</sup>Computer Technologies Laboratory, ITMO University, St. Petersburg, Russia

Users may view, print, copy, and download text and data-mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)

Corresponding authors: Matthew Meyerson (Matthew\_Meyerson@dfci.harvard.edu), Ramaswamy Govindan (rgovinda@dom.wustl.edu).

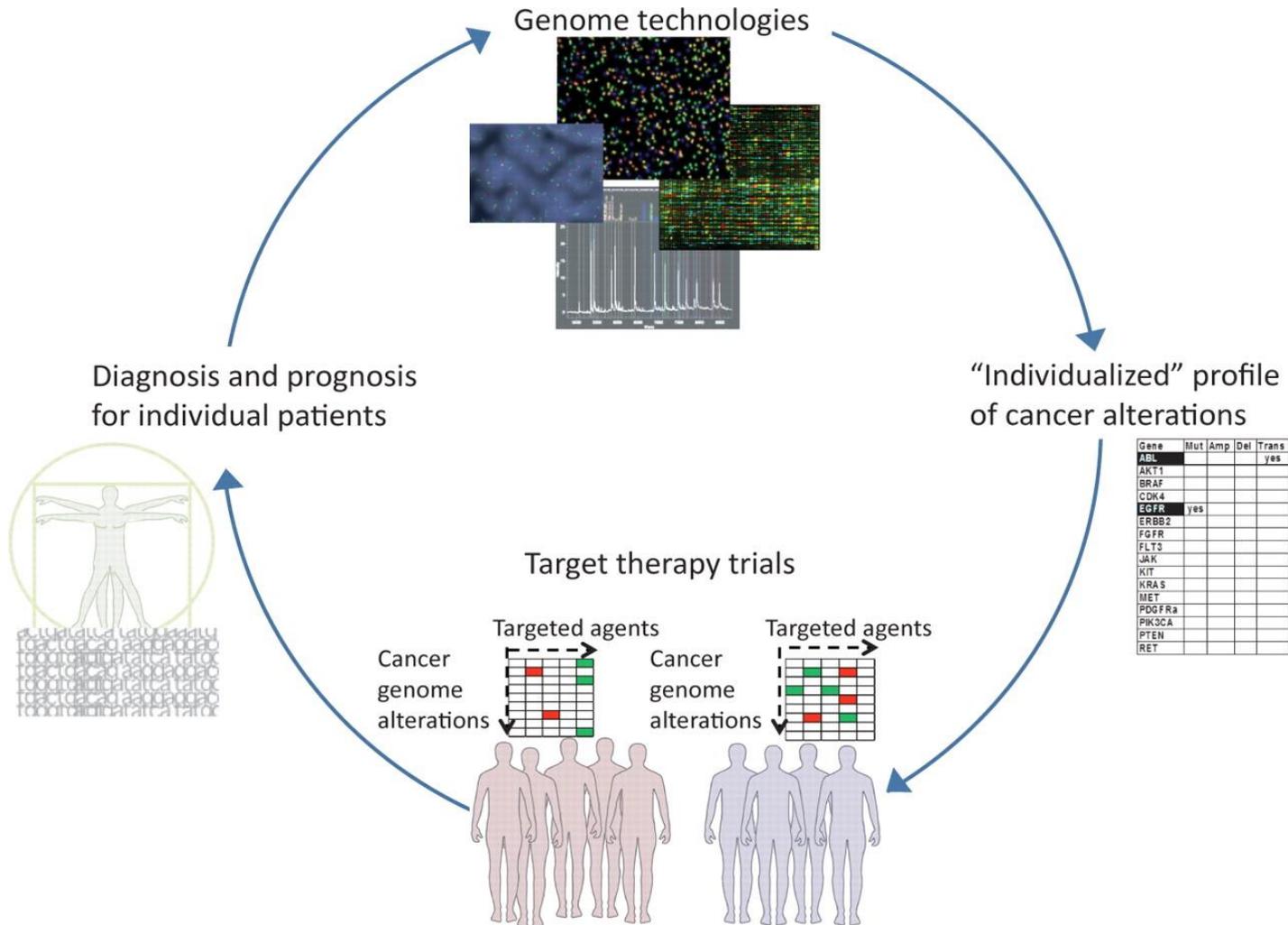
<sup>10</sup>A full list of members appears under Collaborators and in Supplementary Table 3.

URLs

Picard tools: <http://broadinstitute.github.io/picard/>

MutSig algorithm: [www.broadinstitute.org/cancer/cga/MutSig](http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/MutSig)

# Cycle of personalized cancer medicine.

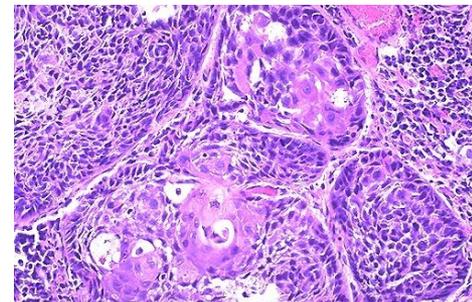
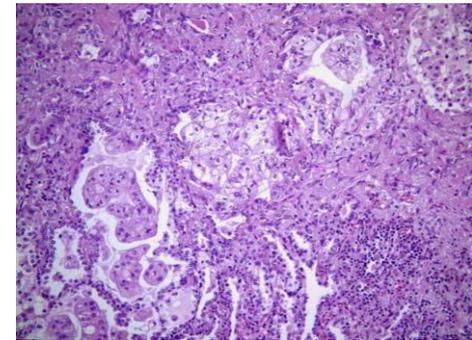
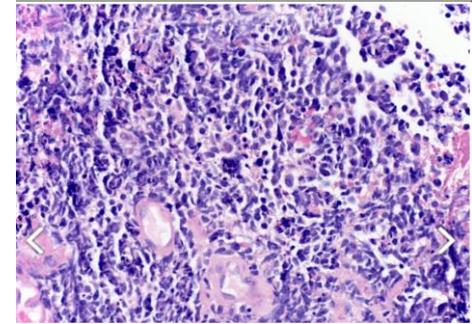


Laura E. MacConaill et al. *Cancer Discovery* 2011;1:297-311

# Tumori del polmone

## Immunoistochimica

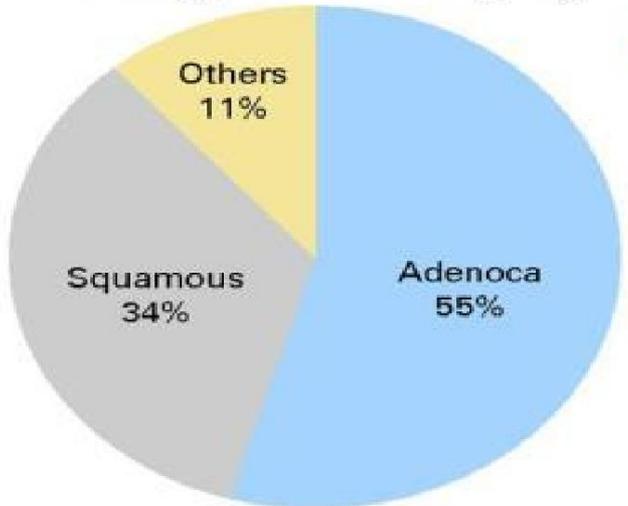
- **Ca. a piccole cellule (SCLC)**
  - **Marcatori neuroendocrini**
    - **CD56, NSE; Sin.; Crom.**
- **Ca. non a piccole cellule (NSCLC)**
  - **Adenocarcinomi**
    - **TTF1; CK7; NASPINA A**
  - **Carcinomi a cellule squamose**
    - **P40; CK5/6; CK34B12; p63**



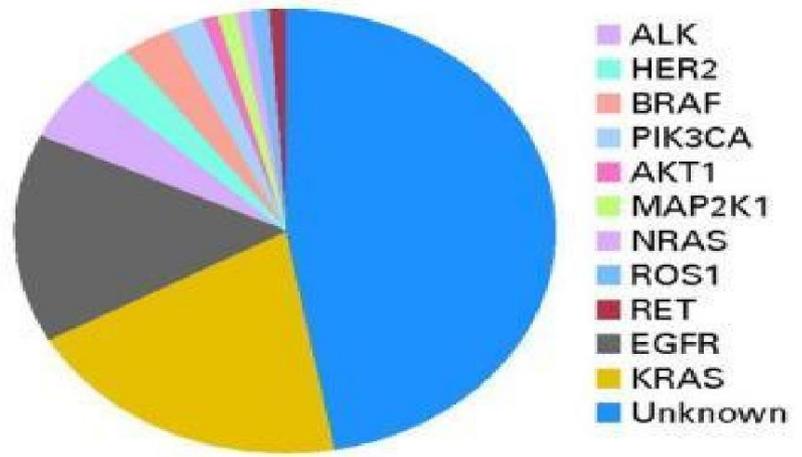
NSCLC  
as one  
disease



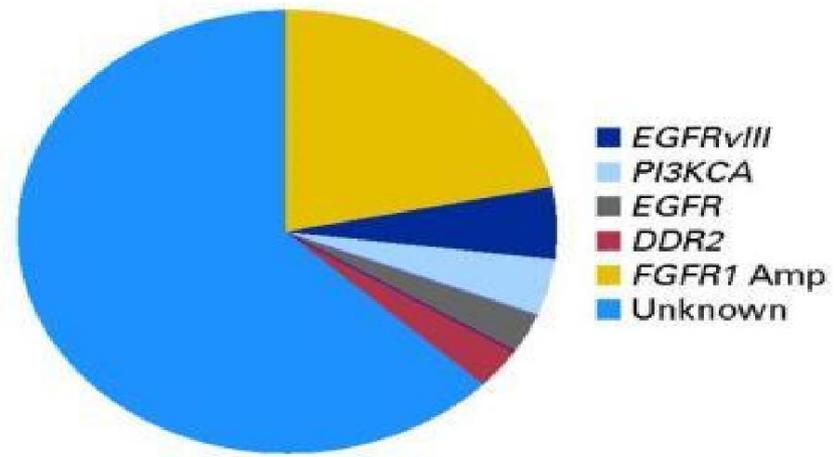
Histology-Based Subtyping



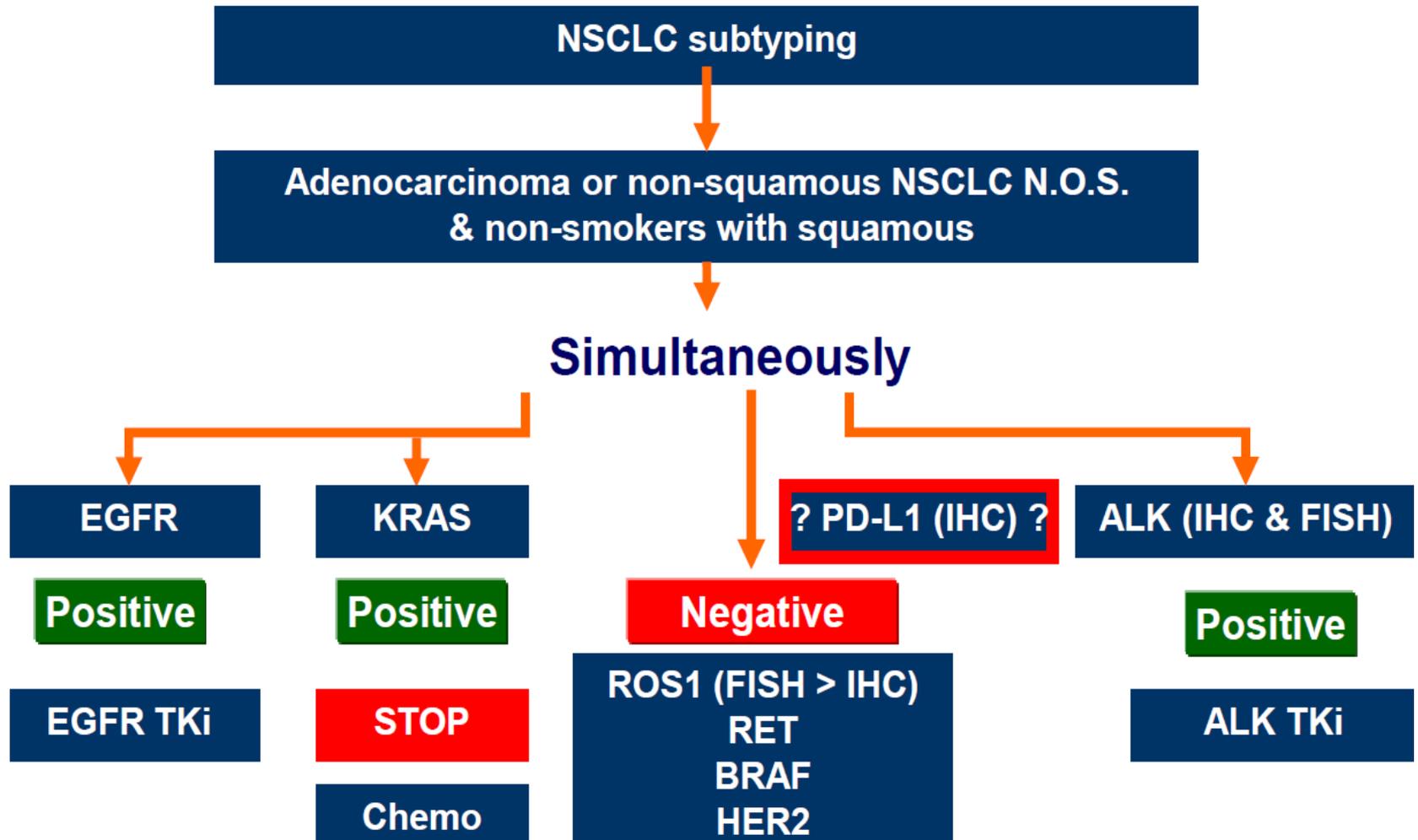
Adenocarcinoma



Squamous Cell Cancer



# Algorithm for Predictive Genetic Testing in Advanced NSCLC Routine Practice



# Tipo di materiale nel NSCLC

**Surgical Resection**



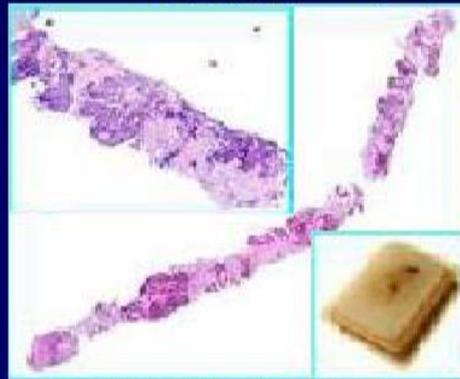
**Histology**



**Advanced Tumor**

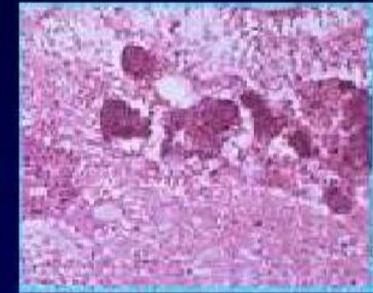


**Core Needle Biopsy (CNB)**



**Formalin-fixed and Paraffin-embedded (FFPE)**

**Endobronchial Ultrasound (EBUS) or Pleural Fluid**



**Alcohol-fixed**



**Fine Needle Aspiration (FNA)**



**Alcohol-fixed**



**Alcohol-fixed - Cell Block**

# IHC

- Used to detect changes to protein expression
- More accessible
- Less subjective
- Interpretation is highly dependent on proper specimen processing

# FISH

- Used to detect gene fusions
- Defines spatial relationships between targets
- Requires high level of skill for chromosome preparation and interpretation

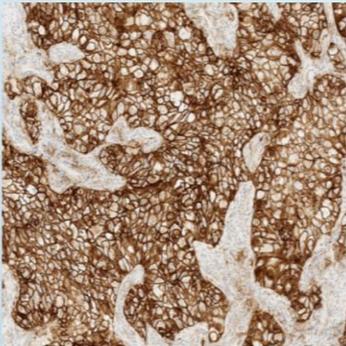
# NGS

- Used to detect genetic mutations and fusions
- Requires specialized equipment and skilled operators
- Generates **DATA**
- Superior performance characteristics

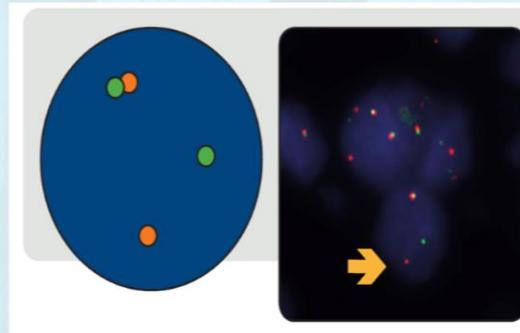
Turnaround time

Cost of testing

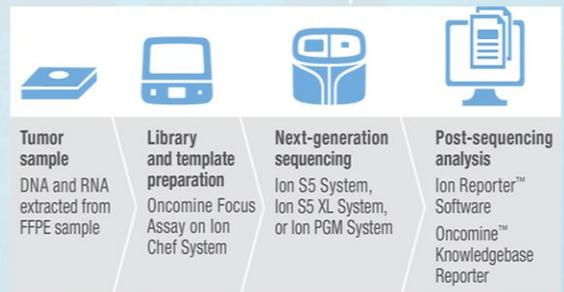
Sensitivity



VENTANA PD-L1 (SP263) Assay staining in non-small cell lung cancer (NSCLC) with membranous and cytoplasmic staining of the tumor cells. Roche 2018.

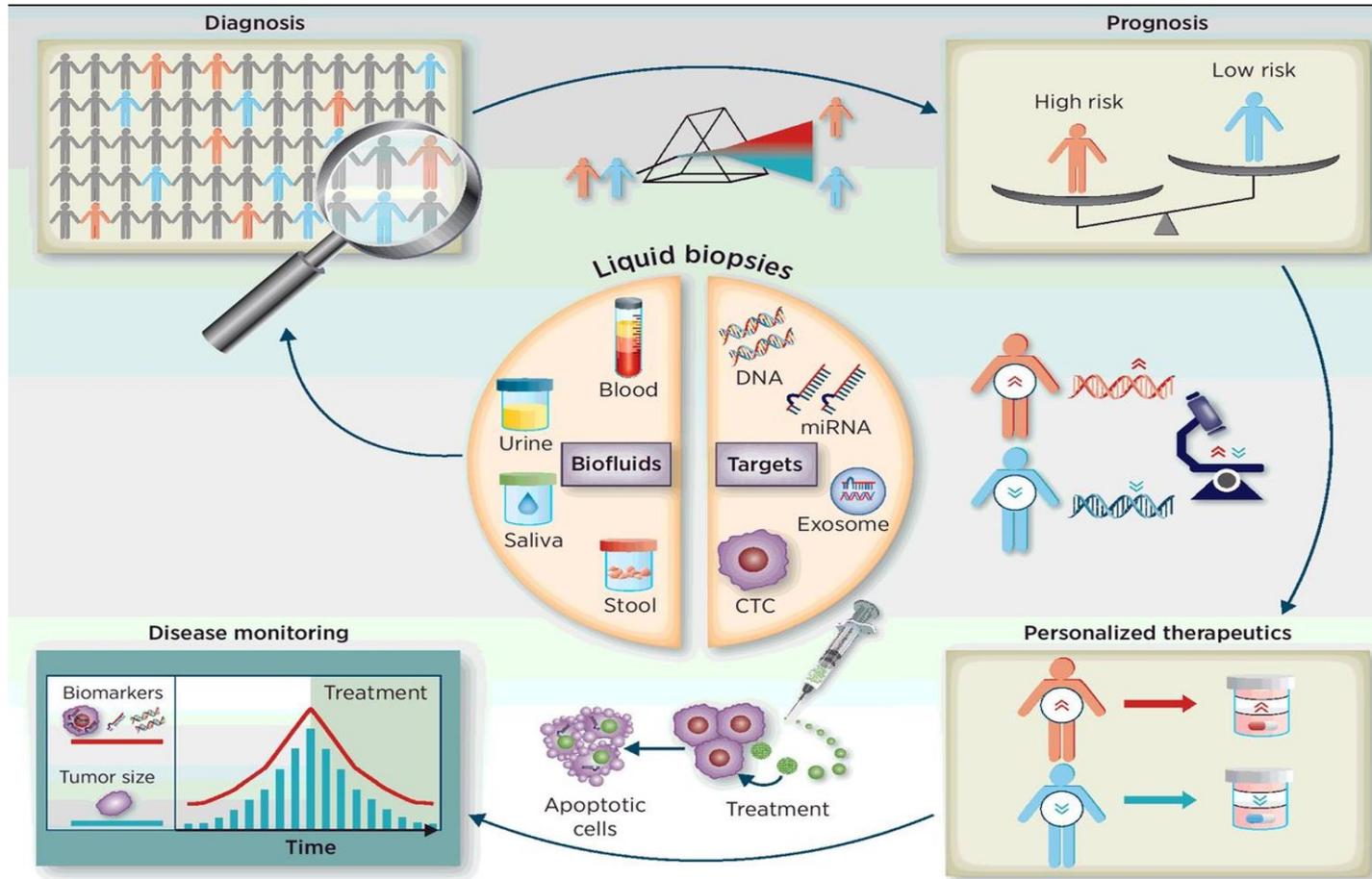


ALK Break apart FISH Evaluation guide for NSCLC Tissue Specimens. AMD-00002974. Abbott 2018



OncoPrint focus assay workflow. Thermo Fisher 2018.

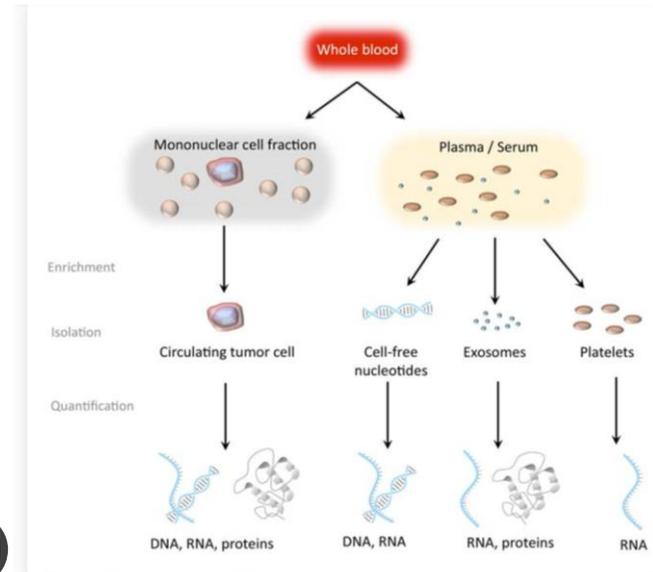
# Biopsia liquida



# Biopsia liquida

Cellule circolanti tumorali (CTC)  
DNA tumorale circolante (ctDNA)

- **CTC**
  - Tecnicamente difficile (centri specializzati)
  - Assenza di markers certi di cellule neoplastiche o steminali
- **ctDNA**
  - DNA tumorale totale (ctDNA)
  - DNA mutato (ex. EGFR)
- cfRNA (RNA circolante libero)
- EV (DNA vescicole extracellulari)



SA Joose et al Cancer Cell, 2015

**Utile per il monitoraggio della malattia**

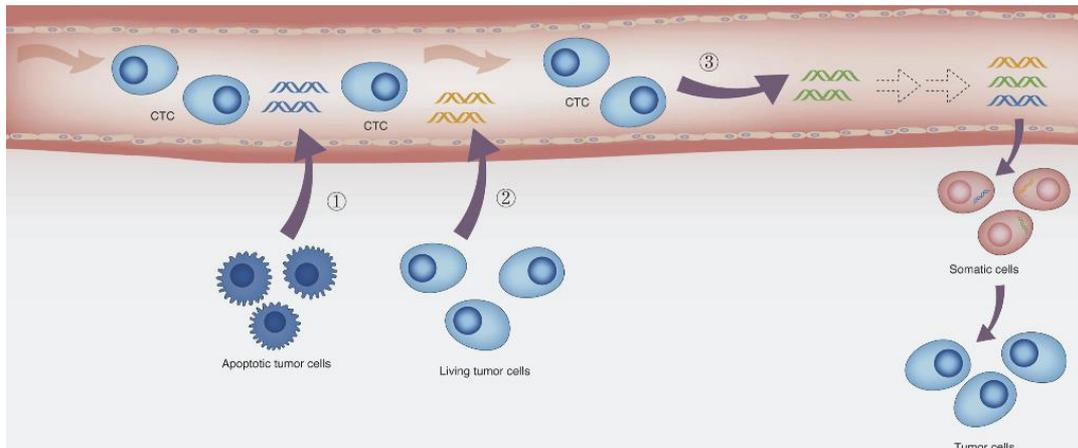
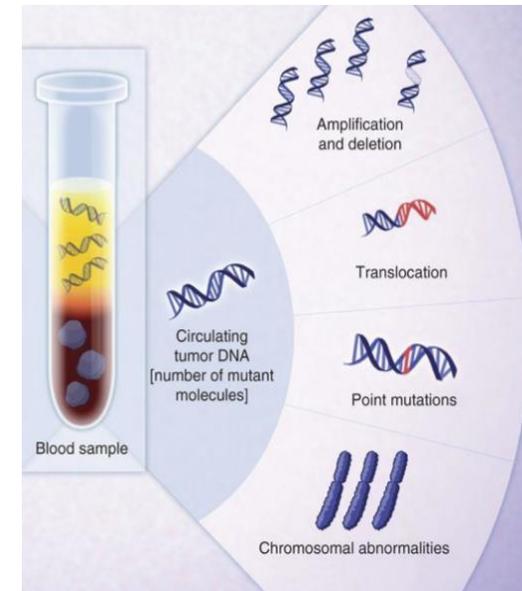
# Biopsia liquida

## ctDNA

Event	Cancer screening	Localized cancer	Metastatic cancer	Refractory cancer
Treatment strategy	Early intervention	Risk of dissemination and detection of recurrence	Treatment selection and monitoring response	Mechanism of resistance and new treatment

Prelievi di sangue ripetuti durante il corso della malattia

Valutazione del DNA tumorali circolante (ctDNA) nel sangue



# Biopsia liquida

## «Raccomandazioni per l'esecuzione di test molecolari su biopsia liquida in oncologia»

(AIOM/SIAPEC/SIF 2018)

[https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/09/2018\\_biopsialiquida.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/09/2018_biopsialiquida.pdf)

- **Applicazioni cliniche della biopsia liquida**
  - **Alla diagnosi**
    - » **possibile alternativa all'analisi su tessuto tumorale quando la quantità o la qualità dei tessuti disponibili non è sufficiente per effettuare le analisi molecolari**
  - **Alla progressione radiologica dopo la terapia con EGFR-TKI**
    - » **Analisi EGFR di sensibilizzazione e mutazioni T790M mediante biopsia liquida (Osimertinib in prog. NSCLC con T790M mut.)**
  - **I pazienti con analisi cfDNA "negativa" devono essere sottoposti ad analisi mutazionale su tessuto mediante re-biopsia**
- **Methods for the study of ctDNA mutations**
  - **PCR Real time (RT-PCR)**
  - **Digital PCR (dPCR)**
  - **NGS**

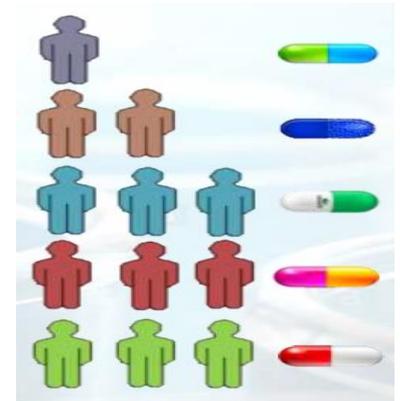
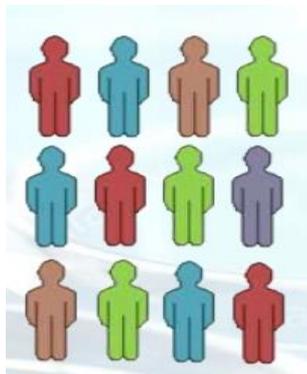
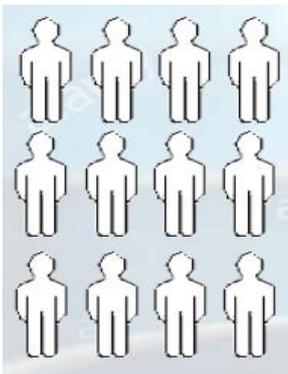
# PRECISION MEDICINE

*« a form of medicine that uses information about a person 'genes, proteins, and environment to prevent, diagnose, and treat disease.»*

National Cancer Institute

## FARMACI A BERSAGLIO MOLECOLARE

Mentre le **terapie convenzionali** distruggono le cellule in attiva replicazione agendo sul DNA e sul meccanismo di divisione cellulare, i **farmaci a bersaglio molecolare** modulano l'attività di specifici target molecolari coinvolti nel signaling cellulare, proliferazione, apoptosi, angiogenesi, metabolismo, migrazione o invasione.



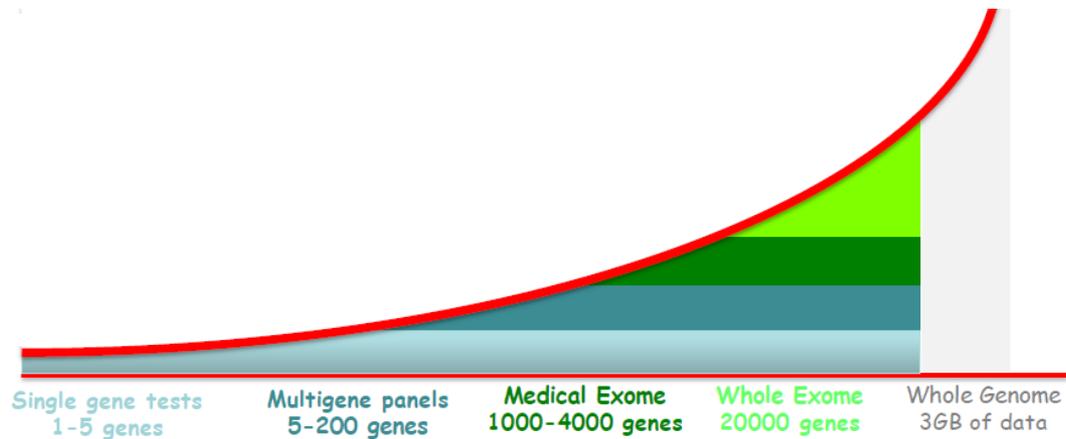
# NEXT GENERATION SEQUENCING

Anatomic Pathology / NEXT-GENERATION CANCER GENOME SEQUENCING

## Whole Cancer Genome Sequencing by Next-Generation Methods

*Jeffrey S. Ross, MD,<sup>1,2</sup> and Maureen Cronin, PhD<sup>2</sup>*

**Key Words:** Cancer; Next-generation sequencing; Massively parallel sequencing; Personalized oncology; Molecular diagnostics; Colorectal cancer; Non-small cell lung cancer; Melanoma



# MOLECULAR REVOLUTION

Rivalutazione del ruolo della diagnosi patologica come spina dorsale del processo decisionale terapeutico. Nella pratica clinica quotidiana, i moderni patologi forniscono un'interpretazione integrata delle caratteristiche morfologiche, molecolari e cliniche che guidano le decisioni terapeutiche

Il campo dell'oncologia di precisione è in rapida espansione e il numero di aberrazioni molecolari tumore-specifiche trattabili è cresciuto sostanzialmente nell'ultimo decennio, con un significativo beneficio in termini di sopravvivenza in diversi tipi di cancro

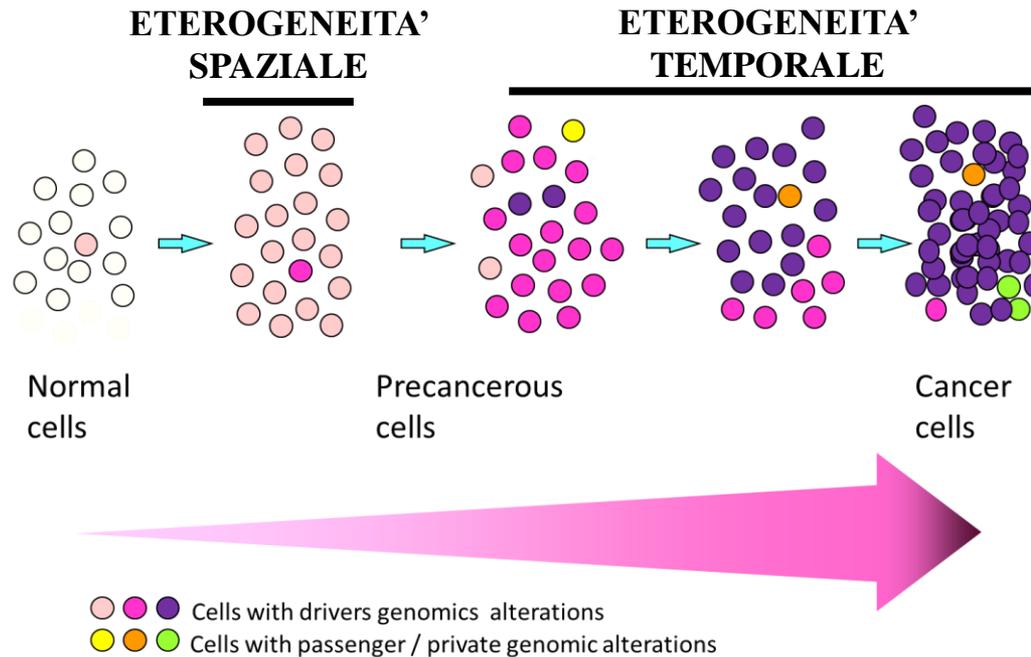
## New Drug Therapy Approvals 2019

*Advancing Health Through Innovation*



**IMPACT INNOVATION PREDICTABILITY ACCESS**  
**FDA's Center for Drug Evaluation and Research**  
**January 2020**

**GLI EVENTI MUTAZIONALI NON SONO TUTTI  
UGUALMENTE RILEVANTI ED IL LORO IMPATTO CLINICO E'  
FUNZIONALE ANCHE DEL CONTESTO CHE LI OSPITA**



**IL CONTESTO, OSSIA IL TESSUTO NEL QUALE TALI ALTERAZIONI SI  
MANIFESTANO, E LA SEQUENZIALITA' DEGLI EVENTI, POTREBBERO ESSERE  
RILEVANTI NELLA SCELTA TERAPEUTICA**

# Prenalitica

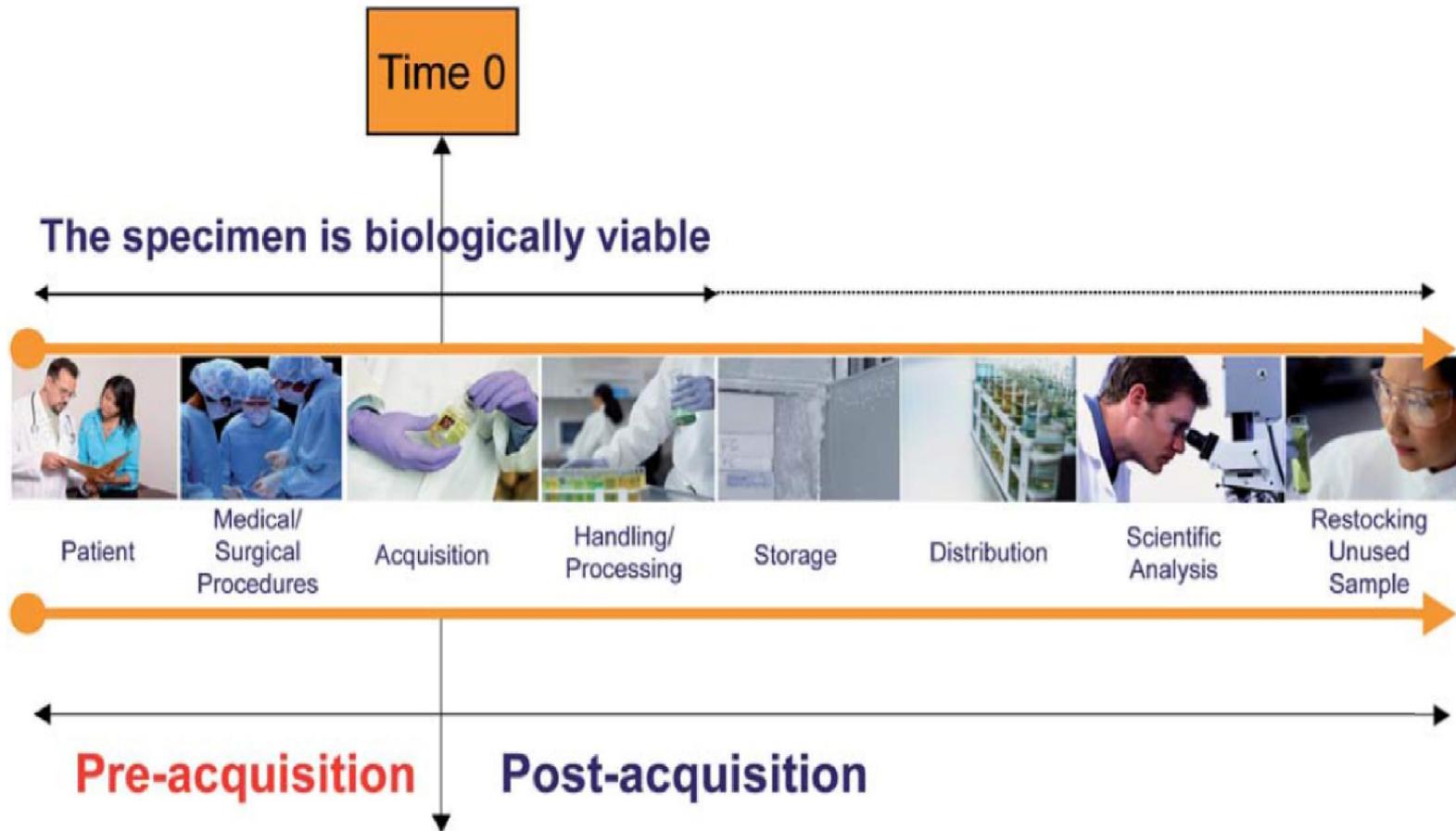


Fig. 1. The life cycle of the biospecimen.

# LA FASE PRE-ANALITICA

I campioni rappresentano il patrimonio delle informazioni ed è quindi indispensabile una standardizzazione di tutti i percorsi e le attività: dalla raccolta del materiale biologico, alla loro processazione fino all'estrazione e conservazione dei campioni di DNA o RNA. Queste sono tutte fasi che possono condizionare sensibilmente i risultati dei successivi test.

## Preanalytics and Precision Pathology

### Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine

*Carolyn C. Compton, MD, PhD; James A. Robb, MD; Matthew W. Anderson, MD, PhD; Anna B. Berry, MD; George G. Birdsong, MD; Kenneth J. Bloom, MD; Philip A. Branton, MD; Jessica W. Crothers, MD; Allison M. Cushman-Vokoun, MD, PhD; David G. Hicks, MD; Joseph D. Khoury, MD; Jordan Laser, MD; Carrie B. Marshall, MD; Michael J. Misialek, MD; Kristen E. Natale, DO; Jan Anthony Nowak, MD, PhD; Damon Olson, MD; John D. Pfeifer, MD, PhD; Andrew Schade, MD; Gail H. Vance, MD; Eric E. Walk, MD; Sophia Louise Yohe, MD*

# A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue

## How Well Do You Know Your FFPE Specimen?

*B. Paige Bass, PhD; Kelly B. Engel, PhD; Sarah R. Greytak, PhD; Helen M. Moore, PhD*

Preanalytical Factor	DNA	RNA	Protein	Morphology
Postmortem interval	<48 h for FISH, <sup>7</sup> ≤4 d for PCR <sup>8</sup>	<4 h <sup>53</sup>	Evidence was insufficient	Evidence was not available
Cold ischemia	<1 h for FISH, <sup>5</sup> ≤24 h for PCR <sup>31</sup>	<12 h <sup>56</sup>	<12 h <sup>5,80-83</sup>	<6 h <sup>91,139-141</sup>
Warm ischemia time	Evidence was insufficient	Evidence was not available	Evidence was not available	Evidence was not available
Specimen size	3–10 mm <sup>3</sup> (Ref. 10)	Evidence was not available	1.2–3.5 mm <sup>3</sup> (Ref. 84)	Evidence was not available
Prefixation handling	Evidence was not available	Evidence was not available	Thresholds are antigen specific <sup>85-87</sup>	Thresholds are tissue and method specific <sup>81,85,142,143</sup>
Decalcification	EDTA <sup>11-14</sup>	Ultrasound or EDTA <sup>14,57-59</sup>	Thresholds are tissue and antigen specific <sup>87-89</sup>	Ultrasound; EDTA; nitric, formic, or acetic acid; DECAL <sup>b</sup> ; Cal-Ex <sup>c</sup> ; D-calcifier <sup>d</sup> ; Plank-Rychlo, Ebner's, or Jenkin's solution <sup>14,89,144,145</sup>

# FISSAZIONE

- ✓ tempo alla fissazione (tempo di ischemia a freddo)
- ✓ tipo di fissativo
- ✓ durata dell'intero processo di fissazione dall'inizio alla fine.

**TEMPO ISCHEMIA CALDA:** Tempo che intercorre tra la legatura dei vasi e l'escissione chirurgica

**TEMPO ISCHEMIA FREDDA:** Tempo che intercorre tra la fine dell'escissione chirurgica e l'inizio della fissazione (circa 30')

Dipende da:

Organizzazione sale operatorie (personale di sala, operatori sanitari)

Tempo di trasferimento in Anatomia Patologica (Ubicazione anatomia patologica)

Temperatura ambiente

Review > Arch Pathol Lab Med. 2007 Dec;131(12):1805-16. doi: 10.5858/2007-131-1805-THFGEA.

**Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities**

Fabiola Medeiros<sup>1</sup>, C Ted Rigl, Glenda G Anderson, Shawn H Becker, Kevin C Halling

# FISSATIVO:

**CAMPIONE ISTOLOGICO:** Formalina neutra tamponata al 10%  
(concentrazione finale 4%)

**CAMPIONE CITOLOGICO:** Formalina o fissativi alcolici

**TEMPO DI FISSAZIONE:** 6-72h

Ore	mm/h	mm
1	3,6	3,6
4	1,8	7,2
9	1,2	10,8
16	0,9	14,4
25	0,72	18
100 (4gg)	0,36	36

## CAMPIONAMENTO:

- Attività del patologo nella gestione del pezzo operatorio e nell'adeguato campionamento
- Attività del tecnico di laboratorio nella gestione delle biocassette

# PROCESSAZIONE:

La processazione deve essere effettuata utilizzando un processatore automatico e seguendo le indicazioni del produttore.

Durante la processazione i tessuti vengono disidratati e l'acqua viene sostituita con la PARAFFINA. Residui di acqua nel campione possono incidere sulla qualità e sulla stabilità delle componenti tissutali, DNA incluso.

E' necessario utilizzare paraffina con composizione standard e con bassa temperatura di melting (50-56°C) per non danneggiare l'integrità delle biomolecole presenti nel tessuto.

## **DECALCIFICAZIONE (campioni con tessuto osseo):**

**ACIDO FORTE** (acido nitrico o acido cloridrico): sono compatibili con la valutazione istologica ma non sono adatti per procedure di sequenziamento basate su PCR.

**ACIDO DEBOLE** (acido picrico, acetico o formico) o **AGENTE CHELANTE** (EDTA): le procedure di decalcificazione richiedono più tempo ma sono adatte sia per l'analisi morfologica che per il sequenziamento basato su PCR, incluso NGS

# SCELTA DEL CAMPIONE

## IL PATOLOGO E' RESPONSABILE DELLA SELEZIONE DEL BLOCCHETTO FFPE DA UTILIZZARE PER L'ESECUZIONE DEL TEST

Prima di procedere con il taglio, IL PATOLOGO deve valutare il materiale e fornire l'idoneità per l'estrazione del DNA/RNA.

Devono essere escluse le aree di tessuto che potenzialmente potrebbero compromettere l'esito dell'esame molecolare:

- Sangue
- Necrosi
- Laghi di mucina
- Infiltrati linfocitari evidenti
- Valutazione dell'eterogeneità

**VALUTAZIONE MORFOLOGICA**

# Scelta del materiale

- **Identificazione della neoplasia**
- **Scelta del blocchetto in paraffina**
- **% cellule neoplastiche nella sezione**
  - **campione (Bx, FNAC, pezzo operatorio)**
    - **>50% (minimo 20%)**
    - **% DNA mutante (AF)=% di tumore/2**
- **N° cellule necessarie**
  - **Dipende dalla metodica**
    - **NGS (10 ng DNA circa 1500 cellule conservate)**

# VALUTAZIONE DELLA CELLULARITA' TUMORALE

Il numero di cellule necessarie nelle metodiche estrattive:

Una cellula : ~ 7,5 pg di DNA (10 pg)

< 100 cellule: < 1ng di DNA

100-1000 cellule: ~ 1-10 ng di DNA

≥ 1000 cellule: ≥ 10 ng DNA

EasyPGX® ready PIK3CA:

15-30ng/reazione (FFPE) – 5-10ng/reazione (FRESCHI/CONGELATI) DNA

EasyPGX® ready ALK, ROS1, RET, MET - EasyPGX® ready NTRK fusion:

25-1500ng/reazione (FFPE) – 2,5-250ng/reazione (FRESCHI/CONGELATI) RNA

EasyPGX® ready MSI:

10-100ng/reazione (FFPE) – 10-20ng/reazione (FRESCHI/CONGELATI) DNA

# VALUTAZIONE DELLA CELLULARITA' TUMORALE

## FRAZIONE TUMORALE CELLULARE (LOD):

N° CELLULE TUMORALI/TOTALE CELLULE NUCLEATE

Per evitare falsi negativi:

SNV/INDEL:

frazione cellulare tumorale  $\geq 10\%$

VARIANTI STRUTTURALI:

frazione cellulare tumorale  $>10\%$

Virchows Arch (2017) 470:21–27  
DOI 10.1007/s00428-016-2042-6

ORIGINAL ARTICLE

**Adequately defining tumor cell proportion in tissue samples for molecular testing improves interobserver reproducibility of its assessment**

Benoît Lhermitte<sup>1</sup>  · Caroline Egele<sup>2</sup> · Noëlle Weingertner<sup>1</sup> · Damien Ambrosetti<sup>3</sup> · Bérengère Dadone<sup>3</sup> · Valérie Kubiniek<sup>4</sup> · Fanny Burel-Vandenbos<sup>3</sup> · John Coyne<sup>3</sup> · Jean-François Michiels<sup>3</sup> · Marie-Pierre Chenard<sup>1</sup> · Etienne Rouleau<sup>5,6</sup> · Jean-Christophe Sabourin<sup>1,2,7</sup> · Jean-Pierre Bellocq<sup>1,2</sup>

## A Prospective, Multi-Institutional Diagnostic Trial to Determine Pathologist Accuracy in Estimation of Percentage of Malignant Cells

Hollis Viray, BS; Kevin Li; Thomas A. Long, MPH; Patricia Vasalos, BS; Julia A. Bridge, MD; Lawrence J. Jennings, MD; Kevin C. Halling, MD; Meera Hameed, MD; David L. Rimm, MD, PhD



MODERN PATHOLOGY (2014) 27, 168–174

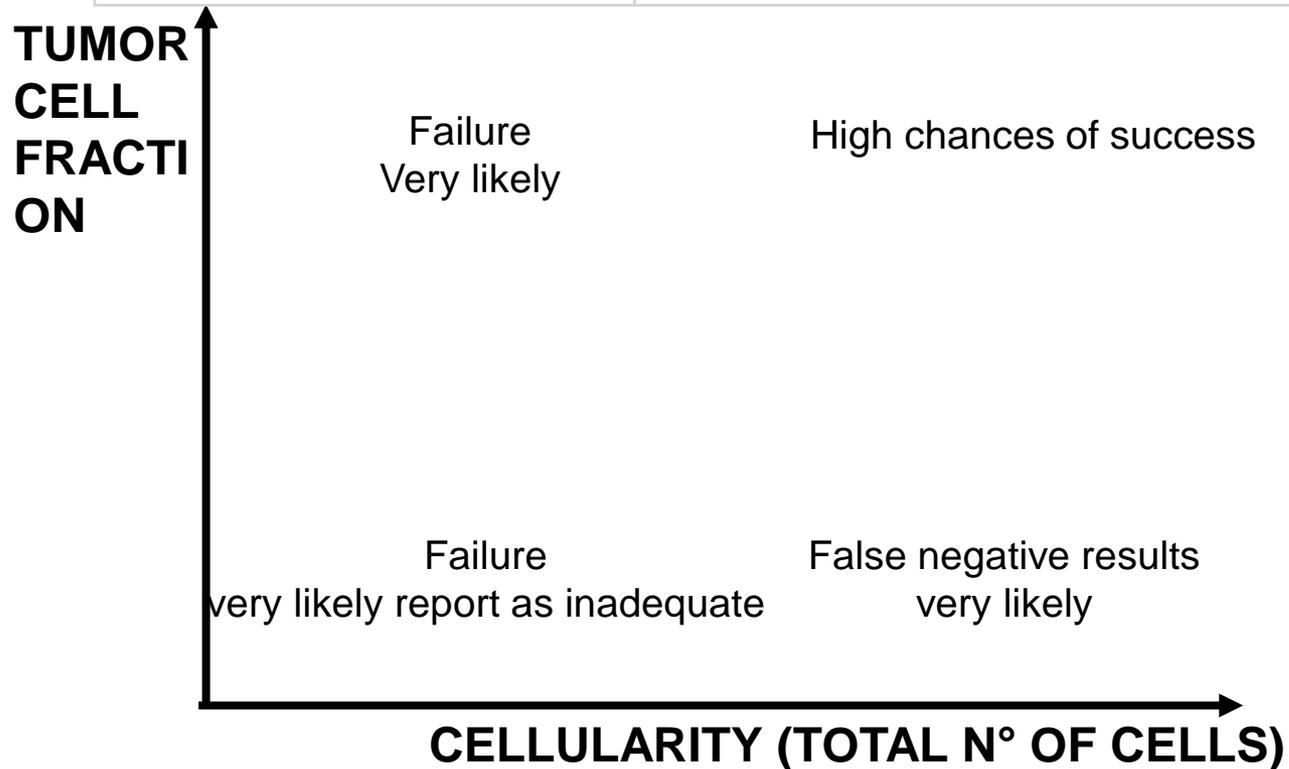
© 2014 USCAP, Inc. All rights reserved 0893-3952/14 \$32.00

## The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate

Alexander JJ Smits<sup>1,2</sup>, J Alain Kummer<sup>1</sup>, Peter C de Bruin<sup>1</sup>, Mijke Bol<sup>2</sup>, Jan G van den Tweel<sup>2</sup>, Kees A Seldenrijk<sup>1</sup>, Stefan M Willems<sup>2</sup>, G Johan A Offerhaus<sup>2</sup>, Roel A de Weger<sup>2</sup>, Paul J van Diest<sup>2</sup> and Aryan Vink<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands and <sup>2</sup>Department of Pathology, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

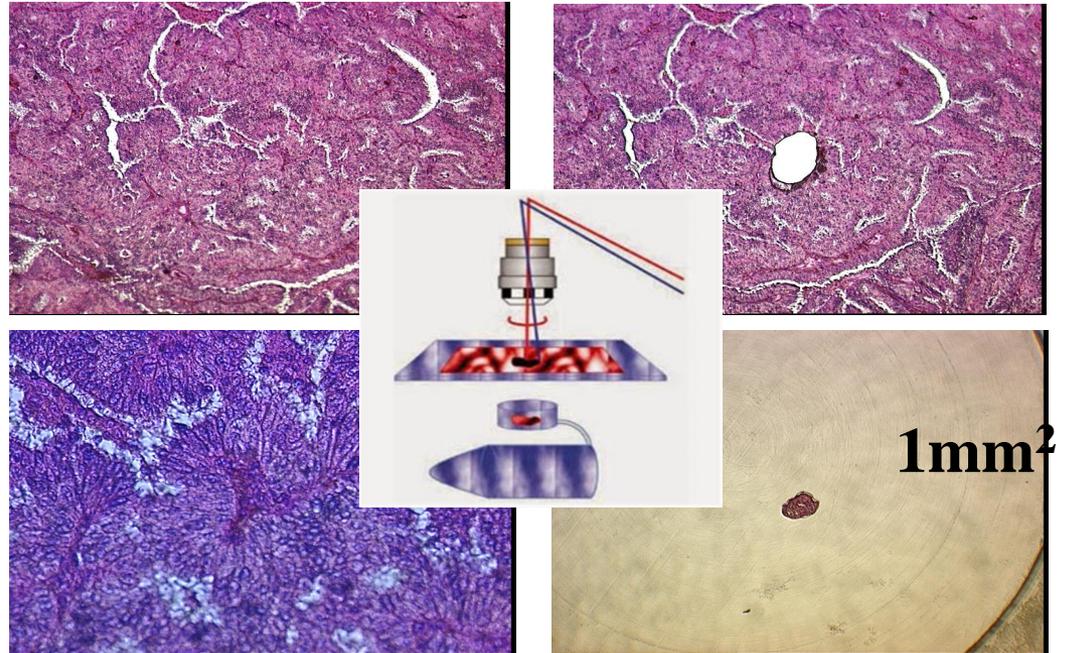
<b>CELLULARITA' TOTALE</b>	<b>FRAZIONE CELLULE TUMORALI</b>	<b>CAMPIONE</b>
>1500-2000 cellule	>10-20%	ADEGUATO
1500-2000 cellule	~10-20%	SUBOTTIMALE
<1500	<10%	INADEGUATO



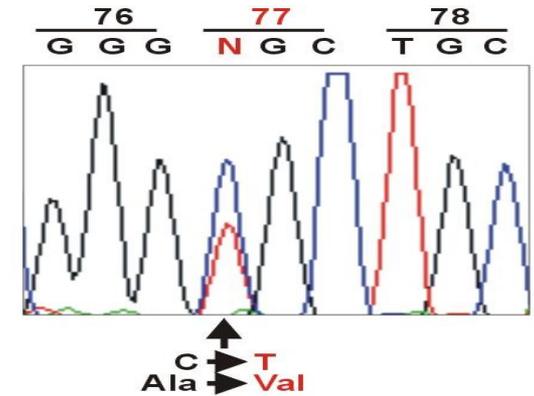
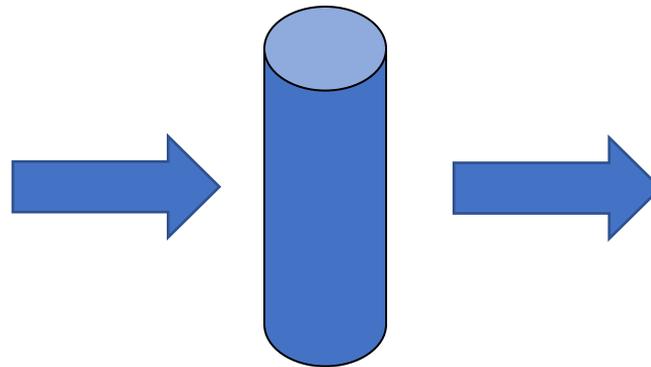
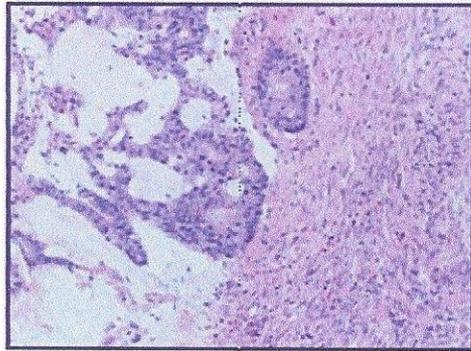
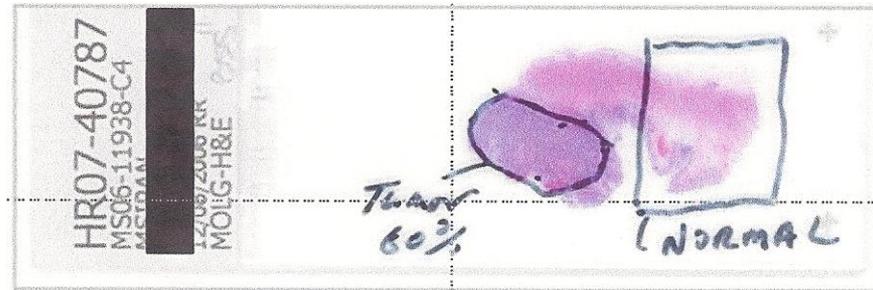
# Tecniche di arricchimento

- Laser capture microdissection (LCM)

- Microdissezione manuale



# Macrodissezione manuale



# TAGLIO DELLE SEZIONI ESTRAZIONE

**TAGLIO DELLE SEZIONI:** 10  $\mu\text{m}$  (5-20 $\mu\text{m}$ )  
Quantità totale: < 80 $\mu\text{m}$

**Effettuare estrazione da:**

- Sezione intera (dopo controllo istologico)
- Area dissecata

**ESTRAZIONE:** Da effettuare in un ambiente dedicato

- SPARAFFINATURA
- DIGESTIONE
- PURIFICAZIONE
- ISOLAMENTO

**QUALITY CHECK:** Lettura spettrofotometrica

# SCELTA DELLA METODICA

Review > Arch Pathol Lab Med. 2018 Mar;142(3):321-346. doi: 10.5858/arpa.2017-0388-CP.  
Epub 2018 Jan 22.

## Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology

Neal I Lindeman<sup>1</sup>, Philip T Cagle, Dara L Aisner, Maria E Arcila, Mary Beth Beasley, Eric H Bernicker, Carol Colasacco, Sanja Dacic, Fred R Hirsch, Keith Kerr, David J Kwiatkowski, Marc Ladanyi, Jan A Nowak, Lynette Sholl, Robyn Temple-Smolkin, Benjamin Solomon, Lesley H Souter, Erik Thunnissen, Ming S Tsao, Christina B Ventura, Murry W Wynes, Yasushi Yatabe

Il test molecolare idealmente dovrebbe essere effettuato nello stesso centro dove è stata effettuata la diagnosi anatomo-patologica:

- Minimizzare il TAT
- Reflex test

Review > J Clin Oncol. 2017 May 1;35(13):1453-1486. doi: 10.1200/JCO.2016.71.9807.  
Epub 2017 Feb 6.

## Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology

Antonia R Sepulveda<sup>1</sup>, Stanley R Hamilton<sup>1</sup>, Carmen J Allegra<sup>1</sup>, Wayne Grody<sup>1</sup>, Allison M Cushman-Vokoun<sup>1</sup>, William K Funkhouser<sup>1</sup>, Scott E Kopetz<sup>1</sup>, Christopher Lieu<sup>1</sup>, Noralane M Lindor<sup>1</sup>, Bruce D Minsky<sup>1</sup>, Federico A Monzon<sup>1</sup>, Daniel J Sargent<sup>1</sup>, Veena M Singh<sup>1</sup>, Joseph Willis<sup>1</sup>, Jennifer Clark<sup>1</sup>, Carol Colasacco<sup>1</sup>, R Bryan Rumble<sup>1</sup>, Robyn Temple-Smolkin<sup>1</sup>, Christina B Ventura<sup>1</sup>, Jan A Nowak<sup>1</sup>

Practice Guideline > J Clin Oncol. 2018 Jul 10;36(20):2105-2122. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8738.  
Epub 2018 May 30.

## Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update

Antonio C Wolff<sup>1</sup>, M Elizabeth Hale Hammond<sup>1</sup>, Kimberly H Allison<sup>1</sup>, Brittany E Harvey<sup>1</sup>, Pamela B Mangu<sup>1</sup>, John M S Bartlett<sup>1</sup>, Michael Bilous<sup>1</sup>, Ian O Ellis<sup>1</sup>, Patrick Fitzgibbons<sup>1</sup>, Wedad Hanna<sup>1</sup>, Robert B Jenkins<sup>1</sup>, Michael F Press<sup>1</sup>, Patricia A Spears<sup>1</sup>, Gail H Vance<sup>1</sup>, Giuseppe Viale<sup>1</sup>, Lisa M McShane<sup>1</sup>, Mitchell Dowsett<sup>1</sup>

# **SENSIBILITA' DELLE METODICHE DI PATOLOGIA MOLECOLARE**

	<b>Sensibilità</b>
<b>Sanger</b>	<b>10-20%</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>&lt;10%</b>
<b>NGS</b>	<b>1-5%</b>
<b>Digital PCR</b>	<b>&lt;1%</b>

# PAPILLARY LESIONS OF THE BREAST: A MOLECULAR ANALYSIS

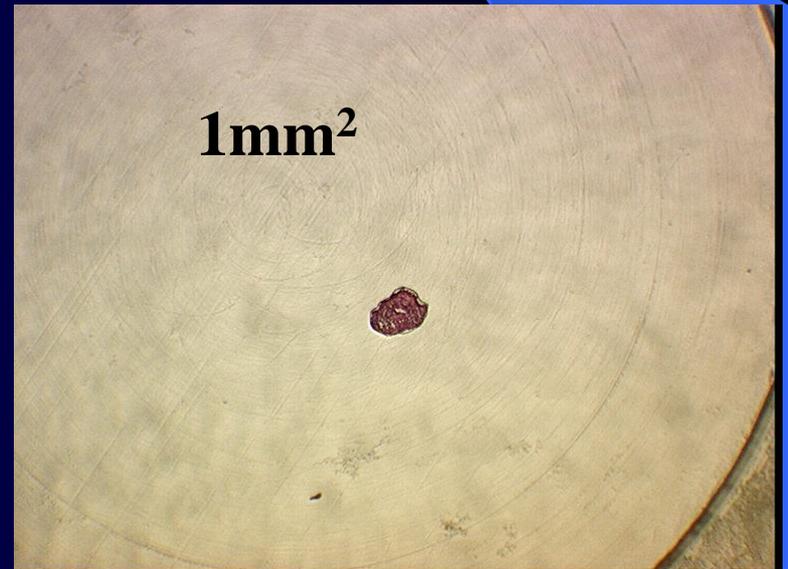
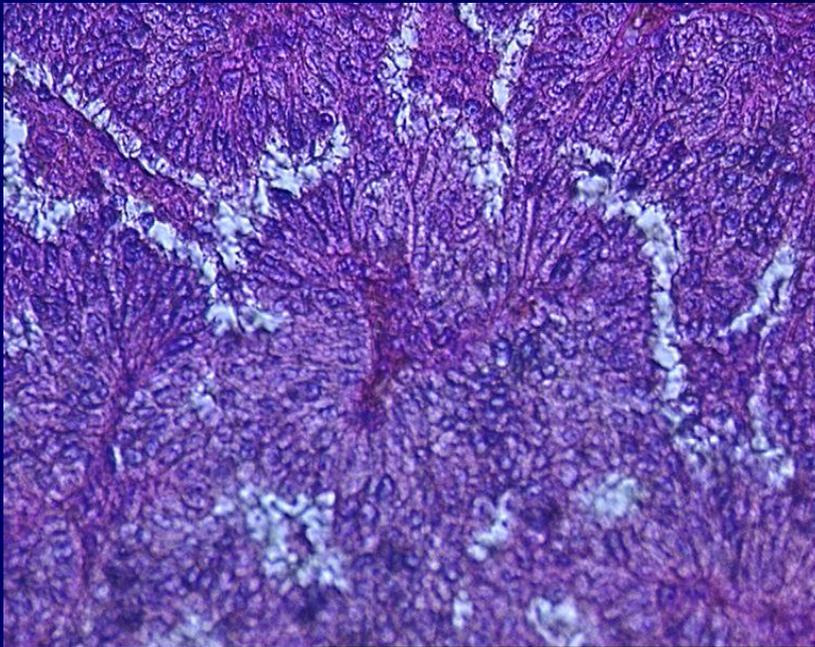
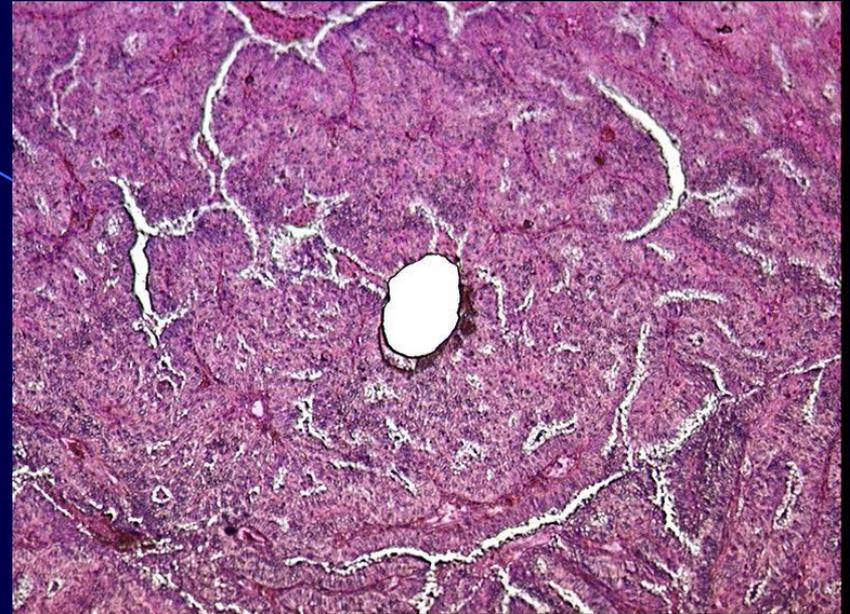
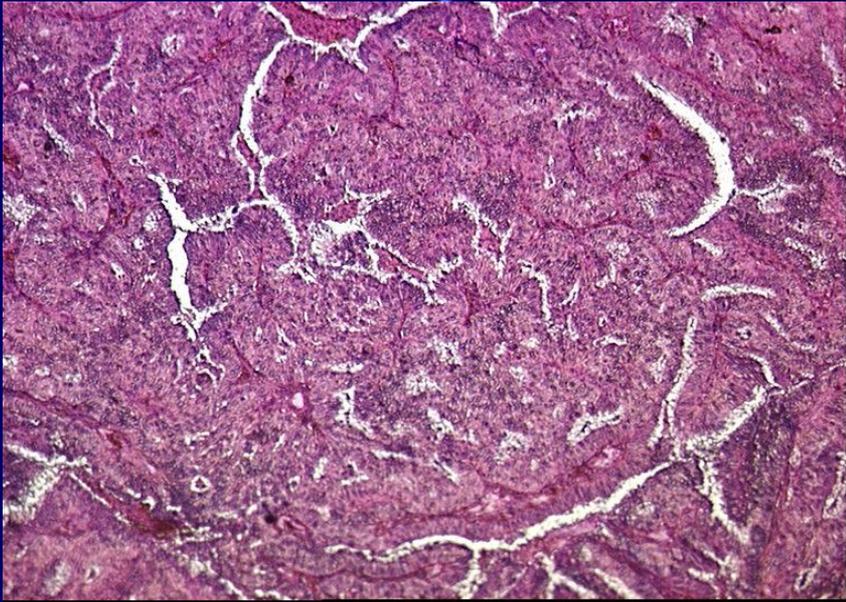
*Di Cristofano C, Zavaglia K, Bertacca G, \*Mrad K, \*Ben Romdhane K, Cipollini G, Bevilacqua G, Cavazzana A*

Department of Oncology, Transplantation and New Technologies in Medicine  
Division of Pathology and of Molecular and Ultrastructural Diagnostic  
University of Pisa and Hospital of Pisa

\* Department of Pathology-Institut Salah Azariz- Tunis

# Mammella

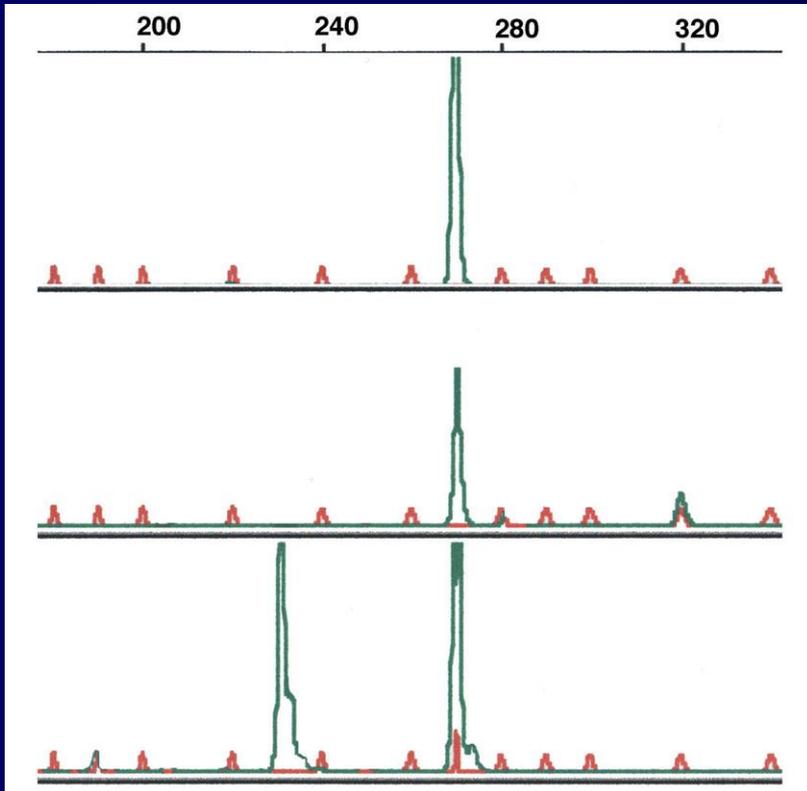
- Tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina
- **Taglio**
  - Al microtomo
  - 1 sezioni di 4 micron di spessore per vetrino
  - lama monouso sterile, sostituita per ogni nuovo campione
- **Sparaffinare**
  - xilolo 2x10'; etanolo 100°x 5'; etanolo 95°x 5'; lavaggio in acqua
- **Colorazione**
  - Sciacquare in acqua
  - Colorare con ematossilina (50 sec.)
  - Sciacquare in acqua
  - Colorare con eosina (10 sec.)
  - Iniziare i passaggi per la disidratazione: 95% (15 sec x 2), 100% (30 sec x 2).
  - Xilene per 2 minuti.
  - Asciugare i vetrini con carta bibula a temperatura ambiente



# Mammella DNA

- **Microdissezione laser**
  - 2000 cellule per area da esaminare del campione in eppendorff precedentemente autoclavate contenenti 20 microlitri di liquido di estrazione e proteinasi k al 2% (10 mgr/ml) (pH 8.0)
- **Estrazione DNA**
  - QIAamp® DNA Micro kit (Qiagen)
- **Inattivazione proteinasi k**
  - 95°C per 10'
- **Controllo della qualità e quantità del DNA**
  - 2000 circa 10-20 picogrammi DNA totale
- **PCR**
  - LOH (analisi della perdita di eterozigosi)
- **Analisi di frammenti**
  - ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)

# Chr 16q D16S476



Carcinoma papillare

Papilloma

Epitelio duttale normale

# **IL GENE *BRMS1* (*BREAST METASTASIS SUPPRESSOR GENE 1*) NEL CARCINOMA MAMMARIO UMANO**

*DI CRISTOFANO Claudio, LOMBARDI Grazia, CAPODANNO Alessandra, ARETINI Paolo, ISOLA Patrizia\*, TANCREDI Mariella, COLLECCHI Paola, NACCARATO Giuseppe, BEVILACQUA Generoso, CALIGO Maria Adelaide*

Dipartimento di Oncologia, Divisione di Anatomia Patologica e Diagnostica Molecolare ed Ultrastrutturale, Università di Pisa ed Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa, Italia

\* Dipartimento di Patologia B.M.I.E, Università di Pisa, Pisa, Italia

# Mammella

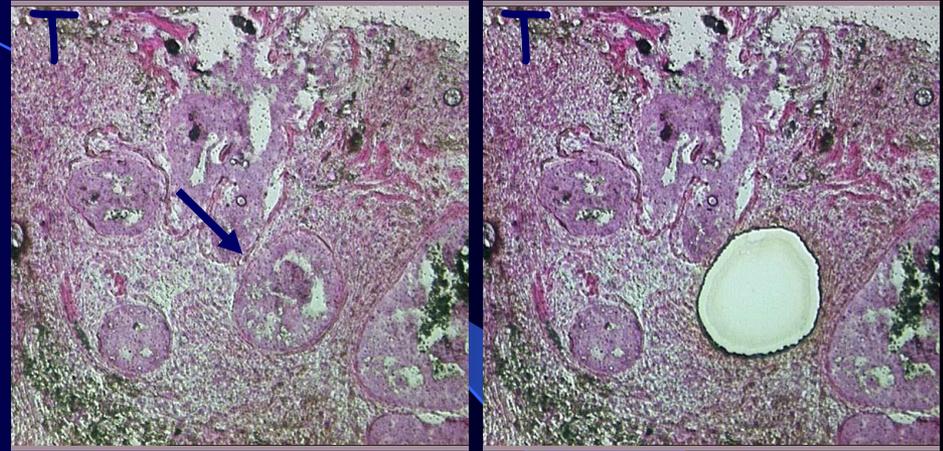
- Tessuto a fresco
  - Frammenti conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sino al momento del taglio
- Preparazione degli strumenti
  - vetrini e materiale per la microdissezione sterilizzati agli U.V. per almeno 2 ore
- Taglio
  - Al criostato alla temperatura da  $-15^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$  su supporto con acqua distillata sterile
  - 4-6 sezioni di 4 micron di spessore per vetrino (EE di controllo prima e dopo il taglio)
  - lama monouso sterile sostituita per ogni nuovo campione
- Fissazione
  - Alcool 70% per 30 sec ( $-80^{\circ}\text{C}$ )
- Colorazione
  - Sciacquare in acqua distillata + DEPC 0.1% (10 sec).
  - Colorare con ematossilina (10 sec.)
  - Sciacquare in acqua distillata + DEPC 0.1% (10 sec).
  - Colorare con eosina (5 sec)
  - Iniziare i passaggi per la disidratazione: 95% (15 sec x 2), 100% (30 sec x 2).
  - Xilene per 2 minuti.
  - Asciugare i vetrini con carta bibula a temperatura ambiente

# Mammella RNA

- **Microdissezione laser**
  - 10000 cellule per area da esaminare del campione in eppendorff precedentemente autoclavate in acqua + DEPC 0.1% contenenti 20 microlitri di liquido di estrazione
- **Estrazione RNA totale**
  - QIAamp® RNAeasy Mini kit (Qiagen)
- **Controllo della qualità e quantità del RNA**
  - 10000 cellule circa 100-150 nanogrammi RNA totale
- **Retrotrascrizione**
  - c-DNA (analisi di espressione quantitativa di un gene)
- **RT-PCR**
  - ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer; Applied Biosystem)
  - 100 nanogrammi circa ad esperimento

# Procedura Sperimentale

1. Microdissezione laser  
[10<sup>4</sup> cellule/campione]

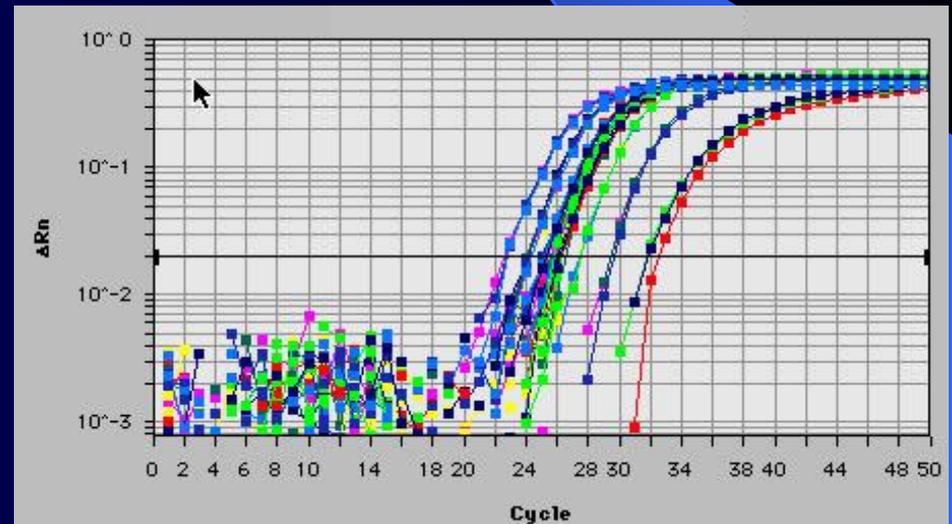


2. Estrazione RNA totale

3. Retrotrascrizione

4. Amplificazione per  
*Real-Time PCR*

[TaqMan]



5. **NBRMS1** =

$BRMS1_{\text{Campione}}$

$TBP_{\text{Campione}}$

$BRMS1_{\text{Calibratore}}$

$TBP_{\text{Calibratore}}$

# Genome analysis and gene expression profiling of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma reveal differences between neuroblastic and Schwannian stromal cells

Simona Coco <sup>1</sup>, Raffaella Defferrari <sup>2</sup>, Paola Scaruffi <sup>1,2</sup>, **Andrea Cavazzana** <sup>3</sup>, **Claudio Di Cristofano** <sup>3</sup>, Luca Longo <sup>1</sup>, Katia Mazzocco <sup>2</sup>, Patrizia Perri <sup>2</sup>, Claudio Gambini <sup>4</sup>, Stefano Moretti <sup>5</sup>, Stefano Bonassi <sup>5</sup>, Gian Paolo Tonini <sup>1</sup>

1 Unit of Translational Paediatric Oncology, National Institute for Cancer Research (IST), Genoa

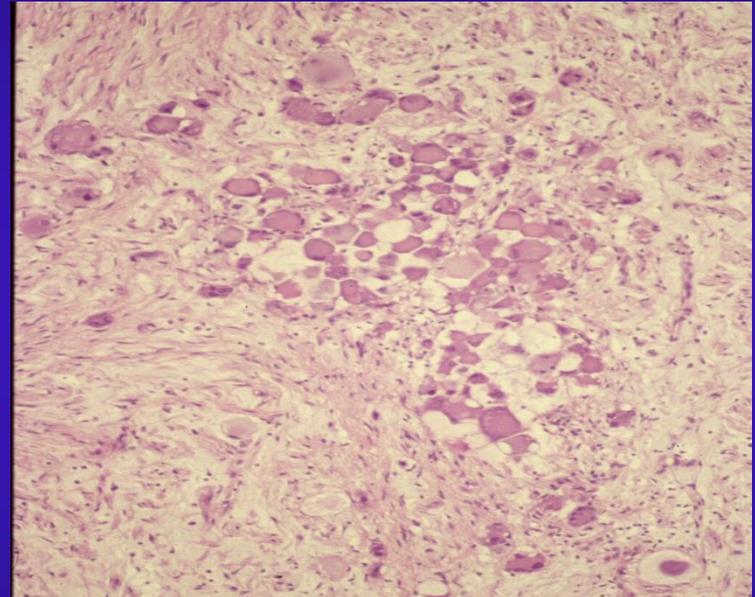
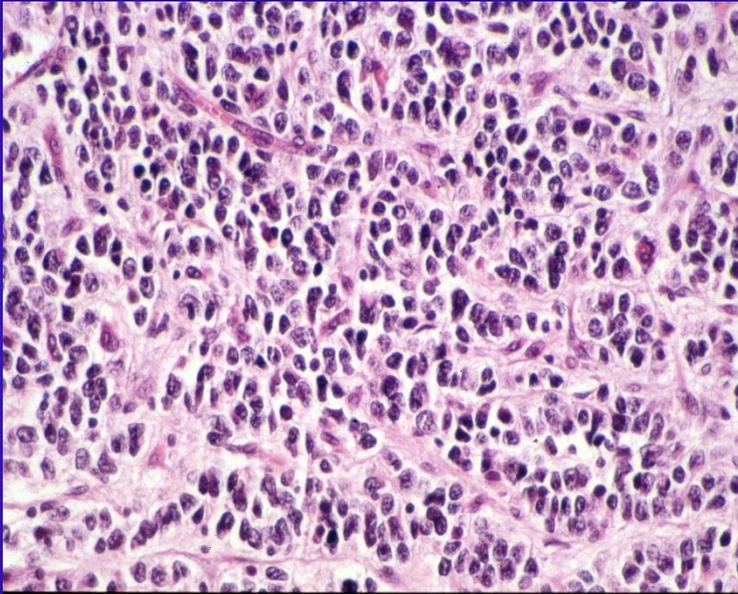
2 Laboratory of Italian Neuroblastoma Foundation, Advanced Biotechnology Center (ABC), Genoa

3 Section of Molecular Pathology, Division of Oncology, Pisa University Hospital, Pisa

4 Department of Pathology, Gaslini Children's Hospital, Genoa

5 Unit of Molecular Epidemiology, National Institute for Cancer Research (IST), Genoa

*Ganglioneuroblastoma:  
la componente stromale è normale o neoplastica?*



*micro-dissezione laser su tessuti **congelati***

# Neuroblastoma

- **Tessuto a fresco**
  - Frammenti conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sino al momento del taglio
- **Preparazione degli strumenti**
  - vetrini e materiale per la microdissezione sterilizzati agli U.V. per almeno 2 ore
- **Taglio**
  - Al criostato alla temperatura da  $-15^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$  su supporto con acqua distillata sterile
  - 4-6 sezioni di 4 micron di spessore per vetrino (EE di controllo prima e dopo il taglio)
  - lama monouso sterile sostituita per ogni nuovo campione
- **Fissazione**
  - Alcool 70% per 30 sec ( $- 80^{\circ}\text{C}$ )
- **Colorazione**
  - Sciacquare in acqua distillata + DEPC 0.1% (10 sec).
  - Colorare con ematossilina (10 sec.)
  - Sciacquare in acqua distillata + DEPC 0.1% (10 sec).
  - Colorare con eosina (5 sec)
  - Iniziare i passaggi per la disidratazione: 95% (15 sec x 2), 100% (30 sec x 2).
  - Xilene per 2 minuti.
  - Asciugare i vetrini con carta bibula a temperatura ambiente

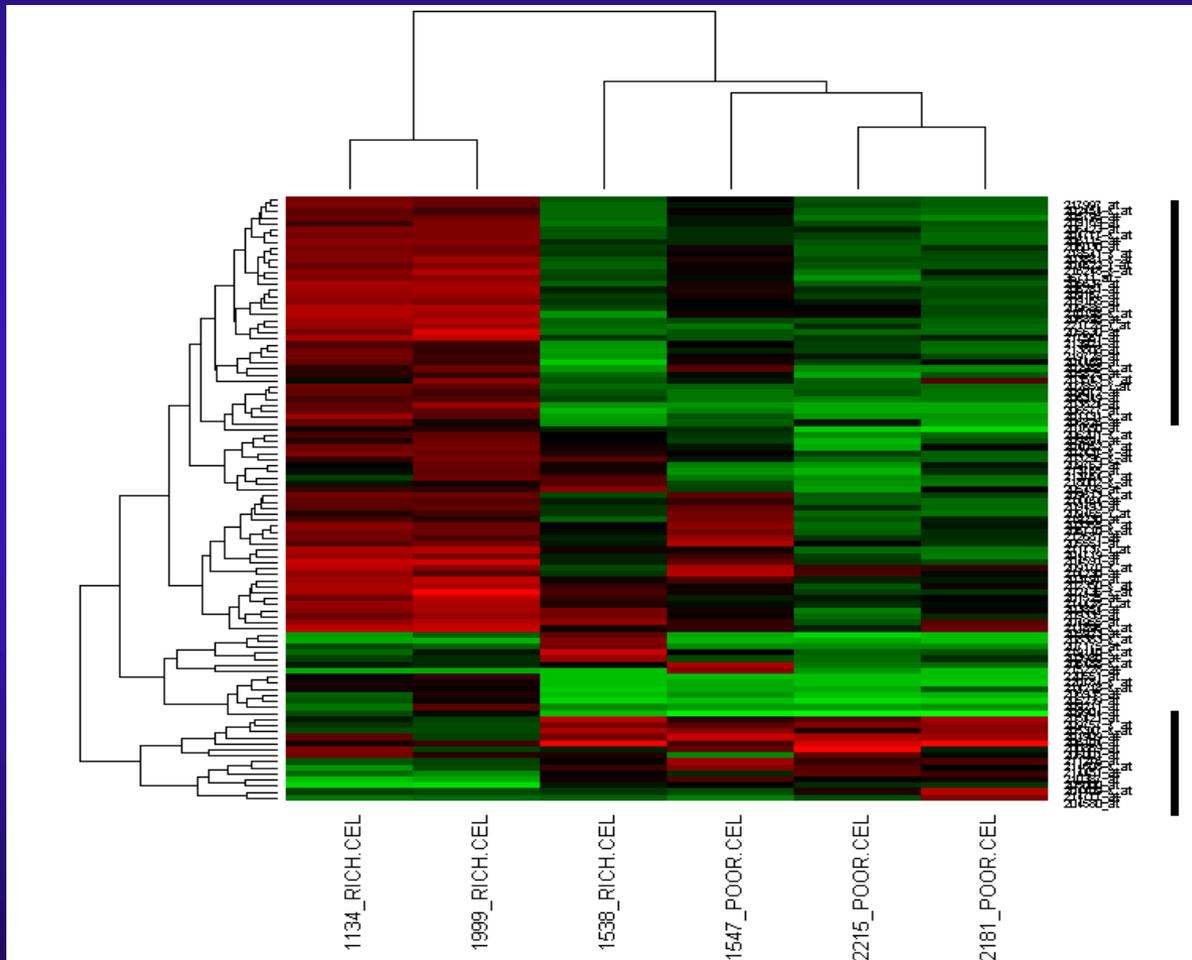
# Neuroblastoma

## RNA

- **Microdissezione laser**
  - 5000 cellule per area da esaminare del campione in eppendorf (0,5 ml) precedentemente autoclavate in acqua + DEPC 0.1% contenenti 20 microlitri di liquido di estrazione
- **Estrazione RNA totale**
  - QIAamp® RNAeasy Mini kit (Qiagen)
- **Controllo della qualità e quantità del RNA**
  - 5000 cellule circa 50-70 nanogrammi RNA totale
- **Amplificazione RNA totale**
  - 2000 nanogrammi RNA totale per esperimento
- **Microarray**
  - "small sample target labeling protocol" (affymetrix)  
Analisi di espressione genica non quantitativa di molti geni

# *neuroblastoma*

## *hierarchical cluster algorithm*



Cluster 1

*NB-SPs*

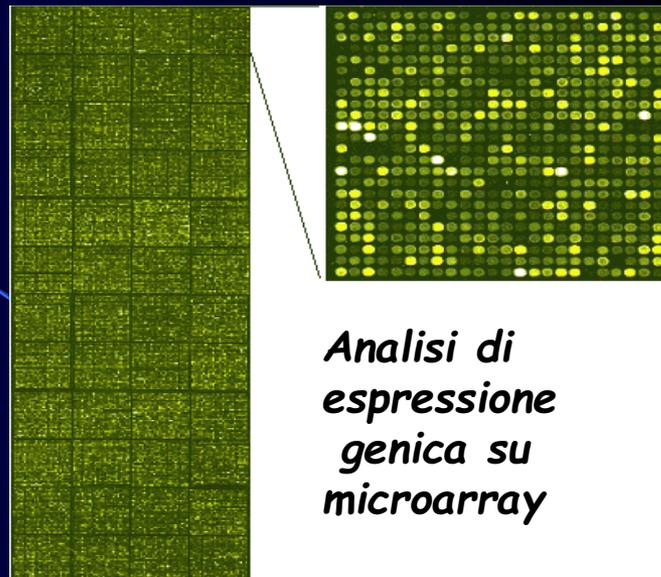
Cluster 2

*GNBi-SRs*

# AIRC 2005

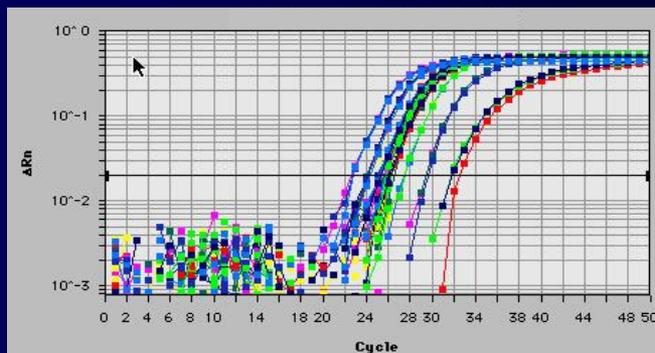


*Amplificazione di mRNA*

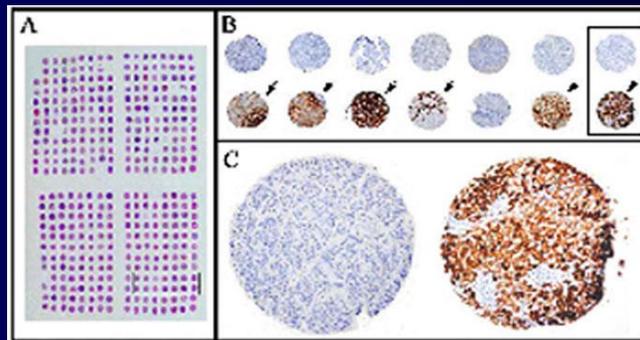


*Analisi di espressione genica su microarray*

*Microdissezione laser*



*Verifica pattern genomici*



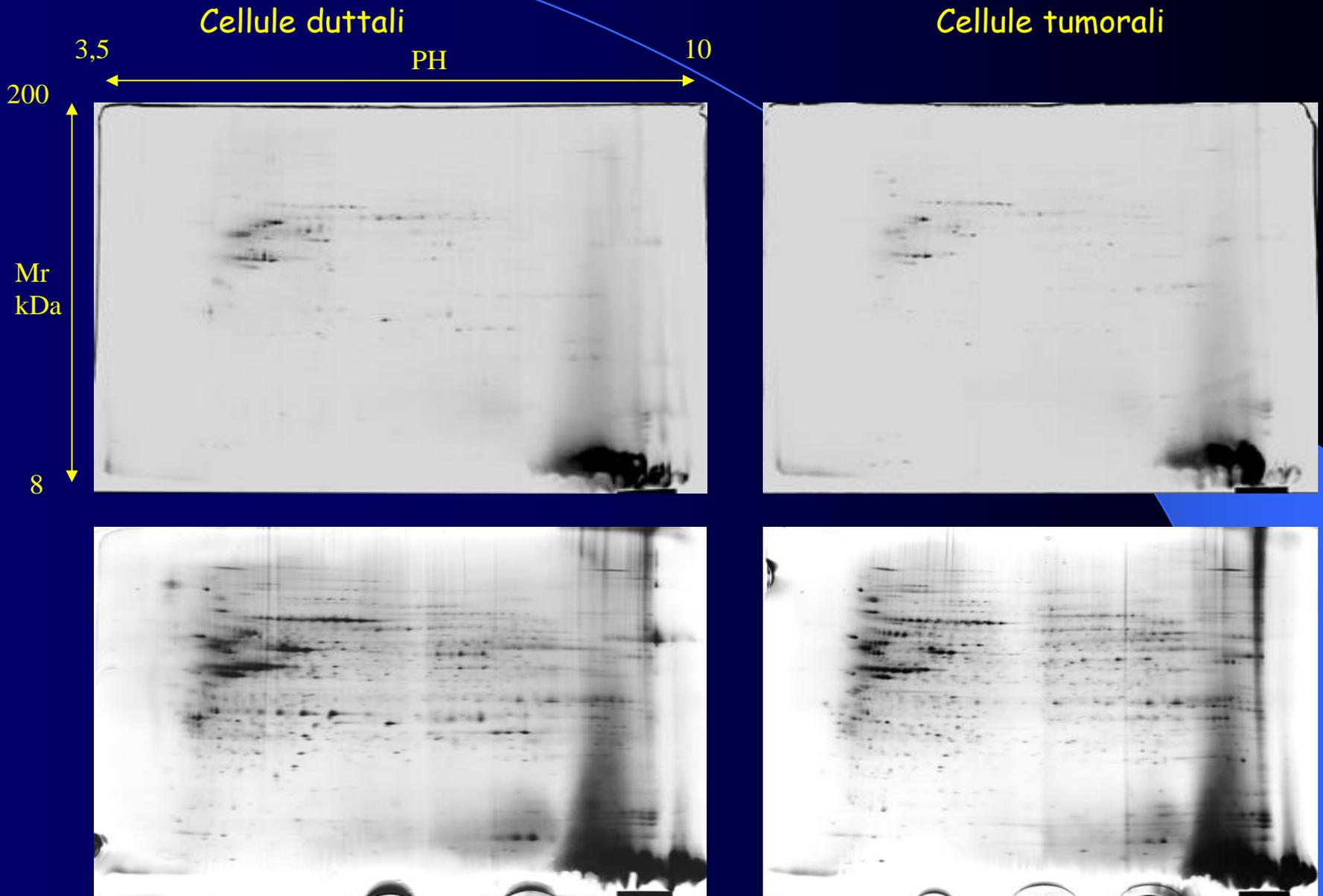
# Pancreas

- Tessuto a fresco
  - Frammenti conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sino al momento del taglio
- Preparazione degli strumenti
  - vetrini e materiale per la microdissezione sterilizzati agli U.V. per almeno 2 ore
- Taglio
  - Al criostato alla temperatura da  $-15^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$  su supporto con acqua distillata sterile
  - 4-6 sezioni di 4 micron di spessore per vetrino (EE di controllo prima e dopo il taglio)
  - lama monouso sterile sostituita per ogni nuovo campione
- Fissazione
  - Alcool 70% per 30 sec
- Colorazione
  - Colorare con blu di toluidina (0.25%; PH 4.5) (5 sec.)
  - Etanolo 100% (30 sec x 2).
  - Xilene per 2 minuti.
  - Asciugare i vetrini con carta bibula a temperatura ambiente

# Pancreas proteine

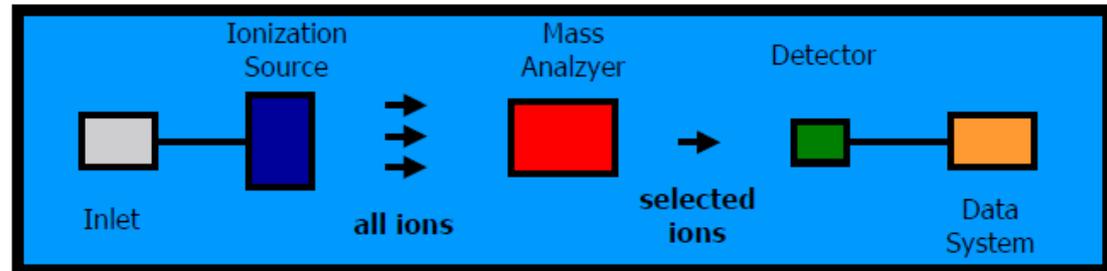
- **Microdissezione laser**
  - 50000 cellule per area tumorale e normale (dotti) in eppendorf (0,5ml) precedentemente autoclavate in acqua contenente 20microlitri di liquido di estrazione
- **Estrazione proteine**
  - buffer: 8 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTE
- **Controllo della qualità e quantità delle proteine**
  - 50000 cellule 5-25 microgrammi proteine totali
- **2D-PAGE**
  - 50 microgrammi di proteine totali per esperimento

# 2D-PAGE

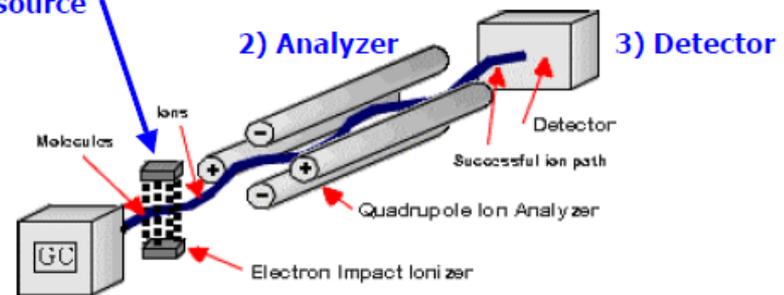


# Proteomica

## Spettrometria di massa



### 1) Ionization source



# BRAF AND NRAS MUTATIONS ARE HETEROGENEOUS AND NOT MUTUALLY EXCLUSIVE IN NODULAR MELANOMA

Caterina Chiappetta<sup>1</sup>, Ilaria Proietti<sup>2</sup>, Valentina Soccodato<sup>2</sup>, Chiara Puggioni<sup>1</sup>, Roberto Zaralli<sup>1</sup>, Luca Pacini<sup>1</sup>, Natale Porta<sup>1</sup>, Nevena Skroza<sup>2</sup>, Vincenzo Petrozza<sup>1</sup>, Concetta Potenza<sup>2</sup>, Carlo Della Rocca<sup>1</sup>, Claudio Di Cristofano<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> UOC of Pathology, Department of Medical-Surgical Sciences and Bio-Technologies, Sapienza University of Rome, Polo Pontino, I.C.O.T, Latina, Italy.
- <sup>2</sup> UOC of Dermatology “Daniele Innocenzi”, Department of Medical-Surgical Sciences and Bio-Technologies, Sapienza University of Rome, Polo Pontino, Fiorini Hospital, Terracina, Italy.

# MUTAZIONI NEL MELANOMA CUTANEO

## Mutazioni nel gene B-RAF 50-70%

Esone 15	Esone 11
L594: E, G, N, V	G466: A, E, R, V
L597: L, Q, R, S, V	G469: E, R, S, V, A
V600: E, D, G, K, M, R	
K601: E, I, K, N	
S605: F, G, N, R	

## Mutazioni nel gene N-RAS 15-20%

Esone 1	Esone 2
Q61: R, K, H	G12: C, D

## Mutazioni nel gene CDK4 <2%

Esone 2
R24: H, C

## Mutazioni nel gene C-KIT 2%

Esone 11	Esone 13
K550N	K642E
Y553N	R634W
Del1554-559	
W557R	
K558N	
V560D	
N566D	
V569G	
Del1566	
N566K	
L576P	
Del1579	
V559: A, D, G	

# *The* NEW ENGLAND JOURNAL *of* MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

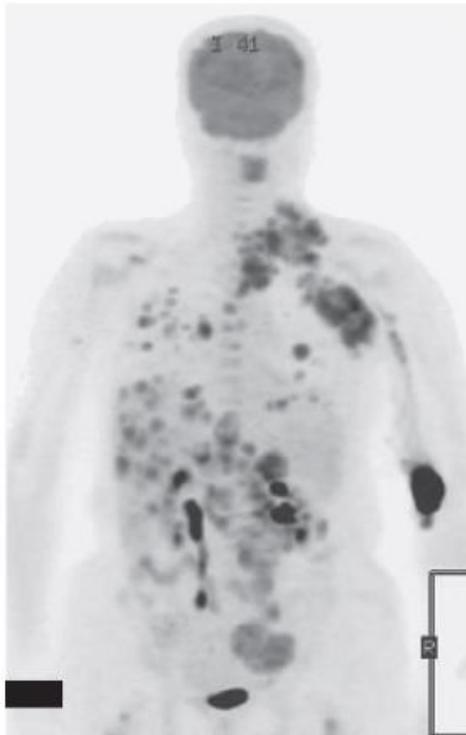
AUGUST 26, 2010

VOL. 363 NO. 9

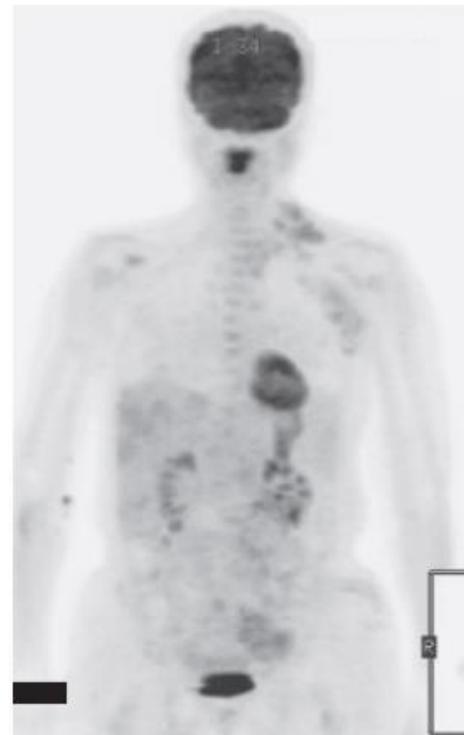
## Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma

Keith T. Flaherty, M.D., Igor Puzanov, M.D., Kevin B. Kim, M.D., Antoni Ribas, M.D.,  
Grant A. McArthur, M.B., B.S., Ph.D., Jeffrey A. Sosman, M.D., Peter J. O'Dwyer, M.D., Richard J. Lee, M.D., Ph.D.,  
Joseph F. Grippio, Ph.D., Keith Nolop, M.D., and Paul B. Chapman, M.D.

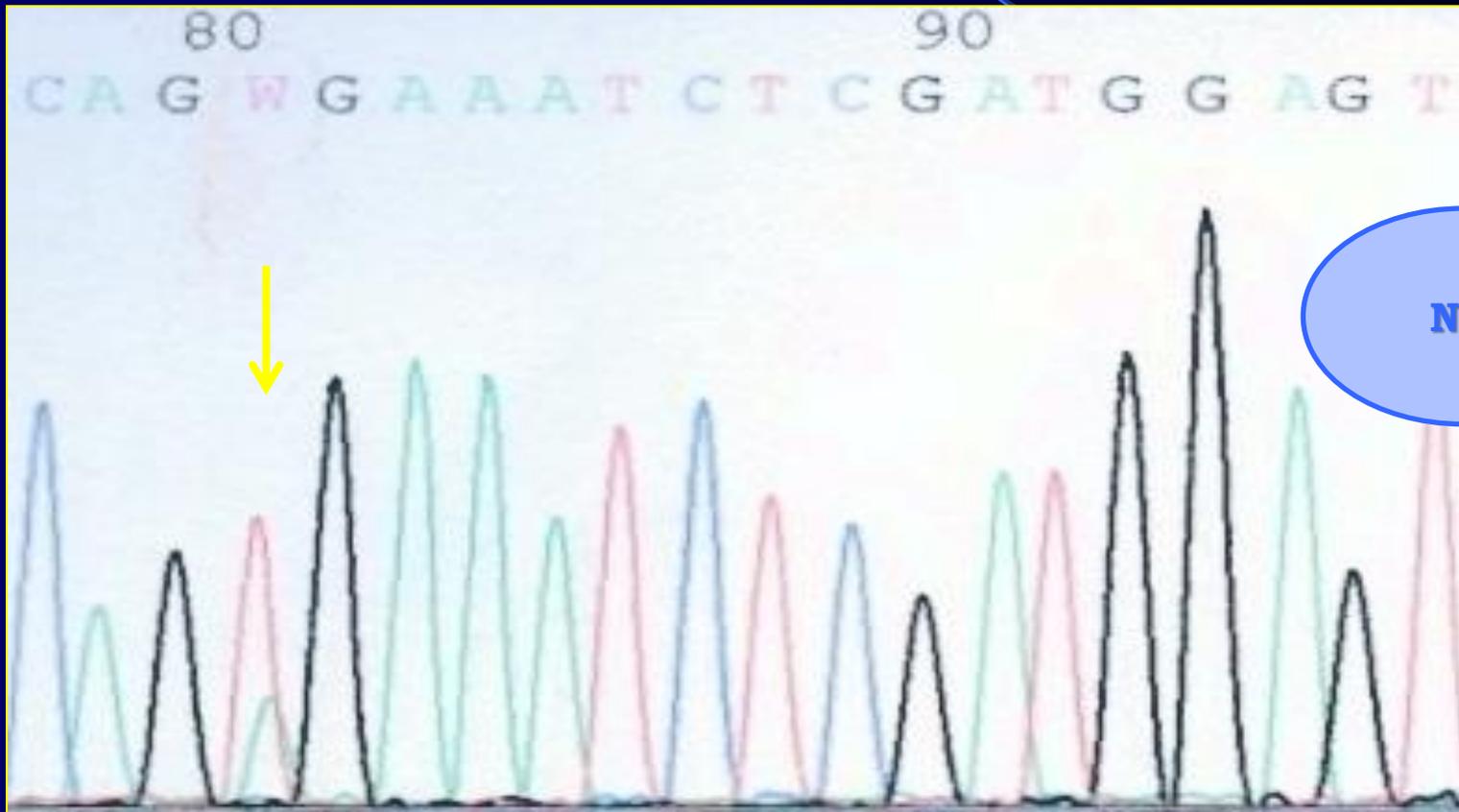
Baseline



Day 15

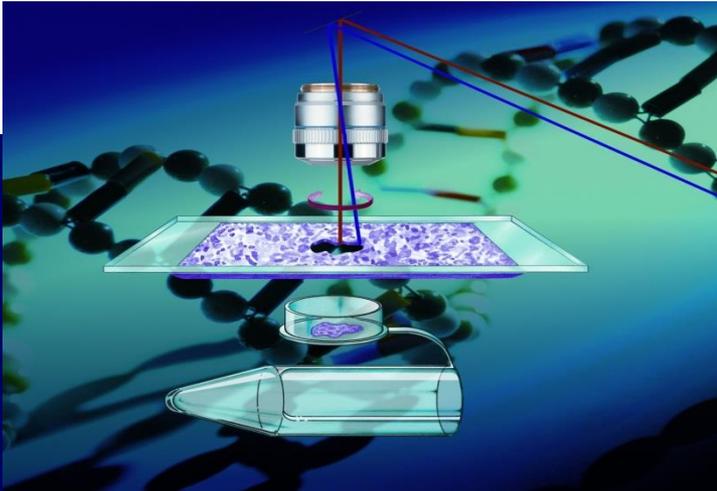
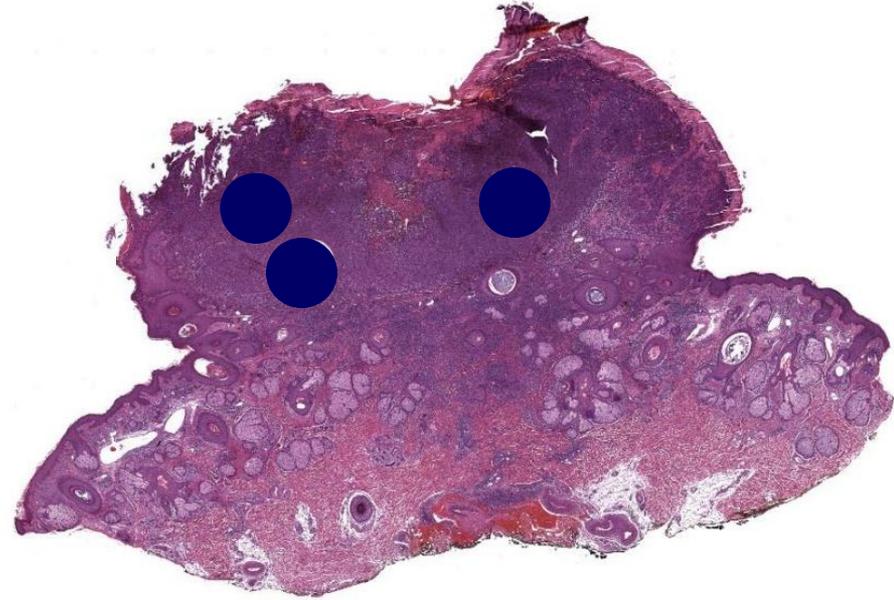
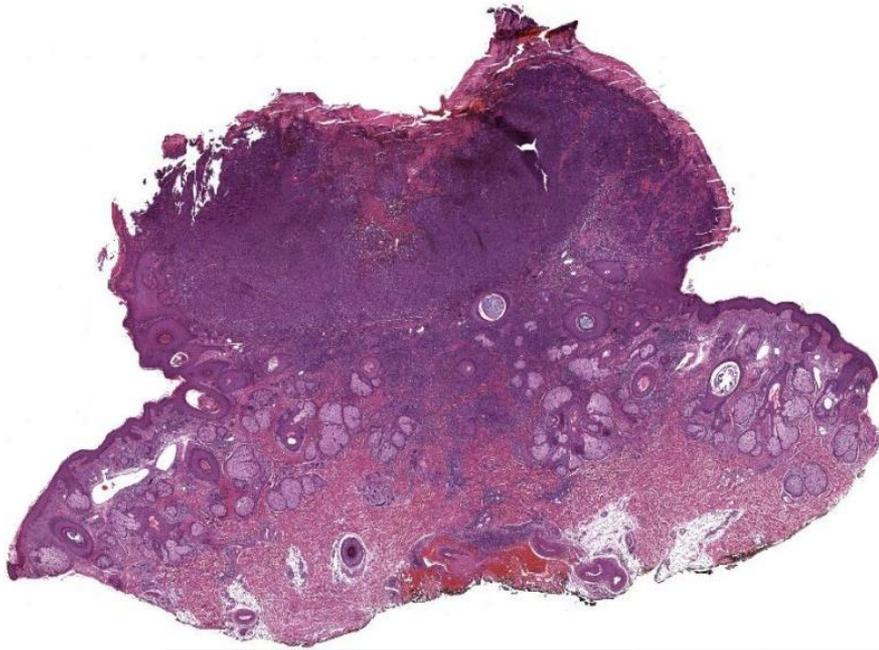


# Mutazione B-RAF (V600E)



**SOSTITUZIONE DI VALINA CON ACIDO GLUTAMMICO**

# Melanoma LCM



# ETEROGENEITÀ INTRATUMORALE

BRAF	Sezione intera	NRAS			NRAS	Sezione intera			
		1 CAMPO	2 CAMPO	3 CAMPO		1 CAMPO	2 CAMPO	3 CAMPO	
1	V600E ★	V600E	V600E	V600E	1	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	2	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	G455R	WT	3	Q61L	WT	Q61L	Q61L
4	WT	WT	WT	WT	4	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	5	G13R	G13R	G13R	G13R
6	WT	A598V	V600R	WT	6	Q61R	Q61R	Q61R	Q61R
7	WT	I592V	WT	WT	7	Q61K	Q61K	Q61K	Q61K
8	V600E ★	V600E	V600R	V600E	8	WT	WT	WT	WT
9	WT ★	V600E	V600E	V600E	9	WT	WT	WT	WT
10	K601E	WT	K601E	K601E	10	WT	WT	WT	WT
11	V600K + ★589I	WT	WT	V600K	11	WT	WT	WT	WT
12	V600R ★	V600R	V600R	WT	12	WT	WT	WT	WT
13	WT	WT	WT	WT	13	WT	WT	WT	WT
14	V600E ★	V600E	V600E	V600E	14	WT	WT	WT	WT
15	S467L	S467L	S467L	S467L	15	Q61R	Q61R	Q61R	Q61R

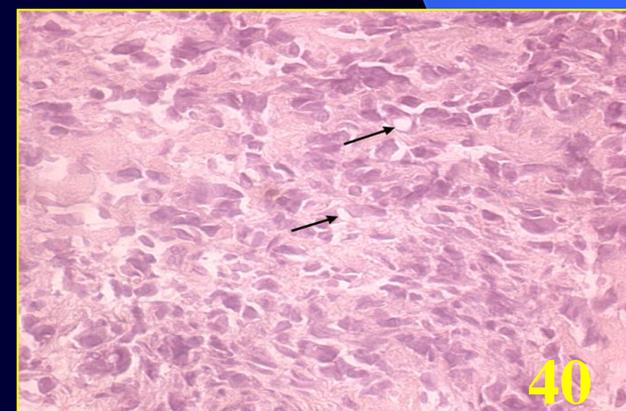
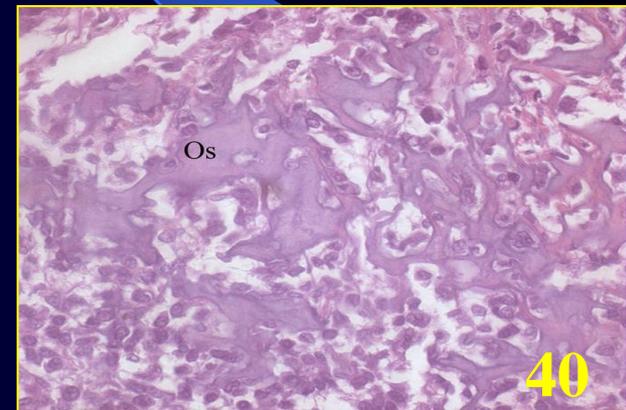
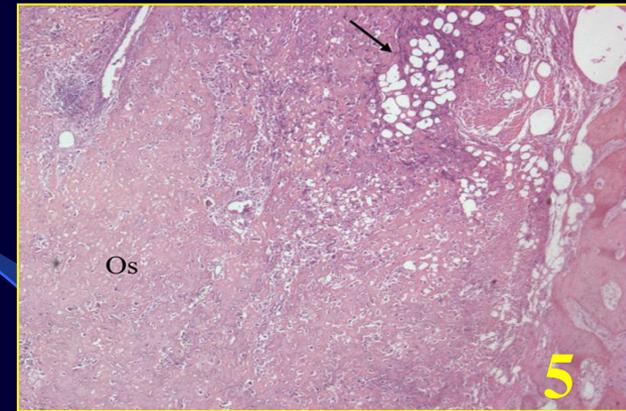
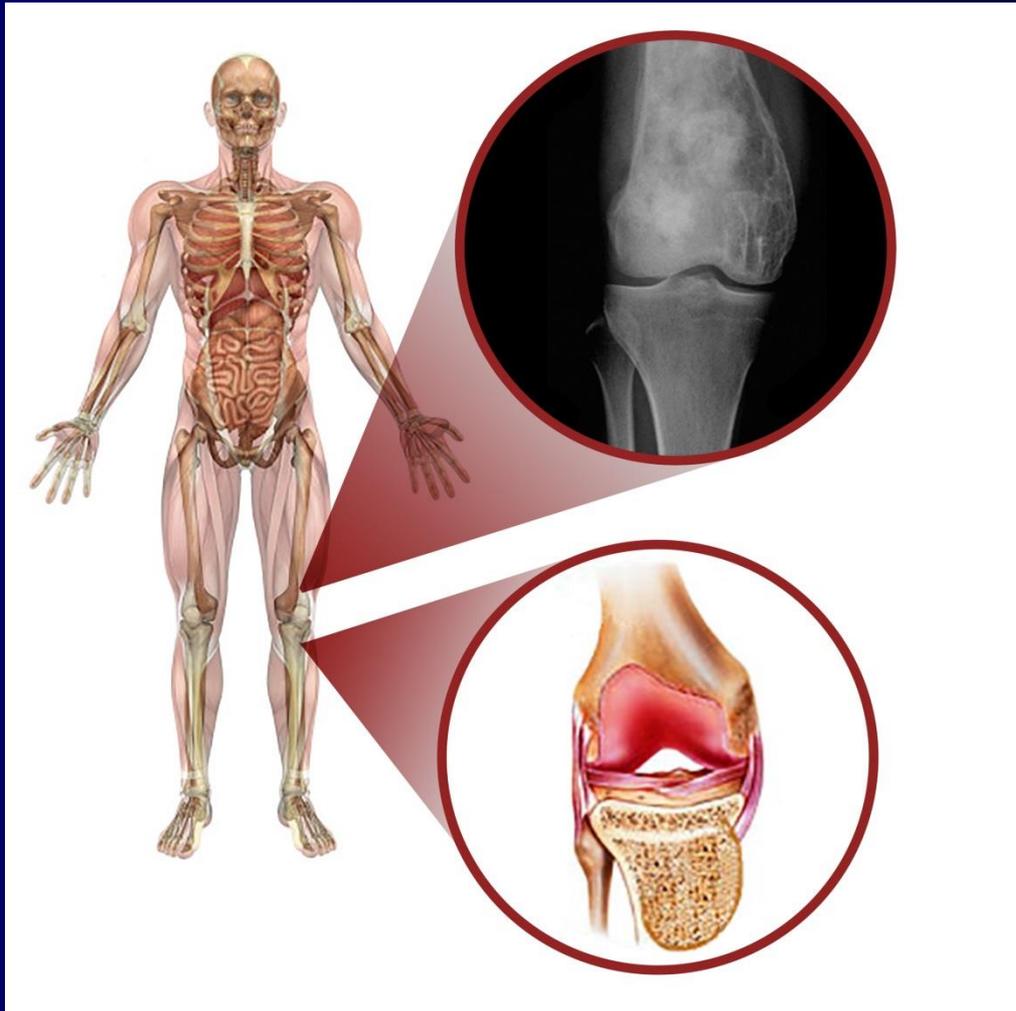
Esone 15 Esone 11

Esone 1 Esone 2

\* QPCR EASY BRAF (Diathec) CE IVD

# Osteosarcoma

Tumore maligno primitivo dell'osso, produttore tessuto osseo immaturo



# Tecnologie di sequenziamento

## 1° GENERAZIONE

### ABI PRISM

(Applied Biosystem)

Terminazione di catena

### PYRO MARK

(Qiagen)

Pirosequenziamento



**ANALISI DI  
ALTERAZIONI NOTE  
(HOT-SPOT)**



## 2° GENERAZIONE

### 454 FLX

(Roche)

Pirosequenziamento

### ABI SOLiD System

(Life Technologies)

Ibridazione

### ILLUMINA

(Solexa)

Terminazione di catena



## 3° GENERAZIONE

### HELISCOPE

(Helicos

Biosciences)

### ION PROTON

(Life Technologies)

Rilevazione diretta



**ANALISI  
DELL'INTERO  
GENOMA E  
DELL'INTERO  
ESOMA**



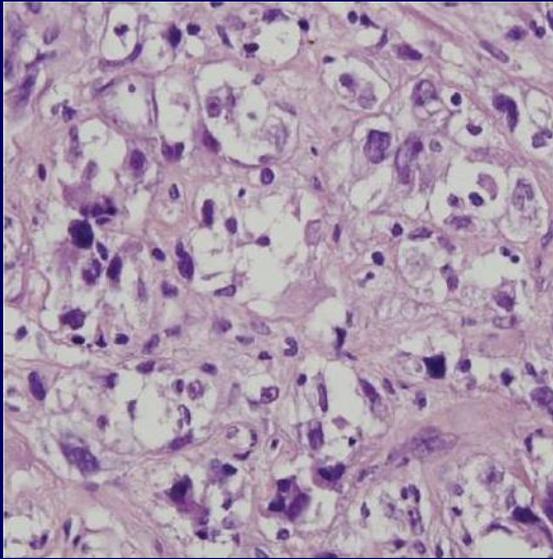
# Osteosarcoma

- Tessuto decalcificato fissato in formalina ed incluso in paraffina
- **Taglio**
  - 4-6 sezioni di 4 micron di spessore per vetrino (EE di controllo prima e dopo il taglio)
  - lama monouso sterile sostituita per ogni nuovo campione
- **Sparaffinare**
  - xilolo 2x10'; etanolo 100°x 5'; etanolo 95°x 5'; lavaggio in acqua
- **Colorazione**
  - Sciacquare in acqua
  - Colorare con ematossilina (50 sec.)
  - Sciacquare in acqua
  - Colorare con eosina (10 sec.)
  - Iniziare i passaggi per la disidratazione: 95% (15 sec x 2), 100% (30 sec x 2).
  - Xilene per 2 minuti.
  - Asciugare i vetrini con carta bibula a temperatura ambiente

# Osteosarcoma

- Estrazione DNA
  - kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison WI, USA).
- RNasi e proteinasi K
- Controllo della qualità e quantità del DNA
  - Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA)
    - Assorbanza alle lunghezze d'onda 260/280 e 260/230.
  - Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
    - 5-10 nanogrammi DNA totale
- Analisi dell'intero genoma
  - Esoma (componente codificante dei geni)
- Analisi bioinformatica

# Sequenziamento di 3° GENERAZIONE



## Biopsie ossee

↳ Scarsa cellularità = Bassa quantità

**Decalcificate - Fissate – Incluse in paraffina**

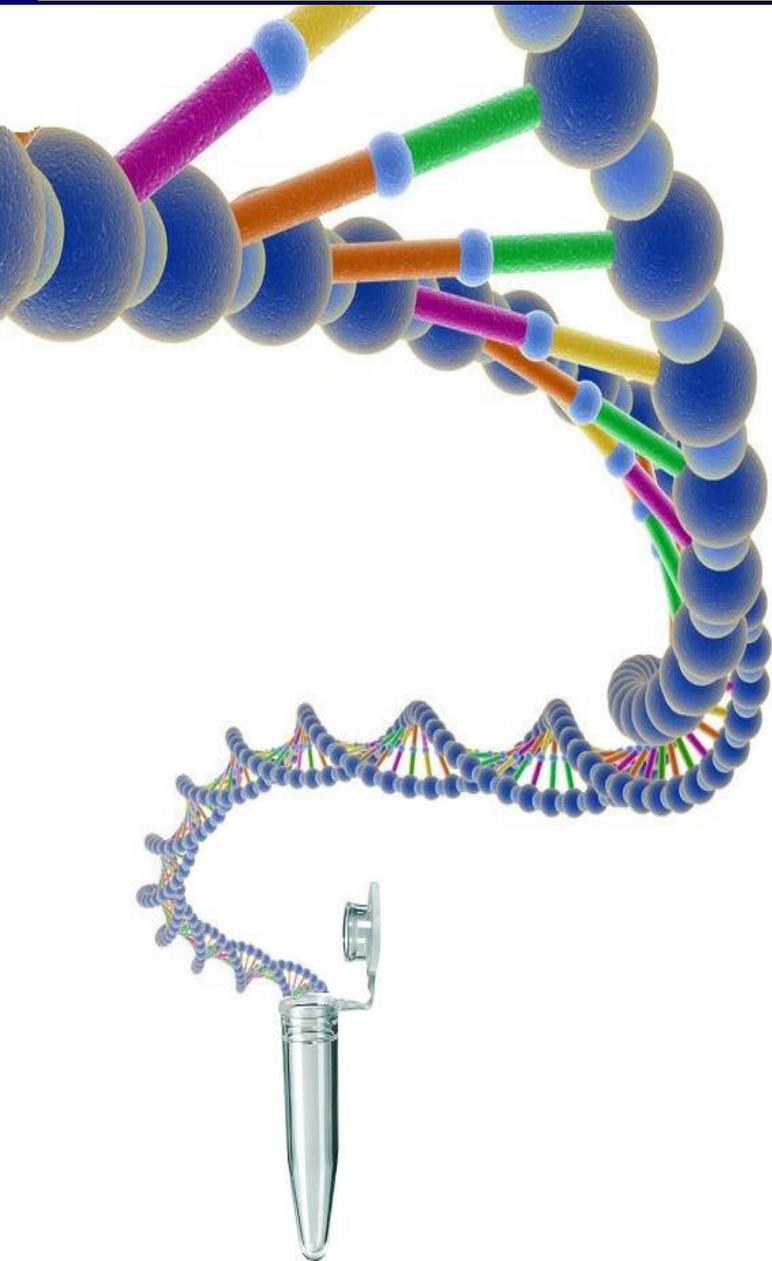
↳ Degradazione acidi nucleici = Bassa qualità

## Ion Proton™ (Life Technologies)

- 20 ng di DNA
- Lettura di frammenti di 200 pb
- Minori tempi di analisi
- Maggiore % di copertura
- Accuratezza 99,7%



# MATERIALI E METODI: PREPARAZIONE DEI CAMPIONI



## 1. ESTRAZIONE ACIDI



VALUTAZIONE QUANTITATIVA



VALUTAZIONE DELLA PUREZZA

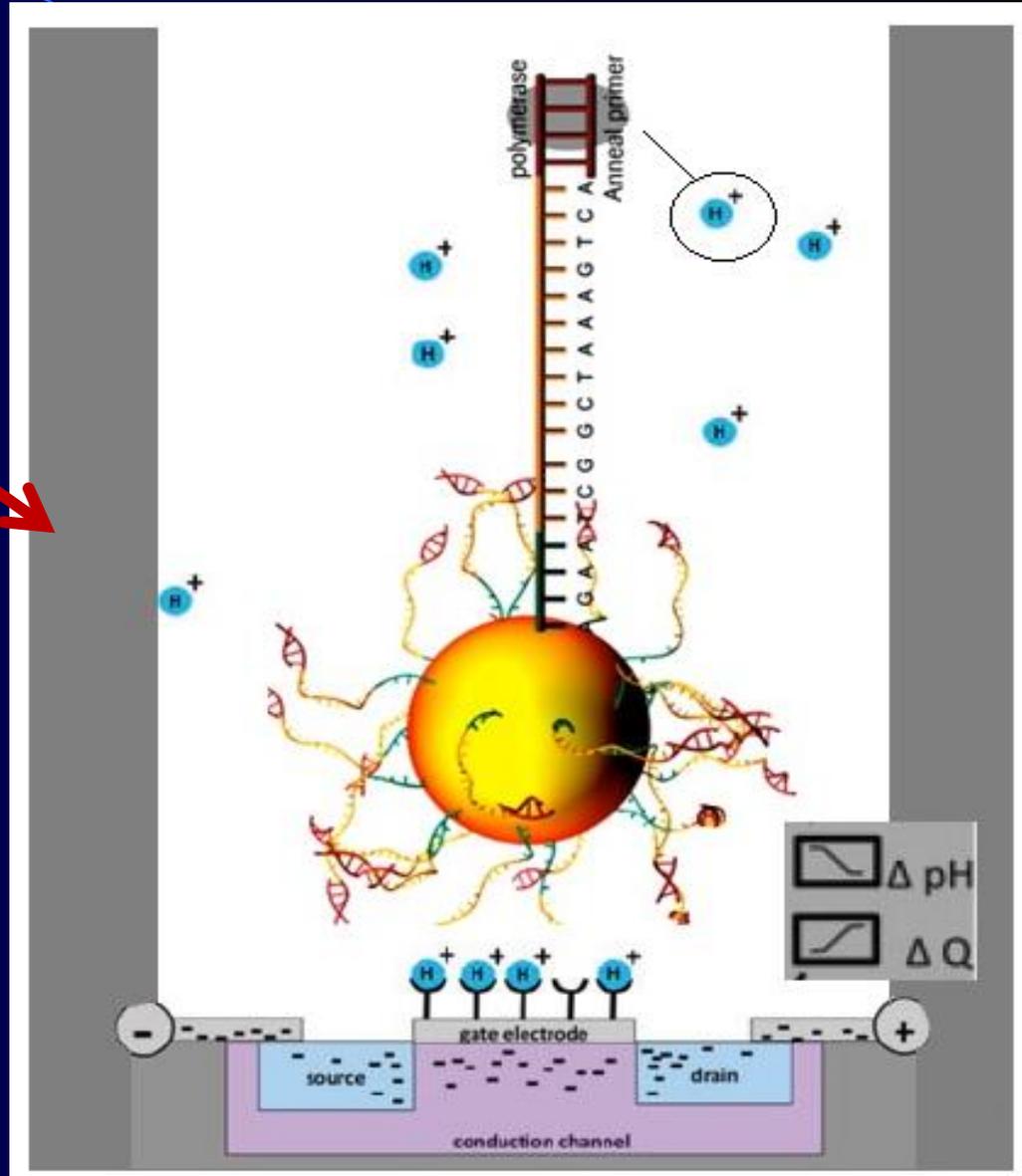
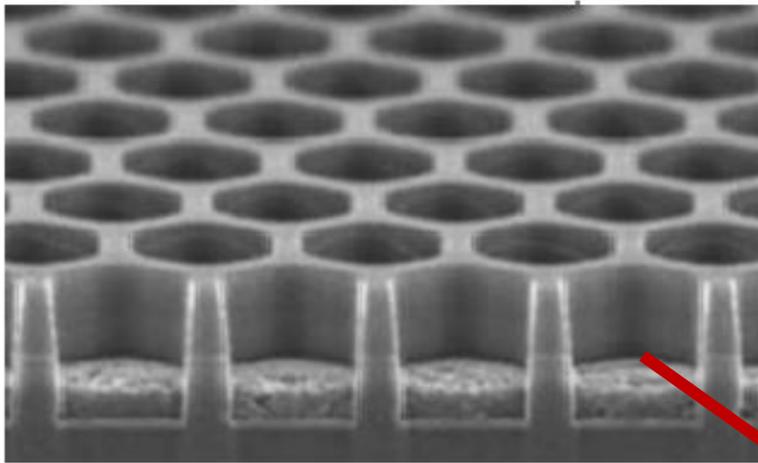


VALUTAZIONE QUALITATIVA

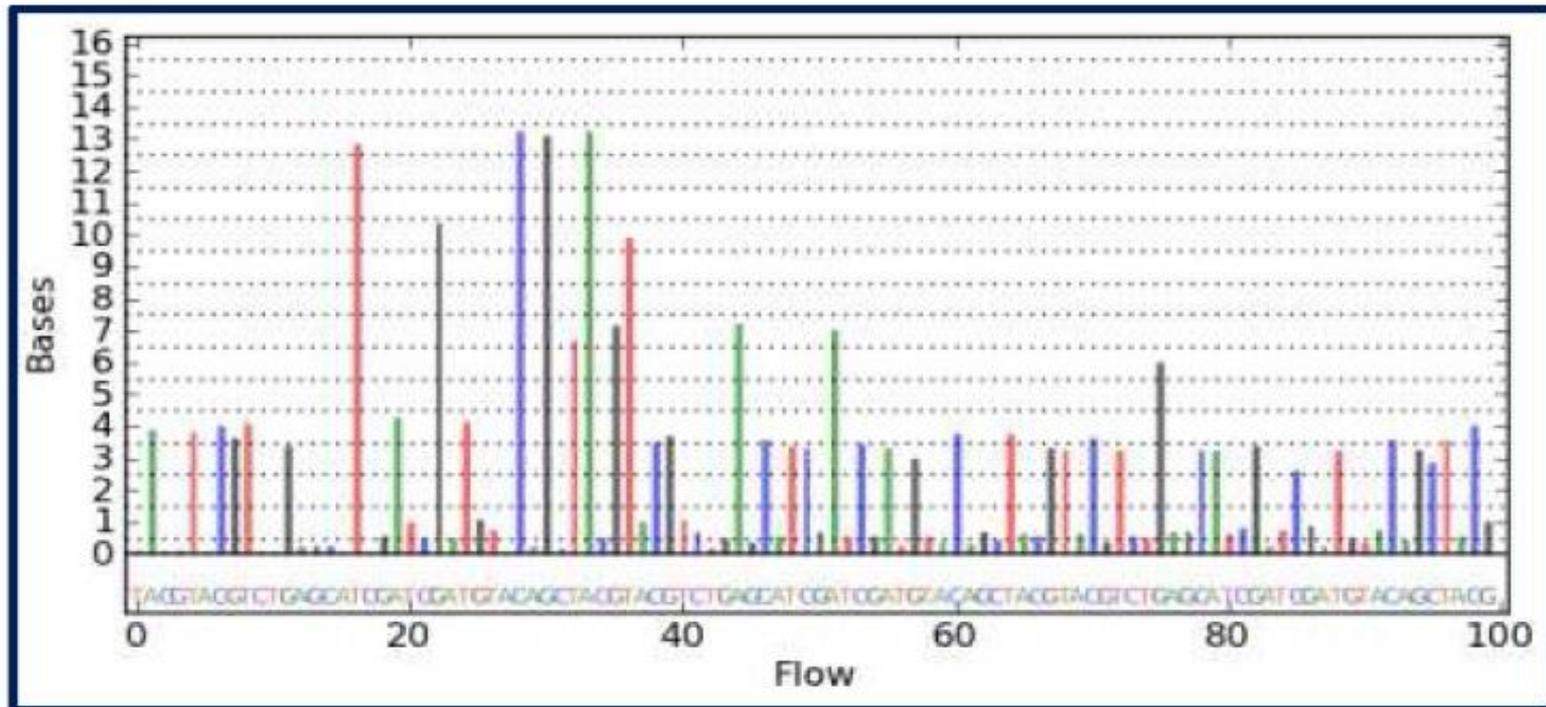
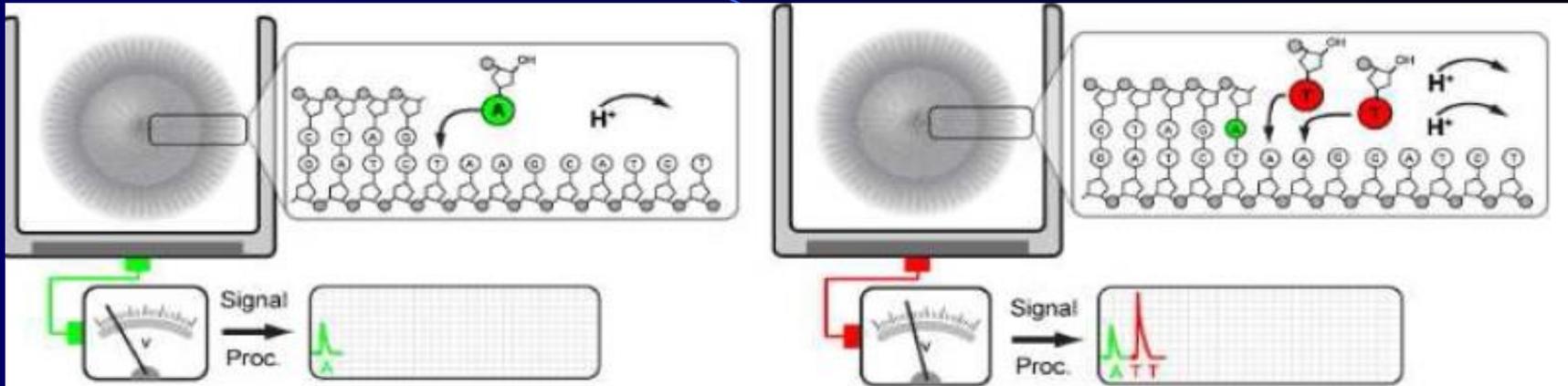
## 2. PRAPARAZIONE LIBRERIA DI DNA

## 3. AMPLIFICAZIONE CLONALE IN EMULSIONE

# SEQUENZIAMENTO



# MATERIALI E METODI: SEQUENZIAMENTO



# Analisi bioinformatica delle mutazioni

**5.000**

**MUTAZIONI**

**per campione**

**1.500 ca.**

presenti in  
letteratura

**3.500 ca.**

di nuova  
identificazione

## Mutazioni ad alto impatto biologico

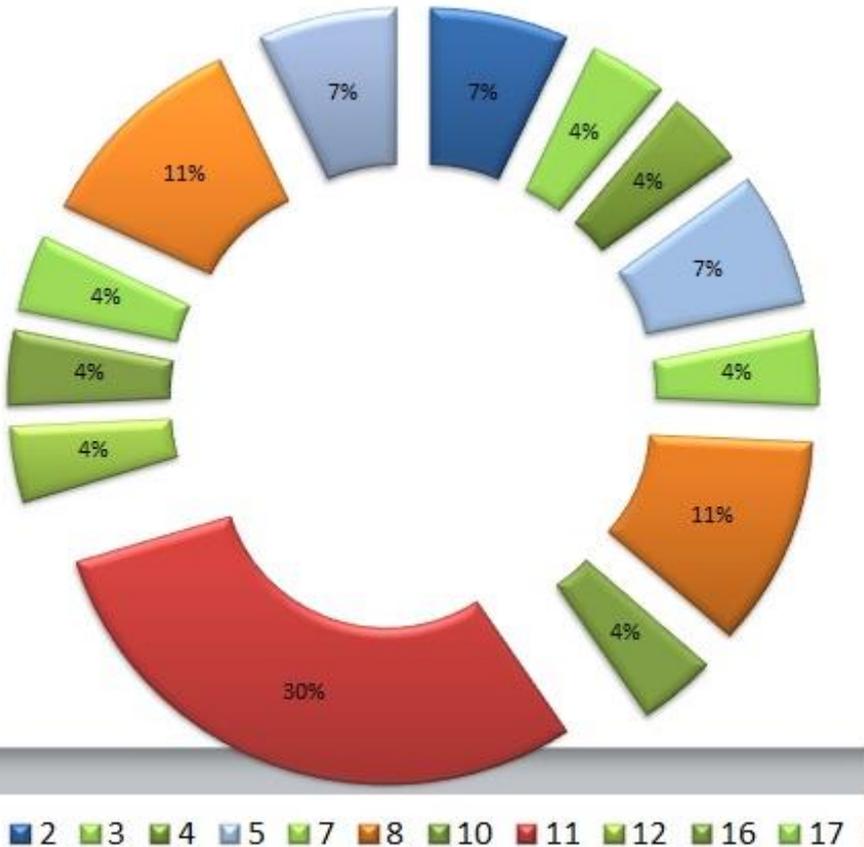
<b>ID Paziente</b>	<b>Mutazioni</b>	<b>Frameshift</b>	<b>%</b>	<b>Omozigosi</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	4.703	<b>1.500</b>	32%	<b>113</b>	7%
<b>2</b>	5.271	<b>1.502</b>	28%	<b>119</b>	8%
<b>3</b>	5.287	<b>1.777</b>	34%	<b>114</b>	6%

# Analisi delle mutazioni

**27 MUTAZIONI FRAMESHIFT  
IN OMOZIGOSI IN TUTTI E TRE I PAZIENTI**



**TRASCritto  
INCOMPLETO**



- 30% dei geni sul chr 11
- 11% dei geni sul chr 8
- 11% dei geni sul chr 19

# Analisi delle mutazioni

## Processi cellulari regolati dai geni mutati

Geni	Funzione
GRIP2 / ACTR1B	Traffico intra-citoplasmatico
ERG1 / YTHDF3 / SRSF8 / CWC15	Splicing RNA
PCDHB9 / CEACAM20 / NCAM1	Molecole di adesione cellulare
DIXDC1 / JKR	Pathway Wnt/B-catenina
LTBP4 / SMAD5 / SPON1	Pathway TGF- $\beta$
MAP3K14	Pathway Nf- $\kappa\beta$
ZNF274 / ZNF518A / ZNF595	Fattori trascrizionali
MMP12 / UNC93B1 7 / ALDH3B1	Risposta allo stress ossidativo