CeGaT GmbH | Paul-Ehrlich-Str. 23 | D-72076 Tübingen | Germany
Dr. Richard Roe
Paul-Ehrlich-Str. 23
72076 Tübingen
Deutschland

Name	Doe, Jane
Geburtsdatum	TT.MM.JJJJ
Geschlecht	Weiblich
Patienten-ID	#
Befunddatum	TT.MM.JJJJ

Bericht über die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen – Doe, Jane (*TT.MM.JJJJ)

Auftrag und klinische Informationen

Anforderer	Dr. Richard Roe
Bereitstellung der Gewebeprobe durch	Abteilung für Pathologie, Krankenhaus Musterstadt
Diagnose	Glioblastom, IDH-Wildtyp, ZNS WHO Grad 4
Vorbekannte molekulare Untersuchungen	relevante Varianten auf DNA-Ebene: *PTEN* (Missense), *TP53* (Frameshift), *TERT* Promoter relevante Amplifikationen auf DNA-Ebene: *EGFR* relevante homozygote Deletionen auf DNA-Ebene: *RB1* überexprimierte Gene auf RNA-Ebene: *VEGFA* Gene mit reduzierter Expression auf RNA-Ebene: *RB1, TP53* (siehe Sequenzierbefund vom TT.MM.JJJJ, Befund-ID #)
Probenmaterial	FFPE-Block mit der externen ID: N24-555 A3 Datum der Materialentnahme: TT.MM.JJJJ
Auftrag	Immun- und Oncoprotein-Panel

Zusammenfassung

Marker	Zelltyp	Ergebnis
PD-L1	Immunzellen (IC Score)	(+)
	Tumorzellen (TP Score)	(+)
LAG3	Immunzellen	-
p-mTOR	Tumorzellen	+++
	Tumorzellen (H Score)	+++
p-ERK	Tumorzellen	+++
p16	Tumorzellen	+++ (kein Verlust)
p53	Tumorzellen	- (passend zur *TP53*-Frameshift-Variante)
HER2	Tumorzellen	-
TROP2	Tumorzellen	-
	Tumorzellen (H Score)	-

- negativ | **(+)** sehr gering | **+** gering | **++** moderat | **+++** hoch

Ergebnisse der angeforderten Färbungen im Detail

Marker	Zelltyp	Subzelluläre Lokalisation	Bewertungssystem*	Ergebnis*
CD45/LCA	Immunzellen	membranär/ zytoplasmatisch	deskriptiv (IF)	positive Anfärbung diffus verteilter Immunzellen, die 38 % der ausgewerteten Tumor-Areale bedecken
PD-L1	Immunzellen	membranär	IC Score (IF)	< 1 %
	Tumorzellen	membranär	TP Score (IF)	< 1 %
LAG3	Immunzellen	membranär	deskriptiv (IF)	keine Anfärbung beobachtet
p-mTOR	Tumorzellen	nukleär	deskriptiv (IF)	10 % der Tumorzellen positiv
	Tumorzellen	nukleär	H Score (IF)	15
	Tumorzellen	zytoplasmatisch	deskriptiv (IF)	80 % der Tumorzellen positiv
	Tumorzellen	zytoplasmatisch	H Score (IF)	235
p-ERK	Tumorzellen	nukleär	deskriptiv (IF)	40 % der Tumorzellen positiv
	Tumorzellen	zytoplasmatisch	deskriptiv (IF)	70 % der Tumorzellen positiv
p16	Tumorzellen	nukleär	deskriptiv (IF)	95 % der Tumorzellen positiv
	Tumorzellen	zytoplasmatisch	deskriptiv (IF)	95 % der Tumorzellen positiv
p53	Tumorzellen	nukleär	deskriptiv (IF)	keine Anfärbung

HER2	Tumorzellen	membranär	deskriptiv (IF)	schwache, inkomplett membranäre Anfärbung in < 1 % der Tumorzellen
	Tumorzellen	zytoplasmatisch	deskriptiv (IF)	zytoplasmatische Anfärbung in < 1 % der Tumorzellen
TROP2	Tumorzellen	membranär	deskriptiv (IF)	keine Anfärbung
	Tumorzellen	membranär	H Score (IF)	0,0

Interpretation

Marker	Interpretation*
CD45/LCA	eine moderate Fraktion der ausgewerteten Tumor-Areale ist von positiv angefärbten Immunzellen bedeckt
PD-L1	< 1% der Immunzellen in den ausgewerteten Arealen positiv, sehr geringe Expression in den Immunzellen < 1% der Tumorzellen in den ausgewerteten Arealen positiv, sehr geringe Expression in den Tumorzellen
LAG3	negativ in den ausgewerteten Tumor-Arealen
p-mTOR	überwiegend starke zytoplasmatische Expression im Großteil der Tumorzellen unklare, überwiegend schwache nukleäre Expression in einer kleinen Fraktion der Tumorzellen
p-ERK	zytoplasmatische Expression in einer großen Fraktion der Tumorzellen nukleäre Expression in einer moderaten Fraktion der Tumorzellen
p16	erhaltene nukleäre Expression im Großteil der Tumorzellen (kein nukleärer Verlust) zytoplasmatische Expression im Großteil der Tumorzellen
p53	negativ
HER2	schwache, inkomplette membranäre Anfärbung in < 1% der Tumorzellen (entsprechend Score 0) < 1% der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv (sehr geringe zytoplasmatische Expression)
TROP2	negativ

Zusatzfärbungen

Untenstehend sind die Ergebnisse jener Färbungen gelistet, die nicht angefordert wurden, jedoch Bestandteil des angewandten Panels waren oder zur Identifikation von Gewebetypen durchgeführt wurden.

Marker	Zelltyp	Subzelluläre Lokalisation	Bewertungssystem*	Ergebnis*
Ki67	Tumorzellen	nukleär	deskriptiv (IF)	25 % der Tumorzellen positiv

Qualitätskontrolle

Vor Beginn der Untersuchung wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung von einem Facharzt für Pathologie oder Neuropathologie begutachtet.

Art des Materials	Externe ID	Tumorgehalt in den ausgewerteten Arealen	Eignung für Antikörper-basierte Färbungen
FFPE	N24-555 A3	75%	ja

Die Qualität der Färbungen wurde von einem Facharzt für Pathologie oder Neuropathologie und einem Biologen bewertet.

Marker	Färbemethode/ Plattform	Anteil ausgewerteter Areale	Qualität der Färbung	Kontrolle
CD45/LCA	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
PD-L1	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
LAG3	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
p-mTOR	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
p-ERK	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
p16	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
p53	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
HER2	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
TROP2	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle
Ki67	Färbung per Hand	60 %	ok	externe Positivkontrolle

Disclaimer

Bei diesem Immunfluoreszenz-Panel handelt es sich um einen Laboratory-Developed Test, der am Zentrum für Humangenetik Tübingen etabliert wurde. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden gegenüber der traditionellen chromogenen Immunhistochemie validiert.

***Die Scoring-Systeme wurden den Immunfluoreszenzmarkern gemäß den für die chromogene Immunhistochemie vorgeschlagenen Standards zugewiesen. Aufgrund der höheren Sensitivität und des breiteren dynamischen Bereichs der Immunfluoreszenzanalyse verhalten sich die Fluoreszenzintensitätswerte jedoch möglicherweise nicht exakt linear zu den Intensitäten, die bei chromogenen immunhistochemischen Färbungen beobachtet werden. Die Fluoreszenzsignale**

wurden während der Antikörperetablierung und -validierung auf Plausibilität überprüft, mit der chromogenen Immunhistochemie verglichen und an diese angepasst. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Immunfluoreszenz- und der immunhistochemischen Analyse können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurden die Namen der Scoring-Systeme in dieser Analyse mit dem Suffix "(IF)" (Immunfluoreszenz) versehen.

Die Verwendung der Ergebnisse liegt in der alleinigen Verantwortung des behandelnden Arztes.

Für weitere Fragen oder Informationen stehen wir gerne zu Verfügung.

Befund erstellt durch:

Dr. med. John Q. Public
Facharzt für Neuropathologie

Dieser Befund wurde elektronisch erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Methodik

Pathologische Begutachtung

Die pathologischen Leistungen (einschließlich der Bestätigung der histologischen Diagnose und der Bestimmung des Tumorgehalts) wurden in unserem Auftrag von einem Facharzt für Pathologie und/oder Neuropathologie durchgeführt. Die Eignung einer Probe für die Immunfluoreszenzanalyse ist abhängig vom Tumorgehalt sowie von der allgemeinen Materialqualität (z.B. kann es infolge inhomogener Fixierung zu einer Qualitätsbeeinträchtigung kommen). Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, ist ein Mindest-Tumorgehalt von 10 % erforderlich. Bei geringer Materialqualität kann die Auswertung der Färbeergebnisse beeinträchtigt oder sogar unmöglich sein. **Im vorliegenden Fall waren die Qualitätskriterien erfüllt.**

Färbemethode

Ein Leerschnitt des eingesandten FFPE-Materials wurde mit den genannten Antikörpern gefärbt. DAPI wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Im Anschluss an die Immunfluoreszenz-Färbungen wurde am selben Leerschnitt eine HE-Färbung durchgeführt.

Kontrollen

Externe Kontrollen wurden in denselben Färbeprozess einbezogen. Bei internen Kontrollen war das Färbeergebnis zumindest in einigen Strukturen der Patientenprobe selbst positiv.

Datenverarbeitung und Auswertung

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen wurden im Kontext des entsprechenden HE-Schnitts, der Kontrollen und der autofluoreszierenden Eigenschaften des Gewebes unter Verwendung eines VS200 Research Slide Scanners und der OlyVIA-Software (EVIDENT) bewertet.

Angewandte Bewertungssysteme:

- H-Score (IF): Score, der das Ausmaß der Immunreaktivität eines Gewebes auf einen Antikörper darstellt, der für ein bestimmtes Markerprotein spezifisch ist. Er wird nach folgender Formel berechnet: 3 x Prozentsatz stark positiver Zellen + 2 x Prozentsatz moderat positiver Zellen + Prozentsatz schwach positiver Zellen. Hieraus ergibt sich ein Bereich von 0 bis 300. H-Score Schwellenwerte: 0 - negativ; 1-99 - schwache Expression; 100-199 - mäßige Expression; 200-300 - starke Expression.
- TP-Score (IF): Prozentsatz der PD-L1-positiven Tumorzellen im Verhältnis zu allen vitalen Tumorzellen.
- IC-Score (IF): Prozentualer Anteil der Tumorfläche, die von PD-L1-positiven Immunzellen bedeckt ist. Zu den Immunzellen gehören Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen.
- Deskriptiv (IF): a) Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen. b) Prozentsatz der Tumorfläche oder des normalen Gewebes, die von positiv gefärbten Immunzellen bedeckt sind.

Datenverfügbarkeit

Screenshots von repräsentativen Bereichen können auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

Anhang – Erläuterungen zu den angewandten Markern

Marker zur Unterscheidung von Immunzell-Subtypen		
CD45/LCA	positiv in	reifen kernhaltigen Immunzellen: Leukozyten einschließlich Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen/Histiozyten, Mastzellen und Plasmazellen
	Relevanz	Identifizierung von Leukozyten

Immuncheckpoint- und Antigenpräsentationsmarker		
PD-L1	Definition / Funktion	inhibitorisches Immun-Checkpoint-Protein; bindet an seinen Rezeptor PD-1 auf T-Zellen; inhibiert Autoimmunität und T-Zell-Aktivierung; die Expression des Proteins auf Tumorzellen kann eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion verhindern
	positiv in	Immun- und Tumorzellen (variable Expression)
	Relevanz	Einschätzung des Ausmaßes der Hemmung der T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort
LAG3	Definition / Funktion	inhibitorischer Co-Rezeptor, der von lymphatischen Zellen exprimiert wird; unterdrückt die T-Zell-vermittelte Immunantwort
	positiv in	“exhausted T cells“; (Antigen-aktivierten T-Zellen)
	Relevanz	Identifizierung von “exhausted T cells“; Einschätzung des Ausmaßes der Hemmung der T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort

Marker zur Charakterisierung von Signaltransduktionswegen		
p-mTOR	Definition / Funktion	Protein, das Zellwachstum, Proteinsynthese, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Autophagie und Apoptose fördert; phosphorylierte (aktivierte) Form von mTOR; eine Dysregulation des mTOR-Signalwegs wird mit maligner Transformation/Tumorentstehung in Verbindung gebracht
	positiv in	Zellen, die aktiviertes mTOR-Protein exprimieren
	Relevanz	Einschätzung der Aktivierung des Pi3K/AKT/mTOR-Signalwegs in Tumorzellen (H-Score für die zytoplasmatische Expression)
p-ERK	Definition / Funktion	„extracellular signal-regulated kinases“ (ERKs) gehören zur Superfamilie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs); ERKs werden durch Phosphorylierung aktiviert; nach Aktivierung regulieren ERKs Zellproliferation, -differenzierung und -überleben; der ERK-Signalweg ist in Tumorzellen häufig dysreguliert
	positiv in	Zellen, die aktiviertes ERK-Protein exprimieren
	Relevanz	Einschätzung der Aktivierung des MAPK-Signalwegs in Tumorzellen
p16	Definition / Funktion	Tumorsuppressorprotein, das vom *CDKN2A*-Gen kodiert wird; Inhibitor der Zellzyklus-aktivierenden Proteine CDK4 und CDK6; unterdrückt Zellwachstum und Zellteilung; ein Verlust dieses Tumorsuppressors wird mit dem Verlust von Seneszenz-Merkmalen und dem Fortschreiten maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht
	positiv in	Zellen mit intaktem *CDKN2A*/p16, seneszenten Zellen; HPV-assoziierten Tumoren (nukleäre und zytoplasmatische Überexpression); Verlust der Kernfärbung bei Tumoren mit biallelischer *CDKN2A*-Inaktivierung
	Relevanz	Bewertung derp16-Expression in *CDKN2A*-alterierten Tumoren; Einschätzung der Aktivierung des CDK Signalwegs; Surrogatmarker für eine mögliche HPV-Assoziation
p53	Definition / Funktion	Tumorsuppressorprotein, das vom *TP53*-Gen kodiert wird; Aktivierung als Reaktion auf DNA-Schäden; induziert Zellzyklus-Arrest, um DNA-Reparaturmechanismen zu ermöglichen, steuert zelluläre Seneszenz und leitet Apoptose ein

	positiv in	normalem Gewebe (Wildtyp p53-Expression: positive Anfärbung einzelner Zellkerne); Tumorzellen mit *TP53*-Veränderungen (starke Kernfärbung in einem hohen Anteil der Tumorzellen im Falle von Missense-Mutationen, kompletter Verlust der Kernfärbung im Falle von trunkierenden, Frameshift-Veränderungen und/oder Deletionen)
	Relevanz	Nachweis einer *TP53*-Veränderung auf Proteinebene; Identifizierung von Tumorzellen in *TP53*-alterierten Entitäten
HER2	Definition / Funktion	Humaner Epidermaler Wachstumsrezeptor 2, der durch das *ERBB2*-Gen codiert wird; Tyrosinkinase, die an Zellwachstum, Zellteilung und Zellreparaturmechanismen beteiligt ist; konstitutive Aktivierung bei Überexpression
	positiv in	Plasmamembranen von Epithelzellen verschiedener Organe wie Brust, Haut, Magen-Darm-Trakt, Atemwegen, Fortpflanzungsorganen und Harnwegen; Überexpression in bis zu 20% der Mammakarzinome, jedoch auch in Kolon-, Magen- und Ösophagustumoren nachweisbar
	Relevanz	Bewertung der membranären HER2-Expression in Tumorzellen; Verifizierung einer mittels DNA/RNA Sequenzierung nachweisbaren *ERBB2*-Amplifikation oder Überexpression auf Proteinebene
TROP2	Definition / Funktion	Transmembran-Glykoprotein, das vom *TACSTD2*-Gen kodiert wird; moduliert Zellregeneration, -proliferation, -invasion und -überleben
	positiv in	normalem Gewebe; überexprimiert in vielen Tumorentitäten, vor allem in Brust- und Blasentumoren
	Relevanz	Überprüfung einer *TACSTD2*-RNA-Überexpression auf Proteinebene, Kategorisierung des TROP2-Expressionsniveaus (z. B. niedrig vs. intermediär vs. hoch), Bestätigung der Target-Expression für klinische Studien oder translationale Ansätze

Marker zur Charakterisierung von Gewebe- und Tumortypen		
Ki67	Definition / Funktion	Marker der Zellproliferation; das Ergebnis der Ki67-Färbung ist als Proliferationsindex bekannt und wird häufig als Maß für die Einordnung der Malignität eines Tumors verwendet
	positiv in	Zellen, die in den Zellzyklus eingetreten sind
	Relevanz	Ermittlung des prozentualen Anteils proliferierender Kerne in einer Gewebeart, einem Zelltyp oder einer Tumorentität

Diese Tabellen bieten einen Überblick über die in dieser Analyse verwendeten Marker und dienen als Erläuterung ihrer Anwendung im gegebenen Kontext. Die aufgeführten Spezifikationen sind daher nicht als umfassend oder vollständig aufzufassen.