

## ONCONEXT TISSUE

### RICERCA DI MUTAZIONI SOMATICHE HOTSPOT IN TUMORI SOLIDI

#### Il tumore e mutazioni somatiche.

I tumori sono patologie dovute ad alterazioni genetiche in cui la componente cellulare non risponde correttamente ai fattori che normalmente ne controllano la proliferazione. Una singola alterazione genetica non è in genere sufficiente a provocare il cancro. Infatti, i tumori sono processi multifasici: la progressione neoplastica consiste in una serie successiva di alterazioni genetiche che si accumulano.

La maggior parte dei tumori è correlata in letteratura alla presenza di mutazioni geniche somatiche<sup>1,2</sup>. Tali mutazioni somatiche si sviluppano in modo spontaneo potenzialmente in qualsiasi tipo di cellula. Queste alterazioni del DNA possono derivare da errori casuali durante la replicazione, o dall'esposizione a fattori ambientali mutageni accidentali, professionali, o dipendenti dallo stile di vita. A differenza delle varianti patogenetiche ereditabili (germline mutations) che sono presenti nella linea germinale, le mutazioni somatiche non sono trasmissibili alla progenie.

Migliaia di mutazioni somatiche, che possono influenzare l'insorgenza di un tumore, lo sviluppo di metastasi o la risposta/resistenza a un trattamento, sono state catalogate su database internazionali. L'identificazione e la comprensione di queste alterazioni del DNA nel tumore possono essere cruciali nella diagnosi del cancro e nella pianificazione del suo trattamento, dal monitoraggio della risposta alla terapia all'identificazione precoce della ripresa. Inoltre, durante la progressione di un tumore, il tessuto continua a sviluppare ulteriori nuove mutazioni e queste ultime possono influenzare la risposta agli agenti terapeutici innescando meccanismi di resistenza.

La diagnosi del cancro, richiede una serie di analisi, tra le quali la biopsia tissutale costituisce il gold standard. La strategia terapeutica contro il cancro, e il controllo della risposta terapeutica, sono convenzionalmente decisi attraverso un approccio analitico che associa la diagnostica per immagini alla caratterizzazione patologica della biopsia del tessuto.

Utilità clinica dell'analisi del ctDNA nel monitoraggio della malattia tumorale e nella medicina di precisione In letteratura è dimostrato che mutazioni somatiche in un determinato gruppo di geni sono spesso alla base dello sviluppo di diversi tipi di tumore (Tabella 2)<sup>1</sup>. Questi geni includono BRAF, la famiglia del gene RAS, EGFR, PIK3CA, FOXL2, e TP53. Mutazioni somatiche nel gene BRAF sono comunemente associate al melanoma, al linfoma non-Hodgkin, al tumore del colon-retto, al carcinoma papillare della tiroide, al carcinoma del polmone non a piccole cellule, e all'adenocarcinoma del polmone, mentre mutazioni somatiche nel gene EGFR sono stati osservate nel tumore del polmone<sup>11</sup>. Mutazioni nel gene PIK3CA sono più frequenti nel tumore del seno e del colon-retto<sup>12</sup>. Mutazioni sul gene FOXL2 sono state osservate nei tumori della granulosa, e mutazioni del gene TP53 vengono rilevate in quasi tutti tipi di cancro<sup>9</sup>.

L'osservazione di mutazioni hotspot può aiutare l'oncologo a consigliare un piano di trattamento personalizzato durante il quale eseguire il monitoraggio della risposta della malattia e il potenziale sviluppo di resistenza al farmaco. Per esempio, nei pazienti affetti da melanoma metastatico, se presente una specifica mutazione somatica sul gene BRAF (V600E), è spesso indicato il trattamento con inibitori di BRAF come dabrafenib, trametinib e vemurafenib, singolarmente o in combinazione<sup>13</sup>. Inoltre, gli inibitori di EGFR cetuximab e panitumumab si sono rivelati più utili nei pazienti con carcinoma polmonare in cui non sono presenti mutazioni sul gene KRAS (wild type) e in cui EGFR è espresso. Diversi studi clinici di rilievo hanno dimostrato che gli inibitori della tirosin-chinasi di EGFR (TKIs), afatinib e erlotinib, sono utili solo per il trattamento di pazienti i cui tumori presentano mutazioni attivanti nel dominio tirosin-chinasico del gene EGFR<sup>14</sup>.

**Table 2 – Frequenza delle mutazioni somatiche per gene e tipo di tumore**

Tipo di tumore	Gene	Frequenza delle mutazioni somatiche
Mammella	PIK3CA	26%
	TP53	23%
Colon-retto	BRAF	11%
	KRAS	36%
	NRAS	5%
	PIK3CA	14%
	TP53	45%
Endometrio	KRAS	14%
	PIK3CA	21%
	TP53	17%
Granulosa cell	FOXL2	97%
Head & Neck	EGFR	2%
	PIK3CA	7%
	TP53	38%
Tumore Renale	TP53	5%
Polmone	BRAF	1-4% 1% in Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
	EGFR	29%
	KRAS	17%
	PIK3CA	4%
	TP53	34%
Melanoma	BRAF	45%
	NRAS	18%
	TP53	12%
Tumore ovarico	BRAF	7%
	FOXL2	18%
	KRAS	12%
	PIK3CA	9%
	TP53	46%
Pancreas	BRAF	2%
	KRAS	57%
	PIK3CA	2%
	TP53	36%
Prostata	BRAF	1%
	EGFR	3%
	KRAS	4%
	PIK3CA	2%
	TP53	14%
Tumore testicolare	BRAF	2%
	FOXL2	2%
	KRAS	4%
	NRAS	2%
	TP53	5%
Tiroide	BRAF	41%
	GNAS	3%
	KRAS	2%
	NRAS	7%
	PIK3CA	3%
	TP53	6%

 References: COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)<sup>19-25</sup>.

## Il test OncoNext Tissue™.

**OncoNext Tissue™** è un test genetico finalizzato al rilevamento di mutazioni somatiche in tumori solidi. L'esame impiega le più recenti innovazioni tecnologiche. Grazie alla tecnologia di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) oggi è possibile individuare in modo estremamente sensibile la presenza di mutazioni somatiche anche da esigue quantità di tessuto tumorale.

Il rilevamento contemporaneo di diverse mutazioni permette di comprendere al meglio il profilo genomico del tumore e adottare il trattamento più idoneo.

## Come viene effettuato il test OncoNext Tissue™.

Il test si esegue su un campione di tessuto, fresco o incluso in paraffina. Il DNA viene isolato ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento del DNA** mediante l'impiego di tecniche di **Next Generation Sequencing (NGS)**, si sequenziano ad elevata profondità di lettura le regioni geniche elencate in Tabella 3. Le sequenze geniche ottenute vengono successivamente analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per individuare eventuali mutazioni somatiche nei geni in esame. Le mutazioni vengono interrogate mediante il **database COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer)** capace di associare le mutazioni patologiche utilizzando i dati presenti nelle pubblicazioni scientifiche.

## Indicazioni per il test OncoNext Tissue™.

Il test **OncoNext Tissue™** è stato progettato per pazienti, ai quali è già stato diagnosticato un tumore, allo scopo di:

- Fornire un **profiling del tumore** per la corretta applicazione della medicina di precisione. Il test **OncoNext Tissue™** Monitor può fornire all'oncologo informazioni utili a improntare un piano di trattamento personalizzato;
- Fornire informazioni prognostiche;
- Essere di **supporto per l'inserimento di un paziente in un Clinical Trial**: si tratta di una funzione aggiuntiva del test **OncoNext Tissue™**, per profilare correttamente il paziente e la sua malattia allo scopo di individuare un eventuale studio clinico in corso per cui tale paziente rientra nei criteri di eleggibilità.

## Regioni geniche investigate.

Il test **OncoNext Tissue™** è stato progettato per il rilevamento di mutazioni somatiche hotspot in **15 geni** coinvolti in diversi tumori: **AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2, FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET e TP53** (tabella 3).

La selezione dei geni è stata eseguita a partire dal consenso scientifico attribuito ai geni inseriti nel pannello da organizzazioni come il National Comprehensive Cancer Network (NCCN)<sup>59</sup> e la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO)<sup>60</sup>. Il pannello comprende geni, regioni geniche incluse le varianti a singolo nucleotide (SNV), e inserzioni/delezioni (indels) che si sono dimostrate utili nello studio molecolare del tessuto tumorale.

Tabella 3: Geni investigati e principali tipi di tumore associati

Gene	Tipi di tumore associati
AKT1	Mammella, Polmone, Colon-Retto*
BRAF	Melanoma*, Colon-Retto* Polmone, Ovarico, Gastrico, Glioma, Tiroide, Pancreas, Prostata
EGFR	Polmone*; Head & Neck, Prostata
ERBB2	Mammella, Polmone
FOXL2	Ovarico
GNA11	Melanoma
GNAQ	Melanoma
KIT	Gastrico, Melanoma*, Carcinoma Timico
KRAS	Colon-Retto*, Gastrico, Polmone*, Ovarico, Tiroide, Endometrio, Pancreas, Prostata
MET	Polmone*, Colon-Retto, Gastrico
NRAS	Colon-Retto*, Polmone, Melanoma, Tiroide
PDGFRA	Gastrico, Melanoma,
PIK3CA	Polmone, Mammella, Prostata, Colon-Retto, Ovarico, Head & Neck, Pancreas, Tiroide
RET	Polmone*, Tiroide
TP53	Polmone, Melanoma, Ovarico, Colon-Retto, Mammella; Endometrio, Head & Neck, Rene, Pancreas, Prostata, Tiroide

\* Linee guida NCCN per tipo di tumore.

### Risultati ottenibili con il test OncoNext Tissue™.

Il test **OncoNext Tissue™** fornisce informazioni relative alla assenza o alla presenza nel campione analizzato di ciascuna delle mutazioni hotspot elencate in tabella 4.

- **Risultato “POSITIVO” – Presenza di una o più mutazioni:** indica che il test ha rilevato, nel DNA estratto dal campione ematico, una o più mutazioni somatiche a livello di uno (o più) geni. Le mutazioni riscontrabili tramite il test **OncoNext Tissue™** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

- con significato patologico noto;
- **con significato benigno** in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico;
- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

L'identificazione di tale/i mutazione/i può avere diverse implicazioni, in relazione alla/e variante/i rilevata/e. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, indirizzando il paziente ad una successiva consulenza con lo specialista oncologo.

- **Risultato “NEGATIVO” - Assenza di mutazioni:** indica che il test non ha rilevato, nel DNA estratto dal campione ematico, nessuna delle mutazioni somatiche ricercate.

- Occasionalmente, il test potrebbe produrre un **risultato non ottimale o non conclusivo**, perché il campione non soddisfa i requisiti minimi di qualità necessari per poter considerare il risultato ottenuto ottimale e, quindi, poter procedere alla relativa emissione del referto.

L'interpretazione del risultato viene personalizzata sulla base della storia clinica del paziente e, opzionalmente, può essere fornita un'indicazione sulla possibilità di inclusione di un paziente in un trial clinico sulla base dei risultati del test **OncoNext Tissue™**.

### Accuratezza del test.

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99% (sensibilità 99%; specificità 99.9%). Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

### Limiti del test OncoNext Tissue™.

- Il test **OncoNext Tissue™** analizza solo le mutazioni più frequenti dei geni investigati. In caso di tumori che, al momento del test, non abbiano sviluppato le mutazioni specifiche ricercate, queste ultime non saranno rilevate. E' quindi possibile che mutazioni in geni non testati da **OncoNext Tissue™** possano essere causa di malattia del paziente.
- L'esame non è in grado di evidenziare:
  - mutazioni localizzate nelle regioni geniche non specificamente investigate;
  - delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 25 bp.
- Un risultato "**NEGATIVO**" - **Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità che siano presenti mutazioni localizzate in regione del genoma non investigate dall'esame.
- Un risultato positivo deve essere interpretato nel contesto della storia clinica del paziente e correlato allo stadio della malattia, ai risultati di imaging, ai dettagli terapeutici, e ad altri dati di laboratorio.
- In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.
- L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.
- Alcune di queste varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.
- Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di *coverage* per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.
- Mutazioni somatiche non incluse nell'esame non saranno rilevate.
- Il test **OncoNext Tissue™** non è finalizzato all'individuazione della predisposizione ereditaria allo sviluppo dei tumori, ma rileva solo le mutazioni somatiche.

### Target coverage.

Si intende per **Target Coverage**, il numero medio di letture (reads) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. In generale, più è profonda la copertura di una regione più sensibile e affidabile è l'analisi. Per le varianti analizzate è necessaria una copertura di **8.000x** per il rilevamento di mutazioni di frequenza fino all'**1%**. I requisiti interni di controllo di qualità (QC) per il test **OncoNext Tissue™** impongono una **copertura maggiore di 8.000x** su più del 99% delle basi target previste per l'analisi.

### Frequenza dell'allele mutato (MAF).

La frequenza dell'allele mutato è la frequenza identificata nel campione riportata per le diverse mutazioni (sostituzioni, inserzioni e delezioni).

### Disclaimer.

I dati presentati nella relazione tecnica e nei referti sono destinati all'uso esclusivo di personale sanitario qualificato. Ogni diagnosi, consulenza, o prescrizione di trattamento in relazione ai dati contenuti nella presente relazione tecnica, o nei referti, deve essere eseguita da un operatore sanitario qualificato che tenga conto della storia clinica del singolo paziente, compresi gli esiti dei altri metodi d'analisi tradizionali (es. biopsia tumorale dei tessuti e tecniche di imaging). Le informazioni contenute nei referti e nella presente relazione tecnica sono riferibili alla data in cui gli stessi sono stati emessi; si consiglia all'operatore sanitario che prende in carico il paziente di

rivalutare in un eventuale futuro la situazione emersa secondo la più recente letteratura disponibile.

Tabella 4: Principali mutazioni ricercate nel test **OncoNext Tissue™**

REFSEQ	GENE	Esone	Mutazione	Variazione Nucleotidica			
NM_005163	AKT1	3	<a href="#">E17K</a>	c.49 G>A			
			<a href="#">D594E</a>	c.1782T>A			
			<a href="#">D594E</a>	c.1782T>G			
			<a href="#">D594G</a>	c.1781A>G			
			<a href="#">D594H</a>	c.1780G>C			
			<a href="#">D594N</a>	c.1779_1780delTGinsGA			
			<a href="#">D594N</a>	c.1780G>A			
			<a href="#">D594V</a>	c.1781A>T			
			<a href="#">G596R</a>	c.1786G>C			
			<a href="#">K601E</a>	c.1801A>G			
			NM_004333	BRAF	15	<a href="#">L597Q</a>	c.1790T>A
						<a href="#">L597R</a>	c.1790T>G
						<a href="#">L597S</a>	c.1789_1790delCTinsTC
						<a href="#">L597V</a>	c.1789C>G
<a href="#">V600D</a>	c.1799_1800delTGinsAT						
<a href="#">V600E</a>	c.1799T>A						
<a href="#">V600E</a>	c.1799_1800delTGinsAA						
<a href="#">V600G</a>	c.1799T>G						
<a href="#">V600K</a>	c.1798_1799delGTinsAA						
<a href="#">V600M</a>	c.1798G>A						
<a href="#">V600R</a>	c.1798_1799delGTinsAG						
	18	<a href="#">G719A</a>				c.2156G>C	
	18	<a href="#">G719C</a>				c.2155G>T	
	18	<a href="#">G719S</a>				c.2155G>A	
	19	<a href="#">Exon 19 Deletions</a>					
	19	<a href="#">Exon 19 Insertions</a>					
	20	<a href="#">A763_Y764insFQEA</a>	c.2290_2291ins				
	20	<a href="#">Exon 20 Insertions</a>					
	20	<a href="#">S768I</a>	c.2303G>T				
	20	<a href="#">T790M</a>	c.2369C>T				
NM_005228	EGFR	19	E746_A750>IP	c.2235_2248delGGAATTAAGAGAAGinsAATTC			
		19	E746_A750del	c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC			
		19	E746_A750del	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA			
		19	E746_P753>VS	c.2237_2257del21insTCT			
		19	E746_S752>A	c.2237_2254del18			
		19	E746_S752>D	c.2238_2255del18			
		19	E746_S752>I	c.2235_2255delinsAAT			
		19	E746_S752>V	c.2237_2255delinsT			
		19	E746_T751>A	c.2237_2251del15			
		19	E746_T751>I	c.2235_2252delinsAAT			
		19	E746_T751>IP	c.2235_2251delinsAATTC			
		19	E746_T751>V	c.2237_2252delinsT			
		19	E746_T751>VA	c.2237_2253delinsTTGCT			
		19	E746_T751del	c.2236_2253del18			
		19	K745_E749del	c.2233_2247del15)			
		19	L747_A750>P	c.2238_2248delATTAAGAGAAGinsGC			
		19	L747_A750>P	c.2239_2248delITTAAGAGAAGinsC			
		19	L747_E749del	c.2239_2247delITTAAGAGAA			
		19	L747_P753>Q	c.2239_2258delinsCA			
		19	L747_S752>Q	c.2239_2256delinsCAA			
		19	L747_S752del	c.2239_2256del18			
		19	L747_T751>Q	c.2238_2252delinsGCA			
		19	L747_T751>S	c.2240_2251del			
		19	L747_T751del	c.2238_2252del			
NM_004448	ERBB2	19	<a href="#">D769H</a>	c.2305G>C			
		19	<a href="#">D769Y</a>	c.2305G>T			
		19	G776S	c.2326 G>A			
		19	c.2263_2264delITinsCC	c.2263_2264delITinsCC			
		19	c.2322_2334dupATACGTGATGGC	c.2322_2334dupATACGTGATGGC			
		19	c.2328_2336dupTGTGGGCTC	c.2328_2336dupTGTGGGCTC			
	19	<a href="#">L755_T759del</a>	c.2264_2278del				
	19	<a href="#">L755S</a>	c.2264T>C				

		20	<a href="#">Exon 20 Insertions</a>	
		20	<a href="#">G778_P780dup</a>	c.2339_2340ins
		20	<a href="#">V777L</a>	c.2329G>T
NM_023067	FOXL2	1	C134W	c.402 C>G
NM_002067	GNA11	5	<a href="#">Q209L</a>	c.626A>T
		5	<a href="#">Q209P</a>	c.626A>C
NM_002072	GNAQ	5	<a href="#">Q209L</a>	c.626A>T
		5	<a href="#">Q209P</a>	c.626A>C
		5	<a href="#">Q209R</a>	c.626A>G
		11	556 ins L	
		11	575 ins PE	
		11	Del 554–558	
		11	Del 554–559	
		11	Del 566–572	
		11	Del 566–574	
		11	Del 579	
		11	Del V559	
		11	E583_E589dupPYDHKWE	
		11	<a href="#">Exon 11 Mutation</a>	
		11	G565V	
		11	K550N	
		11	K558N	
		11	<a href="#">L576P</a>	c.1727T>C
NM_000222	KIT	11	N566D	
		11	<a href="#">P577_D579del</a>	c.1730_1738del
		11	<a href="#">V559A</a>	c.1676T>C
		11	<a href="#">V559D</a>	c.1676T>A
		11	V559G	
		11	V560A	
		11	V560D	c.1727T>C (V560D)
		11	<a href="#">V560del</a>	c.1679_1681del
		11	V560G	
		11	V569G	
		11	<a href="#">W557R</a>	c.1669T>A
		11	<a href="#">W557R</a>	c.1669T>C
		11	<a href="#">Y553N</a>	c.1657T>A
		14	<a href="#">Exon 14 Mutation</a>	
		14	<a href="#">H697Y</a>	c.2089C>T
		2	<a href="#">G12A</a>	c.35G>C
		2	<a href="#">G12C</a>	c.34G>T
		2	<a href="#">G12D</a>	c.35G>A
		2	<a href="#">G12R</a>	c.34G>C
		2	<a href="#">G12S</a>	c.34G>A
		2	<a href="#">G12V</a>	c.35G>T
		2	<a href="#">G13A</a>	c.38G>C
		2	<a href="#">G13C</a>	c.37G>T
		2	<a href="#">G13D</a>	c.38G>A
		2	<a href="#">G13R</a>	c.37G>C
		2	<a href="#">G13S</a>	c.37G>A
		2	<a href="#">G13V</a>	c.38G>T
NM_004985	KRAS	2	<a href="#">Q22K</a>	c.64C>A
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>C
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>T
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>C
		3	<a href="#">Q61K</a>	c.181C>A
		3	<a href="#">Q61L</a>	c.182A>T
		3	<a href="#">Q61P</a>	c.182A>C
		3	<a href="#">Q61R</a>	c.182A>G
		4	<a href="#">A146P</a>	c.436G>C
		4	<a href="#">A146T</a>	c.436G>A
		4	<a href="#">A146V</a>	c.437C>T
		4	<a href="#">K117N</a>	c.351A>C
		4	<a href="#">K117N</a>	c.351A>T
NM_001127500	MET	18	L1213V	c.3637 C>G
		18	V1206L	c.3616 G>T
NM_002524	NRAS	2	<a href="#">G12A</a>	c.35G>C
		2	<a href="#">G12C</a>	c.34G>T

		2	<a href="#">G12D</a>	c.35G>A
		2	<a href="#">G12R</a>	c.34G>C
		2	<a href="#">G12S</a>	c.34G>A
		2	<a href="#">G12V</a>	c.35G>T
		2	<a href="#">G13A</a>	c.38G>C
		2	<a href="#">G13C</a>	c.37G>T
		2	<a href="#">G13D</a>	c.38G>A
		2	<a href="#">G13R</a>	c.37G>C
		2	<a href="#">G13V</a>	c.38G>T
		3	<a href="#">Q61E</a>	c.181C>G
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>C
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>T
		3	<a href="#">Q61H</a>	c.183A>T
		3	<a href="#">Q61K</a>	c.181C>A
		3	<a href="#">Q61L</a>	c.182A>T
		3	<a href="#">Q61L</a>	c.182_183delAAinsTG
		3	<a href="#">Q61P</a>	c.182A>C
		3	<a href="#">Q61R</a>	c.182A>G
		3	<a href="#">Q61R</a>	c.182_183delAAinsGG
		12	Y555C	c.1664 A>G
		12	c.1679_1693delGGGTCATTGAATCAA	c.1679_1693delGGGTCATTGAATCAA
		12	c.1681_1682insAGAGGG	c.1681_1682insAGAGGG
		12	V561D	c.1682 T>A
		12	c.1696_1713del18	c.1696_1713del18
		14	c.2526_2537delCATCATGCATGA	c.2526_2537delCATCATGCATGA
		14	c.2533_2544delCATGATTCGAAC	c.2533_2544delCATGATTCGAAC
		18	<a href="#">D842V</a>	c.2525 A>T
		18	D846Y	c.2536 G>T
		12	<a href="#">Exon 12 Mutation</a>	
		14	<a href="#">Exon 14 Mutation</a>	
		18	<a href="#">Exon 18 Mutation</a>	
		9	<a href="#">D549N</a>	c.1645G>A
		9	<a href="#">E542K</a>	c.1624G>A
		9	<a href="#">E545G</a>	c.1634A>G
		9	<a href="#">E545K</a>	c.1633G>A
		9	<a href="#">E545Q</a>	c.1633G>C
		9	<a href="#">E545V</a>	c.1634A>T
		9	<a href="#">Q546E</a>	c.1636C>G
		9	<a href="#">Q546K</a>	c.1636C>A
		9	<a href="#">Q546L</a>	c.1637A>T
		9	<a href="#">Q546P</a>	c.1637A>C
		9	<a href="#">Q546R</a>	c.1637A>G
		20	<a href="#">H1047R</a>	c.3140A>G
		20	<a href="#">H1047L</a>	c.3140A>T
		20	H1047Y	c.3139C>T
		20	M1043I	c.3129G>A
NM_020975	RET	16	<a href="#">M918T</a>	c.2753 T>C
NM_000546	TP53		Intera regione codificante	

## Bibliografia.

- Greenman, C., et al., Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 2007. 446(7132): p.153-8.
- Stephens, P.J., et al., The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 2012. 486(7403): p. 400-4.
- Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli, Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014. 32(6): p. 579-86.
- Heitzer, E., P. Ulz, and J.B. Geigl, Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 2015. 61(1): p. 112-23.
- Lebofsky, R., et al., Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol*, 2015. 9(4): p. 783-90.
- Esposito, A., et al., Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev*, 2014. 40(5): p. 648-55.
- Newman, A.M., et al., An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014. 20(5): p. 548-54.
- Kidess, E., et al., Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget*, 2015. 6(4): p. 2549-61.
- Forshe, T., et al., Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*, 2012. 4(136): p. 136ra68.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(1): p. 5-29.
- Davies, H., et al., Mutation of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 949-54.



Romero, A., et al., Identification of E545k mutation in plasma from a PIK3CA wild-type metastatic breast cancer patient by array-based digital polymerase chain reaction: Circulating-free DNA a powerful tool for biomarker testing in advance disease. *Transl Res*, 2015.

Ascierto, P.A., et al., Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2013. 31(26): p. 3205-11.

Rothschild, S.I., Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer-Beyond EGFR and ALK. *Cancers (Basel)*, 2015. 7(2): p. 930-49.

Heidary, M., et al., The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2014. 16(4): p. 421.

Zill, O.A., et al., Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov*, 2015.

Janku, F., et al., Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*, 2015. 6(14): p. 12809-21.

Tabernero, J., et al., Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol*, 2015.

Forbes, S.A., et al., COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(Database issue): p. D805-11.

Shah, S.P., et al., Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med*, 2009. 360(26): p. 2719-29.

Schirripa, M., et al., Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2015. 136(1): p. 83-90.

Janku, F., et al., PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22769.

Kalfa, N., et al., Activating mutations of Gsalpha in kidney cancer. *J Urol*, 2006. 176(3): p. 891-5.

Fecteau, R.E., et al., GNAS mutations identify a set of right-sided, RAS mutant, villous colon cancers. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e87966.

Sparks, A.B., et al., Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1998. 58(6): p. 1130-4.

Bettegowda, C., et al., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 2014. 6(224): p. 224ra24.

Oshiro, C., et al., PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. 150(2): p. 299-307.

Beaver, J.A., et al., Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(10): p. 2643-50.

Dawson, S.J., et al., Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013. 368(13): p. 1199-209.

Ignatiadis, M. and S.J. Dawson, Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol*, 2014. 25(12): p. 2304-13.

Murtaza, M., et al., Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 2013. 497(7447): p. 108-12.

Mohamed Suhaimi, N.A., et al., Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol Oncol*, 2015.

Sanmamed, M.F., et al., Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*, 2015. 61(1): p. 297-304.

Siravegna, G., et al., Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*, 2015.

Roschewski, M., et al., Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*, 2015.

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical chemistry*. 2015;61:112-23.

Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Molecular oncology*. 2015;9:783-90.

Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer treatment reviews*. 2014;40:648-55.

Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32:579-86.

Perrone F, Lampis A, Bertan C, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*. 2014;100:115-21.

Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research*. 2015;43:D789-98.

Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic acids research*. 2015;43:D805-11.

Ascierto PA, Minor D, Ribas A, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31:3205-11.

Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene*. 2009;28:85-94.

Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British journal of cancer*. 2015;112:1421-7.

Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26:731-6.

Zill OA, Greene C, Sebisanoovic D, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer discovery*. 2015;

Thress KS, Pawletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature medicine*. 2015;21:560-2.

Karachaliou N, Mayo-de Las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA oncology*. 2015;1:149-57.

Shah SP, Köbel M, Senz J, et al. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *The New England journal of medicine*. 2009;360:2719-29.

De Stefano A, Carlomagno C. Beyond KRAS: Predictive factors of the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*: WJG. 2014;20:9732-43.

Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine*. 2015;21:795-801.

Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2015;136:83-90.

Wong AL, Lim JS, Sinha A, et al. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *Journal of translational medicine*. 2015;13:57.

Rodon J, Braña I, Siu LL, et al. Phase I dose-escalation and -expansion study of buparlisib (BKM120), an oral pan- Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*. 2014;32:670-81.

Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Science translational medicine*. 2012;4:136ra68.

Madic J, Kiiäläinen A, Bidard FC, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2015;136:2158-65.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014;6:224ra24.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology ([www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site)) Accessed 15 June 2015.

Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii1-9.

Higgins MJ, Baselga J (2011) Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 121(10):3797-803.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511(7511):543-50.

Swanton C, Futreal A, Eisen T (2006) Her2-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 2):4377s-4383s.

Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, et al. (2005) Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer* 103(9):1865-73.

Tan D, Deeb G, Wang J, et al. (2003) HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 12(4):201-11.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376(9742):687-97.

Chumsri S, Weidler J, Ali S, et al. (2015) Prolonged Response to Trastuzumab in a Patient With HER2-Nonamplified Breast Cancer With Elevated HER2 Dimerization Harboring an ERBB2 S310F Mutation. *J Natl Compr Canc Netw* 13(9):1066-70.

Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M (2006) HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 354(24):2619-21.

Falchook GS, Janku F, Tsao AS, et al. (2013) Non-small-cell lung cancer with HER2 exon 20 mutation: regression with dual HER2 inhibition and anti-VEGF combination treatment. *J Thorac Oncol* 8(2):e19-20.

Mazières J, Peters S, Lepage B, et al. (2013) Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 31(16):1997-2003.

Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. (2012) Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366(2):109-19.

Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. (2015) Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 372(8):724-34.

Verma S, Miles D, Gianni L, et al. (2012) Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 367(19):1783-91.

Cameron D, Casey M, Oliva C, et al. (2010) Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist* 15(9):924-34.

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355(26):2733-43.

Serra V, Vivancos A, Puente XS, et al. (2013) Clinical response to a lapatinib-based therapy for a Li-Fraumeni syndrome patient with a novel HER2V659E mutation. *Cancer Discov* 3(11):1238-44.

Ali SM, Alpaugh RK, Downing SR, et al. (2014) Response of an ERBB2-Mutated Inflammatory Breast Carcinoma to Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Therapy. *J Clin Oncol ePub Feb 2014*.

Lin NU, Winer EP, Wheatley D, et al. (2012) A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 133(3):1057-65.

Schwab CL, Bellone S, English DP, et al. (2014) Afatinib demonstrates remarkable activity against HER2-amplified uterine serous endometrial cancer in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 111(9):1750-6.

De Grève J, Teugels E, Geers C, et al. (2012) Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer* 76(1):123-7.

De Grève J, Moran T, Graas MP, et al. (2015) Phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in demographically and genotypically defined lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 88(1):63-9.

Gandhi L, Bahleda R, Tolaney SM, et al. (2014) Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* 32(2):68-75.

Ben-Baruch NE, Bose R, Kavuri SM, et al. (2015) HER2-Mutated Breast Cancer Responds to Treatment With Single-Agent Neratinib, a Second-Generation HER2/EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Natl Compr Canc Netw* 13(9):1061-4.

- Kris MG, Camidge DR, Giaccone G, et al. (2015) Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol* ePub Apr 2015.
- Takada M, Higuchi T, Tozuka K, et al. (2013) Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 13:241.
- Jensen JD, Knoop A, Laenholm AV, et al. (2012) PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 23(8):2034-42.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. (2007) A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12(4):395-402.
- Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, et al. (2011) Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositide-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 29(2):166-73.
- Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, et al. (2014) PIK3CA Mutations Are Associated With Lower Rates of Pathologic Complete Response to Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Therapy in Primary HER2-Overexpressing Breast Cancer. *J Clin Oncol* ePub Sep 2014.
- Barbareschi M, Cuorvo LV, Girlando S, et al. (2012) PIK3CA mutations and/or PTEN loss in Her2-positive breast carcinomas treated with trastuzumab are not related to resistance to anti-Her2 therapy. *Virchows Arch* 461(2):129-39.
- Guarneri V, Generali DG, Frassoldati A, et al. (2014) Double-blind, placebo-controlled, multicenter, randomized, phase IIb neoadjuvant study of letrozole-lapatinib in postmenopausal hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, operable breast cancer. *J Clin Oncol* 32(10):1050-7.
- Jones KL, Buzdar AU (2009) Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol* 10(12):1179-87.
- Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, et al. (2013) Hsp90 inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Breast* 22(5):569-78.
- Aarthy, R., Mani, S., Velusami, S. et al. *Mol Diagn Ther* (2015) 19: 339. doi:10.1007/s40291-015-0167-y
- Chaudhuri AA, Binkley MS, Osmundson EC, Alizadeh AA, Diehn M. Predicting radiotherapy responses and treatment outcomes through analysis of circulating tumor DNA. *Seminars in radiation oncology*. 2015;25(4):305-312. doi:10.1016/j.semradonc.2015.05.001.
- Michail Ignatiadis, Mark Lee and Stefanie S. Jeffrey, *Clin Cancer Res* November 1 2015 (21) (21) 4786-4800; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1190
- Jiri Polivka Jr, Martin Pesta, and Filip Janku, *Expert Review Of Molecular Diagnostics* Vol. 15 , Iss. 12,2015
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*. 2008;14(9):985-990. doi:10.1038/nm.1789.
- Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16368-16373. doi:10.1073/pnas.0507904102.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16266-16271. doi:10.1073/pnas.0808319105.
- Sabine Jahr, Hannes Hentze, Sabine Englisch, Dieter Hardt, Frank O. Fackelmayer, Rolf-Dieter Heschand Rolf Knippers, *Cancer Res* February 2 2001 (61) (4) 1659-1665
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. Lee T, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e23418. doi:10.1371/journal.pone.0023418.
- Holdhoff et al., *JNCI J Natl Cancer Inst* (2009) 101(18): 1284-1285. doi: 10.1093/jnci/djp240
- Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*. 2014;20(5):548-554. doi:10.1038/nm.3519.
- Cécile Jovelett et al., *Clin Cancer Res* June 15 2016 (22) (12) 2960-2968
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *The New England journal of medicine*. 2012;366(10):883-892. doi:10.1056/NEJMoa1113205.
- Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biology*. 2014;15(8):453. doi:10.1186/s13059-014-0453-8.
- Ichihara E, Lovly CM. Shades of T790M – intratumor heterogeneity in EGFR mutant lung cancer. *Cancer discovery*. 2015;5(7):694-696. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0616.
- Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The Life History of 21 Breast Cancers. *Cell*. 2012;149(5):994-1007. doi:10.1016/j.cell.2012.04.023.
- Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third Generation EGFR Inhibitor. *Cancer discovery*. 2015;5(7):713-722. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0399.
- Wang Y, Waters J, Leung ML, et al. Clonal Evolution in Breast Cancer Revealed by Single Nucleus Genome Sequencing. *Nature*. 2014;512(7513):155-160. doi:10.1038/nature13600.
- Patel eTsui, 2015, *Clinical Biochemistry*, Volume 48, Issue 15, October 2015, Pages 957–961