



Nachweis von genetischen Aberrationen in malignen Gliomen mittels *Next-Generation-Sequencing*

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Angela Kim Zacher, geb. Veiser
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Februar 2017

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. Holger Schwender

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zacher, Angela; Kaulich, Kerstin; Stepanow, Stefanie; Wolter, Marietta; Köhrer, Karl; Felsberg, Jörg; Malzkorn, Bastian; Reifenberger, Guido (2016): *Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel*. In: *Brain Pathol* 2016 Feb 25. [Epub ahead of print]

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Gliome: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie	1
1.1.1 Die Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation der Gliome	3
1.1.2 Molekulare Pathologie von Gliomen	6
1.1.2.1 Diffuse und anaplastische Astrozytome, IDH-mutiert	7
1.1.2.2 Oligodendrogliome und anaplastische Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert	8
1.1.2.3 Glioblastome	9
1.1.2.4 Diffuse Mittellinienglioblastome, H3-K27M-mutiert	10
1.1.2.5 Andere astrozytäre Tumoren	11
1.1.3 Neuropathologische Diagnostik von Gliomen	12
1.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung in der medizinischen Diagnostik	13
1.3 <i>Ion PGM™, Ion Proton™ und Ion S5™ Next Generation Sequencing (NGS)- Systeme</i>	15
1.4 Ziele der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Kits	20
2.1.3 Verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme	21
2.1.4 Tumorgewebeproben von Patienten mit Gliomen	22
2.1.4.1 Tumorgewebeproben für die Etablierung der NGS-Plattform	22
2.1.4.2 Gliomproben für das Rezidivtumor-Projekt	27
2.1.5 Untersuchte Zelllinien	30
2.1.6 Chemikalien	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 DNA-Extraktion	31
2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe	31
2.2.1.2 DNA-Extraktion aus tiefgefrorenem Tumorgewebe	32
2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Blut	32

2.2.1.4	Extraktion von zellfreier DNA aus Blutplasma	32
2.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmungen	33
2.2.2.1	Das Nanodrop-Spektrophotometer	33
2.2.2.2	Das Qubit-Fluorometer	33
2.2.2.3	Quantitative Real-Time-PCR	33
2.2.3	<i>Ion PGM™</i> und <i>Ion Proton™</i> Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	35
2.2.3.1	Erstellung von benutzerdefinierten Gliom-assoziierten Gen-Panels mit dem <i>AmpliSeq™ Designer Tool</i>	35
2.2.3.2	Erstellung von Amplikon-basierten NGS-Bibliotheken	35
2.2.3.3	Klonale Amplifikation der NGS-Bibliotheken an <i>Ion Sphere™</i> Partikeln (ISP).....	39
2.2.3.4	Aufreinigung der Fragment-positiven ISPs und Qualitätskontrolle.....	39
2.2.3.5	Hochdurchsatz-Sequenzierung	40
2.2.3.6	Analyse der NGS-Daten zur Detektion von Sequenzvarianten und Kopienzahlveränderungen.....	41
2.2.3.7	Unüberwachte Clusteranalyse.....	43
2.2.4	Methoden zur Validierung von Tumor-assoziierten Veränderungen	43
2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese.....	43
2.2.4.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	45
2.2.4.3	Sanger-Sequenzierung.....	45
2.2.4.4	Detektion von Genamplifikationen mittels SYBR® Green qRT-PCR.....	46
2.2.4.5	Bestimmung von Gendeletionen mittels <i>TaqMan™</i> qRT-PCR.....	47
2.2.4.6	DNA-Pyrosequenzierung zur Validierung von Punktmutationen.....	47
2.2.4.7	Immunhistochemie zur Detektion von <i>IDH1</i> -R132H-Mutation, nukleärem ATRX-Verlust und EGFRvIII-Mutation.....	49
2.2.4.8	Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten	49
2.2.4.9	DNA-Methylierungsanalysen	53
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Zusammenstellung der Gliom-Gen-Panel 1 und 2	55
3.2	Etablierung der Gliom-Gen-Panel-Sequenzierung für die diagnostische Routineanwendung.....	58
3.2.1	Konzentrations- und Qualitätsbestimmungen der untersuchten genomischen DNA und der daraus generierten NGS-Bibliotheken.....	59
3.2.1.1	Quantifizierung von degradierter DNA mittels qRT-PCR	59
3.2.1.2	Qualitätsanalyse der NGS-Bibliotheken	60
3.2.2	Optimierung der Gen-Panel-Sequenzierung	61
3.2.2.1	Amplikonabdeckung und Qualität der Gen-Panel-Sequenzierung.....	61
3.2.2.2	<i>Optimierung der Abdeckung der GC-reichen TERT-Promotorsequenz</i>	63
3.2.2.3	Detektion und Eliminierung von C/T-Artefakten in FFPE-DNA	65
3.2.3	Detektion von somatischen Varianten.....	66
3.2.3.1	Detektion von Polymorphismen und somatischen Mutationen.....	66
3.2.3.2	Bestimmung des Schwellenwertes für eine homozygote <i>CDKN2A</i> -Deletion.....	69
3.2.3.3	Sequenzierung von DNA aus stereotaktischen Biopsieproben.....	71
3.2.3.4	Sequenzierung von zirkulierender Tumor-DNA.....	72
3.2.4	Validierung von Mutationen und Kopienzahlveränderungen.....	74
3.2.4.1	ATRX-Mutationen und Verlust der nukleären ATRX-Expression	77

3.2.5	Bestimmung der Mutationsprofile in 121 Gliomen und molekulare Klassifikation mittels unüberwachter Clusteranalyse.....	78
3.2.6	Anwendung der NGS-Daten für die histologische und molekulare Klassifikation von Gliomen	82
3.3	Identifizierung von genetischen Veränderungen in Primär- und Rezidivglioblastomen mittels Gen-Panel-Sequenzierung	84
3.3.1	Mutationen in Primär- und Rezidivglioblastomen	84
3.3.2	Genkopiezahlveränderungen in Primär- und Rezidivglioblastomen.....	86
3.3.3	Veränderte Signalwege in Primär- und Rezidivtumoren.....	90
3.3.4	Austausch von Varianten im selben Gen	91
3.3.5	Hypermutationsphänotyp in Rezidiven	93
4	DISKUSSION	97
4.1	Etablierung der Gen-Panel-Sequenzierung	97
4.1.1	Methodische Herausforderungen der Gen-Panel-Sequenzierung.....	98
4.1.2	Validierung der Gen-Panel-Sequenzierung.....	102
4.1.3	Gen-Panel-Sequenzierung in der Routinediagnostik.....	105
4.2	Variantenmuster von rezidivierenden Glioblastomen	106
4.2.1	Entwicklung eines Hypermutationsphänotyps als Folge der Temozolomidbehandlung	107
4.2.2	Molekulare Evolution von Glioblastomen	109
5	ANHANG	115
5.1	Verwendete Parameter für das <i>variant calling (somatic high stringency)</i> .	115
5.2	In Blut-DNA und/oder Tumor-DNA von 14 Gliompatienten identifizierte Sequenzvarianten	117
5.3	Zusammenfassung der 121 untersuchten Gliome der Gliom-Gen-Panel-Etablierung	119
5.4	Variantenprofil der Primär- und Rezidivglioblastompaare	125
	LITERATURVERZEICHNIS	138
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	138
	DANKSAGUNG	154
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	155

Zusammenfassung

Die Klassifikation von Gliomen basiert nach der neuen Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (2016) sowohl auf histologischen Befunden als auch auf der Bestimmung diagnostischer Biomarker, sodass insgesamt eine integrierte, d.h. histologisch und molekular fundierte Diagnosestellung erfolgt. Aufgrund der stetig wachsenden Kenntnisse über genetische Biomarker für verschiedene Gliome muss die neuropathologische Diagnostik diesen Anforderungen nachkommen, damit eine integrierte Diagnosestellung für eine präzisere Differentialdiagnose sowie ein verbessertes Vorhersagen des Therapieansprechens und der Prognose von Gliompatienten gewährleistet werden kann. Für die umfassende molekulare Diagnose von Gliomen wurde in dieser Arbeit die Gen-Panel-Sequenzierung auf den *Ion PGM*TM- und *Ion Proton*TM-Sequenzierplattformen etabliert und validiert. Dafür wurde im Vorfeld ein Gliom-spezifisches Gen-Panel, bestehend aus 20 in Gliomen häufig veränderten Genen und Genbereichen, erstellt. Eine hohe Spezifität sowie Sensitivität der Gen-Panel-Sequenzierung wurde für die Detektion von DNA-Sequenzvarianten und Veränderungen der Kopienzahl ermittelt. Der Arbeitsablauf wurde für die Anwendung der Methode zur Analyse von DNA aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe optimiert. Anhand der Sequenzierungsdaten von 121 untersuchten Gliomen unterschiedlicher Histologien und Gradierungen wurden im Rahmen einer unüberwachten Clusteranalyse der Sequenzierdaten folgende molekulare Tumorguppen ermittelt: (1) Astrozytäre Gliome mit Mutationen in dem Isozitatdehydrogenase-Gen 1 (*IDH1*) und häufigen Mutationen in den Genen *TP53* und *ATRX*, (2) oligodendrogliale Gliome mit *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen und Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q sowie häufigen Mutationen im *CIC*-Gen und im *TERT*-Genpromotor, sowie (3) Glioblastome ohne *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen mit häufigen *TERT*-Promotormutationen und entweder *EGFR*-Amplifikationen sowie homozygoter *CDKN2A*-Deletionen oder Mutationen in *PTEN* und *NF1*. Die in dieser Arbeit erfolgte Etablierung und extensive Validierung der Gen-Panel-Sequenzierung hat gezeigt, dass diese Methode für die integrierte molekulare und histologische Diagnosestellung von Gliomen prinzipiell geeignet und routinemäßig anwendbar ist.

In einem weiteren Projektteil wurde mittels Gen-Panel-Sequenzierung von 50 Genen und Genregionen das Mutationsprofil in 65 Paaren aus primären und rezidierten Glioblastomen bestimmt und die Ergebnisse jeweils zwischen Primär- und Rezidivtumor der einzelnen Patienten miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass Primär- und

Zusammenfassung

Rezidivglioblastome klonale Tumoren sind, die immer mindestens eine gemeinsame genetische Veränderung aufweisen. Veränderungen im Mutationsprofil zwischen Primär- und Rezidivtumor können dabei von Patient zu Patient unterschiedlich sein. Es konnte sowohl eine lineare Evolution von Rezidiven aus dem im Primärtumor dominanten Tumorzellklon als auch eine verzweigte Evolution aus im Primärtumor seltenen und zum Teil frühen Subklonen nachgewiesen werden. Am häufigsten fanden sich in den Rezidivtumoren neu erworbene Mutationen in den Genen *TP53*, *PTEN*, *EGFR* und *NF1*. In einigen Fällen wurden zwischen Primär- und Rezidivtumor unterschiedliche Mutationen im gleichen Gen nachgewiesen. Die Entwicklung eines DNA-Hypermutationsphänotyps durch Mutationen in DNA-Mismatch-Reparatur-Genen nach Therapie mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid fand sich nur in zwei der 65 untersuchten Rezidivtumore.

Insgesamt unterstreichen die eigenen Ergebnisse die Komplexität der genetischen Veränderungen, die mit der Entstehung und Progression von Glioblastomen assoziiert sind. Die molekularen Mechanismen bei der Entwicklung einer Therapieresistenz und Rezidivtumorbildung sind dabei zwischen unterschiedlichen Patienten sehr heterogen. Hinsichtlich des Einsatzes molekular zielgerichteter Therapieansätze in der Glioblastomrezidivtherapie sprechen die erhobenen Befunde dafür, dass das Mutationsspektrum im Primärtumor sich im Regelfall nicht identisch im Rezidivtumor wiederfinden lässt, sodass eine molekulardiagnostische Testung von Rezidivglioblastomen vor gezielter Therapie notwendig und sinnvoll erscheint.

Abstract

The classification of gliomas is based on the new World Health Organization (WHO) classification of central nervous system tumors (2016) which combines histological findings and the analysis of molecular biomarkers into an integrated diagnosis. The increasing knowledge concerning the molecular genetics of gliomas and the identification of novel biomarkers for distinct glioma types requires neuropathological diagnostic laboratories to imply new methods for molecular diagnostics that enable integrated diagnostics as well as an improved prediction of therapy response and prognosis in the individual patient. In this project, gene panel next generation sequencing was established on the *Ion PGM*[™]- und *Ion Proton*[™]-sequencing platforms and validated as a novel technique for advanced molecular diagnostics of gliomas. For this purpose, a glioma-tailored gene panel, including the 20 most commonly mutated genes or gene regions in gliomas, was assembled. Extensive validation experiments revealed that glioma gene panel sequencing allows for the detection of tumor-associated sequence alterations and copy number variations with high specificity and sensitivity. The respective workflow was optimized for the use of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tumor material. Based on glioma gene panel sequencing data of 121 gliomas of various tumor types and WHO grades, unsupervised cluster analysis revealed the following molecular tumor groups: (1) astrocytic gliomas with mutations in *IDH1* and frequent mutations in *TP53* and *ATRX*, (2) oligodendroglial gliomas with mutations in *IDH1* or *IDH2* and codeletion of the chromosome arms 1p and 19q as well as common mutations in *CIC* and the *TERT* promoter, (3) glioblastomas without *IDH1* mutations but mutations in the promoter region of *TERT* as well as *EGFR* amplification and homozygous *CDKN2A* deletion or mutations in *PTEN* and *NF1*. Collectively, the establishment and extensive validation of gene panel sequencing performed in this thesis demonstrated that the method is suitable for molecular diagnostic routine application and may facilitate modern integrated histological and molecular classification of gliomas.

In a second project, 50 genes or gene regions of 65 primary and recurrent glioblastoma pairs were sequenced by gene panel sequencing to assess the differences and similarities of somatic alterations in primary and recurrent glioblastoma tumors. The results showed that primary and recurrent tumors are clonal tumors which invariably shared at least one genetic alteration. Mutation profiles either revealed a linear evolution of recurrent tumors from the predominant clone in the primary tumor or a branched evolution from a minor subclone of the primary tumor. Most of the mutations exclusively

Abstract

detected in recurrent tumors were mutations in *TP53*, *PTEN*, *EGFR* and *NF1*. Some tumor pairs showed a switch between different mutations in the same gene between primary and recurrent tumors of a single patient. Two of 65 recurrent tumors showed a DNA hypermutation phenotype due to mutations in a DNA mismatch-repair gene following treatment with the DNA-alkylating agent temozolomide. The comparison of genetic patterns between primary and recurrent tumors suggest that complex genetic changes are associated with glioblastoma progression. Molecular processes potentially driving therapy resistance and tumor recurrence are heterogeneous from patient to patient. In addition, the own results indicate that the genetic mutations in recurrent glioblastomas may differ from those in the initial tumor, thus emphasizing that molecular testing of recurrent tumor tissue may be essential for optimal prediction of benefit of the patients from targeted therapy approaches in relapsed disease.

1 Einleitung

1.1 Gliome: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie

Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) machen ca. 2-3 % aller Krebserkrankungen aus (Riemenschneider u. Reifenberger 2009). Gliome und Meningeome gehören zu den häufigsten primären Hirntumoren. Die Mehrzahl der Gliome (80 %) sind biologisch und klinisch bösartige Tumoren (Weller et al. 2015). Das bösartigste und zugleich häufigste Gliom (ca. 60 % aller Gliome) ist das Glioblastom. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Glioblastom-Patienten beträgt weniger als 3 % (Ohgaki u. Kleihues 2005).

Gliome entstehen aus neuroglialen Stamm- oder Vorläuferzellen und wurden nach morphologischen Ähnlichkeiten ihrer Tumorzellen zu den normalen glialen Zelltypen in Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome histologisch unterteilt (Louis et al. 2007; Weller et al. 2015). In der aktuellen Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation für Tumoren des ZNS 2016 werden erstmalig nicht nur histologische und immunhistochemische Merkmale, sondern auch bestimmte molekulare Biomarker zur Tumorklassifikation verwendet und das Konzept der integrierten histologischen und molekularen Klassifikation für Gliome eingeführt (Louis et al. 2016). Dies bedeutet, dass die Tumorkategorisierung sowohl auf phänotypischen als auch auf genotypischen Parametern beruht. Diagnostische molekulare Biomarker für Gliome sind hierbei Mutationen im *IDH1*-(isocitrate dehydrogenase 1) bzw. *IDH2*-(isocitrate dehydrogenase 2)-Gen, eine Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q, eine K27M-Mutation im *H3F3A*-(*H3 histone family member 3A*)-Gen und Fusionen zwischen den Genen *C11orf95* und *RELA* (*C11orf95-RELA* Fusionen) (Louis et al. 2016).

Gliome werden nach der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren in die Malignitätsgrade I bis IV eingeteilt, wobei Tumoren des WHO-Grades I am wenigstens maligne sind. Patienten mit einem WHO-Grad-I-Gliom, z.B. einem pilozytischen Astrozytom, können zumeist durch eine chirurgische Resektion des gegenüber dem angrenzenden Gehirngewebe gut begrenzt wachsenden Tumors geheilt werden. Diffuse Gliome (WHO-Grad II) wachsen langsam und werden nach einer operativen Resektion, insbesondere bei jüngeren und klinisch asymptomatischen Patienten unter 40 Jahren, vorerst beobachtet. Bei älteren Patienten sowie Patienten mit fortschreitendem Krankheitsverlauf folgt dagegen in den meisten Fällen eine postoperative Strahlen- und/oder Chemotherapie (Reifenberger et al. 2016). Diffuse Gliome treten nach initialer Therapie im

Regelfall erneut auf und entwickeln sich im Rezidiv häufig zu einem anaplastischen Gliom (WHO-Grad III) oder einem sekundären Glioblastom (WHO-Grad IV). Anaplastische Gliome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV) sind hochmaligne Tumoren, die schnell wachsen und diffus in das gesunde Hirnparenchym infiltrieren. Patienten mit einem anaplastischen Gliom (WHO-Grad III) werden postoperativ mit Radio- und/oder Chemotherapie behandelt. Die Standardtherapie des Glioblastoms umfasst die operative Tumoresektion, gefolgt von einer kombinierten Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid und nachfolgend sechs Zyklen Erhaltungstherapie mit Temozolomid (Stupp et al. 2005). Temozolomid methyliert Nukleinbasen im DNA-Molekül, wodurch u.a. O6- und N7-Methylguanin sowie N3-Methyladenin entstehen (Agarwala u. Kirkwood 2000). O6-Methylguanin wird durch die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) repariert, ohne das Genom zu schädigen. Eine hohe Sensitivität gegen Temozolomid wurde in Tumoren festgestellt, in denen das *MGMT*-Gen epigenetisch durch eine Hypermethylierung im Promotorbereich transkriptionell inaktiviert ist (Hegi et al. 2005; Wick u. Weller 2009). In diesem Fall kommt es durch O6-Methylguanin zu einer Basenfehlpaarung während der DNA-Replikation, die durch DNA-Mismatch-Reparaturenzyme ausgeschnitten wird, wodurch Einzel- und nachfolgend Doppelstrangbrüche in der DNA entstehen und der Apoptose-Signalweg induziert wird. Eine *MGMT*-Promotormethylierung im Tumorgewebe korreliert daher mit einem besseren Ansprechen auf eine Temozolomidbehandlung und einer verlängerten Überlebenszeit von Glioblastompatienten (Hegi et al. 2005; Wick et al. 2014). Die Bestimmung des *MGMT*-Promotorstatus kann bei der Entscheidung über die postoperative Therapie bei Glioblastompatienten über 70 Jahre helfen (Malmström et al. 2012; Wick et al. 2012). Im Falle einer *MGMT*-Promotormethylierung werden die Patienten mit Temozolomid allein oder in Kombination mit Bestrahlung behandelt, während im Falle des Nachweises eines nicht-methylierten *MGMT*-Promotors ausschließlich Strahlentherapie eingesetzt wird (Reifenberger et al. 2016). Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einem Glioblastom hängt neben dem Lebensalter, dem klinischen Zustand des Patienten, dem Ausmaß der Tumoresektion und dem *MGMT*-Status wesentlich davon ab, ob eine *IDH*-Mutation in den Tumorzellen vorliegt (Reifenberger et al. 2016). Das mediane Überleben von Patienten mit einem IDH-Wildtyp-Glioblastom liegt im Mittel zwischen 14 und 17 Monaten, während Patienten mit einem IDH-mutierten Glioblastom im Mittel ungefähr 30 Monate nach Diagnosestellung überleben (Reifenberger et al. 2016). Trotz der zytotoxischen Wirkung der Strahlenbehandlung und systemischer Gabe von Temozolomid rezidivieren Glioblastome nahezu immer und sind dann oftmals Therapie-resistent. Das Auftreten einer Therapie-Resistenz wurde mit einem veränderten genetischen Profil des

Rezidivtumors im Vergleich zum Primärtumor in Zusammenhang gebracht (Johnson et al. 2014).

1.1.1 Die Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation der Gliome

Tumoren des ZNS wurden bis Mai 2016 hinsichtlich ihrer immunhistochemischen und histologischen Merkmale gemäß der WHO-Klassifikation 2007 in verschiedene Entitäten und WHO-Tumorgrade eingeordnet (Tabelle 1) (Louis et al. 2007). Neue molekularpathologische Erkenntnisse haben dazu beigetragen, dass die WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS überarbeitet wurde (Louis et al. 2016). Die aktuelle Version aus dem Jahr 2016 beinhaltet neben immunhistochemischen und histologischen Eigenschaften auch molekulargenetische Marker, welche eine genauere diagnostische Einordnung erlauben und somit die Klassifikation insbesondere auch der Gliome erheblich verbessern (Louis et al. 2016; Reifenberger et al. 2016).

Nach der vormaligen WHO-Klassifikation von 2007, welche zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Arbeiten an dieser Dissertation noch gültig war, wurden die diffusen und anaplastischen Gliome der WHO-Grade II und III rein histologisch in diffuse Astrozytome WHO-Grad II (A II), anaplastische Astrozytome WHO-Grad III (AA III), Oligodendrogliome WHO-Grad II (O II), anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III (AO III), Oligoastrozytome WHO-Grad II (OA II) und anaplastische Oligoastrozytome WHO-Grad III (AOA III) eingeteilt. Zusätzlich gibt es das Glioblastom (WHO-Grad IV) mit seinen histologischen Varianten, d.h. dem Riesenzellglioblastom und dem Gliosarkom (Louis et al. 2007). Rein klinisch lassen sich unter den Glioblastomen primäre (pGB IV) und sekundäre Glioblastome (sekGB IV) unterscheiden. Letztere entstehen aus niedriggradigeren Vorläuferläsionen (WHO-Grade II oder III) und treten daher hauptsächlich bei jungen Erwachsenen vor dem 50. Lebensjahr auf. Primäre Glioblastome entwickeln sich dagegen *de novo* und finden sich hauptsächlich bei Patienten höheren Alters, d.h. jenseits des 50. Lebensjahres (Ohgaki u. Kleihues 2005). Pilozytische Astrozytome WHO-Grad I (piloA I), subependymale Riesenzellastrozytome WHO-Grad I und pleomorphe Xanthoastrozytome WHO-Grad II (PXA II) gehören zu hauptsächlich bei Kindern und Jugendlichen auftretenden astrozytären Gliomen mit zumeist besser begrenztem Tumorwachstum (Louis et al. 2007). Des Weiteren wurden in der WHO-Klassifikation 2007 noch die verschiedenen ependymalen Tumoren (Subependymom WHO-Grad I, myxopapilläres Ependymom WHO-Grad I, Ependymom WHO-Grad II und anaplastisches Ependymom WHO-Grad III) sowie sonstige seltene

Gliome wie das Astroblastom, das chordoide Gliom des 3. Ventrikels und das angiozentrische Gliom aufgelistet (Louis et al. 2007, vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation und Gradierung von Gliomen 2007*

Astrozytäre Tumoren	WHO-Grad
Pilozytisches Astrozytom	I
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Diffuses Astrozytom	II
Anaplastisches Astrozytom	III
Glioblastom	IV
Gliomatosis cerebri	III
Oligodendrogliale Tumoren	
Oligodendrogliom	II
Anaplastisches Oligodendrogliom	III
Oligoastrozytäre Tumoren	
Oligoastrozytome	II
Anaplastische Oligoastrozytome	III
Ependymale Tumoren	
Superependymom	I
Myxopapilläres Ependymom	I
Ependymom	II
Anaplastisches Ependymom	III
Sonstige Gliome	
Astroblastom	-
Chordoides Gliom des 3. Ventrikels	II
Angiozentrisches Gliom	I

* nach Louis et al. (2007), ohne histologische Varianten.

Nach der neuen WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2016 bilden die diffusen Gliome nun eine große Übergruppe bestehend aus den astrozytären Tumoren der WHO-Grade II, III und IV, den oligodendroglialen Tumoren der WHO-Grade II und III sowie der neuen Entität des diffusen Mittellinienglioms mit Histon 3 K27M (H3-K27M)-Mutation (Tabelle 2). Unter den diffusen und anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad II und III) werden jeweils die eigentlichen IDH-mutierten Entitäten von den provisorischen Entitäten ohne IDH-Mutation und den NOS-Kategorien (aus dem Englischen '*not otherwise specified*') unterschieden. Die Bezeichnung NOS impliziert, dass aufgrund einer fehlenden Bestimmung des IDH-Mutationsstatus keine genauere Diagnose zugewiesen werden kann. Glioblastome werden nach der neuen WHO-Klassifikation in Glioblastome,

Einleitung

IDH-Wildtyp, und Glioblastome, IDH-mutiert sowie Glioblastome, NOS unterteilt. Glioblastome, IDH-Wildtyp, entsprechen dabei größtenteils primären Glioblastomen, wohingegen sekundäre Glioblastome überwiegend in die Gruppe der Glioblastome mit IDH-Mutation fallen (Louis et al. 2016). Diffuse Gliome mit einer K27M-Mutation im *H3F3A*-Gen oder im *HIST1H3B/C*-(*H3 histone family member 1B/C*, *H3.1*)-Gen werden als diffuse Mittelliniengliome, H3-K27M-mutiert, WHO-Grad IV, klassifiziert. Diese Tumoren sind überwiegend in Mittellinienstrukturen des ZNS wie Hirnstamm, Thalamus und Rückenmark lokalisiert (Reifenberger et al. 2016). Oligodendrogliome und anaplastische Oligodendrogliome sind in der neuen WHO-Klassifikation durch eine IDH-Mutation und einen kombinierten Verlust der Chromosomenarmen 1p und 19q (1p/19q-Kodeletion) definiert. Diese werden entsprechend als Oligodendrogliom bzw. anaplastisches Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert beschrieben. Eine Klassifikation von diffusen Gliomen als Oligoastrozytom bzw. anaplastisches Oligoastrozytom ist in der WHO-Klassifikation eigentlich nicht mehr vorgesehen, da sich gezeigt hat, dass diese Mischgliome bei entsprechender molekularer Testung entweder einen astrozytären oder einen oligodendroglialen Genotyp aufweisen (Louis et al. 2016). Ist eine molekulare Analyse jedoch nicht möglich, können Gliome mit gemischtem Phänotyp als Oligoastrozytom, NOS, bzw. anaplastisches Oligoastrozytom, NOS, klassifiziert werden, was aber möglichst vermieden werden sollte.

Neben den diffusen Astrozytomen bilden die Astrozytome mit umschriebenen Wachstumsverhalten eine eigene Gruppe, bestehend aus den pilozytischen Astrozytomen, den pleomorphen Xanthoastrozytomen und den subependymalen Riesenzellastrozytomen. Die Gliomatosis cerebri ist nicht mehr als eigenständige Entität gelistet. Unter den ependymalen Tumoren wurde das Ependymom mit *RELA*-Fusion als neue Entität hinzugefügt (Tabelle 2).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation und Gradierung von Gliomen 2016

Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren	WHO-Grad
Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert	II
Diffuses Astrozytom, IDH-Wildtyp	II
Diffuses Astrozytom, NOS	II
Anaplastisches Astrozytom, IDH-mutiert	III
Anaplastisches Astrozytom, IDH-Wildtyp	III
Anaplastisches Astrozytom, NOS	III
Glioblastom, IDH-Wildtyp	IV
Glioblastom, IDH-mutiert	IV
Glioblastom, NOS	IV
Diffuses Mittelliniengliom, H3-K27M-mutiert	IV
Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19-kodeletiert	II
Oligodendrogliom, NOS	II
Anaplastisches Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19-kodeletiert	III
Anaplastisches Oligodendrogliom, NOS	III
Oligoastrozytom, NOS	II
Anaplastisches Oligoastrozytom, NOS	II
Andere astrozytäre Tumoren	
Pilozytisches Astrozytom	I
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom	III
Ependymale Tumoren	
Superependymom	I
Myxopapilläres Ependymom	I
Ependymom	II
Ependymom, <i>RELA</i> Fusion-positiv	II oder III
Anaplastisches Ependymom	III
Sonstige Gliome	
Astroblastom	-
Angiozentrisches Gliom	I
Chordoides Gliom des 3. Ventrikels	II

1.1.2 Molekulare Pathologie von Gliomen

Das Wissen über somatische Veränderungen in den verschiedenen Entitäten von Gliomen hat in den letzten zehn Jahren drastisch zugenommen (Parsons et al. 2008; Yan et al. 2009; Schwartzentruber et al. 2012; Sturm et al. 2012; Brennan et al. 2013; Brat et al. 2015; Suzuki et al. 2015; Ceccarelli et al. 2016). Durch u.a. Genom- oder Exom-weite DNA-Sequenzierungen konnten charakteristische DNA-Sequenzalterationen,

Veränderungen in der Zahl der Genkopien (*copy number variations*, CNVs) und Chromosomen-Umordnungen als Ursachen für die Entwicklung und Progression der unterschiedlichen Entitäten von Gliomen identifiziert werden (Abbildung 1). Nach der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS (Louis et al. 2016) werden diffuse Gliome molekular insbesondere nach ihrem IDH-Mutationsstatus unterschieden (Tabelle 2). Eine IDH-Mutation wird dabei als ein tumor-initiierender Faktor angesehen, der am Anfang der Gliom-Entwicklung steht (Suzuki et al. 2015). Die IDH1-R132H-Mutation kommt in Gliomen am häufigsten (ca. 90 %) vor, die IDH1-Varianten R132C, R132L und R132S werden ebenso wie IDH2 Kodon-172-Mutationen weniger häufig identifiziert (Balss et al. 2008; Hartmann et al. 2009; Yan et al. 2009). Mutante IDH-Proteine haben diverse Auswirkungen auf den Stoffwechsel. Im intakten Zustand katalysiert die Isozitatdehydrogenase die oxidative Dekarboxylierung von Isozitat zu α -Ketoglutarat unter Generierung von NADPH. Mutantes IDH hingegen katalysiert die Umwandlung von α -Ketoglutarat unter NADPH-Verbrauch zu 2-Hydroxyglutarat (Dang et al. 2009). 2-Hydroxyglutarat ist ein Onkometabolit, welcher unter anderem Histon-Demethylasen und 5-Methylcytosin-Hydroxylasen inhibiert, wodurch es zu einer Zunahme der Histon-Methylierung bzw. Hypermethylierung von CpG-Inseln im Genom kommt (Xu et al. 2011). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln wird als ‚Gliom-CpG-Insel-methylierter Phänotyp‘ (G-CIMP) bezeichnet (Noussim et al. 2010). Durch das 2-Hydroxyglutarat wird außerdem der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1 hochreguliert, wodurch die Angiogenese gefördert wird (Zhao et al. 2009).

Für die Tumorgenese und Progression von Gliomen sind jedoch noch weitere chromosomale und genetische Veränderungen nötig. Diese haben Einfluss auf wichtige Signalwege, die eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration spielen, wie z.B. p53-, Retinoblastom-(Rb)-Signalweg und die Rezeptor-Tyrosinkinase-abhängigen (RTK)-Signalwege PI3K/AKT/mTOR bzw. RAS/MAPK (Brennan et al. 2013; Weller et al. 2015; Reifenberger et al. 2016). Andere betroffene Komponenten bzw. Funktionseinheiten in der Zelle sind der Chromatin-Remodulierungskomplex, der Zitrat-Zyklus und die Regulation von Histonmodifizierungen (Suzuki et al. 2015).

1.1.2.1 Diffuse und anaplastische Astrozytome, IDH-mutiert

IDH-mutierte astrozytäre Tumoren sind neben einer Mutation in *IDH1* oder *IDH2* durch Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* (in >80 % der Fälle) und Mutation im transkriptionellen Regulator *ATRX* (*α -thalassemia/mental retardation syndrom X-linked*)-Gen (in ca. 70-80% der Fälle) charakterisiert (Brat et al. 2015; Suzuki et al. 2015;

Ceccarelli et al. 2016) (Abbildung 1). Durch Veränderungen im p53-Signalweg wird die Apoptose sowie der Zellzyklusarrest gehemmt (Olivier et al. 2010). Durch Mutationen in *ATRX* kommt es zu einem Verlust der nukleären *ATRX*-Expression, wodurch das Chromatin remoduliert und die Regulation der Telomerlänge verändert wird (Heaphy et al. 2011; Lovejoy et al. 2012; Schwartzentruber et al. 2012; Jiao et al. 2012). Neben den genannten Mutationen sind in Astrozytomen auch typische chromosomale Veränderungen bekannt. Ein Gewinn von Chromosom 7 (Trisomie 7) oder des langen Arms von Chromosom 7 (7q) ist häufig in WHO-Grad-II- und III-Astrozytomen, während ein Verlust des Chromosomenarms 10q in anaplastischen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen nachgewiesen werden konnte. In den höhergradigen Tumoren ist zudem häufiger ein homozygoter Verlust der Zellzyklusgene *CDKN2A* und *CDKN2B* (*cyclin-dependent kinase inhibitors 2A* und *2B*) auf 9p21 zu finden (Riemenschneider u. Reifenberger 2009; Reifenberger et al. 2016).

1.1.2.2 Oligodendrogliome und anaplastische Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert

Oligodendrogliome sind genetisch charakterisiert durch Mutation in *IDH1* oder *IDH2* und durch die Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q (Riemenschneider et al. 2010; Louis et al. 2016) (Abbildung 1). Der kombinierte Verlust kommt durch eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 1 und 19 zustande, wodurch ein 1p/19q-Derivat (t(1p;19q)) verloren geht und ein Derivat während der Replikation bestehen bleibt (Griffin et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass ein kombinierter 1p/19q-Verlust zu einem besseren Chemotherapie-Ansprechen und somit zu einer längeren Überlebenszeit der Patienten führt, wodurch die 1p/19q-Kodeletion als prädiktiver Marker gilt (Cairncross et al. 1998; van den Bent, Martin J et al. 2013). Zusätzlich sind Oligodendrogliome durch Mutationen im *TERT* (*telomerase reverse transkriptase*)-Genpromotor (ca. 95 %) und im *CIC* (*capicua transcriptional repressor*)-Gen (ca. 75 %) charakterisiert (Bettegowda et al. 2011; Cahill et al. 2015; Heidenreich et al. 2015). *TERT* kodiert für eine katalytische Untereinheit der Telomerase, welche für die Telomerverlängerung der Chromosomen wichtig ist. Mutationen im *TERT*-Promotor erhöhen die Telomerase-Aktivität, was u.a. zur Inhibierung von Apoptose und Seneszenz führt (Bodnar et al. 1998; Mosrati et al. 2015). *CIC* fungiert als Transkriptionsrepressor und ist dem Rezeptortyrosinkinase (RTK)-Signalweg nachgeschaltet (Bettegowda et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *CIC* durch Mutationen mit der Hochregulierung von Genen, die in der Zellproliferation beteiligt sind, assoziiert ist (Gleize et al. 2015). In ca. einem Drittel der Oligodendrogliome wurden auch Mutationen im Gen *FUBP1* (*far upstream element*

binding protein 1) auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 identifiziert (Bettegowda et al. 2011).

1.1.2.3 Glioblastome

Glioblastome tragen eine Vielzahl von chromosomalen und genetischen Veränderungen (Riemenschneider u. Reifenberger 2009) und werden gemäß der neuen WHO-Klassifikation nach ihrem IDH-Status in zwei Hauptgruppen unterteilt (Louis et al. 2016) (Abbildung 1). IDH-mutierte Glioblastome (ca. 10 % der Fälle) tragen Mutationen, die auch in diffusen und anaplastischen Gliomen nachgewiesen wurden, darunter am häufigsten *TP53*- und *ATRX*-Mutationen (Reifenberger et al. 2016). Zusätzlich finden sich weitere chromosomale Aberrationen wie Verluste der Chromosomenarme 9p und 10q. In IDH-Wildtyp-Glioblastomen ist häufig das *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*)-Gen (40 %) amplifiziert, welches eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert, die das Tumorstwachstum über die Zellproliferations- und Zellmigrationssignalwege RAS/MAP und PI3K/AKT stimuliert (Ohgaki u. Kleihues 2005; Riemenschneider et al. 2010). Ungefähr die Hälfte der *EGFR*-amplifizierten Glioblastome exprimieren die *EGFRvIII*-Variante, die durch eine Deletion von Exon 2 bis 7 charakterisiert ist (Weller et al. 2014b). Die *EGFRvIII*-Variante ist konstitutiv aktiv und stellt ein tumorspezifisches Antigen dar, welches als Zielstruktur für eine Peptid-basierte Vakzinierungstherapie fungieren kann (Thorne et al. 2016). Andere Autoren haben die Expression von EGFRvIII auch mit einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit verbundenem oxidativen Stress und DNA-Beschädigung assoziiert (Nitta et al. 2010). Eine weitere Rezeptortyrosinkinase, PDGFRA (*platelet derived growth factor receptor alpha*), ist in einem kleineren Anteil der Glioblastome amplifiziert (Brennan et al. 2009). Mehr als 70 % der IDH-Wildtyp-Glioblastome tragen eine *TERT*-Promotormutation und ca. 25-30 % eine *TP53*-Mutation. Weitere häufig auftretende Alterationen in IDH-Wildtyp-Glioblastomen sind Gewinne von Chromosom 7 (Trisomie 7), Verluste von Chromosom 10 (Monosomie 10), homozygote Deletion von *CDKN2A/B* auf 9p21, Deletion und/oder Mutation des *RB1* (*retinoblastoma 1*)-Gens, Amplifikation von *CDK4* oder *CDK6* (*cyclin-dependent kinases 4 und 6*), *MDM2* oder *MDM4* (*murine double minute 2 und 4*), Mutationen im *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog on chromosome 10*)-Gen und *NF1* (*neurofibromin 1*)-Gen (Brennan et al. 2013; Weller et al. 2015). *RB1* sowie *CDKN2A/B* kodieren für Tumorsuppressorgene, die den Zellzyklus negativ regulieren (Murphree u. Benedict 1984; Gil u. Peters 2006). *CDK4* und *CDK6* hingegen sind wichtige Regulatoren für die Zellzyklus-Progression und fungieren damit als Onkoproteine (Schmidt et al. 1994; Graña u. Reddy 1995). *PTEN* kodiert ein Tumorsuppressorgen, welches den AKT-Signalweg negativ reguliert (Haas-

Kogan et al. 1998; Stambolic et al. 1998). NF1 ist ein negativer Regulator des RAS/MAP-Signalweges (Bollag et al. 1996). In Glioblastomen, IDH-Wildtyp, werden somit eine Vielzahl von biologisch-relevanten Signalwegen, welche Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression haben, durch genetische Mutationen oder chromosomale Imbalancen in den Tumorzellen in ihrer Aktivität verändert. Anhand von mRNA-Expressionsprofil-Daten wurden Glioblastome in vier verschiedene Subtypen unterteilt: proneural, neural, klassisch und mesenchymal (Verhaak, Roel G W et al. 2010). Die neurale Subgruppe ist durch die Expression verschiedener Neuronenmarker gekennzeichnet (*NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* und *SLC12A*). Durch DNA-Methylierungsanalysen wurden zudem sechs verschiedene molekulare Subgruppen von Glioblastomen anhand epigenetischer Muster und Genexpressions-Daten identifiziert (Sturm et al. 2012). Eine Gruppe mit proneuralem Expressionsprofil stellen die IDH-mutierten, G-CIMP-positiven und größtenteils *MGMT*-Promotor-methylierten Glioblastome dar. Zu einer weiteren proneuralen Gruppe gehören die Rezeptorthyrosinkinase I (RTK I) IDH-Wildtyp Glioblastome, bei denen häufig *PDGFRA*-Amplifikationen zu finden sind. Zu der RTK-II-Subgruppe gehören die Glioblastome, IDH-Wildtyp mit klassischem mRNA-Expressionsprofil. Die klassische Subgruppe ist durch Chromosom 7-Gewinne und häufiger *EGFR*-Genamplifikationen gepaart mit dem Verlust von Chromosom 10 und einer homozygoten Deletion von *CDKN2A* charakterisiert. Die mesenchymale Subgruppe kennzeichnet sich durch fokale hemizygote Deletion der Chromosomenregion 17q11.2 aus. Damit verbunden sind geringe Level von *NF1*-mRNA-Expression (Verhaak, Roel G W et al. 2010). Zwei pädiatrische Glioblastom-Subgruppen werden durch die *H3F3A*-Mutationen im Kodon K27 oder im Kodon G34 unterschieden (Sturm et al. 2012). Nach der neuen WHO-Klassifikation stellen die K27-mutierten Glioblastome eine eigene Entität dar (Louis et al. 2016).

1.1.2.4 Diffuse Mittellinienglioblastome, H3-K27M-mutiert

Diffuse Mittellinienglioblastome sind bösartige Gliome, die typischerweise im Hirnstamm, Thalamus oder Rückenmark bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten und histologisch oftmals Merkmale eines Glioblastoms aufweisen (Louis et al. 2016). Sie unterscheiden sich jedoch von IDH-Wildtyp-Glioblastomen in ihrer molekularen Signatur, da eine charakteristische H3-K27M-Mutation vorliegt (Abbildung 1). Normalerweise ist H3-K27 trimethyliert und assoziiert mit der Inaktivierung von Genpromotoren (Bender et al. 2013; Venneti et al. 2013). Der Austausch von Lysin (K) zu Methionin (M) an Position 27 führt zum Verlust dieser Trimethylierung, eine Veränderung, die man sich in der Diagnostik dieser Tumoren durch den immunhistochemischen Nachweis eines Verlustes

der nukleären Expression von H3-K27me3 zunutze macht. Des Weiteren kann man das mutante H3-K27M-Protein immunhistochemisch in den Tumorzellkernen mit Hilfe eines mutationsspezifischen Antikörpers nachweisen (Louis et al. 2016). Mutationen im *HIST1H3B* (*histone cluster 1 H3 family member b*)-Gen sind in diffusen Mittelliniengliomen weniger häufig zu finden. Zusätzlich finden sich in H3-K27M-mutierten diffusen Mittelliniengliomen gehäuft Mutationen in verschiedenen anderen Genen, darunter *TP53*-, *PPMD1*-, *ACVR1*- und *FGFR1*- Mutationen sowie Amplifikationen der Gene *PDGFRA*, *MYC*, *MYCN*, *CDK4*, *CDK6*, *CCND1-3* oder *MET* (Reifenberger et al. 2016).

1.1.2.5 Andere astrozytäre Tumoren

In pilozytischen Astrozytomen (WHO-Grad I) sind Mutationen, Duplikationen und Fusionen des *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*)-Gens häufig, insbesondere in Tumoren des Kleinhirns bei Kindern (Jones, David T W et al. 2013). BRAF fungiert als ein Regulator des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges und Mutationen in diesem Protein verursachen eine deregulierte Aktivierung dieser wachstumsfördernden Signalkaskade. In einem kleineren Teil der pilozytischen Astrozytome fehlen *BRAF*-Alterationen, stattdessen finden sich dann Veränderungen in anderen Komponenten des MAPK-Signalweges, wie Mutationen in den Genen *NF1*, *FGFR1*, *KRAS* und *PTPN11* oder *NTRK2*-Genfusionen (Jones, David T W et al. 2013). Subependymale Riesenzellastrozytome (WHO-Grad I) zeigen typischerweise Mutationen im *TSC1* (*tuberous sclerosis 1* bzw. *hamartin*)-Gen oder im *TSC2* (*tuberous sclerosis 2* bzw. *tuberin*)-Gen (Chan et al. 2004). Pleomorphe Xanthoastrozytome (WHO-Grad II) sind charakterisiert durch die Punktmutation *BRAF*-V600E (ca. 65 % der Fälle) (Schindler et al. 2011). Daneben sind der Verlust von Chromosom 9 und homozygote Deletionen von *CDKN2A* und *B* häufig (Weber et al. 2007; Koelsche et al. 2014).

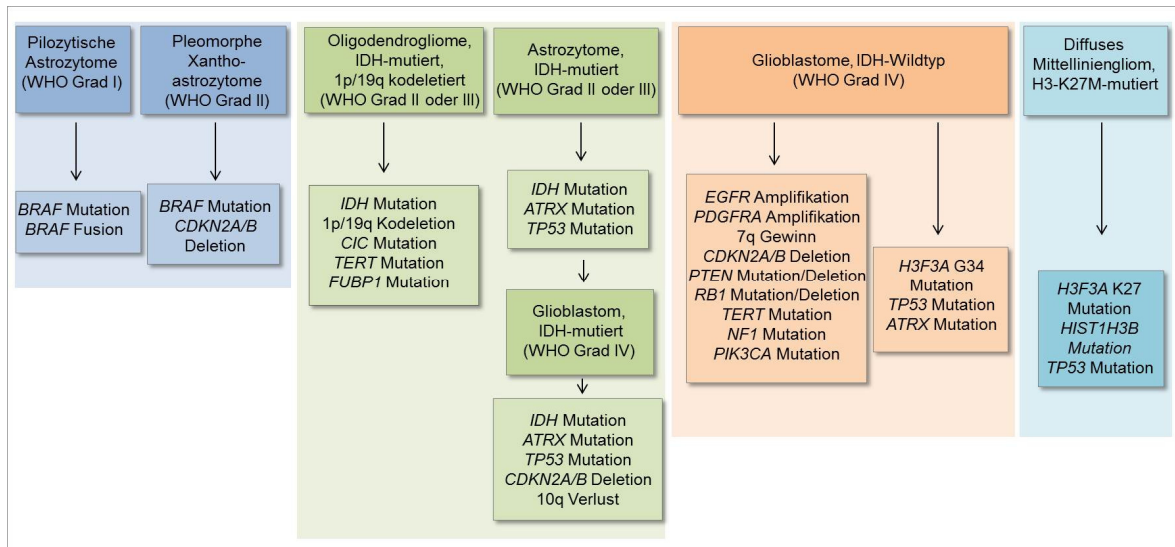


Abbildung 1: Häufige molekulare Veränderungen in IDH-Wildtyp- und IDH-mutierten Gliomen. Niedriggradige, pilozytische Astrozytome und pleomorphe Xanthoastrozytome (blauer Kasten links) zeigen nur wenige molekulare Veränderungen, welche häufig das *BRAF*-Gen betreffen. IDH-mutierte Gliome sind in Astrozytome und Oligodendrogliome unterteilt. Oligodendrogliome tragen Mutationen in den Genen *CIC*, *TERT* und *FUBP1* sowie die charakteristische Kombination aus IDH-Mutation und Kodeletion von 1p und 19q. Astrozytome haben zusätzlich typischerweise *ATRX*- und *TP53*-Mutationen und können sich zu einem IDH-mutierten Glioblastom entwickeln (grüner Kasten). IDH-Wildtyp-Glioblastome WHO-Grad IV haben viele genetische Aberrationen, u.a. in *H3F3A*-G34, *EGFR*, *CDKN2A/B*, *PTEN*, *TERT* und *NF1* (orangener Kasten). Diffuse Mittelliniengliome, H3-K27M-mutiert, weisen neben der charakteristischen H3-K27M-Mutation noch Veränderungen in vielen anderen Genen, darunter z.B. Mutationen in den Genen *TP53*, *PPMD1*, *ACVR1* und *FGFR1* sowie Amplifikationen verschiedener Onkogene, z.B. *PDGFRA*, *MYC*, *MYCN* und anderer auf.

1.1.3 Neuropathologische Diagnostik von Gliomen

Die neuropathologische Diagnostik von Gliomen erfolgt zunächst über die lichtmikroskopische Beurteilung von auf Objektträgern aufgetragenen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten der verfügbaren Tumorgewebeproben. Über immunhistochemische, d.h. Antikörper-vermittelte Färbungen werden zusätzlich bestimmte diagnostische Marker an Schnittpräparaten bestimmt. Hierzu gehören neben Differenzierungsmarkern, wie z.B. GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), und Proliferationsmarkern, wie z.B. Ki67 (MIB-1), inzwischen auch der Antikörper-basierte Nachweis von tumorassoziierten Mutationen, darunter z.B. *IDH1*-R132H, H3-K27M, *BRAF*-V600E und EGFRvIII, sowie von Verlusten der nukleären Expression von ATRX oder H3-K27me3 (Malzkorn u. Reifenberger 2016). In jüngster Zeit ist mit der neuen WHO-Klassifikation (Louis et al. 2016) der Bedarf an zusätzlichen molekularen Analysen zur Diagnostik von Hirntumoren gestiegen (Malzkorn u. Reifenberger 2016). In der Routinediagnostik wird die häufigste IDH1-Mutation, d.h. IDH1-R132H, immunhistochemisch mit Hilfe eines mutationsspezifischen monoklonalen

Antikörpers detektiert (Capper et al. 2009). Alternativ können nicht nur die R132H-Mutation, sondern auch andere, weniger häufig vorkommende IDH1-R132- bzw. IDH2-R172-Mutationen, durch Sanger-Sequenzierung oder mittels Pyrosequenzierung identifiziert werden (Felsberg et al. 2010). Mittels DNA-Sequenzierung können auch gezielt Mutationen im *TERT*-Promotor (hg19 chr5:g.[1295228C>T] und g.[1295250C>T]), im *H3F3A*-Gen (G34 und K27) und im *BRAF*-Gen (V600) nachgewiesen werden. Eine Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q wird häufig über Mikrosatelliten-basierte Untersuchungen, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)-Technik sowie mittels MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) oder Mikroarray-basierte Verfahren bestimmt (Riemenschneider et al. 2010). Der diagnostische Nachweis von *BRAF*- oder *RELA*-Genfusionen in pilozytischen Astrozytomen bzw. Ependymomen erfolgt entweder über FISH-Analysen oder mit Hilfe fusionsspezifischer *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR)-Assays (Malzkorn u. Reifenberger 2016; Masui et al. 2016). Der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors wird ausgehend von Natriumbisulfit-behandelter Tumor-DNA entweder über eine Pyrosequenzierung oder eine methylierungsspezifische PCR (*MSP*) nachgewiesen (Wick et al. 2014). Letztlich werden die histologischen, immunhistochemischen und molekularen Befunde abschließend zu einer integrierten Diagnose gemäß der WHO-Klassifikation von ZNS-Tumoren (Louis et al. 2016) zusammengefasst.

1.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung in der medizinischen Diagnostik

Die Hochdurchsatzsequenzierung oder auch *Next-Generation-Sequencing* (NGS) wird in immer mehr Bereichen der Medizin wie der Humangenetik, Forensik, Infektionsdiagnostik sowie der Krebsdiagnostik und -forschung angewendet (MacLean et al. 2009; Rehm 2013; Yang et al. 2014; Børsting u. Morling 2015; Lapin et al. 2016; Vemula et al. 2016). Je nach Fragestellung können das komplette Genom, das ganze Exom oder ausgewählte Zielgene sequenziert werden. In der onkologischen Diagnostik werden immer häufiger Gen-Panel-Analysen eingesetzt (Ellison et al. 2015; Malapelle et al. 2015; Padmanabhan et al. 2016). Mittels Gen-Panel-Analysen können klinisch relevante Gene für ein bestimmtes Krankheitsbild parallel sequenziert werden. Die Kenntnis von genetischen Tumormarkern in vielen verschiedenen Krebsarten erlaubt eine gezielte Sequenzierung von sogenannten *Hotspot*-Mutationen oder -Regionen. Die traditionellen Routinemethoden wie Sanger-Sequenzierung, Pyrosequenzierung oder DNA-Fragmentanalysen reichen für die gleichzeitige Analyse der Fülle an bekannten Tumormarkern jedoch zumeist nicht mehr aus. Die Menge an verfügbarem Tumormaterial

ist oft limitiert, wodurch der Einsatz eines breitgefächerten Untersuchungsspektrums mit vielen verschiedenen Methoden oftmals nicht möglich ist. Die Gen-Panel-Sequenzierung ermöglicht eine effektive und kostengünstige Diagnostik, bei der aus wenig DNA-Material selektive Genregionen mit klinischer Signifikanz parallel sequenziert werden können (Luthra et al. 2015). Die Varianten können mittels Anzahl der DNA-Sequenzen des Mutations- bzw. Wildtyp-Nukleotids quantitativ bestimmt werden. Der Vorteil dieser Panels im Vergleich zu Genom- oder Exomsequenzierung ist die hohe Abdeckung der Zielregionen, wodurch die analytische Sensitivität und Spezifität hoch ist (Rehm et al. 2013). Außerdem werden insgesamt weniger Sequenzen benötigt, da nur wenige ausgewählte Genombereiche abgedeckt werden. Dadurch können die Kosten niedrig gehalten werden. Vorgefertigte Gen-Panels können seit einigen Jahren für die NGS-Diagnostik von verschiedenen Krebserkrankungen auch kommerziell erworben werden. Die führenden Firmen für Hochdurchsatzsequenzierungen, *Illumina* und *Thermo Fisher Scientific*, bieten aber auch ein auf jeweilige Belange des Untersuchers individuell angepasstes, eigenes Panel-Design an, sodass tumorrelevante Genregionen spezifisch selektiert werden können.

Für die Etablierung der Gen-Panel-Sequenzierung bzw. einer NGS-Plattform in der klinischen Diagnostik hat das *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) Richtlinien zur Verfügung gestellt (Rehm et al. 2013). Ein wichtiger Aspekt ist die Validierung der Hochdurchsatzsequenzierung, zu der verschiedene Parameter gehören (Tabelle 3). Eine valide Variantendetektion wird hierbei über die Sensitivität sowie Spezifität überprüft. Die NGS-Daten müssen reproduzierbar sein und eine Sequenzierungstiefe für Varianten muss bestimmt werden. Bestimmte Genbereiche, wie z.B. GC-reiche DNA-Abschnitte, sind schwieriger zu sequenzieren, sodass eine geringe Abdeckung in diesen Bereichen häufig ist. Die generierten Sequenzen sollten einen bestimmten Qualitätswert erreichen. Dieser Qualitätswert wird über den sogenannten *Phred-Score* bestimmt, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass eine Base nicht korrekt gelesen wurde. Ein *Phred-Score* von 20 gibt an, dass eine von 100 Basen wahrscheinlich falsch gelesen wurde (99 % Genauigkeit).

Die Gen-Panel-Sequenzierung zur molekularen Diagnostik von Tumoren bringt neben den genannten Vorteilen auch Herausforderungen mit sich. Die komplexen NGS-Datensätze müssen bioinformatisch gefiltert und ausgewertet werden. Software-Lösungen für klinische Berichte sind mittlerweile auf dem Markt, jedoch sind die Kosten für Jahreslizenzen hoch. Außerdem muss die Datenmenge sicher und über einen längeren Zeitraum gespeichert werden. Neben somatischen Mutationen werden ebenfalls Keimbahnmutationen detektiert. Es sollte zuvor geklärt werden, ob der Patient über eine Keimbahnmutation in Kenntnis gesetzt werden möchte. Die Etablierung der NGS-

Methode befindet sich im stetigen Prozess, jedoch hat sich die Gen-Panel-Sequenzierung bereits in der molekularen Diagnostik etabliert. Die Kosten werden in Deutschland seit dem 1. Juli 2016 von den Krankenkassen für Gen-Panel unter 25 kb übernommen (Kassenärztliche Bundesvereinigung 2016)

Tabelle 3: Parameter für die Etablierung von Gen-Panel-Sequenzierungen in der molekularen Diagnostik nach Luthra et al. und den Richtlinien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (Rehm et al. 2013; Luthra et al. 2015).

Parameter	Erklärung	Zweck
analytische Sensitivität	Tumorproben mit bekannten Mutationen re-sequenzieren und bestätigen	Fähigkeit der Methode, Varianten zu detektieren
analytische Spezifität	unbekannte Mutationen über etablierte Methoden bestätigen oder falsifizieren	Falsch-positiv-Rate aufdecken
Genauigkeit	Detektion von Mutationen unabhängig von Anwender und Sequenzierungslauf	Reproduktion der Mutationsdetektion
Qualität des Sequenzierungslaufs	prozentuale Abdeckung der Zielregion und durchschnittliche Größe der Amplikons <i>Phred-Score</i> bestimmen	Zielregion sequenziert? Wahrscheinlichkeit, dass eine Base nicht korrekt gelesen wurde
Limitierung der Detektion	Limitierung für die Detektion von molekularen Veränderungen	je nach Variantenregion (z. B. GC-reiche Region) und Detektion von CNVs (mehr Amplikons nötig) unterschiedlich
Sequenzierungstiefe und Grenze der Allelfrequenz	Sequenzierungstiefe identifizieren für eine valide somatische Variantendetektion	je nach Tumorzellgehalt kann die Allelfrequenz von somatischen Mutationen variieren; GC-reiche Regionen werden oft schlecht abgedeckt; Erhöhung der Sequenzierungstiefe nötig

1.3 *Ion PGM™*, *Ion Proton™* und *Ion S5™* Next-Generation-Sequencing (NGS)-Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Ion Torrent™*-Technologie von *Thermo Fisher Scientific* für die Durchführung von NGS-Analysen verwendet. Diese ist seit 2010 auf dem Markt und nutzt als erste kommerzielle Sequenzierungstechnologie einen Halbleiterchip

zur Detektion (Rothberg et al. 2011). Der erste kommerziell erhältliche Sequenzierer mit dieser Technik, der *Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGMTM)*-Sequenzierer, dient speziell zur Sequenzierung von ausgewählten Zielsequenzen im Genom, z.B. im Rahmen einer Gen-Panel-Sequenzierung. Mitte 2012 wurde der *Ion ProtonTM*-Sequenzierer eingeführt, der durch seine größere Kapazität auch für Transkriptom- sowie Exomsequenzierung geeignet ist. Der Sequenzierer *Ion S5TM* wurde 2015 vorgestellt und ist in der Handhabung einfacher zu bedienen als die Vorgänger. Der *Ion S5TM* kann wie der *Ion ProtonTM*-Sequenzierer sowohl für Gen-Panel-Sequenzierungen als auch für Transkriptom- und Exomsequenzierungen genutzt werden.

Für die Sequenzierung mittels *Ion TorrentTM*-Technologie müssen an amplifizierte DNA- bzw. cDNA-Fragmente spezifische Adapter ligiert werden (Rothberg et al. 2011). Die DNA-Fragmente werden in einer Emulsions-PCR (*emPCR*) in Öl/Wasser-Mizellen an Kügelchen, sogenannte *Ion SphereTM*-Partikel (*ISPs*), gekoppelt und dort klonal vervielfältigt. Die *emPCR* erfolgt automatisch über das *OneTouchTM*-Gerät, welches eine *in situ* Thermocycling-PCR durchführt. Anschließend erfolgt eine Selektion von Fragment-positiven *ISPs* mit Hilfe von magnetischen Streptavidin-*Beads* mittels des *OneTouchESTM*-Instrumentes. Millionen der angereicherten *ISPs* werden anschließend in den Sequenzierungschip pipettiert, wo sie in den Vertiefungen (*wells*) des Halbleiterchips immobilisiert werden. In den *wells* wird der Komplementärstrang des DNA-Fragments synthetisiert. Die Sequenzierer fluten den Chip automatisch und sequenziell mit definierten Nukleotiden. Beim Einbau der Nukleotide in den DNA-Strang durch die Polymerase wird ein einzelnes Proton freigesetzt. Da an einem *ISP* Millionen DNA-Fragmente derselben Sequenz gebunden sind, summiert sich die Protonenfreisetzung, und eine lokale pH-Änderung wird durch den Halbleiterchip gemessen. Das Signal korreliert dabei mit der Anzahl der eingebauten Nukleotide. Die Freisetzung der Protonen wird in digitale Informationen übersetzt (Ghose 2012). Über die *Ion TorrentTM-Suite*-Software kann der Sequenzierungslauf überprüft werden. Zusätzlich kann die Software DNA-Varianten wie *single nucleotide variants* (SNVs, Einzel-Nukleotid-Varianten) und kombinierte Insertions/Deletions-Mutationen (Indels) identifizieren. Die erste Generation der Sequenzierchips für den *Ion PGMTM*-Sequenzierer (*Ion 314TM*-Chip) kann etwa 1,3 Millionen Ionensensoren fassen, was eine Sequenzierkapazität von ca. zehn Megabasen (10 MB) ermöglicht. Die zweite Generation (*Ion 316TM*-Chip) misst etwa 6,3 Millionen Ionensensoren (100 MB) und hat eine 10-mal höhere Durchsatzrate als der *Ion 314TM*-Chip. Eine dritte Generation, der *Ion 318TM*-Chip trägt elf Millionen Sensoren (1 GB). Der *Ion ProtonTM*-kompatible *Ion PITM*-Chip hat 165 Millionen *wells*. Die Anzahl der detektierbaren Sequenzen (*reads*) liegt bei etwa 60 bis 80 Millionen, wodurch ein Durchsatz von ca. 10 GB erzeugt werden kann. Für den neuen Sequenzierer *Ion S5TM*

können drei verschiedene Chips verwendet werden. Der *Ion 520™*-Chip kann drei bis fünf Millionen *reads* erzeugen, der *Ion 530™* Chip 15 bis 20 Millionen und der *Ion 540™*-Chip 60-80 Millionen *reads*.

1.4 Ziele der Arbeit

Die molekulare Diagnostik von Gliomen beschränkt sich aktuell auf die individuelle Analyse Gliom-relevanter Mutationen in wenigen ausgewählten Genen (*IDH1*, *IDH2*, *BRAF*, *H3F3A* und *TERT*) sowie den Nachweis von Kodeletionen der Chromosomenarme 1p und 19q (Malzkorn u. Reifenberger 2016). Mit der Implementierung der Gen-Panel-Sequenzierung sollte diese Diagnostik erweitert werden, sodass noch bessere diagnostische, prognostische und prädiktive Aussagen zu jedem einzelnen Patienten getroffen werden können. Die Gen-Panel-Sequenzierung detektiert gleichzeitig verschiedene genetische Veränderungen mit einer Methode und kann so die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS (Louis et al. 2016), die sowohl die Histologie der Gliome als auch molekulare Veränderungen in Markergenen berücksichtigt, mit der Detektion multipler, diagnostisch relevanter Genveränderungen in Gliom-assoziierten Genen verbinden.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Etablierung der NGS-Panelsequenzierung für Gliome mittels der Ion-Technologie unter Verwendung der am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) verfügbaren *Ion-Torrent-PGM™*- und *Ion-Proton™*-Sequenzierplattformen, die Validierung der NGS-Panelsequenzierung sowie die Implementierung der NGS-Panelsequenzierung in die neuropathologische Routinediagnostik. Zuerst wurden durch intensive Literaturrecherche die Gliom-relevanten Gene und eventuell vorhandene *HotSpot*-Mutationsregionen identifiziert, die dann mittels Gen-Panel-Sequenzierung in Gliomen untersucht werden sollten. Anschließend sollte die Sensitivität und Spezifität der Gen-Panel-Sequenzierung an einer Serie von Gliomen unterschiedlicher Entität und mit teilweise bekannten Mutationen in Gliom-relevanten Genen überprüft werden. Weiterhin sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die Methode und der Arbeitsablauf der Amplikon-basierten Gen-Panel-Sequenzierung für die diagnostische Routineanwendung von malignen Gliomen geeignet ist. Faktoren dafür waren der Zeitaufwand, die Handhabung und die Kosten von der DNA-Extraktion über die Erstellung der NGS-Bibliotheken und die Sequenzierung bis hin zur Auswertung der Daten.

In einem weiteren Projektteil wurde die Gen-Panel-Sequenzierung zur vergleichenden genetischen Analyse von Primär- und Rezidivtumoren bei Patienten mit Glioblastomen,

Einleitung

IDH-Wildtyp, eingesetzt. Hierbei stellten sich die Fragen, ob unterschiedliche Mutationsmuster zwischen Primär- und Rezidivglioblastomen in den jeweiligen Tumorkörpern individueller Patienten zu finden sind und ob dadurch z.B. Subklone des Tumors identifiziert werden können, die zur Tumorentwicklung und Rezidivbildung nach initialer Therapie beitragen. Dabei sollte der Vergleich der Mutationsprofile in Primär- und Rezidivtumoren auch Hinweise auf mögliche genetische Veränderungen liefern, die zu einer Resistenzentwicklung der Tumoren gegenüber dem in der Primärtherapie des Glioblastoms standardmäßig verwendeten alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die verwendeten Laborgeräte für die experimentellen Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Bezeichnung	Firma
PCR-Geräte	<i>T3000 Thermocycler, T3 Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen, Deutschland
DNA-Sequenzierer (BMFZ)	<i>Ion PGM™ Sequencer, Ion Proton™ Sequencer, Ion Torrent</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Ion One Touch</i> (BMFZ)	<i>The Ion OneTouch™ 2 System</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluorometer	<i>Qubit® 2.0 Fluorometer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektrometer	<i>Nanodrop ND-1000 Spektrometer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chip-basierte Kapillarelektrophoresemaschine (BMFZ)	<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Zentrifugen	<i>Centrifuge 5415D</i> <i>Centrifuge 5424</i> <i>Rotina 46R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Hettich, Kirchlengern; Deutschland
Real-Time PCR-Gerät	<i>StepOne Plus™ Real-Time Cycler</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kapillar-Sequenzierer (BMFZ)	<i>Applied Biosystems HITACHI, 3130xl Genetic Analyzer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gelelektrophorese Energieversorgung	<i>Power PAC 300</i>	Biorad, Hercules, USA

Geldokumentationssystem	<i>Quantum Capture ST4</i>	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Vakuuminfiltrationsprozessor	<i>Tissue Tek VIP</i>	Sakura Finetek Europe, Leiden, Niederlande
Vakuumpumpe	<i>Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vakuumarbeitsstation	<i>Pyro-Mark Q24 Workstation</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA-Pyrosequenzierer	<i>Pyro-Mark 24</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Automatisiertes DNA/RNA- Extraktionssystem	<i>Maxwell® Rapid Sample Concentrator (RSC)</i>	Promega, Madison, USA

2.1.2 Kits

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden die in Tabelle 5 zusammengefassten molekularbiologischen Kits verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Kits.

Kit	Firma	Artikel- nummer
<i>High Sensitivity (HS) DNA Assay Kit</i> BMFZ	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Q33120
<i>Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3</i> BMFZ	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4488315
<i>Qubit® dsDNA BR Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Q32853
<i>Qubit® dsDNA HS Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Q32854
<i>Magnetblock DynMag™96 Slide</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	12331D
<i>Agencourt AMPure XP</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A63881
<i>Ion PGM™ Template OT2 200 Kit</i> BMFZ	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4480974
<i>Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit</i> BMFZ	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A26433
<i>Taq DNA Polymerase Recombinant</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10342-020
<i>Hot Star Taq® DNA Polymerase</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	203205
<i>QIAmp DNA FFPE Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	56404
<i>GeneRead DNA FFPE Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	180134
<i>NulceoSpin® Plasma XS Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740900.50
<i>JETQUICK Tissue DNA Spin Kit 250</i>	GENOMED, Löhne, Deutschland	440250

<i>PureLink Genomic DNA Mini Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	K-1820-1
<i>BigDye 3.1 Sequenzierungs-Mix BMFZ</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4337455
<i>PyroMark® Gold Q24 Reagents</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	970802
<i>PyroMark® Q24 Cartridge</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland	979202
<i>EZ DNA Methylation-Gold™ Kit</i>	ZYMO RESEARCH, Irvine, USA	ZRC184620
<i>TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4401631 4403328
<i>Taq Man® Life Tech RNase P Detection Reagents (FAM™)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4316831
<i>PTEN TaqMan® Copy Number Assay, Hs05152772_cn</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	PN4400291
<i>CDKN2A TaqMan® Copy Number Assay, Hs02738179_cn</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	PN4400291
<i>Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 17-32 33-48</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4471250 4474009 4474518
<i>Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4480441
<i>My-Budget Universal Agarose</i>	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland	10-35-1020
<i>Maxwell® RSC Large Volume ccfDNA Plasma</i>	Promega, Madison, USA	AS1480

2.1.3 Verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme

Für die Auswertung von NGS-Daten und anderen experimentellen Ergebnissen sowie statistische Analysen wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Computer-Softwares sowie methodenspezifische Auswerteprogramme eingesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme.

Programm	Firma
ANNOVAR	Open source: http://www.openbioinformatics.org/annovar
NextGENe® v.2.3.4	Softgenetics, State College, USA
Torrent Suite™ software 4.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Torrent Variant Caller Plugin v4.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Torrent Variant Caller Plugin v4.4</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CopyCaller™ software version 2.0	Applied Biosystems, Foster City, USA
"R" (Version 3.2.2)	Open source: https://cran.r-project.org/bin/windows/

"RStudio" (Version 0.99.484)	<i>Open source:</i> https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/
R Paket "NMF" (Version 0.20.6)	<i>Open source:</i> https://cran.r-project.org/web/packages/NMF/index.html
R Paket "stats" (Version 3.2.2)	<i>Open source:</i> https://cran.r-project.org/bin/windows/
Integrative Genomics Viewer (IGV 2.3)	Broad Institute, Cambridge, USA
2100 Expert Software B.02.08.SI648	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GraphPad Prism Version 5.00	GraphPad Software incorporated, La Jolla, USA
Finch TV Version 1.4.0	Geospiza incorporated, Waltham, USA
StepOne Plus™ Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nanodrop-1000 3.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quantum Capture ST4	Vilber, Eberhardzell, Deutschland

2.1.4 Tumorgewebeproben von Patienten mit Gliomen

2.1.4.1 Tumorgewebeproben für die Etablierung der NGS-Plattform

Für die im Rahmen der vorliegenden Dissertation zur Etablierung der NGS-Technologie durchgeführten molekularen Untersuchungen an Tumorgewebeproben aus der ZNS-Tumorgewebekbank (ZNS-TuBa) am Institut für Neuropathologie wurde ein projektspezifisches Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studiennummer 4012). Für die Etablierung und Validierung der NGS-basierten Gen-Panel-Sequenzierung von Gliomen wurden insgesamt Tumoren von 121 Gliompatienten untersucht, die an der Klinik für Neurochirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf operiert und deren Tumorgewebeproben am Institut für Neuropathologie neuropathologisch klassifiziert wurden (Tabelle 7). Alle Tumoren wurden ursprünglich nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2007 klassifiziert (Louis et al. 2007). Die Tumorserie umfasste demnach neun diffuse Astrozytome WHO-Grad II, 13 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III, 52 Glioblastome WHO-Grad IV, neun Oligoastrozytome WHO-Grad II, elf anaplastische Oligoastrozytome WHO-Grad III, neun Oligodendrogliome WHO-Grad II, acht anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III, vier pleomorphe Xanthoastrozytome WHO-Grad II und ein pleomorphes Xanthoastrozytom mit anaplastischen Merkmalen (PXA w.a.f.), sowie fünf pilozytische Astrozytome WHO-Grad I. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei 45

Jahren. Der jüngste Patient war zwei Jahre alt, der älteste Patient 79 Jahre. Die Tumoren stammten von 69 männlichen und 52 weiblichen Patienten.

Tabelle 7: Übersicht über die für die Etablierung und Validierung der NGS-Plattform verwendeten Tumorproben mit Angaben zu Diagnose sowie Alter und Geschlecht der Patienten.

Nr.	Fall-Nummer	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose nach WHO 2007
1	O 62	40	W	O II
2	O 70	42	M	O II
3	O 71	51	M	O II
4	O 75	44	M	O II
5	O 81	52	W	O II
6	O 90	36	M	O II
7	O 84	46	W	O II
8	O 77	52	W	O II
9	O 65	37	W	O II
10	AO 75	58	W	AO III
11	AO 86	29	M	AO III
12	AO 97	76	W	AO III
13	AO 98	55	M	AO III
14	AO 84	45	W	AO III
15	AO 109	32	W	AO III
16	AO 83	64	W	AO III
17	AO 147	44	M	AO III
18	AOA 197	33	M	AOA III
19	OA 87	35	W	OA III
20	OA 97	37	W	OA II
21	OA 114	40	W	OA II
22	OA 117	26	M	OA II
23	OA 143	58	M	OA II
24	OA 176	39	W	OA II

25	OA 156	42	W	OA II
26	OA 150	32	M	OA II
27	OA 181	23	W	OA II
28	AOA 166	36	W	AOA III
29	AOA 25	64	M	AOA III
30	AOA 196	61	W	AOA III
31	AOA 32	49	M	AOA III
32	AOA 170	43	M	AOA III
33	AOA 111	47	M	AOA III
34	AOA 198	38	W	AOA III
35	AOA 80	47	M	AOA III
36	AOA 62	31	M	AOA III
37	AOA 124	49	M	AOA III
38	A 213	38	M	A II
39	A 214	32	M	A II
40	A 248	30	W	A II
41	A 345	59	M	A II
42	A 312	44	M	A II
43	A 329	23	W	A II
44	A 406	29	W	A II
45	A 355	23	M	A II
46	A 422	31	M	A II
47	AA 205	42	M	AA III
48	AA 200	79	W	AA III
49	AA 229	43	M	AA III
50	AA 284	42	W	AA III
51	AA 375	43	M	AA III
52	AA 282	23	W	AA III
53	AA 472	24	M	AA III
54	AA 454	53	M	AA III

55	AA 512	29	W	AA III
56	AA 445	50	M	AA III
57	AA 430	72	M	AA III
58	AA 466	45	M	AA III
59	AA 568	48	W	AA III
60	GB 654	36	M	GB IV
61	GB 1111	35	W	GB IV
62	GB 1041	38	W	GB IV
63	GB 1047	46	W	GB IV
64	GB 2119	36	M	GB IV
65	GB 2183	50	M	GB IV
66	GB 2415	45	M	GB IV
67	GB 2189	51	M	GB IV
68	GB 2657	52	M	GB IV
69	GB 2546	48	W	GB IV
70	GB 1763	45	M	GB IV
71	GB 564	66	W	GB IV
72	GB 1248	59	W	GB IV
73	GB 1545	66	W	GB IV
74	GB 1595	71	M	GB IV
75	GB 1936	76	W	GB IV
76	GB 2109	70	M	GB IV
77	GB 2234	73	M	GB IV
78	GB 2214	39	M	GB IV
79	GB 2507	64	W	GB IV
80	GB 2514	61	M	GB IV
81	GB 1266E	56	M	GB IV
82	GB 2212	71	W	GB IV
83	GB 3023	69	W	GB IV
84	GB 3004	78	M	GB IV

Material und Methoden

85	GB 3015	77	W	GB IV
86	GB 3043	60	M	GB IV
87	GB 2880	5	W	GB IV
88	GB 2343	34	W	GB IV
89	GB 2320	42	W	GB IV
90	GB 1528	69	W	GB IV
91	GB 2249	59	M	GB IV
92	GB 2290	38	M	GB IV
93	GB 2270	47	M	GB IV
94	GB 2417	43	M	GB IV
95	GB 2269	74	M	GB IV
96	GB 2646	49	W	GB IV
97	GB 2539	49	M	GB IV
98	GB 1300	58	M	GB IV
99	GB 2086	62	M	GB IV
100	GB 2538	72	M	GB IV
101	GB 2448	64	M	GB IV
102	GB 2526	50	W	GB IV
103	GB 2334	73	M	GB iV
104	GB 2380	48	M	GB IV
105	GB 2660	54	M	GB IV
106	GB 2530	43	M	GB IV
107	GB 3045	15	W	GB IV
108	GB 1128	68	W	GB IV
109	GB 1185	57	M	GB IV
110	GB 1193	43	M	GB IV
111	GB 2385	15	M	GB IV
112	PXA10E	6	M	PXA II
113	PXA 24E	8	W	PXA II
114	PXA 31E	10	W	PXA II

115	PXA 54E	16	M	PXA II
116	PXA 62E	21	M	PXA w.a.f.
117	PA 160	13	W	PA I
118	PA 193	22	M	PA I
119	PA 135	7	W	PA I
120	PA 179	2	W	PA I
121	PA 125	15	W	PA I

M= Männlich, W= Weiblich, A II: Diffuses Astrozytom WHO Grad II; AA III: Anaplastisches Astrozytom WHO Grade III; AO III: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III; AOA III: Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III; APXA III: Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad III; GB IV: Glioblastom WHO Grade IV; O II: Oligodendrogliom WHO Grad II; OA II: Oligoastrozytom WHO Grad II; PA I: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I; PXA II: Pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II; PXA w.a.f.: PXA mit anaplastischen Merkmalen.

2.1.4.2 Gliomproben für das Rezidivtumor-Projekt

Der Projektteil zu den NGS-basierten Untersuchungen von Primär- und Rezidivglioblastomen ist Teil eines multizentrischen vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)-geförderten Verbundprojektes (SysGlio - Systembasierte Vorhersagen für das biologische und klinische Verhalten von Gliomen), weshalb in diesem Projekt auch Gewebeproben von Patienten aus dem Deutschen Gliomnetzwerk (German Glioma Network, GGN) analysiert wurden. Für dieses Projekt wurde ebenfalls ein projektspezifisches Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät eingeholt (Studennummer 4940). Die Analyse beinhaltete Tumorproben von 65 Glioblastom-Patienten, die nach der ersten Operation entweder eine kombinierte Radio-/Chemotherapie erhalten haben (n=51 Patienten), nur mit einer Radiotherapie behandelt wurden (n=6 Patienten), nur mit einer Chemotherapie behandelt wurden (n=2 Patienten) oder keine adjuvante Behandlung nach der ersten Operation erhalten hatten (n=6 Patienten). Die Tabelle 8 zeigt eine Übersicht mit ausgewählten klinischen Daten der Patienten, von denen Tumorproben des Primär- und Rezidivtumors vergleichend untersucht wurden.

Tabelle 8: Ausgewählte klinische Daten der 65 Glioblastompatienten, von denen Primär-und Rezidivtumor untersucht wurden.

Nr.	PAT-ID	Alter (Jahre)	Geschlecht	Primärtherapie nach der 1. Operation	Zeit zwischen 1. und 2. Operation (Tage)
1	009KXOTD	43	M	ST+TMZ	218
2	1F33A2M5	76	W	ST+TMZ	128
3	20SWDRYU	77	W	ST+TMZ	1008
4	21ISINAU	39	M	ST+TMZ	599
5	22B58SJO	60	W	ST+TMZ	1368
6	38XCWM05	80	M	ST+TMZ	145
7	3M1P7VOJ	60	W	ST+TMZ	329
8	3RO58ZYE	60	M	ST+TMZ	307
9	54XA7PM0	50	W	ST+TMZ	147
10	6927CJ4D	59	M	ST+TMZ	187
11	6W2PGOU5	44	M	ST	382
12	754K7PNH	44	M	ST+TMZ	1057
13	83RPQTKM	59	M	ST+TMZ	735
14	8KJ2WIA8	73	M	ST+TMZ	298
15	9M9CIZU5	74	M	ST+TMZ	34
16	BAGHQFDK	61	M	ST+TMZ	149
17	CCNAYKSJ	38	M	ST+TMZ	309
18	DD25LFLA	48	W	ST+TMZ	260
19	EERU69RH	72	M	ST+TMZ	180
20	FADTJ0TV	46	M	TMZ	174
21	J1HJST5O	45	M	ST+TMZ	210
22	J81VQ8XJ	59	W	ST+TMZ	852
23	LVY2D7W3	44	M	ST+TMZ	423
24	M986HS4Z	59	M	ST+TMZ	245
25	MKY181CY	65	W	ST+TMZ	413
26	O46ZNY3S	64	M	ST+TMZ	309

Material und Methoden

27	PCS7KCRW	57	M	ST+TMZ	159
28	PRWQU4Z3	72	M	ST	379
29	QUNMKW6Q	53	M	ST+TMZ	159
30	R1NLP8V6	59	M	ST+TMZ	634
31	R224RO87	67	W	ST	111
32	R2IO4Z52	37	M	ST+TMZ	1522
33	RMQHM31W	14	M	ST+TMZ	275
34	RUP0Z64J	72	M	ST+TMZ	817
35	S5OYPOUZ	52	M	TMZ	225
36	SBC305BR	47	M	ST+TMZ	315
37	TBO92ADK	16	W	ST+TMZ	365
38	TPO24OWS	42	M	ST+TMZ	131
39	UEPV37X1	50	M	ST+TMZ	205
40	UVT3NUNO	75	W	ST+TMZ	868
41	V4F52K0W	69	M	ST+TMZ	412
42	ZETKND4U	48	W	ST+TMZ	676
43	ZH2Y7MZ2	49	M	ST+TMZ	309
44	ZVUH4POH	33	W	ST+TMZ	271
45	3012L	37	W	keine Therapie	120
46	3146L	54	M	ST+TMZ	210
47	3152C	58	M	ST+TMZ	475
48	3196T	63	M	ST+TMZ	401
49	3387N	59	W	ST+TMZ	160
50	3406P	73	M	ST	248
51	3490E	55	W	ST+TMZ	270
52	4270H	58	M	ST	294
53	4678M	67	W	ST	170
54	4759N	67	M	ST+TMZ	213
55	6239E	60	M	ST+TMZ	1523
56	6317N	58	M	ST+TMZ	308

57	8235N	62	M	keine Therapie	128
58	8236T	50	M	keine Therapie	66
59	8237C	68	M	keine Therapie	95
60	8238F	63	M	keine Therapie	36
61	8244P	72	M	keine Therapie	38
62	3575A	70	M	ST+TMZ	210
63	Bev7 - A9	48	M	ST+TMZ	936
64	Bev9 - A11	49	M	ST+TMZ	420
65	M8ULQODZ	48	M	ST+TMZ	179

ST: Strahlentherapie, TMZ: Temozolomid, M= männlich, W= weiblich, PAT-ID: Pseudonymisierte Patienten-Identifikationsnummer.

2.1.5 Untersuchte Zelllinien

Für die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der *CDKN2A*-Kopienzahl mittels Gen-Panel-NGS wurde DNA aus den Zelllinien U118MG (ATCC, Manassas, USA) und aus primären normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) (Promocell, Heidelberg, Germany) verwendet. U118MG hat eine homozygote *CDKN2A*-Deletion.

2.1.6 Chemikalien

Die im Rahmen des Dissertationsprojektes verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biometra GmbH, Merck Millipore, Carl Roth GmbH, VWR und Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
40 % (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Bromphenolblau (669,96 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) (78,13 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Formamid 80 % (v/v) (45,04 g/mol)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
TRIS (121,14 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Borsäure (61,83 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
8 M Urea (60,06 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED) (116,20 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS) (372,24 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Ethanol absolut (46,06 g/mol)	VWR, Langenfeld, Deutschland Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % (60,05 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (105,99 g/mol)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure 65 % (63,01 g/mol)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat (169,87 g/mol)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol (538,6 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Xylol (106,17 g/mol)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe

Die Konservierung und Einbettung der Tumorgewebeproben erfolgte in der Routinediagnostik am Institut für Neuropathologie. Für die DNA-Extraktion aus Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorgewebeproben wurden ein bis fünf Schnitte à 10 µm von einem ca. 10x10 mm großem Gewebestück mit einem Mikrotom abgeschnitten. Es wurden nur Gewebeproben verwendet, die histologisch mindestens einen Tumorzellgehalt von 80 % aufwiesen. Gewebeproben mit einem Tumorzellgehalt von insgesamt weniger als 80 % wurden von Technischen Assistenten auf Objektträger gezogen und Areale mit mehr als 80 % Tumorzellen anschließend mikrodissiziert.

Die Extraktion der DNA aus FFPE-Proben erfolgte mittels des *QIAmp DNA FFPE Tissue Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) wie im Herstellerprotokoll des Kits beschrieben. Der Xylol-Schritt zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurde, abweichend vom Protokoll, zweimal durchgeführt. Des Weiteren wurde DNA aus FFPE-Proben mit Hilfe des *GeneRead DNA FFPE Kits* (Qiagen) gemäß des Herstellerprotokolls extrahiert. Durch die Formalinfixierung des Tumorgewebes kann es zur Desaminierung von Cytosinbasen der

DNA kommen, wodurch Cytosin in Uracil umgewandelt wird. Das Protokoll beinhaltet eine Behandlung der DNA mit Uracil-N-Glycosylase (UNG), wodurch desaminierte Cytosinreste entfernt werden, sodass Formalin-induzierte, d.h. artifizielle C-nach-T-Transitionen in der nachfolgenden Sequenzierung minimiert werden (Do u. Dobrovic 2012).

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus tiefgefrorenem Tumorgewebe

Tumorgewebeproben wurden innerhalb von 30 Minuten nach der neurochirurgischen Resektion in flüssigem Stickstoff unfixiert schockgefroren und anschließend bei -80 °C tiefgefroren gelagert. Der Tumorzellgehalt der tiefgefrorenen Gewebestücke wurde von Neuropathologen lichtmikroskopisch bestimmt. Es wurden nur Proben mit einem Tumorzellgehalt von mindestens 80 % für die DNA-Extraktion verwendet. Die DNA-Extraktion aus gefrorenem Tumorgewebe erfolgte mit dem *JETQUICK Tissue DNA Spin Kit 250* (GENOMED, Löhne, Deutschland). Die Extraktion erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben mit folgender Ausnahme: Die Zentrifugation nach der Lyse wurde bei Raumtemperatur und nicht bei 4 °C durchgeführt. Die Extraktion von DNA aus den kultivierten Zellen U118MG erfolgte mit der gleichen Methode. Die DNA aus den kultivierten NHDF-Zellen wurde von Dr. Dr. Ana-Maria Florea zur Verfügung gestellt.

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Blut

Die DNA-Extraktion aus EDTA-Blut erfolgte mit Hilfe des *PureLink Genomic DNA Mini Kits* (Thermo Fisher Scientific). Die Extraktion basiert auf der selektiven Bindung von DNA an eine Silikamembran und wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

2.2.1.4 Extraktion von zellfreier DNA aus Blutplasma

Für die molekulare Analyse von im Blutplasma zirkulierender, zellfreier Tumor-DNA von Patienten mit ZNS-Tumoren wurde ebenfalls ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät eingeholt (Studien-Nr. 5256). Die Abnahme von Blut von Patienten mit Gliomen oder ZNS-Metastasen erfolgte in der Klinik für Neurochirurgie unter Verwendung von speziellen Blutplasma-Röhrchen (Cell-Free DNA BCT®, Streck). Diese Blut Röhrchen enthalten einen Formaldehyd-freien Konservierungsstoff, der es erlaubt, kernhaltige Blutzellen zu stabilisieren. Die intrazelluläre DNA wird somit nicht freigesetzt und zellfreie, zirkulierende DNA kann gezielt isoliert werden. Die Präparation des Blutplasmas aus den entnommenen Blutproben wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Version 350547-8). Die Extraktion von zellfreier, zirkulierender DNA aus

Blutplasma erfolgte durch das *NucleoSpin® Plasma XS Kit* nach Firmenprotokoll (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Außerdem wurde das *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen) nach Herstellerangabe zur Extraktion verwendet. Als dritte Extraktionsmethode von zellfreier DNA aus Plasma wurden der *Maxwell® Rapid Sample Concentrator* (Promega, Madison, USA) und das Kit *Maxwell® RSC Large Volume ccfDNA Plasma Kit-Custom* (Promega) verwendet. Die Extraktion wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmungen

2.2.2.1 Das Nanodrop-Spektrophotometer

Eine erste DNA-Quantifizierung wurde mittels eines Nanodrop-Gerätes (Nanodrop ND-1000 Spektrometer, Thermo Fisher Scientific) nach der DNA-Extraktion durchgeführt. Das Nanodrop-Fluorometer kann über spektralphotometrische Messungen einen Wellenlängenbereich von 220 nm bis 750 nm abdecken. Das Extinktionsmaximum der doppelsträngigen DNA liegt bei 260 nm, von organischen Substanzen und chaotropen Salzen bei 230 nm und von Proteinen bei 280 nm. Die Konzentrationsangabe erfolgte in ng/µl.

2.2.2.2 Das Qubit-Fluorometer

Eine sensitivere DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Qubit-Fluorometers (Qubit® 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific). Für die DNA-Messung wurden das *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* und das *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll verwendet. Bei der Methode bindet ein DNA-Doppelstrang (ds)-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff in die kleine Furche der DNA. Das Fluorometer misst die Anzahl der Fluoreszenz-Signale, die direkt proportional zur dsDNA-Konzentration in der Lösung ist. Das Qubit-Fluorometer konvertiert die Signale in DNA-Konzentrationen mit Hilfe von DNA-Standards bekannter Konzentrationen.

2.2.2.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die Konzentration von stark degradiertem DNA (z. B. FFPE-DNA oder zellfreier DNA aus Blutplasma) wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Dabei wird die Menge an amplifizierbarer DNA gemessen. In der qRT-PCR wird die Vervielfältigung der PCR-Produkte in Echtzeit über Fluoreszenz gemessen. Bei der Methode wird eine

fluorogene Sonde eingesetzt, die sich sequenzspezifisch an die Ziel-DNA anlagert und am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff trägt. In räumlicher Nähe unterdrückt das Quencher-Molekül die vom Fluorophor emittierte Fluoreszenz, welche von der Lichtquelle des PCR-Geräts via Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer angeregt wird. Während der PCR wird die DNA-Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität aktiviert und die Sonde wird während der Synthese des Gegenstrangs am 5'-Ende abgebaut. Das Fluorophor und der Quencher entfernen sich voneinander und die Fluoreszenz des Reporters steigt. Nach jeder Elongation findet eine Fluoreszenz-Messung statt, die proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte zunimmt.

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde das *TaqMan® RNase P Detection Reagents Kit* (Thermo Fisher Scientific) sowie alternativ das *TaqMan® Copy Number Reference RNase P Assay* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Mit dem Kit und dem Assay wird das *Ribonuklease P RNA Komponent H1 (H1RNA)-Gen (RPPH1)* auf Chromosom 14 detektiert, welches als endogenes Referenzgen in humanen Proben dient (hg19, chr.14:20811565). Die qRT-PCR wurde mit dem *StepOne Plus™ Cyclor* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Quantifizierung der DNA erfolgte über eine Standardkurve, wobei sieben verschiedene DNA-Verdünnungen als Triplikate verwendet wurden. Die Ausgangskonzentration des Standards lag bei 5 ng/µl, der in 1:2 Schritten verdünnt wurde. In der *StepOne Plus™ Software v2.3* wurden die genannten Analyseparameter und Probenamen eingetragen. Als Fluorophor diente das 6-Carboxyfluorescein (FAM) bzw. das 4,7,2'-Trichloro-7'-Phenyl-6-Carboxyfluorescein (VIC) und als Quencher Tetramethylrhodamine (TAMRA). Als passiver Referenzfarbstoff zur Normalisierung des fluoreszierenden Reportersignals diente ROX. Das qRT-PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	50°C	2 min	
2	95°C	10 min	
3	95°C	15s	Schritt 3 bis 4: 40 Zyklen
4	60°C	1 min	

2.2.3 Ion PGM™ und Ion Proton™ Hochdurchsatz-Sequenzierung

2.2.3.1 Erstellung von benutzerdefinierten Gliom-assoziierten Gen-Panels mit dem AmpliSeq™ Designer Tool

Der *Ion AmpliSeq™ Designer* (<https://ampliseq.com>; Thermo Fisher Scientific) dient zum Primer-Design von benutzerdefinierten Gen-Panels. Die Primer-Pools werden für die Erstellung von NGS-Bibliotheken benötigt. Die parallel-amplifizierten Zielregionen, sogenannte Amplikons, können anschließend mittels Ionen-Halbleitertechnologie sequenziert werden (Rothberg et al. 2011). Je mehr Genregionen abgedeckt werden, desto niedriger wird die Amplikon-Spezifität, da Regionen mit ähnlichen Sequenzen ähnliche Primersequenzen haben. Die *Ion AmpliSeq™ Designer* Software erstellt mehrere Multiplex-Primer-Lösungen, wobei diese je nach Spezifität in ‚*highest specificity*‘, ‚*medium specificity*‘ und ‚*relaxed specificity*‘ eingeteilt werden. Die Relaxation der Parameter kann die Abdeckung der Zielregionen erhöhen, jedoch steigt auch das Risiko für Nebeneffekte (sogenannte ‚*off-targets*‘), wodurch ungewollte DNA-Regionen zusätzlich amplifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit für die Erhöhung der Abdeckung ist der Einsatz mehrerer Primer-Pools, sodass Primerpaare in einer Multiplex-PCR-Reaktion nicht miteinander in Konflikt geraten. Je mehr Primer-Pools, desto mehr DNA und Reagenz wird für die Bibliothekserstellung benötigt. Dies hat Auswirkungen auf die Kosten pro Probe. Vor Erstellung der eigenen Gliom-spezifischen Gen-Panels 1 und 2 wurden über intensive Literaturrecherche Zielgene zusammengetragen und ausgewählt (Kapitel 3.1). Die Primersequenzen für das Gliom-Gen-Panel 1 finden sich in Zacher et al. (2016). Die Primersequenzen für das Gliom-Gen-Panel 2 (IAD75775_173) finden sich auf <https://ampliseq.com>. Die Primersequenzen können auf Anfrage über einen AmpliSeq-Link geteilt werden.

2.2.3.2 Erstellung von Amplikon-basierten NGS-Bibliotheken

Die Erstellung der Amplikon-basierten NGS-Bibliotheken erfolgte mittels des *Ion AmpliSeq™ Library 2.0 Kits* (Thermo Fisher Scientific) und beinhaltete folgende Arbeitsschritte: (1) Multiplex-PCR, (2) partieller Primer-Verdau, (3) Adapter-Ligation, (4) Aufreinigung der NGS-Bibliotheken, (5) Amplifikation und erneute Aufreinigung der NGS-Bibliotheken sowie (6) Quantifizierung und Qualitätsanalyse der amplifizierten NGS-Bibliotheken (Abbildung 2). Alle Arbeitsschritte sind ausführlich im *Ion AmpliSeq™-DNA-RNA-LibPrep*-Protokoll (MAN0006735 Rev.5 und A.0 und B.0) erklärt und werden daher nachfolgend nur kurz beschrieben. Die Erstellung einer NGS-Bibliothek benötigt ca. sechs Stunden Arbeitszeit. Maximal acht NGS-Bibliotheken wurden gleichzeitig erstellt.

2.2.3.2.1 *Multiplex-PCR*

Die Erstellung der NGS-Bibliotheken startete mit der parallelen Amplifikation von genomischen Zielregionen. Dafür wurden die zu sequenzierenden DNA-Proben auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Die DNA-Konzentrationen wurden mittels Qubit (Kryo-DNA bzw. DNA aus Zellkulturen) bzw. qRT-PCR (FFPE-DNA bzw. cfDNA) bestimmt. Die Primer von Gliom-Gen-Panel 1 und 2 waren jeweils in zwei Primerpools aufgeteilt. Für die Multiplex-PCR wurde jeder Primer-Pool separat amplifiziert. Die Multiplex-PCR-Reaktionen wurden in Achter-PCR-Streifen angesetzt. Für DNA aus Kryo- bzw. Blutproben wurden 17 Zyklen, für FFPE-DNA 20 Zyklen und für zellfreie-DNA (cfDNAs) bis zu 28 PCR-Zyklen verwendet.

2.2.3.2.2 *Partieller Primer-Verdau*

Nach der Multiplex-PCR folgte der Primer-Verdau mittels FuPa-Reagenz. FuPa verdaut die Primersequenzen und phosphoryliert die Amplikons für die anschließende Adapter-Ligation.

2.2.3.2.3 *Adapter-Ligation*

Nach dem Primer-Verdau erfolgte die Ligation der Adapter A und P1 sowie der Barcode-Adapter (*Ion Xpress™ Barcode Adapter Kit*, Thermo Fisher Scientific) an die Amplikons. Die P1- und A-Adapter werden für die spätere Amplifikation der Amplikons an den *Ion Sphere™*-Partikel (ISPs) und für die Sequenzierung benötigt (Adapter Sequenzen siehe unten). Der A-Adapter enthält ebenso eine Schlüsselsequenz (TCAG), die am Anfang der Sequenzierung erkannt wird. Um verschiedene Proben später unterscheiden zu können, wurden zusätzlich Barcode-Sequenzen ligiert.

Adapter Sequenz A:

5' CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-Fragment-spezifische-Sequenz-3'

Adapter Sequenz P1:

5' CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-Fragment-spezifische-Sequenz-3'

2.2.3.2.4 *Aufreinigung der NGS-Bibliotheken*

Die Amplikon-Bibliotheken wurden in einem nächsten Schritt mit Magnet-Beads (*Agencourt® AMPure® XP Reagent*) zur Entfernung von Primer- und Adapterresten aufgereinigt. Jeder *Bead* besteht aus Polystyrol umgeben von Magnetit, welches mit Carboxyl-Molekülen beschichtet ist. Unter Polyethylenglykol (PEG) und Salz (20 % PEG, 2,5 M NaCl) wird die DNA an die Carboxylgruppen gebunden (Fisher et al. 2011). Je mehr PEG eingesetzt wird, desto kleinere DNA-Fragmente können binden. Die Immobilisation ist somit abhängig von der Konzentration von PEG und Salz und das Volumenverhältnis von *Beads* zu DNA.

2.2.3.2.5 Amplifikation und Aufreinigung der NGS-Bibliothek

Nach der Aufreinigung wurden die NGS-Bibliotheken mit dem *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* und *Library Amplification Primer Mix* selektiv angereichert. Während der Ligation der P1- und A-Adapter an die Zielsequenzen kann es zu Fehlbindungen kommen, sodass nur der P1- bzw. nur der A-Adapter binden. Beim Amplifikationsschritt werden nur die NGS-Bibliotheken mit P1- und A-Adaptersequenzen vervielfältigt. Für die Aufreinigung der NGS-Bibliothek von PCR-Resten wurde erneut das *Agencourt AMPure® XP Reagent* genutzt.

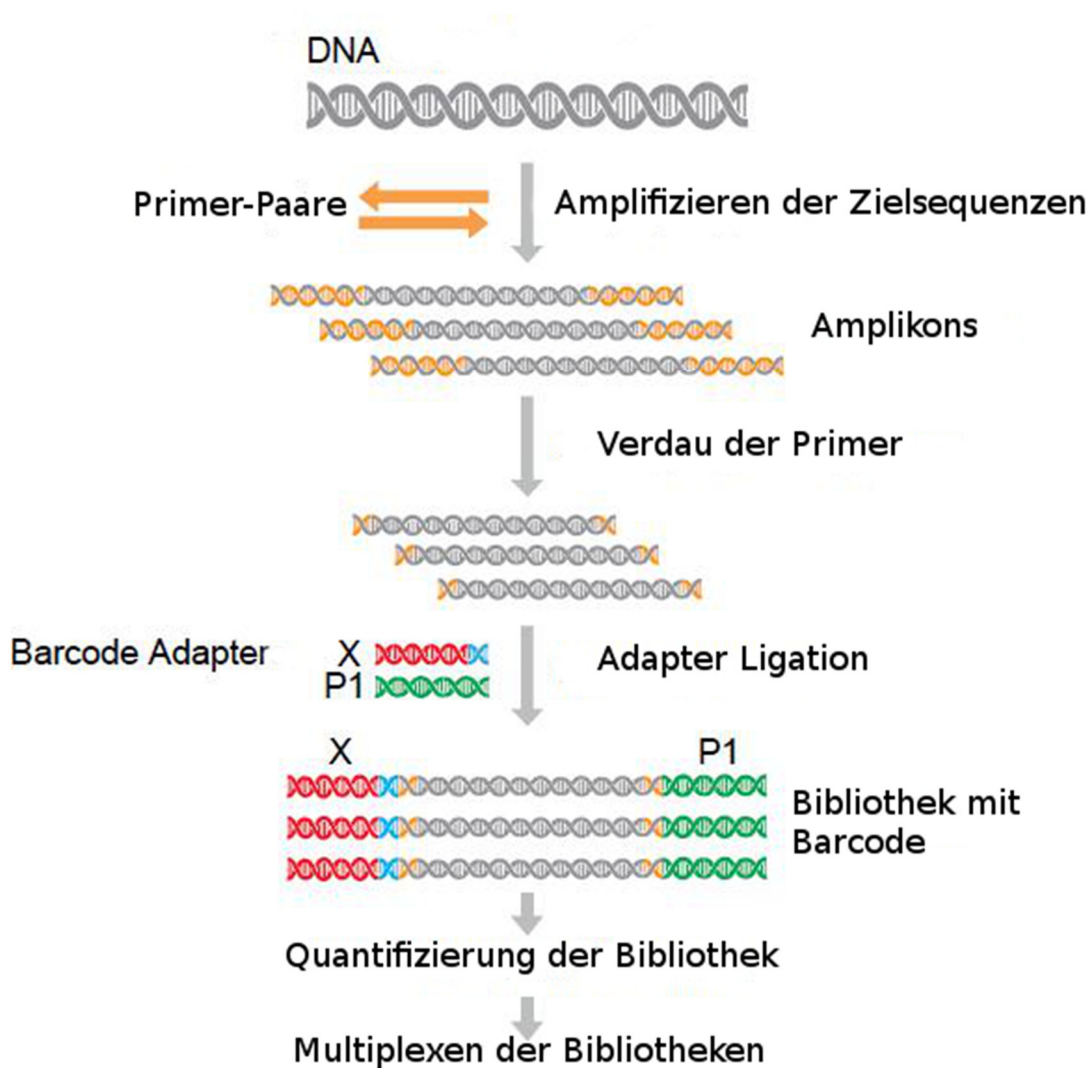


Abbildung 2: Ablauf der Generierung einer NGS-Bibliothek. Aus genomischer DNA werden Zielsequenzen parallel amplifiziert (Multiplex-PCR). Nach dem Primer-Verdau mittels FuPa-Reagenz werden die Adapter-Sequenzen P1 und A und der Barcode ligiert. Die Adaptersequenz X fasst die Sequenzen des A-Adapters (im Bild rot) und die Sequenz des jeweiligen Barcodes (im Bild hellblau) zusammen. Die NGS-Bibliotheken werden aufgereinigt (nicht dargestellt) und mittels Qubit-Messung und Bioanalyzer quantifiziert. Die NGS-Bibliotheken werden auf ca. 200 pM verdünnt (nicht dargestellt) und anschließend für einen NGS-Lauf gepoolt (Abbildung modifiziert aus *Ion AmpliSeq™-DNA-RNA-LibPrep*-Protokoll MAN0006735).

2.2.3.2.6 Quantifizierung und Qualitätsanalyse der amplifizierten NGS-Bibliothek

Die amplifizierten Amplikon-Bibliotheken wurden mittels *Qubit 2.0 Fluorometer* quantifiziert (Qubit-Fluorometer siehe 2.2.2.2). Mit Hilfe des Chip-basierten Kapillarelektrophoresegerätes *Agilent 2100 Bioanalyzer* wurde die Qualität der Bibliotheken bestimmt. Die Analysen wurden mittels *High Sensitivity (HS) DNA Assay* (Agilent Technologies) vom *Genomics* und *Transcriptomics* Labor (GTL) des Biologisch-Medizinisches Forschungszentrums (BMFZ) durchgeführt. Durch den *HS-DNA Chip* können Nukleinsäurefragmente in der Größe von 50 bis 7000 bp analysiert werden. Die Detektion erfolgte durch eingelagerte Fluoreszenzfarbstoffe, die in gelartigen Bildern (Banden) und Elektropherogrammen (*peaks*) dargestellt werden. Mittels der *2100 Expert Software* (Agilent Technologies) und einem mit aufgetragenen DNA-Marker wurde die Größenverteilung der NGS-Bibliotheken in Basenpaaren visualisiert und analysiert. Die Größe der NGS-Bibliotheken sollte im Durchschnitt bei ca. 200 bp liegen. Die Größe der Bibliotheken setzt sich aus der Zielsequenz, P1- und A-Adaptersequenzen, Barcode-Sequenz, einer Schlüsselsequenz und Primer-Resten zusammen. Die NGS-Bibliotheken wurden auf eine Konzentration von 200 pM verdünnt. Für die Verdünnung der NGS-Bibliothek auf 200 pM wurde das Molekulargewicht der Bibliothek berechnet (660 g/mol* Basenpaarlänge der NGS-Bibliothek) und darauf folgend die Molarität der NGS-Bibliothek (Stockkonzentration NGS-Bibliothek/Molekulargewicht der NGS-Bibliothek). Die Molarität der Bibliothek wurde mit dem Faktor ‚200‘ dividiert. Eine Auflistung der Berechnung folgt zur Übersicht:

Stockkonzentration NGS-Bibliothek=	X pg/L
Molekulargewicht von dsDNA=	660 g/mol
Basenpaarlänge der Bibliothek=	Y bp
Molekulargewicht der Bibliothek=	(660 g/mol) * (Y bp)
Molarität der Stock-Bibliothek=	(X pg/L)/(Y bp*660 pg/pmol) =Z pmol/L
Verdünnungsfaktor auf 200 pM=	(Z pmol/L)/200

Anschließend wurden die verdünnten Bibliotheken erneut mittels Qubit in einer Doppelbestimmung quantifiziert. Die Bibliotheken wurden äquimolar gemischt und abschließend auf 6 bzw. 8 pM verdünnt. Für die Sequenzierung auf dem *Ion Torrent Personal Genome Machine™*-Sequenzierer wurden bis zu fünf Bibliotheken gepoolt. Für die Sequenzierung auf dem *Ion Proton™* wurden bis zu 43 NGS-Bibliotheken gepoolt.

2.2.3.3 Klonale Amplifikation der NGS-Bibliotheken an *Ion Sphere*TM-Partikeln (ISP)

Die klonale Amplifikation der DNA-Fragmente an *Ion Sphere*TM-Partikeln (ISP) wurde am *Ion OneTouch*TM 2 System durchgeführt. Über den P1-Adapter werden die DNA-Fragmente an komplementäre Oligonukleotide an den ISP gebunden. Die DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang. Über Denaturierung wird das Ausgangs-DNA-Fragment abgespalten und bindet anschließend erneut an P1-Oligonukleotide und die Synthese startet erneut. Der neue DNA-Strang bleibt durch das Zuckerphosphatrückgrat der DNA am ISP gebunden. Mittels biotinylierten *Reverse-Primers*, welcher komplementär zum A-Adapter ist, und der Polymerase wird der neue Strang aufgebaut. Die klonale Amplifikation wurde mittels einer Emulsions-PCR durchgeführt. Hierbei findet die PCR-Reaktion in Öl/Wasser-Mizellen statt, wobei idealerweise eine Mizelle ein ISP und ein DNA-Fragment beinhaltet. Dies wird dadurch erreicht, dass überproportional viele (Millionen) ISPs eingesetzt werden. Ein ISP trägt nach der klonalen Amplifikation mehrfache Kopien (hundert- bis tausendfach) einer Zielsequenz. Die Emulsions-PCR wurde nach dem Herstellerprotokoll im *Ion OneTouch*TM 2 System durchgeführt und benötigte von der Probenaufbereitung bis zum Ende der Emulsions-PCR ca. sechs Stunden (*Ion PGM*TM 200 *Template OT2 200 Kit* oder *Ion PI*TM *Template OT2 200 Kit v3* und *Ion PI*TM *Hi-Q*TM *OT2 200 Kit*). Zur Durchführung der klonalen Amplifikation wurde das *Ion OneTouch*TM 2 Gerät gemäß Herstellerangaben eingerichtet.

2.2.3.4 Aufreinigung der Fragment-positiven ISPs und Qualitätskontrolle

Nach der Emulsions-PCR erfolgte eine Anreicherung der Fragment-reichen ISPs (positive ISPs) mittels *Streptavidin beads* (*Dynabeads*[®] *MyOne*TM *Streptavidin C1 Beads*). Die Aufreinigung erfolgte automatisch für 30 Minuten im *Ion OneTouch*TM ES und wurde am GTLs des BMFZ durchgeführt (*Ion OneTouch*TM 200 *Template Kit v2 DL*). Bei der Aufreinigung werden positive ISPs über Biotin mit einem DynaMag-Magneten angezogen und selektiert. Über Waschlösungen werden negativ-beladenen ISPs gewaschen. Mittels einer *Melt-off*-Lösung (125 mM NaOH und 0,1% Tween[®]20) wird die DNA denaturiert, sodass diese einzelsträngig vorliegt. Anschließend wird eine Qualitätskontrolle durchgeführt, in der nicht-angereicherte und angereicherte ISPs über das *Qubit 2.0 Fluorometer* gemessen wurden. Die Qualitätsanalysen wurden am GTL des BMFZ durchgeführt. Das Fluorophor Alexa Fluor[®] 488 präsentiert alle ISPs, da das Fluorophor über Oligos an die Oligonukleotide vom ISP koppelt. Das Fluorophor Alexa Fluor[®] 647 bindet über Oligonukleotide an die A-Adapter-Sequenz und markiert alle ISPs

mit DNA-Fragmenten (Abbildung 3). Das Verhältnis der Alexa Fluor® 488-Fluoreszenz zur Alexa Fluor® 647-Fluoreszenz ist ein Maß für die beladenen *ISPs*. Nach Herstellerangaben sollte der Anteil an positiven *ISPs* vor der Aufreinigung bei 10-30% und nach der Aufreinigung bei über 50 % liegen.

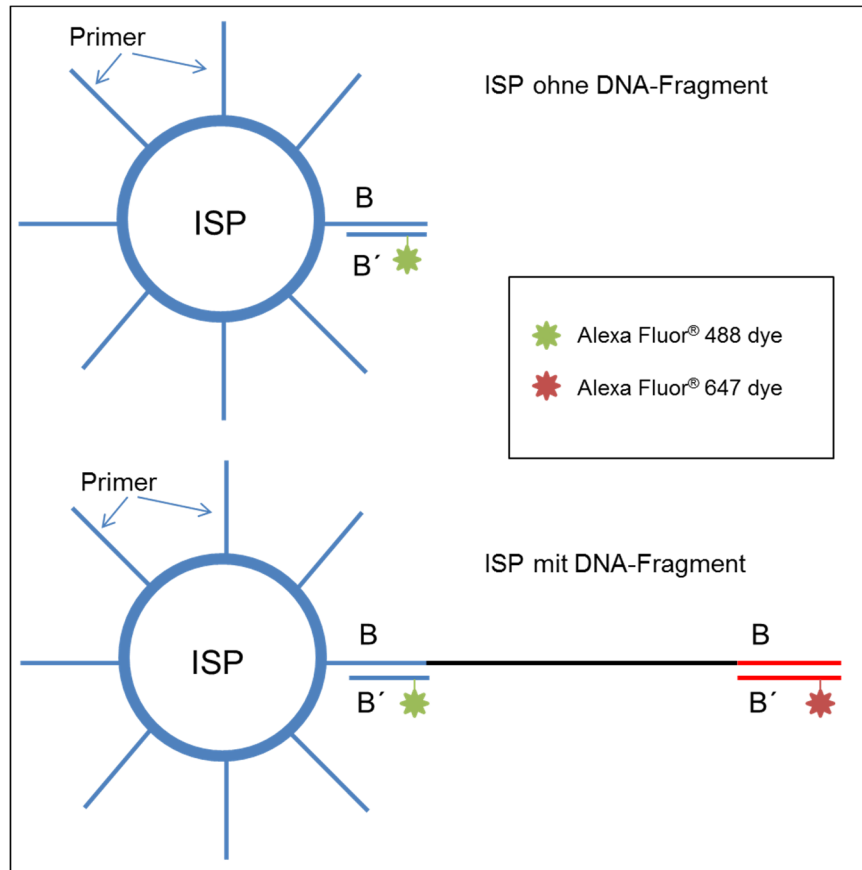


Abbildung 3: Schema eines DNA-Fragment-negativen und eines -positiven ISPs. An einem *ISP* ohne DNA-Fragment bindet nur der Alexa Fluor 488 Farbstoff (*dye*). Am *ISP* mit DNA-Fragment binden beide Farbstoffe. Das Verhältnis der Fragment-negativen und -positiven *ISPs* ist ein Maß für die beladenen *ISPs*.

2.2.3.5 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Hochdurchsatz-Sequenzierungen wurden mittels der *Ion PGM™*- oder *Ion Proton™*-Sequenzierer am GTLs des BMFZ durchgeführt. Bei diesen Sequenzierungsplattformen werden Millionen Mikroreaktionskammern (*wells*) auf einem Halbleiterchip mit *ISPs* besetzt. Während der Sequenzierung wird der Chip sequentiell in einer bestimmten Nukleotid-Reihenfolge geflutet. Diese lautet:

,TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC'. Beim Einbau eines Nukleotids mit Hilfe der DNA-Polymerase werden Protonen freigesetzt (Abbildung 4A). Es kommt zu einer Änderung des pH-Werts, welche von einer Protonen-sensitiven Sensorplatte unter den *wells* detektiert wird und in ein digitales Signal translatiert wird. Die übrigen

Nukleotide im Chip werden gewaschen und der Chip wird mit dem nächsten Nukleotid geflutet (Abbildung 4B). In einem 200 bp-Lauf strömen 200-mal Nukleotide ein. Das detektierte Signal ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide am komplementären DNA-Strang (Abbildung 4C).

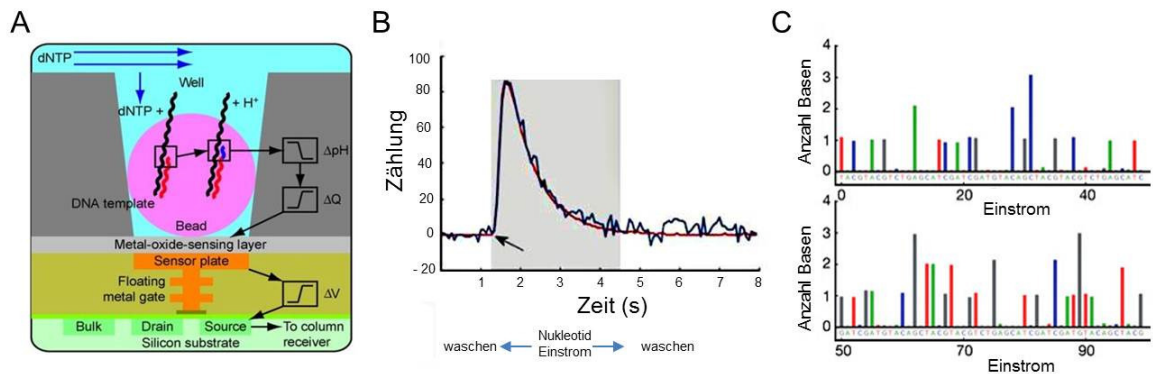


Abbildung 4: Funktionsweise der Ion Torrent™ Halbleiter-Sequenzierung. A) Schematische Darstellung einer einzelnen Mikroreaktionskammer (well) des Ion Torrent Sequenzier-Chips. Im well befindet sich jeweils ein ISPs mit vielen DNA-Templates. Wenn ein Nukleotid in die DNA eingebaut wird, wird ein Proton freigesetzt und der pH-Wert (ΔpH) im well ändert sich. Dies führt zu einer Änderung des Oberflächenpotenzials der Metall-oxid-Leseschicht (metal-oxide-sensing layer) und somit zu einer Änderung der Spannung (ΔV) am Feldeffekt-Transistor. **B)** 1-Nukleotid Inkorporations-Signal aus einem well. Der Pfeil markiert den Start der Nukleotid-Überflutung. Die blaue Linie zeigt die Frequenz an. Die rote Linie zeigt das physikalische Modell. Nach der Nukleotidüberflutung wird der Chip gewaschen; das Signal sinkt. **C)** Die ersten 100 Durchläufe in einem well. Jede Farbe steht für eine andere Base. Die Höhe der Balken repräsentiert die Anzahl der Basen, die eingebaut worden sind (Abbildung modifiziert nach Rothberg et al. 2011).

Für die PGM-Sequenzierung wurden die Sequenzierungschips *Ion 316™* oder *Ion 318™* und das *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2* verwendet. Für die Proton-Sequenzierungen wurden die *Ion PI™ v2* und *v3* Chips und sowie die Sequenzierungsschemie aus dem *Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3* sowie dem *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit* eingesetzt. Die Sequenzierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und dauerte jeweils ca. zwei bis drei Stunden.

2.2.3.6 Analyse der NGS-Daten zur Detektion von Sequenzvarianten und Kopienzahlveränderungen

Die generierten Amplikon-Sequenzen wurden mit dem menschlichen Referenzgenom GRCh37 (hg19) in den Zielregionen des Gliom-Gen-Panels abgeglichen. Dies erfolgte über die *Torrent Suite™ Software 4.4* (TMAP Algorithmus). Varianten wurden über das *Torrent Variant Caller Plugin v4.0* oder *v4.4* mit hohen somatischen Stringenz-Parametern (siehe 5.1 Anhang) selektiert (variant calling). Die Analyse dauert je nach Probenanzahl mehrere Stunden. Die Annotation jeder detektierten Variante erfolgte über die *open-*

source Software ANNOVAR. Informationen aus verschiedenen Datenbanken wurden in einer Excel-Tabelle pro Probe zusammengefasst: *NCBI Reference Sequence Database* (RefSeq), *Exome Sequencing Project* (ESP), *1000 Genomes Project* (1000g), dbSNP, ClinVar, COSMIC, gwasCatalog, PhyloP, SIFT, PolyPhen2, LRT, *Mutation Taster* und FATHMM. Das *variant calling* sowie die Annotation wurden von Frau Dr. Stefanie Stepanow aus dem GTL des BMFZ durchgeführt. Die *Integrative Genomics Viewer* (IGV 2.3)-Software diente zur Visualisierung der Sequenzen, wodurch mögliche Fehler *im variant calling* nachgeprüft wurden. Für die somatischen Mutationsanalysen wurden nur die Varianten berücksichtigt, die in exonischen und *splice-site* Genregionen lagen. Eine Ausnahme war die Genpromotorregion von *TERT*. Die Annovarlisten wurden in einer Access-Datenbank („gliomas_base.mdb“) mittels RStudio mit Hilfe von Dr. Wolfgang Kaisers (Version 0.98.1091) gespeichert.

Veränderungen der Genkopienzahl (CNVs) wurden mit der *NextGENe*® v.2.3.4 Software (SoftGenetics, State College, PA, USA) ermittelt. Sequenzierte Blutproben dienten als Kontrolle. Zur CNV-Analyse berechnet die Software den Wert *reads* pro Kilobase pro Millionen gemappter *reads* (RPKM aus dem engl. *reads per kilobase per million reads*) und die Wahrscheinlichkeit (*Likelihood*) basierend auf Streuungswerten und *read*-Abdeckungsverhältnis. Mittels *Hidden Markov Model* wurden die CNV-Wahrscheinlichkeiten für jedes Amplikon berechnet und geschätzt und ein Verhältniswert (Ratio) ausgegeben (*NextGENe*® *User Manual*: NextGENe-2.4.1-UG001, SoftGenetics). Der Verhältniswert 0,5 steht für eine normale Genkopienanzahl und der Wert 0,33 für eine hemizygoter Deletion (Berechnung siehe unten). Duplikationen haben nach *NextGENe*® einen Wert von 0,6 und wurden in den Analysen als Gewinn definiert. Der Grenzwert von Amplifikationen wurden bei einer Vervierfachung der kompletten Genkopienanzahl gesetzt (Ratio: min. 0,8). Jedoch war der Ratio-Wert der Amplifikationen in den meisten Fällen >1. Die Ratio-Berechnungen der *NextGENe*®-Software sahen wie folgt aus:

Ratio = Anzahl Kopien Tumor/(Anzahl Kopien Tumor+ Anzahl Kopien Kontrollprobe).

Für eine normale Kopienzahl gilt: Ratio = $2/2+2 = 0,5$

Für eine heterozygote Deletion gilt: Ratio = $1/(1+2) = 0,33$

Für eine Duplikation gilt: Ratio = $3/(3+2) = 0,6$

Für eine Amplifikation gilt: Ratio = $8/(8+2) = 0,8$

Für die *CDKN2A*-Verdünnungsreihe zur Detektion von homozygoter *CDKN2A*-Deletion wurden die erwarteten Ratios der Zellmischungsverhältnisse von 90 Teile U118MG-DNA:10 Teile NHDF-DNA und 80 Teile U118MG-DNA:20 Teile NHDF-DNA wie folgt berechnet:

Kopienzahl homozygote *CDKN2A*-Deletion (U118MG-DNA) = 0

Kopienzahl normale *CKDN2A* Kopienzahl (NHDF-DNA) = 2

Kopienzahl Mischungsverhältnis von **90:10** = $0 \times 0,9 + 2 \times 0,1 = 0,2$

Berechneter erwarteter Ratio-Wert für Mischungsverhältnis von 90:10 = $0,2/(0,2+2) = 0,09$

Kopienzahl Mischungsverhältnis von **80:20** = $0 \times 0,8 + 2 \times 0,2 = 0,4$

Berechnete erwarteter Ratio-Wert für Mischungsverhältnis von 80:20 = $0,4/(0,4+2) = 0,167$

Die Mittelwerte der Ratios für zehn *CDKN2A*-Amplikons wurden für jedes Mischungsverhältnis berechnet. Die *Pearson*-Korrelation der erzielten Ratios wurde mittels *GraphPad Prism* (Version 5.0) berechnet.

2.2.3.7 Unüberwachte Clusteranalyse

Eine unüberwachte (nicht-supervidierte) Clusteranalyse (*average linkage hierarchical*) der 121 Gliompanel-NGS-Datensätze basierte auf der Distanzmessung über den Jaccard-Koeffizienten. Die Analyse wurde mit der statistischen Berechnungssprache von „R“ (Version 3.2.2) und „R Studio“ (Version 0.99.484) sowie den „R“-Paketen „NMF“ (Version 0.20.6) und „stats“ (Version 3.2.2) von Dr. Bastian Malzkorn durchgeführt.

2.2.4 Methoden zur Validierung von Tumor-assoziierten Veränderungen

Die Hochdurchsatz-Sequenzierungen und anschließenden Analysen von 121 Gliom-Proben identifizierte viele somatische Mutationen und Kopienzahl-Veränderungen (CNVs) in den 20 ausgewählten Genen bzw. Genregionen des Gliom-Gen-Panels 1. Um die Spezifität und Sensitivität der Methode zu testen, wurden alle detektierten CNVs und ausgewählte Mutationen über standardisierte Routinemethoden getestet. Zur Validierung der NGS-Ergebnisse wurden folgende Methoden verwendet: Standard-PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung, quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR), DNA-Pyrosequenzierung, Immunhistochemische Färbungen, LOH (*Loss of heterozygosity*, Verlust der Heterozygotie)- Analyse mittels Mikrosatellitenmarkern.

2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, um spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dabei wird die DNA bei hohen Temperaturen denaturiert (95°C) und Oligonukleotide (Primer) mit einer bestimmten Sequenz lagern sich nach Abkühlung an die DNA-Stränge (50-60°C) an. Die Primerstränge werden mittels einer *Taq*-Polymerase verlängert (72°C). Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, sodass

Material und Methoden

eine theoretisch exponentielle Vermehrung der jeweiligen DNA-Sequenz erreicht wird. Die PCR wurde mit Hilfe des *HotStarTaq Polymerase Kits* der Firma Qiagen durchgeführt. Die Primer-Sequenzen entsprechen den Primer-Sequenzen des jeweiligen Amplikons (Zacher et al. 2016). Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt:

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
PCR Puffer, 10x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
HotStarTaq™ Polymerase (5 units/µl)	0,125 µl
Milli-Q-Wasser	15,875 µl

Bei DNA-Sequenzen mit GC-reichen Abschnitten (z.B. der *TERT*-Promotorregion) wurde den PCR-Ansätzen Q-Solution (Qiagen) hinzugefügt:

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
PCR Puffer, 10x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
Q Solution, 5x	5 µl
HotStarTaq™ Polymerase (5 units/µl)	0,125 µl
Milli-Q-Wasser	10,875 µl

Die PCR wurde nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	15 min	
2	95°C	15 s	
3	60°C	15s	
4	72°C	15s	Schritt 2 bis 4: 35 bzw. 40 Zyklen für GC-reiche
5	72°C	5 min	DNA-Abschnitte
6	10°C	∞	

Die Bestimmung der Qualität und Länge der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung über ein 3 %-iges Agarosegel (my-Budget Universal Agarose, Bio-Budget Technologies, Deutschland, Krefeld). Zum Anfärben der DNA wurde der *Midori Green* (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland)-Farbstoff verwendet.

2.2.4.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der Sanger-Sequenzierung wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das *Jet Quick DNA Purification Kit* (GENOMED, Loehne, Germany) nach Herstellerprotokoll verwendet. Eine weitere Methode zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mittels paramagnetischer *Beads* von *Agencourt AMPure XP*, wie im Protokoll beschrieben, durchgeführt (Protokoll 000387v001).

2.2.4.3 Sanger-Sequenzierung

Die Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion, bei der je eine der vier Basen als fluoreszierendes Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut wird und es auf Grund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zum Kettenabbruch des neusynthetisierten Strangs kommt (Sanger et al. 1977). Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und von einem Detektor (CCD-Kamera) erkannt werden können. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *BigDye 3.1* Sequenzierungs-Mix (Thermo Fisher Scientific) auf dem Kapillarsequenzierer *3130xl* (Applied Biosystems HITACHI, 3130xl Genetic Analyzer) durch das GTLs des BMFZ. Die visuelle Auswertung der Sequenzen erfolgte über das Programm *Finch TV 1.4.0 Geospiza Incorporation* (Perkin Elmer, Waltham, MA).

2.2.4.4 Detektion von Genamplifikationen mittels SYBR® Green qRT-PCR

Die Amplifikation des *EGFR*-Gens in Glioblastomen wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (StepOne Plus™, Thermo Fisher Scientific) detektiert und validiert. Als Referenzgewebe wurden zwei nicht-neoplastische Hirngewebe (NB 1, NB 2) und als Positivkontrolle eine Probe mit bekannter *EGFR*-Amplifikation mitgeführt (Probe GB1266E). Als Referenzgen für die relative Quantifizierung wurde der WI-3306 STS [*sequence-tagged site*] auf 2q21 verwendet. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt über den DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR-Green (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, Thermo Fisher Scientific). Durch die Bindung von SYBR-Green an die dsDNA entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Durch die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität des emittierenden SYBR-Greens während des Temperaturanstiegs von 60 °C bis 95 °C wird eine Schmelzkurve erstellt. Durch die steigende Temperatur wird die dsDNA schrittweise denaturiert. Dies induziert eine Reduktion des Fluoreszenzsignals. Der Ct (*threshold-cycle*)-Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem der Fluoreszenz-Anstieg exponentiell über den Hintergrund ansteigt. Die Ct-Werte wurden aus der Software StepOne v2.3 entnommen. Für die Auswertung wurden die Δ Ct-Werte sowie die $\Delta\Delta$ Ct-Werte berechnet (Livak u. Schmittgen 2001). Aus dem $\Delta\Delta$ Ct-Wert berechnet sich die n-fache Expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der jeweiligen Probe. Der Mastermix-Ansatz für die qRT-PCR sah wie folgt aus:

<u>Mastermix <i>EGFR</i>-Gen</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
<i>Forward</i> Primer (10 µM) (cactgcctcatctctcaccatc)	0,25 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM) (gactcaccgtagctccagac)	0,25 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	20 ng
ROX Reference Dye	0,5 µl
2 x SYBR-Green-SuperMix-UDG	12,5 µl
Milli-Q-Wasser	6,5 µl
<u>Mastermix Referenzgen WI3306.1.</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
<i>Forward</i> Primer (10 µM) (catgactgagagcccaagatg)	0,75 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM) (cagggtgtgtcatcagaatcag)	0,75 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	20 ng
ROX Reference Dye	0,5 µl
2 x SYBR-Green-SuperMix-UDG	12,5 µl
Milli-Q-Wasser	5,5 µl

2.2.4.5 Bestimmung von Gendeletionen mittels *TaqMan*TM qRT-PCR

Die Bestimmung von *PTEN*-Deletionen bzw. *CDKN2A*-Deletionen erfolgte mittels des *PTEN TaqMan*[®] *Copy Number Assay* (Hs05152772_cn, Thermo Fisher Scientific) bzw. *CDKN2A TaqMan*[®] *Copy Number Assay* (Hs02738179_cn, 9p21.3c, Thermo Fisher Scientific) mittels *StepOne Plus*TM *Real-Time-PCR*-Geräts (Thermo Fisher Scientific). *RNaseP* (4403326, 14q11.2) diente als Referenzgen. Die Bestimmung der Genkopienzahl wurde mit der *CopyCaller*TM *Software Version 2.0* (Applied Biosystems) durchgeführt. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert. Die relativen Genkopien wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt (Livak u. Schmittgen 2001). Humanes nicht-neoplastisches Hirngewebe (Biocat, D1234035-BC, Biocat GmbH, Heidelberg, Deutschland) diente als Kalibratorprobe.

2.2.4.6 DNA-Pyrosequenzierung zur Validierung von Punktmutationen

Die Validierung von somatischen Mutationen im Kodon 132 des *IDH1*-Gens und im Kodon 600 des *BRAF*-Gens wurde mittels DNA-Pyrosequenzierung und dem *PyroMark Q24* Sequenzierer (Qiagen) durchgeführt (Felsberg et al. 2010). Die DNA-Pyrosequenzierung ist eine *sequencing by synthesis* Methode bei der freigesetztes Pyrophosphat (PPi) detektiert wird. Während des Einbaus eines Nukleotids durch die DNA-Polymerase wird PPi freigesetzt, welches über die ATP Sulfurylase in ATP umgewandelt wird. ATP wirkt als Substrat für die Luciferase-vermittelte Konversion von Luciferin zu Oxyluciferin, welches Licht generiert und über eine Kamera detektiert wird. Die Lichtintensität ist proportional zur Anzahl an ATP. Für die Pyrosequenzierung wurde das *PyroMark*[®] *Gold Q24 Reagent Kit* (Qiagen) verwendet. Die in Tabelle 10 aufgelisteten Primer-Sequenzen wurden für die jeweiligen Untersuchungen verwendet. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt durchgeführt:

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
PCR Puffer, 10x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer Biotinyliert (10 µM)	2,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	2,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
HotStarTaq TM Polymerase (5 units/µl)	0,2 µl
Milli-Q-Wasser	16,8 µl

Tabelle 10: Primernamen und Sequenzen für die Pyrosequenzierung zur Detektion von *IDH1*-R132, *IDH2*-R172 und *BRAF*-V600-Mutationen.

Primernamen	Primersequenz
<i>BRAF</i> F1bio	[Btn]ggtgattttggctagctaca
<i>BRAF</i> R1	aaatggatccagacaactg
<i>BRAF</i> Seq1	ggaccactccatcgagatt
<i>IDH1</i> F1bio	[Btn]ggcttgtagtgatggatgggta
<i>IDH1</i> R1	gccaacatgacttacttgatcc
<i>IDH1</i> Seq1	gatccccataagcatg
<i>IDH2</i> R1bio	[Btn]ctccaccctggcctacct
<i>IDH2</i> F1	ctggaccaagcccatcacc
<i>IDH2</i> Seq1	aagcccatcaccatt

Die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen jeweils 100 µM. Für den Ansatz der Pyrosequenzierung wurden die Primer auf 10 µM verdünnt. [Btn], Biotinylierung am 5'-Ende des Primers. Für die DNA-Pyrosequenzierung wurde der Mastermix wie folgt angesetzt:

Mastermix	Volumen/Ansatz
PCR-Produkt	10 µl
<i>Streptavidin Sepharose® High Performance Beads</i> , GE Healthcare	2,5 µl
PyroMark Binding Buffer, Qiagen	2 µl
Milli-Q-Wasser	80 µl

Das PCR-Programm der Pyrosequenzierung wurde wie folgt zusammengefasst ausgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	15 min
2	95°C	30 s
3	58°C	30s
4	70°C	30s
5	72°C	5 min
6	10°C	∞

Schritt 2 bis 4: 45 Zyklen

2.2.4.7 Immunhistochemie zur Detektion von *IDH1*-R132H-Mutation, nukleärem ATRX-Verlust und *EGFRvIII*-Mutation

Zusätzlich zur DNA-Pyrosequenzierung wurden *IDH1*-R132H-Mutationen mittels Immunhistochemie validiert. Für die Detektion dieser *IDH1*-Mutation wurde der mutations-spezifische, monoklonale Antikörper m*IDH1*R132H (clone H09, Dianova, Hamburg, Deutschland) wie in Capper et al. (Capper et al. 2009) beschrieben, eingesetzt. Des Weiteren wurden die *EGFRvIII*-Mutation mittels eines *EGFRvIII*-spezifischen Antikörpers (*rabbit polyclonal lot #6549 antiserum*, Celldex, Needham, MA) wie beschrieben nachgewiesen (Weller et al. 2014a). Die Detektion der nukleären ATRX-Expression erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (HPA001906, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Alle immunhistochemischen Färbungen wurden auf dem automatisierten *Dako Autostainer Plus* durchgeführt. 3,3-Diaminobenzidin wurde als Substrat für die Peroxidase-Reaktion verwendet. Die Immunschnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

2.2.4.8 Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten

Durch PCR-basierte Analysen von Mikrosatelliten lassen sich Verluste von Allelen eines bestimmten Chromosomenabschnitts im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe eines Patienten nachweisen. Mikrosatelliten sind kurze, polymorphe, repetitive DNA-Sequenzen, die sich in jedem Genom unterschiedlich oft hintereinander wiederholen (Jelinek et al. 1980). Durch PCR-Amplifikation eines polymorphen Mikrosatelliten-Lokus lassen sich väterliche und mütterliche Allele anhand unterschiedlicher großer PCR-Produkte unterscheiden. In der Tumor-DNA kann es durch eine chromosomale Deletion zum Verlust eines Allels kommen, ein Phänomen, das man als Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) bezeichnet. Oligodendrogliale Tumoren sind durch den kombinierten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und des langen Arms von Chromosom 19 (19q) charakterisiert, der in der Mikrosatellitenanalyse zu einem LOH auf beiden Chromosomenarmen führt (Reifenberger et al. 1994).

Die Alleltypisierung der Chromosomenarme 1p und 19q wurde mittels PCR-Analyse von elf verschiedenen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Für 1p wurden die Marker *D1S468*, *D1S507*, *D1S200*, *D1S2696*, *D1S211* und *D1S489* analysiert. Für 19q basierten die Untersuchungen auf den Markern *D19S219*, *D19S1182*, *D19S572*, *D19S210* und *D19S596* (Tabelle 11). Die PCR-Produkte der Mikrosatellitenmarker wurden unter verschiedenen PCR-Bedingungen amplifiziert (siehe unten).

Tabelle 11: Primersequenzen für untersuchten Mikrosatellitenmarker auf 1p und 19q.

Primernamen	Primersequenzen	Position
D1S468F D1S468R	aattaaccgtttggctct gcgacacacacttccc	1p36.32
D1S489F D1S489R	agctagaccaagtctcaaca acaaaatgatggggttatgg	1p36.22
D1S507F D1S507R	aggggatcttggcacttgg ctctaggggttctggaaaatgctg	1p36.21
D1S211F D1S211R	agctacatggcaggatcaga ggattccttgctctggaaag	1p34.1
D1S200F D1S200R	gtactgtaactgggtaactgaaac tggcagacctgaacatcata	1p32.3
D1S2696F D1S2696R	aaaaatgagtcagtagaagcct agccagatttacatcccag	1p12
D19S219F D19S219R	gtgagccaagattgtgcc gactatttctgagacagattccca	19q13.32
D19S1182F D19S1182R	ctcgtaactaattctgaaact gtattggagttgcaactgt	19q13.3
D19S596F D19S596R	gaatccgagagggtggg gccagagccactgtgt	19q13.33
D19S572F D19S572R	atttgggtgtgctgacacg gggccacatcctatcccc	19q13.42
D19S210F D19S210R	tcacactcactggctctca gggtgtgcctgtgtgtaaaag	19q13.43

Die Mastermix-Ansätze für Mikrosatelliten *D19S210* und *D19S219* (*Annealing*-Temperatur bei 60°C) wurden mittels *HotStarTaq Polymerase Kits* der Firma Qiagen wie folgt angesetzt.

Mastermix	Volumen/Ansatz
PCR Puffer, 10x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
HotStarTaq™ DNA Polymerase (5 units/µl)	0,1 µl
Milli-Q-Wasser	15,4 µl

Material und Methoden

Der Mastermix-Ansatz für Mikrosatellit *D19S1182* (*Annealing*-Temperatur bei 52°C) wurde wie folgt angesetzt.

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
10x PCR Rxn Buffer, Thermo Fisher Scientific	2,5 µl
dNTP Mix (2 nM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM), Qiagen	0,75 µl
Taq DNA Polymerase (5 units/ µl), Thermo Fisher Scientific	0,1 µl
Q-Solution, Qiagen	5 µl
Milli-Q-Wasser	9,9 µl

Der Mastermix-Ansatz für Mikrosatellit *D19S596* (*Annealing*-Temperatur bei 58°C) wurde wie folgt angesetzt.

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
10x PCR Rxn Buffer, Thermo Fisher Scientific	2,5 µl
dNTP Mix (2 nM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM), Qiagen	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 units/ µl), Thermo Fisher Scientific	0,1 µl
DMSO 100 %	5 µl
Milli-Q-Wasser	9,9 µl

Die Mastermix-Ansätze für Mikrosatelliten *D1S211*, *D1S2696*, *D1S507*, *D1S200*, *D1S489* und *D1S468* (*Annealing*-Temperatur bei 56°C) sowie Mikrosatellit *D19S572* (*Annealing*-Temperatur bei 62°C) wurden wie folgt angesetzt.

Material und Methoden

<u>Mastermix</u>	<u>Volumen/Ansatz</u>
10x PCR Rxn Buffer, Thermo Fisher Scientific	2,5 µl
dNTP Mix (2 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM), Qiagen	0,75 µl
Taq DNA Polymerase (5 units/ µl), Thermo Fisher Scientific	0,1 µl
Milli-Q-Wasser	15,15 µl

Die PCR-Programme für die *HotStarTaq*TM Polymerase (Qiagen) und die Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) laufen wie folgt beschrieben ab. Die *HotStarTaq*TM Polymerase wurde bei 95 °C für 15 Minuten und die Taq DNA Polymerase für fünf Minuten bei 95°C aktiviert.

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
1	95°C	5 bzw. 15 min je nach Taq Polymerase	
2	95°C	20 s	
3	52°, 56°, 60 ° bzw. 62 °C	20s	
4	72°C	20s	Schritt 2 bis 4: 30x bei Kryomaterial 40x bei FFPE Material
5	72°C	5 min	
6	8°C	∞	

Die Mikrosatelliten-PCR-Produkte wurden mit 5 µl Formamid-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) gemischt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die PCR-Produkte wurden auf 12 %-ige Polyacrylamidgele (Zusammensetzung nachfolgend) geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 45 W für 1,2 bis 2,1 Stunden.

Formamid-Ladepuffer:

80 % (v/v) Formamid
0,025 % (w/v) Xylencyanol
0,025 % (w/v) Bromphenolblau

12% (1:19) 8 M Urea Polyacrylamidgel

40 % (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, Merck Bestellnr.1.00640.1000)

10x TBE (1 M Tris-Base, 1 M Borsäure, 0,02 M EDTA)

8 M Urea (Roth Bestellnr. 2317.1)

Die Gellösung wurde zum Start der Polymerisierungsreaktion mit dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS, Sigma-Aldrich Bestellnummer A-9164-100g) und dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich, Bestellnr. T2 250-0) versetzt. Die PCR-Produkte wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Budowle et al. 1991). Abweichend davon wurde 0,2 %-iges Silbernitrat verwendet. Die spezifischen Banden (PCR-Produkte) für eine Tumor-DNA-Probe wurden mit den spezifischen Banden der korrespondierenden Blut-DNA-Probe verglichen. Der Verlust einer Bande in der Tumor-DNA repräsentiert den Verlust eines Allels des entsprechenden Mikrosatellitenlokus.

2.2.4.9 DNA-Methylierungsanalysen

2.2.4.9.1 *Natriumbisulfit-Konvertierung von genomischer DNA*

Hierzu wird die DNA mit Natriumbisulfit behandelt, wodurch unmethyliertes Cytosin in Uracil konvertiert wird. Methyliertes Cytosin bleibt dagegen unverändert. Die Bisulfit-Konvertierung wurde mit Hilfe des *EZ DNA Methylation-GoldTM* Kit (ZYMO RESEARCH, Freiburg) wie im Protokoll des Kits beschrieben durchgeführt.

2.2.4.9.2 *Methylierungsanalyse der ATRX-assoziierten 5'-CpG-Insel*

Die Methylierungsanalysen wurden zur Identifizierung einer Hypermethylierung der im Promotorbereich des *ATRX*-Gens gelegenen 5'-CpG-Insel CpG:_54 (hg38, chrX: 77041004-77041725) durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet, um diese CpG-Insel ausgehend von Bisulfit-konvertierter DNA zu amplifizieren und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung zu sequenzieren (Tabelle 12). Bisulfit-konvertierte, unmethylierte Cytosin-Nukleotide werden zu Uracil und sind in der Primer-Sequenz als kleines ‚t‘ dargestellt. Als Kontrolle für die unmethylierte DNA-Sequenz wurde Blut-DNA von einem männlichen Patienten eingesetzt.

Tabelle 12: Primer-Sequenzen zur Amplifikation von Sequenzen der ATRX-assoziierten CpG-Insel.

Primername	Sequenz
<i>Forward-Primer 1 (Fwd1)</i>	GttAATTtTtTGtTGAGtTCGGtttAAt
<i>Forward-Primer 2 (Fwd2)</i>	GtTTTGAGtTGTGGGGAGGTTt
<i>Forward-Primer 3 (Fwd3)</i>	GtTtTtTGTTTATTtTTGGTGtTGTG
<i>Reverse-Primer 1 (Rev1)</i>	tTTGGTGGGTTAGGtTGTGTG
<i>Reverse-Primer 2 (Rev2)</i>	TAGGTTGtTGGAGATGGGAAGtAtt

Der Mastermix wurde mittels *HotStarTaq® DNA Polymerase Kit* von Qiagen wie folgt zur Amplifikation von Sequenzen der ATRX-assoziierten 5'- CpG-Insel angesetzt.

Mastermix	Volumen/Ansatz
PCR Puffer, 10x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,5 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1,5 µl
genomische DNA (20 ng/µl)	1 µl
HotStarTaq™ DNA Polymerase (5 units/µl)	0,125 µl
Milli-Q-Wasser	10,875 µl
Q-Solution	5 µl

Das PCR-Programm lief wie folgt ab:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	15 min	
2	95°C	30 s	
3	58°C	30s	
4	70°C	30s	Schritt 2 bis 4: 45 Zyklen
5	72°C	5 min	
6	10°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und dann mittels Sanger-Methode sequenziert (siehe Abschnitte 2.2.4.2 und 2.2.4.3).

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenstellung der Gliom-Gen-Panel 1 und 2

Ein erstes benutzerdefiniertes „Gliom-Gen-Panel“ mit 20 Zielgenen bzw. Zielregionen wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit erstellt und bestellt (Gliom-Panel 1, IAD39893_33, Referenzgenom: hg19; Tabelle 13). Die ausgewählten Gene sind an verschiedenen Signalwegen zur Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Zellzyklus beteiligt und häufig in Gliomen mutiert (Schwartzentruber et al. 2012; Brennan et al. 2013; Brat et al. 2015; Suzuki et al. 2015; Ceccarelli et al. 2016). Das Gen-Panel umfasst 660 Zielsequenzen, die Amplikons genannt werden und eine Gesamtsequenz von 66 kB genomischer DNA überspannen. Die durchschnittliche Amplikonlänge beträgt ca. 175 bp. Das Gliom-Gen-Panel 1 beinhaltet Gene und Genregionen, die häufig in Gliomen verändert sind und diagnostische Relevanz haben. Aus diesem Grund wurde dieses Gen-Panel zur Etablierung für die diagnostische Routine von Gliomen verwendet.

Tabelle 13: Gliom-Gen-Panel 1 (IAD39893). Angegeben sind Name und chromosomale Lokalisation der 20 repräsentierten Gene und ob die jeweilige kodierende Sequenz (cds) oder Regionen mit Mutations-*Hotspots* (Region) abgedeckt sind.

Gen	Vollständiger Name	Chromosom	Typ
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog	1p13.2	cds
<i>FUBP1</i>	Far upstream element binding protein 1	1p31.1	cds
<i>CDKN2C</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2C	1p32	cds
<i>H3F3A</i>	H3 histone family member 3A	1q41	Region
<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic	2q33.3	Region
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	3q26.3	cds
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase	5p15.33	Region
<i>PIK3R1</i>	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	5q13	cds
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor	7p12.3-p12.1	cds
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	7q34	Region
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	9p21	cds
<i>CDKN2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B	9p21	cds

Ergebnisse

<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog on chromosome 10	10q23.3	cds
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1	13q14.1-2	cds
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial	15q26.1	Region
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	17p13.1	cds
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1	17q11.2	cds
<i>CIC</i>	Capicua transcriptional repressor	19q13.2	cds
<i>NF2</i>	Neurofibromin 2	22q12.2	cds
<i>ATRX</i>	Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked chromatin remodeler	Xq13	cds

Für die Primersequenzen siehe Zusatztabelle 3 (Zacher et al. 2016).

Ein zweites Gliom-Gen-Panel mit 28 weiteren Genen bzw. Genregionen wurde im Laufe der Doktorarbeit erstellt (Gliom-Panel 2, IAD75775_173, Referenzgenom: hg19; Tabelle 14). Dieses Gen-Panel beinhaltet Gene, die weniger häufig in Glioblastomen verändert sind (*CDK4*, *CDK6*, *MDM2*, *MDM4*, *MET*, *PDGFRA*, *KRAS*, *IRS2*, *PIK3C2B*, *PTPN11*), in diffusen intrinsischen pontinen Gliomen (*ACVR1*, *PPM1D*, *Hist1H3B*, *DAXX*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*) und/oder in niedriggradigen Gliomen des Kindesalters mutiert vorliegen (*FGFR1*, *TSC1*, *TSC2*, *MYB*, *MYBL1* und *NTRK2*) (Knobbe u. Reifenberger 2003; Jones, David T W et al. 2013; Ramkissoon et al. 2013; Wu et al. 2014; Suzuki et al. 2015; Weller et al. 2015; Nikbakht et al. 2016). Die ausgewählten Gene kodieren u.a. für Proteine, die am Zellzyklus und den RTK-abhängigen Signalwegen beteiligt sind (Büschges et al. 1999; Rodríguez-Hernández et al. 2013; Suzuki et al. 2015). Zusätzlich wurden Gene abgedeckt, die für *Mismatch*-Reparaturproteine kodieren (*MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH1*) (Rodríguez-Hernández et al. 2013). *MTAP* wurde dem Gen-Panel hinzugefügt, um einen größeren Bereich auf Chromosom 9p abzudecken. Die zwei Referenzgene *RAB7A* (Chr.3q21.3) und *GABRG3* (Chr.15q12) wurden hinzugefügt, um die Kopienzahl von Genregionen besser bestimmen zu können. Diese beiden Gene sind in Chromosomenregionen lokalisiert, die in Gliomen nur selten von Veränderung der Kopienzahl betroffen sind (Brennan et al. 2013). Es wurde ein Gliom-Gen-Panel mit ‚relaxed specificity‘ Parametern ausgewählt, da eine größtmögliche Abdeckung der Zielregionen erreicht werden sollte. Das Gliom-Gen-Panel 2 überspannt 70 kb an DNA-Sequenz, umfasst 709 Zielsequenzen und deckt 96,91 % der ausgewählten Genregionen ab.

Tabelle 14: Gliom-Gen-Panel 2 (IAD75775_173). Angegeben sind Name und chromosomale Lokalisation der repräsentierten Gene. Entweder sind die jeweilige kodierende Sequenz (cds) oder nur Genregionen (Region) abgedeckt.

Gen	Vollständiger Name	Chromosom	Typ
<i>MDM4</i>	MDM4, P53 Regulator	1q32	Region
<i>PIK3C2B</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta	1q32	cds
<i>ACVR1</i>	Activin A receptor type 1	2q24.1	Region
<i>MSH6</i>	MutS homolog 6	2p16	cds
<i>MSH2</i>	MutS homolog 2	2p21	cds
<i>RAB7A</i>	RAB7A, member RAS oncogene family	3q21.3	Region
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1	3p21.3	cds
<i>PDGFRA</i>	Platelet derived growth factor receptor alpha	4q12	cds
<i>MYB</i>	MYB proto-oncogene, transcription factor	6q22-q23	Region
<i>CCND3</i>	Cyclin D3	6p21	Region
<i>DAXX</i>	Death domain associated protein	6p21	cds
<i>HIST1H3B</i>	Histone cluster 1 H3 family member b	6p22.2	cds
<i>CDK6</i>	Cyclin dependent kinase 6	7q21-22	Region
<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	7q31	Region
<i>PMS2</i>	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component	7p22.2	cds
<i>MYBL1</i>	MYB proto-oncogene like 1	8q13.1	Region
<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1	8p12	Region
<i>NTRK2</i>	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2	9q22.1	cds
<i>TSC1</i>	Tuberous sclerosis 1	9q34	cds
<i>MTAP</i>	Methylthioadenosine phosphorylase	9p21	cds
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	11q13	region
<i>CDK4</i>	Cyclin dependent kinase 4	12q14	region
<i>PTPN11</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	12q24	cds
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene	12q14.3-q15	region
<i>CCND2</i>	Cyclin D2	12p13	region
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase	12p21.1	cds

<i>IRS2</i>	Insulin receptor substrate 2	13.34	Region
GABRG3	gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma3 subunit	15q12	region
<i>TSC2</i>	Tuberous sclerosis 2	16p13.3	cds
<i>PPM1D</i>	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1D	17q23.2	cds

Bei der ersten Sequenzierung mit dem Gliom-Gen-Panel 2 zeigte sich, dass die Amplikons AMPL7154384345 (*MSH2*) und AMPL7153012066 (*MSH6*) mit weniger als zehn *reads*/Probe abgedeckt wurden, sodass mögliche somatische Varianten in diesen Regionen nicht zu detektieren waren. Weiterhin zeigte sich, dass *PMS2CI*, ein Pseudogen von *PMS2*, durch Homologie von Exon 9 und Exon 11-15 ebenfalls sequenziert wurde. Die sequenzierten *reads* bzw. detektierten Varianten der homologen Regionen konnten nicht eindeutig *PMS2* oder *PMS2CI* zugeordnet werden. Insgesamt wurden folgende Kodons nicht vom Panel abgedeckt:

Tabelle 15: Kodons von *MSH2*, *MSH6* und *PMS2*, deren Sequenzen im Gliom-Gen-Panel 2 nicht-abgedeckt sind.

Gen	Nicht abgedeckte Kodons
<i>MSH2</i>	185-197
<i>MSH6</i>	21-80 153-155 885-900
<i>PMS2</i>	666-669 170-179

3.2 Etablierung der Gliom-Gen-Panel-Sequenzierung für die diagnostische Routineanwendung

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung der Hochdurchsatzsequenzierung des Gliom-Gen-Panels 1. Der Arbeitsablauf der Panelsequenzierung beinhaltete mehrere Arbeitsschritte. Der Arbeitsablauf begann mit der DNA-Extraktion aus verschiedenen Materialien mittels verschiedener Extraktionskits. DNA aus FFPE-Material, frischem Gewebe, Blut und Blutplasma wurde extrahiert und quantifiziert. Die NGS-Bibliotheken wurden erstellt und deren Qualität überprüft. Nach der Sequenzierung folgte die Datenanalyse und die Validierung der detektierten Varianten. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden ausgearbeitet und optimiert.

3.2.1 Konzentrations- und Qualitätsbestimmungen der untersuchten genomischen DNA und der daraus generierten NGS-Bibliotheken

3.2.1.1 Quantifizierung von degradiertem DNA mittels qRT-PCR

Zur Konzentrationsbestimmung von FFPE-DNA wurde das *TaqMan® RNase P Detection Reagents Kit* sowie alternativ das *TaqMan® Copy Number Reference RNase P Assay* verwendet. Da die *RNaseP TaqMan* qRT-PCR DNA-Bestimmungsmethoden im Arbeitsablauf aufwendiger und teurer sind als die DNA-Messungen mittels Qubit, wurden die verschiedenen DNA-Konzentrationsbestimmungen verglichen.

Die DNA-Quantifizierungsergebnisse von 20 FFPE-DNA-Proben, die mittels Qubit, NanoDrop oder qRT-PCR bestimmt worden waren, zeigten starke Abweichungen (Abbildung 5). Die FFPE-DNA-Proben zeigten in der NanoDrop-Messung eine durchschnittliche DNA-Konzentration von 52 ng/µl (Standardabweichung: 2,17 ng/µl). Die Bestimmung mittels qRT-PCR zeigte im Mittel eine sechsfach geringere DNA-Konzentration und eine durchschnittliche DNA-Konzentration von 8,5 ng/µl (Standardabweichung: 3,0 ng/µl). Die gemessenen Werte mittels Qubit zeigten zum Teil höhere DNA-Konzentrationen im Vergleich zur qRT-PCR-Methode (durchschnittliche DNA-Konzentration: 10,7 ng/µl, Standardabweichung: 3,4 ng/µl). Teilweise wurden doppelte bis dreifache Konzentrationen gemessen. Für zehn DNA-Proben wurden ähnliche DNA-Konzentrationen mittels Qubit und qRT-PCR bestimmt; zwei Proben hatten in der Qubit-Messung, verglichen mit der qRT-PCR-Methode, eine geringere DNA-Konzentration. Sechs Proben zeigten höhere DNA-Konzentrationen mittels Qubit-Methode. Das qRT-PCR-Produkt war 87 bp groß, sodass kleinere DNA-Fragmente nicht vervielfältigt wurden. Mittels Qubit-Messung wurde Doppelstrang-DNA gemessen, wodurch auch degradierte DNA-Fragmente erfasst wurden. Die unterschiedlichen Werte zwischen Qubit und qRT-PCR wiesen darauf hin, dass zum Teil kleine, degradierte DNA-Fragmente in den Proben zu finden waren. Die Zielsequenzen in Gliom-Gen-Panel 1 sind über 100-bp lang, sodass kleinere DNA-Fragmente in der Multiplex-PCR weniger effizient oder gar nicht vervielfältigt werden können. Mittels qRT-PCR wurde die Menge an zu amplifizierender DNA (>85 bp) gemessen, wodurch diese DNA-Konzentrationsbestimmungsmethode im Vergleich sensitiver als die Qubit-Messung ist. Trotz des größeren Arbeitsaufwands der qRT-PCR-Methode wurden daher die im Protokoll empfohlene qRT-PCR für die FFPE-DNA-Quantifizierung im Weiteren verwendet. Die Konzentrationsmessung von DNA aus tiefgefrorenem Gewebe (Kryo-DNA) erfolgte wie im Protokoll empfohlen über die Qubit-Messung. Hier gab es keine Unterschiede zwischen den mittels Qubit-Methode und qRT-PCR bestimmten Werten.

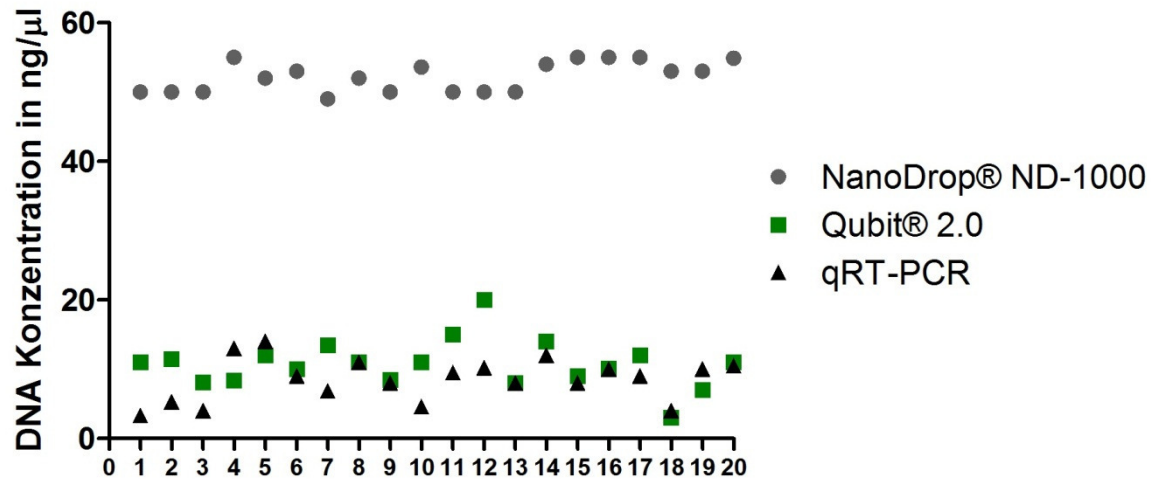


Abbildung 5: FFPE-DNA-Konzentrationen (ng/μl) gemessen mittels NanoDrop® ND-1000, Qubit® 2.0 und qRT-PCR von 20 verschiedenen Tumorproben.

3.2.1.2 Qualitätsanalyse der NGS-Bibliotheken

Vor der Sequenzierung wurden die Größenverteilungen der NGS-Bibliotheken unter Nutzung eines *Bioanalyzer* 2100 (Agilent Technologies), wie in Kapitel 2.2.3.2.6 beschrieben, bestimmt. Die Elektropherogramme ergaben ein charakteristisches Profil der intakten Bibliotheken von zwei hohen *Peaks* zwischen 100 und 300 Basenpaaren. Die Bibliotheken von Gliom-Panel 1 waren durchschnittlich 199-201 bp groß (Abbildung 6A). NGS-Bibliotheken, die mit zu stark degradiert DNA erstellt wurden, zeigten abweichende *Bioanalyzer*-Profile (Abbildung 6B und 6C). Häufig wurden *Peaks* bei ca. 120 bp detektiert (Abbildung 6B). Bei diesen Bibliotheken wurden vermehrt falsch-positive Varianten detektiert (siehe Kapitel 3.2.3.1). In dem vorliegenden Beispiel (Abbildung 6B) wurden mittels *Variant Caller* 63 Varianten detektiert, wobei die durchschnittliche Detektion an Varianten in diesem Sequenzierungslauf bei 44 Varianten lag. Für wenige NGS-Bibliotheken wurde eine hügelartige Erhöhung zwischen 100 und 350 bp beobachtet (Abbildung 6C). In diesen Fällen wurden nur wenige *reads* erzielt, wodurch die Sensitivität der Variantendetektion sank. In dem vorliegenden Beispiel (Abbildung 6C) wurden nur 137644 *reads* erzeugt und damit 10- bis 15-mal weniger *reads* als die Bibliotheken im selben Sequenzierungslauf. Die durchschnittliche Amplikonabdeckung bei dieser Probe lag bei 122 *reads*. Die Erstellung der atypischen NGS-Bibliotheken (wie in Abbildungen 6B und 6C gezeigt) wurde wiederholt, jedoch konnte in den meisten Fällen keine Verbesserung der Qualität erzielt werden. Weiterhin wurden NGS-Bibliotheken mit geringerer Konzentration (250 bis 500 pg/μl) erstellt (Abbildung 6D). In der Sequenzierung

Ergebnisse

zeigten diese Bibliotheken eine ausreichende Anzahl von *reads* und konnten zur Variantendetektion genutzt werden.

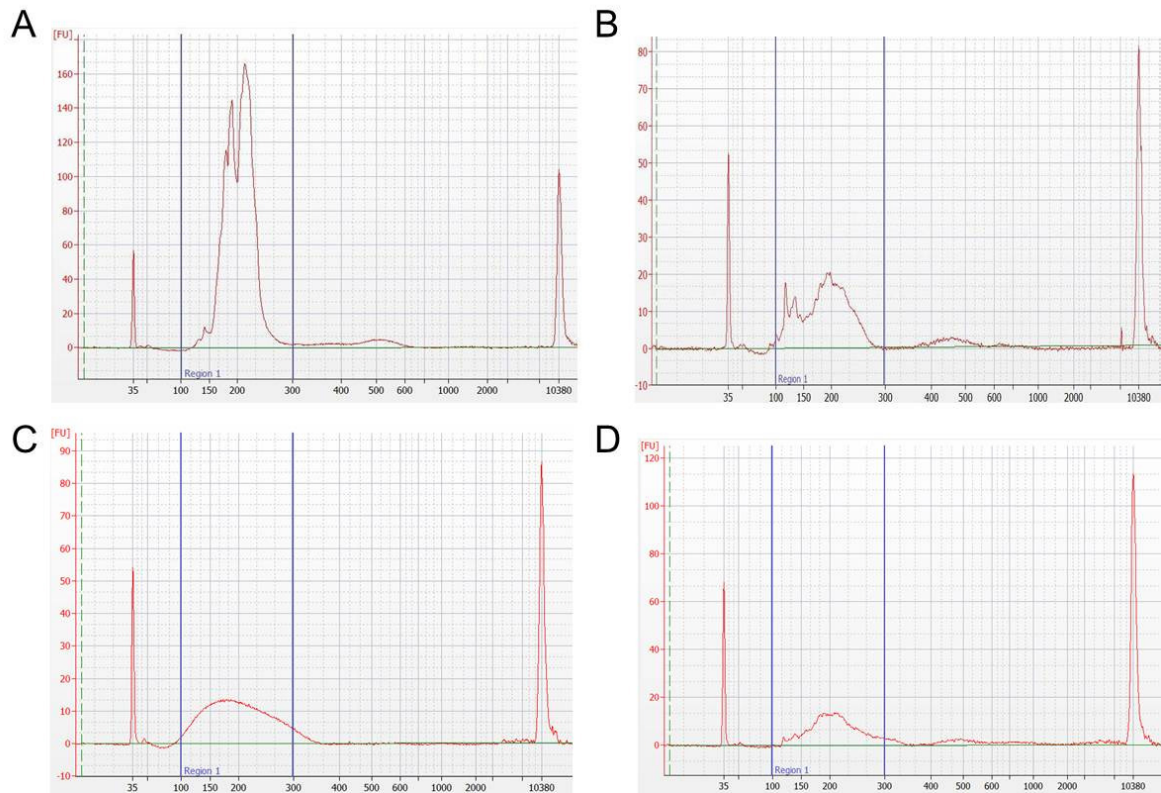


Abbildung 6: Qualitätsmessung der NGS-Bibliotheken unter Nutzung eines *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Die Elektropherogramme (*Peaks*) zeigen die Größenverteilung der in den NGS-Bibliotheken repräsentierten DNA-Fragmente an. X-Achse: Länge in bp nach einem DNA-Längenstandard. Y-Achse: Fluoreszenzwert (FU). DNA-Marker bei 35 bp und 10380 bp. **A)** Profil einer guten NGS-Bibliothek, die für das Gliom-Gen-Panel 1 erstellt wurde. Die Fragmente liegen zwischen 100 und 300 Basenpaaren und sind durchschnittlich 200 bp-lang. **B)** Profil einer NGS-Bibliothek mit einem hohen *Peak* bei einer Fragmentlänge von 120 bp, was darauf hinweist, dass diese Bibliothek ausgehend von stark degradierter DNA erstellt wurde. **C)** Profil einer anderen Bibliothek, die ebenfalls ausgehend von einer stark degradierten DNA generiert wurde. **D)** Profil einer NGS-Bibliothek mit schwachen Fluoreszenzwerten, aber typischem *Peak* bei 200-bp, ein typischer Befund für Bibliotheken, die von intakter, aber sehr niedrig konzentrierter DNA erzeugt wurden.

3.2.2 Optimierung der Gen-Panel-Sequenzierung

3.2.2.1 Amplikonabdeckung und Qualität der Gen-Panel-Sequenzierung

Während der Etablierungsphase wurden neun Sequenzierungsläufe auf dem *Ion PGM™* und fünf auf dem *Ion Proton™* durchgeführt. Das Gliom-Gen-Panel 1 umfasst 660 Amplikons mit einer durchschnittlichen Amplikonlänge von 106 Basenpaaren. Um eine Varianten-Frequenz von 2 % detektieren zu können, sollte eine Amplikonabdeckung von mindestens 1000 *reads* im Durchschnitt erreicht werden (somatische Parameter:

mindestens 20 reads für das Varianten-Allel). Für einen Sequenzierungslauf mittels *Ion 318TM-Chip* (4 bis 5,5 Millionen *reads*) wurden drei bis vier Proben gepoolt. Auf dem *Ion ProtonTM-Chip* (60 bis 80 Millionen *reads*) wurden 39 bis 40 Proben gepoolt. Die durchschnittliche Anzahl an erfassten *reads* pro Probe lag bei 1510942 mit einem medianen *Phred-Score* von 27. Die Qualität der generierten Sequenzen mittels *Ion PGMTM* war im Vergleich zu *Ion ProtonTM*-Sequenzierungen höher (Tabelle 16). Der *Phred-Score* für *Ion PGMTM*-Läufe lag im Mittel bei 28,7 und für *Ion ProtonTM*-Läufe bei 25. Im Durchschnitt waren die Amplikons mit 2226 *reads* (*Ion PGMTM*: 1979 *reads*/Amplikon, *Ion ProtonTM* 2473 *reads*/Amplikon) abgedeckt, wobei 97 % der Amplikons mit mindestens 300 *reads* und 88 % mit mindestens 1000 *reads* abgedeckt waren. Die vorgegebene durchschnittliche Abdeckung von 1000 *reads* wurde in allen NGS-Läufen erfüllt.

Tabelle 16: Auflistung der *Ion PGMTM*- bzw. *Ion ProtonTM* -Läufe und der generierten NGS-Sequenzen und *Phred-Scores*.

NGS Lauf	<i>reads</i>	<i>Phred-Score</i>
PGM1	4303379	28
PGM2	5728197	28
PGM3	3993886	30
PGM4	4021628	27
PGM5	4866399	28
PGM6	5651975	29
PGM7	5798701	30
PGM8	5374873	29
PGM9	5773620	29
Proton1	81494423	26
Proton2	75937740	26
Proton3	83701097	24
Proton4	48268062	25
Proton5	96880722	24

Die Abdeckung von vier GC-reichen Amplikons lag in jedem Sequenzierungslauf durchschnittlich unter 20 *reads* (Tabelle 17, vgl. Zacher et al. 2016). Amplikon AMPL3806956579 liegt im *TERT*-Promotorbereich und wurde durchschnittlich mit 13 *reads* abgedeckt. Das Amplikon AMPL388003993 liegt im *EGFR*-Gen und wurde im

Ergebnisse

Durchschnitt nur mit einem *read* abgedeckt. Amplikon AMPL2020425967 deckt einen Bereich im *CDKN2A*-Gen ab und wurde in keiner Probe sequenziert. AMPL3687401430 liegt in *CIC* und wurde durchschnittlich mit neun *reads* abgedeckt. Die Nukleotidsequenzen der vier genannten Amplikons haben einen GC-Gehalt von 78-82 %, wodurch diese Sequenzen weniger effizient sequenziert wurden.

Tabelle 17: Zusammenfassung der GC-reichen Amplikons mit regelmäßig schlechter Abdeckung (Zacher et al. 2016).

Amplikon-ID	Gen	Chr	GC Gehalt in %	Amplikon Start-Position	Amplikon Stop-Position	Ø reads
AMPL3806956579	<i>TERT</i>	5	82	1295151	1295315	13
AMPL388003993	<i>EGFR</i>	7	79	55087034	55087200	1
AMPL2020425967	<i>CDKN2A</i>	9	77	21974785	21974952	0
AMPL3687401430	<i>CIC</i>	19	78	42799197	42799346	9

Diese Amplikons sind mit weniger als 20 *reads* im Durchschnitt in den Sequenzierungsläufen abgedeckt. Chr: Chromosom, Ø: durchschnittlich

3.2.2.2 Optimierung der Abdeckung der GC-reichen *TERT*-Promotorsequenz

Anfängliche Gen-Panel-Sequenzierungsläufe zeigten eine geringe Abdeckung der GC-reichen *TERT*-Promotorsequenz (Amplikon: AMPL3806956579). Da zwei Schlüsselmutationen (hg19, chr.5:C1295228T und C1295250T) häufig in dieser Region in Gliomen auftreten, sollte die Sequenzierungsabdeckung optimiert werden. Es wurden verschiedene Lösungsansätze getestet:

1. Um eine nicht-effiziente Amplifikation der *TERT*-Promotorsequenz in der Multiplex-PCR auszuschließen, wurde eine Einzel-PCR der *TERT*-Region durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde äquimolar oder in 10- oder 100-facher Konzentration zur Multiplex-PCR zugefügt. Die anschließende Sequenzierung zeigte aber keine Erhöhung der Abdeckung der *TERT*-Promotorsequenzen mit diesem Ansatz.
2. Im nächsten Ansatz wurde eine Einzel-Bibliothek für *TERT* generiert und diese äquimolar oder in zehnfacher Konzentration zur fertigen NGS-Bibliothek hinzugefügt. Auch hierdurch gelang es nicht, eine erhöhte Anzahl von *TERT-reads* zu generieren.

In einem dritten Lösungsansatz wurden Fusionsprimer designt. Die Primer bestanden aus der A-Adaptersequenz, einer Barcode-Adaptersequenz und dem *TERT-Forward*-Primer (5'-ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag-barcode-gat-cagcgctgcc-3') sowie dem *TERT-Reverse*-

Ergebnisse

Primer und der P1-Adaptersequenz (5'- cctctctatgggcagtcggtgat-cggtcctgccccttcac-3') (Abbildung 7A). Die PCR-Produkte dieser Primerpaare bestanden folglich aus der A-Adaptersequenz, Barcode-Sequenz, der *TERT*-Promotor-Zielsequenz und der P1-Adaptersequenz. Das *TERT*-Amplikon wurde mit *Agencourt® AMPure® XP Beads* aufgereinigt, auf 200 pM verdünnt und zur dazugehörigen Barcode-Bibliothekspalte equimolar hinzugefügt. Mit dieser Methode konnte die Abdeckung der *TERT*-Promotorregion auf über 1500 *reads* erhöht werden. Es wurden jedoch nur *reads* in *Forward*-Richtung sequenziert (Abbildung 7B).

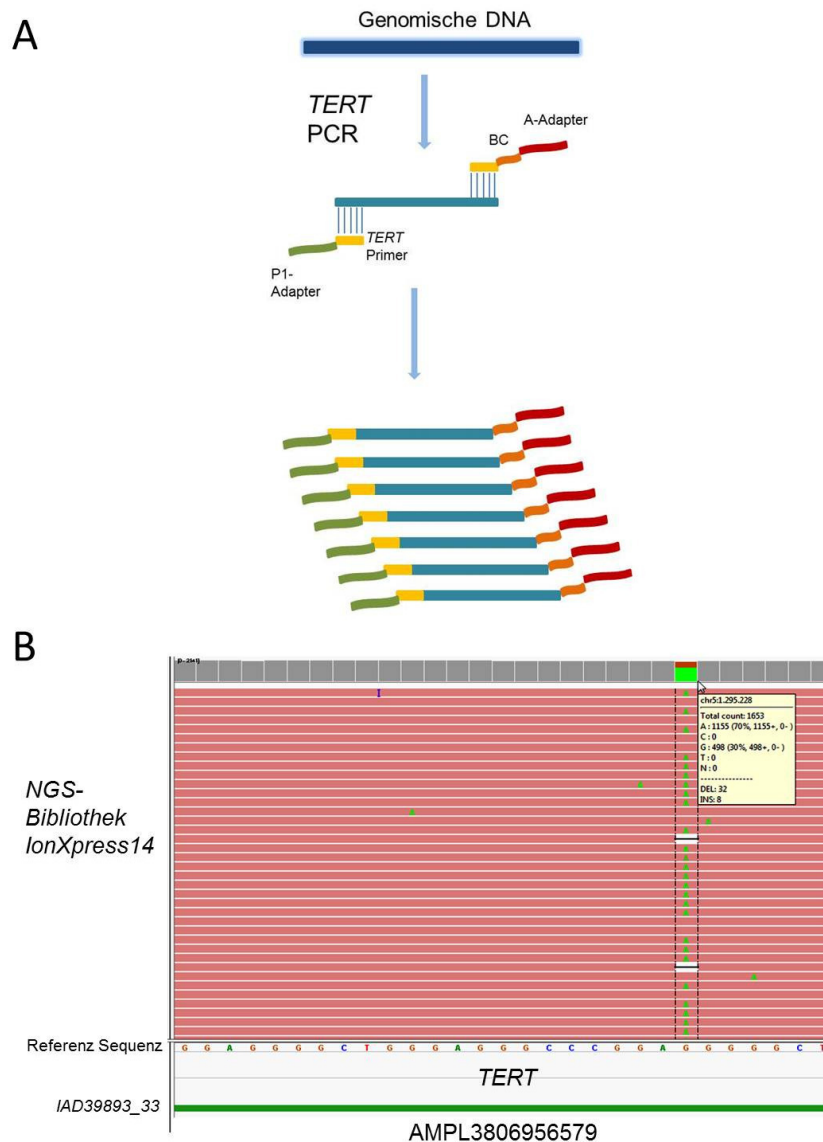


Abbildung 7: Optimierung der Abdeckung der GC-reichen *TERT*-Promotorsequenz. **A)** Aus genomischer DNA wurde die Zielregion mit den bekannten Mutationshotspots im *TERT*-Promotor mittels Fusionsprimer amplifiziert. Die Fusionsprimer bestanden aus den Zielprimern und der Barcode- (BC) sowie den A-Adapter- und P1-Adaptersequenzen. Das Ergebnis sind Fusions-Amplikonprodukte. **B)** Die Anzahl an *TERT*-Sequenzen von Amplikon 3806956579 wurde mittels Fusionsprimer auf über 1500 erhöht. Es wurden nur *Forward-reads* erzeugt (rote Reihen). Die Fusionsprimer wurden mit Barcode-24-Adaptersequenzen (*IonXpress 24*) entworfen.

Nachdem viel Zeit und Arbeit in die Optimierung der *TERT*-Promotorabdeckung geflossen war, wurde von der Firma Life Technologies die *Ion Torrent™*- und *Ion Proton™*-Sequenzierungschemie auf eine *high-quality* (HiQ)-Chemie (*PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit* für die Emulsions-PCR und das *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit* für die Sequenzierung) umgestellt. Dies führte dazu, dass auch ohne Verwendung von Fusionsprimern für das *TERT*-Amplikon eine erhöhte *Forward-read*-Anzahl der *TERT*-Promotorregion im mit dieser Chemie durchgeführten *Ion Proton™*-Lauf generiert wurde. Dabei ist zu beachten, dass die Abdeckung des letzten Proton-Laufs mit insgesamt 96880722 *reads* sehr hoch war. Die durchschnittliche Anzahl von *TERT-reads* lag bei 114. Dadurch konnte auf eine separate Amplifikation mit Fusionsprimern verzichtet werden. Die Detektion der Mutation im *TERT*-Promotorbereich erforderte allerdings eine visuelle Ansicht mittels *Integrative Genomics Viewer* (IGV 2.3), welcher die sequenzierten Amplikons interaktiv darstellt. Dabei werden Referenz-Nukleotide als graue Balken und Mutationen als farbige, alternative Nukleotide dargestellt. Mit dem Wechsel zur *HiQ*-Chemie erhöhte sich ebenso die Abdeckung des Amplikons AMPL388003993 (*EGFR*) von durchschnittlich einem *read* zu 116 *reads* und des Amplikons AMPL3687401430 (*CIC*) von durchschnittlich neun *reads* zu 20 *reads*. Amplikon AMPL2020425967 (*CDKN2A*) konnte dagegen in keinem der NGS-Läufe sequenziert werden.

3.2.2.3 Detektion und Eliminierung von C/T-Artefakten in FFPE-DNA

Genomische DNA aus FFPE-Tumormaterial ist durch die Formalin-Fixierung und Einbettung des Gewebes degradiert. Um sicherzustellen, dass die Variantendetektion in degradierteter DNA, die aus FFPE-Material (FFPE-DNA) extrahiert wurde, vergleichbar mit der Variantendetektion in hochmolekularer DNA ist, die aus tiefgefrorenem Tumorgewebe (Kryo-DNA) gewonnen wurde, wurde jeweils Kryo-DNA und dazugehörige FFPE-DNA aus 15 verschiedenen Gliomen extrahiert und sequenziert (vgl. Zacher et al. 2016). Über 74 % der gefundenen Varianten (189 nicht-synonyme und synonyme Varianten) konnten in den DNA-Proben aus beiden Tumormaterialien gefunden werden (Abbildung 8A). Insgesamt acht Varianten (3 %) wurden nur in Kryo-DNA detektiert. Insgesamt 58 Varianten (23 %) wurden mittels *variant calling* ausschließlich in den FFPE-DNAs detektiert. Davon konnten acht Varianten (8/58, 14 %) im *IG-Viewer* in geringer Frequenz (1-2 %) auch in den entsprechenden Kryo-DNAs identifiziert werden. 46 von 58 Varianten (79 %) wurden als Cytosin zu Thymin (C>T)-Transitionen identifiziert und traten mit alternativen Allel-Frequenzen von unter 10 % auf. C>T-Transitionen können artifiziell durch eine Formalin-induzierte Desaminierung von Cytosin zu Uracil entstehen (Do u. Dobrovic 2012). Aus neun Tumorproben mit solchen C>T-Transitionen wurde erneut DNA aus dem FFPE-

Ergebnisse

Material extrahiert. Hierfür wurde aber nun das neue FFPE-DNA Extraktionskit von Qiagen (*GeneRead DNA FFPE Kit*) verwendet. Das Protokoll dieses Kits beinhaltet eine Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Behandlung, wodurch desaminierte Cytosinreste entfernt und nicht mehr amplifiziert werden. Die Sequenzierungsergebnisse dieser DNA-Proben zeigten eine drastische Reduzierung der C>T (G>A)-Transitionen (Abbildung 8B). In den neun FFPE-DNAs ohne UNG-Behandlung wurden 39 C>T-Transitionen detektiert. Nach erneuter Extraktion und UNG-Behandlung wurde nur eine C>T-Variante in geringer Frequenz sequenziert. Diese Variante konnte als echte Variante identifiziert werden (*TP53*: G147E, COSM43714). Da die DNA-Extraktion über das *GeneRead DNA FFPE Kit* somit eine Reduktion der Formalin-induzierten C>T-Artefakte von 100 % bewirkte, wurde für nachfolgende DNA-Extraktionen aus FFPE-Material ausschließlich dieses Kit verwendet.

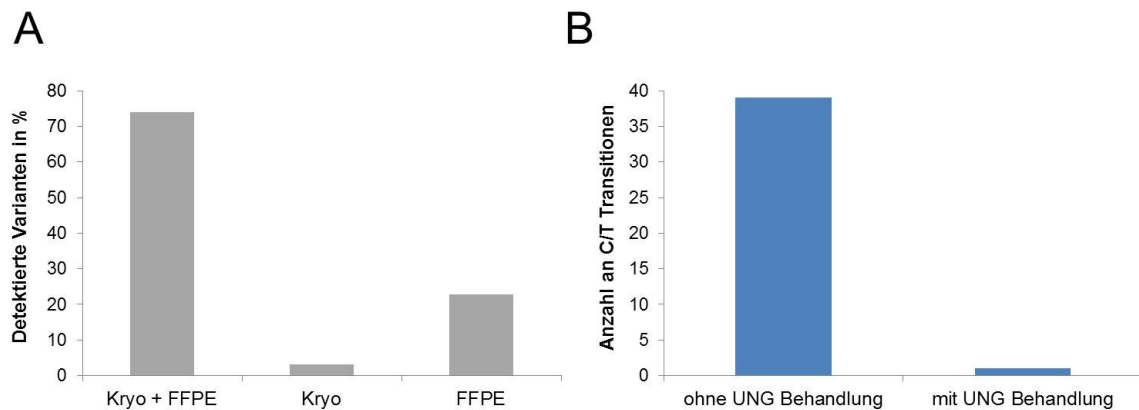


Abbildung 8: **A)** Anzahl der mittels Gliom-Gen-Panel 1 in Kryo-DNA- und korrespondierenden FFPE-DNA-Proben von 15 Gliomen detektierten Sequenzvarianten. Die meisten Varianten wurden sowohl in den Kryo-DNA als auch den FFPE-DNA gefunden. Über 20 % der Varianten (C>T-Transitionen) wurden nur in der FFPE-DNA gefunden. **B)** Anzahl der C>T-Transitionen in FFPE-DNAs mit und ohne UNG-Behandlung. Ohne UNG-Behandlung wurden in neun Gliomen 39 C>T-Transitionen detektiert. Nach einer Behandlung der DNA mit UNG und einer erneuten Sequenzierung wurden diese C>T-Transitionen auf eine Variante reduziert, die eine echte Mutation und kein Formalin-indiziertes C>T-Artefakt darstellte.

3.2.3 Detektion von somatischen Varianten

3.2.3.1 Detektion von Polymorphismen und somatischen Mutationen

Für die Identifizierung von somatischen, tumorspezifischen Mutationen in Gliomen wurden die vom *Variant Caller* identifizierten Varianten mittels *AnnoVar* annotiert (siehe 2.2.3). Die *AnnoVar*-listen beinhalten sowohl intronische als auch exonische Mutationen. Zur Detektion von somatischen Mutationen wurden exonische, protein-kodierende Varianten selektiert. Varianten, die das kodierte Protein nicht verändern (synonyme Mutationen),

wurden nach Abgleich von 14 Blutkontrollproben nicht weiter analysiert, da alle detektierten synonymen Mutationen sowohl in der Tumorprobe als auch in der Blutprobe identifiziert wurden. Polymorphismen wurden mittels bekannter dbSNP-Nummern, über die Allelfrequenzen (100 % = homozygoter, 50 % = heterozygoter Polymorphismus) und Häufigkeiten in der Population (Datenbanken *Exome Sequencing Project* [ESP], *1000 Genomes Project* [1000g]) identifiziert. Ein zusätzlicher Abgleich der Polymorphismen erfolgte über die Sequenzierungsergebnisse von 14 Leukozyten-DNAs (vgl. Zacher et al. 2016). Dabei wurden in den korrespondierenden 14 Tumorproben 51 von 82 Sequenzvarianten als somatische, tumorspezifische Mutationen identifiziert (Tabelle 25, Anhang). Alle Varianten, die sowohl in der Tumor-DNA als auch in der Leukozyten-DNA detektiert wurden, waren in Datenbanken bereits als bekannte Polymorphismen dokumentiert. Bekannte somatische Mutationen wurden mittels COSMIC- bzw. ClinVar-Datenbanken detektiert. Unbekannte Mutationen wurden zunächst im *IG-Viewer 2.3* visuell analysiert. Varianten in ausschließlich inkompletten *reads* (Abbildung 9A) oder niedrig-frequente Varianten in Homopolymer-Regionen (Abbildung 9B) wurden als falsch-positive Varianten ausgeschlossen. Ebenso wurden vermehrt falsch-positive Varianten an überlappenden Primer-Bindestellen von zwei Amplikons festgestellt (Abbildung 10 und Tabelle 18). Als zusätzlicher Abgleich dienten die Sequenzen der Leukozyten-DNA, bei denen die Sequenzierungsartefakte ebenfalls auftraten. Mittels Vorhersage-Algorithmen (SIFT, PolyPhen2, LRT, Mutation Taster und FATHMM) wurden wahrscheinliche Auswirkungen der unbekannten Varianten annotiert und wahrscheinliche Polymorphismen gefiltert.

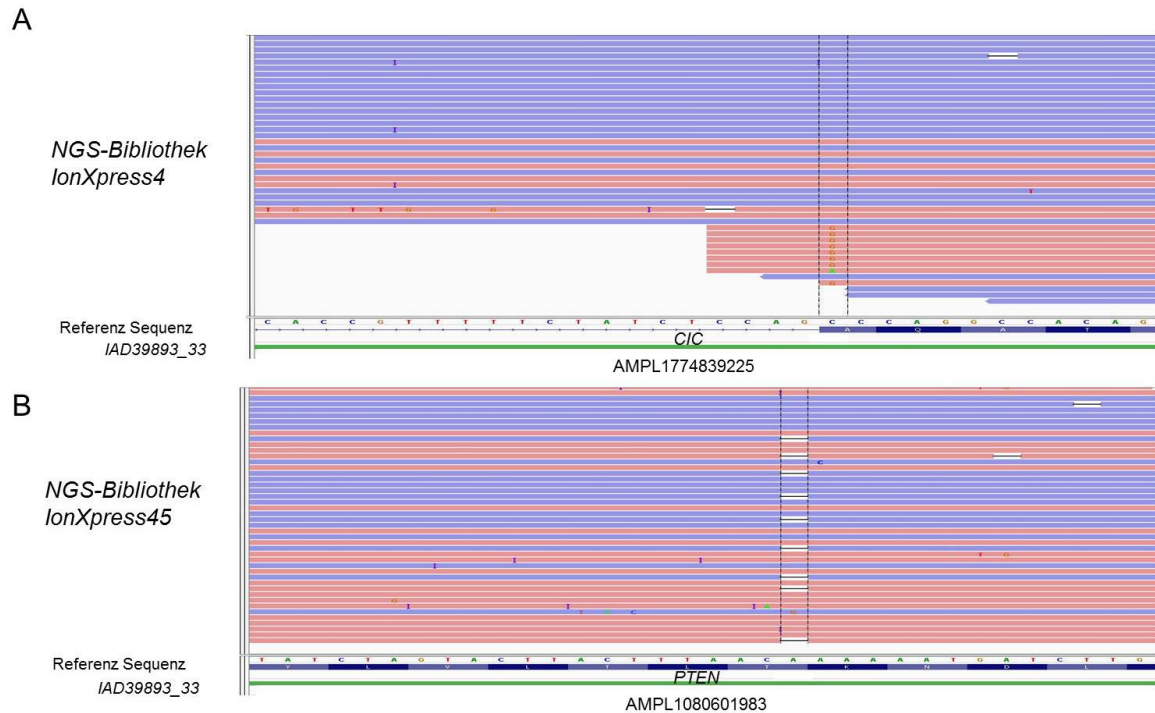


Abbildung 9: Beispiele für falsch-positive Varianten **A)** Ausschließlich in den kurzen, nicht kompletten Sequenzen wurden Guanine statt Cytosine sequenziert (hg 19, *CIC*, chr19: 42798976, Amplikon AMPL1774839225). **B)** In vielen *reads* wurde eine Deletion am Beginn eines Adenin-Polymerstretches detektiert. Diese falsch-positive Deletion war in den meisten untersuchten Proben zu finden (hg 19, *PTEN*, chr10: 89720812, Amplikon AMPL1080601983).

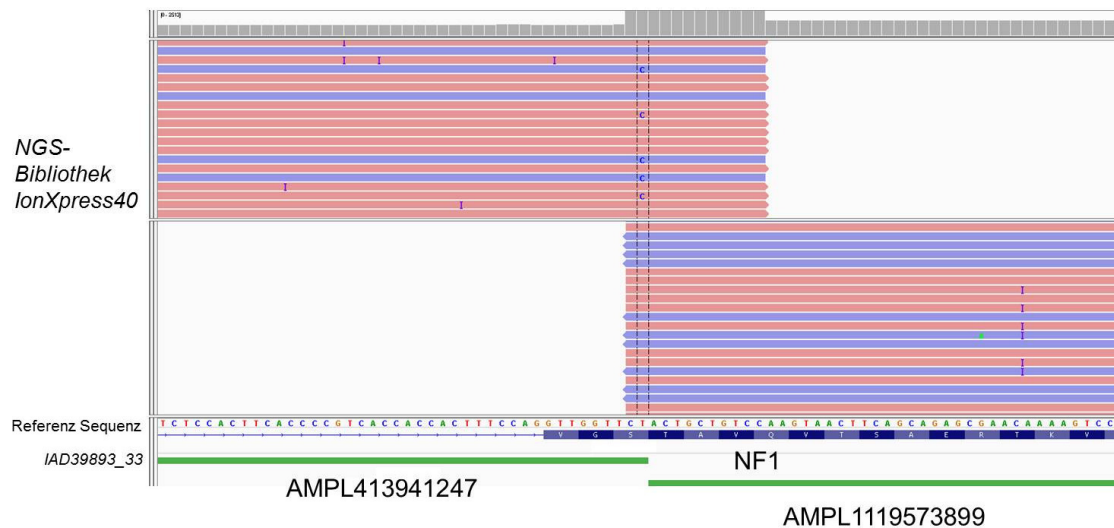


Abbildung 10: Beispiel für eine falsch-positive Variante im Primer-Überlappungsbereich der Amplikons AMPL413941247 und AMPL1119573899 im NF1-Gen auf Chromosom 17 in der NGS-Probe mit Barcode 40. In den *reads* von Amplikon AMPL413941247 wurden an Position 29654525 auch Cytosin-Nukleotide detektiert. Die *reads* von Amplikon AMPL1119573899 zeigen hingegen nur das Referenz-Nukleotid (Thymin).

Tabelle 18: Genpositionen von häufigen falsch-positiven Varianten mit niedriger Frequenz an überlappenden Primerbindestellen.

Chr.	falsch-detektierte Variante an Position	Gen	überlappende Primerbindestellen der Amplikons
2	209113221	<i>IDH1</i>	AMPL1480345659 AMPL393771326
17	29587488	<i>NF1</i>	AMPL391646468 AMPL391652820
17	29654525	<i>NF1</i>	AMPL413941247 AMPL1119573899
19	42799329	<i>CIC</i>	AMPL3687401430 AMPL1854089850
22	30000043	<i>NF2</i>	AMPL420757126 AMPL1078890335
X	76920172	<i>ATRX</i>	AMPL1488532048 AMPL1488546497
X	76938057	<i>ATRX</i>	AMPL1486046786 AMPL1486076433
X	76954078	<i>ATRX</i>	AMPL401726534 AMPL401729850

Chr.: Chromosom

3.2.3.2 Bestimmung des Schwellenwertes für eine homozygote *CDKN2A*-Deletion

Das Gliom-Gen-Panel 1 wurde hauptsächlich zur Detektion von Mutationen in den 20 Zielgenen erstellt. Zusätzlich wurde die NGS-Methode aber auch erfolgreich für die Analyse von Veränderungen der Kopienzahl (*copy number variation*, CNV) angewandt (vgl. Zacher et al. 2016). Zum einen wurde die durchschnittliche *read*-Anzahl einer Zielregion mit der durchschnittlichen *read*-Anzahl der anderen Zielregionen in derselben Probe verglichen. Zum anderen wurden CNVs über die *NextGENe*®-Software berechnet. CNVs der Gene *EGFR* und *PTEN* ließen sich zuverlässig bestimmen. Die gemeinsame Deletion von *FUBP1*, *NRAS*, *CDKN2C* (lokalisiert auf 1p) und *CIC* (lokalisiert auf 19q) wurde als Hinweis auf eine Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q interpretiert. Die Genregionen wurden mit 59 Amplikons (*EGFR*), 19 Amplikons (*PTEN*) bzw. 53 (*FUBP1*, *NRAS* und *CDKN2C*) und 56 Amplikons (*CIC*) abgedeckt. *CDKN2A* wurde von elf Amplikons abgedeckt, wovon ein Amplikon wegen eines hohen GC-Gehalts nicht analysierbar war. Aufgrund der geringen Amplikonanzahl für *CDKN2A* wurden insgesamt relativ wenige *CDKN2A-reads* sequenziert. Um zu überprüfen, ob hemi- bzw. homozygote *CDKN2A*-Deletionen mittels Gen-Panel-Sequenzierung detektiert werden können, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die einerseits DNA aus Zellen der Gliom-Zelllinie U118MG, die eine homozygote *CDKN2A*-Deletion tragen, beinhaltete, und andererseits DNA aus primären, normalen, humanen, dermalen Fibroblasten (NHDF) in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt (Anteile U118MG-DNA zu NHDF-DNA: 0:100,

Ergebnisse

50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0). Die U118MG-DNA- zu NHDF-DNA-Verhältnisse von 80:20, 90:10 und 100:0 spiegeln einen Tumorzellgehalt von mindestens 80 % wider und repräsentieren damit eine homozygote *CDKN2A*-Deletion. Das Verhältnis von 50:50 (U118MG-DNA:NHDF-DNA) spiegelte den Verlust eines der beiden *CDKN2A*-Allele wider (heterozygote Deletion). Die DNA-Mischungen wurden mittels *CDKN2A* qRT-PCR *TaqMan copy number assay* (Kalibrator: NHDF) analysiert (Abbildung 11A). Mit Erhöhung des U118MG-DNA-Anteils sank die *CDKN2A*-Kopienzahl, was sich in niedrigeren qRT-PCR-Quotienten widerspiegelte. Die qRT-PCR-Quotienten lagen nah an den erwarteten Werten (Abbildung 11A). Für die Erstellung der NGS-Bibliotheken wurden dieselben DNA-Mischungen verwendet. Der Sequenzierungsdatensatz der Fibroblasten NHDF-DNA diente als Kontrolle. Die beobachteten Verhältnisse wurden mit der *NextGENe*TM-Software berechnet und sind zusammen mit den erwarteten Werten in Abbildung 11 dargestellt. Die ermittelten Werte lagen nah an den erwarteten Werten. Die DNA-Mischung für eine hemizygoten Deletion (50 Teile U118MG-DNA:50 Teile NHDF-DNA; erwarteter Wert: 0,333, Berechnung siehe 2.2.3.6) zeigte ein beobachtetes Verhältnis von 0,367. Die DNA-Mischungen für einen Tumorzellgehalt von 90 % und 80 % (90 Teile U118MG-DNA:10 Teile NHDF-DNA und 80 Teile U118MG-DNA:20 Teile NHDF-DNA) hatten die erwarteten Ratio-Werte von 0,09 und 0,167 (Berechnung siehe 2.2.3.6) und zeigten Ratio-Werte von 0,111 bzw. 0,19, welche 0,021 bzw. 0,024 von den erwarteten Werten abwichen. Als Schwellenwert einer homozygoten *CDKN2A*-Deletion für eine Tumprobe mit mindestens 80 % Tumorgehalt wurde somit eine Ratio von 0,19 ermittelt (Berechnung siehe 2.2.3.6).

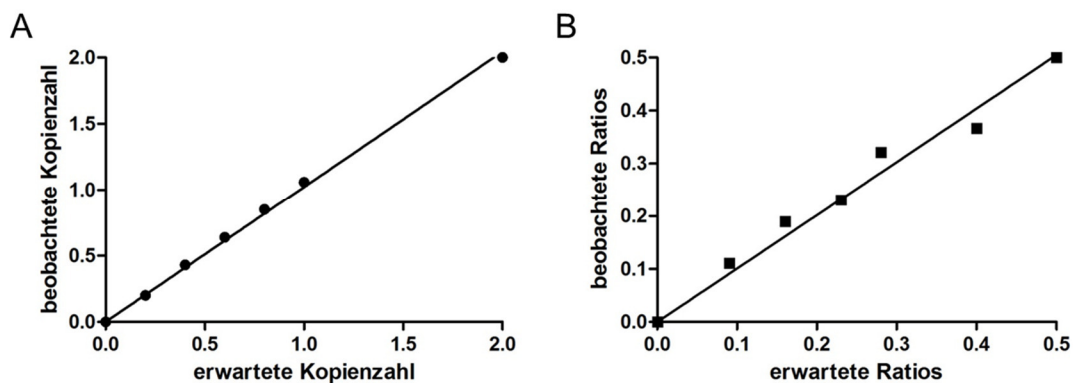


Abbildung 11: Bestimmung der *CDKN2A*-Kopienzahl in einer Verdünnungsserie mit DNA aus *CDKN2A*-defizienten U118MG-Zellen und NHDF-Zellen ohne *CDKN2A*-Verlust. Angezeigt ist die experimentell bestimmte *CDKN2A*-Kopienzahl in Relation zur erwarteten *CDKN2A*-Kopienzahl. Die Punkte auf den Geraden entsprechen von links nach rechts unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der beiden Zelllinien-DNAs (U118MG-DNA:NHDF-DNA): 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100 (U118MG-DNA:NHDF-DNA). **A)** qRT-PCR-Daten: Die Kopienzahl 2.0 der NHDF-Zellen entspricht zwei Allelen von *CDKN2A* ($r = 0,9993$) **B)** NGS-Daten der Verdünnungsserie analysiert mit der *NextGENe*-Software. Ein Verhältnis von 0,5 entspricht einer Kopienzahl von 2 ($r = 0,9903$) (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016, Zusatzabbildung 1).

Durch die geringe Anzahl an Amplikons für *CDKN2A* kann es zwischen den NGS-Bibliotheken und Sequenzierungsläufen jedoch zu Variationen der *CDKN2A-read*-Abdeckung kommen. Eine verbesserte Schätzung der homozygoten *CDKN2A*-Deletion in der DNA einer Tumorprobe kann durch die Hinzunahme der entsprechenden Blut-DNA erzielt werden. Für Tumorproben ohne entsprechende Kontrolle und einem Verhältniswert an der Grenze von 0,19 sollte daher in der diagnostischen Anwendung eine Validierung der homozygoten Deletion mittels *CDKN2A TaqMan copy number assay* erfolgen.

3.2.3.3 Sequenzierung von DNA aus stereotaktischen Biopsieproben

Zur histologischen Diagnostik werden Tumorgewebeproben sowohl von offenen Resektionen als auch von stereotaktischen Hirnbiopsien (stereotaktisch-gewonnenen Tumorproben) verwendet. Gewebeproben aus stereotaktischen Biopsien enthalten nur wenige Tumorzellen, sodass nur geringe DNA-Mengen extrahiert werden können. Die NGS-Sequenzierungen und Variantendetektion in DNA aus drei durch stereotaktischer Probenentnahme gewonnenen Tumorproben (STB A, STB B, STB C) wurden mit den entsprechenden DNA-Proben verglichen, die aus großen Tumorproben extrahiert wurden, welche aus offenen Resektionen (OR A, OR B, OR C) der gleichen Tumoren stammten (Tabelle 19, vgl. Zacher et al. 2016). In der DNA aus Biopsieprobe STB A wurden 31 Varianten gefunden, die in der DNA aus der korrespondierenden OR-A-Probe nicht gefunden wurden (nicht aufgelistet). 90 % dieser Varianten hatten eine geringere Allelfrequenz als 10 %. Die hohe Anzahl an Varianten mit niedriger Allelfrequenz und eine geringe Konzentration der NGS-Bibliothek lassen auf eine starke Degradierung der aus der kleinen STB-A-Probe isolierten DNA schließen. Trotz der stark degradierten DNA aus STB A konnten somatische, tumorspezifische Mutationen in *H3F3A* und *ATRX* mit ähnlichen Frequenzen wie in der aus der zugehörigen offenen Resektionsprobe isolierten DNA identifiziert werden (Tabelle 19). Für die Tumorpaare B und C wurde jeweils eine ähnliche Anzahl an somatischen Varianten zwischen der STB und der korrespondierenden OR-Probe detektiert (Tabelle 19). Für STB B und OR B wurden sieben bzw. sechs Varianten identifiziert. Sechs somatische Mutationen wurden für Tumorpaar B detektiert, wobei die charakteristische *IDH1*-p.R132H-Mutation mit 37 % und 35 % in den Tumorproben aus der stereotaktisch-gewonnenen OP sowie aus offener Resektion ähnliche Allelfrequenzen aufwies. Mutationen in *PIK3R1*, *CDKN2A*, *TP53* und *NF1* zeigten in STB B eine höhere Frequenz im Vergleich zu OR B. Die Mutation in Gen *PIK3CA* (p.M1043I) konnte nur in geringer Frequenz in STB B detektiert werden. Für Tumorpaar C wurden drei somatische Mutationen mit ähnlichen Allel-Frequenzen

Ergebnisse

annotiert (zweimal in *TP53* und einmal *TERT*) und eine Amplifikation von *EGFR* wurde nachgewiesen.

Tabelle 19: Somatische Varianten und deren Allel-Frequenzen in DNA-Proben aus stereotaktischen Biopsien und offenen Resektionen von drei unterschiedlichen Gliomen (A, B und C).

Gen	Mut.	STB A Freq. Mut.	OR A Freq. Mut.	STB B Freq Mut	OR B Freq. Mut.	STB C Freq. Mut.	OR C Freq. Mut.
<i>H3F3A</i>	p.K28M	25,9 %	35,1 %				
<i>ATRX</i>	p.L2202R	34,5 %	36,2 %				
<i>IDH1</i>	p.R132H			37,3 %	35,2 %		
<i>PIK3R1</i>	E155X			35,3 %	23,2 %		
<i>PIK3CA</i>	M1043I			7 %	0 %		
<i>CDKN2A</i>	p.Y44X			57,1 %	28,2 %		
<i>PTEN</i>	p.S229X			4,3 %	16,6 %		
<i>TP53</i>	R141C			75,4 %	65,4 %		
<i>NF1</i>	p.R1000S			30,4 %	20,6 %		
<i>TP53</i>	p.P45S					31,7 %	39,8 %
<i>TP53</i>	p.Q38X					42,4 %	39,3 %
<i>EGFR</i>						Ampl.	Ampl.
<i>TERT</i>	C228T					✓	✓

Mut.: Mutation, Freq.: Frequenz, Ampl.: Amplifikation.

Der Vergleich der Sequenzierungen von DNA, die aus stereotaktischen Tumorproben extrahiert wurde und den korrespondierenden Tumorproben aus offenen Resektionen zeigte, dass repräsentative Mutationsprofile über NGS auch aus minimal-invasiv gewonnenen, sehr kleinen Tumorgewebsproben detektiert werden können.

3.2.3.4 Sequenzierung von zirkulierender Tumor-DNA

In diesem Projektteil sollte überprüft werden, ob sich zellfreie Tumor-DNA (cfDNA) in ausreichender Menge und Qualität aus dem Blutplasma von Patienten mit ZNS-Tumoren isolieren lässt und sich mittels NGS die gleichen Veränderungen im Tumor und der cfDNA nachweisen lassen. Dazu wurde zunächst cfDNA aus insgesamt 18 Blutplasma-Proben von Patienten mit Karzinommetastasen im Gehirn extrahiert. Aus acht Blutplasma-Proben konnten keine ausreichenden Mengen an cfDNA für eine Bibliothekerstellung extrahiert

Ergebnisse

werden. Von zehn cfDNA-Proben wurden NGS-Bibliotheken mit 28 Zyklen pro Multiplex-PCR unter Verwendung des kommerziellen *Ion AmpliSeq™ Cancer HotSpot Panels v2* (Thermo Fisher Scientific) erstellt. In sieben dieser zehn Fälle war die Konzentration der NGS-Bibliothek allerdings für eine Sequenzierung zu gering. Drei cfDNA-Proben und die dazugehörigen Tumorproben wurden erfolgreich sequenziert. In zwei cfDNA-Proben konnten somatische Varianten (*PTEN* p.M35V bzw. *EGFR*-Amplifikation), die in den entsprechenden ZNS-Metastasen identifiziert wurden, nicht nachgewiesen werden. In Probe MET2861 wurden zwei somatische Mutationen in *TP53*-p.R148T und in *CDKN2A*-p.R58X sowohl in der Tumorprobe als auch in der cfDNA detektiert (Abbildung 12). In der cfDNA lagen die Allel-Frequenzen der beiden Mutationen 10 % bis 13 % unter den Allel-Frequenzen in der Tumor-DNA. In der Leukozyten-DNA ließen sich die beiden tumorspezifischen Varianten nicht nachweisen. Diese Pilotversuche zur Isolierung und Sequenzierung von cfDNA haben gezeigt, dass eine Detektion von somatischen Varianten in cfDNA möglich ist. Jedoch müssen die Arbeitsschritte der cfDNA-Extraktion und der Bibliothekserstellung noch weiter optimiert werden, um in einem höheren Anteil der Patienten genügend cfDNA für eine erfolgreiche NGS-Analyse zu gewinnen.

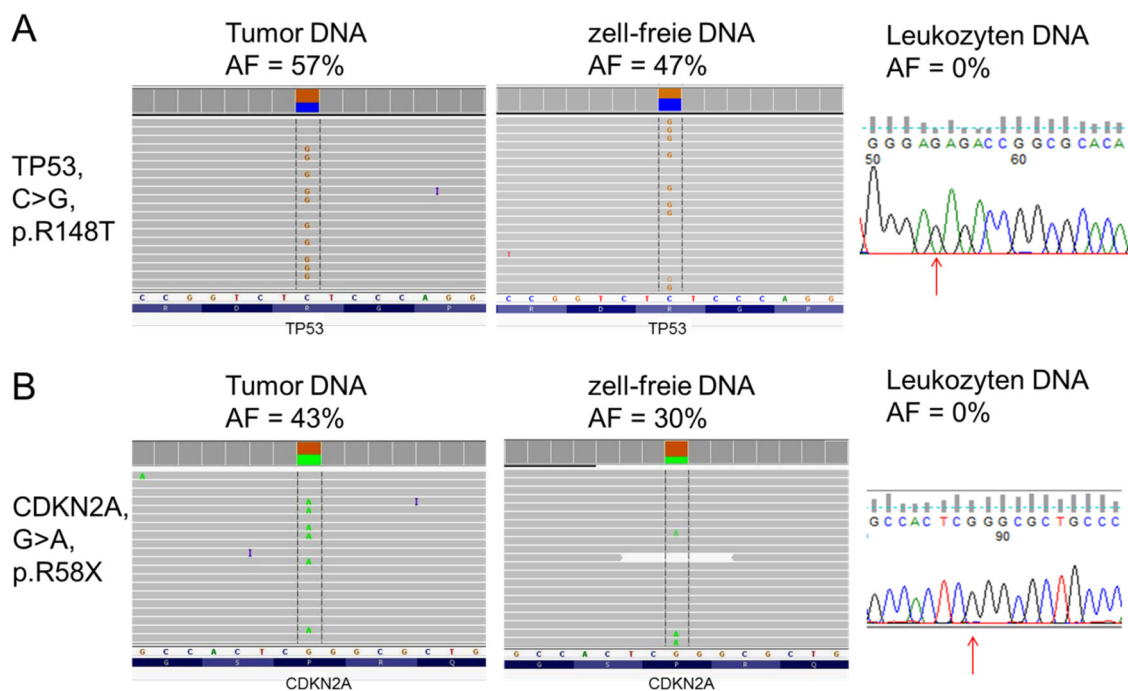


Abbildung 12: Detektion von somatischen Mutationen in Tumor-DNA aus Gewebe und zellfreier Tumor-DNA aus Plasma in einem Patienten mit einer intracerebralen Karzinometastase. A) Nachweis einer TP53 C>G, p.R148T Mutation. **B)** Nachweis einer CDKN2A G>A, p.R58X Mutation. Abgebildet sind jeweils Ausschnitte der IGV-Software für die TP53- bzw. CDKN2A-Regionen in der Tumor-DNA und in der zellfreien-DNA. Beide Mutationen waren mittels Sanger-Sequenzierung nicht in der Leukozyten-DNA des Patienten zu finden.

3.2.4 Validierung von Mutationen und Kopienzahlveränderungen

Vor der Implementierung eines Gliom-Gen-Panels in der molekular-diagnostischen Routine muss sichergestellt werden, dass die Methode valide, sensitive und spezifische Ergebnisse erbringt. Zu Beginn des Projekts wurden zwei Patientenproben (GB564 und GB1047) ausgewählt, die bekannte Mutationen, d.h. *BRAF*-V600E, *PTEN*-G132D sowie *IDH*-R132H aufwiesen. Nach erfolgreicher Detektion dieser Mutationen über das *Ion PGMTM*-System wurden weitere Gliom-DNA-Proben über den *Ion PGMTM* und den *Ion ProtonTM* sequenziert. Zusätzlich wurde von 14 Patienten neben der Tumor-DNA auch die Leukozyten-DNA sequenziert, um häufige Polymorphismen zu identifizieren und nachfolgend herauszufiltern (siehe Kapitel 3.2.3.1). Es zeigte sich, dass alle gefundenen Polymorphismen in öffentlichen Datenbanken dokumentiert sind, sodass eine Unterscheidung von somatischen Mutationen und Polymorphismen in den untersuchten Genregionen auch ohne Blutprobe möglich ist (Tabelle 25, Anhang).

In der Gen-Panel-Sequenzierung von 121 Gliom-Proben wurden insgesamt 389 genetische Veränderungen gefunden (Tabelle 26, Anhang, vgl. Zacher et al. 2016). 66 Gliom-assoziierte Veränderungen in 37 Gliom-Proben waren vor den NGS-Sequenzierungen bereits durch gezielte molekulare Analysen einzelner Gene bzw. Chromosomen bekannt. Alle 38 vorher bekannten SNVs, inklusive 25 *IDH1*-R132H-Mutationen, drei *IDH2*-R172K-Mutationen, sechs *BRAF*-V600E-Mutationen, zwei *H3F3A*-K27M-Mutationen, einer *H3F3A*-G34R-Mutation und einer *PTEN*-G132D-Mutation wurden über die Gen-Panel-Sequenzierung bestätigt. Außerdem wurden 22 CNVs, zehn 1p/19q-Kodeletionen und zwölf *EGFR*-Amplifikationen über die Gen-Panel-Sequenzierung detektiert. Für die genannten SNVs und CNVs konnte somit eine Sensitivität von 100 % erreicht werden. Die Sensitivität der *EGFRvIII*-Detektion war hingegen geringer. Von sechs bekannten *EGFRvIII*-Veränderungen wurden drei auch mittels NGS detektiert. Hier zeigte sich, dass die Sensitivität von RT-PCR und Immunhistochemie höher ist, als die NGS-basierte Methode. Neben den 66 schon bekannten genetischen Veränderungen und 66 *TERT*-Promotormutationen wurden 260 neue Varianten in den 121 untersuchten Gliomen mittels der Gen-Panel-Sequenzierung identifiziert. Die gefundenen DNA-Sequenzveränderungen beinhalteten *nonsynonymous* SNVs, *stopgain* SNVs, *nonframeshift* Substitutionen, *frameshift* Insertionen, *frameshift* Deletionen, *splice site* Mutationen, *stoploss* SNVs und Promotorregion SNVs. Zusätzlich fanden sich 47 CNVs. Für die Validierung der neuen Veränderungen wurden 59 Sequenzveränderungen ausgewählt und konnten mittels Sanger-Sequenzierung, Pyrosequenzierung und/oder Immunhistochemie durchweg bestätigt werden (Abbildung 13 und Abbildung 14). Mutationen mit einer Allel-Frequenz geringer als 15 % wurden für die Validierung

Ergebnisse

ausgeschlossen, da die Detektionsgrenze insbesondere bei der Sanger-Sequenzierung höher ist. Die 47 CNVs, inklusive drei *EGFR*-Amplifikationen, zwei *EGFRvIII*-Varianten, 13 homozygoten *CDKN2A*-Deletionen, zwölf hemizygoten *PTEN*-Verlusten und 17 1p/19q-Kodeletionen wurden über unabhängige Methoden verifiziert. Die Spezifität der Gen-Panel-NGS-Methode von DNA-Sequenzveränderungen und Kopienzahl-Veränderungen lag somit bei 100 %.

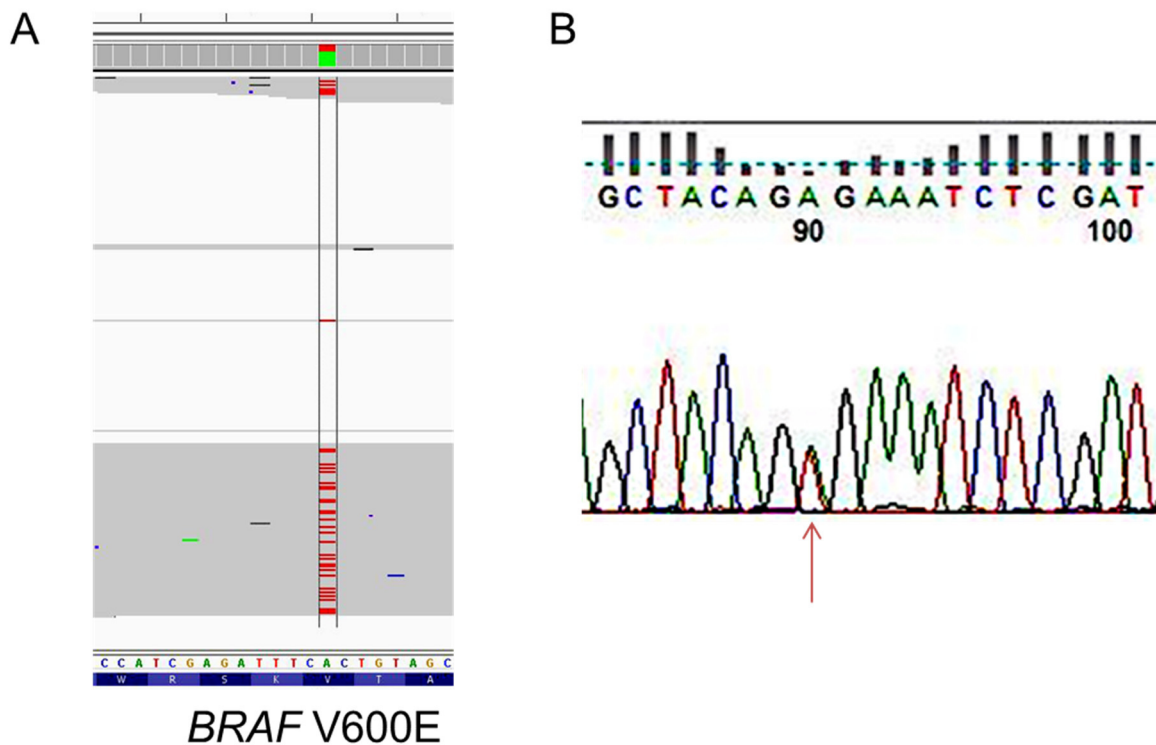


Abbildung 13: Validierung einer in der Gen-Panel-NGS detektierten *BRAF*-V600E-Mutation mittels Sanger-Sequenzierung. **A)** Gezeigt sind die visuell-komprimierten *reads* von *BRAF* an der Position hg19, chr.7: 140453136. Die Mutation in *BRAF*-V600E (A>T) wurde in der Gen-Panel-Sequenzierung detektiert (Ausschnitt aus der IGV-Software). **B)** Die entsprechende Mutation wurde mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Der rote Pfeil gibt die Position der Variante an (hg19, chr.7: 140453136).

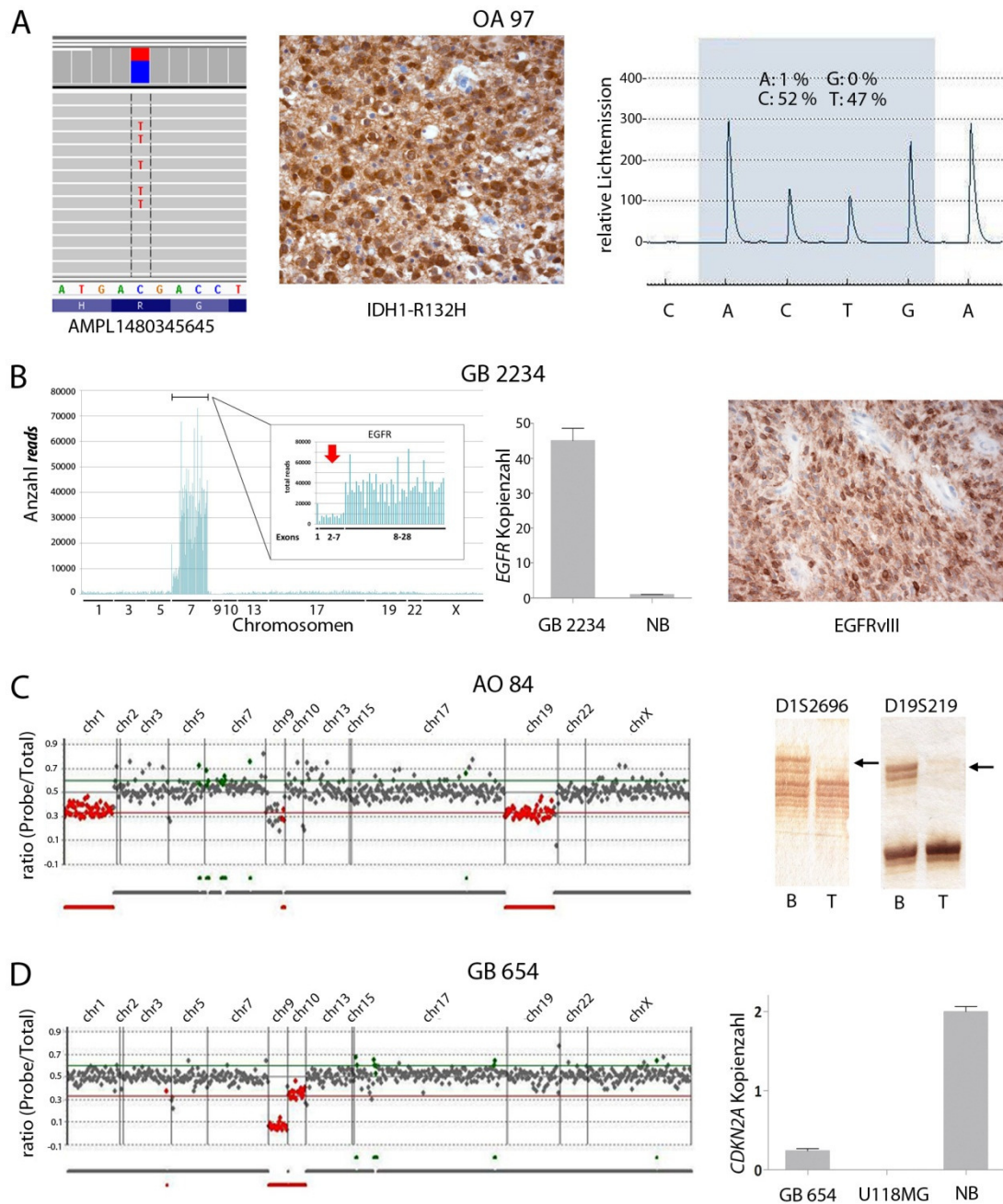


Abbildung 14: Beispiele von molekularen Veränderungen in Gliomen, die mittels Gen-Panel-NGS detektiert und mit unabhängigen Methoden validiert wurden (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016). **A)** Oligoastrozytom (OA97) mit einer *IDH1*-R132H-Mutation. 44 % der *IDH1*-reads zeigen Transitionen von C zu T an der Position Chromosom 2:209113112, hg 19 (IG-Viewer Ausschnitt links). Die *IDH1*-R132H-Mutation in Tumorprobe OA97 wurde mittels Immunhistochemie (Mitte) und DNA-Pyrosequenzierung (rechts) validiert. Die Pyrosequenzierung zeigte eine Allelfrequenz von 47 % für das mutante Allel. **B)** Detektion einer *EGFR*-Amplifikation mit gleichzeitiger *EGFRvIII*-Mutation in einem Glioblastom (GB2234) mittels Gen-Panel-Sequenzierung. Im Vergleich zu den anderen abgedeckten Chromosomenregionen wurde für *EGFR* eine massiv erhöhte Abdeckung von über 70000 reads pro Amplikon detektiert (links). Die *EGFRvIII*-Deletion zeigte sich durch Abnahme der read-Anzahl für die *EGFR*-Exone 2-7 (roter Pfeil) relativ betrachtet zu den Exonen 1 und 8-28. Über qRT-PCR wurde die *EGFR*-Amplifikation bestätigt (Mitte, NB: nicht-neoplastisches Hirngewebe). Die *EGFRvIII*-Deletion wurde mittels immunhistochemischer Färbung mit einem *EGFRvIII*-spezifischen Antikörper validiert (rechts). **C)** Detektion einer 1p/19p-Kodeletion in einem anaplastischen Oligodendrogliom (AO84). Die read-

Anzahl für die Gene *FUBP1*, *NRAS*, *CDKN2C* (1p) und *CIC* (19q) ist im Vergleich zu der Anzahl an *reads* in einer Kontroll-DNA aus Blut reduziert (links, rote Punkte bzw. mit roten Balken unterlegte Bereiche). Über Mikrosatellitenanalyse wurde die 1p/19q-Kodeletion in AO84 bestätigt (rechts). Gezeigt sind die Mikrosatellitenmarker *D1S2696* (1p) und *D19S219* (19q) in der Tumor-DNA (T) und in der dazu gehörigen Blut-DNA (B). Die Pfeile markieren die in der Tumor-DNA deletierten Allele. **D)** Glioblastom (GB654) mit einer homozygoten *CDKN2A*-Deletion, die mittels Gen-Panel-NGS detektiert wurde (links). Die *read*-Anzahl für die Genregionen von *CDKN2A* auf 9p ist im Vergleich zu der Anzahl an *reads* in einer Blutkontrolle stark reduziert (links, rote Punkte). Reduzierte Abdeckungsverhältnisse sind auch für das Gen *PTEN* auf 10q zu beobachten (ebenfalls rote Punkte). Hier liegt eine hemizygote Deletion vor. Die homozygote *CDKN2A*-Deletion wurde mit qRT-PCR im *TaqMan® copy number Assay* verifiziert (rechts). DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB) wurde als Normalkontrolle genutzt, wohingegen DNA aus der Zelllinie U118MG als Kontrolle für eine DNA mit homozygoter *CDKN2A*-Deletion diente (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016, Abbildung 1).

3.2.4.1 *ATRX*-Mutationen und Verlust der nukleären *ATRX*-Expression

Ein Verlust der nukleären *ATRX*-Expression aufgrund von *ATRX*-Mutationen wurde als häufige Veränderung in Kombination mit *TP53*-Mutationen in IDH-mutierten diffusen und anaplastischen Astrozytomen der WHO-Grade II und III sowie in IDH-mutierten Glioblastomen (WHO-Grad IV) beschrieben (Liu et al. 2012; Killela et al. 2014; Reifenberger et al. 2016). Die Gen-Panel-Sequenzierung von 42 Astrozytomen identifizierte 31 Tumoren mit *IDH1*- und *TP53*-Mutationen. In 23 dieser Tumoren ließen sich *ATRX*-Genveränderungen über die Gen-Panel-Sequenzierung detektieren (vgl. Zacher et al. 2016). In 18 der 23 *ATRX*-mutanten Tumoren wurden die *ATRX*-Expressionsverluste mittels Immunhistochemie kontrolliert und bestätigt (Abbildung 15). Acht der 31 *IDH1*- oder *IDH2*- und *TP53*-mutierten Tumore zeigten keine *ATRX*-Mutationen. In sechs der acht Astrozytome wurde über Immunhistochemie nukleäre Expressionsverlust von *ATRX* identifiziert. Die Proteinverluste konnten nicht durch exonische Mutationen oder Deletionen im *ATRX*-Gen erklärt werden. Eine Hypermethylierung der CpG-Insel im *ATRX*-Gen (hg38, CpG65, chrX: 77785468-77786289) wurde daraufhin mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert, aber nicht detektiert, sodass der *ATRX*-Verlust nicht durch eine Inaktivierung des Gens aufgrund einer aberranten Promotormethylierung erklärt werden konnte. Post-transkriptionelle Mechanismen könnten für den beobachteten Proteinverlust im Zellkern verantwortlich sein. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Wichtig ist allerdings der Befund, dass die Detektion von *ATRX*-Alterationen mittels Gen-Panel-NGS offenbar weniger sensitiv ist, als der immunhistochemische Nachweis eines Verlustes der nukleären *ATRX*-Expression (Zacher et al. 2016).

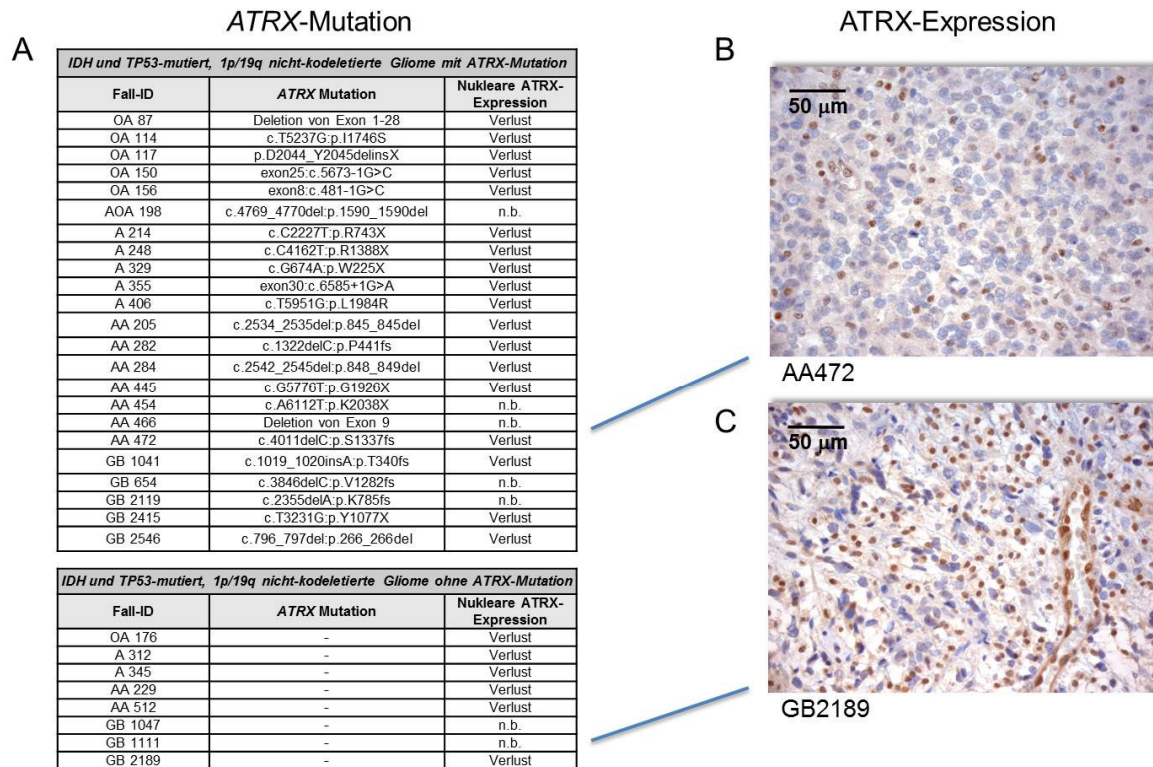


Abbildung 15: Vergleich zwischen den mittels NGS-Analyse detektierten ATRX-Mutationen und dem Verlust von nukleärer ATRX-Expression, der mittels Immunhistochemie in IDH- und TP53-mutierten Astrozytomen nachgewiesen wurde (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016). A) In 24 fand sich ein nukleärer ATRX-Verlust in der Immunhistochemie. In 18 der 24 Tumoren wurden gleichzeitig ATRX-Genveränderungen mittels NGS identifiziert. Sechs Astrozytome zeigten einen ATRX-Verlust, jedoch keine ATRX-Mutation oder -Deletion. **B)** Exemplarisches immunhistochemisches Bild mit Verlust der ATRX-Expression in den Tumorzellkernen (blau), aber nicht in nicht-neoplastischen Mikroglialzellen und vaskulären Zellen (braun-angefärbte Zellkerne). In Fall AA472 wurde eine ATRX-Mutation mit NGS detektiert. **C)** Tumor GB2189 zeigte keine ATRX-Mutation in der Gen-Panel-Sequenzierung, hatte aber trotzdem einen immunhistochemisch nachweisbaren Verlust der nukleären ATRX-Expression (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016, Zusatzabbildung 2).

3.2.5 Bestimmung der Mutationsprofile in 121 Gliomen und molekulare Klassifikation mittels unüberwachter Clusteranalyse

Die Gen-Panel-Sequenzierungen von 121 Gliomen unterschiedlicher Entitäten (Diagnosestellung nach WHO 2007) ergab insgesamt 392 genetische Aberrationen (Tabelle 26, vgl. Zacher et al. 2016). In 115 Gliomen waren Veränderungen in der DNA-Sequenz oder in der Kopienzahl von Genregionen nachweisbar. In sechs Tumoren (vier pilozytische und zwei anaplastische Astrozytome) wurden keine Veränderungen in den 20 Kandidatengenomen bzw. Regionen identifiziert. In 87 % der diffusen und anaplastischen Gliome (60/69) wurden Mutationen in *IDH1* oder *IDH2* detektiert. Die häufigste Mutation war *IDH1*-R132H (85 %), gefolgt von den Mutationen *IDH1*-R132S (6,7 %), *IDH2*-R172K (5 %), *IDH1*-R132L und *IDH1*-R132C (je 1,7 %). In über der Hälfte der Tumoren (66/121)

Ergebnisse

waren Mutationen in der *TERT*-Promotorregion (hg19, chr5:g.[1295228C>T] und g.[1295250C>T]) vorhanden. Am häufigsten wurden *TERT*-Mutationen in Oligodendrogliomen detektiert (O II: 89 %, 8/9 Tumoren; AO III: 100 %, 8/8 Tumoren). Weiterhin wurden *TERT*-Mutationen in primären Glioblastomen (87 %, 34/39 Tumoren) und den Oligoastrozytomen (OA II: 33 %, 3/9 Tumoren; AOA III: 72 %, 8/11 Tumoren) detektiert. Kodeletionen von 1p/19q wurden hauptsächlich in Oligodendrogliomen (88 %, 15/17 O II und AO III) und Oligoastrozytomen (50 %, 10/20 OA II und AOA III) sowie in zwei sekundären Glioblastomen identifiziert. Dabei trugen alle 1p/19q-kodeletierten Gliome zusätzlich *IDH1*- oder *IDH2*-Mutationen sowie *TERT*-Promotormutationen. Zusätzlich konnten in den 1p/19q-kodeletierten Gliomen *FUBP1*- und/oder *CIC*-Mutationen gefunden werden (in *FUBP1*: 19 %, 5/27 Fälle aller 1p/19q-kodeletierten Gliome bzw. *CIC*: 67 % 18/27 Fälle aller 1p/19q-kodeletierten Gliome). In 46 der 121 Tumoren (38 %) wurden *TP53*-Mutationen detektiert, wobei Astrozytome und Glioblastome am häufigsten betroffen waren (A II: 78 %, 7/9 Tumoren; AA III: 85 %, 11/13 Tumoren; sekGB IV: 80 %, 8/10 Tumoren; pGB IV: 23 %, 9/39). In 54 % (12/22 Tumoren) der diffusen und anaplastischen Astrozytome wurden auch *ATRX*-Mutationen nachgewiesen. *EGFR* war in einem Drittel der primären Glioblastome amplifiziert, außerdem in einem anaplastischen Astrozytom sowie einem anaplastischen Oligoastrozytom. Alle *EGFR*-amplifizierten Tumoren hatten keine *IDH*-Mutation. Die *EGFRvIII*-Variante ließ sich in fünf Glioblastomen mittels Gen-Panel-Sequenzierung und drei Glioblastomen zusätzlich mittels qRT-PCR nachweisen. Charakteristische Veränderungen in primären Glioblastomen waren außerdem hemizygote *PTEN*-Deletionen (28 %, 11/39 Tumoren), *PTEN*-Mutationen (41 %, 16/39 Tumoren) und homozygote *CDKN2A*-Deletionen (26 %, 10/39 Tumoren), die auch in pleomorphen Xanthoastrozytomen (PXAs) häufig zu finden waren (40 %, 2/5 Tumoren). In vier von fünf PXAs (80 %) lag eine *BRAF*-V600E-Mutation vor, die auch in einem von fünf pilozytischen Astrozytomen (20 %) und in zwei von 50 Glioblastomen (4 %) identifiziert wurde. *H3F3A*-Mutationen fanden sich in vier Glioblastomen und einem anaplastischen Astrozytom. Weitere Mutationen in den 121 untersuchten Tumoren betrafen die Gene *NF1* (n=10), *PIK3CA* (n=9), *PIK3R1* (n=5), *NRAS* (n=3), *RB1* (n=1), *CDKN2A* (n=2), *CDKN2C* (n=1) und *NF2* (n=1).

Um das Potential der Ergebnisse der Gen-Panel-Sequenzierung für eine molekulare Tumorklassifikation zu untersuchen, wurde eine nicht-supervidierte, hierarchische Clusteranalyse der NGS-Daten von den 121 Gliomproben durchgeführt (Abbildung 16). Hierbei wurden alle Sequenzveränderungen und Kopienzahlveränderungen (CNVs) der Gene *FUBP1*, *NRAS* und *CDKN2C* (1p), *EGFR* (7p), *CDKN2A* (9p), *PTEN* (10q) und *CIC* (19q) einbezogen. Die Clusteranalyse zeigte unterschiedliche, molekular definierte

Tumorgruppen, wobei diese im Wesentlichen durch unterschiedliche Mutationsmuster der Gene *IDH1/2*, *TERT*, *CIC*, *PTEN*, *TP53*, *ATRX* ebenso 1p/19q-Kodeletionen und *EGFR*-Amplifikationen definiert wurden. Eine molekulare Hauptgruppe von Tumoren wurde durch *IDH1*-, *TP53*- und *ATRX*-Mutationen charakterisiert (grüner Balken in Abbildung 16). 19 größtenteils astrozytäre und oligoastrozytäre Tumoren zeigten Mutationen in allen drei genannten Genen. Zehn Tumoren zeigten kombinierte *IDH1*- und *TP53*-Mutationen, acht Tumoren hatten keine *IDH1*-Mutation, dafür *TP53*- und/oder *ATRX*-Mutationen. In vier IDH-Wildtyp-Gliomen konnten *H3F3A*-Mutationen nachgewiesen werden. Die zweite molekulare Gruppe (roter Balken in Abbildung 16) setzte sich hauptsächlich aus 30 Oligodendrogliomen und oligoastrozytären Tumoren zusammen. In diesen Gliomen wurden Mutationen in *IDH1/2* (n=30), *TERT* (n=30) und *CIC* (n=19) sowie 1p/19q-Kodeletionen nachgewiesen. Zusätzlich zeigten sich Mutationen in *FUBP1* (n=5), *PIK3CA* (n=5), *PIK3R1* (n=3), *NRAS* (n=2) und *TP53* (n=2). In der dritten molekularen Gruppe wurden 38 Tumoren, überwiegend primäre Glioblastome, zusammen klassifiziert (roter Balken in Abbildung 16). Diese Tumoren zeigten keine Mutationen in *IDH1* oder *IDH2*, aber häufig Mutationen im *TERT*-Promotor (n=34). Gliome mit Mutationen in *NF1* (n=5) und/oder *PTEN* (n=19) wurden einer anderen Untergruppe zugeteilt als Gliome mit *EGFR*-Amplifikation (n=14) und *EGFRvIII* (n=8). Weitere häufige Veränderungen in der Gruppe waren homozygote *CDKN2A*-Deletionen (n=7), *PTEN*-Deletionen (n=11) und Mutationen in *TP53* (n=5) und *EGFR* (n=4). Insgesamt 15 Tumoren wurden nicht in eine der drei molekularen Hauptgruppen eingeteilt (grauer Balken in Abbildung 16). Hiervon zeigten sechs Tumorfälle keine genetischen Veränderungen in den 20 Kandidatengenen und Regionen (vier pilozytisches Astrozytome und zwei anaplastische Astrozytome). Weitere neun Gliome zeigten *BRAF*-Mutationen (n=6), *TERT*-Mutationen (n=2), homozygote *CDKN2A*-Deletionen (n=2) und *PIK3CA*-Mutationen (n=2).

Die nicht-supervidierte Clusteranalyse ordnete den größten Teil der Tumoren in drei molekulare Hauptgruppen, die diagnostisch für prognostisch distinkte Subgruppen der diffusen Gliome in Erwachsenen sind (Suzuki et al. 2015; Brat et al. 2015; Ceccarelli et al. 2016). Die Gruppen entsprechen *IDH*-, *TP53*- und/oder *ATRX*-mutierten Astrozytomen (1), *IDH*- und *TERT*-mutierten sowie 1p/19q-kodelletierten Oligodendrogliomen (2) und IDH-Wildtyp Glioblastomen mit *TERT*- und *PTEN*-Mutationen sowie *EGFR*-Amplifikation (3).

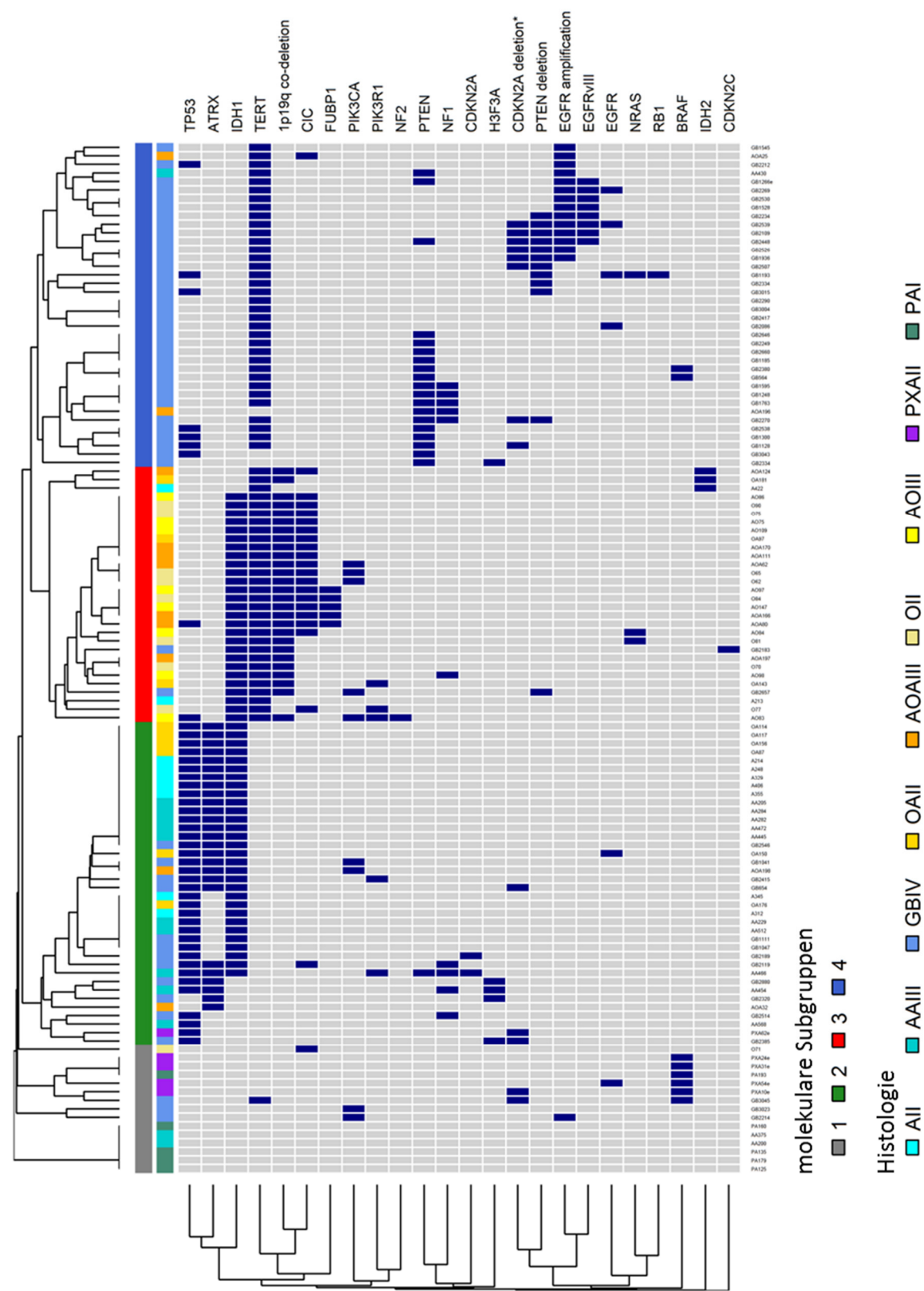


Abbildung 16: Nicht-supervisierte hierarchische Clusteranalyse der mittels Gen-Panel-Sequenzierung in 121 Gliomen gefundenen Mutationen (Zacher et al. 2016). Blaue Kästen zeigen die Präsenz einer Veränderung an; graue Kästen zeigen keine Präsenz an. Die Gliome

wurden abhängig vom Mutationsmuster durch die unsupervidierte Clusteranalyse in vier molekulare Subgruppen unterteilt (grau, grün, rot, blau). In der grauen Gruppe befinden sich die Gliome mit keiner oder nur wenigen Mutationen in den 20 ausgewählten Genen. In der grünen sind hauptsächlich astrozytäre Gliome mit Mutationen in den Genen *IDH1* oder *H3F3A*, *TP53* und/oder *ATRX* gruppiert. Tumoren mit häufigen Mutationen in *IDH1* oder *IDH2*, *TERT*, *CIC* und eine 1p/19-Kodeletion clustern zusammen in der roten Gruppe. In der letzten Subgruppe (blau) finden sich hauptsächlich primäre IDH-Wildtyp-Glioblastome mit häufigen Mutationen in *TERT*, *PTEN* und *NF1* sowie *EGFR*-Amplifikation, *EGFRvIII*-Deletion und homozygoter *CDKN2A*-Deletion. Die Abkürzungen und Bezeichnungen folgen der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2007 (Louis et al. 2007): A II, Diffuses Astrozytom WHO-Grad II; AA III, Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III; O II, Oligodendrogliom WHO-Grad II; AO III, Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III; OA II, Oligoastrozytom WHO-Grad II; AOA III, Anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III; GB IV, Glioblastom WHO-Grad IV; PA I, Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I; PXA, Pleomorphes Xanthoastrozytom; *beinhaltet *TERT*-Mutationen, die mit Sanger-Sequenzierung und/oder NGS detektiert wurden; ** homozygote *CDKN2A*-Deletion; ****EGFRvIII*-Variante, die mittels Immunhistochemie und/oder NGS identifiziert wurden (Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016, Abbildung 2).

3.2.6 Anwendung der NGS-Daten für die histologische und molekulare Klassifikation von Gliomen

Nach der neuen WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2016 (WHO 2007, (Louis et al. 2016)) sind sowohl histologische Merkmale als auch genetische Biomarker für die Diagnostik von Gliomen relevant. Die 121 sequenzierten Gliome wurden ursprünglich gemäß der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2007 (WHO 2007, (Louis et al. 2007)) rein histologisch diagnostiziert. Die 111 diffus infiltrativ wachsenden Gliome der eigenen Serie wurden anhand der ermittelten NGS-Daten nach der aktuellen WHO 2016 neu klassifiziert (Abbildung 17).

Hierbei wurden gemäß WHO 2016 die NGS-Daten zu den molekularen Markern *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation, 1p/19q-Kodeletion und *H3F3A*-K27-Mutation benutzt (vgl. Zacher et al. 2016).

Die deutlichsten Veränderungen in der Klassifikation zeigten sich für die 20 oligoastrozytären Tumoren gemäß WHO 2007. Diese Gruppe entfällt in der Einteilung entsprechend der neuen WHO 2016, da diese Tumoren nun aufgrund der Analyse molekularer Marker entweder den oligodendroglialen Tumoren mit IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion oder den astrozytären Gliomen mit oder ohne IDH-Mutation zugeordnet werden (Abbildung 17). Fünf IDH-mutierte Oligoastrozytome ohne 1p/19q-Kodeletion wurden als diffuse Astrozytome, IDH-mutiert, reklassifiziert. Vier Oligoastrozytome zeigten IDH-Mutationen und 1p/19q-Kodeletionen; sie wurden entsprechend als Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert eingeordnet. Die anaplastischen Oligoastrozytome nach WHO 2007 teilten sich in sieben anaplastische Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, ein anaplastisches Astrozytom, IDH-mutiert, und drei anaplastische Astrozytome, IDH-Wildtyp auf. Unter den diffusen

Astrozytomen (WHO-Grad II) nach WHO 2007 wurde in allen Fällen eine IDH-Mutation gefunden, wodurch diese Gruppe nach neuer WHO 2016 vollständig den diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert (WHO-Grad II) zugeordnet werden konnte. In der Gruppe der anaplastischen Astrozytome waren acht IDH-mutierte und vier IDH-Wildtyp Tumoren sowie ein Gliom mit *H3F3A*-K27-Mutation. Von 17 Oligodendrogliomen zeigten 15 eine IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion. Für zwei Fälle konnte keine Oligodendrogliom-assoziierte genetische Signatur gefunden werden, wodurch die beiden Fälle nach WHO 2016 in die Gruppe der Oligodendrogliome, NOS (*not otherwise specified*) fallen. Nach WHO 2007 wurden 52 Glioblastome diagnostiziert. 81 % (n=42) wurden als Glioblastom, IDH-Wildtyp, eingeordnet. Acht Tumoren zeigten eine IDH-Mutation und wurden somit als Glioblastom, IDH-mutiert, reklassifiziert. In zwei Glioblastomen wurden sowohl IDH-Mutationen als auch 1p/19q-Kodeletion detektiert. Diese Tumoren wurden entsprechend nach der WHO 2016 als anaplastische Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert diagnostiziert. Zwei Glioblastome wurden aufgrund einer nachgewiesenen *H3F3A*-K27-Mutation als diffuse Mittellinienglioblastome, H3-K27M-mutiert, reklassifiziert.

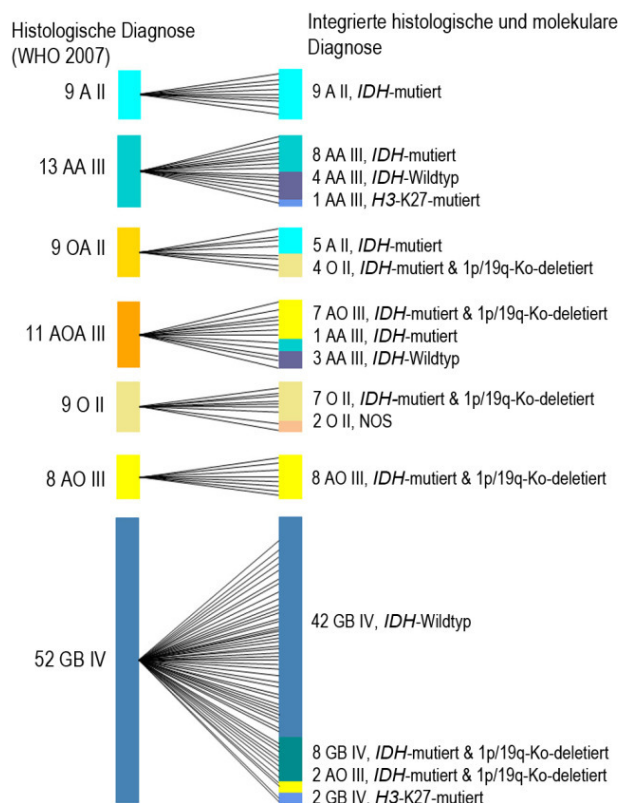


Abbildung 17: Diagnosen nach WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2007 (WHO 2007) und WHO 2016 (WHO 2016) für 111 diffus infiltrativ wachsende Gliome. Die Reklassifikation der Gliome zeigt nach WHO 2016 zum Teil eine andere Diagnose als die Klassifikation nach WHO 2007 (A = diffuses Astrozytom, AA= anaplastisches Astrozytom, OA = Oligoastrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, O = Oligodendrogliom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom, GB = Glioblastom, NOS = *not otherwise specified*; Abbildung modifiziert aus Zacher et al. 2016, Abbildung 3).

3.3 Identifizierung von genetischen Veränderungen in Primär- und Rezidivglioblastomen mittels Gen-Panel-Sequenzierung

Glioblastom-Patienten entwickeln trotz Resektion des Tumors und anschließender Strahlen- sowie Chemotherapie regelmäßig lokale Rezidivtumoren mit ungünstiger Prognose. Die Ausbildung einer Therapie-Resistenz in Gliomrezidiven wurde mit einem veränderten genetischen Profil im Vergleich zum Primärtumor assoziiert (Johnson et al. 2014). In diesem Projekt der Dissertationsarbeit wurden die Mutationsmuster von 65 primären Glioblastomen und deren Rezidiven mittels Gen-Panel-Sequenzierung verglichen. Die Analyse sollte Aufschluss über genetische Veränderungen geben, die mit der Tumorprogression und der Entwicklung einer Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) in Glioblastomen assoziiert sind. Die Analyse umfasste Tumoren von Glioblastompatienten, die nach der Operation eine kombinierte Strahlen-/Chemotherapie erhielten (n=51 Patienten), nur mit Radiotherapie behandelt wurden (n=6 Patienten), nur Chemotherapie erhielten (n=2 Patienten) oder keine postoperative Behandlung bekommen haben (n=6 Patienten) (Patientenliste siehe 2.1.4.2). Für dieses Projekt wurde zusätzlich zum Gliom-Gen-Panel 1 das Gliom-Gen-Panel 2 verwendet (siehe Tabelle 14, IAD75775_173).

3.3.1 Mutationen in Primär- und Rezidivglioblastomen

Dieser Versuchsansatz sollte Aufschluss geben, inwiefern sich Primärtumor und der korrespondierende Rezidivtumor im Mutationsprofil unterscheiden und ob bestimmte Mutationen durch die Behandlung mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum TMZ, welches für seine mutagene Wirkung bekannt ist (Bodell et al. 2003), induziert werden. Der Fokus der ersten Sequenzdatenauswertung lag auf dem Vergleich der Mutationsprofile von Primär- und Rezidivtumor. In 22 von 65 untersuchten Tumorkomplexen (34 %) fanden sich keine Unterschiede im Mutationsprofil zwischen Primär- und Rezidivtumor (Tabelle 27, Anhang). Dabei handelte es sich um Tumorkomplexe von vier der sechs Patienten, die keine adjuvante Behandlung erhalten hatten, sowie von vier Patienten, die nur mit einer Strahlentherapie behandelt worden waren, sowie weiterhin um Tumorkomplexe von zwei Patienten, die nur mit Chemotherapie und zwölf Patienten, die mit einer kombinierten Strahlen- und Chemotherapie behandelt worden waren. Somit wurden in acht von zwölf (67 %) TMZ-unbehandelten Tumorkomplexen und 14 von 53 TMZ-behandelten Fällen (26 %) keine Unterschiede im Mutationsprofil gefunden. In 43 von 65 Fällen (66 %) wurden Unterschiede im Mutationsprofil vom Primärtumor zum Rezidivtumor detektiert. Die 43 Paare setzen sich aus Patienten zusammen, die nach der

Erstoperation nicht behandelt wurden (n=2), nur eine Strahlentherapie (n=2) oder eine kombinierten Strahlen- und Chemotherapie (n=39) bekommen hatten. TMZ-unbehandelte Primärtumoren zeigten somit in 33 % der Fälle (4/12) ein unterschiedliches Mutationsprofil in Primär- und Rezidivtumor, wohingegen in den TMZ-behandelten Fällen die Anzahl mit 74 % (39/53) wesentlich höher lag. Die jeweiligen Tumorkpaare trugen jedoch alle jeweils mindestens eine gemeinsame Mutation, was dafür spricht, dass sich die Rezidivtumoren aus einem bereits im Primärtumor vorhandenen Tumorzellklon entwickelt haben. Insgesamt waren in TMZ-behandelten und –unbehandelten Fällen 58 % der detektierten Mutationen (n=161) sowohl in den Primärtumoren als auch in den Rezidivtumoren nachweisbar. 13 % (n=37) der detektierten Mutationen wurden nur in den jeweiligen Primärtumoren detektiert. Diese Mutationen werden nachfolgend als exklusive Mutationen der Primärtumoren bezeichnet. Hingegen wurden 28 % (n=78) der detektierten Mutationen nur in den jeweiligen Rezidivtumoren eines Tumorkpaares identifiziert. Diese Mutationen werden nachfolgend als exklusive Mutationen der Rezidivtumoren bezeichnet. In den zwölf TMZ-unbehandelten Fällen wurden 85 % der detektierten Mutationen (n=28) jeweils sowohl im Primärtumor als auch im Rezidivtumor detektiert, 3 % exklusiv im Primärtumor (n=1) und 12 % exklusiv im Rezidivtumor (n=4).

Insgesamt wurden die meisten Mutationen im *TERT*-Promotor (n=56) und in den Genen *EGFR* (n=41), *PTEN* (n=31), *TP53* (n=18), *NF1* (n= 15) und *PIK3CA* (n=14) identifiziert (Abbildung 18A). Dabei sind alle Mutationen einberechnet, die exklusiv im Primärtumor, exklusiv im Rezidiv und in Primär- und Rezidivtumor identifiziert wurden. In den 65 primären Glioblastomen wurde die *TERT*-Promotormutation am häufigsten detektiert (n=56/65 Tumoren, 86 %). Die *TERT*-Mutationen blieben, mit einer Ausnahme, im Rezidiv bestehen (Abbildung 18B). Mutationen in *EGFR* und *PTEN* wurden ebenfalls häufig sowohl im Primärtumor als auch im korrespondierenden Rezidivtumor identifiziert. Von 41 gefundenen *EGFR*-Mutationen wurden 19 sowohl im Primär- als auch Rezidivtumor detektiert (46 %). Neun der 41 *EGFR*-Mutationen (22 %) wurden exklusiv im Primärtumor und 13 (32 %) exklusiv im Rezidivtumor gefunden. Mutationen in *PTEN* wurden insgesamt 31-mal identifiziert, wobei 19 Mutationen (61 %) sowohl im Primär- als auch Rezidivtumor detektiert wurden. Acht der 31 *PTEN*-Mutationen (26 %) wurden exklusiv im Primärtumor und vier (13 %) exklusiv im Rezidivtumor gefunden. Insgesamt wurden 27 *TP53*-Mutationen und 14 *PIK3CA*-Mutationen in Primär- und Rezidivtumor gefunden. In den Rezidivtumoren wurden dreimal so häufig exklusive *TP53* (7/27, 26 %)- bzw. *PIK3CA* (3/14, 21 %)-Mutationen identifiziert im Vergleich zu exklusiven *TP53*- bzw. *PIK3CA*-Mutationen in Primärtumoren (2/27 bzw. 1/14 Mutationen, beides 7 %). Die Mehrheit der 15 identifizierten *NF1*-Mutationen und acht *ATRX*-Mutationen wurden exklusiv in den Rezidivtumoren detektiert (*NF1*: 9/15, 60 %; *ATRX*: 6/8, 75 %). Mutationen in *PDGFRA*

Ergebnisse

wurden in acht Primärtumoren identifiziert, wovon nur noch zwei Mutationen in den zugehörigen Rezidivtumoren nachzuweisen waren (2/8, 25 %).

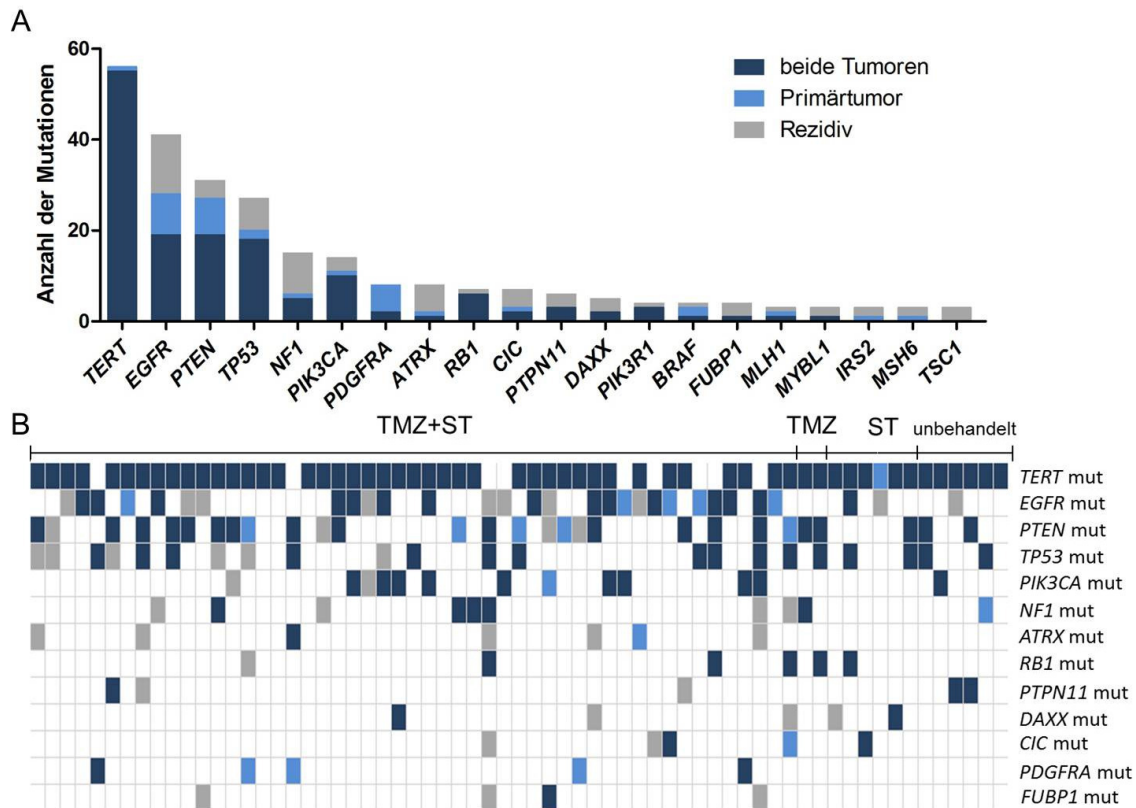


Abbildung 18: Mutationsprofile von Primär- und Rezidivtumoren von 65 Glioblastompatienten. **A)** Anzahl der Mutationen pro Gen, die in beiden Tumoren (dunkelblau), nur im Primärtumor (hellblau) oder nur im Rezidiv (grau) gefunden wurden. In den Genen *TERT*, *EGFR*, *PTEN*, *TP53*, *NF1* und *PIK3CA* wurden am häufigsten Mutationen detektiert. Es wurden nur Gene abgebildet, in denen mehr als zweimal Mutationen gefunden wurden. **B)** Darstellung der Mutationen in den 65 Patienten (pro Patient eine Spalte), die nach den verschiedenen postoperativen Behandlungen gruppiert wurden (TMZ+ST = Temozolomid und Strahlentherapie, TMZ = nur Temozolomid, ST = nur Strahlentherapie). Es wurden nur solche Gene (rechte Spalte) aufgelistet, in denen mindestens vier Mutationen gefunden wurden. Mutationen in Primär- und Rezidivtumoren sind dunkelblau markiert. Mutationen, die nur in Primärtumoren gefunden wurden, sind hellblau markiert. Mutationen, die nur im Rezidiv identifiziert wurden, sind grau koloriert. *TERT*-Promotormutationen wurden in 86 % der Glioblastome identifiziert. In nur einem Fall konnte die im Primärtumor vorhandene *TERT*-Promotormutation im Rezidiv nicht mehr nachgewiesen werden. Zwei *TP53*-Mutationen in zwei Primärtumoren waren in den zugehörigen Rezidiven nicht mehr vorhanden. Beide Primärtumoren trugen jeweils eine weitere *TP53*-Mutation, die im Rezidiv weiter nachzuweisen war. In den unbehandelten Fällen ist nur eine neu hinzugewonnene Mutation in den Rezidiven identifiziert worden. mut: Mutation.

3.3.2 Genkopiezahlveränderungen in Primär- und Rezidivglioblastomen

Neben somatischen Mutationen sind in Glioblastomen auch eine Vielzahl von chromosomalen Imbalancen (CNVs) bekannt, die auch für den Vergleich von genomischen Veränderungen in Primär- und Rezidivtumorkomplexen herangezogen wurden (Abbildung 19). Die Sequenzierungsergebnisse von wenigen Fällen konnten nicht in die

CNV-Analyse miteinbezogen werden, da die Streuung der Amplikonabdeckung zu groß war und eine eindeutige Aussage über Amplifikation oder Deletion nicht möglich war (keine Daten für den Rezidivtumor Gliom-Panel2: R1NLP8V6, 6317N, 3146L, Bev7, 3490E, J81VQ8XJ, R2IO4Z52; keine Daten für Glioma-Panel1: Bev9, J81VQ8XJ, R2IO4Z52). In den 65 untersuchten Tumorkpaaren (Primärtumor und korrespondierendes Rezidiv) wurden insgesamt 63,6 % der identifizierten CNVs sowohl im Primärtumor als auch im zugehörigen Rezidivtumor gefunden. 23,8 % der CNVs wurden exklusiv in den Primärtumoren und 13,8 % exklusiv in den Rezidiven detektiert. In sieben Tumorkpaaren wurden keine CNVs in den sequenzierten Regionen detektiert. In 18 Tumorkpaaren wurden identische CNVs in Primärtumor und Rezidiv identifiziert (Chemo- und Strahlentherapie: 15 Patienten, Strahlentherapie: ein Patient, keine Therapie: zwei Patienten). In 40 Patienten wurden Unterschiede in CNVs zwischen Primärtumor und Rezidiv gefunden (Chemo- und Strahlentherapie: 31 Patienten, Strahlentherapie: vier Patienten, Chemotherapie: zwei Patienten, keine Therapie: drei Patienten). Am häufigsten wurde ein Gewinn von DNA-Sequenzen auf Chromosom 7 detektiert (40/65, 62 %). Insgesamt vier Gene bzw. Genregionen (*EGFR* [kodierende Region], *PMS2* [kodierende Region], *MET* [Genregion] und *CDK6* [Genregion]) sind auf Chromosom 7 lokalisiert und wurden mit Gliompanel 1 und 2 abgedeckt. Die Detektion des Chromosom-7-Gewinns erfolgte mittels CNV-Analyse dieser Gene. In acht der 40 Fälle (20 %) konnte der Chromosomen-7-Gewinn im Rezidiv nicht mehr nachgewiesen werden. In 32 der 65 Primärtumoren (49%) wurde eine *EGFR*-Amplifikation detektiert. In vier der zugehörigen Rezidivtumoren (12,5 %) konnte die Amplifikation nicht mehr nachgewiesen werden und in einem Rezidivtumor wurde eine *EGFR*-Amplifikation exklusiv gefunden, die im Primärtumor nicht nachweisbar war. Vierundzwanzig Primärtumoren (37 %) zeigten *PTEN*-Deletionen, in sechs Rezidiven (25 %) wurden die im Primärtumor vorhandenen *PTEN*-Deletion nicht mehr detektiert. Homozygote *CDKN2A/B*-Deletionen wurden überwiegend in den Primärtumoren (18/65) detektiert. Elf der 18 homozygoten *CDKN2A/B*-Deletionen (61 %) konnten nicht mehr im Rezidivtumor detektiert werden. Die *EGFRvIII*-Variante bzw. Amplifikation von *CDK4* wurde in 12/65 (18 %) bzw. 9/65 (14 %) der Primärtumoren detektiert. Vier von zwölf *EGFRvIII*-Varianten (33 %) bzw. zwei der elf *CDK4*-Amplifikationen (18 %) konnten nicht mehr in den Rezidivtumoren identifiziert werden. Amplifikationen von *PDGFRA* wurden in 4/65 (6 %) Primärtumoren identifiziert und alle wurden auch in den zugehörigen Rezidiven nachgewiesen. In zwei Rezidivtumoren wurden *PDGFRA*-Amplifikationen neu hinzugewonnen. Amplifikationen von *MDM2* wurden in 6/65 (9 %) Primärtumoren identifiziert, wovon fünf in den Rezidiven erhalten blieben. Deletionen von *IRS2* und *RB1* wurden in 7/65 (11 %) bzw. 6/65 (9 %) der Primärtumoren detektiert. Vier der sieben *IRS2*-Deletionen wurden nicht mehr im

Ergebnisse

Rezidiv nachgewiesen (57 %). Dafür wurden drei neue *IRS2*-Deletionen exklusiv in weiteren Rezidivtumoren identifiziert. Die fünf *RB1*-Deletionen wurden in allen Rezidiven nachgewiesen und zusätzlich wurden zwei neue *RB1*-Deletionen hinzugewonnen. Ein Gewinn von *CIC* (19q13.2) wurde in insgesamt zehn Primärtumoren identifiziert. In 80 % (8/10) wurde der Gewinn von *CIC* auch im Rezidivtumor identifiziert. In den TMZ-behandelten Fällen wurden insgesamt 196 CNVs in den Primärtumoren nachgewiesen. Von den 196 CNVs wurden 70 % (139/196) auch in den zugehörigen Rezidiven identifiziert. In den zwölf TMZ-unbehandelten Primärtumoren wurden 21 CNVs detektiert, wovon 90 % in den Rezidiven erhalten blieben.

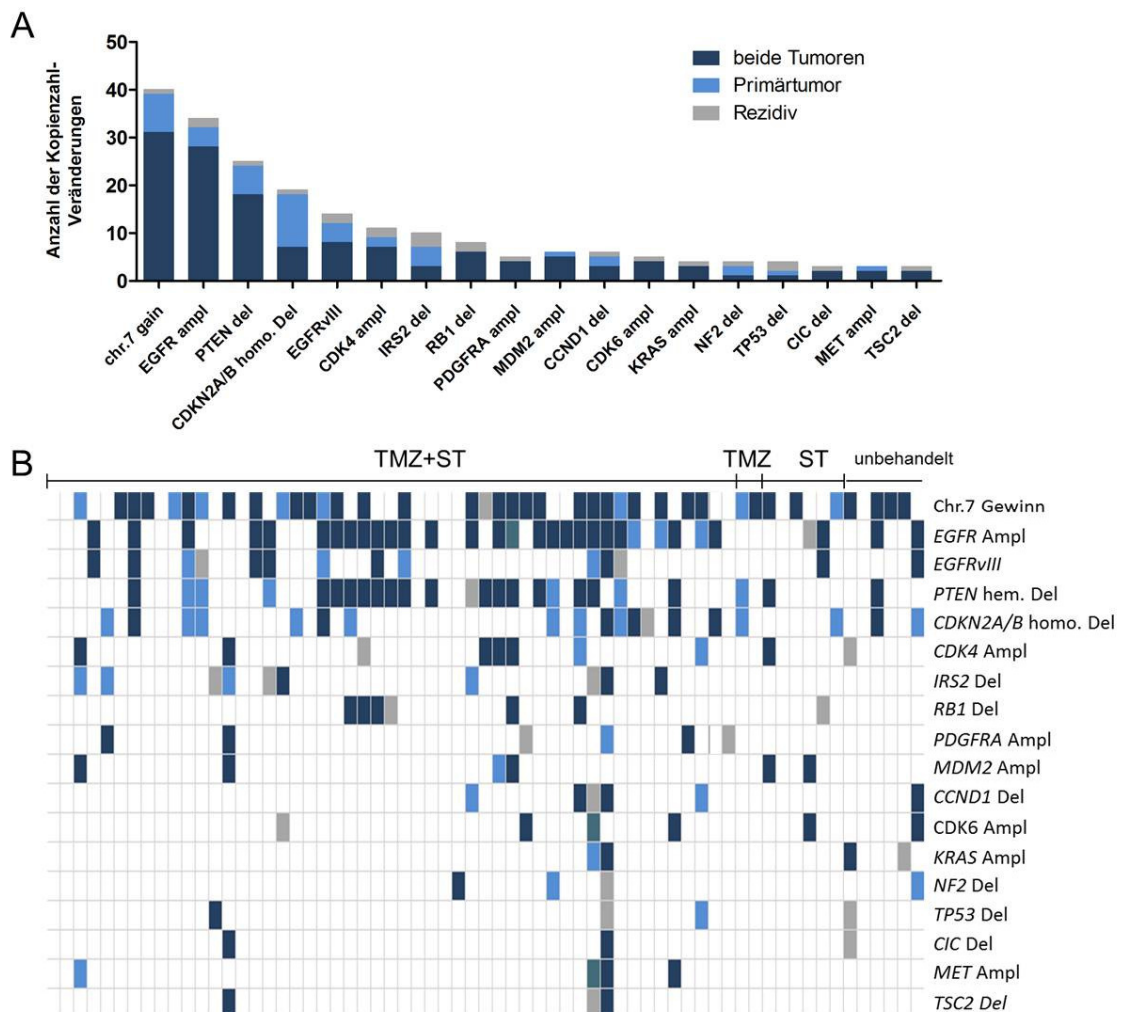


Abbildung 19: CNV-Profil der Glioblastom-Tumorpaae. A) Anzahl der CNVs, die in beiden Tumoren gefunden wurden (dunkelblau), nur im Primärtumor (hellblau) oder nur im Rezidiv (grau). Insgesamt wurden 65 Tumorpaae untersucht. Die Kopienzahlen der Gene *EGFR* und *PTEN* sind am häufigsten verändert. In mindestens zehn Patienten wurden Veränderungen in *CDKN2A/B*, *EGFRvIII*, *PDGFRA*, *IRS2* und *CDK4* detektiert. Es wurden nur Gene abgebildet, in denen häufiger als dreimal Veränderungen gefunden wurden (Gewinn von Genen nicht abgebildet). Es wurden nur Amplifikationen und Deletionen abgebildet. (Ampl= Amplifikation, Del= Deletion. **B)** Patienten (pro Patient eine Spalte) sind nach den verschiedenen Behandlungen sortiert (TMZ+ST= Temozolomid und Strahlentherapie, TMZ= nur Temozolomid, ST= nur Strahlentherapie). Es sind nur solche

Ergebnisse

CNVs aufgelistet, die häufiger als dreimal vorkommen. CNVs in beiden Tumorgruppen sind dunkelblau markiert. CNVs, die nur im Primärtumor gefunden wurden, sind hellblau markiert. CNVs, die nur im Rezidiv nachgewiesen wurden, sind grau koloriert (grüne Felder = Primär- oder Rezidivtumor nicht auswertbar). Chromosom-7-Gewinn und *EGFR*-Amplifikation sind die häufigsten CNVs in den sequenzierten Glioblastomen und sind größtenteils in den Rezidiven auch nachweisbar. In 64 % aller *CDKN2A*-deletierten Glioblastome ist der Verlust im Rezidivtumor nicht mehr identifizierbar. In den unbehandelten Fällen wurden - mit zwei Ausnahmen - alle in den Primärtumoren vorkommenden CNVs auch in den Rezidiven identifiziert. Zusätzlich wurden exklusive CNVs in den Rezidiven detektiert. Ampl: Amplifikation, Del: Deletion, homo.: homozygot, hem.: hemizygot.

Insgesamt wurden 61 % der Mutationen und CNVs sowohl im Rezidiv- als auch im Primärtumor detektiert. 18 % der SNVs und CNVs wurden exklusiv in den Primärtumoren und 21 % exklusiv in Rezidivtumoren nachgewiesen. In insgesamt zehn Fällen wurden exakt dieselben Varianten (SNVs und/oder CNVs), im Primärtumor und auch im Rezidiv detektiert. Dazu zählten sowohl unbehandelte als auch TMZ-therapierte Tumorkpaare (Tabelle 20). In den meisten TMZ-behandelten Tumorkpaaren (55 %) wurden aber auch Varianten ausschließlich im Primärtumor und/oder ausschließlich im Rezidivtumor detektiert. In den TMZ-unbehandelten Fällen wurde in drei Tumorkpaaren (25 %) kein Unterschied im Variantenprofil detektiert. In 17 % der TMZ-unbehandelten Tumorkpaare (2/12) wurden nur exklusive Varianten im Primärtumor identifiziert, wohingegen in 33 % der TMZ-unbehandelten Tumorkpaare (4/12) nur exklusive Varianten in den Rezidiven detektiert wurden.

Tabelle 20: Verteilung der mittels Gen-Panel-Sequenzierung detektierten Varianten in den 65 untersuchten Tumorkpaaren, abhängig von der TMZ-Behandlung.

	TMZ-behandelt n=53	ohne TMZ- Behandlung n=12
Primär- und Rezidivtumorkpaare mit identischem Variantenprofil n=10	15,1 %	25,0 %
Tumorkpaare mit Varianten, die nur im Primärtumor auftraten n= 13	18,9 %	16,7 %
Tumorkpaare mit Varianten, die nur im Rezidiv auftraten n=10	11,3 %	33,3 %
Tumorkpaare mit Varianten, die nur im Primärtumor oder nur im Rezidiv auftraten n=32	54,7 %	25,0 %

3.3.3 *Veränderte Signalwege in Primär- und Rezidivtumoren*

Die Varianten in Primärtumoren bzw. ihren Rezidiven geben einen Hinweis darauf, welche Signalwege und Mechanismen für die Tumorprogression wichtig sind. In beiden Tumorgruppen wurden hauptsächlich Varianten in solchen Genen identifiziert, die Proteine des RTK-PI3K-mTOR-Signalweges (n=117 Varianten), oder des Zellzyklus bzw. Apoptosesignalweges (n=71 Varianten) kodieren (Tabelle 21). Zu ähnlichen Teilen konnten exklusive Varianten von Genen, die am Apoptosesignalweg beteiligt sind, im Primär- bzw. Rezidivtumor beobachtet werden, wohingegen Mutationen im *TERT*-Promotor mit einer Ausnahme in allen Tumoren (n=56) bestehen blieben. Mutationen im RTK-PI3K-mTOR-Signalweg wurden als exklusive Varianten häufiger in Primärtumoren (n=45) als in Rezidivtumoren (n=31) nachgewiesen. Mutationen von Genen, die MAPK-Signalweg-Proteine kodieren oder mit diesen assoziiert sind, wurden sowohl in Primär- als auch im korrespondierenden Rezidivtumor detektiert (n=15). In den Rezidivtumoren wurden insgesamt 12 Varianten detektiert, die in den dazugehörigen Primärtumoren nicht zu finden waren. Insgesamt 13 Varianten wurden in den transkriptionellen Regulationsgenen *CIC* bzw. *FUBP1* jeweils in Primärtumoren und zugehörigen Rezidivtumoren identifiziert, wobei exklusive Mutationen in zwei Primärtumoren und neun Rezidivtumoren gefunden wurden. Sowohl für Gene des *Mismatch*-Reparaturweges als auch für den Insulin-Signalweg wurden drei bzw. vier Varianten in beiden Tumorgruppen identifiziert. Exklusive *IRS2*-Varianten in Primär- oder Rezidivtumor wurden zu gleichen Teilen gefunden. Mutationen in den Transkriptionsfaktor-kodierenden Genen *MYB* und *MYBL1* wurden in vier Primär-/Rezidivtumorkombinationen bzw. nur in Rezidivtumoren (n=3) detektiert. Mutationen in *H3F3A* waren in zwei Patienten im Primär- und Rezidivtumor vorhanden. Veränderungen in *DAXX* bzw. *ATRX* wurden hauptsächlich in den Rezidivtumoren (n=9) und Primär-/Rezidivtumorkombinationen (n=6) identifiziert. In allen wichtigen Glioblastom-Signalwegen wurden Varianten sowohl im Primärtumor als auch im Rezidiv detektiert. Hauptsächlich waren solche Gene verändert, die mit dem RTK-PI3K-mTOR-Signalweg, dem Zellzyklus bzw. der Telomerlängenregulation assoziiert sind.

Tabelle 21: Veränderte Signalwege und Anzahl der detektierten Varianten in Primär- und Rezidivtumoren

Signalweg/ Mechanismus	Gene	Anzahl Varianten in Primär- und Rezidiv- tumoren	Anzahl Varianten nur im Primär- tumor	Anzahl Varianten nur im Rezidiv- tumor
Zellzyklus bzw. Apoptose Regulation	<i>TP53, RB1, CDK4/6, CCND1-3, MDM2/4, CDKN2A/C, PPM1D</i>	71	23	22
RTK-PI3K-mTOR	<i>EGFR, PTEN, PIK3CA, PIK3R1, PIK3C2B, PDGFRA, MET</i>	117	45	31
Telomer	<i>TERT</i>	56	1	0
MAPK-Signalweg	<i>NRAS, BRAF, KRAS, NF1</i>	15	4	12
Transkriptionale Regulation	<i>CIC, FUBP1</i>	13	2	9
Insulin-Signaling	<i>IRS2</i>	3	5	5
Mismatch- Reparatur- mechanismus	<i>MSH2/6, MLH1, PMS2</i>	4	2	4
Transkriptions- faktoren	<i>MYBL, MYB</i>	4	0	3
Histonmodifikation	<i>H3F3A</i>	2	0	0
Telomerregulation Chromatin- Remodeling	<i>ATRX, DAXX</i>	5	1	9

Varianten: Mutationen, Amplifikationen, Deletion und Gewinne

3.3.4 Austausch von Varianten im selben Gen

Beim Vergleich der Varianten zwischen den Tumorkpaaren wurden mehrere Austausche von Varianten im selben Gen zwischen Primär- und Rezidivtumor identifiziert.

Dieses Phänomen konnte in neun von 65 Fällen (14 %) detektiert werden. Am häufigsten wurde ein Austausch im *EGFR*-Gen identifiziert (n=6), weiterhin zweimal in *PTEN* und einmal in *PTPN11*. In sechs Fällen wurde eine Punktmutation durch eine andere

Punktmutation ersetzt (Abbildung 20). In Tumorkörper PCS7KCRW wurde die *PTEN*-Variante p.G165E im Primärtumor mit der p.H123P-Variante im Rezidivtumor ausgetauscht (Abbildung 20A). In Tumorkörper 22B58SJO änderte sich die *PTEN*-Punktmutation von p.M134I zu p.R233X (Abbildung 20B). Tumorkörper 8283F zeigte einen Tausch im *PTPN11*-Gen (Abbildung 20C, p.A461T zu p.E69K). Sowohl in Tumorkörper J1HJST5O als auch in 3196T wurde ein Austausch einer Punktmutation in *EGFR* identifiziert (Abbildung 20D und E, p.R680Q zu p.A289D und p.L62R zu p.G719G). In Tumorkörper LUY2D7W3 wurde sowohl die Punktmutation *EGFR*-p.R521K als auch die *EGFRvIII*-Variante im Primärtumor detektiert. Beide Varianten konnten im Rezidiv nicht mehr nachgewiesen werden, stattdessen die Mutationen p.Y610C und p.T605A.

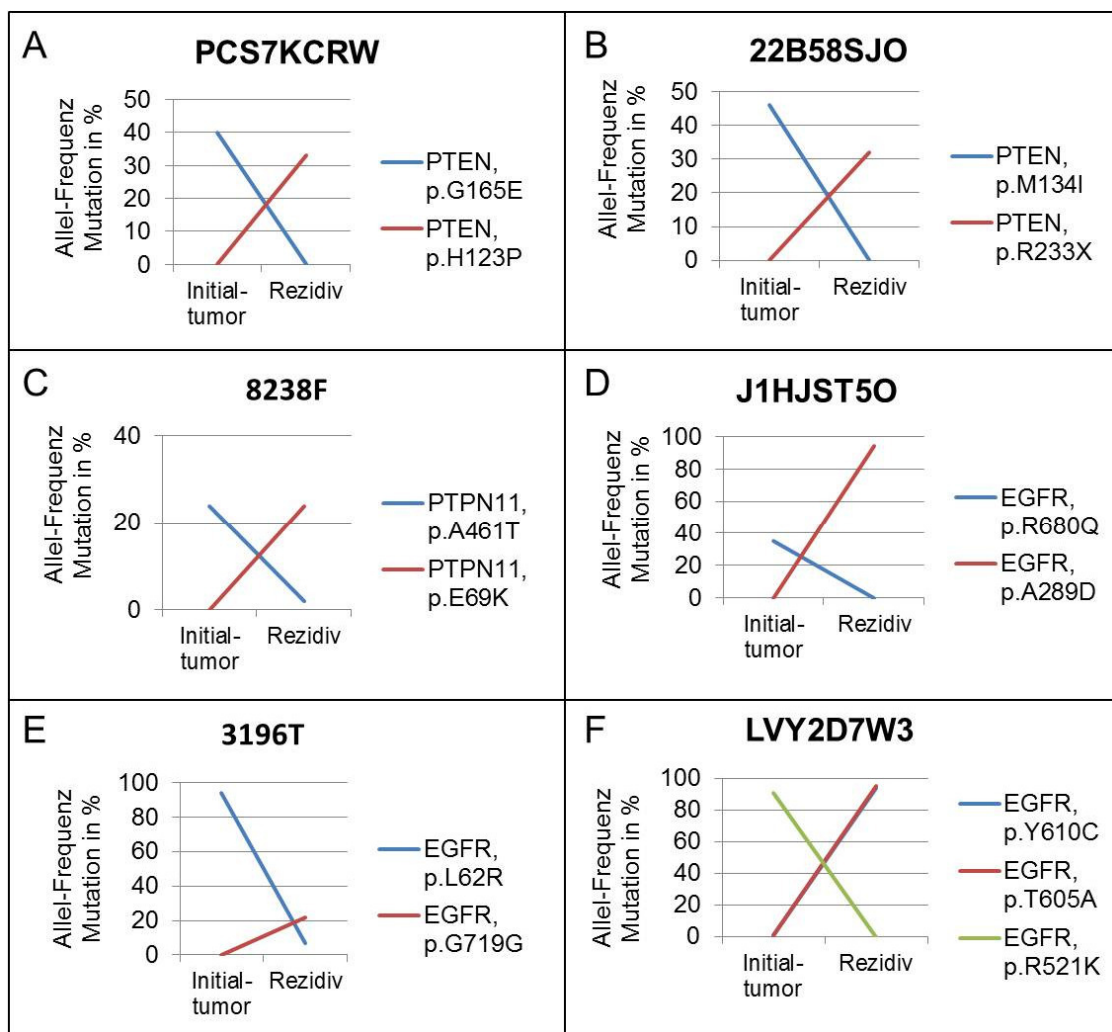


Abbildung 20: Austausch von Mutationen im selben Gen. Mutationen in den Genen *EGFR*, *PTEN* und *PTPN11* im Primärtumor werden durch eine andere Mutation im selben Gen, im zugehörigen Rezidivtumor abgelöst. **A)** Tumorkörper PCS7KCRW: Tausch der Mutation p.G165E zu p.H123P in *PTEN*. **B)** Tumorkörper 22B58SJO: Tausch der Mutation p.M134I zu p.R233X in *PTEN*. **C)** Tumorkörper 8283F: Tausch der Mutation p.A461T zu p.E69K in *PTPN11*. **D)** Tumorkörper J1HJST5O: Tausch der Mutation p.R680Q zu p.A289D in *EGFR*. **E)** Tumorkörper 3196T: Tausch der Mutation p.L62R zu p.G719G in *EGFR*. **F)** Tumorkörper LUY2D7W3: Tausch der Mutation p.R521K zu p.Y610C und p.T605A in *EGFR*.

In den Tumorkpaaren 83RPQTKM und O46ZNY3S wurde ebenso die *EGFRvIII*-Variante durch andere Punktmutationen in *EGFR* abgelöst (p.S229C bzw. p.A289V). In UVT3NUNO wurde der gegenteilige Fall festgestellt. Im Primärtumor wurde die Mutation p.G598V in *EGFR* identifiziert, wohingegen im Rezidiv die *EGFRvIII*-Variante vorhanden war. In Tumorkpaar TPO24OWS wurde eine Amplifikation im Rezeptortyrosinkinasegen im Primärtumor durch eine *EGFR*-Mutation im Rezidiv abgelöst. In 3M1P7VOJ konnte ein *PDGFRA*-Gewinn im Primärtumor detektiert werden, der nicht mehr im Rezidiv zu finden war. Hier wurde eine *EGFR*-Variante detektiert.

3.3.5 *Hypermutationsphänotyp in Rezidiven*

Das Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) alkyliert die Nukleotide Guanin und Adenin, wodurch u. a. O6-Methylguanin entsteht (Agarwala u. Kirkwood 2000). O6-Methylguanin kann durch das Reparaturenzym MGMT aus der DNA entfernt werden, ohne diese zu schädigen (Lips u. Kaina 2001). Wenn O6-Methylguanin nicht vor der DNA-Replikation durch MGMT entfernt wurde, wird Thymin anstatt Cytosin gegenüber dem O6-Methylguanin eingebaut. Diese Basen-Fehlpaarung wird normalerweise von dem *mismatch*-Reparaturmechanismus erkannt. Durch die *mismatch*-Reparaturenzyme kommt es zum Strangbruch der DNA, wodurch der Apoptose-Signalweg induziert und der Zellzyklus-Arrest eingeleitet wird. Insbesondere Rezidivtumoren können eine Therapie-Resistenz entwickeln, indem Mutationen in *Mismatch*-Reparaturgene ausgebildet werden und die zytotoxische Wirkung des Chemotherapeutikums dadurch ausbleibt. Bei inaktiven Reparaturenzymen bleibt es bei der Fehlpaarung von Thymin und O6-Methylguanin. Dies führt zur einer erhöhten Anzahl an C>T (A>G)-Transitionen im Genom und wird als Hypermutationsphänotyp bezeichnet (Yip et al. 2009). In dieser Arbeit wurden Rezidivtumoren hinsichtlich ihrer Anzahl an C>T-Transitionen untersucht und mit der Anzahl an C>T-Transitionen im Primärtumor verglichen. C>T-Transitionen (bzw. A>G) wurden als häufigste Mutation in allen untersuchten Tumoren detektiert (Abbildung 21). Sie machten ca. 60 % der Basenaustausche aus. Somatische Mutationen im Primär- als auch Rezidivtumor und exklusive Mutationen in Rezidivtumoren wurden in 62 % bzw. 65 % als C>T-Transitionen identifiziert und sind damit etwas häufiger im Vergleich zur Anzahl der exklusiven C>T Mutationen im Primärtumor (57 %). Die weiteren Nukleotid-Veränderungen A>G (T>C), G>C (C>G), C>A (G>T), A>C (T>G) und A>T (T>A) traten mit jeweils geringeren Frequenzen von 0-18 % auf.

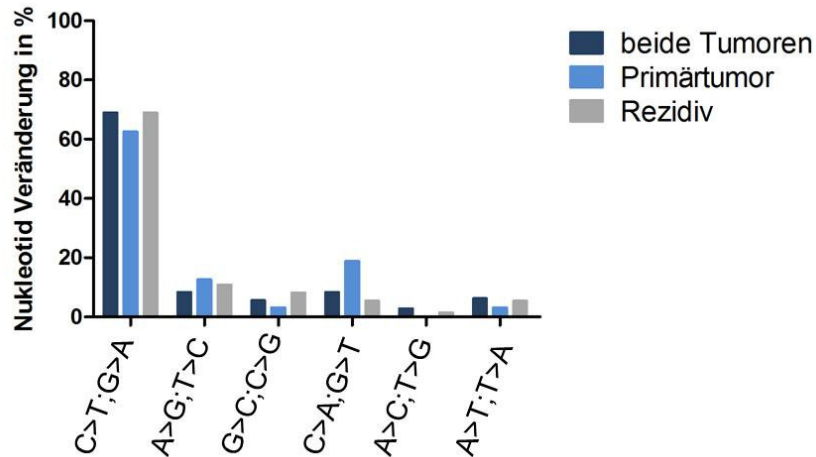


Abbildung 21: Prozentuale Anzahl der Nukleotid-Veränderungen. Die gemeinsamen Mutationen in Primär- und Rezidivtumor wurden größtenteils (65 %) als C>T-(G>A)-Transitionen identifiziert (dunkler blauer Balken, links). Exklusive Mutationen in den Rezidivtumoren wurden zu 62 % als C>T-Transitionen identifiziert (grauer Balken, links) und exklusive Mutationen in den Primärtumoren zu 56 % (hellblauer Balken, links). Damit war der prozentuale Anteil an C>T-(G>A)-Transitionen in den Primärtumoren etwas geringer im Vergleich zum C>T-Anteil in den Rezidivtumoren. Weitere Nukleotid-Veränderungen (A>G, G>C, C>A, A>C und A>T) traten mit einer geringeren Frequenz auf.

C>T-Transitionen sind häufig in Tumoren zu finden, die das *Mismatch*-Reparatursystem deaktiviert haben. Daher wurden die sechs Tumorkaare selektiert, in denen Mutationen in den *Mismatch*-Reparaturgenen *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* bzw. *PMS2* gefunden wurden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Tumorkaare mit Mutationen in DNA-*Mismatch*-Reparaturgenen.

Tumorkaar	Gen	Mutation	Frequenz PT %	Frequenz Rez %
6927CJ4D	<i>MLH1</i>	c.A655G:p.I219V	40	46
Bev7	<i>MLH1</i>	c.G166A:p.E56K	0	4
J81VQ8XJ	<i>PMS2</i>	c.G2016A:p.M672I	10	8
V4F52K0W	<i>PMS2</i>	c.T1480G:p.S494A	66	68
MKY181CY	<i>MSH6</i>	c.G278A:p.G93E	0	28
MKY181CY	<i>MSH6</i>	c.G318A:p.W106X	0	29
3490e	<i>MSH2</i>	c.1718delC:p.A573fs	91	94
3490e	<i>MSH2</i>	c.G82A:p.E28K	0	53

PT.: Primärtumor, Rez.: Rezidivtumor

Der Primär- als auch Rezidivtumor von Tumorkaar 6927CJ4D zeigte eine *MLH1* Mutation mit einer Allelfrequenz von 40 % bzw. 46 %. Im Tumorkaar konnte keine erhöhte Anzahl

an C>T-Transitionen festgestellt werden. Im Rezidiv von 6927CJ4D wurden nur zwei exklusive Mutationen in *TP53* (c.C628T:p.R210X) und *ATRX* (c.A5465G:p.N1822S) identifiziert, wovon nur eine Mutation eine C>T-Transition aufweist. Im Rezidiv von Tumorkörper Bev7 war eine *MLH1*-Mutation mit einer Allelfrequenz von 4 % nachweisbar. Hier wurden keine weiteren exklusiven Mutationen detektiert. In den Tumorkörpern V4F52K0W und J81VQ8XJ wurden Varianten im *PMS2*-Gen detektiert. In den Rezidivtumoren wurde eine *frameshift*-Deletion in *NF2* (exon2:c.139_143del:p.F47fs) bzw. keine weitere exklusive Variante detektiert. In zwei weiteren Tumorkörpern 3490e und MKY181CY wurden Mutationen in *MSH2* bzw. *MSH6* detektiert (Tabelle 23 und Tabelle 24). Beide Fälle zeigten eine erhöhte Anzahl an exklusiven Varianten (21 Mutationen bzw. acht Mutationen) in dem jeweiligen Rezidivtumor. Im Rezidiv 3490e konnten 95 % dieser Varianten als C>T-(G>A)-Transitionen in 13 verschiedenen Genen identifiziert werden. Im Rezidivtumor vom Gliompaar MKY181CY zeigten alle acht Varianten Cytosin- zu Thymin-Veränderungen. In zwei Fällen von 51 Temozolomid-behandelten Tumoren (4 %) wurde der hypermutierte Phänotyp festgestellt. Eine hohe Anzahl an C>T-Transitionen im Rezidivtumor konnte in den Fällen mit *MSH2* bzw. *MSH6*-Mutationen ermittelt werden. Die detektierten Mutationen in den *mismatch*-Genen *PMS2* und *MLH1* zeigten diesen Effekt nicht.

Tabelle 23: Exklusive Mutationen im Rezidivtumor von Tumorkörper 3490e.

Gen	Aminosäure-austausch	Frequenz PT %	Frequenz RT %	Basenaustausch
<i>MSH2</i>	p.E28K	0	53	G>A
<i>FUBP1</i>	p.P493S	0	5	C>T
<i>NRAS</i>	p.D108N	0	19	G>A
<i>PIK3R1</i>	exon8:c.1019+1G>A	0	28	+1G>A
<i>EGFR</i>	p.G682D	0	7	G>A
<i>EGFR</i>	p.S1162N	0	6	G>A
<i>NF1</i>	p.A702V	0	17	C>T
<i>NF1</i>	p.V1371M	0	6	G>A
<i>NF1</i>	p.G1481S	0	7	G>A
<i>CIC</i>	p.P1292L	0	21	C>T
<i>CIC</i>	exon18:c.6922+1G>A	0	8	+1G>A
<i>ATRX</i>	p.D1174N	0	5	G>A

Ergebnisse

<i>ATRX</i>	p.G189R	0	10	G>A
<i>MYBL1</i>	p.N473D	0	29	A>G
<i>MYBL1</i>	p.A445T	0	4	G>A
<i>NTRK2</i>	p.S167F	0	18	C>T
<i>TSC1</i>	p.R902K	0	33	G>A
<i>TSC1</i>	p.L360F	0	5	C>T
<i>TSC1</i>	p.P118S	0	8	C>T
<i>IRS2</i>	p.P712L	0	15	C>T
<i>TSC2</i>	exon4:c.226-1G>A	0	48	-1G>A

95 % der Varianten im Rezidiv waren C>T bzw. G>A Transitionen. PT.: Primärtumor, Rez.: Rezidivtumor.

Tabelle 24: Exklusive Mutationen im Rezidivtumor von Tumorkörper MKY181CY

Gen	Aminosäure-austausch	Frequenz PT %	Frequenz RT %	Basenaustausch
<i>FUBP1</i>	p.P638S	0	4	C>T
<i>PIK3CA</i>	p.E503K	0	5	G>A
<i>NF1</i>	p.W1258X	0	7	G>A
<i>NF1</i>	p.P2782S	0	24	C>T
<i>ATRX</i>	p.E1171K	0	24	G>A
<i>MSH6</i>	p.G93E	0	28	G>A
<i>MSH6</i>	p.W106X	0	29	G>A
<i>CDK4</i>	exon3:c.218+1G>A	0	22	+1G>A

100 % der Varianten im Rezidiv waren C>T bzw. G>A Transitionen. PT.: Primärtumor, Rez.: Rezidivtumor.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Gen-Panel-Sequenzierung

Die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems aus dem Jahr 2016 integriert histologische Merkmale und genetische Veränderungen für die Diagnostik von malignen Gliomen (Louis et al. 2016). Neu entdeckte molekulare Veränderungen erweitern stetig das Spektrum von potentiellen Biomarkern in Gliomen und genetische Profile werden im Hinblick auf diagnostische, prognostische und prädiktive Aussagen für den einzelnen Patienten immer wichtiger (Weller et al. 2015; Reifenberger et al. 2016). Bisher werden molekulare Biomarker jeweils einzeln mittels gezielter Analysetechniken wie Immunhistochemie, Sanger-Sequenzierung, DNA-Pyrosequenzierung, DNA-Fragmentanalysen, z.B. Mikrosatellitenpolymorphismus-Analysen, oder FISH-Untersuchungen in der neuropathologischen Diagnostik detektiert. Für die verschiedenen Methoden sind zum einen größere Mengen an Tumorgewebe erforderlich und zum anderen sind oftmals multiple Markerbestimmungen notwendig, was den Arbeitsaufwand und die Kosten erhöht. Durch die stetige Weiterentwicklung der Hochdurchsatz-Sequenzierung ist heutzutage eine Implementierung dieser Technik in die medizinische diagnostische Routine möglich (MacLean et al. 2009; Rehm 2013; Yang et al. 2014; Børsting u. Morling 2015; Vemula et al. 2016). Die NGS-Plattformen können dabei die vielen einzelnen Routinemethoden ablösen, da zahlreiche genetische Veränderungen auf einmal detektiert werden können. Durch die Gen-Panel-Sequenzierung kann zudem die Zeitspanne von der Operation des Patienten bis zur umfassenden histologischen und molekularen Diagnosestellung gesenkt werden. Darüber hinaus können die Kosten, auf die Menge der zu untersuchenden Biomarker gerechnet, geringer gehalten werden. Die Gen-Panel-Sequenzierung mittels Ion Torrent™- bzw. Proton™-Plattformen erlaubt Sequenzierungen ab einer Gesamtmenge von nur 10 ng DNA, wodurch nur wenig Tumormaterial, wie z. B. im Falle von Stereotaxie-Proben, nötig ist. NGS-Bibliotheken können mit Barcode-Adapter versehen werden, sodass eine Sequenzierung von mehreren Proben gleichzeitig möglich ist. Das Design von Gen-Panels, z.B. mittels des *AmpliSeq*™-Designers, ermöglicht die Abdeckung von kurzen Zielregionen, wodurch kurze DNA-Fragmente, wie sie bei degradiertem DNA aus FFPE-Gewebeproben vorliegen, erfolgreich amplifiziert werden können. Ein weiterer Vorteil der Amplikon-basierten *Next-Generation*-Sequenzierung von Genen oder Genregionen ist die hohe Sequenzabdeckung, wodurch insbesondere somatische Varianten spezifisch und sensitiv

detektiert werden können. Die Etablierung der Gen-Panel-Sequenzierung in der diagnostischen Routine beinhaltete u.a. die Überprüfung der Validität der detektierten Varianten, der Genauigkeit der Sequenzierung und die Bestimmung der Sequenzierungstiefe. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzierungsdaten von 121 Gliomen ausgewertet und hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Das Ergebnis der Validierung und erkannte methodische Herausforderungen werden in den nächsten Kapiteln diskutiert. Des Weiteren wurde der Arbeitsablauf der Panelsequenzierung dargestellt, und folglich wird die Implementierung der Panelsequenzierung für die diagnostische Routinediagnostik erörtert.

4.1.1 Methodische Herausforderungen der Gen-Panel-Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das selbstdesignte Gliompanel (IAD39893_33), das 20 häufig mutierte Genregionen in Gliomen abdeckt, für die molekulare Diagnostik von Gliomen etabliert und validiert. Das Ziel der Untersuchungen war es, eine neue Sequenzierungsmethode zur sensitiven und spezifischen Detektion von somatischen Mutationen und Kopienzahlveränderungen (CNVs) in Gliomen zu entwickeln. Der Methodenablauf begann mit der Optimierung der DNA-Extraktion aus routinemäßig für die neuropathologische Diagnostik asserviertem Tumormaterial. Die Formalin-Fixierung und die Einbettung von Tumorgewebe in Paraffin (sogenannte FFPE-Proben) induzieren eine Degradierung von Nukleinsäuren, wodurch die aus FFPE-Tumorproben isolierte DNA häufig nur aus kleinen DNA-Fragmenten besteht (Gilbert, M Thomas P et al. 2007). Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR). Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente von 87-bp Länge amplifiziert und quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung von FFPE-DNA mittels qRT-PCR zeigte zum Teil geringere Werte als die mit dem Qubit™-System fluorometrisch ermittelten DNA-Konzentrationen. In diesen Fällen könnte es sich um stark degradierte DNA-Proben gehandelt haben, die mittels Qubit™-Verfahren zu hoch konzentriert eingeschätzt wurden. Mittels Qubit™ wird doppelsträngige DNA unabhängig von ihrer Länge gemessen, wodurch auch kleinere DNA-Fragmente mit dieser Methode erfasst werden können (Thermo Fisher Scientific 2010). Im Gegensatz dazu werden mittels qRT-PCR nur solche Fragmente erfasst, die mindestens 87-bp groß sind und beide Bindestellen für das verwendete Primerpaar enthalten. Da der Grad der DNA-Degradierung in jeder Probe unterschiedlich hoch sein konnte, wurde die Konzentration von FFPE-DNA und zellfreier-DNA (cfDNA) aus Blutplasma mittels qRT-PCR quantifiziert. Die qRT-PCR dauerte im Arbeitsablauf ca. drei Stunden länger als die Qubit-Messung, jedoch konnte auf diese

Weise verhindert werden, dass zu wenig amplifizierbare DNA in die nachfolgende Multiplex-PCR eingesetzt wurde. Wenn möglich, sollte auf den Einsatz zu stark degradierter DNA verzichtet werden, da sich in den damit durchgeführten Sequenzierungen gezeigt hat, dass NGS-Bibliotheken dann häufig nicht erfolgreich erstellt werden konnten. Dies wurde auch bei der Verwendung von cfDNA aus Blutplasma beobachtet. Zellfreie Tumor-DNA besteht aus kleinen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten, welche aus apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen freigesetzt werden (Jahr et al. 2001). Die cfDNA kann aus Blutplasma extrahiert werden, wodurch eine nicht-invasive, molekulare Tumordiagnose möglich ist (Bennett et al. 2016; Cheng et al. 2016). Mittels *AmpliSeq-Designer* können seit Mitte 2016 spezifische cfDNA-Gen-Panels mit kleineren Zielregionen erstellt werden, sodass auch stark degradierte DNA eingesetzt werden kann. Das Ausmaß der DNA-Degradierung kann mittels Qualitätsanalyse-Systemen, wie dem *Fragment-AnalyzerTM* (Advanced Analytical Technologies) oder dem *Tape Station Instrument* (Agilent Technologies), vor der Bibliothekserstellung untersucht werden. Diese zusätzliche Qualitätsanalyse steigert die Kosten pro Probe, jedoch könnte in der zertifizierten Routinediagnostik eine erfolgreiche Sequenzierung über die DNA-Qualität gewährleistet werden. Diese DNA-Qualitätsanalyse wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen allerdings nicht durchgeführt. Hingegen wurden die erstellten NGS-Bibliotheken über den *Agilent Bioanalyzer* qualitativ ausgewertet. Hier zeigten sich Qualitätsunterschiede zwischen NGS-Bibliotheken, die aus intakter oder stark degradierter DNA generiert wurden. Erfolgreich erstellte Bibliotheken aus degradierter DNA konnten zwar sequenziert werden, jedoch wurden gehäuft falsch-positive Varianten mit geringer Frequenz detektiert. Diese Varianten mussten zeitaufwendig im *IG-Viewer* visuell begutachtet werden. Zusätzlich zeigte sich eine hohe Streuung der Amplikonabdeckung, wodurch eine Kopienzahl-Analyse bei Proben mit stark-degradierter DNA teilweise nicht möglich war.

In den für diese Arbeit durchgeführten neun Ion PGMTM- und fünf Ion ProtonTM-Läufen wurden im Durchschnitt mehr als 1,5 Millionen *reads* pro Probe und 2000 *reads* pro Amplikon sequenziert. Diese hohe Abdeckung erlaubte eine hohe Spezifität der Variantendetektion mit einer Allel-Frequenz von 1 %, jedoch wurden dadurch auch falsch-positive Mutationen mit geringer Frequenz detektiert. Der größte Teil der falsch-positiven Varianten wurden als C>T-Artefakte in den sequenzierten FFPE-DNAs identifiziert. Während der Fixierung des Tumorgewebes in Formalin kommt es zur Desaminierungsreaktion, bei der Cytosin in Uracil konvertiert wird (Do u. Dobrovic 2012). Die C>T-Transition ist ein bekanntes Problem in der molekularepathologischen Diagnostik und stellt ein noch größeres Problem für die hoch-sensitive NGS-Technik dar (Do u. Dobrovic 2015). Do und Kollegen wiesen nach, dass die Formalin-induzierten C>T-

Artefakte mittels Uracil-DNA-Glykosylase-(UNG)-Behandlung der aus FFPE-Proben gewonnenen DNA reduziert werden konnten. UNG ist ein Reparaturenzym, welches Uracil aus der DNA hydrolysiert (Longo et al. 1990). Mit der Umstellung auf das *GeneRead DNA FFPE* Kit von Qiagen, welches eine UNG-Behandlung der DNA während der Extraktion beinhaltet, konnten alle C>T-Artefakte eliminiert werden. Die DNA-Extraktionen aus FFPE-Tumormaterial wurden daher nachfolgend ausschließlich mit der UNG-Behandlung durchgeführt, was die Detektion von falsch-positiven Varianten stark reduzierte.

Weitere falsch-positive Varianten wurden in zumeist intronischen Homopolymer-Regionen detektiert. Homopolymer-Fehler entstehen durch ungenaue Strömungssignale, die aus langen Abfolgen desselben Nukleotids resultieren (Bragg et al. 2013). Dieser Fehler ist für unterschiedliche NGS-Plattformen bekannt (Loman et al. 2012; Bragg et al. 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit nur exonische Bereiche analysiert wurden, hatten Homopolymer-Fehler größtenteils keine Auswirkungen auf die Variantendetektion. Andere falsch-positive Varianten wurden an überlappenden Primerbindestellen von zwei Amplikons und nicht vollständigen Sequenzen detektiert. Die falschen Varianten entstehen durch unspezifische Primerbindungen, sogenannte *mispriming events*, während der Multiplex-PCR (McCall et al. 2014). Diese sollten größtenteils durch Algorithmen im Primerdesign eines Gen-Panels ausgeschlossen werden, können allerdings nicht komplett vermieden werden. Da die Detektion der falsch-positiven Varianten reproduzierbar auftrat, wurde eine Liste mit häufigen falsch-positiven Varianten erstellt, mit der detektierte Varianten abglichen und gefiltert wurden. Eine weitere Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Analyse von nur komplett sequenzierten Amplikons, da die meisten *mispriming events* zu kleineren Sequenzlängen führen (McCall et al. 2014). Dies ist allerdings in der Analyse aufwendiger und die Amplikon-Abdeckung würde sinken.

Für die Sequenzierungstechnologien sind neben den falsch-positiven Varianten in Homopolymerbereichen oder Primerbindestellen GC-reiche Amplikons eine große Herausforderung (Quail et al. 2012). GC-reiche Sequenzen bilden häufig sekundäre intramolekulare Strukturen, wodurch eine Amplifikation gehemmt wird (McDowell et al. 1998). In dem verwendeten Gliom-Gen-Panel 1 wurden insgesamt vier GC-reiche Amplikons durchschnittlich mit weniger als 20 *reads* abgedeckt. Mit Wechsel zur verbesserten Sequenzierungsschemie im letzten Protonlauf der Etablierungsphase wurde die Abdeckung von drei dieser Amplikons erhöht. Insgesamt war die Abdeckung in diesem Lauf mit 96 Millionen *reads* sehr hoch. Spätere Protonläufe zeigten weiterhin größtenteils eine ausreichende Abdeckung von *Forward*-Sequenzen im *TERT*-Promotorbereich. In diesem Bereich liegen die zwei häufigen Mutationen chr.5:[g.C1295228T] und [g.C1295250T] in Gliomen, die in anderen Studien nur limitiert

mittels NGS detektiert werden konnten und eine Validierung mittels Sanger-Sequenzierung erforderlich machten (Suzuki et al. 2015; Dubbink et al. 2016). Durch die Verwendung von spezifischen Fusionsprimern wurde die Abdeckung des *TERT*-Amplikons erhöht. Für diese Methode ist jedoch eine zusätzliche PCR pro Probe notwendig. Zusätzlich müssen Barcode-spezifische Fusionsprimer entworfen werden, was ein zusätzlicher Kostenaufwand ist. Insofern wurde dieses Verfahren in den eigenen Untersuchungen nicht dauerhaft eingesetzt. Trotz verbesserter Sequenzierungschemie ließen sich keine *Reverse*-Sequenzen der *TERT*-Promotorregion erzeugen, wodurch die *TERT*-Promotormutationen durch die *Variant-Caller*-Software häufig nicht automatisch detektiert wurden, da die Detektion beide Sequenzierungsrichtungen erfordert. Die Detektion der *TERT*-Mutationen mussten daher visuell über den *IG-Viewer* erfolgen. Zusätzlich wurden die *TERT*-Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Es zeigte sich, dass die beiden *TERT-Hotspot*-Mutationen trotz wenigen *reads* spezifisch detektiert werden konnten. Eine weitere Schwierigkeit der Amplikon-basierten Methode wurde mit den Analysen des zweiten Gliom-Gen-Panels offensichtlich. Die Sequenzierung des Gens *PMS2* konnte nicht zu 100 % gewährleistet werden, da das Pseudogen *PMS2CL* eine Sequenzidentität von Exon 2 und Exon 11-15 zu *PMS2* aufweist (van der Klift, Heleen M et al. 2010). Varianten in diesem Bereich müssten mit *Long-Range-PCRs* validiert werden, bei der große Genbereiche bis 50 kb amplifiziert werden (Clendenning et al. 2006). Dies ist mit DNA aus FFPE-Material nicht umsetzbar, da die DNA degradiert ist und aus zu kleinen DNA-Fragmenten besteht.

Zusammenfassend wurden in der Etablierungsphase der Gen-Panel-Sequenzierung verschiedene Probleme bekannt: Der Einsatz von stark degradiertem DNA (u.a. bei cfDNA oder DNA aus FFPE-Tumormaterial) in die Multiplex-PCR erfordert eine sensitive DNA-Konzentrationsbestimmung mittels qRT-PCR. Zu stark degradierte DNA-Proben können prinzipiell sequenziert werden, jedoch wurden häufiger falsch-positive Varianten detektiert. C>T-Transitionen wurden vermehrt in DNA aus FFPE detektiert, was durch eine Behandlung der DNA mit der Uracil-DNA-Glykosylase behoben werden konnte. Sequenzierungsfehler in Homopolymer-Regionen konnten aufgrund von intronischer Lokalisation außer Acht gelassen werden. Häufige falsch-positive Varianten an Primer-Bindungsstellen wurden reproduzierbar detektiert und dokumentiert. Die *read*-Abdeckung der *TERT*-Promotorregion wurde durch eine neue Sequenzierungschemie verbessert, jedoch musste die Begutachtung der Sequenzen aufgrund von fehlenden *Reverse*-Sequenzen visuell bei IGV erfolgen. Die Sequenzierung von Genen, die homologe Pseudogene aufweisen, erfordert eine Validierung der detektierten Varianten mittels *Long-Range-PCR*. Dies konnte aufgrund der degradierten DNA aus FFPE nicht durchgeführt werden.

4.1.2 Validierung der Gen-Panel-Sequenzierung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Validierung der Resultate, die mit dem NGS-basierten Gliom-Gen-Panel erzielt wurden. Die Sequenzierung von 121 Gliomen verschiedener Entitäten und Malignitätsgrade zeigte eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Sequenzveränderungen. Diagnostisch relevante Mutationen in *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *ATRX*, *CIC*, *PTEN*, *H3F3A*, *BRAF* und *TERT* wurden detektiert und mit unabhängigen Routinemethoden validiert. Weiterhin wurden diagnostisch wichtige CNVs einschließlich der Kodeletion von 1p/19q und der *EGFR*-Amplifikation identifiziert und bestätigt. In den histologisch klassifizierten Tumoren wurden die für die jeweiligen Entitäten bekannten molekularen Veränderungen nachgewiesen. Die eigenen Resultate belegen eine hohe Sensitivität und Spezifität der Gen-Panel-Sequenzierung. Obwohl das Gliom-Gen-Panel hauptsächlich für die NGS-basierte Detektion von DNA-Sequenzveränderungen gedacht war, konnten auch bereits bekannte CNVs wie *EGFR*-Amplifikationen und 1p/19q-Kodeletionen identifiziert werden. *EGFR* und die Regionen von Chromosom 1p und 19 q werden jeweils mit über 50 Amplikons abgedeckt. Diese Abdeckung der Zielregionen erlaubte eine sensitive Schätzung von CNVs, was durch eine 100 %-ige Sensitivität und Spezifität für die Detektion von *EGFR*-Amplifikation und 1p/19q-Kodeletion experimentell bestätigt werden konnte (Grasso et al. 2015). Die Detektion von *PTEN*-(10q23.3)-Deletionen war auf 19 Amplikons beschränkt und nur in 23 % der untersuchten Glioblastome ließ sich eine *PTEN*-Deletion mittels Gen-Panel-Sequenzierung nachweisen. In vorherigen Studien zeigte sich dagegen ein wesentlich höherer Anteil (bis zu 90 %) von Glioblastomen mit hemizygoten 10q-Deletionen (Weller et al. 2015). Somit scheint der Nachweis von Chromosom-10-Verlusten mit dem Gliom-Gen-Panel 1 nicht sehr sensitiv zu sein. Für die Detektion einer chromosomalen Monosomie könnte die Sensitivität allerdings durch die Erhöhung der Amplikonzahl für das jeweilige Chromosom gesteigert werden. Die Detektion von homozygoten *CDKN2A*-Deletionen mittels Gen-Panel-NGS war aufgrund der kleinen Gengröße auf zehn Amplikons beschränkt. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde ein Schwellenwert für homozygote *CDKN2A*-Deletionen in Gliomproben mit mindestens 80 % Tumorzellgehalt bestimmt. Abweichungen des erzielten Schwellenwertes im Vergleich zum erwarteten Wert kann mit Varianzen in der Ziel-Amplifikation, heterogener Anreicherung der NGS-Bibliotheken oder dem individuellen Sequenzierungslauf erklärt werden. Eine Wiederholung der Gen-Panel-Sequenzierung der Verdünnungsreihe wurde aus kostentechnischen Gründen nicht durchgeführt. Alle mittels NGS detektierten homozygoten *CDKN2A*-Deletionen konnten mittels *TaqMan*TM-Assay verifiziert werden. Für die Detektion von Kopienzahl-Veränderungen von weiteren kleinen Genen in der

diagnostischen Routine wird daher die Bestimmung eines individuellen Schwellenwertes mit Hilfe einer DNA-Verdünnungsreihe empfohlen. Weiterhin könnten zusätzlich intronische Bereiche abgedeckt werden, sodass sich die Amplikon-Anzahl für ein Gen erhöht. In 25 % der IDH-Wildtyp-Glioblastome fand sich eine homozygote *CDKN2A*-Deletion, wohingegen diese Veränderung in vorherigen Veröffentlichungen in bis zu 40 % dieser Tumoren nachgewiesen wurde (Schmidt et al. 1994; Brennan et al. 2013). Die homozygote *CDKN2A*-Deletion tritt oft kombiniert mit einer *EGFR*-Amplifikation auf (Weller et al. 2015). Ein Drittel der primären Glioblastome wiesen *EGFR*-Amplifikationen auf, sodass der Anteil (25 %) an *CDKN2A*-Deletionen in unserer Tumorserie realistisch ist. Eine limitierte Sensitivität der NGS-Methode wurde für die Detektion der *EGFRvIII*-Mutation beobachtet. Eine reduzierte Abdeckung der *EGFR*-Exone 2-7 in einem Tumor mit *EGFR*-Amplifikation ließ sich nicht in allen Fällen in der Gen-Panel-Sequenzierung nachweisen. Eine geringe Sensitivität von Amplikon-basierten Techniken für den Nachweis von CNVs kann durch eine Kontamination des Tumorgewebes mit nicht neoplastischen Zellen und einer genetischen Heterogenität der Tumorzellen bedingt sein (Solomon et al. 2009). Im Falle der *EGFRvIII*-Mutation ist es in der Tat so, dass diese häufig auf eine kleine Subpopulationen der *EGFR*-amplifizierten Gliomzellen beschränkt ist (Weller et al. 2014b). Insofern ist ein Nachweis dieser Mutation mittels Immunhistochemie oder mittels reverser Transkriptions-PCR sensitiver (Weller et al. 2014b). Auch hinsichtlich des Nachweises von Veränderungen des *ATRX*-Gens sprechen die eigenen Ergebnisse dafür, dass die Gen-Panel-Sequenzierung zwar eine 100 %-ige Spezifität, aber eine niedrigere Sensitivität im Vergleich zur immunhistochemischen Bestimmung der nukleären ATRX-Proteinexpression aufweist. Mittels Immunhistochemie konnten in mehreren Fällen Verluste der nukleären ATRX-Expression detektiert werden, die in der Gen-Panel-Sequenzierung keine nachweisbaren Mutationen oder Deletionen im *ATRX*-Gen zeigten. Diese Beobachtung wurde von anderen Autoren auch schon in einer Studie zu Leiomyosarkomen gemacht (Yang et al. 2015). In den eigenen, zusätzlich durchgeführten DNA-Methylierungsanalysen der in der 5'-Region des *ATRX*-Gens lokalisierten CpG-Insel ergaben sich keine Hinweise auf eine aberrante DNA-Methylierung in den Gliomen mit nukleärem ATRX-Verlust, in denen keine *ATRX*-Mutation vorlag. Mögliche andere Mechanismen, die zu einem Verlust der *ATRX*-Expression führen könnten, wären Mutationen im Intron- oder Promotorbereich sowie post-transkriptionelle Modifizierungen, z. B. eine Herunterregulation der *ATRX*-mRNA durch Bindung von microRNAs an die 3'-untranslatierte Region des *ATRX*-Transkriptes. Diesen Hypothesen wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht weiter nachgegangen.

Neben den genannten Limitationen der NGS-Gen-Panel-Sequenzierung zeigte die Methode zuverlässige, sowohl spezifische als auch sensitive Resultate. Aufgrund der in

den 121 untersuchten Gliomproben gefundenen Mutationsmuster konnten die verschiedenen Gliome in robuste molekulare Subgruppen unterteilt werden. Mittels unsupervidierte Clusteranalyse wurden genetisch ähnliche Tumorguppen unterteilt. IDH-Wildtyp-Glioblastome trugen fast alle eine *TERT*-Promotormutation und zeigten zudem *EGFR*-Amplifikationen, häufig kombiniert mit *CDKN2A*- und *PTEN*-Deletion, oder *PTEN*- und *NF1*-Mutationen. IDH-mutierte astrozytäre Gliome waren durch zusätzliche Mutationen in *TP53* und *ATRX* gruppiert. Dieser Untergruppe wurden bioinformatisch auch IDH-Wildtyp-Gliome zugeordnet, die *TP53*- und *ATRX*-Mutationen trugen und zusätzlich Mutationen im *H3F3A*-Gen aufwiesen. Unter diesen befanden sich Gliome mit der *H3F3A*-K27M-Mutation, die nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS 2016 als eigene Entität betrachtet werden, welche als diffuses Mittelliniengliom, H3-K27M-mutiert, bezeichnet wird (Louis et al. 2016). IDH-mutierte Oligodendrogliome wurden aufgrund von Mutationen in *TERT* und *CIC* sowie der 1p/19q-Kodeletion in einer eigenen Gruppe zusammengefasst. Eine weitere Gruppe bildet sich aus Gliomen mit nur wenigen bzw. keinen genetischen Veränderungen in den untersuchten 20 Zielgenen. In vier pilozytischen Astrozytomen wurden keine genetischen Aberrationen detektiert. Hier könnten Fusionen von *KIAA1549* und *BRAF* vorliegen (Collins et al. 2015), die aber mit dem verwendeten Gliom-Gen-Panel-NGS nicht detektierbar sind.

Insgesamt wurden in allen Sequenzierungsläufen hohe Qualitätswerte erreicht. Der Qualitätswert wird als *Phred-Score* angegeben, der die Fehlerwahrscheinlichkeit für eine Base angibt. Der Base wird eine Qualitätsbewertung hinsichtlich der Intensität ihres detektierten Sequenzersignals zugewiesen (*Phred-score*: Q20= zu 99 % ist die Basenvergabe korrekt) (Ewing u. Green 1998). Mittels Ion PGM™ wurde eine höhere Sequenzierungsqualität erreicht als mit dem Ion Proton™. Die hohe Kapazität des Ion Proton™ könnte einen Einfluss auf die Qualität der Sequenzen haben. Mit einem *Phred-score* von 25 sind die Qualitäten der *reads* jedoch dennoch sehr hoch, wodurch eine valide Detektion von Varianten gewährleistet wird und die Kosten der NGS-Sequenzierung durch die hohe Kapazität des Ion Proton™ gering gehalten werden können. Die Clusteranalyse und die diversen eigenen Validierungsexperimente belegten die Robustheit der Gen-Panel-Sequenzierung, was durch die Einordnung der Gliome in diagnostisch und prognostisch relevante Tumorguppen, d.h. IDH-Wildtyp-Glioblastome, IDH-mutierte astrozytäre Gliome, sowie IDH-mutierte und 1p/19q-kodeletierte Oligodendrogliome bekräftigt wird, die sich auch in großen, auf Exom-weiten Sequenzierungen beruhenden TCGA-Studien ergaben (Brennan et al. 2013; Suzuki et al. 2015; Ceccarelli et al. 2016).

4.1.3 Gen-Panel-Sequenzierung in der Routinediagnostik

Die molekularen Daten aus den Gliom-Gen-Panel-Sequenzierungen wurden genutzt, um die ursprünglich nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2007 (WHO 2007) klassifizierten 111 Gliome des Erwachsenenalters nach der neuen WHO-Klassifikation 2016 zu re-klassifizieren. Die neue WHO-Klassifikation integriert histologische und molekulare Merkmale und teilt die Gliome im Wesentlichen in IDH-mutierte astrozytäre Gliome WHO-Grad II und III, IDH-mutierte und 1p/19q-deletierte Oligodendrogliome WHO-Grad II und III, sowie Glioblastome WHO-Grad IV mit oder ohne IDH-Mutation ein (Louis et al. 2016). Die neue Einordnung der Gliome berücksichtigt somit die wichtigsten molekularen Marker in der Tumordiagnose und bestärkt den Einsatz von Gen-Panel-Sequenzierungen in der molekularen Routinediagnostik. Hinsichtlich der gewünschten Sensitivität der Variantendetektion wird üblicherweise eine Variantenfrequenz von 2 bis 5 % angegeben (Frampton et al. 2013; Wang et al. 2015; Froyen et al. 2016; de Leng, Wendy W J et al. 2016). Dies wurde in der eigenen Arbeit durch die hohe *read*-Abdeckung gewährleistet. Durch die hohe Abdeckung ist jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Detektion von falsch-positiven Varianten erhöht. In der diagnostischen Routine sind daher Qualitätskontrollen der DNA wichtig, um gute Sequenzierungsergebnisse, z. B. wenige falsch-positive Varianten, zu gewährleisten. Negativ-Listen mit bekannten falsch-positiven Mutationen können die Detektion von echten somatischen Mutationen erleichtern. Die eigenen Ergebnisse belegen, dass die Sequenzierung von aus FFPE-Material isolierter, degradierter DNA und die Detektion von somatischen Mutationen in geringen DNA-Mengen, wie sie z.B. aus stereotaktisch gewonnenen Tumorproben oder aus Blutplasma isolierbar sind, prinzipiell möglich ist. Die Allelfrequenzen der Mutationen in DNA-Proben, die aus stereotaktisch gewonnenen Tumorproben isoliert wurden, zeigten ähnliche Werte im Vergleich zu korrespondierenden DNA-Proben des gleichen Tumors, die aus einer größeren Tumorprobe, welche mittels einer offenen Resektion entfernt wurde, gewonnen wurden.

In letzter Zeit spielt insbesondere die Analyse von zellfreier, zirkulierender Tumor-DNA (cfDNA) aus Blutplasma, die sog. *liquid biopsy*, eine zunehmende Rolle beim nicht-invasiven Monitoring von somatischen Mutationen und für die Bestimmung der Therapieeffektivität (Bettegowda et al. 2014). Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wurden bereits erfolgreiche Studien zur Rolle von cfDNA-Analysen als prognostischer und prädiktiver Biomarker veröffentlicht (Thress et al. 2015; Ai et al. 2016). In Gliompatienten ist die Menge an zellfreier Tumor-DNA im Blutplasma jedoch meist gering, was insbesondere der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben wird (Bettegowda et al. 2014). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, da größtenteils keine

ausreichenden Mengen an cfDNA aus Blutplasma extrahiert werden konnten. Neue Extraktionskits könnten eine bessere cfDNA-Ausbeute bringen, sodass mehr cfDNA aus Blutplasma gewonnen werden kann. Mit Hilfe der AmpliSeq™-Software ist es zudem möglich, Primer speziell für die Gen-Panelanalyse von cfDNA zu entwerfen. Weiterhin können auch spezifische Panels zur Detektion von Fusionsgenen erstellt werden, welche in Gliomen immer häufiger identifiziert werden und als diagnostisch und therapeutisch relevant gelten (Weller et al. 2015; Reifenberger et al. 2016). Die *KIAA1549-BRAF*-Genfusion kann z.B. als diagnostischer Marker für pilozytische Astrozytome verwandt werden und wurde zudem als prognostischer Faktor innerhalb dieser Tumorgruppe beschrieben (Becker et al. 2015). *FGFR-TACC3*, *ARHGEF2-NTRK1*, *CHTOP-NTRK1* und weitere Fusionsprodukte wurden in Glioblastomen identifiziert und könnten in Zukunft als molekulare Marker fungieren (Parker et al. 2013; Zheng et al. 2014). Wichtige diagnostisch-genetische Veränderungen wie IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion werden mit dem erstellten Gliom-Gen-Panel bereits abgedeckt, jedoch werden zukünftig neu detektierte Biomarker für individualisierte Therapien eine Erweiterung des Panels nötig machen. Die Zeit von der Operation bis zum molekularen Profil des Tumors beträgt für die Gen-Panel-NGS-Analytik etwa eine Woche und liegt somit gut im zeitlichen Rahmen von etwa 2-4 Wochen zwischen Operation und Beginn der postoperativen Strahlen- und Chemotherapie (Stupp et al. 2005). Über die Gen-Panel-Sequenzierung werden viele genetische Veränderungen gleichzeitig detektiert, sodass nachträgliche Anforderungen zur Bearbeitung zusätzlicher Marker reduziert werden können. Ein zweites Gliom-Gen-Panel mit Genen, die weniger häufig in Gliomen verändert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits erstellt. Die schnelle Entwicklung und Flexibilität neuer Panels erleichtert den Einsatz der NGS-basierter Sequenzierungen in der Tumordiagnostik. In dieser Arbeit wurden jedoch auch einige potentielle Probleme der parallelen Hochdurchsatz-Sequenzierung identifiziert (s.o.), die eine Validierung eines jeden neuen Gen-Panels und die Bestimmung von Qualitätsfaktoren unerlässlich machen. Die Robustheit der Gen-Panel-Sequenzierung insbesondere bei der Detektion von somatischen Mutationen spricht jedoch für einen Einsatz in der diagnostischen Routine.

4.2 Variantenmuster von rezidivierenden Glioblastomen

Die Standardbehandlung des Glioblastoms beinhaltet die operative Entfernung von Tumorgewebe und eine nachfolgende, kombinierte Strahlen- und Chemotherapie (Stupp et al. 2005). Im Laufe der Erkrankung rezidiert der Tumor allerdings nahezu immer und ist dann häufig therapieresistenter im Vergleich zum Initialtumor (Stupp et al. 2009; Weller

et al. 2013). Therapieversagen und Resistenzentwicklung wird unter anderem der hohen intratumoralen Heterogenität in malignen Gliomen zugeschrieben (Marusyk u. Polyak 2010; Parker et al. 2015). Im Median sind gemäß einer Publikation aus 2014 sieben verschiedene Subklone in einem Glioblastom zu erwarten (Andor et al. 2014). In aktuellen Hochdurchsatz-Sequenzierungsstudien wurde zudem nachgewiesen, dass Primärtumor und Rezidivtumor eines Patienten oftmals unterschiedliche molekulare Muster aufweisen und klonal divers sind (Campos et al. 2016; Wang et al. 2016). Dies konnte in der vorliegenden Studie an 65 Primär- und Rezidivtumorpaaren ebenfalls nachgewiesen werden. Trotz des unterschiedlichen Mutationsprofils beruhen bisherige Behandlungen des rezidivierenden Tumors typischerweise auf am Primärtumor erhobenen Befunden (Campos et al. 2016). Je nach klinischem Zustand des einzelnen Patienten und der Lokalisation eines Rezidivglioms werden die Patienten erneut operiert und/oder mittels Bestrahlung bzw. Kombinationstherapie behandelt (Weller et al. 2013; Roy et al. 2015). Dies soll in erster Linie bestehende neurologische Ausfälle minimieren und die Tumorprogression reduzieren. Mit verbessertem Wissen über die molekulare Signatur des Rezidivtumors könnten in Zukunft gerichtete, molekulare Therapieansätze (siehe Abschnitt 4.2.2) eingesetzt werden, die sich speziell gegen den Tumor richten, wodurch ein Therapieversagen und Resistenzentwicklung vermieden werden sollen.

4.2.1 Entwicklung eines Hypermutationsphänotyps als Folge der Temozolomidbehandlung

Das alkylierende Zytostatikum Temozolomid wird routinemäßig in der Chemotherapie des Glioblastoms eingesetzt (Stupp et al. 2005). Temozolomid methyliert das DNA-Molekül, wodurch sich O6- und N7-Methylguanin bzw. N3-Methyladenin bilden (Agarwala u. Kirkwood 2000; Plummer et al. 2005). N7-Methylguanin und N3-Methyladenin werden mittels Nukleotid-Exzisionsreparaturweg entfernt, ohne die DNA zu schädigen. O6-Methylguanin wird durch das DNA-Reparaturprotein MGMT ohne Genomschädigung entfernt (Pegg et al. 1995). Im Fall einer fehlenden MGMT-Expression, z.B. als Folge einer *MGMT*-Promotormethylierung (Wick et al. 2014), wird O6-Methylguanin durch den *Mismatch*-Reparaturmechanismus entfernt, wodurch zunächst Einzel- und nachfolgend Doppelstrangbrüche der DNA entstehen (Agarwala u. Kirkwood 2000). Dadurch werden Zellzyklusarrest oder Apoptose ausgelöst (Lips u. Kaina 2001). Bei einer Inaktivierung des *Mismatch*-Reparatursignalwegs, durch z. B. Mutation, bleibt O6-Methylguanin in der DNA bestehen, das sich bei der nächsten DNA-Replikation mit Thymin statt Cytosin bindet. Dies kann wiederum zu multiplen Temozolomid-induzierten C>T-Mutationen führen, die über das gesamte Genom verteilt sind und multiple Gene betreffen (TCGA 2008). Dieses

Phänomen wird als Hypermutations- oder Hypermutatorphänotyp beschrieben und kann als mögliche Ursache der Entwicklung von Temozolomid-resistenten Tumorzellklonen und der Entwicklung von Tumorrezidiven fungieren (Campos et al. 2016). Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde eine in Rezidivglioblastomen im Vergleich zu Primärtumoren verminderte Expression der *Mismatch*-Reparaturenzyme *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* und *MSH6* beschrieben (Felsberg et al. 2014) und zum Teil auch unter Therapie erworbene Mutationen im *MSH6*-Gen gefunden (Cahill et al. 2007; TCGA 2008). In der eigenen Arbeit fand sich ein Hypermutationsphänotyp in nur zwei von 53 TMZ-behandelten Glioblastomen (4 %). In diesen zwei Rezidivtumoren wurden Mutationen in den *Mismatch*-Reparaturgenen *MSH2* bzw. *MSH6* nachgewiesen. Die hohe Anzahl an Mutationen mit der C>T-Transition (>95 % aller in den Tumoren detektierten exklusiven SNVs) in den zwei Rezidiven passt zu einer Inaktivierung des *Mismatch*-Reparatursignalwegs aufgrund der gefundenen Mutationen in *MSH2* bzw. *MSH6*. In vier weiteren Fällen wurden Mutationen in den Reparaturgenen *MLH1* bzw. *PMS2* detektiert. In diesen Fällen zeigte sich allerdings kein Hypermutationsphänotyp im Rezidivtumor. In anderen Studien wurden hypermutierte Tumoren mit Mutationen in *PMS2* und *MLH1* assoziiert (Kim et al. 2015; Wang et al. 2016). Wang et al. (2016) detektierten einen höheren Anteil an hypermutierten Gliomrezidiven (17 %) mittels *Whole-Genome*- bzw. *Whole-Transcriptome*-Sequenzierungen. In 16 von 17 hypermutierten TMZ-behandelten Glioblastomen wurden Mutationen in den *Mismatch*-Reparaturgenen *MSH6*, *MSH4*, *MSH5*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH1* oder *MLH2* gefunden, wodurch eine 100-fach höhere Mutationsrate in den Rezidiven im Vergleich zum Primärtumor beobachtet wurde (Wang et al. 2016). *MSH5*, *PMS1* und *MLH2* wurden in unserer Studie mittels Gen-Panel-Sequenzierung nicht abgedeckt, sodass Mutationen in diesen Genen nicht detektiert werden konnten. Für *PMS2* können Mutationen aufgrund der hohen Homologie zum Pseudogen *PMS2CL* (van der Klift et al. 2010) nicht sensitiv über die in der eigenen Arbeit verwendete Amplikon-basierte NGS-Analyse detektiert werden. Das Pseudogen *PMS2CL* weist eine Sequenzidentität von Exon 2 und Exon 11-15 zu *PMS2* auf (van der Klift, Heleen M et al. 2010). Die zwei gefundenen Mutationen in *PMS2* liegen in den Exonen 11 und 12 und könnten somit auch fälschlicherweise *PMS2* zugeordnet worden sein. Die sequenzierten *reads* könnten vom Pseudogen *PMS2CL* stammen und die detektierten Mutationen in eben diesem Pseudogen lokalisiert sein. In diesem Fall würde das Reparaturenzym *PMS2* funktionsfähig sein, wodurch eine Abwesenheit des DNA-Hypermutationsphänotyps in den Rezidiven erklärt werden könnte. Die Identifizierung von Mutationen in Exon 9 und 11-15 von *PMS2* kann über *long-range*-PCRs und Sanger-Sequenzierung erfolgen (Clendenning et al. 2006). Die Gene *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* wurden zudem nicht vollständig im Gliompanel abgedeckt, sodass möglicherweise

bestimmte somatische Mutationen, die in den nicht abgedeckten Sequenzen liegen, nicht detektiert wurden (Tabelle 15). Zudem werden in der Gen-Panel-Sequenzierung nur wenige, in den eigenen Untersuchungen 50 Zielregionen abgedeckt, sodass andere, möglicherweise hypermutierte Genbereiche nicht erfasst werden. Die beobachtete niedrige Rate von Rezidiven mit Hypermutationsphänotyp könnte auch durch eine Temozolomid-Resistenz der Tumorzellen durch von *MGMT* erklärt werden, das die TMZ-induzierten Alkylgruppen an der O6-Position von Guanin entfernt und dadurch die zytotoxische Wirkung von Temozolomid aushebelt. Eine transkriptionelle Inaktivierung von *MGMT* durch aberrante Methylierung seines Promotors wurde mit einer verlängerten Lebensdauer von Glioblastom-Patienten assoziiert (Hegi et al. 2005; Wick et al. 2014). In der vorliegenden Studie war von zwölf Glioblastomen der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus bekannt. In zehn Fällen wurde keine *MGMT*-Promotormethylierung detektiert, sodass die geringe Rate von hypermutierten Tumoren möglicherweise auch durch einen vergleichsweise niedrigen Anteil von *MGMT*-Promotormethylierten Tumoren erklärt werden kann. Diese Hypothese muss experimentell durch Bestimmung des *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus in der kompletten Tumorserie untermauert werden. Andere Autoren identifizierten ein hypermutiertes Rezidivgliom, welches ebenfalls eine *IDH1*-Mutation trug (Kim et al. 2015). Sie schlussfolgerten, dass die *IDH1*-Mutation eine globale Hypermethylierung der DNA in den Tumorzellen induzierte, welche eine Methylierung des *MGMT*-Promotors mit einschloss, wodurch die Voraussetzung zur Entwicklung eines DNA-Hypermutationsphänotyps unter Temozolomidbehandlung gegeben war (Kim et al. 2015). In den von uns untersuchten 65 Glioblastomen wurde allerdings nur in einem Tumor eine *IDH1*-Mutation (p.R132C Fall: R21O4Z52) detektiert. In dem korrespondierenden Rezidiv war kein Hypermutationsphänotyp festzustellen. Der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus war in dieser Tumorprobe nicht bekannt.

Zusammenfassend kann die TMZ-Behandlung bei Tumoren mit inaktivem *Mismatch*-Reparaturmechanismus einen Hypermutations-Phänotyp auslösen. Dadurch unterscheidet sich das Mutationsprofil zwischen Primär- und Rezidivtumor wesentlich, was allerdings in der eigenen Fallserie nur in zwei von 65 Patienten der Fall war.

4.2.2 Molekulare Evolution von Glioblastomen

In dieser Arbeit wurde mittels Gen-Panel-Sequenzierung bestätigt, dass sowohl TMZ-behandelte als auch TMZ-unbehandelte Glioblastome ein verändertes Mutationsprofil im Rezidiv im Vergleich zum zugehörigen Primärtumor aufweisen können. Insgesamt wurden

Mutationen häufiger in Rezidiven nach Radiotherapie und kombinierter TMZ-Behandlung identifiziert. Die meisten Aberrationen (61 %) wurden allerdings sowohl im Primär- als auch im Rezidivtumor gefunden, was unterstreicht, dass sich Rezidivgliome aus vorbestehenden Tumorzellklonen im Primärtumor entwickeln. Ähnliche Mutationsraten wurden in Untersuchungen von Primär- und Rezidivtumoren von anderen Autoren ermittelt, die 54 % bzw. 68 % gemeinsame Mutationen detektierten (Johnson et al. 2014; Kim et al. 2015). Mutationen im *TERT*-Promotor wurden, mit Ausnahme von einem Tumorkörper, durchgängig sowohl im Initialtumor als auch im Rezidiv detektiert. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um eine frühe Mutation in der Tumorentstehung handelt und die Erhaltung der Telomere eine notwendige Voraussetzung für die Bildung von Hirntumoren ist (Killela 2013). Promotormutationen im *TERT*-Gen verstärken die *TERT*-Expression und verhindern Telomer-Verkürzungen und somit die Seneszenz von Tumorzellen (Bodnar et al. 1998; Campisi u. d'Adda di Fagagna 2007). Beide detektierten *H3F3A*-Mutationen wurden ebenfalls im Rezidiv beibehalten, wodurch die von der Mutation ausgelösten Veränderung der posttranslationalen Modifikation von Histonen in der Tumورprogression weiterhin wichtig scheinen (Schwartzentruber et al. 2012). Weiterhin sind Gene in Primär- und Rezidivtumor verändert, deren Genprodukte im RTK-PI3K-mTOR-Signalweg (*EGFR*, *PTEN*, *PIK3CA*, *PTEN*) beteiligt oder für die Regulation von Zellzyklus-Progression bzw. Apoptose wichtig sind (*TP53*, *RB1*, *CDK4/6*) (Suzuki et al. 2015). Kim et al. (2015) beschreiben zwischen Primär- und Rezidivtumor gemeinsame Mutationen als klonale Mutationen, die in allen bzw. den meisten Tumorzellen präsent sind und sich somit in der frühen Tumorentwicklung gebildet haben müssen. Weitere somatische Varianten wurden nur im Initialtumor oder nur im Rezidiv identifiziert. Sie stellen somit subklonale Varianten dar, die erst später in der Tumorentwicklung entstehen (Johnson et al. 2014; Kim et al. 2015). Exklusive Varianten in Genen, die im Zellzyklus bzw. im RTK-PI3K-mTOR-Signalweg und in der Chromatin-Remodulierung assoziiert sind, wurden sowohl in Primärtumoren als auch Rezidivtumoren identifiziert. Mutationen in Subklonen könnten in der Tumورprogression einen selektiven Vorteil bringen (Johnson et al. 2014). Die Theorie der klonalen Evolution von Tumoren wurde erstmals 1976 beschrieben (Nowell 1976). Nowell beschrieb die Tumورprogression als einen evolutionären Prozess, der schrittweise durch somatische Mutationen in Tumorzellsuklonen mit sequentiellen Selektionen stattfindet. Tumorzellsuklone werden beispielsweise durch operative Entfernung sowie Strahlen- und Chemotherapie selektiert (Kim et al. 2015). In der eigenen Serie konnten 13 % der Mutationen und 24 % der CNVs im Primärtumor im nachfolgenden Rezidivtumor nicht mehr detektiert werden, was eine Eliminierung von Subklonen durch die Behandlung des Primärtumors vermuten lässt. Einige wenige resistente Tumorzellen überleben die Behandlung und bilden eine

Tumorphpopulation als Rezidiv aus. Der Rezidivtumor trägt sowohl funktionell relevante Varianten des Primärtumors und akkumuliert weitere Mutationen in Subklonen, wodurch eine Heterogenität auch im Rezidiv zu finden ist (Andor et al. 2014). Eine im Vergleich zu exklusiven Mutationen des Primärtumors höhere Anzahl an exklusiven Mutationen des Rezidivtumors konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. In zwei Rezidiven wurde zusätzlich eine TMZ-induzierte Hypermutation detektiert (siehe Abschnitt 5.2.1). Hingegen wurden weniger CNVs im Rezidiv im Vergleich zu behandelten Primärtumoren gefunden. Rezidivtumoren enthalten oftmals viel nekrotisches Gewebe und können ausgeprägte reaktive Veränderungen aufweisen, wodurch die Qualität der DNA aus Rezidiv-Gewebeproben sowie der Anteil an Tumor-DNA geringer sein können als im Primärtumor (Campos et al. 2016). Dies könnte dazu beigetragen haben, dass chromosomale Aberrationen mittels gezielter Gen-Panel-Sequenzierung in Rezidivtumoren weniger sensitiv detektiert wurden. Die Analyse mittels *Illumina-Infinium-HumanMethylation450-(450k)-Array* deckt 99 % der RefSeq-Gene (RefSeq= Referenz-Sequenz-Datenbank vom *National Center for Biotechnology Information* [NCBI]) ab und erlaubt womöglich eine sensitivere Detektion von CNVs, die eine gezielte Panelsequenzierung nicht gewährleisten kann (Sahm et al. 2016). Weiterhin ist anzunehmen, dass die Temozolomid-Behandlung Tumorzellen mit chromosomalen Aberrationen eliminiert bzw. reduziert. In zwölf TMZ-unbehandelten Tumoren wurden insgesamt 21 CNVs in den Primärtumoren detektiert, wovon 19 CNVs in den Rezidivtumoren erhalten blieben (90 %). Im Vergleich wurden bei TMZ-behandelten Tumoren nur 70 % der im Primärtumor gefundenen CNVs auch in den Rezidiven identifiziert. Der Vergleich zwischen CNVs in TMZ-unbehandelten und TMZ-behandelten Tumoren gibt Hinweise, dass Tumorzellen mit chromosomalen Veränderungen sensibler auf Temozolomid reagieren. Diese Vermutung müsste allerdings mit Erhöhung der Fallzahl und umfassender Genomanalyse von TMZ-unbehandelten Patienten verifiziert werden. Wang und Kollegen konnten über ein mathematisches Modell zeigen, dass die Evolution von Glioblastomen stark verzweigt ist und sich nicht linear entwickelt. In einer linearen Evolution bildet ein Klon eine Mutation aus und entwickelt über Jahre neue Varianten (Yates u. Campbell 2012). In 24 % der TMZ-behandelten Tumorkollektoren wurden keine Unterschiede im Variantenprofil zwischen Primär- und Rezidivtumor detektiert bzw. es wurden nur weitere Varianten im Rezidiv gefunden. In TMZ-unbehandelten Tumoren ist der Anteil an Tumorkollektoren, die dasselbe Variantenprofil haben, mit insgesamt 58 % höher. Nach Definition könnte in diesen Glioblastomen eine lineare Tumorentwicklung vorliegen, die bereits in vorherigen Studien in wenigen Glioblastomen vermutet wurde (Johnson et al. 2014). Eine lineare Tumorentwicklung ist somit in unbehandelten Tumoren wahrscheinlicher als in behandelten Tumoren. Durch die fehlende Therapie musste sich der Tumor weniger

anpassen und bildete keine bzw. nur wenige weitere Mutationen aus. In den meisten TMZ-behandelten Tumoren wurde ein diverses Variantenprofil in den Tumorklängen identifiziert, was auf eine verzweigte Tumor-Evolution hindeutet (Wang et al. 2016). Die Arbeiten von Wang et al. und Kim et al. erklären, dass die stark verzweigte Tumorprogression als konvergente Tumorevolution erklärt werden kann (Kim et al. 2015; Wang et al. 2016). Die konvergente Evolution beschreibt einen gemeinsamen Vorfahrklon von Primärtumor und Rezidivtumor mit wenigen Schlüsselmutationen. Mögliche Schlüsselmutationen bzw. -varianten wären gemäß den eigenen Ergebnissen u.a. Veränderungen in *TERT*, *EGFR*, *PTEN*, *TP53*, *NF1* oder *PIK3CA*. Klonale Mutationen in *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* und *PTEN* wurden bereits beschrieben (Kim et al. 2015; Wang et al. 2016). Die Klone von Primär- und Rezidivtumor scheinen sich zum Teil bereits vor der Diagnose des Primärtumors auseinander zu entwickeln (Kim et al. 2015; Wang et al. 2016). Neue unterschiedliche Populationen entstehen, die koexistieren und sich parallel entwickeln. Subklone verändern durch unterschiedliche Varianten in verschiedenen Genen dieselben Schlüsselsignalwege, wie z.B. den RTK-PI3K-mTOR Signalweg bzw. Zellzyklus- und/oder Apoptose-regulierende Proteinnetzwerke. In den eigenen Untersuchungen fanden sich zwischen Primär- und Rezidivtumor unterschiedliche Mutationen im selben Gen in 14 % der Tumorklängen. Hauptsächlich waren dabei die Gene *PTEN* und *EGFR* betroffen. Weiterhin wurden in einem Tumorklang unterschiedliche Mutationen im Gen *PTPN11* gefunden, welches in der Studie von Wang et al. (2016) als Tumorprogressionsgen aufgeführt wird. In derselben Studie wurden zwischen Primär- und Rezidivtumor distinkte Varianten in den Genen *TP53* und *PDGFRA* gefunden, was nach Wang die Theorie der konvergenten Evolution unterstreicht. In den vorliegenden Daten und vorherigen Studien (Johnson et al. 2014; Kim et al. 2015) ist somit sowohl eine lineare als auch eine verzweigte Tumor-Evolution erkennbar (Abbildung 22).

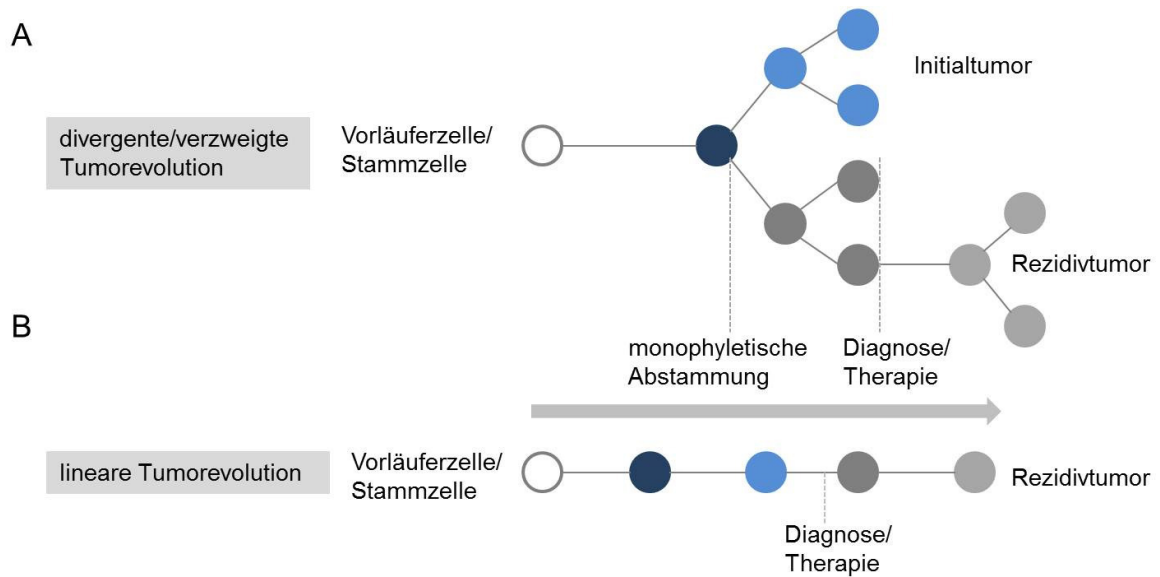


Abbildung 22: Graphische Darstellung von zwei Modellen der Tumorevolution. A) Modell der verzweigten Tumorevolution. Das Modell beschreibt eine gemeinsame Abstammung von Initial- und Rezidivtumor von einem Tumorzellklon, der durch Mutationen in einer Vorläuferzelle entstanden ist (modifiziert nach (Wang et al. 2016)). Somatische Varianten entstehen in Primär- und Rezidivtumor und Subklone von Primär- und Rezidivtumor entwickeln sich parallel und unabhängig voneinander. Durch Selektion von therapieresistenten Subklonen entsteht das Rezidiv, welches wiederum neue Subklone ausbildet. **B)** Im Modell der linearen Evolution bildet eine Vorläuferzelle nach und nach somatische Mutationen aus. Wenige Klone entkommen der Eliminierung durch Behandlung und formen das Rezidiv, welches neue somatische Varianten ausbilden kann.

In TMZ-unbehandelten Fällen ist eine lineare Tumorprogression wahrscheinlicher, wohingegen in TMZ-behandelten Tumoren eine komplexere Tumorevolution vermutet werden kann. Diese Komplexität kann auch durch einen TMZ-ausgelösten Hypermutationsphänotyp verstärkt sein (siehe 4.2.1). Die hohe molekulare Vielschichtigkeit und Heterogenität von Glioblastomen ermöglicht es den Tumoren, Therapieresistenzen auszubilden, wodurch einzelne Tumorklone überleben und sich weiter entwickeln (Kim et al. 2015). Dieses Phänomen erschwert die Erstellung neuer gezielter Glioblastomtherapien (Sottoriva et al. 2013). Die Untersuchung der molekularen Grundlagen der Tumorprogression ermöglicht es jedoch, den Effekt von adjuvanten Therapeutika auf den Tumor besser zu verstehen und darauf aufbauend potentiell neue Strategien zu entwickeln, mit denen eine Resistenzentwicklung vermieden oder zumindest verzögert werden kann. In der vorliegenden Studie wurde ersichtlich, dass das genetische Profil von Glioblastomen dynamisch ist und sich das Mutationsprofil von Primär- und Rezidivtumor grundlegend unterscheiden kann. Die Rezidivbildung kann von Patient zu Patient molekular unterschiedlich verlaufen. Für eine effektive Behandlung des Rezidivtumors ist es somit empfehlenswert, das molekulare Muster des Rezidivs zukünftig zu analysieren und dahingehend den Patienten zielgerichtet zu behandeln. Potenzielle

molekulare Ansätze für eine zielgerichtete Glioblastomtherapie wurden bereits in experimentellen oder präklinischen Studien getestet, die sich gegen veränderte Proteine im RTK-PI3K-mTOR Signalweg oder gegen Mechanismen bei der Histonmodifikation richten (Hashizume et al. 2014; Reardon et al. 2014; Robinson et al. 2014; Schuster et al. 2015; Pitz et al. 2015). Diese beinhalten Inhibitoren gegen EGFR, PI3K, BRAF und H3F3A-K27 Demethylierungsinhibitoren oder Peptid Vakzination gegen EGFRvIII. Ebenfalls wurden Peptid-Vakzination gegen mutantes IDH1 und Inhibitoren gegen mutantes IDH1 getestet (Rohle et al. 2013; Schumacher et al. 2014). Je mehr zielgerichtete Therapiemöglichkeiten in Zukunft zur Verfügung stehen, desto geringer ist die Ausprägung von Resistenzmechanismen und Weiterentwicklung des Glioblastoms.

5 Anhang

5.1 Verwendete Parameter für das *variant calling* (*somatic high stringency*)

Für das *variant calling* mittels *Torrent Suite™ Software 4.4* wurden die folgenden, als json.-Datei gespeicherten, Parameter verwendet:

```
{
  "long_indel_assembler": {
    "short_suffix_match": 5,
    "output_mnv": 0,
    "min_indel_size": 4,
    "min_var_count": 5,
    "min_var_freq": 0.14999999999999999,
    "kmer_len": 19,
    "max_hp_length": 8,
    "relative_strand_bias": 0.80000000000000004
  },
  "meta": {
    "tvcargs": "tvc"
  },
  "torrent_variant_caller": {
    "snp_min_allele_freq": 0.02,
    "snp_strand_bias": 0.90000000000000002,
    "hotspot_min_coverage": 20,
    "hotspot_min_cov_each_strand": 2,
    "hotspot_min_allele_freq": 0.02,
    "snp_min_variant_score": 10.0,
    "hotspot_strand_bias": 0.94999999999999996,
    "hp_max_length": 8,
```

Anhang

```
"filter_insertion_predictions": 0.20000000000000001,  
"indel_min_variant_score": 10.0,  
"indel_min_coverage": 20,  
"heavy_tailed": 3,  
"outlier_probability": 0.0050000000000000001,  
"data_quality_stringency": 8.5,  
"snp_min_cov_each_strand": 3,  
"hotspot_min_variant_score": 6.0,  
"indel_strand_bias": 0.84999999999999998,  
"downsample_to_coverage": 2000,  
"filter_unusual_predictions": 0.25,  
"indel_min_allele_freq": 0.050000000000000003,  
"do_snp_realignment": 1,  
"prediction_precision": 1.0,  
"indel_min_cov_each_strand": 3,  
"filter_deletion_predictions": 0.20000000000000001,  
"suppress_recalibration": 1,  
"snp_min_coverage": 20  
},  
"freebayes": {  
  "gen_min_coverage": 20,  
  "allow_mnps": 1,  
  "allow_complex": 0,  
  "read_max_mismatch_fraction": 1.0,  
  "read_mismatch_limit": 10,  
  "allow_indels": 1,  
  "min_mapping_qv": 4,  
  "gen_min_alt_allele_freq": 0.035000000000000003,  
  "allow_snps": 1,  
  "gen_min_indel_alt_allele_freq": 0.10000000000000001  
}}
```

5.2 In Blut-DNA und/oder Tumor-DNA von 14 Gliompatienten identifizierte Sequenzvarianten

In 14 Patienten wurden sowohl die Tumor-DNA als auch die aus Leukozyten isolierte DNA (Blut-DNA) mit Hilfe des Gliompanels 1 auf Sequenzvarianten hin untersucht. Tabelle 25 fasst die in ausschließlich in der Tumor-DNA detektierten, d.h. somatischen Mutationen, und die sowohl in der Tumor- als auch in der zugehörigen Blut-DNA gefundenen Sequenzvarianten, d.h. DNA-Polymorphismen, zusammen.

Tabelle 25: Zusammenfassung der in Blut-DNA und/oder Tumor-DNA von 14 ausgewählten Gliompatienten gefundenen nicht-synonymen Sequenzvarianten (aus Zacher et al. 2016).

Fall	DNA	Sequenzvariante	dbSNP Nummer
O 90	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>CIC</i> , c.C630A, p.F210L <i>CIC</i> , c.A4531T, p.I1511F <i>TERT</i> , g.C1295250T	rs121913500
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>CDKN2A</i> , c.G442A, p.A148T <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R	rs2227983 rs3731249 rs1042522
AOA 166	Tumor	<i>FUBP1</i> , exon19:c.1706-1G>A <i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>CIC</i> , c.G4354T, p.E1452X <i>CIC</i> , c.T4384G, p.S1462A <i>CIC</i> , c.G4544A, p.R1515H <i>TERT</i> , g.C1295250T	rs121913500
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E	rs2227983 rs1042522 rs3088074
AOA 196	Tumor	<i>PTEN</i> , exon5:c.492+2T>- <i>NF1</i> , c.6787_6790del, p.2263_2264del	
	Tumor und Blut	<i>NF1</i> , c.T528A, p.D176E	rs112306990
AO 97	Tumor	<i>FUBP1</i> , c.1466_1467insT, p.Y489fs <i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>CIC</i> , c.C3640T, p.R1214X <i>TERT</i> , g.C1295250T	rs121913500
	Tumor und Blut	<i>PIK3R1</i> , c.G168A, p.M56I <i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>CIC</i> , c.C1979T, p.P660L <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E	rs3730089 rs2227983 rs1042522 rs139337301 rs3088074
OA 87	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>TP53</i> , c.C421T, p.R141C	rs121913500 rs121913343
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E <i>PIK3CA</i> , c.A1173G, p.I391M	rs2227983 rs3088074 rs3729680
O 81	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>NRAS</i> , c.A182G, p.Q61R <i>TERT</i> , g.C.1295228T	rs121913500 rs11554290
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K	rs2227983

Anhang

		<i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>CDKN2A</i> , c.G442A, p.A148T <i>NF1</i> , c.T528A, p.D176E	rs1042522 rs3731249 rs112306990
AA 472	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>TP53</i> , c.G379T, p.D127Y <i>ATRX</i> , c.4011delC, p.S1337fs <i>ATRX</i> , c.C1882T, p.R628X	rs121913500
	Tumor und Blut	<i>PIK3R1</i> , c.G168A, p.M56I <i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E	rs3730089 rs2227983 rs1042522 rs3088074
OA 114	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>TP53</i> , c.G338A, p.G113D <i>TP53</i> , c.C59T, p.P20L <i>ATRX</i> , c.T5237G, p.I1746S	rs121913500 rs121912656
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R	rs2227983 rs1042522
AO 147	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>FUBP1</i> , c.T1857G, p.Y619X <i>FUBP1</i> , c.1307_1310del, p.436_437del <i>CIC</i> , c.C2347T, p.Q783X <i>TERT</i> , g.C1295228T	rs121913500
	Tumor und Blut	<i>PIK3R1</i> , c.G168A, p.M56I <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R	rs3730089 rs1042522
GB 2189	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>CDKN2A</i> , c.262delG, p.E88fs <i>TP53</i> , c.G347A, p.R116Q <i>TP53</i> , c.A256G, p.T86A	rs121913500 rs11540652
	Tumor und Blut	<i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E	rs1042522 rs3088074
AOA 62	Tumor	<i>IDH1</i> , c.G395A, p.R132H <i>PIK3CA</i> , c.G1624A, p.E542K <i>CIC</i> , c.A614G, p.N205S <i>TERT</i> , g.C1295228T	rs121913500 rs121913273
	Tumor und Blut	<i>PIK3R1</i> , c.G168A, p.M56I <i>TP53</i> , p.P33R	rs3730089 rs1042522
AOA 80	Tumor	<i>IDH1</i> , p.R132S <i>FUBP1</i> , p.G529X <i>NF1</i> , p.F201L <i>CIC</i> , p.R215W <i>TERT</i> , g.C1295250T	rs121913499
	Tumor und Blut	<i>EGFR</i> , c.G1562A, p.R521K <i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R	rs2227983 rs1042522
GB 2234	Tumor	<i>TERT</i> , g.1295228T	
	Tumor und Blut	<i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E	rs1042522 rs3088074
GB 2514	Tumor	<i>TP53</i> , c.A182G, p.H61R <i>NF1</i> , c.C4084T, p.R1362X <i>NF1</i> , exon3:c.288+1G>A	rs137854560
	Tumor und Blut	<i>TP53</i> , c.C98G, p.P33R <i>ATRX</i> , c.C2671G, p.Q891E <i>PIK3CA</i> , c.A1173G, p.I391M	rs1042522 rs3088074 rs3729680

5.3 Zusammenfassung der 121 untersuchten Gliome der Gliom-Gen-Panel-Etablierung

Die mittels Panelsequenzierung in 121 Gliomen detektierten Mutationen sowie Genkopienzahlveränderungen sowie zugehörige klinische Daten und Diagnosen nach WHO 2007 und 2016 sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: Zusammenfassung der in den 121 untersuchten Gliomen gefundenen genetischen Veränderungen (vgl. Zacher et al. 2016). Aufgeführt sind klinische Daten, Diagnosen gemäß WHO 2007 und 2016, sowie die detektierten Mutationen und Kopienzahlveränderungen (CNVs). Mutationen in *TERT* hg19 chr5:g.[1295228C>T] and hg19 chr5:g.[1295250C>T] wurden wie folgt abgekürzt *TERT*, g.C1295228T and g.C1295250T. Blau kolorierte Mutationen/CNVs waren vor der Sequenzierung bekannt und wurden mittels NGS bestätigt. Rot kolorierte Mutationen/CNVs wurden mittels NGS detektiert und wurden mit anderen Methoden validiert. * Fälle mit niedriger *TERT*-Abdeckung wurden mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Verwendete Abkürzungen: M, männlich; W, weiblich; mut, mutiert; Kodel, kodeletiert; NOS, not otherwise specified; A II: Diffuses Astrozytom WHO Grad II; AA III: Anaplastisches Astrozytom WHO Grade III; AO III: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III; AOA III: Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III; APXA III: Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad III; GB IV: Glioblastom WHO Grade IV; O II: Oligodendrogliom WHO Grad II; OA II: Oligoastrozytom WHO Grad II; PA I: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I; PXA II: Pleomorphes Xanthoastrozytom WHO Grad II; PXA w.a.f.: PXA mit anaplastischen Merkmalen; mut: mutiert; kodel: kodeletiert; NOS: nicht anders spezifiziert.

Fall	Alter Jahren	Geschlecht	Tumor Lokalisation	Diagnose WHO 2007	Detektierte Mutationen	Detektierte CNVs	Diagnose WHO 2016
O 62	40	W	Frontal	O II	<i>PIK3CA</i> , G1624A:p.E542K <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.C643T:p.R215W <i>TERT</i> , g.C1295228T*	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
O 70	42	M	Frontal	O II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T *	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
O 71	51	M	Parieto-occipital	O II	<i>CIC</i> , c.C1967T:p.A656V		O II, NOS
O 75	44	M	Fronto-temporal	O II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>CIC</i> , c.G714C:p.W238C	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
O 81	52	W	Fronto-parietal	O II	<i>NRAS</i> , c.A182G:p.Q61R <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T *	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
O 90	36	M	Frontal	O II	<i>CIC</i> , c.A4531T:p.I1511F <i>CIC</i> , c.C630A:p.F210L <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel,
O 84	46	W	Frontal	O II	<i>CIC</i> , c.177_184del:p.59_62del <i>FUBP1</i> , c.C1288T:p.R430C <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
O 77	52	W	Frontal	O II	<i>PIK3R1</i> , p.192_193del <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.G2793A:p.M931I <i>CIC</i> , c.G4544A:p.R1515H		O II, NOS ^s
O 65	37	W	Frontal	O II	<i>PIK3CA</i> , c.G3145C:p.G1049R <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.G644A:p.R215Q	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19 kodel
AO 75	58	W	Temporal	AO III	<i>CIC</i> , c.C1057T:p.R353X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19 kodel

Anhang

					<i>TERT</i> , g.C1295228T *		
AO 86	29	M	Frontal	AO III	<i>CIC</i> , c.A679C:p.N227H <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.G683A:p.R228Q <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 97	76	W	Frontal	AO III	<i>CIC</i> , c.C3640T:p.R1214X <i>FUBP1</i> , c.1466_1467insT:p.Y489fs <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 98	55	M	Temporo-parietal	AO III	<i>NF1</i> , c.4772+2T>A <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 84	45	W	Frontal	AO III	<i>NRAS</i> , c.C181A:p.Q61K <i>CIC</i> , c.C3328T:p.Q1110X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 109	32	W	fronto-temporal	AO III	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.G714T:p.W238C	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 83	64	W	Frontal	AO III	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PIK3CA</i> , c.A3140G:p.H1047R <i>PIK3R1</i> , exon14:c.1746-1G>A <i>PIK3R1</i> , c.927_930del:p.309_310del <i>NF2</i> , exon13:c.1341-1G>A <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.C271T:p.L91F	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AO 147	44	M	Fronto-parietal	AO III	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>CIC</i> , c.C2347T:p.Q783X <i>FUBP1</i> , c.T1857G:p.Y619X <i>FUBP1</i> , c.1307_1310del:p.436_437del <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AOA 197	33	M	Temporal	AOA III	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T *	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
OA 87	35	W	Frontal	OA III	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C	<i>ATRX</i> Exon 1-28 Deletion	A II, IDH mut
OA 97	37	W	Fronto-parietal	OA II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>CIC</i> , c.G757A:p.A253T <i>CIC</i> , exon9:c.1464+1G>A	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
OA 114	40	W	Frontal	OA II	<i>ATRX</i> , c.T5237G:p.I1746S <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.C59T:p.P20L <i>TP53</i> , c.G338A:p.G113D		A II , IDH mut
OA 117	26	M	Frontal	OA II	<i>ATRX</i> , p.D2044_Y2045delinsX <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.C346T:p.R116W		A II, IDH mut
OA 143	58	M	Parietal	OA II	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PIK3R1</i> , c.T257G:p.L86X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
OA 176	39	W	Frontal	OA II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.G422A:p.R141H		A II, IDH mut
OA 156	42	W	Frontal	OA II	<i>IDH1</i> , c.C394T:p.R132C <i>TP53</i> , c.A320G:p.N107S <i>ATRX</i> , exon8:c.481-1G>C		A II, IDH mut
OA 150	32	M	Temporal	OA II	<i>TP53</i> , c.A92G:p.Y31C <i>EGFR</i> , c.C2884T:p.R962C <i>ATRX</i> , exon25:c.5673-1G>C <i>IDH1</i> , c.G395T:p.R132L		A II, IDH mut
OA 181	23	W	Frontal	OA II	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH2</i> , c.G515A:p.R172K	1p/19q Ko-deletion	O II, IDH mut & 1p/19 kodel
AOA 166	36	W	Frontal	AOA III	<i>FUBP1</i> , exon19:c.1706-1G>A <i>CIC</i> , c.G4354T:p.E1452X <i>CIC</i> , c.G4544A:p.R1515H <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>CIC</i> , c.T4384G:p.S1462A <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q kodel
AOA 25	64	M	Parieto-occipital	AOA III	<i>CIC</i> , c.4582delC:p.P1528fs <i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation	AA III, IDH WildtypI*

Anhang

AOA 196	61	W	Frontal	AOA III	<i>PTEN</i> , exon5:c.492+2T>- <i>NF1</i> , c.6787_6790del:p.2263_2264del		AA III, IDH Wildtyp*
AOA 32	49	M	Temp-oral	AOA III	<i>ATRX</i> , c.T4679G:p.L1560R		AA III, IDH Wildtyp
AOA 170	43	M	Fronto-parietal	AOA III	<i>CIC</i> , c.C643T:p.R215W <i>CIC</i> , c.G602A:p.R201Q <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TERT</i> , g.C1295228T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
AOA 111	47	M	Temp-oral	AOA III	<i>CIC</i> , c.C2872T:p.Q958X <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q co-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
AOA 198	38	W	Fronto-parietal	AOA III	<i>PIK3CA</i> , c.C1221G:p.C407W <i>ATRX</i> , c.4769_4770del:p.1590_1590del <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.T262C:p.Y88H		AA III, IDH mut
AOA 80	47	M	Frontal	AOA III	<i>IDH1</i> , c.C394A:p.R132S <i>TERT</i> , g.C1295250T * <i>CIC</i> , c.C643T:p.R215W <i>FUBP1</i> , c.G1585T:p.G529X <i>TP53</i> , c.G440A:p.G147E	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
AOA 62	31	M	Frontal	AOA III	<i>CIC</i> , c.A614G:p.N205S <i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PIK3CA</i> , c.G1624A:p.E542K <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
AOA 124	49	M	Parietal	AOA III	<i>IDH2</i> , c.G515A:p.R172K <i>CIC</i> , c.G72A:p.W24X <i>TERT</i> , g.C1295250T *	1p/19q Ko-deletion	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
A 213	38	M	Frontal	A II	<i>IDH1</i> , c.C394A:p.R132S <i>TERT</i> , g.C1295228T *		A II, IDH mut
A 214	32	M	Occipital	A II	<i>ATRX</i> , c.C2227T:p.R743X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C		A II, IDH mut
A 248	30	W	fronto-parietal	A II	<i>TP53</i> , c.A446G:p.D149G <i>ATRX</i> , c.C4162T:p.R1388X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H		A II, IDH mut
A 345	59	M	Temp-oral	A II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.G131A:p.C44Y		A II, IDH mut
A 312	44	M	Temp-oral	A II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.T202G:p.Y68D		A II, IDH mut
A 329	23	W	Fronto-temp-oro-parietal	A II	<i>IDH1</i> , c.C394A:p.R132S <i>ATRX</i> , c.G674A:p.W225X <i>TP53</i> , c.G128A:p.R43H		A II, IDH mut
A 406	29	W	Occipital	A II	<i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>ATRX</i> , c.T5951G:p.L1984R <i>TP53</i> , c.G8A:p.C3Y		A II, IDH mut
A 355	23	M	Temp-oral	A II	<i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>ATRX</i> , exon30:c.6585+1G>A		A II, IDH mut
A 422	31	M	Frontal	A II	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>IDH2</i> , c.G515A:p.R172K <i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C		A II, IDH mut
AA 205	42	M	Fronto-parietal	AA III	<i>ATRX</i> , c.2534_2535del:p.845_845del <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H		AA III, IDH mut
AA 200	79	W	Temporo-parietal	AA III			AA III, IDH Wildtyp
AA 229	43	M	Frontal	AA III	<i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H		AA III, IDH mut
AA 284	42	W	Frontal	AA III	<i>ATRX</i> , c.2542_2545del:p.848_849del <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.G334A:p.G112S		AA III, IDH mut
AA 375	43	M	Temp-oral	AA III			AA III, IDH Wildtyp
AA 282	23	W	Frontal	AA III	<i>ATRX</i> , c.1322delC:p.P441fs <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H <i>TP53</i> , c.G440A:p.G147E		AA III, IDH mut
AA 472	24	M	Fronto-temporal	AA III	<i>ATRX</i> , c.4011delC:p.S1337fs <i>ATRX</i> , c.C1882T:p.R628X <i>IDH1</i> , c.G395A:p.R132H		AA III, IDH mut

Anhang

					<i>TP53, c.G379T:p.D127Y</i>		
AA 454	53	M	Thalamus	AA III	<i>TP53, c.A263G:p.Y88C</i> <i>ATRX, c.A6112T:p.K2038X</i> <i>H3F3A, c.A83T:p.K28M</i> <i>NF1, c.6787_6790del:p.2263_2264del</i> <i>NF1, c.7163_7166del:p.2388_2389del</i>		AA III, H3-K27 mut
AA 512	29	W	Fronto-temporal	AA III	<i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>TP53, c.G428T:p.C143F</i>		AA III, IDH mut
AA 445	50	M	Temp-oral	AA III	<i>TP53, c.C421T:p.R141C</i> <i>TP53, c.G128A:p.R43H</i> <i>ATRX, c.G5776T:p.G1926X</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i>		AA III, IDH mut
AA 430	72	M	Temp-oral	AA III	<i>TERT, g.C1295228T *</i> <i>PTEN, c.A16G:p.K6E</i>	<i>EGFR Amplifikation</i>	AA III, IDH Wildtyp**
AA 466	45	M	Frontal	AA III	<i>TP53, c.C421T:p.R141C</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>PIK3R1, c.G463T:p.E155X</i> <i>CDKN2A, c.C132G:p.Y44X</i> <i>PTEN, c.C686G:p.S229X</i> <i>NF1, c.C2998A:p.R1000S</i> <i>NF1, c.G3790T:p.E1264X</i>	<i>ATRX Exon 9 Deletion</i>	AA III, IDH mut
AA 568	48	W	Frontal	AA III	<i>TP53, c.T122G:p.V41G</i> <i>TP53, c.T7C:p.C3R</i>		AA III, IDH Wildtyp
GB 654	36	M	cerebral NOS	GB IV	<i>TP53, c.C346T:p.R116W</i> <i>ATRX, c.3846delC:p.V1282fs</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i>	<i>homozygote CDKN2A Deletion</i>	GB IV, IDH mut
GB 1111	35	W	Cerebral NOS	GB IV	<i>IDH1, c.C394A:p.R132S</i> <i>TP53, c.C139T:p.H47Y</i>		GB IV, IDH mut
GB 1041	38	W	Cerebral NOS	GB IV	<i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>PIK3CA, c.A1008G:p.I336M</i> <i>TP53, exon8:c.658-1G>C</i> <i>ATRX, c.1019_1020insA:p.T340fs</i>		GB IV, IDH mut
GB 1047	46	W	Cerebral NOS	GB IV	<i>TP53, c.G418T:p.V140L</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i>		GB IV, IDH mut
GB 2119	36	M	Temp-oral	GB IV	<i>CIC, c.G121A:p.V41I</i> <i>TP53, c.C628T:p.R210X</i> <i>TP53, c.G209A:p.R70H</i> <i>ATRX, c.2355delA:p.K785fs</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>NF1, c.G663A:p.W221X</i> <i>NF1, c.G1275A:p.W425X</i>		GB IV, IDH mut
GB 2183	50	M	Frontal	GB IV	<i>TERT, g.C1295228T *</i> <i>CDKN2C, c.141_142insGGAAATCCCGAGAT</i> <i>TGCCA:p.L47fs</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i>	<i>1p/19q Ko-deletion</i>	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
GB 2415	45	M	Frontal	GB IV	<i>ATRX, c.T3231G:p.Y1077X</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>PIK3R1, c.C346A:p.P116T</i> <i>TP53, c.T262C:p.Y88H</i> <i>TP53, exon6:c.597+1G>A</i>		GB IV, IDH mut
GB 2189	51	M	Temp-oral	GB IV	<i>TP53, c.G347A:p.R116Q</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>CDKN2A, c.262delG:p.E88fs</i> <i>TP53, c.A256G:p.T86A</i>		GB IV, IDH mut
GB 2657	52	M	Frontal	GB IV	<i>TERT, g.C1295228T *</i> <i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>PIK3CA, c.T29C:p.L10P</i>	<i>PTEN Deletion</i> <i>1p/19q Ko-deletion</i>	AO III, IDH mut & 1p/19q codel
GB 2546	48	W	Fronto-parietal	GB IV	<i>IDH1, c.G395A:p.R132H</i> <i>ATRX, c.796_797del:p.266_266del</i> <i>TP53, c.G85A:p.A29T</i> <i>TP53, c.A629C:p.X210S</i>		GB IV, IDH mut
GB 1763	45	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT, g.C1295228T *</i> <i>PTEN, c.C287A:p.P96Q</i> <i>NF1, c.1179_1180insT:p.H393fs</i>		GB IV, IDH Wildtyp
GB 564	66	W	Occipital	GB IV	<i>TERT, g.C1295228T *</i> <i>BRAF, c.T1799A:p.V600E</i> <i>PTEN, c.G395A:p.G132D</i>		GB IV, IDH Wildtyp

Anhang

GB 1248	59	W	temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PTEN</i> , exon1:c.39_42A <i>NF1</i> , c.G4992A:p.W1664X		GB IV, IDH Wildtyp
GB 1545	66	W	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation	GB IV, IDH Wildtyp
GB 1595	71	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PTEN</i> , c.A103G:p.M35V <i>NF1</i> , c.G4463A:p.R1488H		GB IV, IDH Wildtyp
GB 1936	76	W	Frontal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2109	70	M	Parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i> ** <i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2234	73	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i> <i>PTEN</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2214	39	M	Temp-oral	GB IV	<i>PIK3CA</i> , c.A3140G:p.H1047R	<i>EGFR</i> Amplifikation	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2507	64	W	fronto-temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion <i>PTEN</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2514	61	M	Frontal	GB IV	<i>TP53</i> , c.A182G:p.H61R <i>NF1</i> , exon2:c.164+1G>A <i>NF1</i> , c.C4084T:p.R1362X		GB IV, IDH Wildtyp
GB 1266 E	56	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>PTEN</i> , exon1:c.39_42A	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i>	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2212	71	W	Frontal	GB IV	<i>TP53</i> , c.C112T:p.Q38X <i>TP53</i> , c.C133T:p.P45S <i>TERT</i> , g.C1295250T *	<i>EGFR</i> Amplifikation	GB IV, IDH Wildtyp
GB 3023	69	W	Parietal	GB IV	<i>PIK3CA</i> , c.G3129A:p.M1043I		GB IV, IDH Wildtyp
GB 3004	78	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *		GB IV, IDH Wildtyp
GB 3015	77	W	Occipital	GB IV	<i>TP53</i> , c.G337A:p.G113S <i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>PTEN</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 3043	60	M	Frontal	GB IV	<i>TP53</i> , c.G400A:p.G134R <i>PTEN</i> , c.C697T:p.R233X		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2880	5	W	Thalamus	GB IV	<i>TP53</i> , c.C421T:p.R141C <i>ATRX</i> , c.C1105G:p.L369V <i>H3F3A</i> , c.A83T:p.K27M		GB IV, H3-K27 mut
GB 2343	34		Temp-oral	GB IV	<i>H3F3A</i> , c.G103A:p.G34R <i>PTEN</i> , c.A977T:p.D326V		GB IV, IDH Wildtyp***
GB 2320	42	W	Thalamus	GB IV	<i>ATRX</i> , c.T6605G:p.L2202R <i>H3F3A</i> , c.A83T:p.K27M		GB IV, H3-K27 mut
GB 1528	69	W	Temp-oro-parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i>	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2249	59	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.493-1G>A		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2290	38	M	Temp-oral	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2270	47	M	Fronto-parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.A76G:p.T26A <i>NF1</i> , c.A7123T:p.K2375X	<i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp

Anhang

GB 2417	43	M	Parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T *		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2269	74	M	Frontal	GB IV	<i>EGFR</i> , c.A787C:p.T263P <i>TERT</i> , g.C1295228T	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i>	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2646	49	W	Temporo-occipital	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.950_953del:p.V317fs		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2539	49	M	Temporo-parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>EGFR</i> , c.G865A:p.A289T	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i> ** <i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 1300	58	M	Temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.40_42del:p.14_14del <i>TP53</i> , c.G200T:p.G67V		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2086	62	M	Temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T * <i>EGFR</i> , c.C1787T:p.P596L		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2538	72	M	Frontal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.790delA:p.M264fs <i>TP53</i> , c.T262A:p.Y88N		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2448	64	M	Frontal	GB IV	<i>PTEN</i> , c.G253T:p.V85F <i>TERT</i> , g.C1295228T	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i> ** <i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2526	50	W	Parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295250T	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>PTEN</i> Deletion homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2334	73	M	temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295250T	<i>PTEN</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2380	48	M	Temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.G523A:p.V175M <i>BRAF</i> , c.A1781G:p.D594G		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2660	54	M	Temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.760_764del:p.K254fs		GB IV, IDH Wildtyp
GB 2530	43	M	Parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295250T	<i>EGFR</i> Amplifikation <i>EGFRvIII</i>	GB IV, IDH Wildtyp
GB 3045	15	W	Temporo-parietal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295250T <i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 1128	68	W	Cerebral NOS	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>TP53</i> , c.A305G:p.Y102C <i>PTEN</i> , c.165-1G>A	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 1185	57	M	Parieto-occipital	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>PTEN</i> , c.G494A:p.G165E		GB IV, IDH Wildtyp
GB 1193	43	M	Temporal	GB IV	<i>TERT</i> , g.C1295228T <i>TP53</i> , c.G128A:p.R43H <i>NRAS</i> , c.G34T:p.G12C <i>EGFR</i> , c.G661T:p.G221W <i>RB1</i> , c.1215+1G>A	<i>PTEN</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp
GB 2385	15	M	Temporal	GB IV	<i>H3F3A</i> , c.G103A:p.G34R <i>TP53</i> , c.C628T:p.R210X <i>TP53</i> , c.C190T:p.R64X	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	GB IV, IDH Wildtyp***
PXA10E	6	M	Parietal	PXA II	<i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	PXA II
PXA24E	8	W	Temporal	PXA II	<i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E		PXA II
PXA31E	10	W	Frontal	PXA II	<i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E		PXA II
PXA	16	M	Temp-	PXA II	<i>EGFR</i> , c.G2039A:p.R680Q		PXA II

54E			oral		<i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E		
PXA 62E	21	M	n.d.	PXA w.a.f.	<i>TP53</i> , c.C241T:p.R81X	homozygote <i>CDKN2A</i> Deletion	PXA w.a.f. (APXA III)
PA 160	13	W	Cerebellar	PA I			PA I
PA 193	22	M	Parieto-occipital	PA I	<i>BRAF</i> , c.T1799A:p.V600E		PA I
PA 135	7	W	Cerebellar	PA I			PA I
PA 179	2	W	Cerebellar	PA I			PA I
PA 125	15	W	Parieto-temporal	PA I			PA I

5.4 Variantenprofil der Primär- und Rezidivglioblastompaare

Die in den 65 Primär- und Rezidivglioblastompaaren detektierten Mutationen und deren Allelfrequenzen sowie die gefundenen Genkopienzahlveränderungen sind in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27: Mutationen und Allelfrequenzen sowie Genkopienzahlveränderung in den 65 untersuchten Primär- und Rezidivglioblastomen.

Tumorpaar	Gen/ Region	Varianten	Allelfrequenz Primärtumor (%)	Allel- frequenz Rezidiv- tumor (%)
6927CJ4D	TERT	chr5:C1295228T	46	53
	PTEN	NM_001304717:exon7:c.1012-1G>A	15	17
	PPM1D	NM_003620:exon6:c.G1281A:p.W427X	13	15
	TP53	NM_001126115:exon6:c.C628T:p.R210X	0	7
	ATRX	NM_138270:exon22:c.A5465G:p.N1822S	0	5
	MLH1	NM_000249:exon8:c.A655G:p.I219V	40	46
CCNAYKSJ	TERT	chr5:C1295228T	13	25
	MYBL1	NM_001080416:exon11:c.C1481T	9	25
	PTEN	NM_000314:exon5:c.C388T:p.R130X	0	27
	TP53	NM_001126115:exon1:c.C97T:p.Q33X	0	31
FADTJ0TV	TERT	chr5:C1295228T	56	21
	PTEN	NM_000314:exon1:c.A76G:p.T26A	60	14
	NF1	NM_000267:exon47:c.A7123T:p.K2375X	35	13
	chr.7	Gewinn	✓	--
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	--
TPO24OWS	TERT	chr5:C1295228T	50	23
	EGFR	NM_005228:exon15:c.G1793T:p.G598V	0	16
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	MET	Amplifikation	✓	--
	IRS2	Deletion	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	--

Anhang

	MDM2	Amplifikation	✓	✓
8KJ2WIA8	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	✓
	EGFR	NM_005228:exon7:c.A787C:p.T263P	70	70
	TERT	chr5:C1295228T	29	50
RMQHM31W	H3F3A	NM_002107:exon2:c.G103A:p.G35R	39	20
	TP53	NM_001126115:exon6:c.C628T:p.R210X	47	29
	TP53	NM_001126115:exon2:c.C190T:p.R64X	47	41
	EGFR	NM_005228:exon13:c.1539delG:p.E513fs	89	94
	PDGFRA	NM_006206:exon9:c.G1341T:p.W447C	84	88
	PDGFRA	NM_006206:exon5:c.G704A:p.C235Y	4	0
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	PDGFRA	Amplifikation	✓	✓
	PPM1D	Gewinn	✓	✓
	IRS2	Deletion	✓	--
	KRAS	Gewinn	✓	✓
	CCND2	Gewinn	✓	✓
DD25LFLA	TERT	chr5:C1295228T	32	33
	PTEN	NM_000314:exon8:c.950_953del:p.V317fs	36	34
	FGFR1	NM_001174066:exon13:c.A1688G:p.D563G	5	0
	FGFR1	NM_001174066:exon11:c.C1371A:p.N457K	10	0
	PTPN11	NM_002834:exon12:c.G1381A:p.A461T	6	22
	TP53	NM_001126115:exon4:c.C437T:p.P146L	0	45
	chr.7	Gewinn	✓	✓
ZH2Y7MZ2	TERT	chr5:C1295228T	46	70
	EGFR	NM_005228:exon7:c.G865A:p.A289T	15	0
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	RB1	Deletion	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
R1NLP8V6 CNVs RT: Gliom- Panel2 nicht auswertbar	PTEN	NM_000314:exon1:c.40_42del:p.14_14del	69	40
	TP53	NM_001126115:exon2:c.G200T:p.G67V	62	37
	TERT	chr5:C1295228T	57	33
	ATRX	NM_138270:exon14:c.A4343G:p.D1448G	0	5
	PTPN11	NM_002834:exon5:c.G541A:p.V181I	0	5
	NF2	NM_181830:exon6:c.C535T:p.R179X	0	5
	chr.7	Gewinn	✓	✓
BAGHQFDK	EGFR	NM_005228:exon15:c.C1787T:p.P596L	13	10
	NF1	NM_001042492:exon39:c.5812+2T>C	0	10
	TERT	chr5:C1295228T	60	60
EERU69RH	TERT	chr5:C1295228T	54	26
	PTEN	NM_000314:exon7:c.790delA:p.M264fs	49	34

Anhang

	TP53	NM_001126115:exon2:c.T262A:p.Y88N	47	27
	chr.7	Gewinn	✓	--
	PDGFRA	Gewinn	✓	--
O46ZNY3S	PTEN	NM_000314:exon4:c.G253T:p.V85F	75	29
	TERT	chr5:C1295228T	67	46
	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866T:p.A289V	0	29
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	--
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	--
54XA7PM0	TERT	chr5:C1295250T	52	33
	FUBP1	NM_003902:exon18:c.A1774G:p.K592E	0	4
	EGFR	NM_005228:exon9:c.C1088T:p.T363I	0	47
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	--	✓
	PTEN	Deletion	✓	--
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	--
PRWQU4Z3	TERT	chr5:C1295250T	32	36
	DAXX	NM_001254717:exon2:c.T781A	0	4
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	MDM2	Amplifikation	✓	✓
	KRAS	Gewinn	✓	✓
	IRS2	Deletion	✓	✓
754K7PNH	EGFR	Gewinn	✓	--
	IRS2	Deletion	--	✓
	CDK6	Gewinn	✓	--
	MET	Gewinn	✓	--
	TP53	Deletion	✓	✓
	TERT	chr5:C1295228T	✓	53
	TP53	TP53:NM_001126115:exon3:c.G376C:p.E126Q	0	26
	PTEN	NM_000314:c.C287A:p.P96Q	39	32
	NF1	NM_000267:c.1179_1180insT:p.H393fs	35	36
SBC305BR	TERT	chr5:C1295228T	47	43
	PTEN	NM_000314:exon6:c.G523A:p.V175M	37	28
	PIK3CA	PIK3CA:NM_006218:exon15:c.G2236A:p.D746N	0	5
	BRAF	NM_004333:exon15:c.A1781G:p.D594G	10	0
	PDGFRA	Amplifikation	✓	✓
	MDM2	Amplifikation	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	CIC	Deletion	✓	✓

Anhang

	chr.7	Gewinn	✓	✓
	IRS2	Deletion	✓	--
	KRAS	Duplizierung	✓	✓
	TSC2	Deletion	✓	✓
QUNMKW6Q	TERT	chr5:C1295228T	28	38
	PTEN	NM_000314:exon7:c.760_764del:p.K254fs	29	0
	PDGFRA	NM_006206:exon3:c.G236A:p.G79D	20	0
	PDGFRA	NM_006206:exon5:c.G704A:p.C235Y	10	0
	PDGFRA	NM_006206:exon9:c.G1341T:p.W447C	9	0
	RB1	NM_000321:exon3:c.265-1G>A	0	14
	TP53	NM_001126115:exon6:c.G631T:p.E211X	0	15
	TP53	NM_001126115:exon3:c.G317C:p.C106S	0	15
009KXOTD	TERT	chr5:C1295250T	34	10
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
RUP0Z64J	TERT	chr5:C1295228T	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	--
	CDK6	Gewinn	✓	--
	MET	Gewinn	✓	--
	IRS2	Deletion	--	✓
ZVUH4POH	H3F3A	NM_002107:c.G103A:p.G35R	41	48
	PTEN	NM_000314:c.A977T:p.D326V	52	92
	TP53	NM_001126115:c.C628T:p.R210X	92	97
	ATRX	ATRX:NM_138270:exon14:c.G4427A:p.R1476Q	48	67
	MLH1	NM_001167619:exon15:c.1122_1124del:p.374_375del	7	0
	PDGFRA	NM_006206:exon7:c.C1028T:p.P343L	77	0
	IRS2	Deletion	✓	✓
	PDGFRA	Gewinn	✓	✓
	CDK6	Amplifikation	--	✓
	chr.7	Gewinn	✓	--
TBO92ADK	TERT	chr5:C1295250T	48	35
	BRAF	NM_004333:c.T1799A:p.V600E	44	37
	KRAS	Gewinn	✓	✓
	CCND2	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
R224RO87	TP53	NM_001126115:exon3:c.A305G:p.Y102C	70	41
	TERT	chr5:C1295228T	70	25
	PTEN	NM_000314:exon3:c.165-1G>A	71	27
	CDKN2C	CDKN2C:NM_078626:exon1:c.60_63del:p.Q20fs	15	63
	chr.7	Gewinn	✓	--

Anhang

	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
PCS7KCRW	TERT	chr5:C1295228T	36	38
	PTEN	NM_000314:exon6:c.G494A:p.G165E	40	0
	PTEN	NM_000314:exon5:c.A368C:p.H123P	0	33
	NF1	NM_000267:exon16:c.1754_1757del:p.L585fs	0	26
	chr.7	Gewinn	✓	✓
6W2PGOU5	NRAS	NM_002524:exon2:c.G34T:p.G12C	37	8
	EGFR	NM_005228:exon6:c.G661T:p.G221W	28	3
	TERT	chr5:C1295228T	38	8
	RB1	NM_000321:exon12:c.1215+1G>A	25	3
	TP53	NM_001126115:exon1:c.G128A:p.R43H	28	3
8235N	TERT	chr5:C1295228T	19	44
	TP53	NM_001126115:exon4:c.C437T:p.P146L	37	69
	PTEN	NM_000314:exon7:c.C697T:p.R233X	24	56
	TP53	Deletion	--	✓
	CIC	Deletion	--	✓
	CCND2	Amplifikation	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	--	✓
	KRAS	Amplifikation	✓	✓
	MYB	Gewinn	✓	✓
	MYBL1	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
8236T	TERT	chr5:C1295228T	67	45
	PIK3CA	NM_006218:exon10:c.G1624A:p.E542K	39	34
8238F	TERT	chr5:C1295228T	35	50
	PTPN11	NM_002834:exon12:c.G1381A:p.A461T	24	2
	EGFR	NM_005228:exon17:c.C1934G:p.S645C	0	23
	PTPN11	NM_002834:exon3:c.G205A:p.E69K	0	24
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
3012L	CIC	Gewinn	✓	✓
	PTEN	NM_000314:exon4:c.G212A:p.C71Y	16	38
	TERT	chr5:C1295228T	22	32
	PTPN11	NM_002834:exon13:c.C1520A:p.T507K	16	30
	chr.7	Gewinn	✓	✓
8244P	TERT	chr5:C1295250T	30	23
	TP53	NM_001126115:exon1:c.G128A:p.R43H	25	25
	NF1	NM_000267:exon45:c.6787_6790del:p.T2263fs	12	0
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	KRAS	Amplifikation	--	✓
	MYBL1	Gewinn	--	✓
6239e	TERT	chr5:C1295250T	52	30

Anhang

	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866A:p.A289D	11	6
	PTEN	NM_000314:exon5:c.C334G:p.L112V	60	62
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	--
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	✓
6317N	PIK3CA	NM_006218:exon2:c.C223G:p.Q75E	40	22
CNVs RT:	TERT	chr5:C1295228T	57	13
Gliom-	EGFR	NM_005228:exon5:c.C574G:p.P192A	18	6
Panel2	CIC	Gewinn	✓	--
nicht	PTEN	Deletion	✓	✓
auswertbar	chr.7	Gewinn	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
3152C	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	✓
	RB1	Deletion	✓	✓
	CIC	Gewinn	✓	✓
	TERT	chr5:C1295228T	60	22
	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866T:p.A289V	0	93
	PIK3CA	NM_006218:exon20:c.C2903G:p.A968G	0	4
3196T	PIK3CA	NM_006218:exon2:c.C277T:p.R93W	35	35
	TERT	chr5:C1295228T	50	51
	EGFR	NM_005228:exon2:c.T185G:p.L62R	94	7
	EGFR	NM_005228:exon11:c.G1280A:p.R427H	7	0
	EGFR	EGFR:NM_005228:exon13:c.G1562A:p.R521K	4	7
	EGFR	NM_005228:exon18:c.G2156A:p.G719D	0	22
	TP53	NM_001126115:exon3:c.330_331insCTGC:p.M111fs	0	17
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	--	✓
	PIK3C2B	Gewinn	--	✓
	MDM4	Gewinn	--	✓
	RB1	Deletion	✓	✓
	CIC	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
3146L	EGFR	Amplifikation	✓	✓
RT:	EGFRvIII	Deletion	✓	✓
CNVs Gliom-	PTEN	Deletion	✓	✓
Panel2	RB1	Deletion	✓	✓
nicht	TP53	Amplifikation	✓	✓
auswertbar	CIC	Gewinn	✓	✓
	TERT	chr5:C1295250T	33	26

Anhang

	PIK3CA	NM_006218:exon3:c.G353A:p.G118D	22	28
	DAXX	DAXX:NM_001254717:exon2:c.T781A:p.F261I	13	17
20SWDRYU	TP53	NM_001126115:exon1:c.A140G:p.H47R	61	70
	TERT	chr5:C1295250T	45	31
	CDK6	Gewinn	✓	✓
	RB1	Deletion	--	✓
	CIC	Gewinn	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
LVY2D7W3	PIK3CA	NM_006218:exon19:c.G2702T:p.C901F	36	41
	TERT	chr5:C1295228T	60	68
	EGFR	NM_005228:exon15:c.A1813G:p.T605A	1	95
	EGFR	NM_005228:exon15:c.A1829G:p.Y610C	1	94
	EGFR	NM_005228:exon13:c.G1562A:p.R521K	91	0
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CIC	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	--
M986HS4Z	TERT	chr5:C1295228T	24	24
	PIK3R1	NM_001242466:exon4:c.279_290del:p.93_97del	11	13
	PIK3R1	NM_001242466:exon6:c.A601G:p.N201D	11	11
S5OYPOUZ	TERT	chr5:C1295228T	65	68
	PTEN	NM_000314:exon1:c.A16T:p.K6X	86	84
	RB1	NM_000321:exon8:c.729_730insAA:p.V243fs	77	78
	RB1	NM_000321:exon9:c.C920T:p.T307I	85	83
	TP53	NM_001126118:exon3:c.212_213insGTTTCCG:p.R71fs	73	71
	PIK3R1	NM_181504:exon2:c.G168A:p.M56I	10	11
	PIK3C2B	Amplifikation	✓	--
	MDM4	Amplifikation	✓	--
Bev7 RT: CNVs Gliom- Panel2 nicht auswertbar	chr.7	Gewinn	✓	✓
	TERT	chr5:C1295228T	80	43
	EGFR	NM_005228:exon20:c.G2303T:p.S768I	5	0
	MLH1	NM_001167619:exon10:c.G166A:p.E56K	0	4
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
Bev9 PT/RT: CNVs Gliom- Panel1 nicht auswertbar	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	TERT	chr5:C1295228T	19	43
	RB1	NM_000321:exon20:c.C2104T:p.Q702X	13	42
	TP53	NM_001126115:exon2:c.C190T:p.R64X	16	45
	TP53	NM_001126118:exon3:c.C98G:p.P33R	43	27
	PTEN	NM_000314:exon8:c.950_953del:p.V317fs	14	0
	CIC	CIC:NM_015125:exon20:c.G4813A:p.A1605T	9	0
	NF1	NM_000267:exon32:c.A4306G:p.K1436E	0	72

Anhang

	NF1	NM_000267:exon44:c.C6709T:p.R2237X	0	20
	DAXX	NM_001254717:exon2:c.T781A:p.F261I	0	13
	MYB	NM_001130172:exon6:c.A545G:p.K182R	0	16
	CCND1	NM_053056:exon4:c.G716A:p.C239Y	0	4
	PDGFRA	Amplifikation	--	✓
J81VQ8XJ	TERT	chr5:C1295228T	40	43
PT/RT:	NF1	NM_000267:exon21:c.G2524A:p.G842S	28	32
Gliom-	PTEN	NM_000314:exon7:c.G701A:p.R234Q	5	0
Panel2	PMS2	NM_000535:exon12:c.G2016A:p.M672I	10	8
nicht	CIC	Gewinn	✓	✓
auswertbar	PTEN	Deletion	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
3387N	TERT	chr5:C1295228T	29	29
	NF1	NM_000267:exon28:c.3737_3740del:p.L1246fs	12	14
	BRAF	NM_004333:exon11:c.G1397T:p.G466V	5	0
	BRAF	NM_004333:exon15:c.G1786C:p.G596R	0	4
	EGFR	Gewinn	✓	✓
	CIC	Gewinn	✓	--
3490e	PTEN	NM_000314:exon5:c.C388T:p.R130X	77	80
RT:	RB1	NM_000321:exon3:c.304_305del:p.C102fs	77	75
Gliom-	TP53	NM_001126112:exon4:c.97-1G>T	14	40
Panel2	NF1	NM_000267:exon49:c.C7285T:p.R2429X	43	43
nicht	PTEN	NM_000314:exon6:c.634+1G>A	4	0
auswertbar	TP53	NM_001126115:exon1:c.G128A:p.R43H	22	0
	MSH2	NM_000251:exon11:c.1718delC:p.A573fs	91	94
	MSH2	NM_000251:exon1:c.G82A:p.E28K	0	53
	FUBP1	NM_003902:exon15:c.C1477T:p.P493S	0	5
	NRAS	NM_002524:exon4:c.G322A:p.D108N	0	19
	PIK3R1	NM_181523:exon8:c.1019+1G>A	0	28
	EGFR	NM_201284:exon16:c.G2045A:p.G682D	0	7
	EGFR	NM_005228:exon28:c.G3485A:p.S1162N	0	6
	NF1	NF1:NM_000267:exon18:c.C2105T:p.A702V	0	17
	NF1	NF1:NM_000267:exon31:c.G4111A:p.V1371M	0	6
	NF1	NF1:NM_000267:exon33:c.G4441A:p.G1481S	0	7
	CIC	NM_015125:exon16:c.C3875T:p.P1292L	0	21
	CIC	NM_001304815:exon18:c.6922+1G>A	0	8
	ATRX	NM_138270:exon8:c.G3520A:p.D1174N	0	5
	ATRX	NM_138270:exon8:c.G565A:p.G189R	0	10
	MYBL1	NM_001080416:exon10:c.A1417G:p.N473D	0	29
	MYBL1	NM_001080416:exon10:c.G1333A:p.A445T	0	4
	NTRK2	NM_001018064:exon5:c.C500T:p.S167F	0	18
	TSC1	NM_001162427:exon21:c.G2705A:p.R902K	0	33
	TSC1	NM_001162427:exon11:c.C1078T:p.L360F	0	5
	TSC1	NM_001162427:exon5:c.C352T:p.P118S	0	8

Anhang

	IRS2	NM_003749:exon1:c.C2135T:p.P712L	0	15
	TSC2	NM_001114382:exon4:c.226-1G>A	0	48
	CCND2	Gewinn	✓	na
	KRAS	Gewinn	✓	na
	NF2	Deletion	✓	✓
4678M	CIC	NM_015125:exon10:c.C2086T:p.R696W	36	47
	TERT	chr5:C1295228T	24	12
	CIC	Gewinn	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	✓
21ISINAU	PIK3CA	NM_006218:exon21:c.A3140G:p.H1047R	22	35
	IRS2	IRS2:NM_003749:exon1:c.C2656T:p.R886W	4	0
	EGFR	NM_005228:exon15:c.G1784A:p.C595Y	12	0
	EGFR	NM_005228:exon20:c.G2303T:p.S768I	0	4
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CCND1	Deletion	✓	--
	IRS2	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	--	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
38XCWM05	TERT	chr5:C1295228T	43	33
	TP53	NM_001126115:exon3:c.G317A:p.C106Y	43	69
	PTEN	NM_000314:exon6:c.A530T:p.Y177F	70	0
	TP53	NM_001126115:exon1:c.G128A:p.R43H	42	0
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CDK6	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	--	✓
	PDGFRA	Gewinn	--	✓
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
3M1P7VOJ	EGFR	NM_005228:exon7:c.A824T:p.Y275F	51	79
	TERT	chr5:C1295228T	44	43
	EGFR	NM_005228:exon7:c.865_866TA	0	46
	PTEN	Deletion	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	PDGFRA	Gewinn	✓	--
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	MDM2	Amplifikation	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	✓
J1HJST50	TERT	chr5:C1295228T	54	67
	FUBP1	NM_003902:exon13:c.A1100G:p.N367S	47	53
	EGFR	NM_005228:exon17:c.G2039A:p.R680Q	35	0
	PIK3CA	NM_006218:exon21:c.A3140G:p.H1047R	42	0
	PTEN	NM_000314:exon5:c.G380C:p.G127A	0	12
	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866A:p.A289D	0	94
	EGFR	Gewinn	✓	✓

Anhang

	RB1	Deletion	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CDK4	Amplifikation	✓	✓
	MDM2	Amplifikation	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
V4F52K0W	PMS2	NM_000535:exon11:c.T1480G:p.S494A	66	68
	TERT	chr5:C1295228T	68	76
	PTEN	NM_000314:exon6:c.634+1G>C	69	0
	NF2	NM_000268:exon2:c.139_143del:p.F47fs	0	40
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	EGFR	Gewinn	✓	✓
	CDK6	Amplifikation	✓	✓
	PDGFRA	Amplifikation	--	✓
8237C	TERT	chr5:C1295228T	53	30
	EGFR	EGFR:NM_005228:exon7:c.C866T:p.A289V	9	46
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRVIII	Deletion	✓	✓
	NF2	Deletion	✓	--
	CIC	Gewinn	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	CDK6	Amplifikation	✓	✓
	MET	Gewinn	✓	✓
	CCND1	Deletion	✓	✓
	CCND2	Gewinn	--	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
3406P	EGFR	NM_005228:exon15:c.C1787T:p.P596L	0	75
	TERT	chr5:C1295250T	✓	--
	EGFR	Amplifikation	--	✓
	CDK6	Amplifikation	✓	✓
	PDGFRA	Gewinn	--	✓
	CCND2	Gewinn	✓	✓
	MDM2	Amplifikation	✓	✓
4270H	DAXX	DAXX:NM_001254717:exon2:c.T781A:p.F261I	21	18
	TERT	chr5:C1295228T	47	30
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRVIII	Deletion	✓	✓
	DAXX	Gewinn	✓	✓
	RB1	Deletion	--	✓
22B58SJO	PTEN	NM_000314:exon5:c.G402A:p.M134I	46	0
	PTEN	NM_000314:exon7:c.C697T:p.R233X	0	32
	MSH6	MSH6:NM_001281492:exon2:c.C1628A:p.P543Q	8	0
	PDGFRA	PDGFRA:NM_006206:exon20:c.C2740T:p.R914W	7	0
	TERT	chr5:C1295228T	50	69
	chr.7	Gewinn	✓	✓

Anhang

	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
3575A	EGFR	NM_005228:exon15:c.G1793T:p.G598V	47	6
	EGFR	NM_005228:exon24:c.A2941C:p.I981L	96	79
	PTEN	NM_000314:exon5:c.384dupG:p.K128fs	64	9
	ATRX	NM_138270:exon15:c.T4556C:p.V1519A	0	8
	DAXX	DAXX:NM_001254717:exon2:c.T781A:p.F261I	0	6
	TERT	chr5:C1295228T	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	PDGFRA	Deletion Exon 17-22	✓	--
	MYB	Deletion	✓	--
	NF2	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	--
4759N	PIK3CA	PIK3CA:NM_006218:exon21:c.G3148A:p.G1050S	21	10
	EGFR	EGFR:NM_005228:exon7:c.T760A:p.F254I	87	80
	TERT	chr5:C1295228T	26	18
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
1F33A2M5	PIK3CA	NM_006218:exon7:c.A1173G:p.I391M	38	56
	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866T:p.A289V	23	0
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	✓
	TP53	Amplifikation	✓	✓
	RB1	Deletion	✓	✓
	CCND1	Deletion	✓	✓
	CCND2	Amplifikation	✓	--
	CDK4	Amplifikation	✓	--
	NF2	Amplifikation	✓	--
	ATRX	Deletion	✓	--
	CIC	Gewinn	✓	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
83RPQTKM	EGFR	NM_005228:exon6:c.A685T:p.S229C	0	80
	ATRX	NM_138270:exon33:c.A7016G:p.Q2339R	4	0
	TERT	chr5:C1295228T	✓	✓
	IRS2	NM_003749:exon1:c.C2369T:p.P790L	0	5
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRvIII	Deletion	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	✓
	CIC	Gewinn	--	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	CDK6	PT: Amplifikation, RT: Gewinn	✓	✓
	MET	PT: Amplifikation, RT: Gewinn	✓	✓
	KRAS	Amplifikation	✓	✓

Anhang

	MYBL1	PT: Amplifikation, RT: Gewinn	✓	✓
	MDM4	Gewinn	--	✓
	CCND1	Deletion	--	✓
	IRS2	Deletion	--	✓
	TSC2	Deletion	--	✓
9M9CIZU5	EGFR	NM_005228:exon13:c.G1562A:p.R521K	80	4
	CIC	CIC:NM_015125:exon4:c.G562A:p.D188N	0	4
	CIC	CIC:NM_015125:exon10:c.C2101T:p.P701S,	0	7
	TSC2	NM_000548:exon24:c.G2674A:p.V892I	0	5
	MDM2	MDM2:NM_001145337:exon2:c.C47G:p.T16S	52	50
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRVIII	Deletion	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	CIC	Deletion	✓	✓
	NF2	Deletion	--	✓
	TP53	Deletion	--	✓
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	MET	Amplifikation	✓	✓
	IRS2	Deletion	✓	✓
	CCND1	Deletion	✓	✓
	TSC2	Deletion	✓	✓
	KRAS	Amplifikation	✓	✓
	CDK6	Gewinn	✓	✓
	PDGFRA	PT: Amplifikation, RT: Gewinn	✓	✓
UVT3NUNO	EGFR	NM_005228:exon15:c.G1793T:p.G598V	80	0
	CIC	NM_015125:exon15:c.C3707G:p.P1236R	35	42
	TERT	chr5:C1295228T	✓	53
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	EGFRVIII	Deletion	--	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	--
	PTEN	Deletion	✓	--
ZETKND4U	PTEN	NM_000314:exon1:c.72_79del:p.D24fs	53	86
	TERT	chr5:C1295228T	✓	33
	PTPN11	NM_002834:exon13:c.T1504C:p.S502P	0	38
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	EGFR	Amplifikation	✓	--
R2IO4Z52 PT/RT: Gliom- Panel2 nicht auswertbar	IDH1	NM_001282386:exon4:c.C394T:p.R132C	19	47
	EGFR	NM_005228:exon7:c.889+1G>A	4	0
	TP53	TP53:NM_001126115:exon4:c.C436A:p.P146T	86	93
	EGFR	Amplifikation	NA	--
	CDKN2A/B	Deletion	--	✓

Anhang

UEPV37X1	EGFR	NM_005228:exon13:c.G1562A:p.R521K	7	42
	CDKN2A	NM_000077:exon2:c.G442A:p.A148T	82	73
	CDKN2A	NM_058197:exon1:c.G187C:p.G63R	11	27
	PTEN	NM_000314:exon8:c.960delA:p.L320fs	83	49
	RB1	NM_000321:exon18:c.C1735T:p.R579X	74	33
	TP53	NM_001126115:exon1:c.G31A:p.V11M	88	48
	TP53	NM_001126118:exon3:c.C98G:p.P33R	8	27
	EGFR	Amplifikation	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	✓
3RO58ZYE	IRS2	Deletion	✓	✓
	TERT	chr5:C1295228T	✓	56
	EGFR	NM_005228:exon7:c.C866T:p.A289V	94	84
	EGFR	Amplifikation	✓	✓
	CDKN2A/B	Deletion	✓	✓
	PTEN	Deletion	✓	✓
	HIST1H3B	Deletion	✓	✓
	DAXX	Deletion	✓	✓
	MYB	Deletion	✓	✓
M8ULQDZ	CCND3	Deletion	✓	✓
	CDK6	Amplifikation	✓	✓
	MET	Amplifikation	✓	✓
	PIK3CA	NM_006218:exon6:c.T1132C:p.C378R	43	46
	TERT	chr5:C1295250T	32	✓
MKY181CY	PDGFRA	NM_006206:exon7:c.G1021A:p.A341T	45	40
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	PDGFRA	Amplifikation	✓	✓
	PIK3CA	NM_006218:exon7:c.A1173G:p.I391M	30	40
	EGFR	NM_005228:exon7:c.G865A:p.A289T	94	19
MKY181CY	PTEN	NM_000314:exon7:c.741dupA:p.L247fs	95	42
	TP53	NM_001126115:exon4:c.C436G:p.P146A	89	25
	FUBP1	NM_003902:exon19:c.C1912T:p.P638S	0	4
	PIK3CA	NM_006218:exon9:c.G1507A:p.E503K	0	5
	NF1	NM_000267:exon28:c.G3774A:p.W1258X	0	7
	NF1	NM_000267:exon57:c.C8344T:p.P2782S	0	24
	ATRX	NM_138270:exon8:c.G3511A:p.E1171K	0	24
	MSH6	NM_000179:exon2:c.G278A:p.G93E	0	28
	MSH6	NM_000179:exon2:c.G318A:p.W106X	0	29
	CDK4	NM_000075:exon3:c.218+1G>A	0	22
	EGFR	Amplifikation	✓	--
	TP53	Deletion	✓	--
	chr.7	Gewinn	✓	✓
	CCND1	Deletion	✓	--
	CDK4	Amplifikation	✓	--

PT: Primärtumor, RT: Rezidivtumor, NA: nicht auswertbar, CNVs: *copy number variations*

Literaturverzeichnis

- Agarwala, S. S. u. Kirkwood, J. M. (2000): Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist* 5 (2): 144–151.
- Ai, B.; Liu, H.; Huang, Y. u. Peng, P. (2016): Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7 (28): 44583–44595.
- Andor, N.; Harness, J. V.; Müller, S.; Mewes, H. W. u. Petritsch, C. (2014): EXPANDS: expanding ploidy and allele frequency on nested subpopulations. *Bioinformatics* 30 (1): 50–60.
- Balss, J.; Meyer, J.; Mueller, W.; Korshunov, A.; Hartmann, C. u. Deimling, A. von (2008): Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116 (6): 597–602.
- Becker, A. P.; Scapulatempo-Neto, C.; Carloni, A. C.; Paulino, A.; Sheren, J.; Aisner, D. L.; Musselwhite, E. u. Clara, C., et al. (2015): KIAA1549: BRAF Gene Fusion and FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74 (7): 743–754.
- Bender, S.; Tang, Y.; Lindroth, A. M.; Hovestadt, V.; Jones, David T W; Kool, M.; Zapatka, M. u. Northcott, P. A., et al. (2013): Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 24 (5): 660–672.
- Bennett, C. W.; Berchem, G.; Kim, Y. J. u. El-Khoury, V. (2016): Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget* 7 (43): 71013–71035.
- Bettegowda, C.; Agrawal, N.; Jiao, Y.; Sausen, M.; Wood, L. D.; Hruban, R. H.; Rodriguez, F. J. u. Cahill, D. P., et al. (2011): Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* 333 (6048): 1453–1455.
- Bettegowda, C.; Sausen, M.; Leary, R. J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Agrawal, N.; Bartlett, B. R. u. Wang, H., et al. (2014): Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6 (224): 224ra24.
- Bodell, W. J.; Gaikwad, N. W.; Miller, D. u. Berger, M. S. (2003): Formation of DNA adducts and induction of lacI mutations in Big Blue Rat-2 cells treated with temozolomide: implications for the treatment of low-grade adult and pediatric brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (6): 545–551.
- Bodnar, A. G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S. E.; Chiu, C. P.; Morin, G. B.; Harley, C. B.; Shay, J. W.; Lichtsteiner, S. u. Wright, W. E. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 (5349): 349–352.
- Bollag, G.; Clapp, D. W.; Shih, S.; Adler, F.; Zhang, Y. Y.; Thompson, P.; Lange, B. J. u. Freedman, M. H., et al. (1996): Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* 12 (2): 144–148.

- Børsting, C. u. Morling, N. (2015): Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet* 18: 78–89.
- Bragg, L. M.; Stone, G.; Butler, M. K.; Hugenholtz, P. u. Tyson, G. W. (2013): Shining a light on dark sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data. *PLoS Comput Biol* 9 (4): e1003031.
- Brat, D. J.; Verhaak, Roel G W; Aldape, K. D.; Yung, W K Alfred; Salama, S. R.; Cooper, Lee A D; Rheinbay, E. u. Miller, C. R., et al. (2015): Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 372 (26): 2481–2498.
- Brennan, C.; Momota, H.; Hambardzumyan, D.; Ozawa, T.; Tandon, A.; Pedraza, A. u. Holland, E. (2009): Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE* 4 (11): e7752.
- Brennan, C. W.; Verhaak, Roel G W; McKenna, A.; Campos, B.; Noushmehr, H.; Salama, S. R.; Zheng, S. u. Chakravarty, D., et al. (2013): The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155 (2): 462–477.
- Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A. M.; Eisenberg, A. J. u. Allen, R. C. (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48 (1): 137–144.
- Büsches, R.; Weber, R. G.; Actor, B.; Lichter, P.; Collins, V. P. u. Reifenberger, G. (1999): Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9 (3): 435–42; discussion 432–3.
- Cahill, D. P.; Levine, K. K.; Betensky, R. A.; Codd, P. J.; Romany, C. A.; Reavie, L. B.; Batchelor, T. T. u. Futreal, P. A., et al. (2007): Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 13 (7): 2038–2045.
- Cahill, D. P.; Louis, D. N. u. Cairncross, J. G. (2015): Molecular background of oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncol* 4 (5): 287–294.
- Cairncross, J. G.; Ueki, K.; Zlatescu, M. C.; Lisle, D. K.; Finkelstein, D. M.; Hammond, R. R.; Silver, J. S. u. Stark, P. C., et al. (1998): Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90 (19): 1473–1479.
- Campisi u. d'Adda di Fagagna (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9): 729–740.
- Campos, B.; Olsen, L. R.; Urup, T. u. Poulsen, H. S. (2016): A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene* 35 (45): 5819–5825.
- Capper, D.; Zentgraf, H.; Balss, J.; Hartmann, C. u. Deimling, A. von (2009): Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol* 118 (5): 599–601.
- Ceccarelli, M.; Barthel, F. P.; Malta, T. M.; Sabedot, T. S.; Salama, S. R.; Murray, B. A.; Morozova, O. u. Newton, Y., et al. (2016): Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* 164 (3): 550–563.
- Chan, J. A.; Zhang, H.; Roberts, P. S.; Jozwiak, S.; Wieslawa, G.; Lewin-Kowalik, J.; Kotulska, K. u. Kwiatkowski, D. J. (2004): Pathogenesis of tuberous sclerosis

subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (12): 1236–1242.

Cheng, F.; Su, L. u. Qian, C. (2016): Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 7 (30): 48832–48841.

Clendenning, M.; Hampel, H.; LaJeunesse, J.; Lindblom, A.; Lockman, J.; Nilbert, M.; Senter, L.; Sotamaa, K. u. de la Chapelle, Albert (2006): Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat* 27 (5): 490–495.

Collins, V. P.; Jones, David T W u. Giannini, C. (2015): Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129 (6): 775–788.

Dang, L.; White, D. W.; Gross, S.; Bennett, B. D.; Bittinger, M. A.; Driggers, E. M.; Fantin, V. R. u. Jang, H. G., et al. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462 (7274): 739–744.

de Leng, Wendy W J; Gadellaa-van Hooijdonk, Christa G; Barendregt-Smouter, Françoise A S; Koudijs, M. J.; Nijman, I.; Hinrichs, John W J; Cuppen, E. u. van Lieshout, S., et al. (2016): Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PLoS ONE* 11 (2): e0149405.

Do, H. u. Dobrovic, A. (2012): Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget* 3 (5): 546–558.

Do, H. u. Dobrovic, A. (2015): Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 61 (1): 64–71.

Dubbink, H. J.; Atmodimedjo, P. N.; Kros, J. M.; French, P. J.; Sanson, M.; Idbaih, A.; Wesseling, P. u. Enting, R., et al. (2016): Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro-oncology* 18 (3): 388–400.

Ellison, G.; Huang, S.; Carr, H.; Wallace, A.; Ahdesmaki, M.; Bhaskar, S. u. Mills, J. (2015): A reliable method for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fixed tumour tissue utilising multiplex PCR-based targeted next generation sequencing. *BMC Clin Pathol* 15: 5.

Ewing, B. u. Green, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8 (3): 186–194.

Felsberg, J.; Wolter, M.; Seul, H.; Friedensdorf, B.; Göppert, M.; Sabel, M. C. u. Reifenger, G. (2010): Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol* 119 (4): 501–507.

Fisher, S.; Barry, A.; Abreu, J.; Minie, B.; Nolan, J.; Delorey, T. M.; Young, G. u. Fennell, T. J., et al. (2011): A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol* 12 (1): R1.

Frampton, G. M.; Fichtenholtz, A.; Otto, G. A.; Wang, K.; Downing, S. R.; He, J.; Schnall-Levin, M. u. White, J., et al. (2013): Development and validation of a clinical cancer

genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 31 (11): 1023–1031.

Froyen, G.; Broekmans, A.; Hillen, F.; Pat, K.; Achten, R.; Mebis, J.; Rummens, J.-L.; Willemse, J. u. Maes, B. (2016): Validation and Application of a Custom-Designed Targeted Next-Generation Sequencing Panel for the Diagnostic Mutational Profiling of Solid Tumors. *PLoS ONE* 11 (4): e0154038.

Gil, J. u. Peters, G. (2006): Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (9): 667–677.

Gilbert, M Thomas P; Haselkorn, T.; Bunce, M.; Sanchez, J. J.; Lucas, S. B.; Jewell, L. D.; van Marck, E. u. Worobey, M. (2007): The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS ONE* 2 (6): e537.

Gleize, V.; Alentorn, A.; Connen de Kérillis, Léa; Labussière, M.; Nadaradjane, A. A.; Mundwiller, E.; Ottolenghi, C. u. Mangesius, S., et al. (2015): CIC inactivating mutations identify aggressive subset of 1p19q codeleted gliomas. *Ann Neurol* 78 (3): 355–374.

Graña, X. u. Reddy, E. P. (1995): Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11 (2): 211–219.

Grasso, C.; Butler, T.; Rhodes, K.; Quist, M.; Neff, T. L.; Moore, S.; Tomlins, S. A. u. Reinig, E., et al. (2015): Assessing copy number alterations in targeted, amplicon-based next-generation sequencing data. *J Mol Diagn* 17 (1): 53–63.

Griffin CA, Burger P; Morsberger L; Yonescu R; Swierczynski S; Weingart JD; Murphy KM. (2006): Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65(10):988-94

Haas-Kogan, D.; Shalev, N.; Wong, M.; Mills, G.; Yount, G. u. Stokoe, D. (1998): Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 8 (21): 1195–1198.

Hartmann, C.; Meyer, J.; Balss, J.; Capper, D.; Mueller, W.; Christians, A.; Felsberg, J. u. Wolter, M., et al. (2009): Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118 (4): 469–474.

Hashizume, R.; Andor, N.; Ihara, Y.; Lerner, R.; Gan, H.; Chen, X.; Fang, D. u. Huang, X., et al. (2014): Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* 20 (12): 1394–1396.

Heaphy, C. M.; de Wilde, Roeland F; Jiao, Y.; Klein, A. P.; Edil, B. H.; Shi, C.; Bettegowda, C. u. Rodriguez, F. J., et al. (2011): Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 333 (6041): 425.

Hegi, M. E.; Diserens, A.-C.; Gorlia, T.; Hamou, M.-F.; Tribolet, N. de; Weller, M.; Kros, J. M. u. Hainfellner, J. A., et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10): 997–1003.

Heidenreich, B.; Rachakonda, P. S.; Hosen, I.; Volz, F.; Hemminki, K.; Weyerbrock, A. u. Kumar, R. (2015): TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences. *Oncotarget* 6 (12): 10617–10633.

- Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F. O.; Hesch, R. D. u. Knippers, R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61 (4): 1659–1665.
- Jelinek, W. R.; Toomey, T. P.; Leinwand, L.; Duncan, C. H.; Biro, P. A.; Choudary, P. V.; Weissman, S. M. u. Rubin, C. M., et al. (1980): Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (3): 1398–1402.
- Jiao, Y.; Killela, P. J.; Reitman, Z. J.; Rasheed, A. B.; Heaphy, C. M.; de Wilde, Roeland F; Rodriguez, F. J. u. Rosenberg, S., et al. (2012): Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3 (7): 709–722.
- Johnson, B. E.; Mazor, T.; Hong, C.; Barnes, M.; Aihara, K.; McLean, C. Y.; Fouse, S. D. u. Yamamoto, S., et al. (2014): Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 343 (6167): 189–193.
- Jones, David T W; Hutter, B.; Jäger, N.; Korshunov, A.; Kool, M.; Warnatz, H.-J.; Zichner, T. u. Lambert, S. R., et al. (2013): Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 45 (8): 927–932.
- Kassenärztliche Bundesvereinigung (2016): <http://www.kbv.de/html/online-ebm.php>. Aufgerufen am 14.2.2017.
- Killela, P. J.; Pirozzi, C. J.; Reitman, Z. J.; Jones, S.; Rasheed, B. A.; Lipp, E.; Friedman, H. u. Friedman, A. H., et al. (2014): The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. *Oncotarget* 5 (6): 1452–1457.
- Kim, H.; Zheng, S.; Amini, S. S.; Virk, S. M.; Mikkelsen, T.; Brat, D. J.; Grimsby, J. u. Sougnez, C., et al. (2015): Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* 25 (3): 316–327.
- Knobbe, C. B. u. Reifenberger, G. (2003): Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* 13 (4): 507–518.
- Koelsche, C.; Sahm, F.; Wöhrer, A.; Jeibmann, A.; Schittenhelm, J.; Kohlhof, P.; Preusser, M. u. Romeike, B., et al. (2014): BRAF-mutated pleomorphic xanthoastrocytoma is associated with temporal location, reticulin fiber deposition and CD34 expression. *Brain Pathol* 24 (3): 221–229.
- Lapin, V.; Mighion, L. C.; da Silva, Cristina P; Cuperus, Y.; Bean, Lora J H u. Hegde, M. R. (2016): Regulating whole exome sequencing as a diagnostic test. *Hum Genet* 135 (6): 655–673.
- Lips, J. u. Kaina, B. (2001): Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. *Mutat Res* 487 (1-2): 59–66.
- Liu, X.-Y.; Gerges, N.; Korshunov, A.; Sabha, N.; Khuong-Quang, D.-A.; Fontebasso, A. M.; Fleming, A. u. Hadjadj, D., et al. (2012): Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* 124 (5): 615–625.

- Livak, K. J. u. Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
- Loman, N. J.; Misra, R. V.; Dallman, T. J.; Constantinidou, C.; Gharbia, S. E.; Wain, J. u. Pallen, M. J. (2012): Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30 (5): 434–439.
- Longo, M. C.; Berninger, M. S. u. Hartley, J. L. (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93 (1): 125–128.
- Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B. W. u. Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114 (2): 97–109.
- Louis, D. N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Deimling, A. von; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W. K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Kleihues, P. u. Ellison, D. W. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131 (6): 803–820.
- Lovejoy, C. A.; Li, W.; Reisenweber, S.; Thongthip, S.; Bruno, J.; Lange, T. de; De, S. u. Petrini, John H J, et al. (2012): Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet* 8 (7): e1002772.
- Luthra, R.; Chen, H.; Roy-Chowdhuri, S. u. Singh, R. R. (2015): Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel)* 7 (4): 2023–2036.
- MacLean, D.; Jones, Jonathan D G u. Studholme, D. J. (2009): Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol* 7 (4): 287–296.
- Malapelle, U.; Vigliar, E.; Sgariglia, R.; Bellevisine, C.; Colarossi, L.; Vitale, D.; Pallante, P. u. Troncone, G. (2015): Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol* 68 (1): 64–68.
- Malmström, A.; Grønberg, B. H.; Marosi, C.; Stupp, R.; Frappaz, D.; Schultz, H.; Abacioglu, U. u. Tavelin, B., et al. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13 (9): 916–926.
- Malzkorn, B. u. Reifenberger, G. (2016): Practical implications of integrated glioma classification according to the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system 2016. *Curr Opin Oncol* 28 (6): 494–501.
- Marusyk, A. u. Polyak, K. (2010): Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805 (1): 105–117.
- Masui, K.; Mischel, P. S. u. Reifenberger, G. (2016): Molecular classification of gliomas. *Handb Clin Neurol* 134: 97–120.

- McCall, C. M.; Mosier, S.; Thiess, M.; Debeljak, M.; Pallavajjala, A.; Beierl, K.; Deak, K. L. u. Datto, M. B., et al. (2014): False positives in multiplex PCR-based next-generation sequencing have unique signatures. *J Mol Diagn* 16 (5): 541–549.
- McDowell, D. G.; Burns, N. A. u. Parkes, H. C. (1998): Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 26 (14): 3340–3347.
- Mosrati, M. A.; Malmström, A.; Lysiak, M.; Kryzstofiak, A.; Hallbeck, M.; Milos, P.; Hallbeck, A.-L. u. Bratthäll, C., et al. (2015): TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* 6 (18): 16663–16673.
- Murphree, A. L. u. Benedict, W. F. (1984): Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 223 (4640): 1028–1033.
- Nikbakht, H.; Panditharatna, E.; Mikael, L. G.; Li, R.; Gayden, T.; Osmond, M.; Ho, C.-Y. u. Kambhampati, M., et al. (2016): Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun* 7: 11185.
- Nitta, M.; Kozono, D.; Kennedy, R.; Stommel, J.; Ng, K.; Zinn, P. O.; Kushwaha, D. u. Kesari, S., et al. (2010): Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS ONE* 5 (5): e10767.
- Noushmehr, H.; Weisenberger, D. J.; Diefes, K.; Phillips, H. S.; Pujara, K.; Berman, B. P.; Pan, F. u. Pelloso, C. E., et al. (2010): Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17 (5): 510–522.
- Nowell, P. C. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (4260): 23–28.
- Ohgaki, H. u. Kleihues, P. (2005): Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109 (1): 93–108.
- Olivier, M.; Hollstein, M. u. Hainaut, P. (2010): TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (1): a001008.
- Padmanabhan, V.; Steinmetz, H. B.; Rizzo, E. J.; Erskine, A. J.; Fairbank, T. L.; de Abreu, Francine B; Tsongalis, G. J. u. Tafe, L. J. (2017): Improving Adequacy of Small Biopsy and Fine-Needle Aspiration Specimens for Molecular Testing by Next-Generation Sequencing in Patients With Lung Cancer: A Quality Improvement Study at Dartmouth-Hitchcock Medical Center. *Arch Pathol Lab Med* 141 (3): 402–409.
- Parker, B. C.; Annala, M. J.; Cogdell, D. E.; Granberg, K. J.; Sun, Y.; Ji, P.; Li, X. u. Gumin, J., et al. (2013): The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *J Clin Invest* 123 (2): 855–865.
- Parker, N. R.; Khong, P.; Parkinson, J. F.; Howell, V. M. u. Wheeler, H. R. (2015): Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol* 5: 55.
- Parsons, D. W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J. C.-H.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P. u. Carter, H., et al. (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321 (5897): 1807–1812.

- Pegg, A. E.; Dolan, M. E. u. Moschel, R. C. (1995): Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51: 167–223.
- Pitz, M. W.; Eisenhauer, E. A.; MacNeil, M. V.; Thiessen, B.; Easaw, J. C.; Macdonald, D. R.; Eisenstat, D. D. u. Kakumanu, A. S., et al. (2015): Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* 17 (9): 1270–1274.
- Plummer, E. R.; Middleton, M. R.; Jones, C.; Olsen, A.; Hickson, I.; McHugh, P.; Margison, G. P. u. McGown, G., et al. (2005): Temozolomide pharmacodynamics in patients with metastatic melanoma: dna damage and activity of repair enzymes O6-alkylguanine alkyltransferase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Clin Cancer Res* 11 (9): 3402–3409.
- Quail, M. A.; Smith, M.; Coupland, P.; Otto, T. D.; Harris, S. R.; Connor, T. R.; Bertoni, A.; Swerdlow, H. P. u. Gu, Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13: 341.
- Ramkisson, L. A.; Horowitz, P. M.; Craig, J. M.; Ramkisson, S. H.; Rich, B. E.; Schumacher, S. E.; McKenna, A. u. Lawrence, M. S., et al. (2013): Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (20): 8188–8193.
- Reardon, D. A.; Wen, P. Y. u. Mellinghoff, I. K. (2014): Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: past experiences and challenges. *Neuro-oncology* 16 Suppl 8: viii7-13.
- Rehm, H. L. (2013): Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 14 (4): 295–300.
- Rehm, H. L.; Bale, S. J.; Bayrak-Toydemir, P.; Berg, J. S.; Brown, K. K.; Deignan, J. L.; Friez, M. J.; Funke, B. H.; Hegde, M. R. u. Lyon, E. (2013): ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 15 (9): 733–747.
- Reifenberger, G.; Wirsching, H.-G.; Knobbe-Thomsen, C. B. u. Weller, M. (2016): Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*: [Epub ahead of print].
- Reifenberger, J.; Reifenberger, G.; Liu, L.; James, C. D.; Wechsler, W. u. Collins, V. P. (1994): Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145 (5): 1175–1190.
- Riemenschneider, M. J.; Jeuken, Judith W M; Wesseling, P. u. Reifenberger, G. (2010): Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120 (5): 567–584.
- Riemenschneider, M. J. u. Reifenberger, G. (2009): Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci* 10 (1): 184–212.
- Robinson, G. W.; Orr, B. A. u. Gajjar, A. (2014): Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* 14: 258.

- Rodríguez-Hernández, I.; Garcia, J. L.; Santos-Briz, A.; Hernández-Lain, A.; González-Valero, J. M.; Gómez-Moreta, J. A.; Toldos-González, O.; Cruz, J. J.; Martín-Vallejo, J. u. González-Sarmiento, R. (2013): Integrated analysis of mismatch repair system in malignant astrocytomas. *PLoS ONE* 8 (9): e76401.
- Rohle, D.; Popovici-Muller, J.; Palaskas, N.; Turcan, S.; Grommes, C.; Campos, C.; Tsoi, J. u. Clark, O., et al. (2013): An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 340 (6132): 626–630.
- Rothberg, J. M.; Hinz, W.; Rearick, T. M.; Schultz, J.; Mileski, W.; Davey, M.; Leamon, J. H. u. Johnson, K., et al. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475 (7356): 348–352.
- Roy, S.; Lahiri, D.; Maji, T. u. Biswas, J. (2015): Recurrent Glioblastoma: Where we stand. *South Asian J Cancer* 4 (4): 163–173.
- Sahm, F.; Schrimpf, D.; Jones, David T W; Meyer, J.; Kratz, A.; Reuss, D.; Capper, D. u. Koelsche, C., et al. (2016): Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta Neuropathol* 131 (6): 903–910.
- Sanger, F.; Nicklen, S. u. Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463–5467.
- Schindler, G.; Capper, D.; Meyer, J.; Janzarik, W.; Omran, H.; Herold-Mende, C.; Schmieder, K. u. Wesseling, P., et al. (2011): Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121 (3): 397–405.
- Schmidt, E. E.; Ichimura, K.; Reifenberger, G. u. Collins, V. P. (1994): CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54 (24): 6321–6324.
- Schumacher, T.; Bunse, L.; Pusch, S.; Sahm, F.; Wiestler, B.; Quandt, J.; Menn, O. u. Osswald, M., et al. (2014): A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* 512 (7514): 324–327.
- Schuster, J.; Lai, R. K.; Recht, L. D.; Reardon, D. A.; Paleologos, N. A.; Groves, M. D.; Mrugala, M. M. u. Jensen, R., et al. (2015): A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-oncology* 17 (6): 854–861.
- Schwartzentruber, J.; Korshunov, A.; Liu, X.-Y.; Jones, David T W; Pfaff, E.; Jacob, K.; Sturm, D. u. Fontebasso, A. M., et al. (2012): Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482 (7384): 226–231.
- Solomon, D. A.; Kim, J.-S.; Ransom, H. W.; Sibenaller, Z.; Ryken, T.; Jean, W.; Bigner, D.; Yan, H. u. Waldman, T. (2009): Sample type bias in the analysis of cancer genomes. *Cancer Res* 69 (14): 5630–5633.
- Sottoriva, A.; Spiteri, I.; Piccirillo, Sara G M; Touloumis, A.; Collins, V. P.; Marioni, J. C.; Curtis, C.; Watts, C. u. Tavaré, S. (2013): Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (10): 4009–4014.

- Stambolic, V.; Suzuki, A.; de la Pompa, J L; Brothers, G. M.; Mirtsos, C.; Sasaki, T.; Ruland, J.; Penninger, J. M.; Siderovski, D. P. u. Mak, T. W. (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95 (1): 29–39.
- Stupp, R.; Hegi, M. E.; Mason, W. P.; van den Bent, Martin J; Taphoorn, Martin J B; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K. u. Allgeier, A., et al. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10 (5): 459–466.
- Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, Martin J; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, Martin J B; Belanger, K. u. Brandes, A. A., et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10): 987–996.
- Sturm, D.; Witt, H.; Hovestadt, V.; Khuong-Quang, D.-A.; Jones, David T W; Konermann, C.; Pfaff, E. u. Tönjes, M., et al. (2012): Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22 (4): 425–437.
- Suzuki, H.; Aoki, K.; Chiba, K.; Sato, Y.; Shiozawa, Y.; Shiraishi, Y.; Shimamura, T. u. Niida, A., et al. (2015): Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* 47 (5): 458–468.
- TCGA (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455 (7216): 1061–1068.
- Thermo Fisher Scientific /Hrsg. (2010): Molecular Probes Molecular Probes™ Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies.
- Thorne, A. H.; Zanca, C. u. Furnari, F. (2016): Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma. *Neuro-oncology* 18 (7): 914–918.
- Thress, K. S.; Brant, R.; Carr, T. H.; Dearden, S.; Jenkins, S.; Brown, H.; Hammett, T.; Cantarini, M. u. Barrett, J. C. (2015): EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 90 (3): 509–515.
- van den Bent, Martin J; Brandes, A. A.; Taphoorn, Martin J B; Kros, J. M.; Kouwenhoven, Mathilde C M; Delattre, J.-Y.; Bernsen, Hans J J A u. Frenay, M., et al. (2013): Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 31 (3): 344–350.
- van der Klift, Heleen M; Tops, Carli M J; Bik, E. C.; Boogaard, M. W.; Borgstein, A.-M.; Hansson, Kerstin B M; Ausems, Margreet G E M u. Gomez Garcia, E., et al. (2010): Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum Mutat* 31 (5): 578–587.
- Vemula, S. V.; Zhao, J.; Liu, J.; Wang, X.; Biswas, S. u. Hewlett, I. (2016): Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses* 8 (4): 96.
- Venneti, S.; Garimella, M. T.; Sullivan, L. M.; Martinez, D.; Huse, J. T.; Heguy, A.; Santi, M.; Thompson, C. B. u. Judkins, A. R. (2013): Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and

glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol* 23 (5): 558–564.

Verhaak, Roel G W; Hoadley, K. A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M. D.; Miller, C. R. u. Ding, L., et al. (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17 (1): 98–110.

Wang, J.; Cazzato, E.; Ladewig, E.; Frattini, V.; Rosenbloom, Daniel I S; Zairis, S.; Abate, F. u. Liu, Z., et al. (2016): Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 48 (7): 768–776.

Wang, J.; Su, H.-k.; Zhao, H.-f.; Chen, Z.-p. u. To, S.-s. T. (2015): Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 465 (1): 1–4.

Weber, R. G.; Hoischen, A.; Ehrler, M.; Zipper, P.; Kaulich, K.; Blaschke, B.; Becker, A. J. u. Weber-Mangal, S., et al. (2007): Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Oncogene* 26 (7): 1088–1097.

Weller, M.; Cloughesy, T.; Perry, J. R. u. Wick, W. (2013): Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro-oncology* 15 (1): 4–27.

Weller, M.; Kaulich, K.; Hentschel, B.; Felsberg, J.; Gramatzki, D.; Pietsch, T.; Simon, M. u. Westphal, M., et al. (2014a): Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int. J. Cancer* 134 (10): 2437–2447.

Weller, M.; Kaulich, K.; Hentschel, B.; Felsberg, J.; Gramatzki, D.; Pietsch, T.; Simon, M. u. Westphal, M., et al. (2014b): Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int J Cancer* 134 (10): 2437–2447.

Weller, M.; Wick, W.; Aldape, K.; Brada, M.; Berger, M.; Pfister, S. M.; Nishikawa, R. u. Rosenthal, M., et al. (2015): Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 1: 15017.

Wick, W.; Platten, M.; Meisner, C.; Felsberg, J.; Tabatabai, G.; Simon, M.; Nikkhah, G. u. Papsdorf, K., et al. (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13 (7): 707–715.

Wick, W. u. Weller, M. (2009): Classification and management of anaplastic gliomas. *Curr Opin Neurol* 22 (6): 650–656.

Wick, W.; Weller, M.; van den Bent, Martin; Sanson, M.; Weiler, M.; Deimling, A. von; Plass, C.; Hegi, M.; Platten, M. u. Reifenberger, G. (2014): MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol* 10 (7): 372–385.

Wu, G.; Diaz, A. K.; Paugh, B. S.; Rankin, S. L.; Ju, B.; Li, Y.; Zhu, X. u. Qu, C., et al. (2014): The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 46 (5): 444–450.

- Xu, W.; Yang, H.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Kim, S.-H.; Ito, S. u. Yang, C., et al. (2011): Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19 (1): 17–30.
- Yan, H.; Parsons, D. W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B. A.; Yuan, W.; Kos, I. u. Batinic-Haberle, I., et al. (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360 (8): 765–773.
- Yang, C.-Y.; Liao, J.-Y.; Huang, W.-J.; Chang, Y.-T.; Chang, M.-C.; Lee, J.-C.; Tsai, J.-H.; Su, Y.-N.; Hung, C.-C. u. Jeng, Y.-M. (2015): Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am J Transl Res* 7 (10): 2072–2081.
- Yang, Y.; Xie, B. u. Yan, J. (2014): Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12 (5): 190–197.
- Yates, L. R. u. Campbell, P. J. (2012): Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13 (11): 795–806.
- Yip, S.; Miao, J.; Cahill, D. P.; Iafrate, A. J.; Aldape, K.; Nutt, C. L. u. Louis, D. N. (2009): MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res* 15 (14): 4622–4629.
- Zacher, A.; Kaulich, K.; Stepanow, S.; Wolter, M.; Köhrer, K.; Felsberg, J.; Malzkorn, B. u. Reifenberger, G. (2016): Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel. *Brain Pathol.* 2016 Feb 25. [Epub ahead of print]
- Zhao, S.; Lin, Y.; Xu, W.; Jiang, W.; Zha, Z.; Wang, P.; Yu, W. u. Li, Z., et al. (2009): Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 324 (5924): 261–265.
- Zheng, Z.; Liebers, M.; Zhelyazkova, B.; Cao, Y.; Panditi, D.; Lynch, K. D.; Chen, J. u. Robinson, H. E., et al. (2014): Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* 20 (12): 1479–1484.

Abkürzungsverzeichnis

A II	diffuses Astrozytom WHO-Grad II
Abb.	Abbildung
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AA III	anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III
AKT	Serin/Threonin Kinase
Ampl.	Amplifikation
AOA III	anaplastisches Oligoastrozytom WHO-Grad III
AO III	anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaar
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Chr.	Chromosom
CNV	engl. <i>copy number variation</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
emPCR	Emulsions- PCR
ESP	engl. <i>Exome Sequencing Project</i>
EtOH	Ethanol
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Freq.	Frequenz

Abkürzungsverzeichnis

Fwd	engl. <i>forward</i>
GB	Glioblastom
GTL	<i>Genomics and Transcriptomics Labor</i>
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
hg	Humanes Genom
HS	engl. <i>high sensitivity</i>
ID	Identifikation
IGV	engl. <i>Integrative Genomics Viewer</i>
Indels	Insertions/Deletions-Mutationen
ISP	engl. <i>Ion Sphere™ Particles</i>
kb	Kilobase
LOH	engl. <i>loss of heterozygosity</i>
M	männlich
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MLPA	engl. <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
miRNA	MicroRNA
mRNA	MessengerRNA
mTOR	engl. <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
Mut.	Mutation
μ	mikro
NB	engl. <i>normal brain</i>
NGS	engl. <i>Next Generation Sequencing</i>
NHDF	primäre normale humane dermale Fibroblasten
NTP	Nukleosidtriphosphat
NOS	engl. <i>not otherwise specified</i>
NPI	Institut für Neuropathologie
OA II	Oligoastrozytom WHO-Grad II
O II	Oligodendrogliom WHO-Grad II

Abkürzungsverzeichnis

OR	offene Resektionen
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PGM	engl. <i>Personal Genome Machine</i>
pedGB IV	Pädiatrisches Glioblastom WHO-Grad IV
pGB IV	primäres Glioblastom WHO-Grad IV
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
piloA I	Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I
PPI	Pyrophosphat
PXA II	pleomorphes Xanthoastrozytom WHO-Grad II
qRT-PCR	engl. <i>Quantitative Real Time-PCR</i>
Rev	engl. <i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPKM	<i>reads</i> pro Kilobasen pro Millionen Sequenzen
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
s	Sekunde
sekGB IV	sekundäres Glioblastom WHO-Grad IV
STS	engl. <i>sequence-tagged site</i>
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
ST	Strahlentherapie
STB	stereotaktische Tumorproben
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TuBa	Tumorbank
UNG	Uracil-N-Glykosylase

Abkürzungsverzeichnis

W	weiblich
w.a.f.	engl. <i>with anaplastic features</i>
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation
cfDNA	zellfreie DNA
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Guido Reifenberger, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchzuführen und mich in meiner Arbeit immer unterstützt hat.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Holger Schwender, der das Zweitgutachten meiner Dissertation als Betreuer der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf übernommen hat.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Düsseldorfer School of Oncology (Universitätstumorzentrum Düsseldorf).

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Karl Köhrer und Dr. Stefanie Stepanow aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum für das Durchführen diverser Sequenzierungsläufe.

Ich danke meinen Kollegen Kerstin, Marietta, Bastian, Jörg, Daniela und Britta für die Hilfestellungen im Labor oder am Computer. Ihr habt mir oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Dabei gilt ein besonderer Dank meiner lieben Betreuerin und Mentorin Kerstin. Unerwähnt möchte ich auch nicht meine weiteren Kollegen bzw. Freunden lassen, die auch für den nötigen Spaß im und außerhalb des Labors gesorgt haben: Anne, Miriam, Sascha, Marc, Vera, Jana & Ana.

Auch möchte ich meinen lieben Freunden danken. Ihr habt immer für die nötige Abwechslung und Freude gesorgt.

Mein herzlicher Dank gilt meiner großartigen Familie und meiner Schwiegerfamilie für die Unterstützung und Euren Rückhalt in den letzten Jahren. Zu guter Letzt danke ich meinem lieben Mann Tobias, der mich immer aufgebaut und unterstützt hat. Danke, dass du immer da bist.

Eidestattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ort, Datum

Angela Zacher