

Die molekulargenetische Charakterisierung von Nebennierenrindenzarzinomen als Schritt in Richtung personalisierter Medizin



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Juliane Lippert

geboren in Schweinfurt

Würzburg, Mai 2021



Eingereicht am: 28.05.2021

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Alsheimer

Gutachterin: PD. Dr. med. Cristina L. Ronchi

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Schultz

Tag des Promotionskolloquiums: 22.09.2021

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Die molekulargenetische Charakterisierung von Nebennierenrindenzinomen als Schritt in Richtung personalisierter Medizin“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: “Molecular Characterisation of Adrenocortical Carcinomas as a Step towards Personalized Medicine” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Krebserkrankungen im Allgemeinen	5
1.1.1 Krebserkrankungen und wie sie entstehen	5
1.1.2 Krebserkrankungen in Zahlen	6
1.2 Personalisierte Medizin	6
1.2.1 Definition.....	6
1.2.2 Biomarker	7
1.2.3 Der Weg zur modernen personalisierten Medizin.....	7
1.2.4 Praktische Anwendung personalisierter Medizin – ein Beispiel	8
1.3 Nebennierenrinde und Nebennierenrindenzarzinome	9
1.3.1 Lokalisation, Aufbau und Funktion der Nebenniere.....	9
1.3.2 Nebennierenrindenzarzinome	9
1.4 Prognostische Marker bei Nebennierenrindenzarzinomen	12
1.4.1 Klinische und histopathologische Marker	12
1.4.2 Molekulare Marker	16
1.5 Neue Therapieziele bei Nebennierenrindenzarzinomen.....	18
1.6 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Projektplan.....	22
2.2 Studienprotokoll.....	22
2.3 Untersuchtes Probenmaterial.....	24
2.3.1 Retrospektive Studie.....	24
2.3.2 Prospektive Studie.....	27
2.4 Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.5 Angewendete Labormethoden	29
2.5.1 DNA-Isolation.....	29
2.5.2 Qualitäts- und Quantitätsmessung der DNA	30
2.5.3 Polymerasekettenreaktion.....	33
2.5.4 Sequenzierungen.....	37

2.5.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	47
2.6	Auswertung der Sequenzierdaten.....	47
2.6.1	Daten der Sanger-Sequenzierungen.....	47
2.6.2	Daten der Pyrosequenzierungen.....	48
2.6.3	Next-Generation Sequencing-Daten	48
2.7	Statistische Auswertung der Daten	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Retrospektive Studie.....	55
3.1.1	Sequenziererergebnisse	55
3.1.2	Sequenziererergebnisse als prognostische Marker.....	62
3.1.3	Klinische und histopathologische Daten und die Korrelation zum PFS.....	67
3.1.4	Vergleich der prognostischen Stärke der Marker	73
3.1.5	Prädiktive Marker für das Ansprechen auf Standardtherapien	77
3.1.6	Neue Therapieziele.....	78
3.2	Prospektive Studie.....	85
3.2.1	Sequenziererergebnisse	85
3.2.2	Neue Therapieziele.....	89
3.3	Vergleich von Tumorprobenpaaren.....	92
4	Diskussion	97
4.1	Molekulargenetische Untersuchungen an DNA aus FFPE-Gewebe.....	97
4.2	Prognostische Marker	101
4.3	Prädiktive molekulare Marker und zielgerichtete Therapien	103
4.4	Vergleich von Tumorprobenpaaren.....	105
5	Ausblick	107
6	Verzeichnisse und Quellen	108
6.1	Literaturverzeichnis.....	108
6.2	Internetquellen.....	115
6.3	Abbildungsverzeichnis	118
6.4	Tabellenverzeichnis	120
6.5	Abkürzungsverzeichnis	121
7	Anlage	124
7.1	Ergänzende Tabellen.....	124
7.2	Ergänzende Abbildungen.....	154

INHALTSVERZEICHNIS

Curriculum Vitae	167
Publikationen und Kongressbeiträge.....	168
Danksagung.....	170

ZUSAMMENFASSUNG

Nebennierenrindenzarzinome (NNR-Ca; engl. adrenocortical carcinoma (ACC)) zählen zu den sehr seltenen Tumorentitäten. Die Prognose für die Patient*innen ist insgesamt eher schlecht, kann aber, im Einzelnen betrachtet, sehr heterogen sein. Eine zuverlässige Prognose anhand klinischer und histopathologischer Marker – wie dem Tumorstadium bei Diagnose, dem Resektionsstatus und dem Proliferationsindex Ki-67 –, die routinemäßig erhoben werden, ist nicht für alle Erkrankten möglich. Außerdem wird deren Behandlung dadurch erschwert, dass Therapeutika fehlen, von denen ein Großteil der Patient*innen profitiert.

Umfassende Multi-Omics-Studien aus den letzten Jahren halfen nicht nur das Wissen über Pathomechanismen in NNR-Cas zu erweitern, es konnte auch gezeigt werden, dass sich Patient*innen anhand molekularer Marker in Subgruppen mit jeweils unterschiedlicher Prognose einteilen lassen. Mit molekulargenetischen Untersuchungen wurden außerdem potentielle neue Therapieziele gefunden. Diese Erkenntnisse finden bisher jedoch keine oder kaum Anwendung, da die Analysen den zeitlichen und finanziellen Rahmen, der für den routinemäßigen Einsatz im Klinikalltag zu erfüllen wäre, deutlich überschreiten.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Strategie zur verbesserten Patientenversorgung der NNR-Ca-Patient*innen zu etablieren. Dafür sollte geklärt werden, ob ausgewählte molekulare prognostische Marker mit Methoden, die theoretisch einfach in den Klinikalltag zu implementieren wären, gefunden werden können. Außerdem sollte nach prädiktiven Markern gesucht werden, die helfen, NNR-Ca-Patient*innen zielgerichtet zu therapieren.

Statt exom- oder genomweite Analysen durchzuführen wurden gezielt krebs- beziehungsweise NNR-Ca-assoziierte Gene mittels NGS (Next-Generation Sequencing) oder Sanger-Sequenzierung (zusammen 161 Gene) und Pyrosequenzierung (4 Gene) auf somatische Veränderungen hin untersucht. Die Analysen wurden an DNA (Desoxyribonukleinsäure) durchgeführt, die aus FFPE (mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet)-Gewebe isoliert worden war, welches standardmäßig nach Tumoroperationen in Pathologien für Untersuchungen zur Verfügung steht.

Durch Analyse der Sequenzierergebnisse von insgesamt 157 Patient*innen aus einem retrospektiven (107 Patient*innen) und einem prospektiven Studienteil (50 Patient*innen) konnten in NNR-Cas bereits beschriebene Veränderungen von Genen und Signalwegen sowie Methylierungsunterschiede gefunden werden. Anhand der Sequenzierdaten der retrospektiven Studie wurden molekulare prognostische Marker (Anzahl an proteinverändernden Varianten pro Tumorprobe, Veränderungen im P53/Rb- und/oder dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und dem Methylierungsstatus von CpG-Inseln von vier

Tumorsuppressorgenen (*GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD*) definiert und für jeden einzelnen Marker ein signifikanter Zusammenhang zur Länge des progressionsfreien Überlebens (PFS) der Patient*innen gefunden. Durch die Kombination der molekularen Marker mit den klinischen und histopathologischen Markern war es zudem möglich, einen COMBI-Score zu bilden, der, verglichen mit den klinischen und histopathologischen Markern, eine spezifischere und sensitivere Aussage darüber erlaubt, ob Patient*innen innerhalb von 2 Jahren ein Fortschreiten der Tumorerkrankung erfahren. Mit Hilfe der Sequenzierdaten wurden in beiden Kohorten außerdem Veränderungen gefunden, die als prädiktive Marker zum Einsatz von zielgerichteten Therapien verwendet werden könnten. Als vielversprechendstes Therapieziel wurde – bei 46 Tumoren in der retrospektiven und 7 Tumoren in der prospektiven Studie – CDK4 identifiziert. CDK4/CDK6-Inhibitoren sind für die Behandlung von fortgeschrittenem und metastasiertem Brustkrebs von der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (FDA; engl. Food and Drug Administration) zugelassene Therapeutika und bei anderen soliden Tumoren Gegenstand von Studien.

Im Rahmen der Arbeit konnten außerdem von 12 Patient*innen jeweils zwei Tumoren molekulargenetisch untersucht und die Ergebnisse verglichen werden. Die Analyse zeigte, dass der Methylierungsstatus – im Vergleich zu Veränderungen in der DNA-Sequenz – der stabilere prognostische Marker ist.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass molekulare prognostische und prädiktive Marker für den Einsatz zielgerichteter Therapien mit Methoden identifiziert werden können, die sich im klinischen Alltag bei der Behandlung von NNR-Ca-Patient*innen implementieren lassen. Um einen allgemein anerkannten Leitfaden zu etablieren, fehlen allerdings noch die Ergebnisse weiterer – vor allem prospektiver – Studien zur Validierung der hier präsentierten Ergebnisse. Die gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch als wichtiger Schritt in Richtung personalisierter Medizin bei Nebennierenrindenzinomen anzusehen.

SUMMARY

Adrenocortical carcinomas (ACC) are among the very rare tumor entities. Altogether prognosis for the patients is poor, though regarding individuals the outcome can be heterogenous. Prognostic stratification on the basis of clinical and histopathological markers – for example tumor stage at diagnosis, resection status and proliferation index Ki-67 – is not reliable for all patients. This fact and the lack of effective pharmacological therapies, makes the patient care challenging.

In the last years comprehensive multi omics studies helped to increase the knowledge about pathogenetic mechanisms in ACC. With those data, scientists were also able to identify molecular markers useful to distinguish subgroups of patients with distinct clinical outcome. With molecular analysis also new potential drug targets for targeted therapies were identified. Till now these findings have not been transferred into the clinical routine care of ACC patients, mostly due to the time consuming and expensive methods required for the multi omics studies.

The aim of this study was to establish a strategy for improved patient care of ACC patients. We chose methods theoretically applicable in a clinical routine workflow to analyze selected prognostic molecular markers, already correlated to outcome. Moreover it was searched for predictive markers for targeted therapy of ACC patients.

Instead of comprehensive analysis a targeted approach via NGS (Next Generation Sequencing) or Sanger Sequencing (161 genes in total) and pyrosequencing (4 genes) was conducted to find somatic variants in genes associated with cancer in general or particularly with ACC. For the analysis, DNA (deoxyribonucleic acid) was isolated from FFPE (formalin fixad and paraffin embedded) tissue which is routinely prepared and available in pathological institutions after tumor resections.

Sequencing results of 157 patients in total, gained from a retrospective part of the study (107 patients) and a prospective part (50 patients), were in accordance to already published data concerning somatic variants in genes and signaling pathways and differences in the methylation patterns of particular genes. Molecular prognostic markers (number of protein changing variants per tumor sample, variants in P53/Rb- and/or Wnt/ β -Catenin signaling pathway and methylation pattern of CpG islands of four tumor suppressor genes (*GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD*)) were defined with the data of the retrospective study. A significant prognostic role for progression free survival (PFS) was found for all of them. With the COMBI-Score – a combination of the molecular prognostic markers and the clinical and histopathological prognostic markers – it was possible to even better predict the progress of the disease within two years. Moreover variants reported to be predictive markers for the use

of targeted therapies were identified in both cohorts. Most promising drug target seems to be CDK4 which was found to be amplified in 46 and 7 tumors in the retrospective and prospective study, respectively. CDK4/CDK6 inhibitors are drugs already approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of advanced or metastatic breast cancer and under investigation in other solid tumors.

Within this study it was also possible to compare molecular data from 12 tumor pairs, what means two tumors gained from one patient. It seems as if the methylation pattern is a more consistent prognostic marker than the changes detected on DNA sequence level.

In conclusion, we demonstrated that molecular prognostic markers and predictive markers for targeted therapy can be identified using methods easily applicable in a clinical routine workflow for patients with ACC. Before implementing our strategy into a guideline that is commonly approved, further prospective studies are needed for the validation of the presented results. However our strategy can be regarded as an important step towards personalized medicine in adrenocortical carcinoma.

1 EINLEITUNG

1.1 Krebserkrankungen im Allgemeinen

1.1.1 Krebserkrankungen und wie sie entstehen

„Cancer is the name given to a collection of related diseases. In all types of cancer, some of the body's cells begin to divide without stopping and spread into surrounding tissue.“ (siehe 6.2 [Int. 1]). Diese Definition für Krebserkrankungen – von denen es mehr als 200 bekannte Arten gibt (siehe 6.2 [Int. 2]) – findet man auf der Seite des National Cancer Institutes (NCI) (siehe 6.2 [Int. 1]). Der Begriff „Krebs“ umfasst also Erkrankungen, bei denen Zellen im Körper die eigentlich streng regulierten und kontrollierten Prozesse der Vermehrung, des Wachstums, der Differenzierung und des Niedergangs umgehen und sich im Körper ausbreiten können. Dass Zellen die Fähigkeit bekommen, dieser Regulation und Kontrolle zu entkommen, wird durch die Ansammlung von Veränderungen im Erbgut des Menschen, dem Genom, möglich.

Genetische Veränderungen können bereits in der Keimbahn vorliegen oder sich im Laufe des Lebens in einer Zelle ansammeln, sogenannte somatische Varianten. Trägt ein*e Krebspatient*in keine Keimbahnveränderung, die die Entstehung des Tumors begünstigt hat, spricht man von einer sporadischen Krebserkrankung.

Die Veränderungen betreffen die DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid)-Sequenz selbst – hierbei können nur einzelne oder einige wenige Nukleotide verändert sein, aber man findet auch strukturelle oder zahlenmäßige Chromosomenaberrationen in Tumoren – oder Modifikationen der Sequenz. Die Kombination der Veränderungen ist wohl in jedem Tumor einzigartig und kann auch innerhalb eines Tumors variieren, so dass dieser aus verschiedenen Subpopulationen besteht. Die Fähigkeiten, die die Zellen durch die Veränderungen erlangen, sind in den meisten Tumoren ähnlich, insofern, dass sie es den Zellen ermöglichen, Regulations- und Kontrollmechanismen zu umgehen. Diese wurden von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 als „The Hallmarks of Cancer“ [1] beschrieben. Zu diesen Kennzeichen zählen die Unabhängigkeit der Tumorzellen von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum verhindern sollen, die Fähigkeit, dem programmierten Zelltod, der Apoptose, zu entgehen, die unendliche Teilungsfähigkeit, die Aufrechterhaltung der Angiogenese und schließlich die Fähigkeit, in umliegendes Gewebe einzuwandern und Metastasen zu bilden [1].

EINLEITUNG

Die Forschung in den darauffolgenden Jahren zeigte, dass Krebszellen auch fähig zu sein scheinen, ihren Metabolismus dahingehend zu verändern, dass optimale Bedingungen für ihre Proliferation geschaffen werden, und der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen. Dies wurde von Hanahan und Weinberg 2011 – neben neuen Erkenntnissen zu den bereits 2000 beschriebenen Fähigkeiten – in „Hallmarks of Cancer: The Next-Generation“ zusammengefasst. [2]

1.1.2 Krebserkrankungen in Zahlen

Die Tatsache, dass sich in einer Zelle mehrere Veränderungen ansammeln müssen, bis diese entartet, erklärt, warum Krebs als eine Erkrankung des Alters gilt. 60 % aller Krebsneuerkrankungen treten nach dem 65. Lebensjahr auf [3]. Alternde und wachsende Bevölkerungen, aber auch zunehmend gesundheitsschädigende Verhaltensweisen wie ungesunde Ernährung, zu wenig Sport und damit verbundenes Übergewicht oder Zigaretten- und Alkoholkonsum sind Gründe für weiter steigende Krebserkrankungsraten. Nicht nur in Deutschland hat sich die Zahl der Erkrankungen seit den 1970er Jahren fast verdoppelt (siehe 6.2 [Int. 3]). Auch weltweit ist über die Jahre ein stetiger Anstieg zu beobachten, der sich wohl fortsetzen wird. Während im Jahr 2018 18,1 Millionen Menschen an Krebs erkrankten, werden für das Jahr 2040 29,5 Millionen Fälle erwartet (siehe 6.2 [Int. 4]). Krebserkrankungen belasten nicht nur die Betroffenen und ihr soziales Umfeld, sie stellen auch eine ökonomische Herausforderung dar. Im Jahr 2009 lagen die geschätzten Kosten für die Behandlung von Krebspatient*innen bei knapp 286 Milliarden US-Dollar weltweit [4]. Kosten, die weiter steigen könnten, da neueste Diagnostik und Therapeutika – im Rahmen der personalisierten Medizin eingesetzt – oft teure Methoden und Präparate sind, die nur ausgewählten Patient*innen zugute kommen, für diese jedoch mit Hoffnung auf Lebensverlängerung oder sogar Heilung verbunden sind.

1.2 Personalisierte Medizin

1.2.1 Definition

Menschen durchlaufen bei gleicher Erkrankung nicht die gleiche Krankheitsentwicklung und sprechen unterschiedlich auf ein und dieselbe Behandlung an. Die Ursachen für diese Unterschiede zu berücksichtigen und die medizinische Behandlung und Medikation der Patient*innen an ihre individuellen Voraussetzungen anzupassen wird als „personalisierte Medizin“ bezeichnet. Dabei bedeutet „individuell“ in der Regel nicht , dass für jedes

Individuum eine geeignete Therapie gefunden wird, sondern dass die Erkrankten Subgruppen zugeordnet werden.

1.2.2 Biomarker

Die Einordnung in Subgruppen erfolgt mit Hilfe von Biomarkern. Sie werden als „Charakteristikum, das objektiv gemessen und evaluiert wird, als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse, oder pharmakologische Antworten auf Therapien“ definiert [5]. Ein Biomarker, der objektiv zu messen ist, wäre erhöhter Blutdruck. Er kann Hinweis auf eine mögliche Herzerkrankung sein. In der modernen Medizin – vor allem im Zusammenhang mit Krebserkrankungen und -therapien – sind Biomarker jedoch meist „objektiv messbare Biomoleküle, wie ein Protein, ein Metabolit, RNA, DNA oder eine epigenetische Veränderung“ [6], die an Gewebe-, Blut- oder Plasmaproben untersucht werden.

Prognostische Marker werden zum Zeitpunkt der Diagnose erhoben und lassen – erst einmal unabhängig von der Therapie, die eventuell folgt – Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf zu [7]. Anhand dieser Marker kann eingeschätzt werden, ob bei Patient*innen das Risiko für ein schnelles Fortschreiten der Erkrankung besteht oder ob ein langes krankheitsfreies Überleben (DFS, engl. disease free survival), progressionsfreies Überleben (PFS, engl. progression free survival) und/oder Gesamtüberleben (OS, engl. overall survival) zu erwarten ist.

Relevant für die Wahl der Behandlung sind im Zusammenhang mit personalisierter Medizin prädiktive Marker. Sie werden untersucht, um herauszufinden, ob bei Patient*innen eine bestimmte Therapie angeschlossen wird oder nicht [5]. In Deutschland sind aktuell 82 Medikamente zugelassen, bei denen „in einer offiziellen Bekanntmachung – in der Regel in der Packungsbeilage oder der Fachinformation – ausdrücklich eine Testung vor der Behandlung verlangt oder empfohlen wird“ (siehe 6.2 [Int. 5]). Die meisten dieser Medikamente sind für die Krebstherapie bestimmt. Ihre Verwendung wird auch als zielgerichtete Krebstherapie bezeichnet. Sie sind – im Gegensatz zu Chemotherapeutika die meist zytotoxisch auf alle sich schnell teilenden Zellen wirken – gegen spezifische molekulare Ziele in den Krebszellen gerichtet, denen entscheidende Rollen beim Tumorwachstum und dem Tumorprogress zugeschrieben werden [8].

1.2.3 Der Weg zur modernen personalisierten Medizin

Dass das Wissen über moderne molekulare Biomarker gewachsen ist und sich neue Möglichkeiten für Behandlungen eröffneten und weiterhin eröffnen, wäre ohne die Erfindung

EINLEITUNG

und Etablierung neuer Labormethoden, vor allem neuer Sequenziermethoden – im Sprachgebrauch in Laboren wird meist die Abkürzung NGS (Next-Generation Sequencing) verwendet –, nicht möglich. Mit diesen Methoden lassen sich relativ einfach und schnell große Datenmengen generieren. Es können in kurzer Zeit viele Gene auf einmal (Panelsequenzierung), alle kodierenden Sequenzen des Genoms (WES, engl. Whole Exome Sequencing) oder das ganze Genom (WGS, engl. Whole Genome Sequencing) sequenziert werden. Außerdem werden die Technologien zum Beispiel für RNA (Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid)- und Methylierungsanalysen verwendet.

Durch Anwendung dieser neuen Methoden ließen sich in den letzten Jahren große Sequenzierprojekte der Krebsforschung umsetzen. Das internationale Krebsgenomkonsortium (ICGC, engl. International Cancer Genome Consortium) wurde 2007 gegründet, um durch die Koordination von Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt Genomdaten von verschiedenen Tumorentitäten zu sammeln und zu analysieren (siehe 6.2 [Int. 6]). Das Programm zur Erstellung eines Krebsgenomatlantens (TCGA, engl. The Cancer Genome Atlas) wurde 2006 initiiert und zielt ebenfalls darauf ab, unterschiedliche Tumorentitäten auf molekularer Ebene zu charakterisieren (siehe 6.2 [Int. 7]). Die Daten beider Projekte sind frei zugänglich und tragen dazu bei, das Verständnis über verschiedene Krebsarten und deren Subgruppen auf molekularer Ebene zu verbessern. Damit soll die Diagnostik und die Behandlung von Krebserkrankungen optimiert werden. Auf der Internetseite von ICGC heißt es: "No therapeutic is developed today without, in some way, applying the knowledge that ICGC has provided the world." (siehe 6.2 [Int. 6]).

1.2.4 Praktische Anwendung personalisierter Medizin – ein Beispiel

Bei häufigen Tumorentitäten wie Brust- oder Lungenkrebs ist die zielgerichtete Behandlung der Patient*innen bereits Standard. Bei Brustkrebs wurde mit der intensiven Suche nach Biomarkern schon Ende der 80er Jahre begonnen [7]. Bereits 1987 wurde gezeigt, dass Patient*innen mit Brustkrebs eine schlechtere Prognose haben, wenn *HER2* (Synonym: *ERBB2*) amplifiziert beziehungsweise *HER2* überexprimiert ist [9]. Zusammen mit der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus und des Proliferationsindex Ki-67 können die Tumoren in der Brust einer von fünf Hauptgruppen zugeordnet werden, die unterschiedlich schnell wachsen und somit für die Betroffenen mit verschiedenen Prognosen verbunden sind (siehe 6.2 [Int. 8]).

Von den 82 in Deutschland im Rahmen der personalisierten Medizin zugelassenen Therapeutika sind 17 für die Anwendung bei Brustkrebs vorgesehen. Bei fast allen (16 von 17 Medikamenten) ist es Pflicht, vor Beginn der Therapie den Expressionsstatus von Hormonrezeptoren und/oder des Wachstumsfaktorrezeptors *HER2* zu testen. Sie sind also

prädiktive Marker und abhängig vom Testergebnis kommen unterschiedliche Therapien zur Anwendung. (siehe 6.2 [Int. 5])

Das Beispiel zeigt auch, dass manche Marker – in diesem Fall *HER2/HER2* und Hormonrezeptoren – sowohl prognostische als auch prädiktive Funktion haben können.

Die zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten bei Brustkrebs sind Resultat jahrzehntelanger Forschung bei einer der häufigsten Tumorentitäten der Welt. Bei seltenen Tumorentitäten dauert es länger, um eine ausreichend große Kohorte für valide Daten zusammen zu erreichen. So ist es zu erklären, dass für diese bisher kaum personalisierte Therapieansätze verfügbar sind und im Klinikalltag Einsatz finden. Zu diesen seltenen Krebserkrankungen gehört auch das Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Ca).

1.3 Nebennierenrinde und Nebennierenrindenzarzinome

1.3.1 Lokalisation, Aufbau und Funktion der Nebenniere

Nebennieren sind Drüsen, die beidseitig den Nierenpolen aufsitzen und im Retroperitonealraum, also hinter dem Bauchfell, zu finden sind. Sie können grob in Nebennierenrinde und Nebennierenmark eingeteilt werden. In der Nebennierenrinde werden histologisch drei Zonen unterschieden, die alle Steroidhormone produzieren. Die äußere Zone, die Zona glomerulosa, produziert vor allem das Mineralkortikoid Aldosteron. Die innere Zone setzt sich aus der Zona fasciculata und der Zona reticularis zusammen. In der Zona fasciculata werden Glukokortikoide gebildet, vor allem Kortisol, in der Zona reticularis Androgene. [10, 11]

1.3.2 Nebennierenrindenzarzinome

In den Nebennieren können sich verschiedene Neoplasien entwickeln. Bei den über 50-Jährigen können bei mindestens 3 % Tumoren in den Nebennieren gefunden werden [12]. Dabei handelt es sich zum Großteil um gutartige Adenome und nur bei wenigen Patient*innen um maligne Tumoren wie die Nebennierenrindenzarzinome [13].

Da es in dieser Arbeit um die molekulargenetische Charakterisierung von sporadischen Nebennierenrindenzarzinomen geht, wird in den folgenden Abschnitten nur auf diese Tumorentität eingegangen.

Häufigkeit – Allgemein und am Universitätsklinikum Würzburg im Speziellen

In Europa gelten Tumorentitäten als selten, wenn daran weniger als 6 von 100.000 Personen erkranken [14]. Laut Literaturangaben werden Nebennierenrindenzinome bei etwa 0,7 bis 2 Personen pro 1 Million Einwohner*innen pro Jahr diagnostiziert [15, 16] und daher auch als extrem seltene Krebserkrankung angesehen [17, 18]. Zum Vergleich: Bei Brustkrebs, der häufigsten Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland, lag die Inzidenz 2016 bei 1122 Patientinnen pro 1 Millionen Einwohner pro Jahr (siehe 6.2 [Int. 9]).

Die Endokrinologie am Universitätsklinikum Würzburg ist das größte Referenzzentrum für NNR-Cas in Europa und gehört zum Europäischen Nebennierentumornetzwerk (ENSAT, engl. European Network for the Study of Adrenal Tumors) (siehe 6.2 [Int. 10]).

Dort wurden in den letzten vier Jahren im Schnitt knapp 200 Patient*innen pro Jahr mit NNR-Ca behandelt oder beraten. Von diesen hatten jedes Jahr durchschnittlich 40 die Erstdiagnose Nebennierenrindenzinom erhalten. Die Patient*innen kamen aus ganz Deutschland nach Würzburg, aber auch aus verschiedenen europäischen Ländern. (Schriftliche Auskunft von Michaela Haaf, Studiensekretariat Endokrine Tumore, Universitätsklinikum Würzburg).

Diagnose

Nebennierenrindenzinome werden in etwa 60 % der Fälle aufgrund ihrer hormonellen Aktivität und den damit verbundenen körperlichen Veränderungen bei den Patient*innen diagnostiziert [19]. In 50 – 80 % der hormonell aktiven Tumoren kommt es zu einer Überproduktion von Cortisol [17]. Der Hypercortisolismus (Cushing-Syndrom) führt zu Stammfettsucht und einem sogenannten Vollmondgesicht, um nur zwei von mehreren charakteristischen Merkmalen zu nennen. Die Überproduktion von adrenalen Androgenen wird ebenfalls häufig beobachtet (40 – 60 % der hormonell aktiven NNR-Cas) [17]. Die Überproduktion an männlichen Geschlechtshormonen kann bei Frauen wiederum zu Virilisierung führen. Hormonell inaktive NNR-Cas fallen hauptsächlich durch Beschwerden wie zum Beispiel Übelkeit und Erbrechen oder Rückenschmerzen, hervorgerufen durch die Größe des Tumors, auf [19]. Ein kleinerer Teil der Karzinome (10 – 15 % der Fälle) wird bei bildgebenden Untersuchungen, die aus anderen Gründen durchgeführt werden, zufällig entdeckt [20].

Für die endgültige Diagnose werden hormonelle Untersuchungen durchgeführt, um festzustellen, welche Hormone der Tumor produziert. Mit bildgebenden Maßnahmen werden Größe und Lage des Tumors bestimmt und das Vorhandensein von Metastasen untersucht. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen des Tumorgewebes sichern die Differentialdiagnostik. [19]

Prognose und Therapieoptionen

Die Prognose für Personen, bei denen ein Nebennierenrindenzellkarzinom diagnostiziert wurde, ist insgesamt eher schlecht. Innerhalb der Gruppe der NNR-Ca-Patient*innen ist sie jedoch sehr variabel. Etwa 70 % der Patient*innen entwickeln Rezidive oder Metastasen [21]. Dies geschieht meist innerhalb von 5 Jahren, kann in sehr seltenen Fällen aber auch erst nach mehr als 10 Jahren der Fall sein [22, 23]. Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert ebenfalls sehr stark. Sie liegt zwischen 13 % und 80 % [17, 18]. Nur sehr selten sind in der Literatur Patient*innen beschrieben, die trotz der Entwicklung von Rezidiven und Metastasen bis zu 28 Jahre nach der Diagnose noch am Leben waren [24]

Bei Tumoren frühen Stadiums, die noch nicht gestreut haben, wird eine Adrenalectomie, also die Entfernung der Nebenniere, empfohlen, die von erfahrenen Chirurg*innen durchgeführt werden sollte, so dass eine vollständige Resektion (R0) gelingt, die derzeit als einzige Chance auf Heilung gilt [20].

Das einzige Medikament, das von der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (FDA; engl. Food and Drug Administration) und der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA; engl. European Medicines Agency) speziell für die Behandlung von NNR-Cas zugelassen ist und seit 1960 verwendet wird, ist Mitotane. Mitotane hemmt selektiv die Zellteilung der Nebennierenrindenzellen und verhindert die Synthese von Steroidhormonen in der Nebennierenrinde [25]. Es wird sowohl der adjuvante Einsatz, zusätzlich zu einer Operation (OP) bei Patient*innen mit hohem Risiko für Rezidiv des NNR-Cas, als auch der palliative Einsatz empfohlen [20]. Dabei ist wichtig, dass ein Mitotane-Plasmalevel von mindestens 14 mg/L (Milligramm/Liter) erreicht wird, um einen Einfluss auf das Überleben der Patient*innen zu sehen [26-29]. Eine Überdosierung (Mitotane-Plasmalevel über 20 mg/L [28]) gilt es jedoch zu vermeiden, da diese häufig zu Nebenwirkungen wie erhöhten Leberenzymwerten (62 %), Übelkeit (38 %) und Durchfall (21 %) führt [30]. Weiterhin kommen bei fortgeschrittener Erkrankung Kombinationstherapien aus Mitotane mit den Chemotherapeutika Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin [31] beziehungsweise bei Gemcitabin-basierter Chemotherapie [32] zum Einsatz, deren Wirksamkeit jedoch ebenfalls auf einen Teil der Patient*innen beschränkt ist.

1.4 Prognostische Marker bei Nebennierenrindencarzinomen

1.4.1 Klinische und histopathologische Marker

Wie bereits erläutert (siehe 1.2), werden prognostische Marker verwendet, um Aussagen über den wahrscheinlichen Verlauf einer Erkrankung machen und somit bessere Therapieentscheidungen treffen zu können. Bei NNR-Cas ist der Zusammenhang einiger klinischer und histopathologischer Marker zum Überleben der Patient*innen gut untersucht. Diese werden im Rahmen der Diagnostik, zum Beispiel mit Hilfe von bildgebenden Verfahren, Untersuchung von Blut oder Urin und nach der OP durch Gewebeuntersuchungen, erhoben und dokumentiert. In den folgenden Abschnitten werden die klinischen und histopathologischen prognostischen Marker erläutert, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind.

ENSAT-Tumorstadium

Die Klassifikation von Tumoren wird von der UICC (engl. Union for International Cancer Control) durchgeführt. Die Einteilung von Tumoren in Stadien spielt bei den meisten Entitäten eine wichtige Rolle für die Prognose und die Therapieplanung. Dafür wird das TNM-System verwendet, mit dem die Größe und Ausbreitung der Primärtumoren (T, Tumor), der Befall der um den Primärtumor liegenden Lymphknoten (N, engl. lymph node) und das Vorhandensein von Metastasen (M) beurteilt wird. (siehe 6.2 [Int. 11])

Auch bei NNR-Cas wird die Einordnung in Tumorstadien als ein wichtiger und stabiler prognostischer Faktor angesehen. Die Klassifikation der NNR-Cas erfolgt ebenfalls auf Grundlage des TNM-Systems. Das Einteilungssystem der UICC wurde jedoch modifiziert, da es vor allem für die Unterscheidung der Stadien II und III nicht ausreichend war. Seit 2008 wird die angepasste ENSAT-Klassifikation verwendet. [18]

Nur Tumoren, die kleiner sind als 5 cm, das umliegende Gewebe noch nicht infiltriert haben und sich auch noch nicht in Lymphknoten oder entfernte Organe ausgebreitet haben, werden dem Stadium I zugeordnet (T1, N0, M0). Tumoren des Stadiums II sind größer als 5 cm, haben aber noch keine umliegenden Lymphknoten und Organe befallen und auch keine Fernmetastasen gebildet. Die Tumoren des Stadiums III können variabel in ihrer Größe und der Infiltration von umliegendem Gewebe sein. Benachbarte Organe, Blutgefäße und Lymphknoten können befallen sein. Wenn Fernmetastasen vorliegen, werden die Tumoren dem Stadium IV zugeordnet. Tumorgröße und Lymphknotenbefall können in diesem Stadium variabel sein. In Tabelle 1 sind die Kriterien für die Einstufung in ENSAT-Tumorstadium I – IV im Detail aufgelistet.

EINLEITUNG

Eine systematische Analyse von Studien, bei denen die Kohorte jeweils größer als 100 Patient*innen war, ergab, dass fast alle Forschungsgruppen einen Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem Gesamtüberleben und/oder dem progressionsfreien Überleben untersucht haben [20]. In Publikationen aus verschiedenen Ländern beziehungsweise aus unterschiedlichen Jahren hatten Patient*innen mit einem Tumor niedrigen Stadiums (I oder II) ein längeres rezidivfreies Überleben und/oder Gesamtüberleben als Erkrankte mit höherem Stadium (III und IV) (zum Beispiel [15, 16, 30, 33]). In Ausnahmefällen gibt es Patient*innen, bei denen der Tumor in einem frühen Stadium diagnostiziert wird, die trotzdem ein sehr kurzes krankheitsspezifisches Überleben haben, und andererseits Langzeitüberlebende, die bei der Diagnose des NNR-Ca bereits Fernmetastasen hatten [18].

Tabelle 1: Kriterien zur Einteilung der NNR-Cas in Stadien anhand der ENSAT-Kriterien.

Die Tumoren werden in die Stadien I – IV eingeteilt. Zur Einordnung in das entsprechende Stadium wird die Tumorgöße bestimmt, die Infiltration von umliegendem Gewebe und der Befall von nahen Organen und Blutgefäßen beurteilt, sowie der Befall von nahen Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen untersucht. (Einstufungskriterien nach [18])

ENSAT Stadium	Einstufungskriterien
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
	T3 N0/N1 M0
	T4 N0/N1 M0
IV	T1-4 N0/N1 M1

T1: Tumor ≤ 5 cm und nicht in das die Nebenniere umgebende Gewebe eingewachsen; T2: Tumor > 5 cm und nicht in das umliegende Gewebe eingewachsen; T3: Tumorgöße variabel; Tumor ist in das umliegende Gewebe eingewachsen; T4: Tumorgöße variabel; Tumor ist in umliegende Organe (zum Beispiel Niere, Pankreas, Milz und Leber) oder in große Blutgefäße (Vena renalis oder Vena Cava) eingewachsen; N0: Tumor hat nicht in umliegende Lymphknoten gestreut; N1: Tumor hat in umliegende Lymphknoten gestreut; M0: Tumor ist nicht metastasiert; M1: Fernmetastasen vorhanden

Alter

Krebs wird generell als Erkrankung des Alters angesehen. NNR-Cas können in jedem Alter auftreten. Gehäuft werden sie bei Erwachsenen jedoch zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr diagnostiziert [17]. Neben dem Tumorstadium wird das Alter der Patient*innen bei Erstdiagnose der NNR-Cas als (zusätzlicher) prognostischer Faktor beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ein höheres Alter der Patient*innen bei Diagnose des NNR-Cas mit

EINLEITUNG

einer schlechteren Prognose korreliert [23, 34]. Von Asare et al. wurde vorgeschlagen, das Alter bei Erstdiagnose zu berücksichtigen, wenn eine Prognose zum Überleben der Patient*innen gestellt werden soll, da sie durch eine TNM-A- Klassifikation signifikante Unterschiede im OS zeigen konnten [35]. Die Autoren sehen vor allem einen Vorteil bei der Unterscheidung der Stadien I und II durch Einbezug des Alters in die Klassifikation [35]. In anderen Kohorten wird dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patient*innen bei Erstdiagnose und dem PFS beziehungsweise dem OS gesehen [33, 36-38].

Hormonstatus

In Abschnitt 1.3.1 wurde bereits kurz erläutert, dass in der Nebennierenrinde in den verschiedenen Zonen Steroidhormone produziert werden und 60 % der Nebennierenrindenzellkarzinome hormonell aktiv sind. Welche Rolle der Hormonstatus als prognostischer Marker bei NNR-Cas hat, wird kontrovers diskutiert. Else et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Kortisolproduktion der Karzinome und einem kürzeren OS beziehungsweise PFS feststellen [33]. Auch Abiven et al. beschrieben, dass Patient*innen, deren NNR-Cas Glukokortikoide oder Mineralkortikoide sekretieren, eine schlechtere Prognose haben [23]. In bereits metastasierten NNR-Cas konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Hormonstatus und dem Überleben der Patient*innen gefunden werden [39].

Proliferationsindex Ki-67

Das Protein Ki-67 wird nur von Zellen exprimiert, die teilungsaktiv sind [40] und wird schon seit den Achtzigerjahren genutzt, um verschiedene Tumorentitäten anhand des Anteils sich teilender Zellen genauer zu klassifizieren. Ein höherer Proliferationsindex Ki-67 – also ein höherer Anteil teilungsaktiver Zellen – geht dabei bei verschiedenen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose einher (siehe zum Beispiel Metaanalysen zu gastrointestinalen Tumoren beziehungsweise Brust- und Darmkrebs [41-43]). In den Pathologien gehört es zu den Routineuntersuchungen, den Proliferationsindex Ki-67 zu analysieren. Auch bei NNR-Cas beinhaltet die pathologische Aufarbeitung in der Regel die Bestimmung des Ki-67, was anschließend in die Prognosestellung einfließt [20]. Der Ki-67 wurde in Zusammenhang mit einer kompletten Resektion in zwei unabhängigen NNR-Ca-Kohorten als stärkster prognostischer Faktor für PFS und OS identifiziert [38]. An einer italienischen Kohorte von 225 Patient*innen wurde ebenfalls der signifikante Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und dem Proliferationsindex Ki-67 gezeigt [44]. Für den Proliferationsindex Ki-67 gibt es allerdings noch kein einheitliches Unterteilungssystem. Ein Punkt, in dem sich auch die zitierten Publikationen unterscheiden. Außerdem verwenden

Pathologen unterschiedliche Methoden, um den Proliferationsindex zu bestimmen, wodurch es zu signifikanten Unterschieden bei der Einstufung der Tumorproben kommen kann [45].

Resektionsstatus

Es wurde bereits erwähnt (siehe 1.3.2), dass eine Adrenalektomie von erfahrenen Chirurg*innen durchgeführt werden sollte, um eine vollständige Resektion zu erreichen. Die Resektion in sano ist die einzige Chance auf Heilung und der Resektionsstatus spielt eine entscheidende Rolle für die Prognose.

Bilimoria et al. kamen bei der Auswertung der Daten von knapp 4000 Patient*innen in den USA in einer retrospektiven Studie zu dem Ergebnis, dass verbleibende mikroskopische (R1) oder makroskopische (R2) Reste mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden sind [34]. Margonis et al. verglichen Überlebensdaten von Patient*innen mit Resektionsstatus R0 beziehungsweise R1 und konnten eine schlechtere Überlebensrate bei der zweiten Gruppe zeigen [46].

2013 analysierten Erdogan et al. das PFS und das OS von Patient*innen mit verschiedenen Resektionsstadien einer zweiten Operation nach der ersten Rekurrenz des Tumors. Sie kamen zu dem Schluss, dass, neben der Zeitspanne bis zum erneuten Tumorwachstum nach der ersten OP, wiederum der Resektionsstatus der zweiten OP einen wichtigen Einfluss auf das PFS und OS hat. Das Risiko für erneutes Tumorwachstum sei dann 2-mal so hoch, wenn mikroskopische Reste zurückblieben oder keine Aussage über den Resektionsstatus getroffen werden kann (RX). Bei einer zweiten Operation mit makroskopisch unvollständiger Resektion sei das Risiko sogar um das Vierfache erhöht und damit entsprechend dem PFS von Patient*innen, die nicht operiert wurden. Patient*innen, die überhaupt nicht operiert wurden, hatten das kürzeste Gesamtüberleben. [47]

Kombination von klinischen und histopathologischen Faktoren

Um eine präzisere Prognose für die Patient*innen treffen zu können, wurden bereits verschiedene Kombinationen von klinischen und histopathologischen Markern getestet und publiziert.

Um die Patient*innen mit Tumorstadium I und II in ihrer Prognose besser differenzieren zu können, kombinierten Asare et al. – wie bereits erläutert (siehe 1.4.1) – das ENSAT-Tumorstadium mit dem Alter der Patient*innen bei Erstdiagnose und konnten so eine bessere Vorhersage für das 5-Jahres-Überleben erreichen [35].

Libé et al. untersuchten die Kombination aus mehreren klinischen und histopathologischen Markern. Für das ENSAT-Tumorstadium III und das ENSAT-Tumorstadium IV, das anhand der Anzahl weiterer betroffener Organe in drei Untergruppen eingeteilt war, konnten die

Forscher*innen differenziertere Prognosen für das Gesamtüberleben von NNR-Ca-Patient*innen stellen. Sie kombinierten dafür das Tumorstadium mit dem Tumorgrad (G), dem Resektionsstatus (R), dem Alter (A) und dem Vorhandensein von Symptomen (S) zum GRAS-Score. [48]

Auch in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Endokrinologie aus dem Jahr 2018 wird empfohlen, bei Erstdiagnose das Tumorstadium, den Resektionsstatus und den Tumorgrad (Proliferationsindex Ki-67 oder Mitoserate) für die Prognose zu berücksichtigen. Das Alter wird nicht explizit genannt, jedoch soll auf die „allgemeine Verfassung“ der Patient*innen geachtet werden. [20]

1.4.2 Molekulare Marker

Um die Kenntnisse über die Pathogenese von Nebennierenrindenzinomen zu erweitern, wurden in der Vergangenheit bereits größere und kleinere Projekte zur molekularen Charakterisierung dieser Tumorentität vorgenommen. Es wurden Veränderungen auf DNA-Ebene, aber auch auf RNA-Ebene und DNA-Modifikationen untersucht. So konnten verschiedene Marker identifiziert werden, die mit der Prognose von NNR-Ca-Patient*innen assoziiert sind. In den folgenden Abschnitten werden die Forschungsergebnisse vorgestellt, die Relevanz für diese Arbeit haben.

Anzahl detektierter Einzelnukleotidaustausche und kleiner Insertionen und Deletionen

Tumoren entwickeln sich durch Ansammlung von Veränderungen im Erbgut der Zellen. Die Anzahl somatischer Einzelnukleotidaustausche (SNV, engl. single nucleotide variant) und kleiner Insertionen und Deletionen (Indel), die schließlich in Tumoren zu finden sind, ist sehr heterogen. Bei Exomanalysen verschiedener Tumorentitäten wurden sowohl große intraspezifische als auch interspezifische Unterschiede gefunden [49]. Die Anzahl der gefundenen Varianten – bezogen auf die Größe der untersuchten Region in Basenpaaren – wird als Mutationslast (TMB, engl. tumor mutational burden) bezeichnet.

Beim Vergleich von Nebennierentumoren wurde in Karzinomen eine deutlich höhere durchschnittliche Anzahl an Varianten detektiert als in Adenomen [50-53]. Diese liegt bei NNR-Cas im Mittel bei 0,6 beziehungsweise 0,9 somatischen kodierenden Varianten/Mb [54, 55]. Zheng et al. beschreiben eine Spanne von 0,2 bis zu 14 somatischen kodierenden Varianten/Mb und konnten, als seltene Ausnahme, einen Tumor mit einem TMB von 100 finden [55]. In beiden Kohorten wurde eine Korrelation zwischen hoher Variantenanzahl und

einer schlechten Überlebensrate und/oder der Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung gezeigt [54, 55].

Kopienzahlveränderungen und Chromosomale Signaturen

Neben den SNVs und kleinen Indels sind in Tumoren auch CNAs (engl. copy number alteration) – diese Abkürzung wird für Kopienzahlveränderungen verwendet, die in Studien in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gefunden wurden [56] – einzelner Gene, Teilbereiche eines Chromosoms, ganzer Chromosomenarme beziehungsweise Chromosomen und auch des kompletten Genoms zu finden. Veränderungen können Amplifikationen, das heißt Zugewinn von Kopien, oder Deletionen, also Verluste, sein, wodurch letztendlich das Expressionslevel von Proteinen verändert sein kann.

Auch in NNR-Cas finden sich zahlreiche Amplifikationen und Deletionen, die ganze Chromosomenarme oder größere Bereiche eines Chromosoms betreffen [57, 58]. Mehrfach beschrieben sind Veränderungen auf den Chromosomen 5, 7, 12, 19 und 22 [53, 59-62]. Die Anzahl und Größe der gefundenen CNAs kann – wie auch die Anzahl der SNVs – zur Differenzierung von Nebennierenrindendadenomen und -karzinomen dienen, aber auch als prognostischer Marker bei NNR-Cas verwendet werden [53, 59, 61].

Anhand von SNP (Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. Single Nucleotide Polymorphism) - Array-Daten wurden von Zheng et al. Subgruppen von chromosomalen Signaturen definiert, die sich in der Anzahl und Größe der Kopienzahlveränderungen unterscheiden. In Tumoren des Quiet-Typs finden sich kaum große Kopienzahlveränderungen, die sich über einen großen Bereich erstrecken. Im Gegensatz zum Chromosomalen-Typ, bei dem sich viele Veränderungen über komplette Chromosomen erstrecken. Der Noisy-Typ zeichnet sich durch eine hohe Anzahl von Chromosomenbrüchen aus, was – im Vergleich zu den beiden anderen Signaturen – mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patient*innen korreliert ist, deren Tumoren diesem Typ zugeordnet werden. [55]

ZNRF3, das eine E3-Protein-Ubiquitin-Ligase kodiert, die negativer Regulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist [63], ist Beispiel für ein einzelnes Gen, dessen Verlust bei NNR-Cas mit einer schlechten Prognose assoziiert wurde [64].

Veränderte Gene und Signalwege

Nicht nur die Anzahl an Varianten hat eine Relevanz für die Prognose der NNR-Ca-Patient*innen, sondern auch, welche Gene und Signalwege von Veränderungen betroffen sind. Bei NNR-Cas sind auf DNA-Ebene vor allem Veränderungen von *TP53*, *CTNNB1*, *ZNRF3* und *CDKN2A* beschrieben [54, 55]. Sowohl das Vorhandensein von inaktivierenden *TP53*-Varianten als auch aktivierenden *CTNNB1*-Varianten sind mit einer schlechteren

Prognose für die NNR-Ca-Patient*innen assoziiert [65]. Ordnet man die gefundenen Veränderungen Signalwegen zu, sind am häufigsten der p53/Rb-Signalweg und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg betroffen, gefolgt von Varianten in Genen, die wichtig für die Remodellierung von Chromatin sind [54, 55].

Methylierungsstatus

Neben den Veränderungen der DNA-Sequenz und strukturellen und zahlenmäßigen Chromosomenaberrationen spielen bei der Entstehung und Entwicklung von Krebs auch epigenetische Mechanismen eine Rolle. „Die Epigenetik als Teilbereich der Genetik untersucht die Mechanismen, die die Aktivität unserer Gene verändern, ohne die Abfolge der DNA-Bausteine zu modifizieren“ [66]. Die am besten untersuchte Modifikation der DNA beim Menschen ist die Methylierung, also das Anhängen von Methylgruppen an Cytosine eines CpG (Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin)-Dinukleotids, worüber die Expression von Genen reguliert wird. Ein Zusammenhang zwischen Methylierung, Genregulation und Krebs wurde bereits in den Achtzigerjahren beschrieben [67].

Erste Daten von genomweiten Methylierungsanalysen in normalem Nebennierenrindengewebe, Adenomen und NNR-Cas der Stadien I und IV und deren unterschiedlichen Methylierungsstatus wurden 2012 veröffentlicht [68]. In einer weiteren Publikation wurde die differentielle Methylierung bei benignen und malignen Nebennierentumoren gezeigt [69]. Durch Methylierungsassays konnten Subgruppen von NNR-Cas mit unterschiedlichen CpG-Insel-Methylierungsphänotypen (CIMP, engl. CpG island methylation phenotype) und unterschiedlichem Gesamtüberleben gefunden werden [54, 70]. Der Begriff CIMP wurde ursprünglich für Darmkrebs etabliert, um eine Untergruppe von hypermethylierten Tumoren zu beschreiben [71].

Im Hinblick darauf, dass die Untersuchung des Methylierungsstatus in der Routinediagnostik als prognostischer Marker angewendet werden kann, untersuchten Jouinot et al. zielgerichtet Tumorsuppressorgene. Mit methylierungssensitiver multiplexer ligationsabhängiger Sondenamplifikation (MS-MLPA, engl. Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) konnte die Hypermethylierung der vier Tumorsuppressorgene *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* mit einer schlechteren Prognose für NNR-Ca-Patient*innen assoziiert werden. [72]

1.5 Neue Therapieziele bei Nebennierenrindenzinomen

Es wurde bereits erwähnt, dass für die Therapie von Patient*innen mit NNR-Cas nur wenige Standardverfahren zur Verfügung stehen, deren Effektivität beschränkt ist (siehe 1.3.2).

EINLEITUNG

Fortschritte bei der Behandlung der Erkrankten verspricht man sich auch bei NNR-Cas durch neuartige Therapien, die gegen spezifische, deregulierte molekulare Ziele in den Tumorzellen gerichtet sind.

Große Hoffnungen ruhten vor einigen Jahren auf dem zielgerichteten Einsatz von Linsitinib (OSI-906). Linsitinib ist eine niedermolekulare Verbindung, die inhibitorisch auf den Insulinrezeptor (IR) und den IGF1R (engl. Insuline-like growth factor receptor 1) wirkt [73]. Normalerweise werden über die Bindung von verschiedenen insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF, engl. insuline-like growth factor) an entsprechende Rezeptoren Signalwege aktiviert, die Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration von Zellen regulieren [74]. Auch in den Nebennieren spielt dieses System eine wichtige Rolle bei der Regulation biologischer Funktionen. Die Tatsache, dass die Überexpression von IGF2 in bis zu 90 % der Patient*innen mit NNR-Cas beschrieben ist [75, 76], war Rationale für die Untersuchung zielgerichteter Therapeutika zur Inhibierung des IGF2/IGFR- Signalwegs in NNR-Cas. Zellkultur- und Mausmodell-Experimente und Phase I-Studien mit verschiedenen IGF1R-Inhibitoren brachten vielversprechende Ergebnisse zum Ansprechen der Tumoren auf die Therapie mit Linsitinib [77, 78]. Eine darauffolgende Phase III-Studie endete jedoch enttäuschend [79]. In dieser multizentrischen Studie konnte bei Patient*innen mit fortgeschrittenem NNR-Ca, die mit Linsitinib behandelt wurden, kein längeres Gesamtüberleben als bei einer Kontrollgruppe, die mit einem Placebo behandelt wurde, gesehen werden [79]. Die Ausnahme bildeten vier Patient*innen, bei denen das Tumorwachstum über längere Zeit kontrolliert werden konnte [79]. Eine Erklärung für das gute Ansprechen dieser Behandelten auf die zielgerichtete Therapie beziehungsweise das Versagen der Therapie bei den meisten anderen Studienteilnehmer*innen fehlt bisher. Molekulargenetische Untersuchungen könnten eventuell Aufschluss darüber geben und sind wichtig, um weitere potentielle Therapieziele zu identifizieren.

1.6 Ziel der Arbeit

Die Prognose für Patient*innen, die an Nebennierenrindenzellkarzinomen erkrankt sind, haben sich über die letzten Jahre – trotz Fortschritten bei der Erforschung dieser Tumorentität – nicht deutlich verbessert. Empfehlungen zur Behandlung der Erkrankten stützen sich derzeit auf klinische und histopathologische Marker wie das ENSAT-Tumorstadium, den Resektionsstatus und den Proliferationsindex Ki-67 [20]. Diese sind jedoch nicht ausreichend, um die Entwicklung der Erkrankung bei möglichst vielen Patient*innen richtig einzuschätzen und für einen Großteil die richtige Behandlungsstrategie zu finden.

Vor allem umfangreiche Omics-Studien, die unter anderem die Untersuchung von Daten aus Exomsequenzierungen, Genexpressionsstudien und Methylierungsanalysen der Tumoren

EINLEITUNG

beinhalteten, haben geholfen, das Wissen um die Pathomechanismen in NNR-Cas zu vergrößern und die Veränderungen zu identifizieren, die Einfluss auf das Überleben der Patient*innen haben [54, 55, 64]. Die wichtigen Erkenntnisse aus diesen Studien haben jedoch noch keinen Einzug in den Klinikalltag gehalten, da die Erhebung derartiger Daten mit hohen Kosten und großem personellem und zeitlichem Aufwand verbunden ist. Das betrifft vor allem die Auswertung der Daten, die in dieser umfangreichen Art nicht für den Einsatz in der routinemäßigen Patientenversorgung geeignet ist.

Ein Ansatz, die Analysen zu vereinfachen, um sie für die Routinediagnostik übertragbar zu machen, wurde 2017 veröffentlicht. Die Autor*innen präsentierten eine Pipeline (TARGOMICs), mit der gleichzeitig zur Variantensuche auch die Analyse des DNA-Methylierungsstatus und der Chromosomenaberrationen möglich ist [80]. Problem dieser Studie und auch vieler anderer Untersuchungen zu molekularen Markern – im Hinblick auf den Einsatz der Analysen in der Routinediagnostik – ist jedoch, dass schockgefrorenes (ff, engl. fresh frozen) Tumormaterial verwendet wurde. Tiefgekühltes Tumormaterial wird hauptsächlich für Studien gesammelt, da die Lagerung in Stickstofftanks aufwendig und teuer ist. Einfacher und kostengünstiger wäre es, Material von Tumoren zu verwenden, die nach der Operation in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) wurden, was routinemäßig in Pathologien durchgeführt wird.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen Leitfaden zur Testung prognostischer und prädiktiver Marker mit DNA aus FFPE-Gewebe zu finden, der verhältnismäßig kostengünstig, einfach durchzuführen und auszuwerten ist. Dies soll eine zukünftige Anwendung in der Routinediagnostik ermöglichen, um die Behandlungsmöglichkeiten von Patient*innen mit NNR-Ca, wie in Abbildung 1 dargestellt, zu verbessern. Dafür sollte geklärt werden, ob sich die DNA aus FFPE-Tumormaterial eignet, um ausgewählte molekulargenetische Untersuchungen durchzuführen und sich damit bereits beschriebene molekulare prognostische Marker und ihr Zusammenhang zum Überleben der Patient*innen bestätigen lassen. Auch sollte untersucht werden, ob mit den molekularen Markern – im Vergleich zu klinischen und histopathologischen Markern – präzisere Prognosen für die Erkrankten zu treffen sind. Außerdem war die Frage, ob sich mit den gewählten Analysen prädiktive Marker und neue Optionen für zielgerichtete Therapien zur Behandlung von Nebennierenrindenzinomialpatient*innen identifizieren lassen.

EINLEITUNG

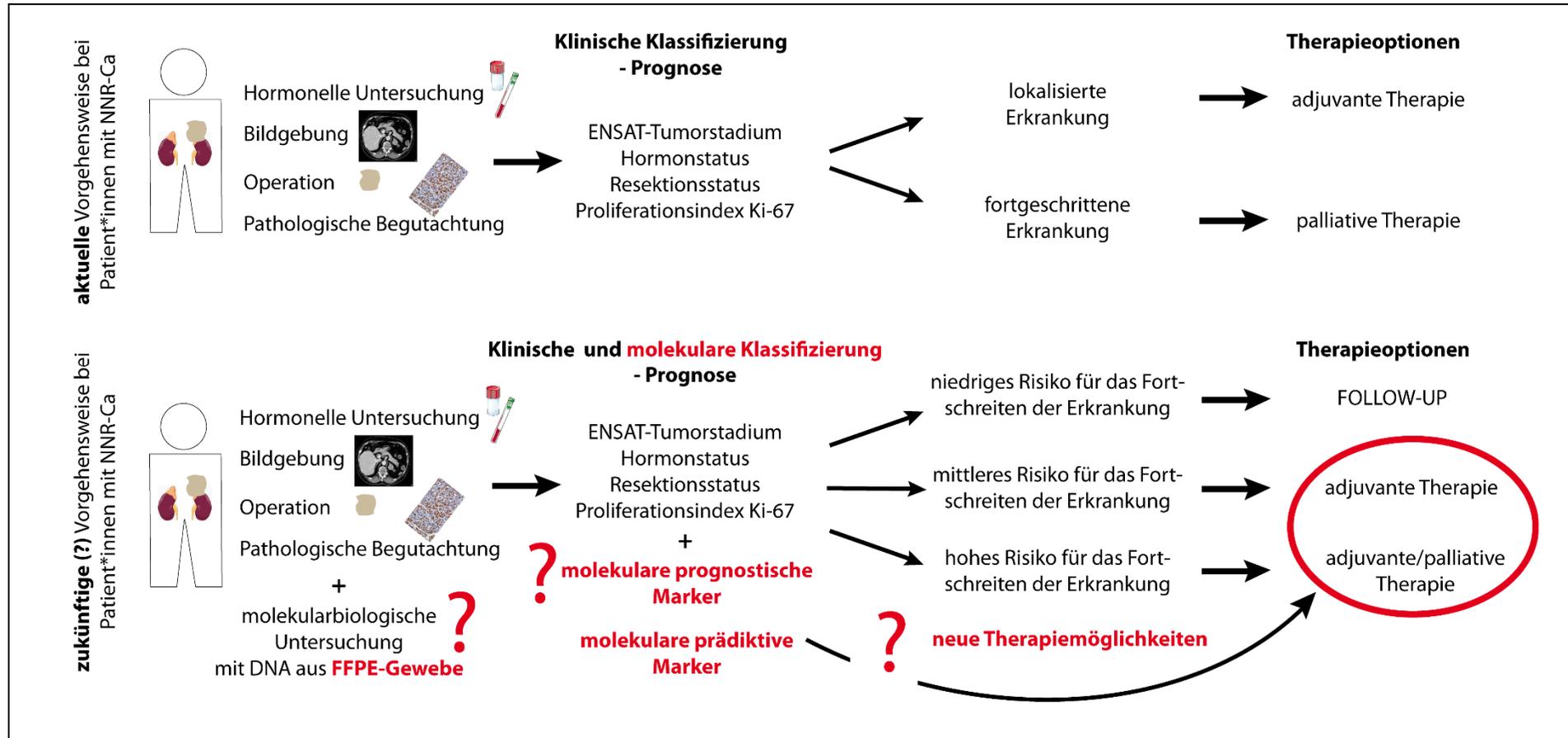


Abbildung 1: Aktuelle und zukünftige Behandlungsstrategien für Patient*innen mit NNR-Ca.

Bei der zukünftigen Vorgehensweise könnten – zusätzlich zu bereits standardmäßig untersuchten klinischen und histopathologischen Markern – prognostische und prädiktive molekulare Marker untersucht werden, um eine differenziertere Prognose für die Patient*innen stellen beziehungsweise eine zielgerichtete Therapie anbieten zu können. Idealerweise können die Marker mit Hilfe kostengünstiger, einfach anzuwendender, molekularbiologischer Methoden mit DNA aus FFPE-Tumormaterial untersucht werden.

Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure; ENSAT = Europäisches Netzwerk zur Untersuchung von Nebennierenrindentumoren; FFPE = in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet; NNR-Ca = Nebennierenrindenzarzinome

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Projektplan

Um die oben genannten Fragen zu beantworten, war die Arbeit in zwei Teilprojekte gesplittet. In der retrospektiven Studie sollte die Durchführbarkeit der genetischen Analysen an FFPE-Material überprüft und mit verhältnismäßig günstigen und einfachen Methoden nach wiederkehrenden molekularen prognostischen und prädiktiven Markern gesucht werden. Zur Analyse von somatischen SNVs, CNAs und chromosomalen Signaturen in der Tumor-DNA wurde das Comprehensive Cancer Panel gewählt, mit dem 160 Gene angereichert werden konnten, die bekanntermaßen mit Krebs assoziiert sind. Einzelgenanalysen – im ersten Projektteil wurde zusätzlich zu den 160 Genen *ZNRF3* untersucht – wurden mit Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Der Methylierungsstatus von CpG-Inseln der Tumorsuppressorgene *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* wurde mittels Pyrosequenzierungen statt genomweiten Methylierungsanalysen bestimmt. Durch Korrelation der molekular-genetischen Daten mit Überlebensdaten der Patient*innen sollte geklärt werden, ob sie sich als prognostische Marker eignen. Das Panel war außerdem so gewählt, dass Gene untersucht wurden, die aus anderen Tumorentitäten als prädiktive Marker für zielgerichtete Therapien bekannt sind. Die prospektive Studie sollte der Bestätigung der gefundenen Marker dienen, wobei die Untersuchungsmethoden entsprechend angepasst werden sollten. Ein Überblick zum geplanten Ablauf des Projekts ist in Abbildung 2 dargestellt.

2.2 Studienprotokoll

Die Durchführung der Studien wurde von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg (#88/11) beziehungsweise der Universität Birmingham (Projekt 11-066) genehmigt. Für die Proben aus Birmingham liegt zusätzlich eine Genehmigung für den Materialtransfer nach Würzburg vor.

Studiendesign und -durchführung erfolgten unter Berücksichtigung der Vorgaben der „Declaration of Helsinki“ (siehe 6.2 [Int. 12]). Außerdem wurden die Empfehlungen zur Veröffentlichung von Markern für die Prognostik bei Tumorerkrankungen (Reporting Recommendations for Tumour Marker Prognostic Studies (REMARK)) beachtet [81]. Von allen Patient*innen liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur genetischen Untersuchung der DNA aus Blut- und Tumorproben vor.

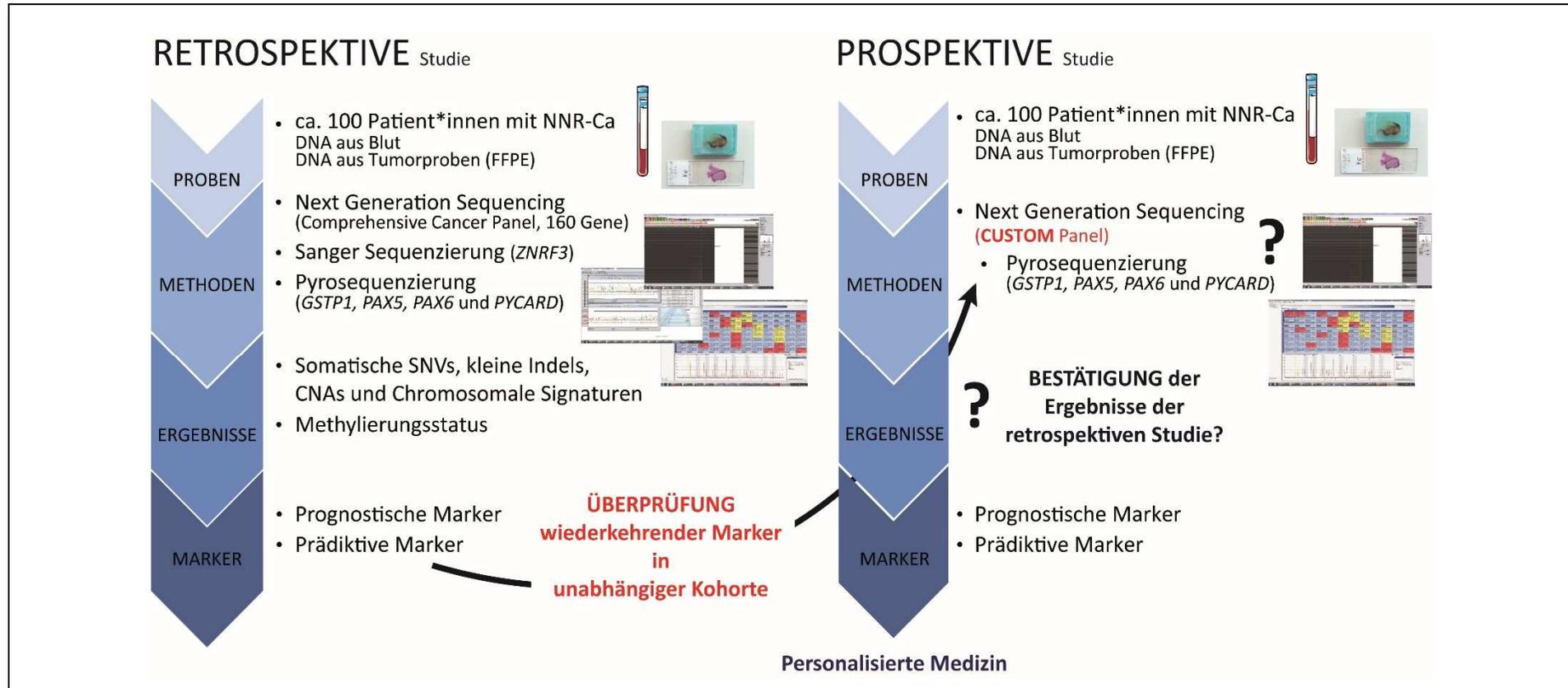


Abbildung 2: Überblick über den Projektplan.

Das Projekt war in zwei Studien unterteilt: Mit der retrospektiven Studie sollte die Durchführbarkeit der Untersuchungen an FFPE-Material getestet und mit unterschiedlichen Sequenziermethoden (NGS, Sanger-Sequenzierung und Pyrosequenzierung) und deren Auswertung prognostische und prädiktive Marker identifiziert werden. In der prospektiven Studie sollten die angewendeten Methoden an die vorherigen Ergebnisse angepasst (Custom Panel) und erneut Patientenmaterial untersucht werden, mit der Frage, ob vorherige Ergebnisse reproduziert und schließlich im Rahmen von personalisierter Medizin eingesetzt werden können.

Abkürzungen: ca. = circa; CNA = Kopienzahlveränderung; DNA = Desoxyribonukleinsäure; FFPE = Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet; Indel = Insertion und Deletion; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinom; SNV = Einzelnukleotidaustausch

2.3 Untersuchtes Probenmaterial

In den beiden Teilprojekten wurde mit unterschiedlichen Patientenkohorten gearbeitet. Die Einschlusskriterien für die Proben in die jeweilige Studie unterschieden sich leicht. Diese Punkte werden in den jeweiligen Abschnitten genauer erläutert.

Gemeinsam ist den beiden Teilprojekten, dass nur Tumormaterial verwendet wurde, welches vorher durch Patholog*innen histologisch eindeutig als NNR-Ca klassifiziert wurde und eine ausreichende Qualität hat (siehe 2.5.2 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung mit DNA QuantiMIZE Assay Kits). Außerdem musste von allen Patient*innen neben dem Tumor auch Vollblut verfügbar sein. Das Blut wird bis zur Isolation der DNA in EDTA (Ethylendiamintetraazetat)-Röhrchen bei -80°C gelagert. Die Tumorproben werden als FFPE-Blöcke bei Raumtemperatur gelagert.

Als klinischer Endpunkt oder Zielereignis wurde bei beiden Studien die Zeit des progressionsfreien Überlebens verwendet, also der Zeitraum von der ersten OP (teilweise nicht vollständig möglich) bis zum ersten radiologischen Hinweis auf erneutes Tumorwachstum, bis zum Tod, bedingt durch die Tumorerkrankung oder bis zum letzten dokumentierten Termin der Nachsorge, wenn der Tumor bis dahin nicht rezidivierend war.

2.3.1 Retrospektive Studie

Das erste Teilprojekt, die retrospektive Studie, wurde mit Material von Patient*innen durchgeführt, welches in der Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg archiviert ist. Die Patient*innen und die relevanten Daten zu ihrer Erkrankung, sofern vorhanden, sind im Europäischen Nebennierentumorregister gespeichert.

Einschlusskriterium in die retrospektive Studie war, neben den bereits erwähnten Kriterien, die möglichst vollständige Dokumentation klinischer und histopathologischer Daten der einzelnen Patient*innen (siehe Tabelle 2). Im Rahmen der retrospektiven Studie wurden 117 Tumorproben von insgesamt 107 Patient*innen aus den Jahren 2002 bis 2016 untersucht. Die Kohorte entspricht derjenigen, die bereits bei Lippert et al. beschrieben wurde [82].

Es wurden Tumor- und Blutproben von 46 Männern und 61 Frauen im Alter zwischen 18 und 87 Jahren untersucht. In 29 % der Fälle (n (Anzahl, engl. number) = 31) wurde das Nebennierenrindenzinom zufällig entdeckt. Bei 42 % (n = 45) war die Tumorgöße der Diagnosegrund. Bei 29 % der Patient*innen (n = 31) wurde der Tumor aufgrund hormoneller Veränderungen diagnostiziert. Etwa die Hälfte der Tumoren waren hormonell aktiv (n = 56). Die andere Hälfte war endokrinologisch inaktiv beziehungsweise war nicht bekannt, ob und welche Hormone der Tumor sekretierte (n = 25 beziehungsweise n = 26). Bei 52,3 % der

Kohorte (n = 56) wurde der Tumor zu einem frühen Zeitpunkt entdeckt (ENSAT-Tumorstadium I-II). 26,2 % der Tumoren (n = 28) wurden dem ENSAT-Tumorstadium III zugeordnet und bei 21,5 % der Patient*innen (n = 23) hatten sich bereits Fernmetastasen gebildet, wodurch die NNR-Cas dem ENSAT-Tumorstadium IV zugeordnet wurden.

Tabelle 2: Klinische und histopathologische Daten der Kohorte der retrospektiven Studie (n = 107).

Die in dieser Tabelle enthaltenen Daten wurden bereits publiziert [82].

Geschlecht (m/w)	46/61
Alter [Jahre] – Median (Spanne)	49 (18-87)
<50 – abs. Anzahl (Anteil [%])	57 (53.3)
≥50 – abs. Anzahl (Anteil [%])	50 (46.7)
Diagnosegrund (verfügbare Daten: n = 107)	
Zufallsbefund – abs. Anzahl (Anteil [%])	31 (29.0)
Tumorgröße – abs. Anzahl (Anteil [%])	45 (42.0)
Hormonelle Veränderungen – abs. Anzahl (Anteil [%])	31 (29.0)
Hormonsekretion (verfügbare Daten: n = 81)	
Glukokortikoide – abs. Anzahl (Anteil [%])	24 (22.4)
gemischte Sekretion – abs. (Anteil [%])	25 (23.3)
andere (Androgene, Mineralkortikoide, Östrogene) – abs. Anzahl (Anteil [%])	7 (2.4)
endokrinologisch inaktiv – abs. Anzahl (Anteil [%])	25 (23.3)
unbekannt – abs. Anzahl (Anteil [%])	26(24.3)
ENSAT-Tumorstadium bei Diagnose (verfügbare Daten: n = 107)	
I-II – abs. Anzahl (Anteil [%])	56 (52.3)
III – abs. Anzahl (Anteil [%])	28 (26.2)
IV (mit Metastasen) – abs. Anzahl (Anteil [%])	23 (21.5)
Resektionsstatus (verfügbare Daten: n = 104)	
R0 – abs. Anzahl (Anteil [%])	74 (69.2)
RX – abs. Anzahl (Anteil [%])	16 (15.0)
R1 – abs. Anzahl (Anteil [%])	5 (4.7)
R2 – abs. Anzahl (Anteil [%])	9 (8.4)
Ki-67 Proliferationsindex (verfügbare Daten: n = 107) – Median (Spanne)	12 (1-90)
0-9 – abs. Anzahl (Anteil [%])	30 (28.0)
10-19 – abs. Anzahl (Anteil [%])	34 (31.8)
≥20 – abs. Anzahl (Anteil [%])	43 (40.2)
Tumortyp	
Primärtumor – abs. Anzahl (Anteil [%])	89 (83.2)
Rezidiv – abs. Anzahl (Anteil [%])	9 (8.4)
Metastase – abs. Anzahl (Anteil [%])	9 (8.4)

Abkürzungen: abs. = absolute; ENSAT = Europäisches Netzwerk zur Untersuchung von Nebennierenrindentumoren; m = männlich; n = Anzahl; R0 = kein Residualtumor; RX = nicht beurteilbar, ob Tumorgewebe zurückgeblieben ist; R1 = mikroskopischer Residualtumor; R2 = makroskopischer Residualtumor; w = weiblich

Bei 74 Patient*innen konnte der Tumor vollständig entfernt werden. Bei 16 Erkrankten konnte keine Aussage über den R-Status getroffen werden. Bei 4,7 % der Kohorte (n = 5) blieb ein mikroskopischer und bei 8,4 % (n = 9) ein makroskopischer Rest des Tumors zurück. Bei 2,8 % der Patient*innen (n = 3) wurden keine Angaben zum Resektionsstatus gefunden. Der Proliferationsindex lag im Median bei 12. Bei den untersuchten NNR-Cas handelte es sich

größtenteils um Primärtumoren (n = 89; 83,2 %). Nur jeweils 9 Tumoren waren Rezidive beziehungsweise Metastasen (jeweils 8,4 %). Eine genaue Auflistung aller Parameter ist in Tabelle 2 zu finden.

Die Patient*innen wurden im Median über einen Zeitraum von 31 Monaten regelmäßig untersucht beziehungsweise behandelt. Die Hälfte der Patient*innen (n = 54) verstarb während des Follow-Ups. Einige wurden mehrmals operiert (n = 26) oder lokal bestrahlt (n = 19). 73 Patient*innen wurden adjuvant oder palliativ mit Mitotane behandelt. 62 Betroffene erhielten im Laufe ihrer Behandlung zytotoxische Chemotherapeutika. Genauere Angaben zu den unterschiedlichen Behandlungen sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Daten zur Behandlung der Patient*innen während des Betreuungszeitraums (n = 107).

Die in dieser Tabelle enthaltenen Daten wurden bereits publiziert [82].

Dauer des Follow-Ups [Monate] – Median (Spanne)	31 (3 – 274)
Verstorbene	54 (50.5)
Lokal angewendete Therapien	
Zusätzliche Operationen – abs. Anzahl (Anteil [%])	26 (24.3)
Bestrahlung (Tumorbett oder Metastasen) – abs. Anzahl (Anteil [%])	19 (17.8)
Iodometomidate – abs. Anzahl (Anteil [%])	7 (6.5)
Mitotanetherapie	73 (68.2)
Adjuvante Therapie – abs. Anzahl (Anteil [%])	39 (36.4)
Palliative Therapie – abs. Anzahl (Anteil [%])	34 (31.8)
Zytotoxische Chemotherapien	
Keine Chemotherapie – abs. Anzahl (Anteil [%])	45 (42.1)
Platinumpreparate – abs. Anzahl (Anteil [%])	52 (48.6)
Streptozotocin – abs. Anzahl (Anteil [%])	44 (41.1)
Gemcitabine und Capecitabine – abs. Anzahl (Anteil [%])	36 (33.6)

Abkürzungen: abs. = absolute

Von 12 Patient*innen wurde jeweils eine weitere Tumorprobe analysiert. In Tabelle 4 sind die Angaben zu den Tumortypen aufgelistet, die untersucht wurden. Nur ein Tumorkörper wurde während einer OP, also synchron, entnommen. Bei allen anderen Tumorkörpern unterscheiden sich die Entnahmezeitpunkte (= metachron). Der Großteil der Zusatztumoren sind Metastasen (10 von 12). Nur bei zwei Probenpaaren handelt es sich um einen Primärtumor und ein Rezidiv. Die Paare sind identisch mit denjenigen, die, zusammen mit Tumorkörpern aus Frankreich, in Jouinot et al. charakterisiert wurden [83].

Tabelle 4: Untersuchte Tumorprobenpaare.

Kennung	Tumortyp	Entnahmezeitpunkt
182 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	synchron
500 (retrospektive Studie)	Rezidiv Metastase	metachron
539 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
560 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
602 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
810 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
913 (retrospektive Studie)	Primärtumor Rezidiv	metachron
932 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
937 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
949 (retrospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
670 (prospektive Studie)	Primärtumor Metastase	metachron
1801 (prospektive Studie)	Primärtumor Rezidiv	metachron

2.3.2 Prospektive Studie

Voraussetzung für den Einschluss in die prospektive Studie war, zusätzlich zu den allgemeinen Einschlusskriterien in dieser Arbeit, dass die Patient*innen zum Zeitpunkt der Sequenzierung der Proben möglichst noch am Leben sein sollten. Es wurde immer der aktuellste vorhandene Tumor für die Untersuchungen verwendet. Die älteste verwendete Probe stammt aus dem Jahr 2011, die neueren Proben sind aus dem Jahr 2018. Bis März 2019 wurden 52 Tumoren von 50 Patient*innen sequenziert. Von zwei Patient*innen also auch wieder zwei Tumoren (siehe Tabelle 4). Neben Würzburger Probanden wurden in die prospektive Studie – im Rahmen einer Kooperation – auch Proben von Patient*innen der Universität von Birmingham (United Kingdom) eingeschlossen. Von den Patient*innen der prospektiven Studie war über die Hälfte weiblich (31 Frauen gegenüber 19 Männern). Diagnostiziert wurden die Tumoren bei Patient*innen im Alter zwischen 19 und 80 Jahren. Bei etwa einem Drittel (n = 17) wurde der Tumor aufgrund hormoneller Veränderungen diagnostiziert. Bei 28 % (n = 14) war die Diagnose ein Zufallsbefund. Die Tumorgröße führte nur bei einer Person (2 %) zur Entdeckung des Nebennierenrindenzinoms. Bei neun Erkrankten (18 %) war die Entdeckung auf andere Ursachen, wie Schmerzen, zurückzuführen. Bei weiteren neun Patient*innen (18 %) sind keine Diagnosegründe bekannt. Über die Hälfte der Tumoren (56 %, n = 28) wurden dem ENSAT-Tumorstadium I-II zugeordnet. 18 NNR-Cas

(36 %) hatten bereits das ENSAT-Tumorstadium III erreicht und bei vier Patient*innen hatten sich bereits Fernmetastasen gebildet (ENSAT-Tumorstadium IV; 8 %). 80 % (n = 40) der Tumoren konnten komplett entfernt werden. Der Proliferationsindex lag im Median bei 20. Die untersuchten Tumoren waren zum größten Teil Primärtumoren (n = 43; 86 %). Es wurden außerdem zwei Rezidive (4 %) und fünf Metastasen (10 %) untersucht. Die klinischen und histopathologischen Daten der Kohorte sind im Detail in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Klinische und histopathologische Daten der Kohorte der prospektiven Studie (n = 50).

Geschlecht (m/w)	19/31
Alter [Jahre] – Median (Spanne)	54 (19-80)
<50 – abs. Anzahl (Anteil [%])	20 (40)
≥50 – abs. Anzahl (Anteil [%])	29 (58)
Unbekannt – abs. Anzahl (Anteil [%])	1 (2)
Diagnosegrund (verfügbare Daten: n = 41)	
Zufallsbefund – abs. Anzahl (Anteil [%])	14 (28)
Tumorgröße – abs. Anzahl (Anteil [%])	1 (2)
Hormonelle Veränderungen – abs. Anzahl (Anteil [%])	17 (34)
Andere Gründe – abs. Anzahl (Anteil [%])	9 (18)
Hormonsekretion (verfügbare Daten: n = 41)	
Glukokortikoide – abs. Anzahl (Anteil [%])	13 (26)
gemischte Sekretion – abs. Anzahl (Anteil [%])	3 (6)
andere (Androgene, Mineralkortikoide, Östrogene) – abs. Anzahl (Anteil [%])	1 (2)
endokrinologisch inaktiv – abs. Anzahl (Anteil [%])	24 (48)
ENSAT-Tumorstadium bei Diagnose	
I-II – abs. Anzahl (Anteil [%])	28 (56)
III – abs. Anzahl (Anteil [%])	18 (36)
IV (mit Metastasen) – abs. Anzahl (Anteil [%])	4 (8)
Resektionsstatus (verfügbare Daten: n = 49)	
R0 – abs. Anzahl (Anteil [%])	40 (80)
RX – abs. Anzahl (Anteil [%])	2 (4)
R1 – abs. Anzahl (Anteil [%])	4 (8)
R2 – abs. Anzahl (Anteil [%])	0 (0)
R0 Lokal (bei vorhandenen Metastasen) – abs. Anzahl (Anteil [%])	3 (6)
Ki-67 Proliferationsindex (verfügbare Daten: n = 50) – Median (Spanne)	20 (1-70)
0-9 – abs. Anzahl (Anteil [%])	10 (20)
10-19 – abs. Anzahl (Anteil [%])	7 (14)
≥20 – abs. Anzahl (Anteil [%])	29 (58)
Unbekannt – abs. Anzahl (Anteil [%])	4 (8)
Tumortyp	
Primärtumor – abs. Anzahl (Anteil [%])	43 (86)
Rezidiv – abs. Anzahl (Anteil [%])	2 (4)
Metastase – abs. Anzahl (Anteil [%])	5 (10)

Abkürzungen: abs. = absolute; ENSAT = Europäisches Netzwerk zur Untersuchung von Nebennierenrindentumoren; m = männlich; n = Anzahl; R0 = Kein Residualtumor; RX = Es kann nicht beurteilt werden, ob Tumorgewebe zurückgeblieben ist; R1 = mikroskopischer Residualtumor; R2 = makroskopischer Residualtumor; w = weiblich

2.4 Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien und Reagenzien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionen bei AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Beckman Coulter Diagnostics (Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten), Berlin-Chemie AG (Berlin, Deutschland), B. Braun (Melsungen, Deutschland), Laborhaus Scheller GmbH und Co. KG (Euerbach, Deutschland), GE Healthcare (Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten), Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) oder VWR Life Science (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Alle verwendeten Enzyme stammten, wenn nicht anders angegeben oder sie direkt in den verwendeten Kits enthalten waren, von Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten), Applied Biosystems™ (Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten), Invitrogen oder der Roche Diagnostics GmbH.

Die Angaben zu den verwendeten Geräten befinden sich in den jeweiligen Abschnitten.

Die Bezeichnungen und Herstellerangaben der verwendeten Kits sind bei den entsprechenden Unterpunkten zu finden.

Alle Primer wurden bei Metabion (Planegg, Deutschland) bestellt.

Puffer, die nicht selbst mit den oben angegebenen Chemikalien angesetzt wurden, wurden bei Qiagen (Hilden, Deutschland) oder der Roche Diagnostics GmbH bezogen. Die Zusammensetzung der selbst angesetzten Puffer ist unter den jeweiligen Abschnitten angegeben.

Es wurden Verbrauchsmaterialien von 4titude (Wotton, Großbritannien), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Hartenstein (Würzburg, Deutschland), Qiagen, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) verwendet.

2.5 Angewendete Labormethoden

In den folgenden Abschnitten werden die durchgeführten Methoden erläutert. Bei den Standardmethoden, wie zum Beispiel der Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) oder der Sanger-Sequenzierung, wird das zugrundeliegende Prinzip nicht im Detail erläutert.

2.5.1 DNA-Isolation

Die DNA für die beiden Studien wurde aus FFPE-Tumorproben und dem zugehörigen Vollblut gewonnen.

Wichtig war hierbei, dass vor der DNA-Isolation Schnitte und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) der FFPE-Blöcke angefertigt wurden. HE-Färbungen werden standardmäßig in Pathologien eingesetzt, „um einen Überblick über das gesamte Gewebe, die Strukturen, die Zellverteilung, die Kern-Plasma-Relationen, die Anfärbbarkeit zu erhalten“ [84]. So kann auch die genaue Lokalisation des Tumorgewebes bestimmt (siehe Abbildung 3) und für die Isolation der DNA ein Bereich mit möglichst hohem Tumorzellgehalt verwendet werden. Das Schneiden und Färben der Proben erfolgte im Forschungslabor der Endokrinologie am Universitätsklinikum Würzburg oder am Institut für Pathologie der Universität Würzburg beziehungsweise in der Pathologie in Birmingham. Die Bestimmung der genauen Lokalisation des Tumors wurde für alle Schnitte in Würzburg durchgeführt. Der Tumorzellgehalt lag bei den Proben, die für die Sequenzierung verwendet wurden, bei 60 % - 95 %.



Abbildung 3: FFPE-Block mit Tumormaterial und zugehörigem HE-gefärbtem Schnitt.

Die blaue Umrandung auf dem HE-Schnitt (unten) markiert die genaue Lokalisation des Tumorgewebes, der für die DNA-Isolation benötigt wird. (Fotografien zur Verfügung gestellt von PD Dr. Cristina L. Ronchi, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Würzburg).

Abkürzungen: HE = Hämatoxylin-Eosin

Für die Isolation der DNA aus Tumorgewebe wurde das GeneRead DNA FFPE Kit von Qiagen verwendet. Die DNA aus Vollblut wurde mit dem NucleoSpin® Blood L Kit von Macherey-Nagel (Bethlehem, PA, Vereinigte Staaten) isoliert. Die DNA-Isolation wurde jeweils entsprechend der Herstellerangaben von Sonja Steinhauer in der Endokrinologie durchgeführt (siehe 6.2 [Int. 13] und [Int. 14]).

2.5.2 Qualitäts- und Quantitätsmessung der DNA

Für die Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von DNA gibt es verschiedene Methoden, die sich im Prinzip der Messung, in ihrer Genauigkeit und darin, ob nur die Konzentration der DNA gemessen wird oder zusätzlich auch die Größe der Fragmente, unterscheiden. Die für die Messung verwendete Methode wurde abhängig vom späteren Verwendungszweck der DNA gewählt.

Quantitätsmessung mit dem Qubit

Sollte nur die Konzentration der DNA bestimmt werden, wurde eine fluorometrische Quantifizierung mit dem Qubit Fluorometer von Thermo Fisher Scientific vorgenommen. Bei dieser Art der Konzentrationsbestimmung wird ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der an doppelsträngige (ds) DNA bindet und auch nur nach Bindung an das Zielmolekül und Anregung leuchtet, was die Sensitivität und die Spezifität der Messung erhöht (siehe 6.2 [Int. 15]). Die DNA wurde, je nach erwarteter Konzentration der Proben, mit dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (für Ausgangskonzentrationen der Proben von 10 pg/μl bis 100 ng/μl) oder dem Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (für Ausgangskonzentrationen der Proben von 100 pg/μl–1000 ng/μl) nach Herstellerangaben vorbereitet und mit dem Qubit™ Fluorometer gemessen (siehe 6.2 [Int. 16]). Diese Art der Konzentrationsbestimmung wurde für die Probenvorbereitung vor der NGS-Anreicherung und für die Verdünnung der finalen Libraries vor der Sequenzierung verwendet (siehe 2.5.4 Next-Generation Sequencing).

Qualitäts- und Quantitätsmessung mit dem Bioanalyzer 2100

Eine weitere Methode, um die Konzentration der DNA und auch deren Qualität – in Form von Fragmentgrößen – zu überprüfen, war die Messung der DNA mit dem Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten). Die Messmethode basiert auf dem Prinzip der Gelelektrophorese, also der Auftrennung geladener Teilchen entsprechend ihrer Größe entlang eines elektrischen Feldes. Die Messungen wurden mit dem Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe 6.2 [Int. 17]). Diese Messmethode kam zum Einsatz, um an vorgegebenen Zwischenschritten zu kontrollieren, ob die Anreicherung der DNA für NGS korrekt funktioniert und um die Fragmentgrößen der Libraries vor der Sequenzierung zu bestimmen (siehe 2.5.4 Next-Generation Sequencing).

Qualitäts- und Quantitätsbestimmung mit DNA QuantiMIZE Assay Kits

Die DNAs der Tumoren wurden, wie bereits erwähnt, aus FFPE-Gewebe extrahiert. Formaldehyd, das für die Fixierung von Gewebe verwendet wird, führt dazu, dass Nukleinsäuren degradiert werden und die DNA in Bruchstücken vorliegt [84]. Die isolierte DNA kann danach zwar noch für molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden, der Erfolg der Untersuchungen wird aber entscheidend vom Grad der Fragmentierung beeinflusst. Der Degradationsgrad der DNA wiederum ist abhängig von Temperatur, pH-Wert und Dauer der Isolation [84] und kann, trotz Standardprotokollen, sehr variabel sein, weswegen es sinnvoll

ist, die Qualität der DNA vor der Verwendung für molekularbiologische Analysen zu überprüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das GeneRead und das QIAseq DNA QuantiMIZE Assay Kit von Qiagen verwendet. Grundlage der Messmethode ist die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). Mit dieser lässt sich – wie der Name sagt – in Echtzeit mit einer PCR die Quantität der DNA bestimmen. Fluoreszenzfarbstoffe, in diesem Fall SYBR Green, lagern sich in doppelsträngige DNA (dsDNA) ein und die Intensität der Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Nach jedem Zyklus nimmt die Menge an dsDNA zu und damit auch die Stärke des Fluoreszenzsignals. Das Ergebnis dieser Messung ist der C_T -Wert (Schwellenwertzyklus; engl. cycle threshold). Der Schwellenwertzyklus gibt an, wann das erste Mal ein Signal detektiert wird, das deutlich über dem Hintergrundsignal liegt. Je kleiner der C_T -Wert ist, desto früher wurde der Schwellenwert überschritten, desto mehr Ausgangsmaterial war also zur Amplifikation vorhanden.

Um den Grad der Degradation einer Probe bestimmen zu können, wurden in zwei getrennten Reaktionen – Assay 100 und Assay 200 – 100 beziehungsweise 200 bp (Basenpaar) große Stücke an 20 Positionen der genomischen DNA von jeder zu untersuchenden Probe und einer idealen, nicht fragmentierten Kontroll-DNA, die im Kit enthalten ist, amplifiziert. Von jeder Probe wurden, durch den Vergleich der C_T -Werte der Proben zur idealen Kontroll-DNA, ΔC_T -Werte errechnet. Anhand der beiden ΔC_T -Werte jeder Probe (Assay 100 und Assay 200) wurde ein Qualitätsscore (QC-Score) ermittelt. Der QC-Score ist Maß für die Qualität einer Probe, die in HIGH (QC-Score $\leq 0,04$) oder LOW (QC-Score $> 0,04$) eingeteilt wird.

In Abbildung 4 ist die Analyse der DNA-Qualität exemplarisch für zwei Proben unterschiedlich starker Fragmentierung dargestellt. Wenig fragmentierte DNA sollte sich ähnlich gut amplifizieren lassen wie die Kontroll-DNA, die C_T -Werte der Ansätze einander in etwa entsprechen und der ΔC_T -Wert klein sein. Aus der Verrechnung der beiden ΔC_T -Werte ergibt sich ein QC-Score $\leq 0,04$. Bei stark degradiertem DNA werden im Vergleich zur Kontroll-DNA bei Assay 200 deutlich höhere C_T -Werte erwartet, so dass der ΔC_T -Wert groß ist und der QC-Score $> 0,04$.

Die Vorbereitung der Proben und Durchführung der Qualitätskontrolle mit den DNA QuantiMIZE Assay Kits erfolgte wie im Handbuch beschrieben (siehe 6.2 [Int. 19]). Die qPCR wurde mit dem ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Berechnung der C_T -Werte der Proben erfolgte mit der QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.2 von Thermo Fisher Scientific. Anhand eines Excel-Formblatts von Qiagen (siehe 6.2 [Int. 20]) konnte mit den ermittelten C_T -Werten die Qualität der Proben gemessen werden. DNA mit einem QC-Score $\leq 0,04$ wurde für weitere Analysen verwendet. Stark fragmentierte Proben mit einem QC-Score $> 0,04$ wurden von den Studien ausgeschlossen.

Mit den Formblättern konnte außerdem die Menge an DNA berechnet werden, die bei der Anreicherung eingesetzt werden sollte.

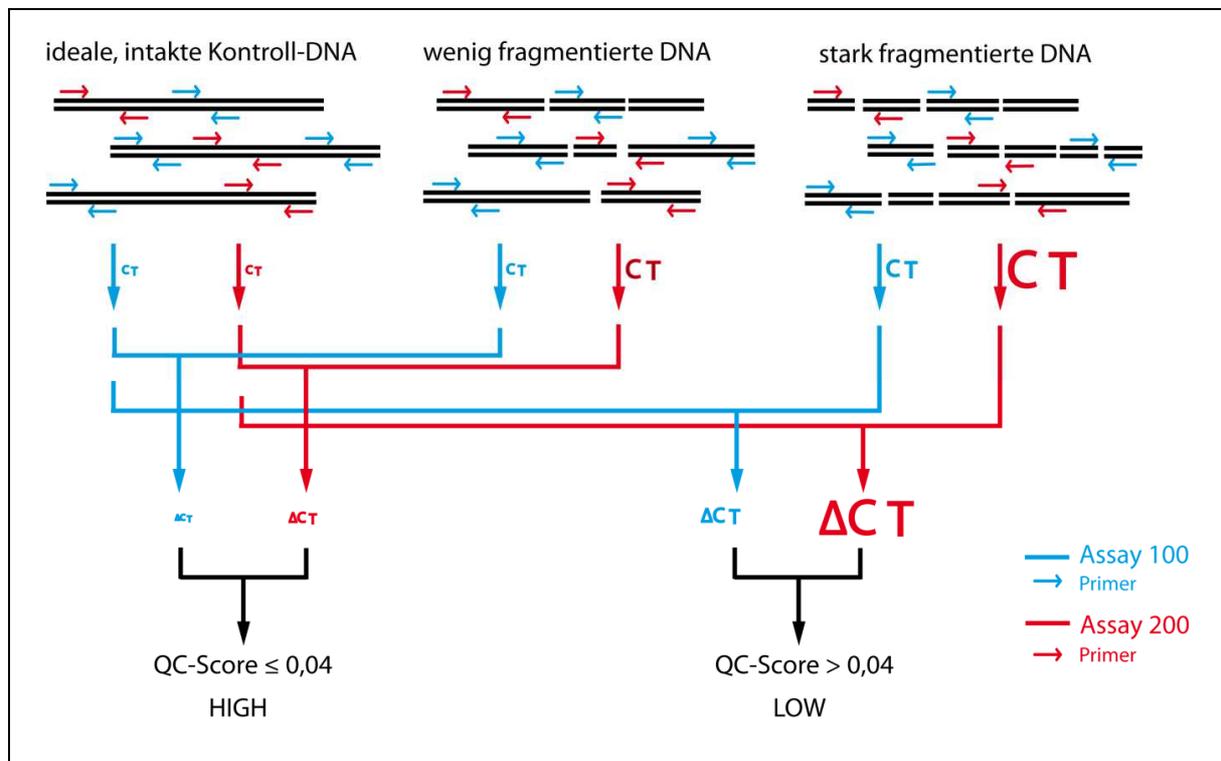


Abbildung 4: Prinzip der Qualitätsbestimmung mit den DNA QuantiMIZE Assay Kits.

Dargestellt ist die Analyse von wenig fragmentierter und stark fragmentierter DNA im Vergleich zu einer idealen Kontroll-DNA mit dem QuantiMIZE Assay Kit. Die Primer (blaue und rote Pfeile) binden an je 20 Positionen im Genom, wodurch in getrennten Ansätzen 100 bp (Assay 100) beziehungsweise 200 bp (Assay 200) große Stücke amplifiziert werden. Ist die DNA intakt, werden sowohl 100 bp als auch 200 bp große Stücke amplifiziert. Der Schwellenwertzyklus wird schnell erreicht und ist somit klein. Bei stark fragmentierter DNA können größere Stücke kaum amplifiziert werden. Der C_T-Wert ist relativ groß. Aus dem Vergleich der C_T-Werte der Proben mit denen der idealen Kontroll-DNA ergeben sich für jede Probe zwei ΔC_T-Werte (für Assay 100 und Assay 200). Diese wiederum ergeben miteinander verrechnet einen QC-Score, der Maß für die Qualität der DNA – wenig oder stark fragmentiert – darstellt. Bei wenig fragmentierten Proben liegt der QC-Score ≤ 0,04; bei stark fragmentierten Proben > 0,04. (Abbildung in Anlehnung an „Principle of the QIaseq DNA QuantiMIZE System“, Produktdetails, siehe 6.2 [Int. 18])

Abkürzungen: Δ = delta; C_T = Schwellenwertzyklus; QC-Score = Qualitätsscore

2.5.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist Ausgangsreaktion vieler Verfahren in molekularbiologischen Laboren. Das Prinzip wurde im Jahr 1986 erstmals publiziert [85]. Bei der PCR werden ausgewählte Bereiche der DNA selektiv amplifiziert, indem drei Schritte – die Denaturierung der dsDNA, die Anlagerung von Primern und die Elongation – in dieser Reihenfolge mehrmals wiederholt werden. In jedem neuen Zyklus dient das PCR-Produkt des vorangegangenen Zyklus als neues Template, so dass die gewünschten Bereiche exponentiell vervielfältigt

werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den PCR-Produkten verschiedene Arten von Sequenzierungen (siehe 2.5.4 Sanger-Sequenzierung und Pyrosequenzierung) durchgeführt. Die Bedingungen, die daraus für das Primerdesign und den PCR-Ansatz folgen, werden in den nächsten Abschnitten erklärt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen in den Thermocyclern T3 oder T Professional Basic Gradient (beide von Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion vor einer Sanger-Sequenzierung

Sollte mit dem PCR-Produkt eine Sanger-Sequenzierung (siehe 2.5.4 Sanger-Sequenzierung) durchgeführt werden, wurden die Primer mit dem Online Tool Primer3web Version 4.1.0 [86, 87] mit den Standardeinstellungen designt. Die Primer wurden mit der Software SNPCheck auf Einzelnukleotidpolymorphismen überprüft (siehe 6.2 [Int. 21]). Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) (siehe 6.2 [Int. 22]) wurde verwendet, um zu kontrollieren, dass die gewählten Primer nur an der gewünschten Stelle im Genom binden. Für einen einfachen Ansatz einer Standard-PCR wurden folgende Reagenzien gemischt:

Komponenten	Volumen [µl]
5x Puffer B*	23,0
Primer Forward (10 pmol)	1,0
Primer Reverse (10 pmol)	1,0
Platinum™ Taq DNA Polymerase (2 U/Reaktion)	0,2
	25,2
	+ 1-2 µl DNA

* 5x Puffer B: 4ml 10x Ammoniumpuffer#; je 80 µl 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1,76 ml 50 mM Magnesiumsulfat; 8 ml Enhancer; 19,2 ml dH₂O

10x Ammoniumpuffers: 75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8); 2,64 g Ammoniumsulfat; 100 µl 20 % Tween; auf 100 ml mit dH₂O auffüllen

Die DNA wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	30	
Annealing	64	30	3x
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	30	
Annealing	61	30	3x
Elongation	72	30	
Denaturierung	95	30	
Annealing	58	30	30x
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	300	
Pause	10	∞	

8 µl der PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um das Gelingen der PCR zu kontrollieren. Für ein gutes Sequenzierergebnis wurden die PCR-Produkte mit Exonuklease I (Exo) und Shrimp Alkaliner Phosphatase (SAP) enzymatisch aufgereinigt. Mit Exo wird einzelsträngige DNA verdaut. Mit SAP werden nicht eingebaute Nukleotide dephosphoryliert. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten gemischt und 15 min bei 37°C und 15 min bei 80°C inkubiert:

Komponenten	Volumen [µl]
PCR-Produkt	18,0
dH ₂ O	5,0
Exo (10U/µl)/SAP (2U/µl)	je 0,5

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der retrospektiven Studie das Gen *ZNRF3* mit Sanger-Sequenzierung analysiert. Von allen Tumor- und Blutproben wurden die kodierenden Regionen von *ZNRF3* – außer Exon 1 – wie beschrieben amplifiziert und enzymatisch aufbereitet. Die verwendeten PCR-Primer wurden bereits publiziert [82] und sind im Anhang (siehe 7.1 Tabelle 12) aufgelistet

Bisulfitkonvertierung und Polymerasekettenreaktion vor einer Pyrosequenzierung

Auch der Pyrosequenzierung geht eine Amplifikation der ausgewählten Regionen mit einer PCR voraus. Da die Information der Methylierung eines Cytosins im Kontext eines CpG-Dinukleotids bei einer standardmäßigen PCR allerdings verloren geht, wurde vor der Amplifikation eine Bisulfitkonvertierung der DNA durchgeführt. Bei der Bisulfitkonvertierung wird unmethyliertes Cytosin sehr zügig in Uracil umgewandelt; 5-Methylcytosin dagegen nur sehr schleppend [88]. Das Prinzip dieser Reaktion wurde im Januar beziehungsweise Februar des Jahres 1970 von zwei Gruppen, unabhängig voneinander, veröffentlicht [88, 89]. 1992 wurde erstmals publiziert, wie man die Bisulfitkonvertierung nutzen kann, um methylierte und unmethylierte Cytosine voneinander zu unterscheiden [90].

Für die Bisulfitkonvertierung wurde das EpiTect®Fast DNA Bisulfite Kit (50) beziehungsweise das EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Kit (beide von Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 500 ng genomischer DNA (siehe 6.2 [Int. 23] beziehungsweise [Int. 24]).

Da nach der Bisulfitkonvertierung alle unmethylierten Cytosine in Uracil umgewandelt sind (siehe Abbildung 5), musste für das Design der Primer die Software PyroMark Assay Design von Qiagen verwendet werden, mit dem die ursprüngliche Referenzsequenz *in silico* in eine bisulfitkonvertierte Sequenz umgewandelt werden kann. Für das Design der Primer für die

PCR und automatisch auch für die Sequenzierung wurden folgende Einstellungen – im Vergleich zu den Standardeinstellungen – verändert:

- Optimale Amplikonlänge: 50-200 Nukleotide
- Primer durften NICHT über variablen Positionen liegen (= potentiell methylierte CpGs)

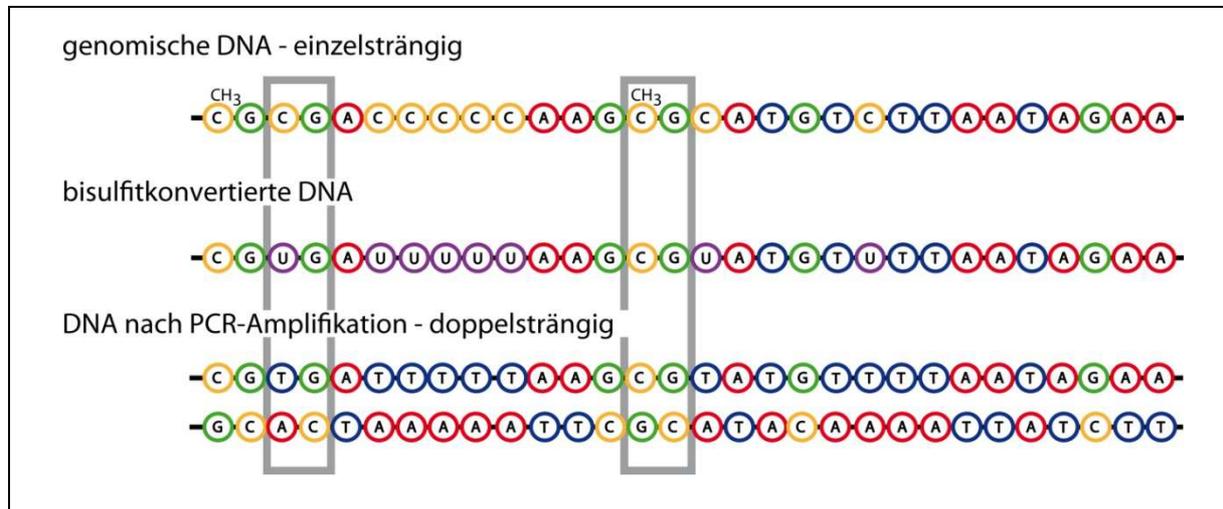


Abbildung 5: Veränderungen in der DNA-Sequenz durch die Bisulfidkonvertierung.

Bei der Bisulfidkonvertierung werden unmethylierte Cytosine (C) in Uracil (U) umgewandelt und liegen nach einer Amplifikation mittels PCR als Thymin (T) vor. Methyliertes Cytosin bleibt nach der Bisulfidkonvertierung als Cytosin erhalten, jedoch ohne die angehängte Methylgruppe (CH₃ über ytosin). Grau umrandet sind zwei CpGs, eines mit methyliertem Cytosin und ein unmethyliertes Cytosin.

Abkürzungen: A = Adenin; C = Cytosin; DNA = Desoxyribonukleinsäure; G = Guanin; PCR = Polymerasekettenreaktion; T = Thymin; U = Uracil

Um zu überprüfen, ob die Primer nur an der gewünschten Stelle im Genom binden, wurde das online-Tool BiSearch (siehe 6.2 [Int. 25]) verwendet.

Der komplementäre Primer zu dem Strang, der pyrosequenziert werden sollte, musste biotinyliert bestellt werden. Für einen einfachen Ansatz einer PCR vor der Pyrosequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Komponenten	Volumen [µl]
10x PCR-Puffer Fast Start Taq DNA Polymerase	3,75
PCR Grade Nucleotide Mix	0,75
Primer Forward (10pmol)	1,5
Primer Reverse (10pmol)	1,5
Fast Start Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,3
dH ₂ O	25,7
	33,5
	+ 1-2 µl bisulfidkonvertierte DNA

Die DNA wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	30	
Annealing	*	30	45x
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	350	
Pause	10	∞	

*Annealingtemperatur: *GSTP1*: 60°C/ *PAX5*: 58°C/ *PAX6*: 59°C/ *PYCARD*: 58°C

Für diese Arbeit – sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Studie – wurden Teile der CpG-Inseln von *GSTP1*, *PAX5* und *PAX6* und *PYCARD* auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Daher wurde die DNA aller Tumor- und Blutproben, die im Rahmen der Arbeit analysiert wurden, bisulfidkonvertiert und wie oben angegeben amplifiziert. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (siehe 7.1 Tabelle 13) und wurden bereits publiziert [82]. Die Assays wurden so designt, dass mit den amplifizierten Regionen möglichst auch die bei Jouinot et al. untersuchten CpGs (über MS-MLPA) abgedeckt waren [72].

2.5.4 Sequenzierungen

Sequenzierungen im Allgemeinen dienen der Bestimmung von Reihenfolgen, in dieser Arbeit immer der Bestimmung der Basenabfolgen von DNA, wobei sich sowohl die Methoden unterscheiden als auch die Resultate, die man daraus ablesen kann. Nachfolgend werden die Sequenziermethoden erläutert, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen und Inkubationsschritte in einem T3 oder T Professional Basic Gradient Thermocycler von Biometra durchgeführt.

Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung – benannt nach Frederick Sanger, der diese Methode mit entwickelte- basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode [91].

In dieser Arbeit wurde in der retrospektiven Studie von allen Proben *ZNRF3* mit der Sanger-Sequenzierung analysiert.

Pro enzymatisch behandeltem PCR-Produkt (siehe 2.5.3 Polymerasekettenreaktion vor einer Sanger-Sequenzierung) wurden zwei getrennte Ansätze für die Sequenzierung vorbereitet, jeweils ein Ansatz für den forward-Strang beziehungsweise für den reverse-Strang. Für einen einfachen Ansatz wurden folgende Reagenzien gemischt:

Komponenten	Volumen [µl]
dH ₂ O	4,0
5x Sequenzierpuffer	2,0
Big Dye™ Terminator	0,5
Primer (10pmol; F oder R)	0,5
	6,0
	+ 4 µl enzymatisch behandeltes PCR-Produkt

Das Cycle Sequencing wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	120	
Denaturierung	96	20	25x
Annealing	58	20	
Elongation	60	180	
Finale Elongation	60	180	
Pause	10	∞	

Nach der Fällung mit Natriumacetat und Ethanol wurden die Proben in Formamid resuspendiert und mit einem Sequenziergerät von Applied Biosystems (ABI3130xl oder ABI3730 Genetic Analyzer) sequenziert.

Pyrosequenzierung

Um den Methylierungsstatus von Genen zu ermitteln, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Pyrosequenzierung gewählt. Die Methode wurde ursprünglich erfunden, um Basenaustausche ohne Gelelektrophorese und Gebrauch von radioaktiven Materialien zu detektieren [92]. Die Pyrosequenzierung für Methylierungsanalysen erlaubt die Untersuchung mehrerer CpGs pro Ansatz (auch als Assay bezeichnet) und ist als die sensitivste und genaueste Methode beschrieben, um dabei den Methylierungsstatus jedes einzelnen CpGs zu bestimmen [93]. Zudem können damit die Ergebnisse von Proben, deren DNA aus unterschiedlichen Materialien isoliert wurde, wie es in dieser Arbeit für Tumor-DNA aus FFPE-Gewebe und DNA aus Vollblut der Fall ist, direkt verglichen werden. Die Ergebnisse müssen nicht gegen Kontrollen normalisiert werden, wie es zum Beispiel bei der MS-MLPA der Fall ist.

Die Primer für die Sequenzierungen von *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* wurden so gewählt, dass damit möglichst auch die CpGs analysiert werden konnten, die mit der MS-MLPA von MRC-Holland untersucht werden (siehe 6.2 [Int. 26]), die von Jouinot et al verwendet wurden [72]. Die Sequenzierprimer wurden zusammen mit den PCR-Primern (siehe 2.5.3 Bisulfidkonvertierung und Polymerasekettenreaktion vor einer Pyrosequenzierung) designiert. Im Anhang befindet sich eine Abbildung zur Lage der Sequenzierprimer im Vergleich zur Lage der Sonden für die MS-MLPA (siehe 7.2 Abbildung 38) und eine Tabelle mit den Sequenzen der Primer und der Anzahl der CpGs, die mit den jeweiligen Assays analysiert

werden können (siehe 7.1 Tabelle 13). Sowohl die Abbildung als auch die Primersequenzen wurden bereits publiziert [82].

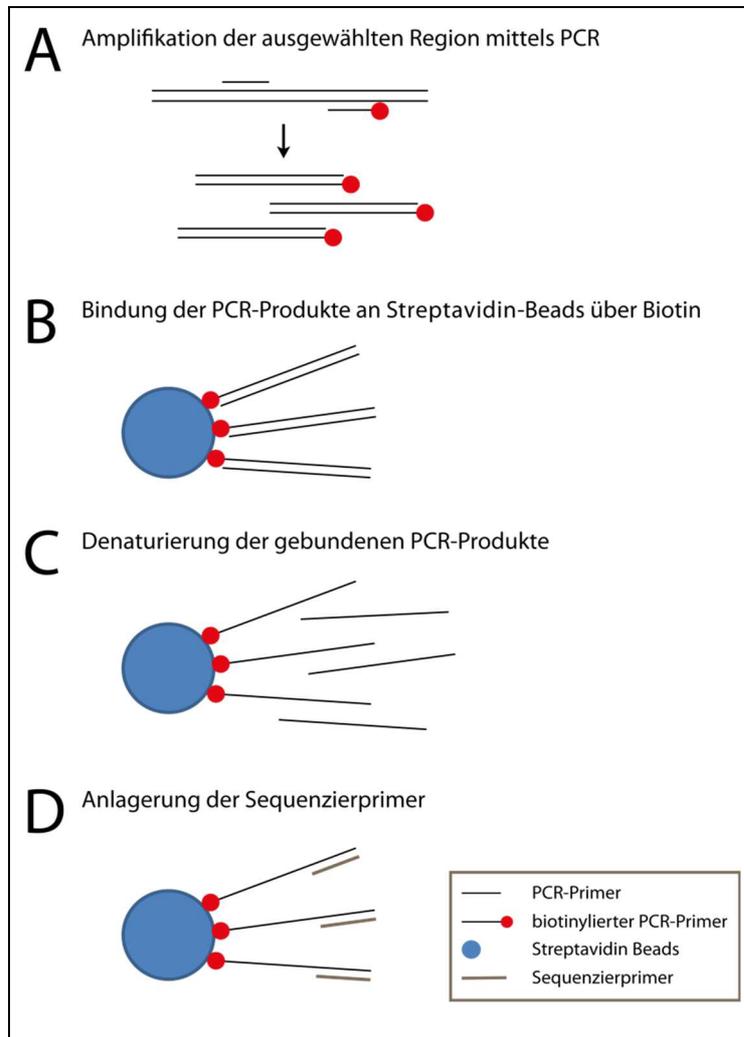


Abbildung 6: Vorbereitung auf die Pyrosequenzierung.

Durch Verwendung eines biotinylierten Primers bei der PCR sind alle PCR-Produkte mit Biotin markiert (A) und können an Streptavidin-Beads binden (B). Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA bleibt nur der Strang an den Streptavidin-Beads gebunden, der biotinyliert ist (C). An diesen Strang, der pyrosequenziert werden soll, werden die Sequenzierprimer angelagert (D).

Abkürzungen: PCR = Polymerasekettenreaktion

Als Vorbereitung auf die Pyrosequenzierung wurden die PCR-Produkte an Streptavidin Sepharose-Beads gebunden und mit der PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen) mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 0,2 M (molarem) Natriumhydroxid denaturiert, mit 0,01 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan gewaschen und in die Platte mit den vorgelegten Sequenzierprimern überführt, die sich an die denaturierten PCR-Produkte anlagern. Eine schematische Darstellung dieses Ablaufs ist in Abbildung 6 zu sehen. Die genaue Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (siehe 6.2 [Int. 27]).

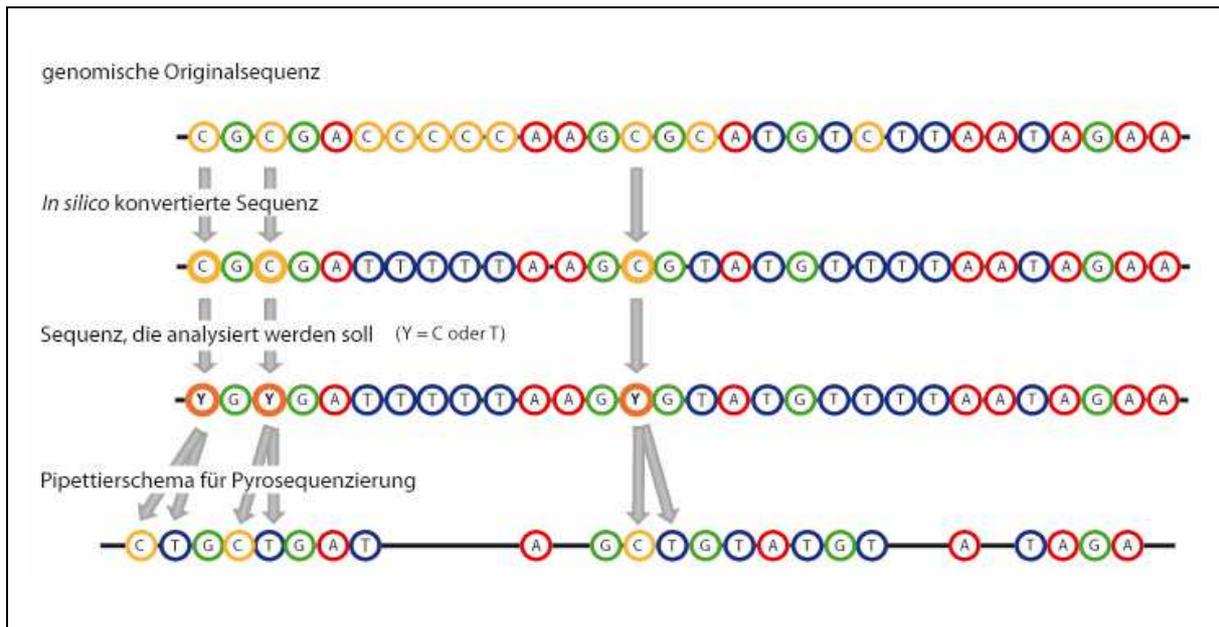


Abbildung 7: Erstellung des Pipettierschemas für die Pyrosequenzierung.

Die genomische Originalsequenz lässt sich *in silico* in eine bisulfitkonvertierte Sequenz umwandeln, wobei alle Cytosine (C) im Kontext eines CpGs als methyliert angesehen werden und somit unverändert bleiben. Cytosine ohne nachfolgendes Guanin (G) werden in Thymin (T) umgewandelt. Erst bei Generierung der zu analysierenden Sequenz wird wieder berücksichtigt, dass CpGs auch unmethyliert sein können und deswegen nach Bisulfitkonvertierung und PCR als T vorliegen würden. Diese Information wird in einem Zwischenschritt über das Y weitergegeben, das anzeigt, dass an der entsprechenden Position ein C oder ein T sein kann. Im Pipettierschema für die Pyrosequenzierung wird die Kodierung aufgelöst (Y → C und T) und Stretches – also mehrere gleiche Basen hintereinander – werden zusammengefasst.

Die eigentliche Sequenzierung erfolgte mit einem PyroMark MD von Biotage AB (Uppsala, Schweden) durch Sequenzierung durch Synthese (SBS, engl. Sequencing-by-Synthesis). Bei dieser Art der Sequenzierung wird der DNA-Strang verlängert und gleichzeitig detektiert, welches Nukleotid eingebaut wurde beziehungsweise dass ein Nukleotid eingebaut wurde. Im Fall der Pyrosequenzierung wurde vor der Sequenzierung ein Pipettierschema erstellt, durch das vorgegeben ist, welche Nukleotide zugegeben werden. Die wichtige Information, die detektiert wird, ist ein Lichtsignal, sofern ein Nukleotid eingebaut wurde. In Abbildung 7 ist schematisch dargestellt, wie mit den Programmen PyroMark Assay Design 2.0 und Pyro Q-CpG 1.0.9 (Biotage) von der genomischen Originalsequenz über *in silico* konvertierte Sequenzen ein Pipettierschema für die Pyrosequenzierung erstellt wird.

Der eigentliche Ablauf einer Pyrosequenzierung ist in Abbildung 8 vom Prinzip her dargestellt. Die Einstellungen, die am Sequenziergerät vorzunehmen sind und die Vorbereitungen, die für die eigentliche Sequenzierung zu treffen sind, wurden entsprechend den Vorgaben aus dem PyroMark® Q96 MD User Manual von Qiagen (siehe 6.2 [Int. 28]) durchgeführt.

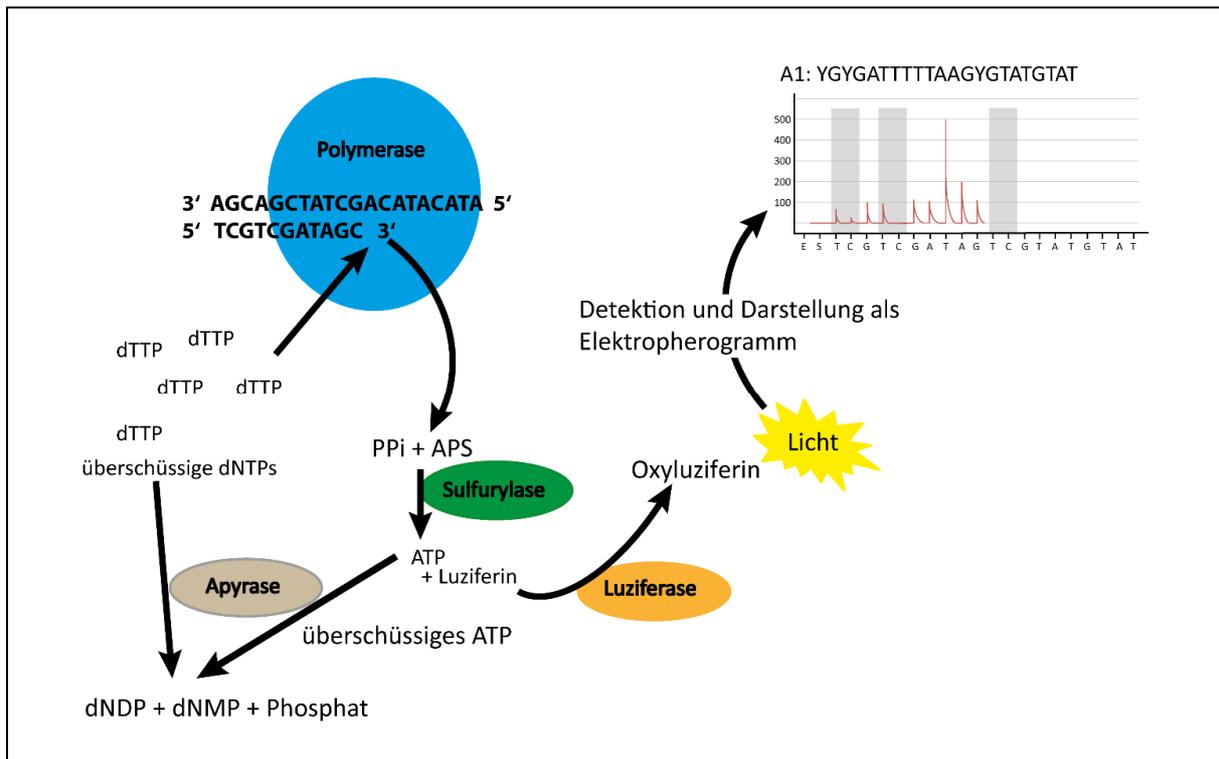


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs der Pyrosequenzierung.

Nachdem der Enzymmix aus Polymerase, Sulfurylase, Luziferase und Apyrase und die Substrate Adenosin-5'-phosphosulfat und Luziferin zugegeben wurden, werden nach einem vorgegebenen Pipettierschema dNTPs (in dieser Abbildung exemplarisch dTTPs) zur Reaktion gegeben. Wird ein Nukleotid durch die Polymerase eingebaut, wird PPi frei. PPi wird zusammen mit APS durch die Sulfurylase in ATP umgesetzt, welches wiederum zusammen mit Luziferin durch die Luziferase in Oxyluziferin umgewandelt wird. Das entstehende Lichtsignal wird detektiert und im Elektropherogramm dargestellt. Überschüssige dNTPs werden durch die Apyrase in dNDPs, dNMPs und Phosphat zerlegt. (in Anlehnung an Abbildung aus „PyroMark Gold Q96 Reagents Handbook“, siehe 6.2 [Int. 29]).

Abkürzungen: APS = Adenosin-5'-phosphosulfat; ATP = Adenosintriphosphat; dNDP = Desoxynukleosiddiphosphat; dNMP = Desoxynukleosidmonophosphat; dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate; dTTPs = Desoxythymidintriphosphate; PPi = Pyrophosphat

Für die Sequenzierung werden zuerst Substrate (Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Luziferin) und Enzyme (Apyrase, Polymerase, Sulfurylase und Luziferase) zur DNA dispensiert. Dann folgen, nach dem bereits erwähnten Schema, sukzessive die Nukleotide (Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) beziehungsweise Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat). Wird ein Nukleotid durch die Polymerase eingebaut, wird Pyrophosphat (PPi) frei, das zusammen mit APS durch die Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt wird. ATP wiederum wird benötigt, um Luziferin durch die Luziferase in Oxyluziferin umzuwandeln, wodurch ein Lichtsignal frei wird. Das Lichtsignal ist direkt proportional zur Menge der eingebauten Nukleotide. Es wird von einer Kamera detektiert und graphisch in einem Elektropherogramm über die Software Pyro Q-CpG dargestellt. Die aufgezeichneten Peakhöhen sind direkt proportional zur Stärke des detektierten Fluoreszenzsignals. Nicht

eingebaute Nukleotide und überschüssiges ATP werden durch die Apyrase abgebaut. Ist dieser Prozess beendet, wird ein neues Nukleotid zugegeben und die Reaktion beginnt erneut. So wird sukzessive das vorgegebene Pipettierschema abgearbeitet. Nach Abschluss der Pyrosequenzierung berechnet das Programm zum einen, ob das detektierte Signal dem erwarteten Signal entspricht, zum anderen die mittlere Methylierung der CpGs.

Der Ablauf der Pyrosequenzierung wurde für die prospektive Studie unverändert von der retrospektiven Studie übernommen.

Next-Generation Sequencing – Retrospektive Studie

Die Proben der retrospektiven Studie wurden mit dem GeneRead DNaseq Human Comprehensive Cancer Panel V2 und dem GeneRead DNaseq Panel PCR Kit V2 (beide Qiagen) angereichert. Mit diesem Amplikon-basierten Kit können die kodierenden Sequenzen von 160 Genen untersucht werden, die in Zusammenhang mit Krebserkrankungen beschrieben sind. In Tabelle 6 sind alle angereicherten Gene aufgelistet. Die Gene sind Funktionen und Signalwegen zugeordnet. Die exprimierten Proteine können in mehreren Signalwegen eine Rolle spielen und wichtige Funktionen in der Zelle übernehmen, weswegen Mehrfachnennungen möglich sind.

Tabelle 6: Gene, die in der retro- bzw. der prospektiven Studie untersucht wurden.

Die Gene sind Signalwegen und Funktionen zugeordnet, in denen die von ihnen exprimierten Proteine eine Rolle spielen. Mehrfachnennungen sind möglich. Gene, die auch mit dem Custom-Panel der prospektiven Studie angereichert wurden, sind fett gedruckt. Gene, die nur mit dem Custom-Panel angereichert werden, sind am Ende der Tabelle aufgeführt. Die Quellenangaben verweisen auf Publikationen, in denen die Relevanz dieser Gene für NNR-Cas beschrieben ist.

	Gene
Onkogene	AR, CDK4, H3F3A, HIST1H3B, JAK1, JAK2, KIT, MAP2K1, MED12, MET, NFE2L2, NRAS, PIK3CA, SF3B1, SPOP, SRC, SRSF2, U2AF1
Tumorsuppressorgene	ARID2, ATM, ATRX, BAP1, BCOR, BRCA1, BRCA2, CDH1, CIC, DAXX, FUBP1, GATA3, KMT2D, MAP3K1, MEN1, MLH1, MLL2, NF1, NF2, PBRM1, PHF6, PRDM1, SMAD4, STK11, TP53, TSC1, VHL, WT1
Signaltransduktion (verschiedene Signalwege zum Beispiel Wnt-/ MAPK-/ Hedgehog-Signalwege)	AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, CBL, CCND1, CSF1R, CTNNB1, CYLD, DDR2, ECT2L, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FAM123B, FBXW7, FGFR2, FGFR3, FLT3, GATA2, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, JAK2, KDR, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP3K1, MAP4K3, MED12, NF1, NOTCH1, NOTCH2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PPP2R1A, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, PTPN11, RET, ROS1, SMAD4, SMO, SRC, SUFU, TSC2, TSHR, VEGFR3
Apoptose	ABL1, APC, BCL6, BRAF, CBL, CTNNB1, CYLD, DAXX, FAS, FLT3, FOXL2, GATA1, HRAS, MAP2K4, NF1, NPM1, PTEN, RB1, STK11, TNFAIP3, VHL, WT1
Angiogenese	CTNNB1, ERBB2, FGFR2, GATA2, KDR, NF1, NOTCH1, PIK3CA, PTEN, TNFAIP3, VEGFR3, VHL

MATERIAL UND METHODEN

	Gene
Adhäsion	ABL1, APC, CDH1, CTNNA1, DDR2, EGFR, ERBB2, GATA1, JAK2, KDR, NF1, NF2, NOTCH1, PDGFRA, PTEN, PTPN11, RAC1, RET, SRC, VEGFR3
Zellzyklus	ABL1, AKT1, APC, BUB1B, CCND1, CDC73, CDK12, CDK4, CDKN2A, CDKN2B, CHEK2, CREBBP, CYLD, FBXW7, FGFR2, HRAS, MYC, NPM1, PTEN, RB1, SMARCA4, SMARCB1, STK11, TNFAIP3, TP53
DNA-Schäden und -Reparatur	ABL1, APC, ATM, ATRX, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CCND1, CHEK2, DDB2, EP300, ERCC5, FANCA, FANCD2, FANCE, MDM2, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NPM1, PALB2, PMS2, STK11, TP53, XPC
Epigenetik	ARID1A, ASXL1, ATRX, BCOR, DICER1, DNMT3A, EZH2, IKZF1, KDM6A, KMT2D, MLL2, PRDM1, SETD2, SMARCA4, SMARCB1, SPO1
Entzündungsreaktion	CEBPA, CSF1R, IL6ST, JAK2, MYD88, TNFAIP3
Immunantwort	ALK, BTK, CARD11, CBLB, CD79A, CD79B, CREBBP, CRLF2, CYLD, EP300, FAM46C, IL7R, JAK2, JAK3, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K1, MYD88, NFKBIA, PAX5, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, PTPN11, SOCS1, TNFAIP3, TNFRSF14, TP53
Hypoxie	CREBBP, EP300, NF1, SMAD4, VHL
Metabolismus	FH, IDH1, IDH2, MTOR, SDHB, SLC7A8
mRNA Spleißen	SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2
Ubiquitylierung	BAP1, BCOR, CBLB, DAXX, DDB2, FBXO11, MDM2
Antwort auf ungefaltete Proteine	CCND1, HSPH1, NFE2L2, NPM1
Andere Gene	EPCAM, FLCN, GPC3, GRIN2A, KLF6, PHOX2B, TERT, ZNF2
Gene nur im Custom-Panel:	ZNRF3 [54] CCNE1, FGFR4, RPL22, TERF2 [55] CDC27, KREMEN1, SCN7A, SDK1 [64]

Die Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung – die sogenannte Anreicherung – wurde entsprechend dem Handbuch von Qiagen (siehe 6.2 [Int. 30]) durchgeführt.

Für die Anreicherung wurden die DNAs, wie mit dem QuantiMIZE Assay Kit errechnet (siehe 2.5.2), auf 2,5 ng/µl verdünnt. Diese Verdünnungen wurden verwendet, um pro Probe, in 4 Ansätzen, insgesamt 7951 Amplikons zu vervielfältigen, was einer Zielregion von 744835 Basen entspricht. Auf die Multiplex-PCR folgte das Poolen der Ansätze und die Aufreinigung der gepoolten Proben. Danach wurde die Reparatur der Enden der PCR-Produkte und Anhängen eines Adenins (A) durchgeführt. An die A-Überhänge wurden Adapter mit Barcodes ligiert, die nach der Sequenzierung das Demultiplexen, das heißt die Zuordnung der einzelnen Reads zu den entsprechenden Ausgangsproben, ermöglichen. Es folgte ein weiterer Aufreinigungs- und Amplifikationsschritt, bis die endgültige Library aufgereinigt werden konnte.

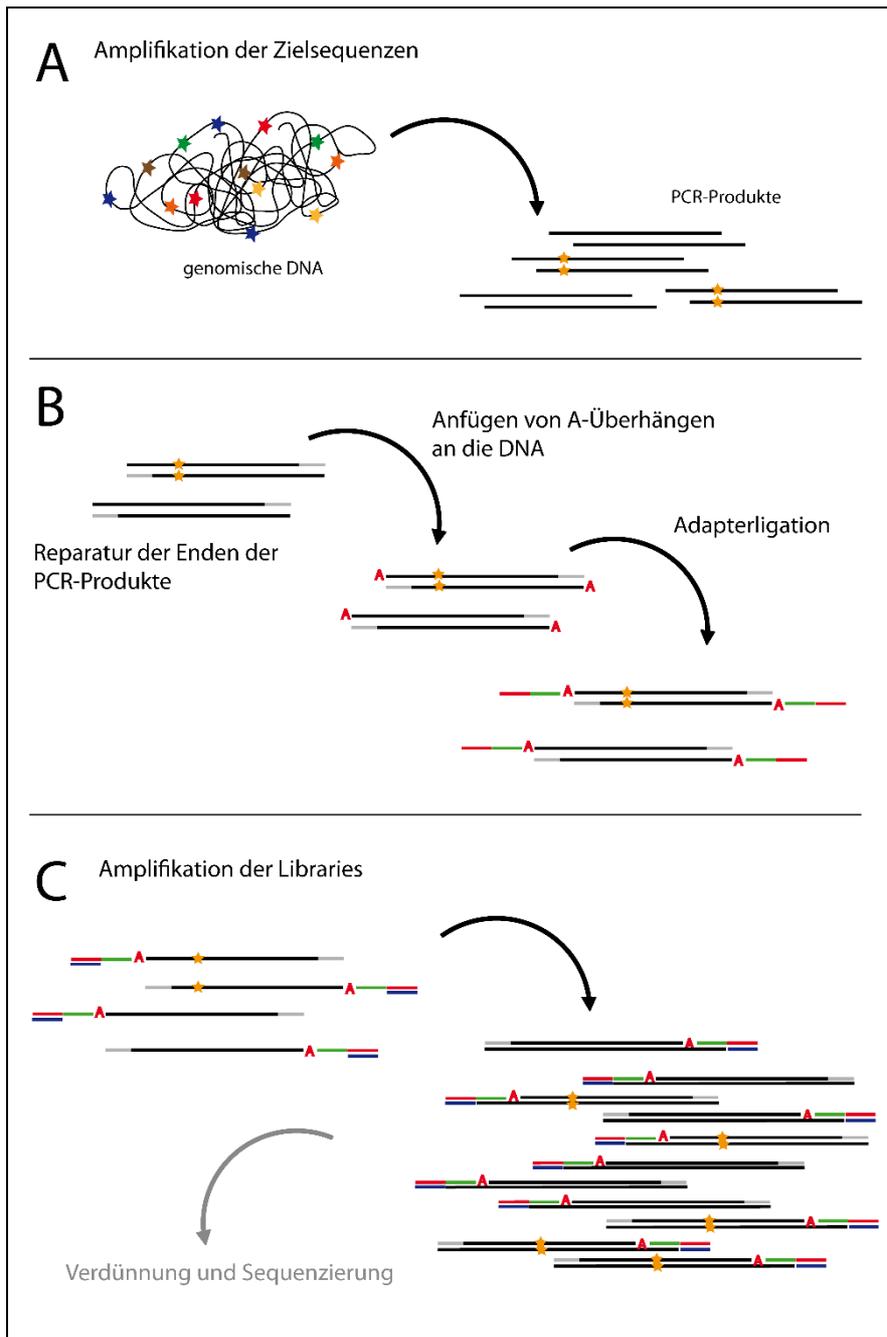


Abbildung 9: Ablauf der Anreicherung mit dem GeneRead DNA Seq Human Comprehensive Cancer Panel.

Nach Amplifikation der Zielsequenzen (A) werden die Enden der PCR-Produkte repariert, ein A-Überhang angehängt, über den wiederum Adapter ligiert werden, die nach der Sequenzierung auch der Identifikation der einzelnen Proben dienen (B). Vor der Sequenzierung werden alle Libraries noch einmal amplifiziert (C).

Jede einzelne Library wurde anschließend vermessen (siehe 2.5.2) und auf 4 nM verdünnt. Für einen Sequenzierlauf wurden durchschnittlich 20 Proben gemischt, denaturiert und auf eine finale Konzentration von 1,2 pM eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem NextSeq 500 von Illumina (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) unter Verwendung von NextSeq® 500/550 Mid Output Kits v2 (300 Zyklen) (Illumina).

In Ausnahmefällen wurden Proben auch auf dem MiSeq (Illumina) sequenziert. Dabei konnten nur zwei auf 8 pM verdünnte, Proben (jeweils zusammengehörige Blut- und Tumorprobe) auf ein MiSeq Reagent Kit v2 (300 Zyklen) aufgetragen und sequenziert werden. Eine

schematische Darstellung mit den wichtigsten Punkten der Anreicherung ist in Abbildung 9 zu finden.

Next-Generation Sequencing – Prospektive Studie

Die Proben der prospektiven Studie wurden mit einem selbst zusammengestellten QIAseq Targeted DNA Custom-Panel von Qiagen analysiert. Mit diesem Panel wurden die kodierenden Regionen von 100 Genen angereichert, die zum größten Teil auch schon im Human Comprehensive Cancer Panel enthalten waren und in denen in der retrospektiven Studie mindestens ein Einzelnukleotidaustausch oder eine kleine Insertion oder Deletion gefunden worden waren. Außerdem Gene, die nicht mit dem Human Comprehensive Cancer Panel angereichert worden waren, die aber bereits im Zusammenhang mit NNR-Ca beschrieben wurden, zum Beispiel *ZNRF3* [54]. Insgesamt wurden mit dem Custom-Panel die kodierenden Regionen von 100 Genen über 4752 Amplikons angereichert, was 350929 Basenpaaren entspricht. Die mit dem Custom-Panel angereicherten Gene sind ebenfalls in Tabelle 6 zu finden. Sie sind fett gedruckt beziehungsweise zusätzlich am Ende der Tabelle aufgelistet.

Auch die Durchführung der QIAseq-Anreicherung wird im Folgenden nicht im Detail beschreiben, da dabei vorgegangen wurde, wie es im Handbuch von Qiagen vorgegeben ist (siehe 6.2 [Int. 31]).

Anhand der Ergebnisse der Messungen mit dem QIAseq QuantiMIZE Assay Kit von Qiagen (siehe 2.5.2) wurden die Proben verdünnt. Anschließend wurden sie fragmentiert, die Enden repariert und eine A-Addition durchgeführt. An die überhängenden Adenine wurden im nächsten Schritt Adapter ligiert, die aus einer 12 bp-langen „einzigartigen“ Sequenz (UMI, engl. Unique Molecular Index oder Identifier), einer 8 bp-langen Sequenz eines Probenindex und einer Sequenz, an die ein universeller Primer binden kann, bestehen. Mit einer Kombination aus spezifischen Primern und Universalprimern wurden anschließend die Zielregionen amplifiziert. Nach einer Aufreinigung wurden in einer abschließenden universellen PCR die Proben noch einmal amplifiziert, dadurch Adaptersequenzen für die Sequenzierung an die PCR-Produkte gehängt und jede Probe mit Indices noch einmal individuell markiert. Über die zwei probenspezifischen Indices können die Ergebnisse nach der Sequenzierung eindeutig zugeordnet werden. Jede einzelne Library wurde anschließend vermessen (siehe 2.5.2) und auf 1 – 4 nM verdünnt. Für einen Sequenzierlauf wurden hier ebenfalls durchschnittlich 20 Proben gemischt, denaturiert und auf eine finale Konzentration von 1,2 pM eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem NextSeq 500 von Illumina unter Verwendung von NextSeq® 500/550 Mid Output Kits v2 (300 Zyklen) (Illumina). Eine schematische Darstellung mit den wichtigsten Punkten der Anreicherung ist in Abbildung 10 zu finden.

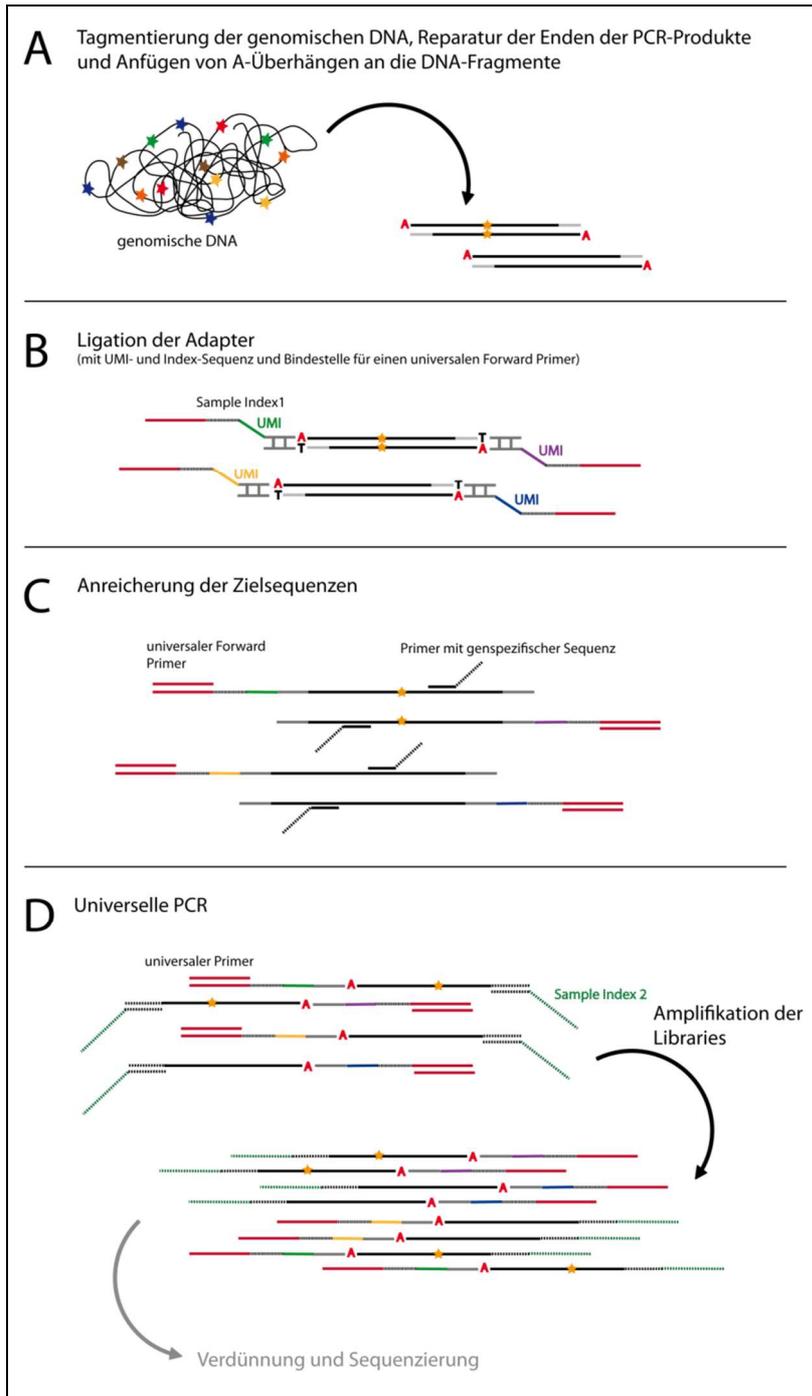


Abbildung 10: Ablauf der Anreicherung mit dem QIaseq Targeted DNA Custom-Panel.

Die DNAs werden zunächst tagmentiert, die Enden der Fragmente repariert und A-Überhänge angefügt (A). Über die A-Überhänge erfolgt die Ligation der Adapter, die aus einer einzigartigen Sequenz (UMI in grün, gelb, lila oder blau) als Markierung für ein Ausgangstemplate, einer probenspezifischen Sequenz (Sample Index 1, schwarz) und einer universalen Primerbindestelle (rot) bestehen (B). Die Zielsequenzen werden unter Verwendung eines universalen Primers und eines genspezifischen Primers, der neben der spezifischen Sequenz (schwarz) auch eine universelle Primerbindesequenz (grau) enthält, amplifiziert (C). In einer abschließenden universalen PCR werden die Libraries mit einem universalen Primer (rot) und einem Primer, der eine zweite probenspezifische Sequenz (Sample Index 2) enthält, amplifiziert (D). (Abbildung in Anlehnung an Handbuch (siehe 6.2 [Int. 31]))

Abkürzungen: UMI = Unique Molecular Identifier

2.5.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Überprüfung von Kopienzahlveränderungen (im Speziellen *CDK4*-Amplifikationen), wurden Färbungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in der Zytogenetik des Instituts für Humangenetik von Dr. rer. nat. Indrajit Nanda durchgeführt. Dafür wurden 2 µm dicke FFPE-Schnitten der Tumorproben, die in der Endokrinologie angefertigt worden waren, mit der ZytoLight®SPEC *CDK4/CEN 12* Dual Color Probe von ZytoVision (Bremerhaven, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers gefärbt (siehe 6.2 [Int. 32]). Dieses Kit enthält Sonden, die an *CDK4* beziehungsweise an eine Region am Zentromer von Chromosom 12 (CEN12) binden.

Die gefärbten FFPE-Schnitte stammten von Tumoren, die sequenziert worden waren und von denen Daten zu den Kopienzahlveränderungen vorlagen. Für die Färbungen wurden zwei Tumorproben gewählt, bei denen keine Amplifikation von *CDK4* gefunden worden war, außerdem zwei Proben, bei denen mit der CNA-Analyse eine heterozygote Amplifikation von *CDK4* gefunden wurde und weiterhin zwei Proben, bei denen vier oder mehr Kopien von *CDK4* vorlagen.

Für die Analyse wurden pro Probe die Fluoreszenzsignale von 200 Zellen ausgezählt. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, die nicht überlappten, eine klare Abgrenzung des Zellkerns zeigten und bei denen die Hybridisierungssignale deutlich waren. Es wurden die Signale beider Sonden ausgezählt.

2.6 Auswertung der Sequenzierdaten

Die Sequenzierdaten der Sanger-Sequenzierung, der Pyrosequenzierung und des Next-Generation Sequencing wurden mit unterschiedlichen Programmen ausgewertet. Diese werden unter den jeweiligen Unterpunkten erläutert.

2.6.1 Daten der Sanger-Sequenzierungen

Die Daten der Sanger-Sequenzierungen von *ZNRF3* wurden mit dem Programm Gensearch von PhenoSystems® (Braine le Chateau, Belgien) ausgewertet. Dafür wurden die Sequenzierdaten gegen die Referenzsequenz von *ZNRF3* aligniert und die kodierenden Bereiche, außer Exon 1, von *ZNRF3* +/- 20 bp der umgebenden intronischen Bereiche auf Varianten hin untersucht. Für das Projekt waren nur somatische Varianten relevant. Alle Keimbahnvarianten wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Von synonymen und intronischen Varianten wurde der Einfluss auf das Spleißen mit den Spleißstellenvorhersageprogrammen GeneSplicer [94], MaxEntScan [95], NNSplice [96] und

SpliceSiteFinder-like [97, 98] analysiert. Synonyme und intronische Varianten ohne vorhergesagten Einfluss auf das Spleißen wurden nicht für die Suche nach prognostischen Markern verwendet.

Alle Varianten, die in die endgültigen Auswertungen aufgenommen wurden, wurden dahingehend überprüft, ob Informationen in Datenbanken (COSMIC [99], ClinVar [100], cBioPortal [101, 102]) zu finden waren.

2.6.2 Daten der Pyrosequenzierungen

Die Daten der Pyrosequenzierung wurden mit dem Programm Pyro-Q-CpG (Qiagen) ausgewertet. So wurde der Anteil methylierter Cytosine pro CpG und damit die mittlere Methylierung aller analysierten CpGs eines Assays berechnet. Mit den Methylierungswerten aller Assays von allen Genen wurde eine mittlere Methylierung für jede Probe berechnet und so bestimmt, ob sie hypo- oder hypermethyliert ist, die mittlere Methylierung also $\leq 25\%$ oder $> 25\%$ ist. Wie viele CpGs pro Gen mit wie vielen Assays analysiert wurden, ist in Tabelle 13 aufgelistet.

2.6.3 Next-Generation Sequencing-Daten

Die Auswertung der NGS-Daten wurde für beide Studien mit GensearchNGS von PhenoSystems® durchgeführt. Dafür wurden die Rohdaten entsprechend der angehängten Identifier sortiert und mit dem GensearchNGS Aligner gegen das Referenzgenom GRCh37 (Genome Reference Consortium human genome (build 37)) aligniert. Die alignierten Sequenzen wurden auf Varianten hin gescannt, die in der Region von Interesse (ROI, engl. Region of Interest), also in den kodierenden Regionen und umliegenden Bereichen der 160 beziehungsweise 100 Gene der Panels, lagen. Weiterhin sollten die Varianten eine Frequenz über 1 % haben und die Bereiche mindestens 10-fach abgedeckt sein. Es wurde für die alignierten Sequenzen außerdem eine Analyse der Abdeckung durchgeführt.

Das weitere Vorgehen bei der Auswertung der somatischen Varianten wird in den folgenden Abschnitten jeweils für SNVs und kleine Indels, CNAs und chromosomale Signaturen erläutert.

Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen

Für die Auswertung der SNVs und kleinen Indels wurde das Compare Variants Tool von GensearchNGS verwendet. Mit dieser Anwendung ist es möglich, die Variantenlisten mehrerer Proben zu vergleichen und gezielt Varianten zu filtern. Da für die Fragestellung der Arbeit nur die somatischen Varianten im Tumor relevant waren, wurden die Einstellungen so gewählt, dass nur die Varianten gelistet wurden, die nicht in der Blutprobe des jeweiligen Patienten zu

finden waren. Außerdem wurden folgende Filter gesetzt, um häufige Varianten in der Bevölkerung und Artefakte auszuschließen:

- Abdeckung > 100
- Frequenz der Variante (in der untersuchten Probe) > 10 %
- Distanz zum Exon < +/- 21 bp
- Frequenz des selteneren Allels in der Bevölkerung (MAF, engl. Minor Allele Frequency) < 2 % (Daten von Ensembl [103] und gnomAD [104])
- Variantenbalance > 0.2

Abbildung 11 zeigt den Variantenvergleich schematisch.

Mit den detektierten und als real befundenen Veränderungen wurde vorgegangen, wie bereits für die Daten der Sanger-Sequenzierung beschrieben. Es wurde also der Einfluss auf das Spleißen beurteilt und eine Datenbankabfrage durchgeführt (siehe 2.6.1). Außerdem wurde ihre Targetierbarkeit mit OncoKB [105] überprüft.

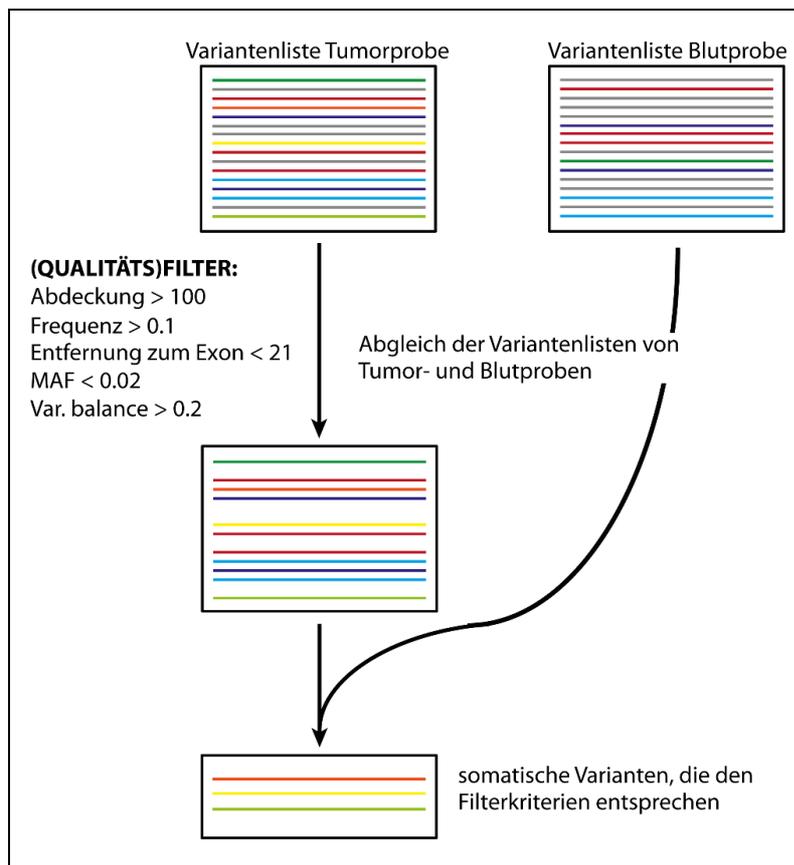


Abbildung 11: Variantenvergleich zum Filtern von somatischen SNVs und kleinen Indels.

Die Variantenlisten der Tumor- und der Blutprobe – jede farbige Linie steht für eine Variante – liegen vor und werden, nachdem die Varianten der Tumorprobe mit verschiedenen Parametern vorgefiltert wurden, miteinander verglichen. Die finale Liste am Ende enthält Varianten, die den Filterkriterien entsprechen und nur in der Tumorprobe detektiert wurden.

Abkürzungen: MAF = Minor Allele Frequency; Var = Variante

Die beschriebene Vorgehensweise zur Variantendetektion wurde nach diesem Prinzip in der retrospektiven und der prospektiven Studie durchgeführt.

Berechnung der Mutationslast der Tumoren

Mit den Daten der Auswertung der Einzelnukleotidaustausche und der kleinen Indels wurden auch die TMBs der NNR-Cas errechnet. Für die Berechnung wurden alle SNVs – auch alle synonymen und intronischen Varianten – und kleinen Indels berücksichtigt und in Bezug zu der Anzahl an Basen gesetzt, die mit dem Human Comprehensive Cancer Panel und *ZNRF3* (0,745 Mb) beziehungsweise dem Custom-Panel (0,351 Mb) angereichert wurden. Die Mutationslast wird in Varianten/Mb angegeben.

Somatische Kopienzahlveränderungen

Anhand der NGS-Daten wurden außerdem Kopienzahlveränderungen untersucht. Diese werden als ein Stück DNA definiert, das 1 Kilobase (Kb) und größer ist und im Vergleich zu einem Referenzgenom in veränderter Kopienzahl – also amplifiziert oder deletiert - vorliegt [106]. In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff immer auf ein komplettes Gen, wobei zu beachten ist, dass mit dem beschriebenen Ansatz der Sequenzierung eigentlich nur eine Aussage über die kodierenden Bereiche eines Gens getroffen werden kann.

Da die Anreicherung Amplikon-basiert durchgeführt wurde, könnten PCR-Artefakte die Ergebnisse verfälschen. Um die Abdeckung zweier Proben miteinander vergleichen zu können, wird außerdem ein Normalisierungsschritt auf die Gesamtzahl der alignierten Reads durchgeführt. Der Schritt der Normalisierung kann vor allem bei Proben, die aus verschiedenen Ausgangsmaterialien gewonnen wurden, problematisch sein, wenn die DNAs deutliche Qualitätsunterschiede aufweisen. Deswegen wurden zwei unabhängige CNA-Analysen durchgeführt und die Ergebnisse abgeglichen.

Die Blutprobe wurde bei beiden Analysen als normale Referenz verwendet und die zugehörige Tumorprobe damit verglichen. Es wurden jeweils nur die Gene analysiert, die von mindestens sechs Regionen abgedeckt waren. Im Anhang (siehe 7.1 Tabelle 14) sind alle angereicherten Gene aufgelistet. Dieser Tabelle ist auch die Anzahl der Regionen zu entnehmen, die abgedeckt waren. Gene, die aufgrund zu weniger Regionen nicht mit analysiert wurden, sind grau gedruckt.

Analysiert wurden Amplifikationen, also der Zugewinn der Kopienzahl einer Region, und Deletionen, also der Verlust einer Region.

Eine Auswertung der Kopienzahlveränderungen wurde mit dem CNA Analysis Tool von GensearchNGS durchgeführt. Ergebnis dieser Analyse ist der FoldChange (FC), der das Verhältnis der Abdeckung einer bestimmten Region bei Blut und Tumor angibt. Ist die Abdeckung beider Proben an einer Stelle gleich, ist der FC 1. Ist der FC einer Region $\geq 1,25$, wird sie als amplifiziert eingeordnet, wobei mit dem Programm GensearchNGS zwischen heterozygot dupliziert ($1,25 \leq FC < 1,75$) und homozygot dupliziert ($FC > 1,75$) differenziert

werden kann. Ebenso werden Regionen mit einem $FC \leq 0,75$ als deletiert bezeichnet. Auch die Deletionen werden in heterozygot ($0,75 \geq FC > 0,25$) und homozygot ($FC \leq 0,25$) unterteilt. Für die Auswertung wurden nur Gene als deletiert oder dupliziert angesehen, wenn alle Regionen entweder deletiert oder dupliziert waren.

Die alternative Auswertung zur Absicherung der Ergebnisse wurde von Dr. Silke Appenzeller (CCC Mainfranken, Core Unit Bioinformatik) durchgeführt. Dafür wurden die Rohdaten der Sequenzierung einem Qualitätstest mit FastQC v0.11.3 (siehe 6.2 [Int. 33]) unterzogen und mit TrimGalore v0.4.0 (siehe 6.2 [Int. 34]) unter zusätzlicher Verwendung von Cutadapt v1.8 (siehe 6.2 [Int. 35]) die Adapter und Reads mit schlechter Qualität entfernt. Die Sequenzen wurden mit dem BWA-MEM Aligner v0.7.12 [107] gegen UCSC hg19 (University of California Santa Clara human genome 19 \cong GRCh37) mit den Standardeinstellungen nach Fujita et al. [108] aligniert. BAM (Binary Alignment Map)-Files wurden mit der Software Picard v1.125 (siehe 6.2 [Int. 36]) generiert. Zur Analyse der CNAs wurde die Abdeckung jedes Amplikons mit dem multiBamCov-Tool im BEDTools suite, v2.26.0 [109] verwendet. Es wurden nur die Marker berücksichtigt, die in den Kontrollproben mindestens 200-fach abgedeckt waren. Die Ergebnisse jeder Probe wurden normalisiert, indem die Abdeckung jedes Amplikons durch die Gesamtzahl an Reads pro Probe geteilt wurde. Auch in dieser Auswertung wurde eine Tumorprobe mit der zugehörigen Blutprobe verglichen und in diesem Fall der Log_2FC errechnet. Waren mindestens 80 % der Marker, die ein Gen abdecken, mindestens 1,5-fach amplifiziert oder deletiert, wurde das Gen als amplifiziert beziehungsweise deletiert eingestuft. Es wurden nur die Gene als deletiert oder amplifiziert eingestuft, die in beiden Auswertungsansätzen deletiert oder amplifiziert waren. Gene, auf die das nicht zutraf, wurden als „normal“ eingestuft.

Die Auswertung der CNAs wurde in der prospektiven und der retrospektiven Studie gleich durchgeführt.

Chromosomale Signaturen

Mit beiden Auswertepipelines für die CNA-Analyse konnte man einen Gesamtüberblick über alle angereicherten und analysierten Regionen erhalten. Diese Darstellungen der Daten wurden dazu verwendet, um die Patienten den drei chromosomalen Signaturen quiet, chromosomal und noisy zuzuordnen. Die ursprüngliche Einordnung in die drei Gruppen basiert auf Daten von SNP-Arrays [55], weswegen die Kriterien für die Panel-Sequenzierungen modifiziert wurden. Tumorproben wurden dem chromosomalen Typ zugeordnet, wenn mindestens drei große Regionen – also ganze Chromosomen oder Chromosomenarme – deletiert oder amplifiziert waren. Wenn weniger als drei Regionen von Deletionen oder Amplifikationen betroffen waren, wurden die Proben als quiet eingestuft. Erschien der

Gesamtüberblick unruhig mit vielen kleineren amplifizierten und/oder deletierten Regionen, wurden die Tumoren als noisy klassifiziert. Beispiele für die drei Signaturen, jeweils für einen Patienten von beiden Auswerteprogrammen, sind in Abbildung 12 dargestellt. Jeder Punkt steht für eine angereicherte Region eines Gens. Die rote Linie in der Mitte ist die Nulllinie. Liegen Punkte dort, wurde keine Veränderung der Abdeckung bei der Tumorprobe im Vergleich zur Blutprobe detektiert. Abweichungen nach oben stellen die Amplifikation einer Region dar, Abweichungen nach unten den Verlust.

Bei der Auswertung und Darstellung mit GensearchNGS (Abbildung 12 B) wird die ungefähre Lage der Gene auf dem Chromosom dargestellt. Die Veränderungen der Kopienzahl einer Region werden in Prozent angegeben. Die blaue Linie stellt den Mittelwert der Differenzen aller angereicherten Regionen pro Chromosom dar. Bei der alternativen Auswertung (Abbildung 12 A) sind die amplifizierten Gene ohne die eigentlich vorhandenen Abstände dargestellt. Es entsteht der Eindruck eines Genoms, der jedoch artifiziell ist. Die Teilbereiche, die die Chromosomen einnehmen, korrelieren mit der Menge an Genen und zugehörigen Amplikons, die auf dem jeweiligen Chromosom untersucht wurden, nicht aber mit der wahren Größe des Chromosoms. Angegeben wird der Log_2FC der Veränderungen.

Beim Quiet-Typ weichen die Werte der normalisierten Reads insgesamt kaum vom Wert 0 ab. Es liegen keine beziehungsweise nur wenige Veränderungen vor. Beim chromosomalen Typ erstrecken sich Veränderungen über größere Bereiche auf mehreren Chromosomen oder betreffen das komplette Chromosom (in diesem Beispiel Amplifikationen von/auf Chromosom 5 und 12 und Verluste auf Chromosom 6, 10, 13, 17 und 22). Der Noisy-Typ erscheint im Gesamtbild eher unruhig, es finden sich viele kleinere deletierte beziehungsweise amplifizierte Bereiche.

Die Zuordnung der Tumorproben zu einer der Signaturen wurde nur in der retrospektiven Studie durchgeführt.

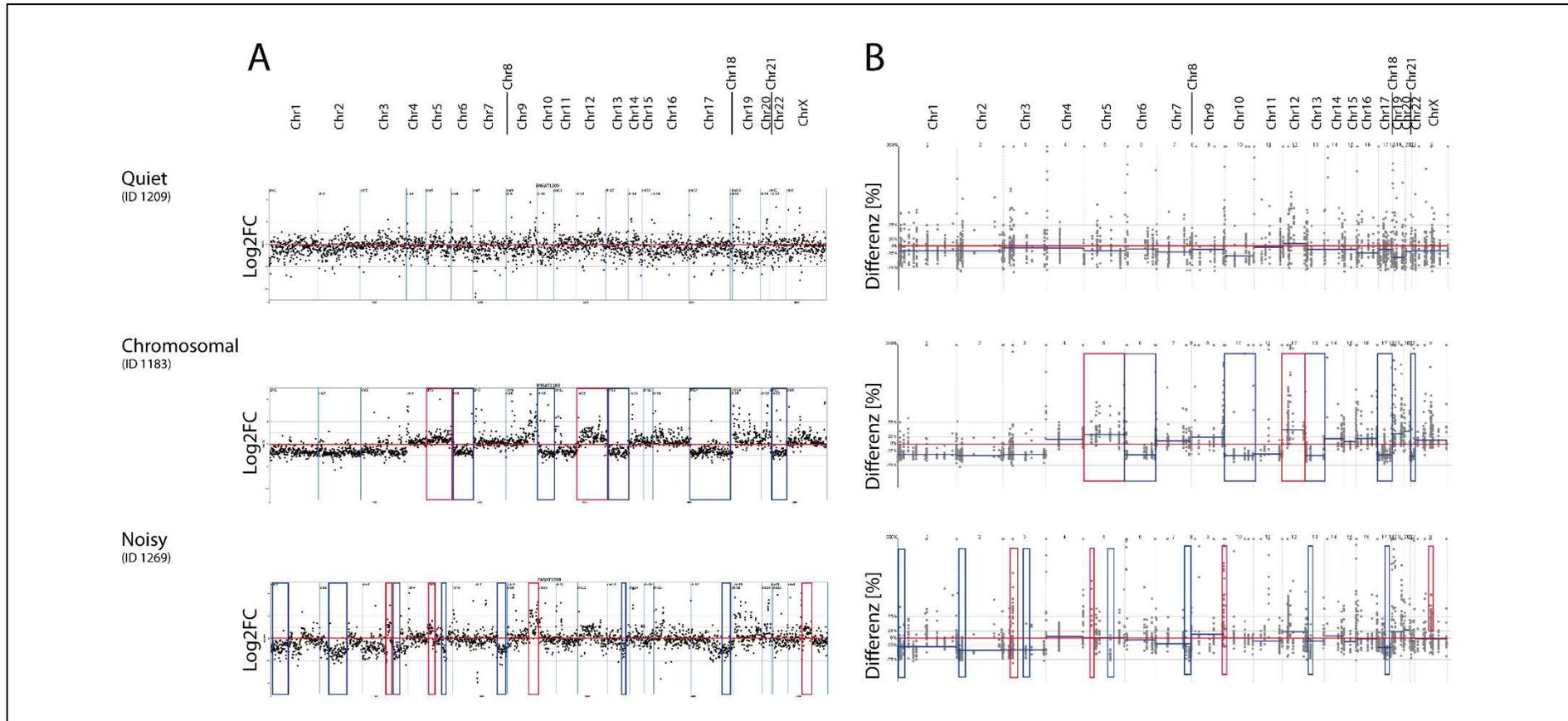


Abbildung 12: Beispiele für die drei chromosomalen Signaturen.

Auswertung A (Alternative Auswertepipeline von Dr. Silke Appenzeller) und B (Auswertung mit Gensearch NGS- CNA Analysis Tool) zeigen die Daten der jeweils der gleichen Patient*innen. Dargestellt sind die Abdeckungen der amplifizierten Regionen einer Tumorprobe im Vergleich zur zugehörigen Blutprobe. Ein Punkt steht für eine amplifizierte Region. Die rote Linie ist die Nulllinie, bei der die Abdeckung der Tumorprobe der Abdeckung der Blutprobe entspricht. Die blauen Linien in B geben die mediane Differenz innerhalb eines Chromosoms an. Im Quiet-Typ sind kaum eindeutige Abweichungen zu erkennen. Beim Chromosomal-Typ sind ganze Chromosomen oder Chromosomenarme amplifiziert (markiert mit roten Kästen) oder deletiert (markiert mit blauen Kästen). Im Noisy-Typ sind viele kleinere Bereiche amplifiziert oder deletiert (ebenfalls rote beziehungsweise blaue Markierung).

Abkürzungen: FC = FoldChange; ID = Identifikator

2.7 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten der retrospektiven Studie wurden mit GraphPad Prism v6.0 (La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten) und SPSS v23 (SPSS Inc., Chicago, Vereinigte Staaten) durchgeführt. Generell wurden P-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Der exakte Test nach Fisher wurde verwendet, um dichotome Variablen auf ihre Unabhängigkeit hin zu überprüfen. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Bonferroni-Test, wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen nicht normal verteilter Variablen verwendet. Die Korrelation von verschiedenen Parametern und das Konfidenzintervall (KI) in dem 95 % der Parameter liegen, wurden mit der Analyse der linearen Regression ermittelt. Zur Erstellung der Überlebenskurven wurde das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Überlebenszeitunterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Logrank-Test überprüft. Das Cox-Modell wurde eingesetzt, wenn der Einfluss mehrerer Varianten auf die Überlebensraten untersucht wurde und die Faktoren identifiziert werden sollten, die einen unabhängigen Einfluss auf das Überleben haben.

Um letztendlich herauszufinden, welche Marker am besten geeignet sind, um die beste Prognose für die Patient*innen treffen zu können, wurden zum einen die Werte der Logrank-Tests verglichen. Außerdem wurde die Sensitivität, die Spezifität und der Genauigkeitsgrad von zwei Modellen berechnet, indem die Patienten in die Gruppen „betroffen“ und „nicht betroffen“ eingeteilt wurden, je nachdem, ob sie innerhalb von 24 Monaten ein Fortschreiten ihrer Erkrankung erfuhren oder nicht. Mit diesen Daten wurde eine Grenzwertoptimierungskurve erstellt (Receiver-Operating-Characteristics-Kurve; ROC-Kurve) und das Konfidenzintervall für die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass die Patienten innerhalb von 24 Monaten nach der ersten Operation einen Progress im Krankheitsverlauf haben.

3 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die DNA aus FFPE-Tumormaterial für die ausgewählten molekulargenetischen Untersuchungen verwendet werden kann und sich mit Panelsequenzierungen und Methylierungsanalysen prognostische Marker, die bereits für NNR-Cas beschrieben wurden, bestätigen lassen. Außerdem sollte analysiert werden, ob mit den molekularen prognostischen Markern präzisere Prognosen für die Patient*innen zu treffen sind und prädiktive Marker und neue Therapieansätze gefunden werden können.

Dafür wurden die im Methodenteil beschriebenen Sequenziermethoden an DNA von insgesamt 169 Tumorproben und den entsprechenden Blutproben von 157 Patient*innen durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse der beiden Studienteile werden in diesem Teil der Arbeit aufgeführt. Die Ergebnisse der retrospektiven Studie wurden bereits publiziert [82]. Sie werden im Folgenden aber noch einmal ausführlich dargestellt.

3.1 Retrospektive Studie

3.1.1 Sequenzierergebnisse

Für die retrospektive Studie wurden 117 Tumoren von 107 Patient*innen untersucht (siehe Tabelle 2), das heißt von zehn Patient*innen wurden jeweils zwei Tumorproben sequenziert und ausgewertet. Für die Auswertung der prognostischen und prädiktiven Marker wurden jedoch nur die Daten eines Tumors pro Patient*in benötigt. Für weitere Analysen wurden die Daten des jeweils chronologisch zuerst entnommenen Tumors gewählt, so dass insgesamt die Daten von 107 NNR-Cas in die Auswertung einbezogen wurden. Die in den folgenden Abschnitten erläuterten Ergebnisse beziehen sich auf diese 107 Tumorproben. Die Daten der Tumorpaare werden separat in Abschnitt 3.3 verglichen.

Mutationslast

Durch die Auswertung der NGS-Daten beziehungsweise der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen mit den beschriebenen Filterkriterien (siehe 2.5.4 beziehungsweise 2.6.1 und 2.6.3) wurden in 107 untersuchten Tumorproben von 107 Patient*innen insgesamt 265 somatische SNVs (inklusive synonyme und intronische Varianten) und kleine Indels gefunden. Damit wurde die Mutationslast bestimmt, die im Median bei 2,7 Varianten/Mb lag (Mittelwert: 3,3 Varianten/Mb; Minimum: 0; Maximum: $21,5 \pm 16$ Varianten). Eine

vollständige Liste aller gefundenen Varianten ist im Anhang verzeichnet (siehe 7.1 Tabelle 15).

Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen

Betrachtet man nur die somatischen, proteinverändernden Varianten, wurden in den 107 Proben insgesamt 215 Veränderungen gefunden. Diese verteilen sich auf 72 % der Kohorte (n = 77). Bei 28 % (n = 30) der Tumoren wurden keine SNVs und kleinen Indels detektiert. 23,4 % der Kohorte hatten eine Variante (n = 25). Etwa die Hälfte der Tumoren (48,6 %, n = 52) wies zwei oder mehr Varianten auf. Im Tumor mit der ID 913 konnten 14 somatische Varianten gefunden werden, was das Maximum in dieser Kohorte war.

Die Varianten – ebenfalls nur die proteinverändernden – waren in 68 Genen des Panels und in *ZNRF3* – das mittels Sanger-Sequenzierung auf Varianten hin untersucht wurde – zu finden (69 von 161 Genen). In 29 dieser Gene wurde jeweils nur eine Variante gefunden, in den restlichen 40 Genen mindestens zwei Varianten. Die meisten Veränderungen wurden in *TP53* nachgewiesen (24 Varianten (V) in 24 Proben (P)), gefolgt von *CTNNB1* (19 V in 18 P), *NF1* (12 V in 12 P), *APC* (10 V in 9 P), *ZNRF3* (9 V in 9 P), *MEN1* (8 V in 8 P), *GNAS* (7 V in 7 P) und *ATRX* (8 V in 7 P). Mehrere Veränderungen wurden in dieser Kohorte auch in den Genen *RB1*, *NOTCH1*, *DAXX* und *EGFR* (betroffene Proben jeweils: 4,6 %) nachgewiesen. Die Veränderungen in *TP53*, *CTNNB1* und *APC* sind hauptsächlich in Hotspots lokalisiert. Bei *TP53* befinden sich die größtenteils onkogenen und wahrscheinlich onkogenen Varianten – also Varianten, die das Tumorwachstum befördern – vor allem in der DNA-Bindedomäne und im Tetramerisierungsmotiv. In dem Gen *CTNNB1* clustern die Varianten in der N-terminalen Region (p.34 – p.45), wo 16 der insgesamt 19 Varianten lokalisiert sind, die alle wahrscheinlich onkogen sind. 6 von 10 Varianten in *APC* befinden sich zwischen p.1459 und p.1573 in der Mitte der Proteinsequenz. Diese sechs und zwei weitere Varianten sind trunkierende Varianten, das heißt sie führen zur Expression eines verkürzten Proteins beziehungsweise zu einem NMD (Nonsense-vermittelter Abbau; engl. nonsense mediated decay) der messenger RNA. Bei den anderen Genen sind die Veränderungen über die komplette Proteinsequenz verteilt, aber es finden sich hauptsächlich bestimmte Arten von Varianten. In *NF1*, *ZNRF3*, *MEN1* und *ATRX* wurden ebenfalls hauptsächlich trunkierende Varianten gefunden. Die Einstufung der meisten dieser Varianten ist unklar. Zu den Genen, bei denen mindestens 5 Tumoren von Veränderungen betroffen waren, sind im Anhang schematische Darstellungen der Proteinsequenzen mit den bekannten Proteindomänen zu finden, in denen die Lage der gefundenen Veränderungen angegeben ist (siehe 7.2 Abbildung 39 bis Abbildung 50). Zum Vergleich ist zu jedem Gen die Lage der gefundenen Varianten der NNR-Ca-Kohorte dargestellt, die im Rahmen von

TCGA untersucht wurde. Informationen dazu wurden der Datenbank cBioPortal entnommen [101, 102].

Somatische Kopienzahlveränderungen

In den 107 Tumorproben wurden mit den NGS-Daten insgesamt 356 Kopienzahlveränderungen (Amplifikationen und Deletionen) gefunden. In 13 Proben wurden keine CNAs detektiert (12,1 % der Kohorte). Bei 19 Tumoren (17,8 %) wurde eine Kopienzahlveränderung eines Gens gefunden. Der Großteil der Tumoren hatte in 2 bis maximal 12 Genen Veränderungen (n = 75, 70,1 % der Kohorte). Ob Veränderungen gefunden wurden und welche Gene dies in der entsprechenden Tumorprobe sind, ist Tabelle 18 zu entnehmen. In der Tabelle wird nur zwischen Deletionen und Amplifikationen unterschieden und nicht, ob es sich – wie in Abschnitt 2.6.3 definiert – um heterozygote oder homozygote Deletionen beziehungsweise Amplifikationen handelt.

Von den Kopienzahlveränderungen waren 61 der 160 Gene des Panels betroffen. *CDK4* war am häufigsten verändert. In 43 % der Tumorproben (n = 46) wurden Amplifikationen von *CDK4* gefunden. Ebenfalls häufig amplifiziert waren *NOTCH1* (n = 22, 21 % der Proben), *TERT* (n = 13, 12 %), *FGFR3* (n = 13, 12 %) und *MDM2* (n = 8, 7 %). Weitere Amplifikationen beziehungsweise Deletionen fanden sich von *STK11* (n = 33, 31 %), *GNA11* (n = 18, 17 %), *TNFRSF14* (n = 32, 30 %), *SMARCB1* (n = 23, 21 %), *FLCN* (n = 21, 20 %) und *CHEK2* (n = 14, 13 %).

Zuordnung der somatischen Veränderungen (SNVs, kleine Indels und CNAs) zu Signalwegen

Die Produkte der Gene, die in dieser Studie am häufigsten durch SNVs, kleine Indels und/oder CNAs verändert waren, nehmen wichtige Funktionen im P53/Rb- oder dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg beziehungsweise bei der Chromatin-Remodellierung ein.

In 57 % (n = 62) der Tumoren wurden eine oder mehrere Veränderungen im P53/Rb-Signalweg gefunden (*CDK4* (44,9 %), *TP53* (22,4 %), *RB1* (9,3 %) und *MDM2* (7,4 %)). 32,7 % der Tumoren (n = 35) waren von Varianten im Wnt/ β -Catenin-Signalweg betroffen (*CTNNB1* (16,8 %), *ZNRF3* (8,4 %) und *APC* (8,4 %)). Von den untersuchten Proben wiesen 22 (20,6 %) Veränderungen in beiden Signalwegen auf, wovon wiederum drei Proben (2,8 %) sowohl Veränderungen in *TP53* als auch *CTNNB1* hatten. Bei circa einem Drittel der Kohorte (n = 36; 33,6 %) waren Gene verändert, die eine Rolle bei der Chromatin-Remodellierung spielen (*ATRX* (6,5 %), *DAXX* (4,7 %), *DNMT3A* (2,8 %), *KDM6A* (2,8 %), *KMT2D* (1,9 %), *MEN1* (7,4 %), *SETD2* (1,9 %) und *TERT* (13,1 %)). Des Weiteren wurden bei 27,1

% der Kohorte (n = 29) Veränderungen in Genen des NOTCH-Signalweges gefunden, der für die Zell-Zell-Kommunikation wichtig ist (*FBXW7* (1,9 %), *NOTCH1* (25,2 %)).

Ein kleiner Teil der Tumoren war außerdem von Veränderungen in Genen betroffen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (BRCA-DNA-Reparatur (8,4 %, n = 9) beziehungsweise DNA-Mismatch-Reparatur (6,5 %, n = 7)). Wie viele Veränderungen in den einzelnen Proben gefunden wurden, welcher Art die Varianten sind und weitere Details zu den Signalwegen sind in Abbildung 13 dargestellt.

Chromosomale Signaturen

Anhand der Verteilung der Kopienzahlveränderungen über das gesamte Genom wurden alle Tumorproben einem von drei chromosomalen Signaturen (quiet, chromosomal oder noisy) zugeordnet. 44 Proben (41,1 %) entsprachen dem Quiet-Typ, bei dem weniger als drei Regionen von Veränderungen betroffen sind. Dem chromosomalen Pattern, bei dem mindestens drei größere Regionen – also ganze Chromosomenarme oder Chromosomen – deletiert und/oder amplifiziert sind, wurden 38 Tumoren (35,5 %) zugeordnet. 25 Proben (23,4 %) wurden als noisy identifiziert. Bei diesem Pattern sind Veränderungen in vielen kleineren Regionen zu finden.

Methylierungsanalysen

Wie bereits beschrieben (siehe 2.6.2) wurden mit allen Proben (Tumor- und Blutproben) Methylierungsanalysen der vier Gene *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* mittels Pyrosequenzierungen durchgeführt. Für die Methylierung der analysierten CpGs von *GSTP1* wurden mit den verwendeten Assays in den Tumorproben Mittelwerte zwischen 1 % und 74 % ermittelt. Bei *PAX5* lagen die Methylierungswerte in den Tumorproben im Durchschnitt zwischen 1 % und 98 %, bei *PAX6* zwischen 2 % und 97 % und bei *PYCARD* zwischen 1 % und 94 %. Die daraus berechnete mittlere Methylierung der untersuchten CpGs pro Tumorprobe lag zwischen 2 % und 77 %. Mit den ermittelten Werten wurden die Tumoren in eine hypomethylierte Gruppe (mittlere Methylierung ≤ 25 %) und eine hypermethylierte Gruppe (mittlere Methylierung > 25 %) eingeteilt. 69,2 % der Proben (n = 74) wurden als hypomethyliert eingestuft und 30,8 % als hypermethyliert (n = 33). Die mittlere Methylierung der Blutproben lag im Schnitt bei 2 % (Minimum 1 %; Maximum 4 %). Sie wurden damit alle als unmethyliert angesehen.

ERGEBNISSE

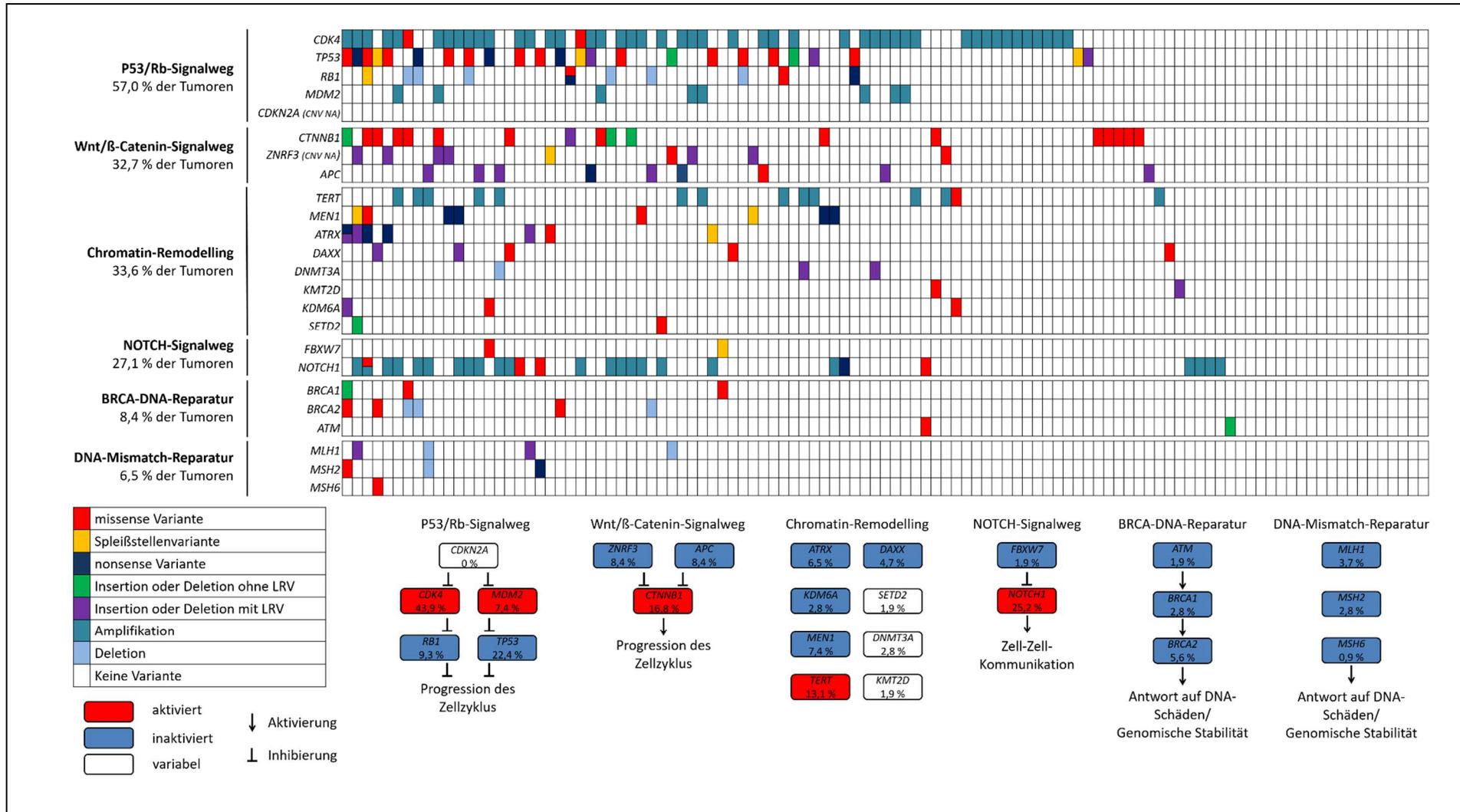


Abbildung 13: Häufig von Veränderungen betroffene Signalwege in der retrospektiven Studie.

Anhand der Auswertung der NGS- und Sanger-Sequenzierungsdaten konnten somatische Varianten (SNVs, kleine Indels und CNAs) gefunden werden, die Veränderungen in den dargestellten Signalwegen (P53/Rb-, Wnt/ β -Catenin und NOTCH-Signalweg, DNA-Reparatur und Chromatin-Remodelling) verursachen. Zu jeder Tumorprobe (entspricht einer Spalte; n = 107; sortiert nach Variantenanzahl) sind die in den analysierten Genen gefundenen Varianten entsprechend ihrer Art (siehe Legende links unten) farbig markiert. Die unter den Bezeichnungen der Signalwege links angegebenen Prozentzahlen geben den Anteil der betroffenen Proben pro Signalweg an. In den schematisch dargestellten Signalwegen (unten) ist der Anteil der Veränderungen für jedes Gen angegeben, außerdem, ob die Veränderungen aktivierend und/oder inaktivierend wirken (rot \triangleq aktivierend; blau \triangleq inaktivierend; weiß \triangleq variabel). Ob die Genprodukte in den Signalwegen normalerweise eine aktivierende oder inaktivierende Funktion haben, wird durch einen Pfeil oder einen Balken verdeutlicht. (Der Abbildung zugrunde liegende Daten wurden bereits publiziert [82])

Abkürzungen: CNA = Kopienzahlveränderung; Indel = Insertionen und Deletionen; LRV = Leserasterverschiebung; NA = keine Angaben; SNV = Einzelnukleotidaustausche

ERGEBNISSE

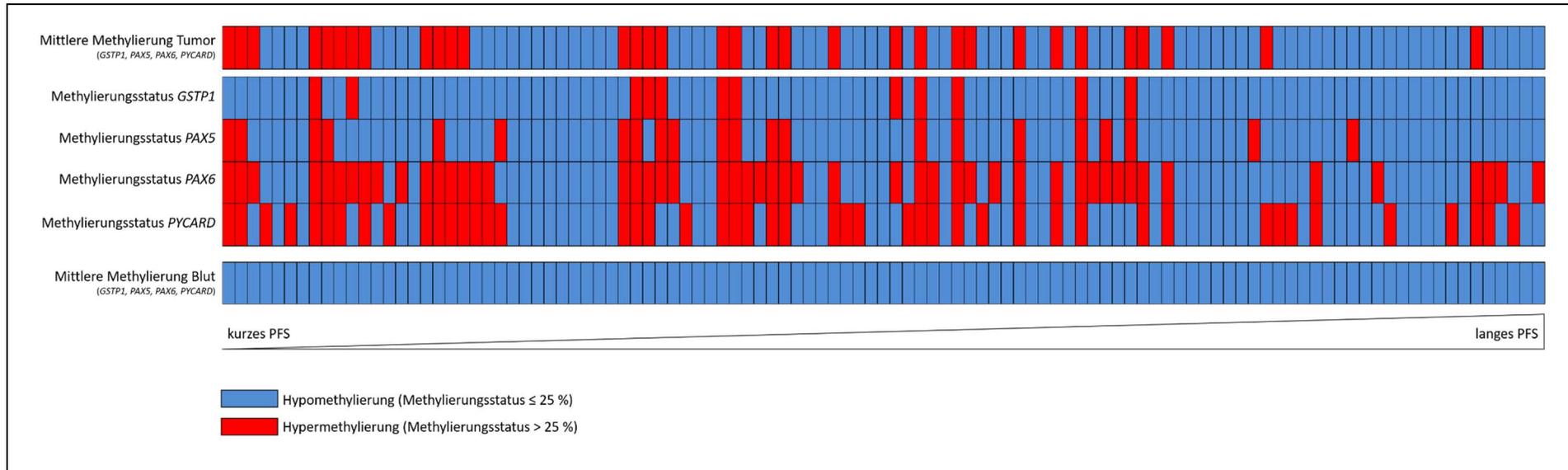


Abbildung 14: Methylierungsstatus der Proben der retrospektiven Studie.

In der Heatmap dargestellt sind die ermittelten mittleren Methylierungswerte aller in der prospektiven Studie untersuchten Tumorprouben (oberste Zeile) und Blutproben (unterste Zeile). Hypomethylierte Proben (Methylierungsstatus von $\leq 25\%$) sind blau dargestellt und hypermethylierte Proben (Methylierungsstatus $> 25\%$) rot. Für die Tumorprouben sind auch die Methylierungsstatus der vier untersuchten Gene (*GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD*) einzeln dargestellt (Reihe 2 – 4). Jede Spalte entspricht einer Tumorproube ($n = 107$), die nach der Länge des progressionsfreien Überlebens sortiert sind.

Abkürzungen: PFS = progressionsfreies Überleben

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalysen für alle Tumor- und Blutproben dargestellt. Die Proben sind entsprechend der Länge des PFS der Patienten sortiert. Für die Tumorproben sind auch die Methylierungsstatus der einzelnen Gene angegeben, die differentiell methyliert sein können.

3.1.2 Sequenzierergebnisse als prognostische Marker

Um herauszufinden, welche Daten aus den Sequenzierungen von FFPE-Tumormaterial als molekulare prognostische Marker für die Länge des progressionsfreien Überlebens der Patient*innen verwendet werden können, wurden mit den Ergebnissen Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Es wurden zuerst die einzelnen Parameter in univariaten Analysen und anschließend eine Kombination der molekularen Marker in einer multivariaten Analyse untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse hierzu erläutert.

Anzahl somatischer SNVs und kleiner Indels als prognostischer Marker

Die Anzahl proteinverändernder somatischer SNVs und kleiner Indels als prognostischer Marker wurde als dichotome Variable untersucht. Die Kohorte wurde also in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe mit Tumoren, in denen entweder keine oder nur eine somatische Variante (Anzahl somatischer Varianten 0-1) gefunden worden war beziehungsweise Patient*innen mit NNR-Cas, bei denen 2 oder mehr Varianten (Anzahl somatischer Varianten ≥ 2) detektiert worden waren. Mit der Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Gruppen in der Länge des PFS signifikant unterscheiden. Patient*innen, in deren Tumor keine oder nur eine somatische Variante gefunden wurde, hatten ein medianes progressionsfreies Überleben von 15 Monaten. Im Vergleich dazu war das Risiko der Progression der Krebserkrankung für Patienten mit 2 oder mehr somatischen Varianten im Tumor um das 1,92-fache erhöht. Das PFS lag bei diesen Patienten im Median bei nur 5 Monaten. ($P = 0,0015$, Hazard Ratio (HR) = 1,92, 95 % KI = 1,36 bis 3,29, Abbildung 15)

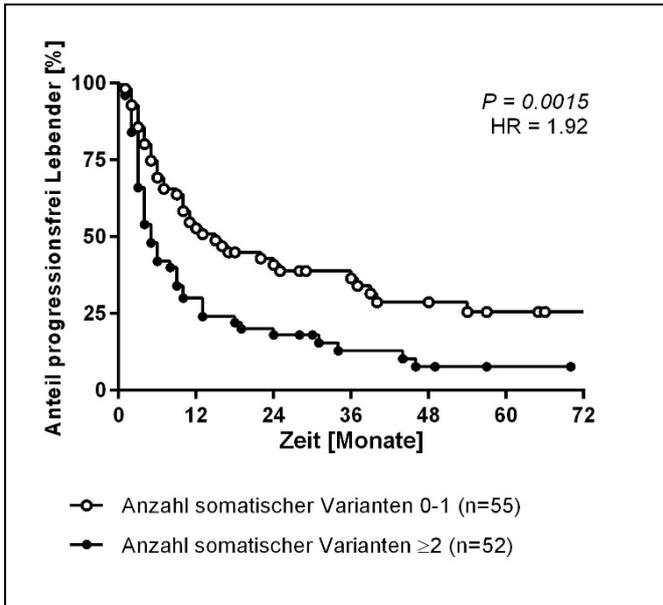


Abbildung 15: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Anzahl somatischer, proteinverändernder Varianten.

Patient*innen mit 0-1 somatischen Varianten im Tumor haben ein signifikant längeres PFS im Vergleich zu Patient*innen, in deren Tumor zwei oder mehr Varianten gefunden wurden (im Median 15 versus 5 Monate).

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Zuordnung der somatischen Veränderungen (SNVs, kleine Indels und CNAs) zu Signalwegen

Neben der Anzahl der gefundenen, proteinverändernden Veränderungen pro Tumor spielt auch der von Veränderungen betroffene Signalweg eine signifikante Rolle für das PFS der Patient*innen dieser Kohorte.

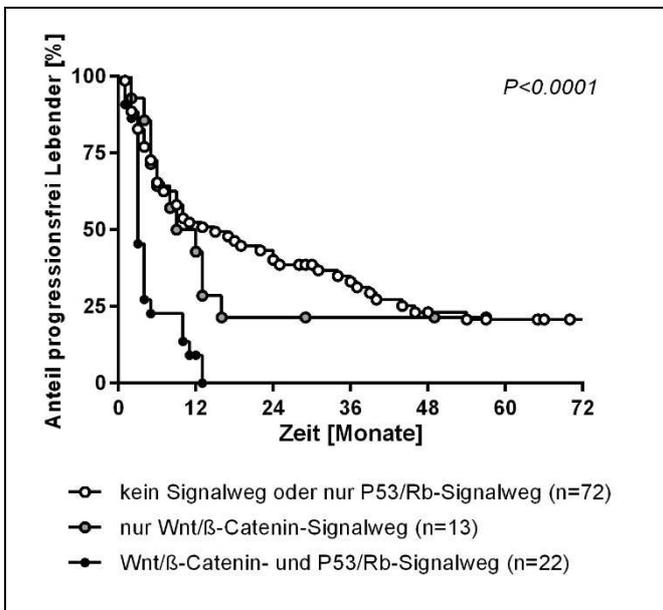


Abbildung 16: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Veränderungen im P53/Rb- und/ oder Wnt/β-Catenin-Signalweg.

Abhängig davon, ob in den untersuchten Tumorproben Veränderungen im P53/Rb- und/oder dem Wnt/β-Catenin-Signalweg oder keine Varianten in den entsprechenden Genen gefunden wurden, haben Patient*innen ein signifikant unterschiedliches PFS (im Median 15, 10,5 beziehungsweise 3 Monate).

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Für diese Analyse wurden Gene des P53/Rb-Signalweges – *CDK4*, *CDKN2A*, *MDM2*, *RB1* und *TP53* – beziehungsweise des Wnt/β-Catenin-Signalwegs – *APC*, *CTNNB1* und *ZNRF3* – auf das Vorhandensein von Varianten untersucht. Es wurde gefunden, dass Patient*innen

mit einem Tumor, in dem keine Variante im Wnt/ β -Catenin- oder dem P53/Rb-Signalweg detektiert wurde beziehungsweise nur Veränderungen im P53/Rb-Signalweg ($n = 72$), ein medianes progressionfreies Überleben von 15 Monaten haben. Patient*innen, in deren Tumor nur der Wnt/ β -Catenin-Signalweg von Veränderungen betroffen war ($n = 13$), leben im Median 10,5 Monate, ohne dass die Krebserkrankung fortschreitet. Die schlechteste Prognose haben Erkrankte, in deren Tumor sowohl Varianten im Wnt/ β -Catenin- als auch im P53/Rb-Signalweg gefunden wurden ($n = 22$; medianes PFS 3 Monate) ($P < 0,0001$, per trend, Abbildung 16).

Chromosomale Signaturen

Mit den Überlebenszeitanalysen zu den chromosomalen Signaturen konnte für diese Kohorte gezeigt werden, dass Patient*innen, deren Tumor dem Noisy-Typ zugeordnet wurde ein fast doppelt so hohes Risiko für den Progress der Tumorerkrankung haben, verglichen mit Patient*innen, deren Tumor dem Chromosomal- oder Quiet-Typ zugeordnet wurde. Die erste Gruppe erfährt im Median nach 5 Monaten ein Fortschreiten der Krebserkrankung. Bei der Vergleichsgruppe, die sich aus Patient*innen zusammensetzt, deren Tumor als quiet oder chromosomal eingestuft wurde, war das mediane PFS mit 10 Monaten doppelt so hoch. ($P = 0,0038$, HR = 1,94, 95 % KI = 1,38 bis 4,39, Abbildung 16).

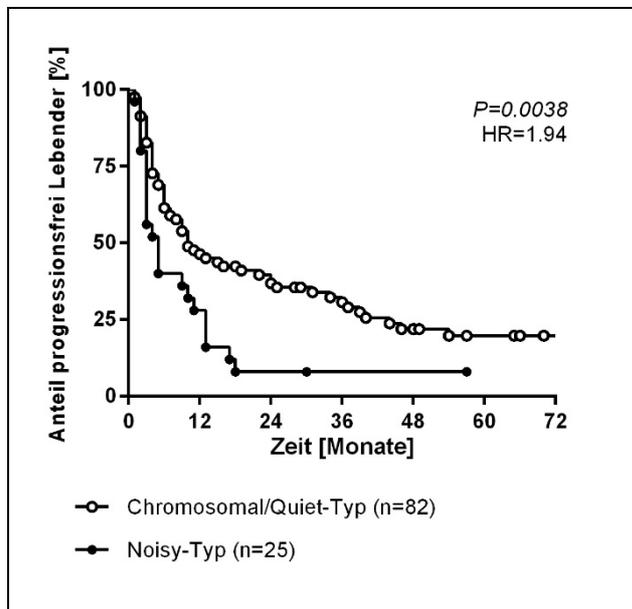


Abbildung 16: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – chromosomale Signaturen.

Patient*innen, deren Tumoren dem Noisy-Typ zugeordnet wurden, haben ein signifikant kürzeres medianes PFS (5 Monate) im Vergleich zu 10 Monaten bei der Vergleichsgruppe (Chromosomal- und Quiet-Typ zusammengefasst).

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Methylierungsanalysen

Überlebenszeitanalysen zeigten in dieser Kohorte die Relevanz des Methylierungsstatus der Tumorproben – bezogen auf die mittlere Methylierung der untersuchten CpGs von *GSTP1*,

PAX5, *PAX6* und *PYCARD* – für die Länge des progressionsfreien Überlebens der Patient*innen. Erkrankte mit einem hypomethylierten Tumor überleben im Median 13 Monate, ohne dass es zu einem Fortschreiten der Krebserkrankung kommt. Bei hypermethylierten Tumoren ist das Risiko eines Progresses für die Patient*innen 2,19-fach erhöht. Bei diesen Patient*innen kommt es im Median nach 5 Monaten zu erneutem Tumorwachstum. ($P = 0,0001$, HR = 2,19, 95 % KI = 1,73 bis 4,87, Abbildung 17)

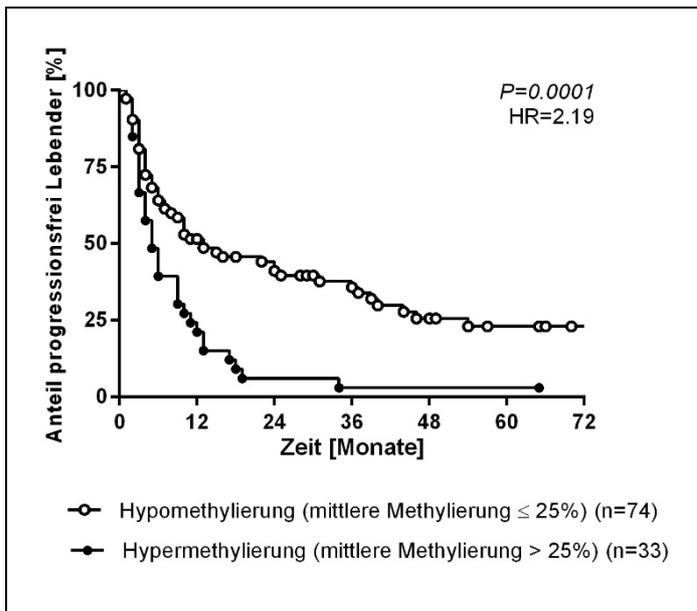


Abbildung 17: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Methylierungsstatus.

Patient*innen, deren Tumoren hypermethyliert sind, haben ein signifikant kürzeres medianes PFS (5 Monate) im Vergleich zu 13 Monaten bei der hypomethylierten Gruppe.

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Kombination der molekularen Marker zum molekularen Score

Im Einzelnen konnte in dieser Kohorte für alle analysierten molekularen Marker eine signifikante prognostische Relevanz für die Länge des PFS gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob sich Patient*innen in ihrer Prognose noch besser unterscheiden lassen, wurden die einzelnen Marker zum molekularen Score kombiniert. In die Berechnung dieses Scores wurden nur die Marker einbezogen, die objektiv zu analysieren waren. Die Einordnung der Tumorproben in chromosomale Signaturen wurde nicht für die Bildung des molekularen Scores verwendet, da diese Analysen sehr zeitaufwendig waren. Außerdem war diese Klassifizierung ursprünglich bei der Analyse von WES-Daten aus frischem Material gefunden worden. Die Proben anhand von Paneldaten einem von drei chromosomalen Signaturen zuzuordnen, war verhältnismäßig ungenau.

Der molekulare Score wurde daher aus folgenden molekularen Markern gebildet:

- Anzahl an somatischen, proteinverändernden Varianten pro Tumorprobe (0 – 1 = 0 Punkte; $\geq 2 = 1$ Punkt)

ERGEBNISSE

- Veränderungen im Wnt/ β -Catenin- beziehungsweise P53/Rb-Signalweg (keine Veränderungen/nur Veränderungen im P53/Rb-Signalweg = 0; nur Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg = 1; Veränderungen im Wnt/ β -Catenin und im p53/Rb-Signalweg = 2)
- Methylierungsstatus (Hypomethylierung (mittlere Methylierung $\leq 25\%$) = 0; Hypermethylierung (mittlere Methylierung $> 25\%$) = 1)

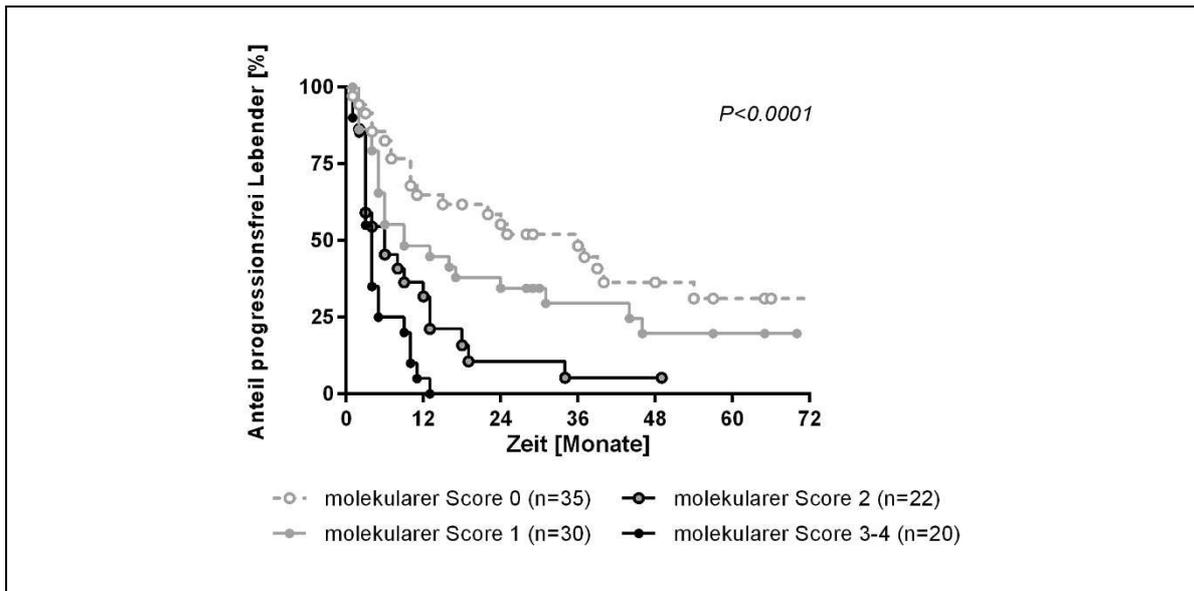


Abbildung 18: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – molekularer Score.

Einberechnet wurde die Anzahl an somatischen Varianten pro Probe (0 – 1 Varianten = 0 Punkte; ≥ 2 Varianten = 1 Punkt), Veränderungen in Signalwegen (keine Veränderungen/nur Veränderungen im P53/Rb-Signalweg = 0; nur Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg = 1; Veränderungen im Wnt/ β -Catenin und im P53/Rb-Signalweg = 2) und der Methylierungsstatus (Hypomethylierung (mittlere Methylierung $\leq 25\%$) = 0; Hypermethylierung (mittlere Methylierung $> 25\%$) = 1). Die vier Gruppen (molekularer Score 0, 1, 2 bzw. 3-4) unterscheiden sich signifikant in ihrem PFS (medianes PFS 36, 9, 6 bzw. 4 Monate). (modifiziert nach [82] und hier mit Genehmigung der Oxford University Press veröffentlicht (Lizenznummer: 4933651316969))

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Mit den drei verwendeten Markern wurden vier Gruppen mit unterschiedlichen Scores gebildet, die sich in der Länge des PFS signifikant unterschieden. Die Gruppe mit einem molekularen Score von 0 (n = 35) hatte ein deutlich besseres medianes PFS (36 Monaten) im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (molekularer Score 1 (n = 30): medianes PFS 9 Monate; molekularer Score 2 (n = 22): medianes PFS 6 Monate; molekularer Score 3-4 (n = 20): medianes PFS 4 Monate) ($P < 0,0001$ per trend, Abbildung 18).

3.1.3 Klinische und histopathologische Daten und die Korrelation zum PFS

Um beurteilen zu können, ob mit den molekularen Markern präzisere Prognosen zu treffen sind als mit den klinischen und histopathologischen Markern, wurden auch diese Daten für Überlebenszeitanalysen herangezogen. Die klinischen und histopathologischen Parameter der Kohorte wurden ebenfalls zuerst einzeln, in univariaten Analysen, und dann in Kombination, durch eine multivariate Analyse, auf ihre Korrelation zur Länge des progressionsfreien Überlebens der Patient*innen hin untersucht.

ENSAT-Tumorstadium

In Abbildung 19 ist der Zusammenhang zwischen dem ENSAT-Tumorstadium und dem progressionsfreien Überleben der Nebennierenrindenzinompatienten dargestellt.

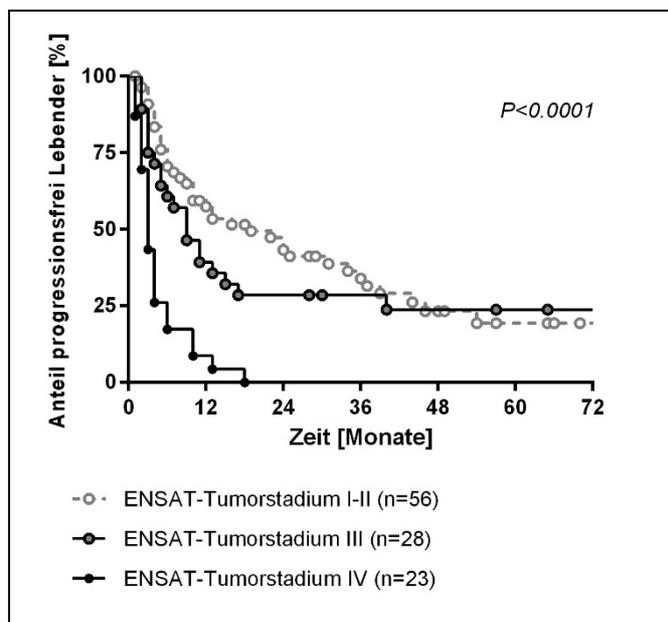


Abbildung 19: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – ENSAT-Tumorstadium.

Patient*innen mit ENSAT-Tumorstadium I-II und III haben ein signifikant längeres PFS als Patient*innen mit ENSAT-Tumorstadium IV (medianes PFS 19, 9 beziehungsweise 3 Monate).

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Die Patient*innen der Kohorte wurden für die Überlebenszeitanalyse, entsprechend dem ENSAT-Tumorstadium bei Erstdiagnose, drei Gruppen zugeordnet: ENSAT-Tumorstadium I-II (n = 56), III (n = 28) oder IV (n = 23). Zwischen dem ENSAT-Tumorstadium und der Länge des progressionsfreien Überlebens der Erkrankten konnte in dieser Kohorte ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Patient*innen mit einem NNR-Ca, das bei der Diagnose dem frühen ENSAT-Tumorstadium I oder II zugeordnet worden war, haben ein medianes PFS von 19 Monaten. Patient*innen mit einem Tumor des ENSAT-Tumorstadiums III haben ein medianes PFS von 9 Monaten. In der Gruppe der Patient*innen, die bei Erstdiagnose

einen metastasierenden Tumor hatten (ENSAT-Tumorstadium IV), war das mediane PFS mit 3 Monaten am kürzesten. ($P < 0,0001$ per trend, Abbildung 19)

Hormonstatus und Symptome

In der Kohorte wurde auch der Zusammenhang zwischen der Hormonsekretion der Tumoren und der Länge des progressionsfreien Überlebens der Erkrankten untersucht. Es wurde zwischen hormonell inaktiven (= endokrinologisch inaktiv; $n = 25$) Tumoren, solchen, die nur Glukokortikoide oder Glukokortikoide zusammen mit anderen Hormonen sekretieren ($n = 49$) und einer Gruppe, die andere Steroidhormone als Glukokortikoide sekretieren ($n = 7$), unterschieden. Patient*innen, bei denen es durch den Tumor zu einer Überproduktion an Glukokortikoiden kam, hatten im Median ein progressionsfreies Überleben von 5 Monaten. Bei Patient*innen, deren Tumoren einen Hormonexzess anderer Steroide verursachen, war zwar das mediane PFS mit 29,5 Monaten deutlich länger, die maximale progressionsfreie Überlebenszeit aber kürzer als bei Patient*innen mit Glukokortikoidexzess (54 Monate versus 73 Monate). Patient*innen, deren Tumoren hormonell inaktiv waren, hatten im Median eine progressionsfreie Überlebenszeit von 15 Monaten, aber mit 240 Monaten eine deutlich längere maximale progressionsfreie Überlebenszeit im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. ($P = 0,004$ per trend, Abbildung 20)

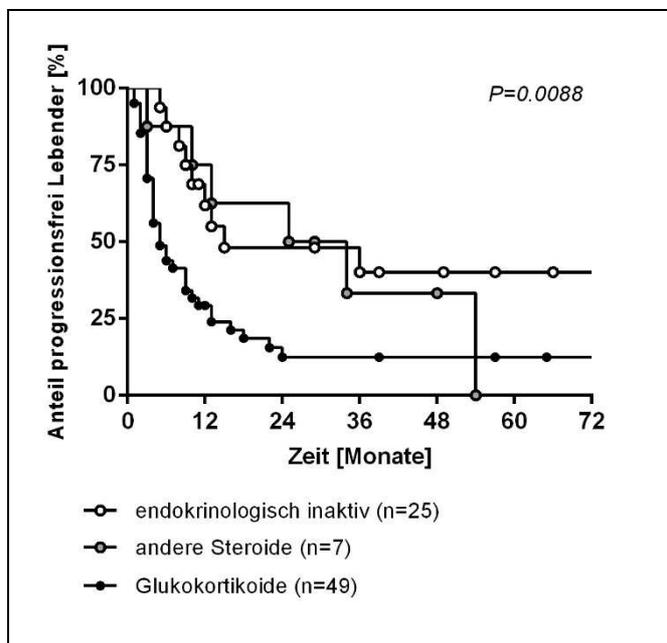


Abbildung 20: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 81 Patient*innen – hormonelle Aktivität.

Patient*innen, bei denen in dieser Kohorte eine Überproduktion an Glukokortikoiden nachzuweisen war, haben im Median ein signifikant kürzeres PFS (5 Monate) als die Erkrankten, deren Tumoren hormonell inaktiv waren beziehungsweise andere Steroide produzierten (medianes PFS 15 Monate beziehungsweise 29,5 Monate)

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Da bei 30 - 40 % der Patient*innen NNR-Cas auch aufgrund anderer Symptome, wie zum Beispiel Schmerzen im Bauchraum, diagnostiziert werden [20], wurde auch dies in eine Analyse mit einbezogen. Es wurde eine dichotome Analyse durchgeführt, bei der die Gruppe mit Symptomen – darin eingeschlossen sind Patient*innen mit Hormonexzess und anderen

Beschwerden wie Schmerzen – (Symptome JA; n = 76) gegen die Gruppe der Patient*innen ohne Symptome (Symptome NEIN; n = 31) verglichen wurde, bei denen die NNR-Cas ein Zufallsbefund waren. Es zeigte sich, dass Patient*innen, deren Tumorerkrankung aufgrund von Symptomen diagnostiziert wurde, ein 1,7-fach höheres Risiko für das Fortschreiten ihrer Erkrankung haben. Sie haben im Median ein PFS von 7 Monaten. Die Vergleichsgruppe hat ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben von 19 Monaten. ($P = 0,0286$, HR = 1,7, 95 % KI = 1,077 bis 2,646, Abbildung 21)

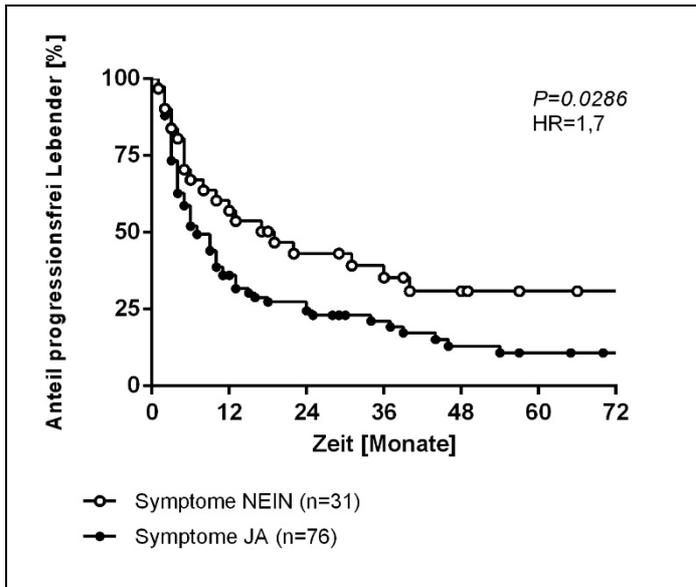


Abbildung 21: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Vorhandensein von Symptomen.

Patient*innen deren NNR-Cas zufällig entdeckt wurden (Symptome NEIN), haben ein signifikant längeres PFS im Vergleich zu Patient*innen, deren Tumoren aufgrund von Symptomen (Symptome JA) diagnostiziert wurden (medianes PFS 19 beziehungsweise 7 Monate).

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; n = Anzahl, PFS = progressionsfreies Überleben

Proliferationsindex Ki-67

Für die Überlebenszeitanalyse zum Einfluss des Proliferationsindex Ki-67 auf die Länge des PFS wurde die Kohorte (n = 107) – entsprechend dem Anteil proliferierender Zellen im Tumor – in drei Gruppen eingeteilt: Proliferationsindex Ki-67 0-9 (n = 30), Proliferationsindex Ki-67 10-19 (n = 34) und Proliferationsindex Ki-67 ≥ 20 (n = 43). Die Analyse ergab, dass Patient*innen mit einem geringen Anteil an proliferierenden Zellen (Proliferationsindex Ki-67 0-9) ein medianes Überleben ohne Fortschreiten der Krebserkrankung von 37 Monaten haben, wohingegen das PFS bei Patient*innen mit einem Proliferationsindex Ki-67 von 10-19 bei nur 12 Monaten liegt. Bei Erkrankten mit sehr teilungsaktiven Tumoren (Ki-67-Index ≥ 20) sinkt das mediane PFS auf 5 Monate. In dieser Kohorte konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil teilungsaktiver Zellen im Tumor und der Länge des PFS der Patient*innen nachgewiesen werden ($P < 0,0001$ per trend, Abbildung 22).

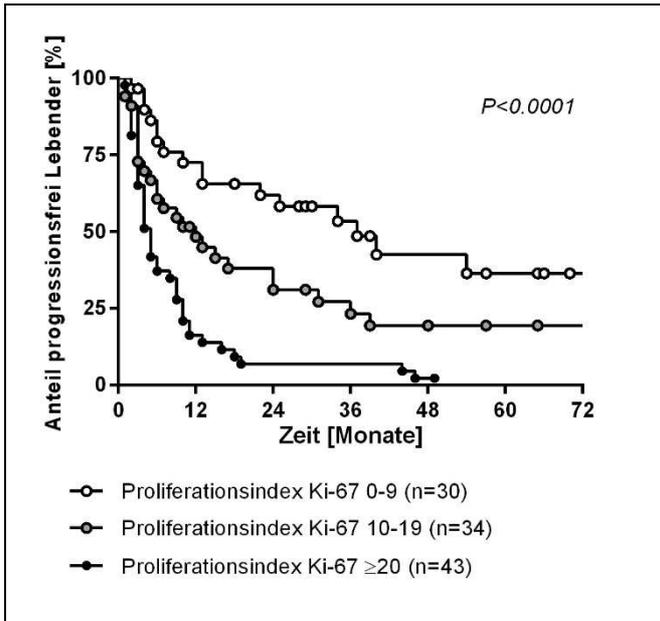


Abbildung 22: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Proliferationsindex Ki-67.

Patient*innen, deren Tumor einen geringen Anteil teilungsaktiver Zellen aufweist (Proliferationsindex Ki-67 0-9), haben ein signifikant längeres PFS (Median 37 Monate) im Vergleich zu Patient*innen mit teilungsaktiveren Tumoren (Proliferationsindex Ki-67 10-19 beziehungsweise Proliferationsindex Ki-67 ≥ 20 ; medianes PFS 12 beziehungsweise 5 Monate).

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Resektionsstatus

Auch der Resektionsstatus ließ sich in der untersuchten Kohorte (n = 104; von 3 Patient*innen gab es keine Information zum Resektionsstatus) als signifikanter, prognostischer Marker bestätigen.

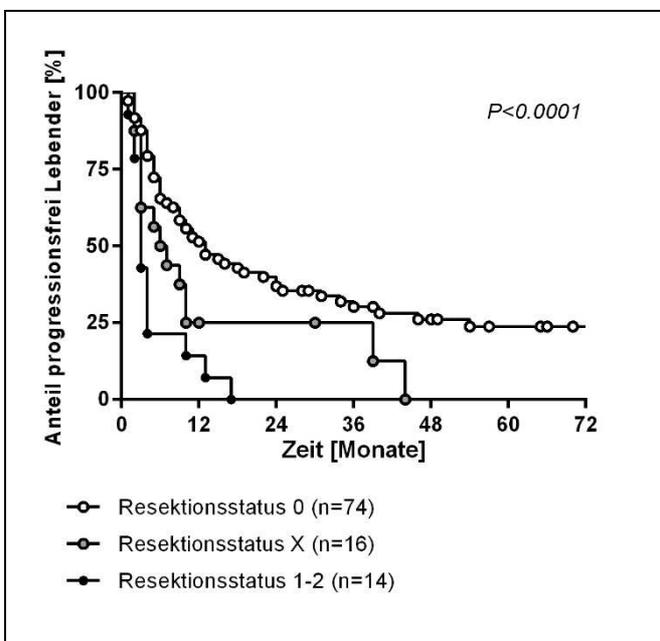


Abbildung 23: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 104 Patient*innen – Resektionsstatus.

Die Länge des PFS ist in dieser Kohorte signifikant abhängig vom Resektionsstatus. Patient*innen mit einer vollständigen Resektion (R0) haben im Median das längste PFS (13 Monate). Eine unvollständige Resektion (R1-2) ist mit schnellem Progress verbunden (medianes PFS = 3 Monate). Patient*innen nach deren OP keine Aussage über den Resektionsstatus getroffen werden kann, haben ein medianes PFS von 6,5 Monaten.

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Während Patient*innen, bei denen der Tumor komplett entfernt werden konnte (R0), ein medianes PFS von 13 Monaten haben, erfahren Erkrankte, bei denen ein mikroskopischer oder makroskopischer Rest des Tumors zurückgeblieben ist (R1 beziehungsweise R2), eine

Progression der Erkrankung im Median bereits nach 3 Monaten. Patient*innen, bei denen keine Aussage über den Resektionsstatus getroffen werden konnte, haben ein medianes PFS von 6,5 Monaten. ($P < 0;0001$ per trend, Abbildung 23)

Alter

Das Alter und dessen Einfluss auf die Länge des PFS wurde als dichotome Variable untersucht. Die Kohorte wurde dafür in zwei Gruppen unterteilt. Es wurde zwischen Patient*innen unterschieden, die jünger als 50 Jahre (Alter < 50, n = 57) alt sind beziehungsweise älter (Alter > 50, n = 50). Die Einteilung orientiert sich am medianen Alter der Kohorte bei Erstdiagnose, welches bei 49 Jahren lag. In dieser Kohorte konnte nicht gezeigt werden, dass das Alter der Patient*innen einen signifikanten Einfluss auf die Länge des PFS hat ($P = 0.85$; HR= 1,039; 95 % KI = 0,6790 bis 1,601). Das mediane PFS war 9 Monate bei den Patient*innen, die jünger als 50 Jahre waren, beziehungsweise 9,5 Monate bei der älteren Gruppe (Abbildung 24).

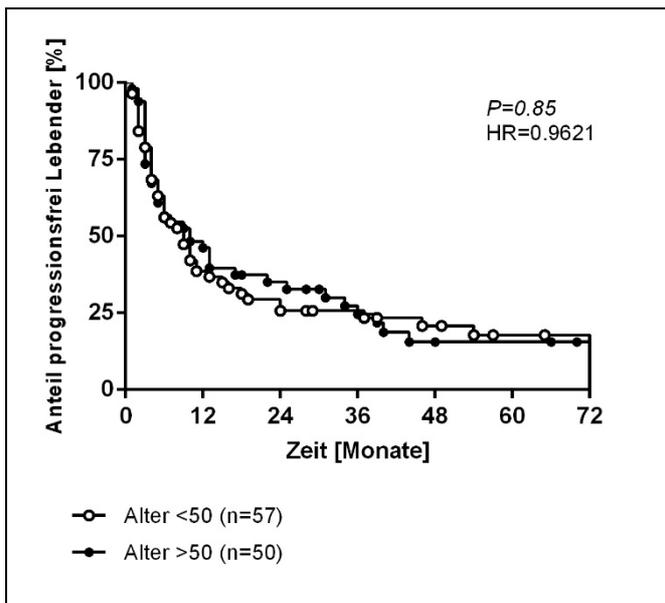


Abbildung 24: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Alter der Patient*innen bei Erstdiagnose.

Es wurde kein signifikanter Unterschied bei der Länge des PFS zwischen Patient*innen gefunden, die bei Erstdiagnose jünger beziehungsweise älter als 50 Jahre waren.

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Kombination von klinischen und histopathologischen Faktoren zum mGRAS-Score

In Anlehnung an den GRAS-Score, der von Libé et al. 2015 publiziert wurde [48], wurde aus den klinischen und histopathologischen Daten ein modifizierter GRAS-Score (mGRAS) gebildet, um zu untersuchen, ob sich durch die Kombination aller dokumentierten klinischen und histopathologischen Marker die prognostische Stärke verbessern lässt. Im Gegensatz zum GRAS-Score von Libé et al. wurden in die Berechnung des mGRAS-Score alle ENSAT-

ERGEBNISSE

Tumorstadien (I-IV) einbezogen und das ENSAT-Tumorstadium IV nicht in Untergruppen unterteilt. Das Alter wurde, obwohl es in dieser Kohorte kein signifikanter klinischer Marker für die Länge des PFS der Patient*innen war, mit einbezogen, da in anderen Studien damit eine differenziertere Prognose möglich war [35]. Lagen zu manchen Parametern keine Informationen vor, wurden diese mit 0 bewertet.

Der mGRAS-Score setzt sich dann folgendermaßen zusammen:

- ENSAT-Tumorstadium (I-II = 0 Punkte; III = 1 Punkt; IV = 2 Punkte)
- Proliferationsindex Ki-67 (0-9 = 0 Punkte; 10-19 = 1 Punkt; ≥ 20 = 2 Punkte)
- Resektionsstatus (R0 = 0 Punkte; RX = 1 Punkt; R1 = 2 Punkte; R2 = 3 Punkte)
- Alter (< 50 = 0 Punkte; > 50 = 1 Punkt)
- Diagnose aufgrund von Symptomen wie Tumormasse oder Steroidsekretion (Nein = 0 Punkte; Ja = 1 Punkt)

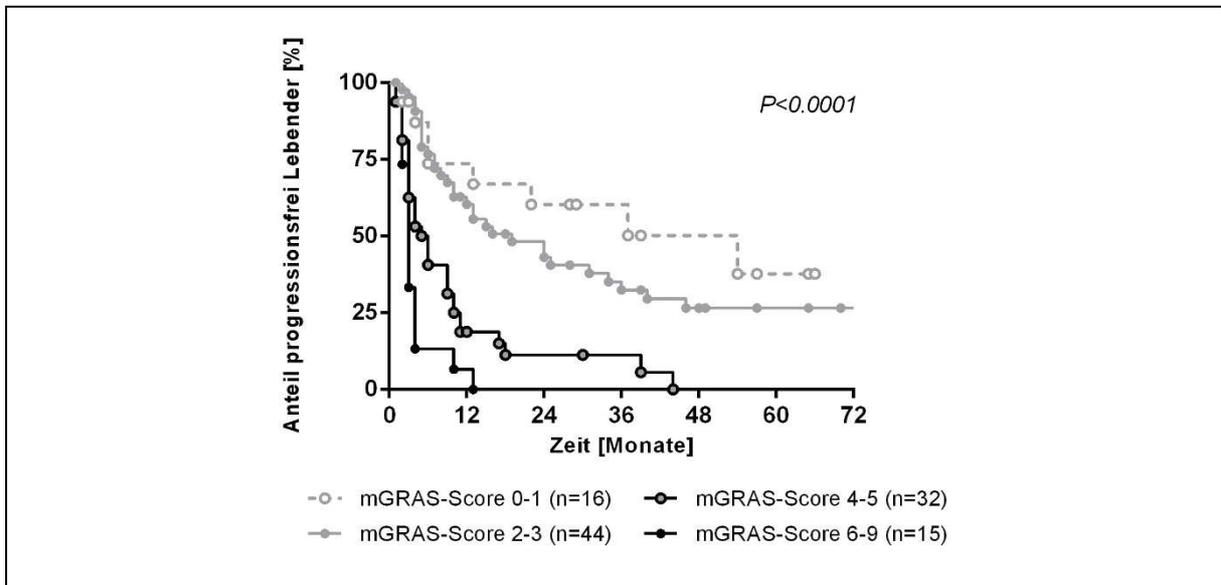


Abbildung 25: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – mGRAS-Score.

Patient*innen wurden anhand des ENSAT-Tumorstadiums (I-II = 0 Punkte; III = 1 Punkt; IV = 2 Punkte), des Proliferationsindex Ki-67 (0-9 = 0 Punkte; 10-19 = 1 Punkt; ≥ 20 = 2 Punkte), des Resektionsstatus (R0 = 0 Punkte; RX = 1 Punkt; R1 = 2 Punkte; R2 = 3 Punkte), ihrem Alter (< 50 = 0 Punkte; > 50 = 1 Punkt) und dem Diagnosegrund (Symptomen: Nein = 0 Punkte/ Ja = 1 Punkt) einer von vier Gruppen mit unterschiedlichen mGRAS-Scores zugeordnet (0-1, 2-3, 4-5 bzw. 6-9). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant in der Länge des PFS der Patient*innen mit einem medianen PFS von 54, 24, 4,5 bzw. 3 Monate. (Abbildung angepasst nach [82] und veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 4933651316969))

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Die Kohorte wurde mittels des mGRAS-Scores in vier Gruppen unterteilt (mGRAS-Score 0-1 (n = 16), mGRAS-Score 2-3 (n = 44), mGRAS-Score 4-5 (n = 32) und mGRAS-Score 6-9 (n = 15)), die sich in ihrem PFS signifikant unterscheiden. Die Patientengruppe mit dem

niedrigsten mGRAS-Score hatte die beste Prognose mit einem medianen PFS von 54 Monaten. Patient*innen mit einem mGRAS-Score 2-3 erfahren im Median nach 19 Monaten eine Progression ihrer Krebserkrankung. Ein deutlich kürzeres PFS haben sowohl Patient*innen mit mGRAS-Score 4-5 (medianes PFS 5,5 Monate) als auch Patient*innen mit mGRAS-Score 6-9 (medianes PFS 3 Monate). ($P < 0,0001$ per trend; Abbildung 25)

3.1.4 Vergleich der prognostischen Stärke der Marker

Sowohl mit dem molekularen Score als auch mit dem mGRAS-Score lassen sich vier Gruppen in der Länge des medianen PFS signifikant unterscheiden, wobei mit keinem der beiden Scores eine deutlich bessere Vorhersage zu treffen ist. Aus diesem Grund wurde auch die Kombination der beiden Scores zu einem COMBI-Score auf die prognostische Stärke hin überprüft.

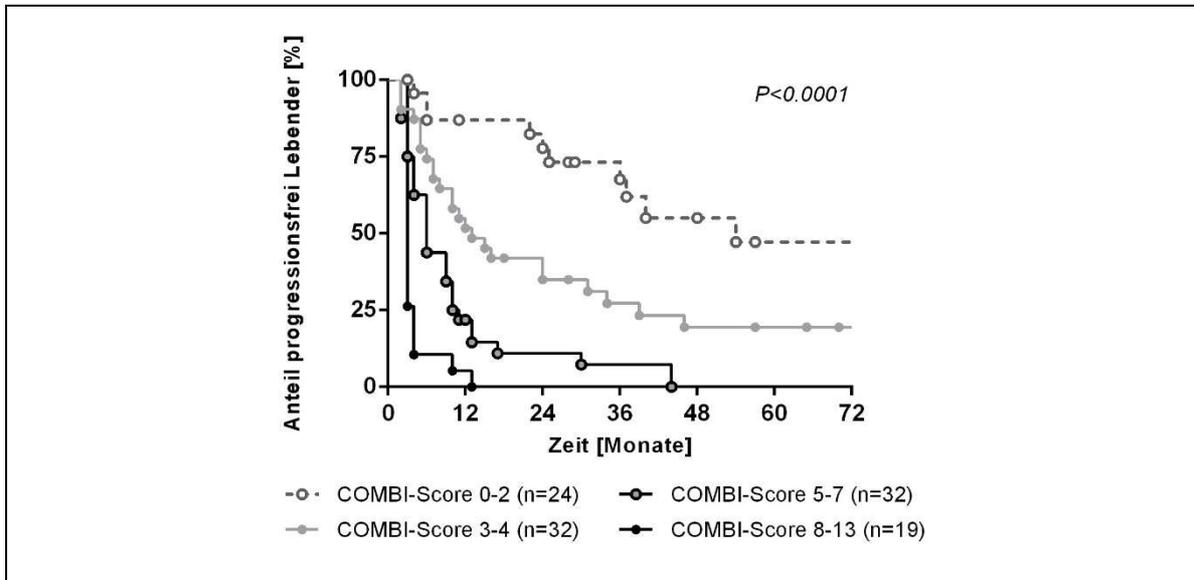


Abbildung 26: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – COMBI-Score.

Durch die Kombination von mGRAS- und molekularem Score wurde der COMBI-Score berechnet. Die Kohorte wurde so vier Gruppen mit unterschiedlichen Prognosen zugeordnet (COMBI-Score 0-2, 3-4, 5-7 und 8-13). Ein niedriger COMBI-Score ist mit einer signifikant besseren Prognose – bezogen auf die Länge des PFS – verbunden, als ein hoher COMBI-Score (medianes PFS 54, 13, 6 beziehungsweise 3 Monate). (Abbildung angepasst nach [82] und veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 4933651316969))

Abkürzungen: n = Anzahl; PFS = progressionsfreies Überleben

Der COMBI-Score setzt sich aus allen klinischen und histopathologischen Markern und allen molekularen Markern zusammen, die für die Berechnung des mGRAS-Scores beziehungsweise des molekularen Scores verwendet wurden. Die Proben wurden wiederum in vier Gruppen aufgeteilt und Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Patient*innen mit

ERGEBNISSE

einem niedrigen COMBI-Score von 0-2 (n = 24) hatten im Vergleich zu den anderen Gruppen ein deutlich längeres medianes PFS von 54 Monaten. Das mediane PFS bei Patient*innen mit einem COMBI-Score 3-4 (n = 32) lag bei 13 Monaten, mit einem COMBI-Score 5-7 (n = 32) bei 6 Monaten und und bei Patient*innen mit einem COMBI-Score 8-13 (n = 19) bei nur 3 Monaten (P<0,0001 per trend; Abbildung 26).

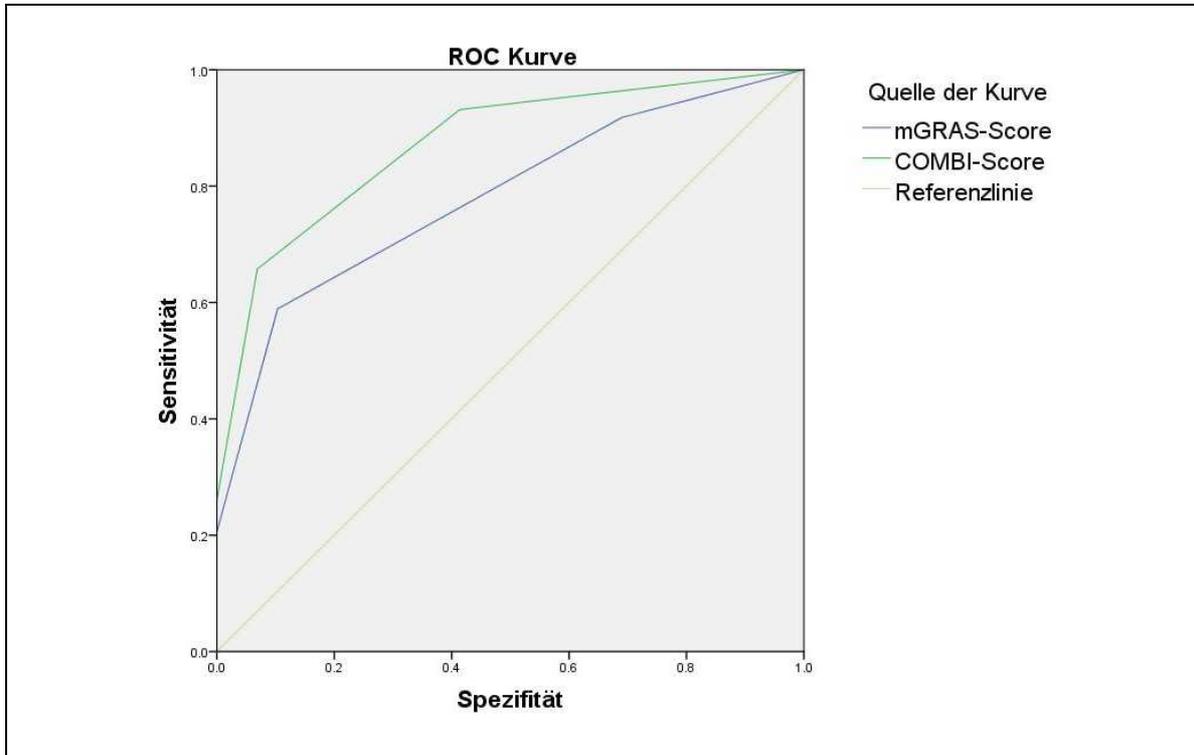


Abbildung 27: Vergleich der prognostischen Stärke des COMBI- und des mGRAS-Scores.

Der COMBI-Score (blaue Kurve) hat, verglichen mit dem mGRAS-Score (grüne Kurve), eine höhere Sensitivität und Spezifität, das Fortschreiten der Erkrankung innerhalb von 24 Monaten vorherzusagen. (Abbildung angepasst nach [82] und veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 4933651316969))

Mit der Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve; engl. receiver operating characteristic) konnte verdeutlicht werden, dass der COMBI-Score im Vergleich zum mGRAS-Score eine höhere Sensitivität (= Anzahl richtig positiver Proben/(Anzahl richtig positiver Proben plus Anzahl falsch negativer Proben); 93,2 % versus 91,8 %) und eine höhere Spezifität (= Anzahl richtig negativer Proben/(Anzahl richtig negativer Proben plus Anzahl falsch positiver Proben); 58,6 % versus 31,0 %) hat, das Fortschreiten der Krebserkrankung innerhalb von 24 Monaten vorherzusagen (Abbildung 27 und Tabelle 7)

ERGEBNISSE

Tabelle 7: Qualitätswerte des mGRAS-Scores im Vergleich zum COMBI-Score.

	mGRAS-Score	COMBI-Score
Sensitivität	91,8 %	93,2 %
Spezifität	31,0 %	58,6 %
positiver prädiktiver Wert	77,0 %	85,0 %
negativer prädiktiver Wert	60,0 %	77,3 %
Genauigkeit	74,5 %	83,3 %
Bereich unter der Kurve (95 % Konfidenzintervall)	0,78 (0,689 – 0,871)	0,872 (0,800 – 0,943)

Die Überlebenszeitanalysen mit den unterschiedlichen Scores (mGRAS-, molekularer und COMBI-Score) wurde außerdem für die Untergruppe von Patient*innen durchgeführt, bei denen eine komplette Entfernung des Tumorgewebes (R0) möglich war. Mit allen drei Scores ließen sich auch in dieser Gruppe von Patient*innen signifikant jeweils 4 Gruppen mit unterschiedlich langem medianen Überleben – in diesem Fall krankheitsfreiem Überleben (DFS) – unterscheiden.

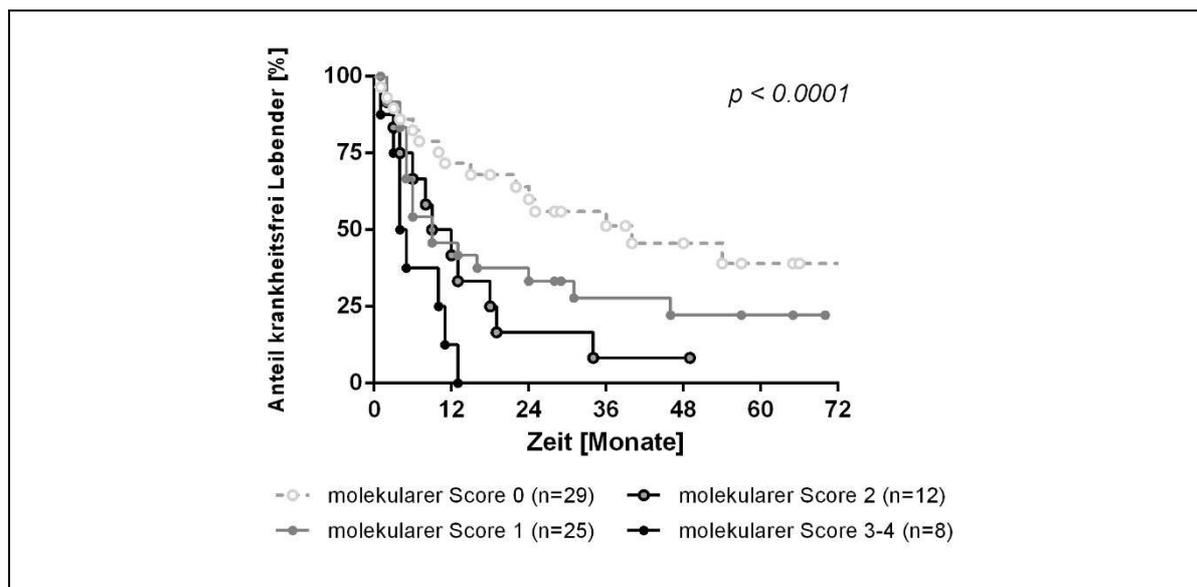


Abbildung 28: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – molekularer Score.

Einberechnet wurde die Anzahl an somatischen Varianten pro Probe (0 – 1 Varianten = 0 Punkte; ≥ 2 Varianten = 1 Punkt), Veränderungen in Signalwegen (keine Veränderungen/nur Veränderungen im P53/Rb-Signalweg = 0; nur Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg = 1; Veränderungen im Wnt/ β -Catenin und im P53/Rb-Signalweg = 2) und der Methylierungsstatus (Hypomethylierung (mittlere Methylierung ≤ 25 %) = 0; Hypermethylierung (mittlere Methylierung > 25 %) = 1). Die vier Gruppen (molekularer Score 0, 1, 2 bzw. 3-4) unterscheiden sich in ihrem DFS (medianes DFS 40, 9, 12 bzw. 4 Monate).

Abkürzungen: DFS = krankheitsfreies Überleben; n = Anzahl

Mit der Kombination der Sequenzierungsergebnisse zum molekularen Score können vier Gruppen mit einem medianen krankheitsfreien Überleben von 40, 9, 10,5 beziehungsweise

ERGEBNISSE

4,5 Monaten unterschieden werden (Abbildung 28). Die Kombination der klinischen und histopathologischen Marker zum mGRAS-Score lässt eine Differenzierung von vier Gruppen mit medianem DFS von 54, 24, 4,5 beziehungsweise 3 Monaten zu (Abbildung 29). Mit dem COMBI-Score war es jedoch möglich eine Untergruppe mit extrem langem medianen DFS von 240 Monaten zu identifizieren. Die drei Untergruppen mit einem COMBI-Score von 3-4, 5-7 beziehungsweise 8-10 hatten ein medianes DFS von 24, 5 oder 3 Monaten (Abbildung 30).

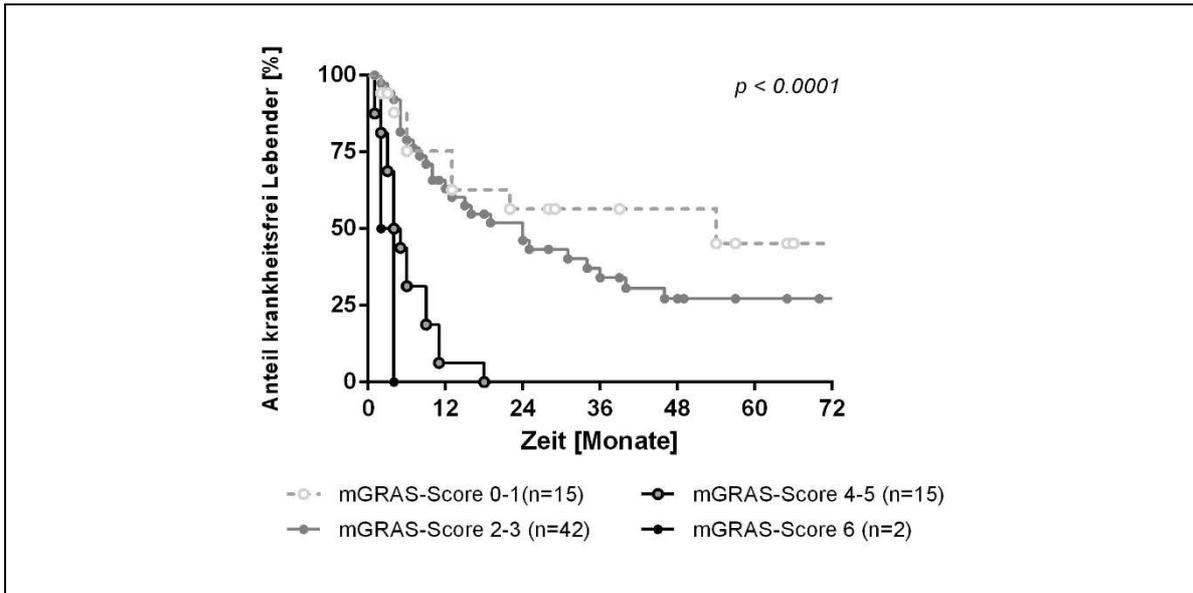


Abbildung 29: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – mGRAS-Score.

Patient*innen wurden anhand des ENSAT-Tumorstadiums (I-II = 0 Punkte; III = 1 Punkt; IV = 2 Punkte), des Proliferationsindex Ki-67 (0-9 = 0 Punkte; 10-19 = 1 Punkt; ≥ 20 = 2 Punkte), ihrem Alter (< 50 = 0 Punkte; > 50 = 1 Punkt) und dem Diagnosegrund (Symptomen: Nein = 0 Punkte/ Ja = 1 Punkt) einer von vier Gruppen mit unterschiedlichen mGRAS-Scores zugeordnet (0-1, 2-3, 4-5 bzw. 6-9), die sich signifikant in ihrem DFS unterscheiden (medianes DFS 54, 24, 4,5 bzw. 3 Monate). (Abbildung angepasst nach [82] und veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 5057701332674))

Abkürzungen: DFS = krankheitsfreies Überleben; n = Anzahl

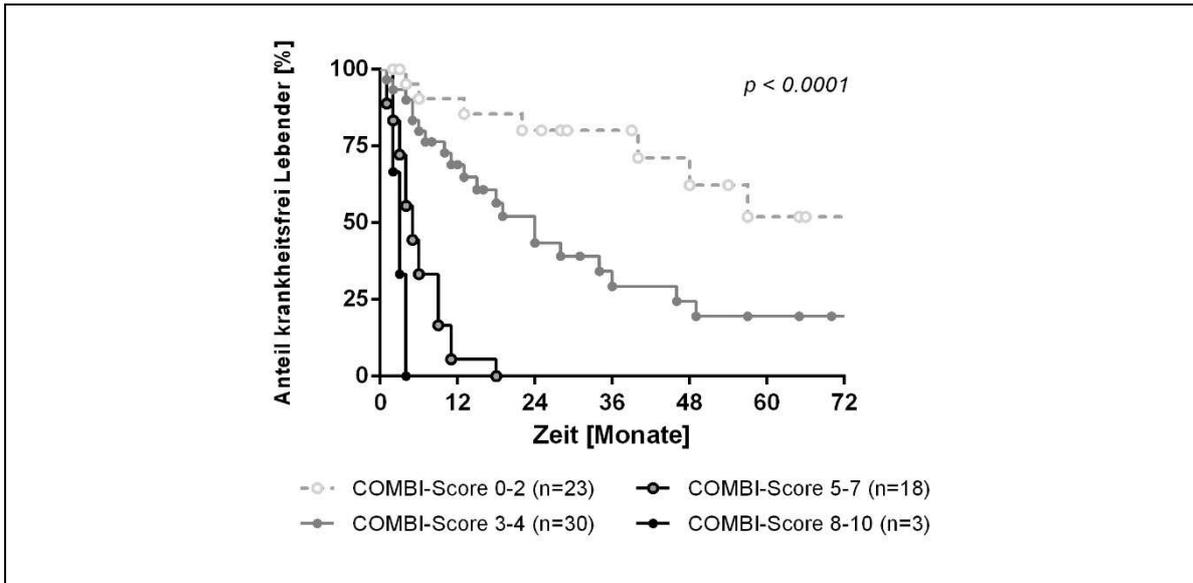


Abbildung 30: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – COMBI-Score.

Durch die Kombination von mGRAS- und molekularem Score wurde der COMBI-Score berechnet. Die Kohorte wurde so vier Gruppen mit unterschiedlichen Prognosen zugeordnet (COMBI-Score 0-2, 3-4, 5-7 und 8-10). Ein niedriger COMBI-Score ist mit einer signifikant besseren Prognose verbunden – bezogen auf die Länge des DFS – als ein hoher COMBI-Score (medianes DFS 240, 24, 5 bzw. 3 Monate). (Abbildung angepasst nach [82] und veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 5057701332674))

Abkürzungen: DFS = krankheitsfreies Überleben; n = Anzahl

3.1.5 Prädiktive Marker für das Ansprechen auf Standardtherapien

Das einzige für die Behandlung von NNR-Cas zugelassene Medikament Mitotane führt häufig zur Entwicklung von Resistenzen beziehungsweise das nötige Serumlevel von 14 mg/ml wird nicht erreicht. In der Kohorte wurde daher untersucht, ob sich molekulare Marker finden lassen, die eine Vorhersage auf das Ansprechen auf die Therapie ermöglichen.

Der Zusammenhang zwischen molekularen Markern und dem Ansprechen auf die Standardtherapien wurde sowohl bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung als auch mit fortgeschrittenem NNR-Ca untersucht. Bei Patient*innen mit lokalisierter Erkrankung war der niedrige COMBI-Score (0-2) geringfügig besser geeignet, das krankheitsfreie Überleben vorherzusagen als ein niedriger mGRAS-Score (0-1). Dies wurde sowohl bei Patient*innen gefunden, die eine adjuvante Therapie mit Mitotane erhalten hatten (n = 39; P = 0.0001 im Vergleich zu P = 0.0058) als auch bei einer vergleichbaren Gruppe von Erkrankten, die keine adjuvante Therapie erhalten hatten (n = 49; p = 0.0001 im Vergleich zu p = 0.0008). Dies legt die Vermutung nahe, dass kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Veränderungen und dem Ansprechen auf die Therapie besteht.

Bei NNR-Ca-Patient*innen in fortgeschrittenem Stadium oder mit schnellem Progress der Erkrankung werden auch andere Therapeutika ergänzend oder alternativ zu Mitotane eingesetzt. Auch bei Patient*innen mit fortgeschrittener Erkrankung wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen molekularen Markern und dem objektiven Ansprechen auf Therapien oder der Zeit bis zum Progress unter Therapie (Monotherapie mit Mitotane (n = 34), Etoposid-Doxorubicin-Cisplatin (n = 52), Gemcitabin plus Capecitabin (n = 36) und/oder Streptozotozin (n = 44)) gesehen.

3.1.6 Neue Therapieziele

Ziel der Arbeit war es auch, in der untersuchten Kohorte potentielle neue Therapieziele zu identifizieren. Das Comprehensive Cancer Panel war deswegen für die Sequenzierungen in der retrospektiven Studie gewählt worden, weil damit verschiedene Gene untersucht werden konnten, die als prädiktive Marker beschrieben sind (32 der 160 Gene). Mit bestimmten Varianten in diesen Genen lässt sich das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen. In beiden Kohorten ließen sich Varianten finden, die in anderen Tumorentitäten als prädiktive Marker für zielgerichtete Therapien verwendet werden. Bei anderen Genen und Varianten gibt es starke Hinweise für ihre Rolle als prädiktive Marker, die jedoch noch nicht routinemäßig eingesetzt werden. In Abbildung 31 ist eine Aufgliederung der prädiktiven Marker nach Evidenzlevel zu sehen [105]. Die Gene, die mit dem Comprehensive Cancer Panel untersucht wurden und bei denen Varianten bereits als prädiktive Marker bekannt sind, wurden dem entsprechenden Evidenzlevel farblich zugeordnet.

Die Veränderungen, die bei den jeweiligen Genen als prädiktive Marker verwendet werden, können sehr unterschiedlich sein. Es kann sich um ganz spezielle Einzelnukleotidaustausche handeln oder generell alle onkogenen Varianten in einem Gen, Genfusionen oder Amplifikationen. Unterschiedliche Varianten sind bei einigen Genen verschiedenen Evidenzleveln zugeordnet und können auch – wie zum Beispiel verschiedene *ABL1*-Varianten – als prädiktive Marker für das Ansprechen auf eine Therapie (*BCR-ABL1*-Fusionen; Evidenzlevel 1) oder die Entwicklung von Resistenzen (missense Variante, die zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin an p.315 führt bei bestimmten Therapeutika; Evidenzlevel R1) dienen. [105] (Stand 2019)

ERGEBNISSE

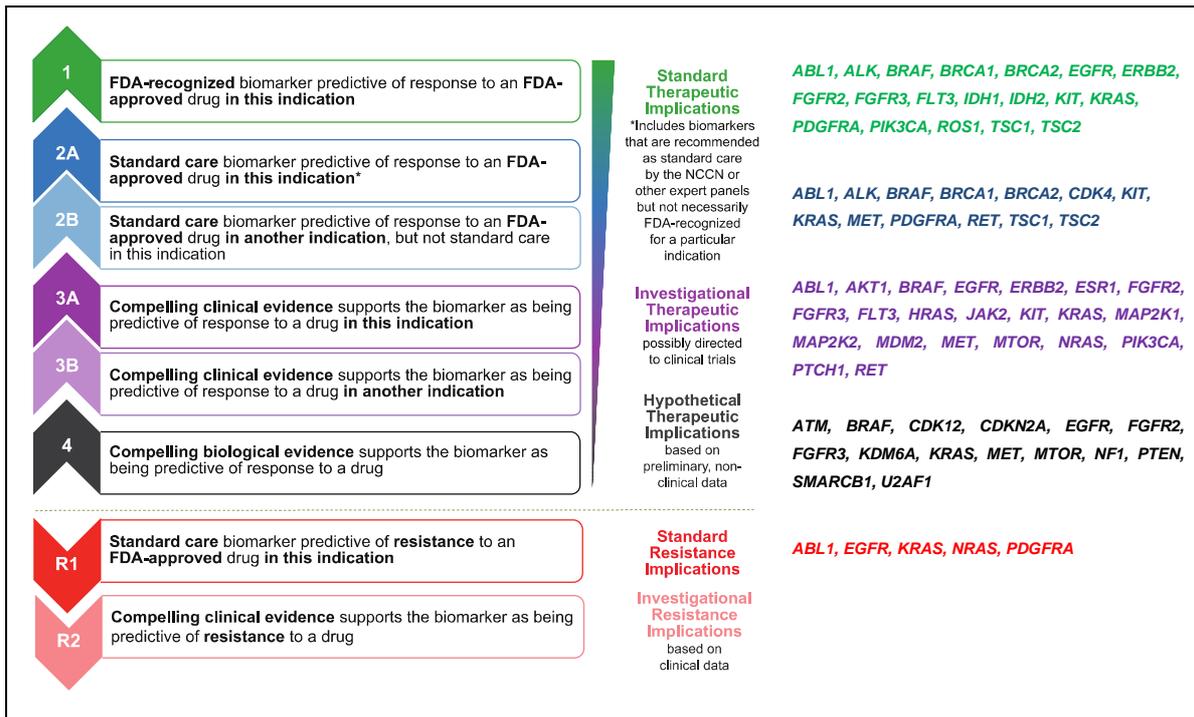


Abbildung 31: Evidenzlevel von prädiktiven Biomarkern (Stand 2019).

Die unterschiedlichen Evidenzlevel der prädiktiven Marker und Gene aus dem Human Comprehensive Cancer Panel, die diesen zugeordnet werden können. Ergänzend zur Abbildung von Chakravaty et al. [105] in der linken Bildhälfte (veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. (Lizenznummer: 5017630821406)) sind rechts die targetierbaren Gene gelistet und farbig dem entsprechenden Evidenzlevel (1-4 beziehungsweise R1 und R2) zugeordnet, die mit dem Human Comprehensive Cancer Panel angereichert wurden.

Abkürzungen: FDA = Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (engl. Food and Drug Administration); NCCN = National Comprehensive Cancer Network

Level 1 = von der FDA anerkannter Biomarker, der prädiktiv für das Ansprechen auf eines von der FDA genehmigten Medikaments bei einer bestimmten Erkrankung ist = Standardtherapie; **Level 2A** = standardmäßig verwendeter Biomarker, der prädiktiv für das Ansprechen auf eines von der FDA genehmigten Medikaments bei einer bestimmten Erkrankung ist; **Level 2B** = standardmäßig verwendeter Biomarker, der prädiktiv für das Ansprechen auf eines von der FDA genehmigten Medikaments bei einer bestimmten Erkrankung ist, aber nicht Standardtherapie bei einer anderen Indikation; **Level 3A** = überzeugende klinische Evidenz dafür, dass ein Biomarker als prädiktiver Marker bei einer bestimmten Indikation dienen kann; **Level 3B** = überzeugende klinische Evidenz dafür, dass ein Biomarker als prädiktiver Marker bei einer anderen Indikation dienen kann; **Level 4** = überzeugende biologische Evidenz, dass ein Biomarker prädiktiv für das Ansprechen auf ein Medikament sein könnte; **Level R1** = Standard-Biomarker für die Entwicklung von Resistenzen auf eines von der FDA genehmigten Medikaments bei einer bestimmten Indikation; **Level R2** = überzeugende klinische Evidenz, dafür dass ein Biomarker als prädiktiver Marker für die Entwicklung von Resistenzen auf ein Medikament dienen kann.

Bei 64 von 107 Patient*innen wurden in den Tumoren Veränderungen in Genen gefunden, die bei OncoKB als prädiktive Marker den Evidenzleveln 1-4 zugeordnet sind. Nicht alle gefundenen Varianten sind jedoch als prädiktive Marker beschrieben. Wenn auch die genaue Variante in die Auswertung einbezogen wird, fallen die Proben weg, bei denen Varianten gefunden wurden, die bei dem entsprechenden Gen (noch) nicht als prädiktive Marker bekannt sind. Übrig bleiben dann 49 Tumorproben, bei denen Varianten detektiert

ERGEBNISSE

wurden, für die es Therapeutika gibt, die bei anderen Tumorentitäten bereits in der klinischen Anwendung sind oder in klinischen Studien untersucht wurden (Tabelle 8). Dazu gehören *CDK4*-Amplifikationen, die bei 46 Proben (43 % der Kohorte) gefunden wurden.

Neben *CDK4*-Varianten sind in Tabelle 8 noch *BRAF*- und *MDM2*-Varianten als prädiktive Marker mit Evidenzlevel 1 – 3A aufgelistet. Bei beiden Genen waren in dieser Kohorte jedoch nur verhältnismäßig wenige Proben von Veränderungen betroffen (1,8 % mit *BRAF*-Veränderungen und 7,0 % mit *MDM2*-Amplifikationen).

Der Vollständigkeit halber sind in Tabelle 9 Gene aufgelistet, bei denen Varianten als prädiktive Marker bei OncoKB zu finden sind, in dieser Kohorte jedoch nicht die entsprechenden bekannten, targetierbaren Varianten gefunden wurden, sondern Varianten, die nach dem derzeitigen Stand der Forschung nicht als Marker beschrieben sind. Außerdem sind Gene und Varianten aufgeführt, die dem Evidenzlevel 4 zugeordnet sind, da es bisher nur biologische Hinweise gibt, dass die gelisteten Therapeutika für die Behandlung angewendet werden könnten. Alle Gene waren außerdem nur in einem sehr geringen Teil der Kohorte von Veränderungen betroffen. Dazu gehören auch *BRCA1*- und *BRCA2*-Varianten und Veränderungen in *EGFR*, *KIT*, *RET* und *TSC1* und *TSC2*, bei denen die potentiellen Therapeutika ein hohes Evidenzlevel hätten.

ERGEBNISSE

Tabelle 8: Potentielle Therapieziele mit Evidenzlevel 1-3A – retrospektive Studie.

Gelistet sind Gene, die bei OncoKB als prädiktive Marker mit Evidenzlevel 1-3A gelistet sind und die entsprechenden targetierbaren Veränderungen auf DNA-Ebene gefunden wurden (Stand 2019). Die Daten wurden bereits publiziert [82].

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>CDK4</i>	Cyclin-abhängige Kinase	Amplifikationen missense V	43 1.8	CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib/Abemaciclib/Ribociclib)	2A (Liposarkom) -
<i>MDM2</i>	P53-Regulator	Amplifikation	7.0	MDM2-Inhibitoren (DS-3032b, RG7112)	3A (Liposarkom)
<i>BRAF</i>	Serin-/Threonin-Kinase	missense V	1.8	BRAF-Inhibitoren (Vemurafenib/Dabrafenib) MEK-Inhibitoren (Trametinib/Cobimetinib)	1 (kutanes Melanom) 2A (NSCLC)

Abkürzungen: NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; V = Variante

^A Evidenzlevel nach OncoKB für die in Klammern genannte Tumorentität [105]. Siehe auch Abbildung 31.

Tabelle 9: Therapieziele mit Evidenzlevel 4 oder nicht targetierbare Varianten in potentiellen Therapiezielen – retrospektive Studie.

Gelistet sind Gene, die bei OncoKB als prädiktive Marker aufgeführt sind, bei denen in der untersuchten Kohorte jedoch nicht die entsprechenden targetierbaren Veränderungen auf DNA-Ebene gefunden wurden beziehungsweise Gene und Varianten mit niedrigem Evidenzlevel. Das angegebene Evidenzlevel und die verfügbaren Therapeutika gelten für die bei OncoKB gelisteten Veränderungen (Stand 2019). Die Daten wurden bereits publiziert [82]

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>ATM</i>	DNA-Reparatursystem	missense V	1.8	PARP-Inhibitor (Olaparib) (synthetische Letalität)	4 (Prostatakarzinom) ^B
<i>BRCA1</i>	DNA-Reparatursystem	Del oder missense V	2.8	PARP-Inhibitor (Rucaparib/Olaparib/Nirapanib) (synthetische Letalität)	1-2° (Eierstockkrebs) ^B
<i>BRCA2</i>	DNA-Reparatursystem	missense V	2.8	PARP-Inhibitor (Rucaparib/Olaparib/Nirapanib) (synthetische Letalität)	1-2° (Eierstockkrebs) ^B
<i>EGFR</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	4,7	TKI (Afatinib/Erlotinib/Gefitinib)	1 (NSCLC) ^B

ERGEBNISSE

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>ESR1</i>	Estrogenrezeptor	missense V	0.9	AZD9496 (Fulvestrant)	3A (Brustkrebs) ^B
<i>FGFR2</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	0,9	TKI (Erdafitinib)	4 (alle soliden Tumoren)
<i>EGFR</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	4,7	TKI (Afatinib/Erlotinib/Gefitinib)	1 (NSCLC) ^B
<i>ESR1</i>	Estrogenrezeptor	missense V	0.9	AZD9496 (Fulvestrant)	3A (Brustkrebs) ^B
<i>FGFR2</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	0,9	TKI (Erdafitinib)	4 (alle soliden Tumoren)
<i>KDM6A</i>	Chromatin-modifizierendes Enzym	missense V Delins mit/ohne LRV	3,7	EZH2-Inhibitor (Tazemostat)	4 (Blasenkarzinom)
<i>KIT</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	0.9	TKI (Imatinib/Sunitinib)	1 (GIST) ^B 2A (Melanom)
<i>NF1</i>	RAS/MAPK-Regulation	missense V nonsense V, SS-Varianten Delins mit LRV	11.2	MEK-Inhibitor (Trametinib/Cobimetinib)	4 (alle soliden Tumoren)
<i>NOTCH1</i>	NOTCH Signalweg	Amplifikationen missense V nonsense V	21.5 3.7 0.9	γ-Sekretase-Inhibitor (PF-03084014)	4 (alle Tumoren)
<i>PTCH1</i>	Sonic-Hedgehog-Rezeptor	missense V	1.8	Hedgehog-Inhibitor (Sonidegib)	3A (Hautkrebs)
<i>RET</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	0.9	TKI (Cabozantinib)	2A (NSCLC) ^B
<i>TSC1</i>	mTOR-Pfad	Del mit LRV missense V	1.8 0.9	mTOR-Inhibitor (Everolimus)	2A (ZNS + Nierenkarzinom) ^B
<i>TSC2</i>		missense V	0.9	mTOR-Inhibitor (Everolimus)	2A (ZNS + Nieren-Ca) ^B

Abkürzungen: Ca = Karzinom; Del = Deletion; Delins = Deletion und Insertion; DNA = Desoxyribonukleinsäure; GIST = Gastrointestinaler Stromatumor; LRV = Leserasterverschiebung; NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; TKI = Tyrosinkinaseinhibitor; V = Variante; ZNS = Zentrales Nervensystem

^A Evidenzlevel nach OncoKB für die in Klammern genannte Tumorentität [105]. Siehe auch Abbildung 31

^B Gene, bei denen in der untersuchten Kohorte nicht die eigentlich targetierbaren Varianten gefunden wurden.

Überprüfung der *CDK4*-Amplifikationen

Da *CDK4*-Amplifikationen in dieser Kohorte das häufigste und vielversprechendste targetierbare Ereignis waren, wurden diese stichprobenartig mittels FISH-Analysen überprüft. Dafür wurden zwei Kontrollproben, jeweils zwei Proben mit heterozygoter *CDK4*-Amplifikation beziehungsweise mit Überamplifikation von *CDK4* (hier in Anlehnung an die Bezeichnung bei GensearchNGS als homozygote Amplifikation bezeichnet) verwendet. Von allen Proben wurde die Anzahl der Fluoreszenzsignale in 200 klar abgegrenzten Zellen ausgezählt. In den zwei Kontrollproben, die in der NGS-Analyse keine *CDK4*-Amplifikation hatten, wurden hauptsächlich Zellen mit einem *CDK4*-Signal beziehungsweise zwei *CDK4*-Signalen gefunden (Anteil 93,5 % beziehungsweise 84 %). Bei den Proben, bei denen mit der NGS-Analyse eine heterozygote Amplifikation von *CDK4* gefunden wurde, wurden Zellen mit zwei *CDK4*-Signalen (37 % und 57,5 %) nachgewiesen, aber auch ein großer Anteil an Zellen mit drei (41,5 % beziehungsweise 26 %) oder vier (14,5 % beziehungsweise 13,5 %) Signalen. In den Proben, die anhand der NGS-Daten als homozygot amplifiziert eingestuft wurden, wurden neben Zellen mit zwei *CDK4*-Signalen (18 % beziehungsweise 23,5 %) jeweils bei über 60 % der Zellen drei bis acht *CDK4*-Signale detektiert. In Abbildung 32 sind die genauen Zahlen zu den jeweils ausgezählten *CDK4*-Signalen in den 200 Zellen zu finden. Außerdem ist zu jeweils einer Probe die Aufnahme eines exemplarischen Ausschnitts des gefärbten FFPE-Schnitts zu sehen. Mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) blau gefärbt ist die DNA. Grün fluoreszieren die Sonden, die an *CDK4* binden, rot die Kontrollsonden, die an die Zentromerregion binden. Zu jeder Probe mit Foto ist auch die graphische Darstellung der CNA-Analyse der NGS-Daten abgebildet.

ERGEBNISSE

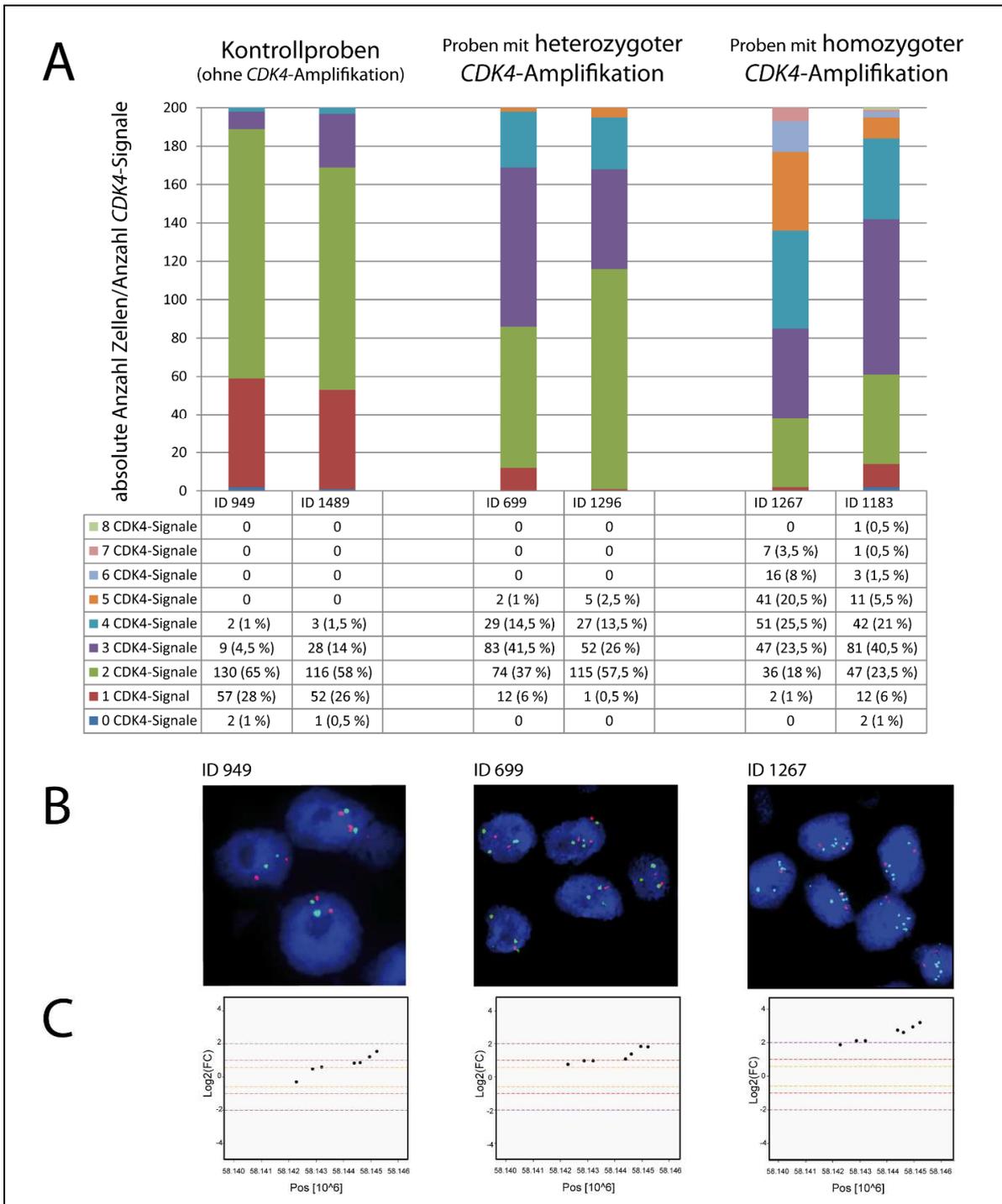


Abbildung 32: Überprüfung der *CDK4*-Kopienzahlveränderungen mittels FISH-Analysen.

A) Ergebnisse zur Auszählung der *CDK4*-Signale (zwischen 0 und 8 pro Zelle) von insgesamt 200 Zellen pro Probe. B) Exemplarischer Ausschnitt je eines gefärbten FFPE-Schnitts pro Gruppe (grün = *CDK4*-Signal; rot = Zentromerregion; blau = DNA mit DAPI gefärbt). C) Graphische Darstellung der CNA-Analyse der NGS-Daten von *CDK4* von drei Proben. Ein Punkt entspricht einem Amplikon. Abweichungen nach oben von der Nulllinie in der Mitte der Grafik aus sind mit Amplifikationen des jeweiligen Amplikons gleichzusetzen. Die Teile B und C der Abbildung wurden bereits publiziert [82] und werden hier mit Genehmigung der Oxford University Press veröffentlicht (Lizenznummer: 4933651316969).

Abkürzungen: ID = Identifikator

3.2 Prospektive Studie

Die prospektive Studie sollte der Validierung der Daten der retrospektiven Studie dienen. Im Rahmen dieses zweiten Projektteils war die Untersuchung von 100 Tumorproben geplant. Bis zur Abgabe dieser Arbeit wurden 52 Proben von 50 NNR-Ca-Patient*innen sequenziert und ausgewertet. Bei den Tumorkombis handelt es sich um einen Primärtumor und eine Metastase beziehungsweise einen Primärtumor und ein Rezidiv. Die bisherigen Ergebnisse der NGS- und Methylierungsanalysen werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Von den Tumorkombis wurden die Daten des zuletzt entnommenen Tumors (also Metastase beziehungsweise Rezidiv) mit einbezogen. Wie in der retrospektiven Studie werden die Daten der Tumorkombis aber auch in einem separaten Abschnitt verglichen (siehe 3.3).

Aus den NGS-Daten wurden ebenfalls Informationen über die somatischen SNVs, die kleinen Indels und die CNAs gezogen und Signalwegen zugeordnet. Nicht mehr analysiert wurden die CN-Signaturen, da die Datenanalyse – im Hinblick auf die routinemäßige Anwendung – zu ungenau und zeitaufwendig wäre. Hinzu kommt, dass mit der Umstellung auf das Custom-Panel nur noch 100 Gene sequenziert werden, was die analysierten Bereiche – im Vergleich zu einem Exom oder Genom – noch weiter eingrenzt. Die Methylierungsanalysen von *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* wurden unverändert durchgeführt.

3.2.1 Sequenziererergebnisse

Mutationslast

Bei der Auswertung der Sequenzierdaten der prospektiven Studie wurden in den 50 untersuchten Tumorproben insgesamt 93 Varianten gefunden (somatische SNVs, kleine Indels und intronische Varianten), die den beschriebenen Filterkriterien (siehe 2.6.3) entsprechen. Angaben zu allen Varianten sind im Anhang zu finden (siehe 7 Tabelle 17). Mit der Anzahl der Varianten pro Tumor wurde, entsprechend zur retrospektiven Studie, die Mutationslast berechnet, die bei dieser Kohorte im Median bei 2,8 Varianten/Mb (Mittelwert: 5,3 Varianten/Mb; Minimum 0, Maximum 25,6 \pm 9 Varianten).

Somatische SNVs und kleine Indels

Berücksichtigt man nur die proteinverändernden somatischen SNVs und kleinen Indels, wurden in 13 Tumoren keine Varianten gefunden (26 % der Kohorte). In 18 Proben wurde jeweils eine Variante detektiert (36 %). 19 NNR-Cas hatten zwei oder mehr Varianten (38 %).

In einem Tumor wurden sieben proteinverändernde somatische Varianten gefunden, was in diesem Studienteil das Maximum war.

Die Veränderungen wurden in 34 der 100 untersuchten Gene gefunden. Die meisten Varianten wurden wieder in *TP53* (14 V(Varianten) in 13 P(Patient*innen)) detektiert. Weitere, wiederholt veränderte Gene waren *CTNNB1* (8 V in 8 P), *MEN1* (7 V in 6 P), *ZNRF3* (5 V in 5 P), *ATRX* (4 V in 3 P), *ARID1A* (4 V in 2 P), *CREBBP* (3 V in 3 P) und *APC* (3 V in 3 P). Die missense und trunkierenden Varianten, die in *TP53* gefunden wurden, befanden sich – wie auch schon im retrospektiven Studienteil – in der DNA-Bindedomäne. Alle *CTNNB1*-Varianten wurden an Position p.41 beziehungsweise p.45 gefunden, was auch schon ein Hotspot für Veränderungen in der retrospektiven Studie war. In den anderen Genen wurden zwar jeweils weniger Varianten detektiert, aber auch hier finden sich – im Vergleich zur retrospektiven Studie oder den Varianten der NNR-Ca-TCGA-Kohorte – gleiche Verteilungen oder hauptsächlich gleiche Variantenarten. In *MEN1* – in der prospektiven Studie nach *TP53* und *CTNNB1* am häufigsten verändert – finden sich zum Beispiel hauptsächlich trunkierende Varianten (5 von 7). Im Anhang in Abbildung 39 bis Abbildung 50 sind zum Vergleich zusätzlich zu den Varianten der retrospektiven Studie pro Gen auch die Varianten der prospektiven Studie angegeben.

Kopienzahlveränderungen

In den 50 bisher untersuchten Tumorproben wurden insgesamt 96 Kopienzahlveränderungen (Amplifikationen und Deletionen) gefunden. Wie auch bei den SNVs und kleinen Indels wurden in einem Teil der Proben keine CNAs detektiert (n = 23; 46 %). Bei fünf Tumoren wurde entweder eine Amplifikation oder eine Deletion in einem Gen gefunden (10 %). 44 % (n = 22) der Kohorte hatten zwei oder mehr Kopienzahlveränderungen. Genaue Angaben hierzu sind im Anhang zu finden (siehe 7 Tabelle 18).

Betroffen von Kopienzahlveränderungen waren 42 der 100 Gene des Custom Panels. *CDK4* war – wie auch schon in der retrospektiven Studie – am häufigsten verändert. Amplifikationen dieses Gens wurden bisher in 14 % der Tumorproben (n = 7) gefunden. Außerdem wurden bei jeweils sechs Tumorproben Kopienzahlveränderungen von *NOTCH1* (12 % der Proben) und *TERT* (12 %) detektiert. Jeweils 8 % der Kohorte (n = 4) hatten Kopienzahlveränderungen in *FGFR3*, *MDM2*, *JAK2*, *ATM*, *KREMEN1* und *GNA11*. In diesem Projektteil können nun auch Informationen zu Kopienzahlveränderungen in *ZNRF3* und *CDKN2A* gesammelt werden. Von beiden Genen ist bekannt, dass sie in NNR-Cas häufig deletiert sind [55]. Deletionen von *CDKN2A* wurden in vier Tumoren gefunden (8 % der Kohorte), Deletionen von *ZNRF3* in 3 Tumoren (6 % der Kohorte).

Zuordnung der somatischen Veränderungen (SNVs, kleine Indels und CNAs) zu Signalwegen

Auch die bisher gefundenen Veränderungen der prospektiven Studie wurden Signalwegen zugeordnet. In dieser Kohorte sind ebenfalls häufig Veränderungen im P53/Rb-Signalweg (48 % der Kohorte) und im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (36 % der Kohorte) zu finden. Dabei wurden in 8 Proben (16 %) Veränderungen in beiden Signalwegen gefunden, wovon wiederum eine Probe (2 %) sowohl eine *TP53*- als auch eine *CTNNB1*-Variante trägt. In 10 Proben (20 %) wurden nur in Genen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und in 17 Tumoren (34 %) nur in Genen des P53/Rb-Signalweges Varianten gefunden. Auch Gene, deren Produkte eine Rolle bei der Remodellierung von Chromatin spielen, waren wieder von Veränderungen betroffen (insgesamt 40 % der Kohorte). Seltener wurden Varianten in Genen des NOTCH-Signalwegs detektiert (12 %) oder fanden sich Veränderungen in den Genen, deren Produkte eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen (BRCA-DNA-Reparatur: 16 %; DNA-Mismatch-Reparatur: 6 %). Bei den Varianten handelt es sich um Kopienzahlveränderungen, Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen. (Abbildung 33)

Methylierungsanalysen

Die Methylierungsanalysen der CpG-Inseln der vier Gene *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* wurden in der prospektiven Studie unverändert fortgeführt. Für die mittlere Methylierung des Promotorbereichs von *GSTP1* wurden Werte zwischen 1 % und 62 % gefunden. Bei *PAX5* konnten Methylierungswerte zwischen 1 % und 56 % ermittelt werden, bei *PAX6* zwischen 2 % und 82 %. Für die Promotorbereiche von *PYCARD* wurden Methylierungswerte zwischen 1 % und 94 % gemessen. So konnten in diesem Studienteil bisher 30 Tumorproben (60 % der Kohorte) als hypomethyliert und 20 Proben (40 % der Kohorte) als hypermethyliert eingestuft werden. Die mittlere Methylierung aller untersuchten Promotorbereiche der Blutproben lag bei 2 % (Min 2 %, Max 3 %). Die Blutproben wurden daher alle als unmethyliert eingestuft.

ERGEBNISSE

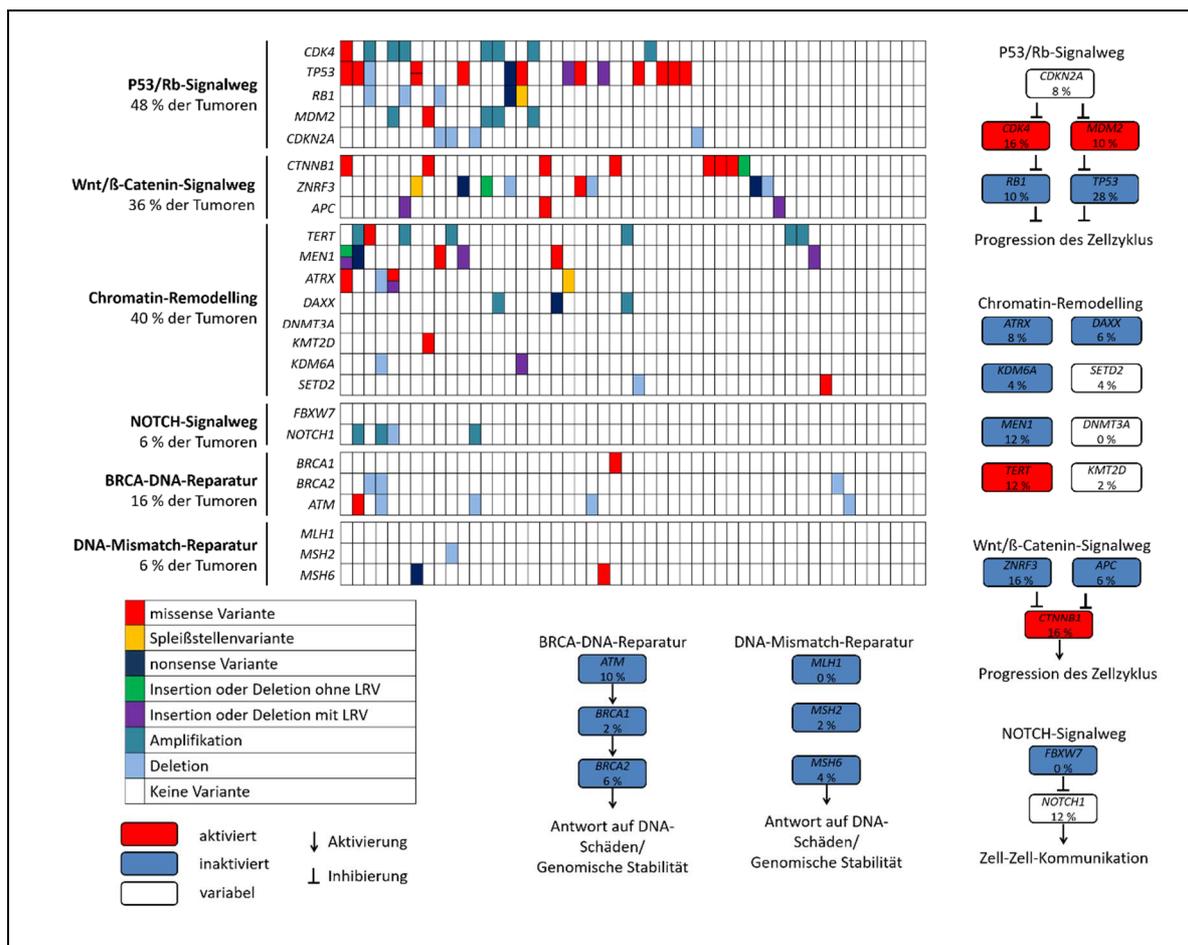


Abbildung 33: Häufig von Varianten betroffene Signalwege in der prospektiven Studie.

Durch die Auswertung der NGS- und Sanger-Sequenzierungsdaten konnten somatische Varianten gefunden werden, die Veränderungen – sowohl die Proteinsequenzen als auch das Expressionslevel betreffend – in den dargestellten Signalwegen (P53/Rb-, Wnt/ β -Catenin und NOTCH-Signalweg, DNA-Reparatur und Chromatin-Remodelling) verursachen. Zu jeder Tumorprobe (entspricht einer Spalte; n = 50; sortiert nach Variantenanzahl) sind die in den analysierten Genen gefundenen Varianten entsprechend ihrer Art (siehe Legende links unten) farbig markiert. Die unter den Bezeichnungen der Signalwege links angegebenen Prozentzahlen geben den Anteil der betroffenen Proben pro Signalweg an. In den schematisch dargestellten Signalwegen (unten und rechts) ist der Anteil der Veränderungen für jedes Gen angegeben, außerdem, ob die Veränderungen aktivierend oder inaktivierend wirken (rot beziehungsweise blau; weiß \triangleq variabel). Ob die Genprodukte in den Signalwegen eigentlich eine aktivierende oder inaktivierende Funktion haben, wird durch einen Pfeil oder einen Balken verdeutlicht. (Vorlage für schematische Darstellung der Signalwege erstellt von Dr. Silke Appenzeller (CCC Mainfranken, Core Unit Bioinformatik))

Abkürzungen: CNA = Kopienzahlveränderung; LRV = Leserasterverschiebung; NA = keine Angaben

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalysen aller Gene für alle Tumor- und Blutproben dargestellt. Die Proben sind nach der Länge des PFS der Patienten sortiert und für die Tumorproben sind – neben der mittleren Methylierung – auch die Methylierungsstatus für alle Gene einzeln dargestellt.

ERGEBNISSE

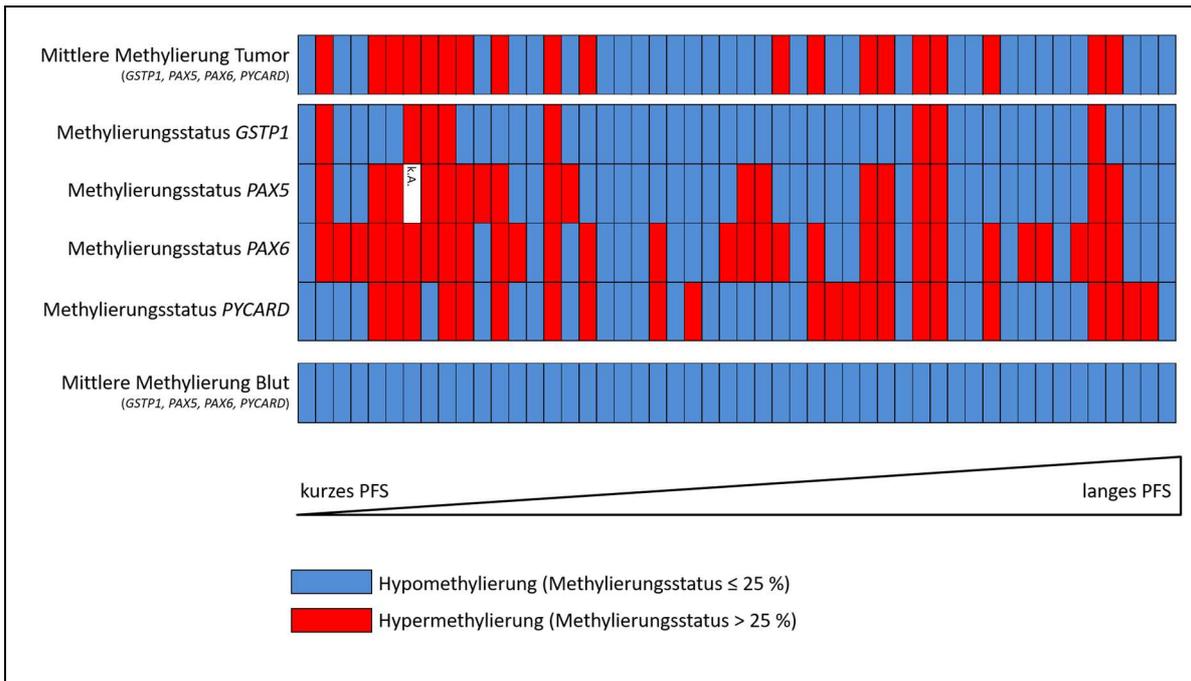


Abbildung 34: Methylierungsergebnisse der prospektiven Studie.

In der Heatmap dargestellt sind die ermittelten Methylierungswerte – unterschieden in Hypomethylierung (Methylierungsstatus von 0 – 25 % (blau)) und Hypermethylierung (Methylierungsstatus > 25 % (rot)) – aller in der prospektiven Studie untersuchten Tumorpoben (oberste Zeile) und Blutproben (unterste Zeile). Für die Tumorpoben sind auch die Methylierungsstatus der vier untersuchten Gene (*GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD*) einzeln dargestellt (Reihe 2 – 4). Jede Spalte entspricht einer Tumورprobe (n = 50), die nach der Länge des progressionsfreien Überlebens der Patient*innen sortiert sind.

Abkürzungen: k.A. = keine Angaben; PFS = progressionsfreies Überleben

3.2.2 Neue Therapieziele

Von den potentiellen neuen Therapiezielen, die bereits im Abschnitt 3.1.6 für die retrospektive Studie gelistet wurden, fanden sich auch in den bisher untersuchten Tumorpoben der prospektiven Studie einige wieder. Amplifikationen von *CDK4*, die in der Kohorte der retrospektiven Studie vielversprechendster prädiktiver Marker waren, wurden bei 12 % der Tumoren (n = 6) gefunden. Neben *CDK4*-Varianten sind in Tabelle 10 außerdem *MDM2*-Varianten als prädiktive Marker gelistet. *MDM2* war bei 8 % der Tumoren amplifiziert (n = 4) und in einem Tumor wurde eine missense Variante gefunden (2 %).

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Potentielle Therapieziele mit Evidenzlevel 1-3A – prospektive Studie.

Gelistet sind Gene, die bei OncoKB als prädiktive Marker mit Evidenzlevel 1-3A gelistet sind und die entsprechenden targetierbaren Veränderungen auf DNA-Ebene gefunden wurden (Stand 2019).

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>CDK4</i>	Cyclin-abhängige Kinase	Amplifikationen missense V	14 2	CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib/Abemaciclib/Ribociclib)	2A (Liposarkom)
<i>MDM2</i>	P53-Regulator	Amplifikationen missense V.	8 2	MDM2-Inhibitoren (DS-3032b, RG7112)	3A (Liposarkom)

Abkürzungen: V = Variante

^A Evidenzlevel nach OncoKB für die in Klammern genannte Tumorentität [105]. Siehe auch Abbildung 31.

Tabelle 11: Therapieziele mit Evidenzlevel 4 oder nicht targetierbaren Varianten in potentiellen Therapiezielen.

Gelistet sind Gene, die bei OncoKB als prädiktive Marker aufgeführt sind, bei denen in der untersuchten Kohorte jedoch nicht die entsprechenden targetierbaren Veränderungen auf DNA-Ebene gefunden wurden beziehungsweise Gene und Varianten mit niedrigem Evidenzlevel. Das angegebene Evidenzlevel und verfügbaren Therapeutika gelten für die bei OncoKB gelisteten Varianten.

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>ATM</i>	DNA-Reparatursystem	missense V	2	PARP-Inhibitor (Olaparib) (synthetische Letalität)	1 (Prostatakarzinom) ^B
<i>BRCA1</i>	DNA-Reparatursystem	missense V	2	PARP-Inhibitor (Rucaparib/Olaparib/Nirapanib) (synthetische Letalität)	1-2° (Eierstockkrebs) ^B
<i>BRCA2</i>	DNA-Reparatursystem	Deletionen	6	PARP-Inhibitor (Rucaparib/Olaparib/Nirapanib) (synthetische Letalität)	1-2° (Eierstockkrebs) ^B
<i>EGFR</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	2	TKI (Afatinib/Erlotinib/Gefitinib)	1 (NSCLC) ^B
<i>FGFR3</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	2	TKI (Erdafitinib)	4 (alle soliden Tumoren)

ERGEBNISSE

Gen	Funktion	Detektierte Veränderung auf DNA-Level	Anteil Proben [%]	Potentielle, zielgerichtete Therapeutika	Evidenzlevel ^A (Tumorentität)
<i>KDM6A</i>	Chromatin-modifizierendes Enzym	Delins mit/ohne LRV	2	EZH2-Inhibitor (Tazemostat)	4 (Blasenkarzinom)
<i>KIT</i>	Rezeptortyrosinkinase	missense V	2	TKI (Imatinib/Sunitinib)	1 (GIST) ^B 2A (Melanom)
<i>NF1</i>	RAS/MAPK-Regulation	nonsense V Splicesite-V	2 2	MEK-Inhibitor (Trametinib/Cobimetinib)	4 (alle soliden Tumoren)
<i>NOTCH1</i>	NOTCH Signalweg	Amplifikationen Deletionen	6 2	γ-Sekretase-Inhibitor (PF-03084014)	4 (alle Tumoren)
<i>RET</i>	Rezeptortyrosinkinase	Amplifikation	2	TKI (Cabozantinib)	2A (NSCLC) ^B
<i>SMARCB1</i>	Chromatin-Remodellierung	Deletion	2	EZH2-Inhibitor (Tazemostat)	4 (alle Tumoren)
<i>TSC2</i>	mTOR-Pfad	Amplifikation Deletion	2 2	mTOR-Inhibitor (Everolimus)	2A (ZNS + Nierenkarzinom) ^B

Abkürzungen: Delins = Deletion und Insertion; LRV = Leserasterverschiebung; NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; TKI = Tyrosinkinaseinhibitor; V = Variante; ZNS = Zentrales Nervensystem

^A Evidenzlevel nach OncoKB für die in Klammern genannte Tumorentität [105]. Siehe auch Abbildung 31

^B Gene, bei denen in der untersuchten Kohorte nicht die eigentlich targetierbaren Varianten gefunden wurden.

Zur Vollständigkeit sind in Tabelle 11 auch für diesen Studienteil Gene gelistet, bei denen Varianten als prädiktive Marker bei OncoKB zu finden sind, in dieser Kohorte jedoch nicht die entsprechenden bekannten, targetierbaren Varianten detektiert wurden, sondern Varianten, die nach dem derzeitigen Stand der Forschung nicht als Marker beschrieben sind. Außerdem aufgeführt sind Gene und Varianten, die dem Evidenzlevel 4 zugeordnet sind, da es bisher nur biologische Hinweise gibt, dass die gelisteten Therapeutika für die Behandlung angewendet werden könnten.

3.3 Vergleich von Tumorprobenpaaren

Im Rahmen der Arbeit wurden sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Studie DNAs von Tumorpaaren untersucht (10 beziehungsweise 2 Paare). Es handelte sich dabei hauptsächlich um Paare aus Primärtumor und Metastase (9 Paare). Es wurden aber auch Primärtumoren im Vergleich zu Rezidiven untersucht (2 Paare) und ein Paar aus Rezidiv und Metastase. Mit den zusätzlichen Proben wurden die gleichen Analysen durchgeführt wie mit den Primärtumoren, dem Rezidiv beziehungsweise der ersten untersuchten Metastase, so dass die Ergebnisse zu SNVs, kleinen Indels, CNAs und dem Methylierungsstatus verglichen werden konnten.

Mutationslast, Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen

Bei zehn von zwölf Tumorpaaren konnten keine oder nur kleine Unterschiede in der Anzahl der Varianten gefunden werden. Bei zwei Paaren wurden weder im Primärtumor noch in der Metastase somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen gefunden. Bei vier Paaren wurde die gleiche Anzahl an Varianten in beiden Proben detektiert, wobei es sich nur bei ID 500 und ID 539 um die gleichen Varianten handelt. Bei vier weiteren Probenpaaren wurde im zweiten Tumor eine oder zwei Varianten mehr gefunden. Bei zwei Patient*innen unterschieden sich die Tumoren stark in der Anzahl der gefundenen Varianten. Der Tumor aus der Metastasen-Operation von ID 670 wies neun somatische SNVs und kleine Indels auf, die im Primärtumor nicht gefunden worden waren. Im Primärtumor mit der ID 937 wurden 6 Varianten gefunden, die in der Metastase, die dem gleichen Patienten ein Jahr später entnommen wurde, nicht mehr nachzuweisen waren. Bei Probenpaaren mit Unterschieden in der Mutationslast ist diese bei 5 von 6 Paaren in den Rezidiven beziehungsweise Metastasen höher als in den chronologisch zuerst entnommenen Tumoren. Welche Varianten genau in den Proben gefunden wurden ist im Vergleich der zusammengehörigen Proben in Abbildung 35 dargestellt.

Wurde nach der ersten Analyse der Proben eine Diskrepanz in der Anzahl und Art der gefundenen Varianten zusammengehöriger Proben festgestellt, wurden die Sequenzierdaten zur Kontrolle auch händisch überprüft.

Kopienzahlveränderungen

Im Gegensatz zu den somatischen SNVs und kleinen Indels unterscheiden sich die zusammengehörigen Tumorpaare in der Anzahl der gefundenen Kopienzahlveränderungen stärker. Nur bei vier von 12 Tumorprobenpaaren wurde die gleiche Anzahl von CNAs gefunden, wobei sich die Gene, in denen die CNAs detektiert wurden, unterscheiden. Detaillierte Angaben zu den CNVs finden sich in Abbildung 36.

Methylierungsanalysen

Neben den NGS-Analysen und Sanger-Sequenzierungen wurden mit den Tumorprobenpaaren auch Pyrosequenzierungen durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass sich 10 von 12 Paare im mittleren Methylierungsstatus gleichen, also entweder beide hypo- oder beide hypermethyliert sind. Nur die beiden Tumoren von ID 670 beziehungsweise ID 932 unterscheiden sich in ihrem Methylierungsstatus. Der Primärtumor von ID 670 ist hypomethyliert, die untersuchte Metastase aber hypermethyliert. Bei den Proben von ID 932 ist es umgekehrt, der Primärtumor ist hypermethyliert und die Metastase hypomethyliert. Eine Darstellung zu den Methylierungsdaten der Tumorprobenpaare befindet sich in Abbildung 37.

ERGEBNISSE

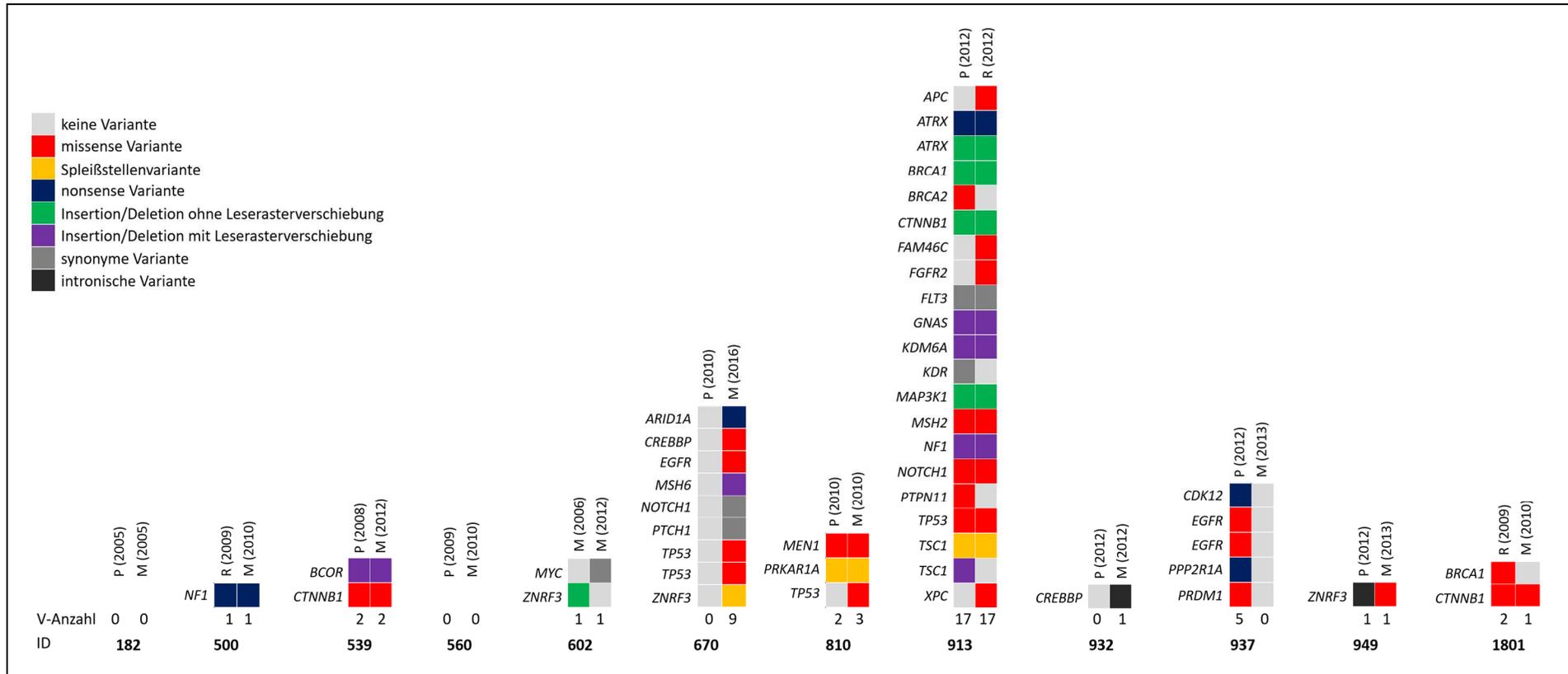


Abbildung 35: Vergleich der somatischen SNVs und kleinen Indels.

Die Tumorkaare sind nach ID sortiert. Dargestellt sind sowohl proteinverändernde als auch intronische und synonyme Varianten pro Tumorkaare. Um welche Kaare es sich handelt (M, P, R) und wann diese entnommen wurde (Jahreszahl), ist über den Varianten angegeben. Zu jeder Kaare ist die Anzahl der Varianten angegeben, die gefunden wurden (V-Anzahl). Der Abbildung zugrunde liegende Daten wurden teilweise bereits publiziert [83]

Abkürzungen: ID = Identifikator; M = Metastase, P = Primärtumor; R = Rezidiv; V-Anzahl = Variantenanzahl

ERGEBNISSE

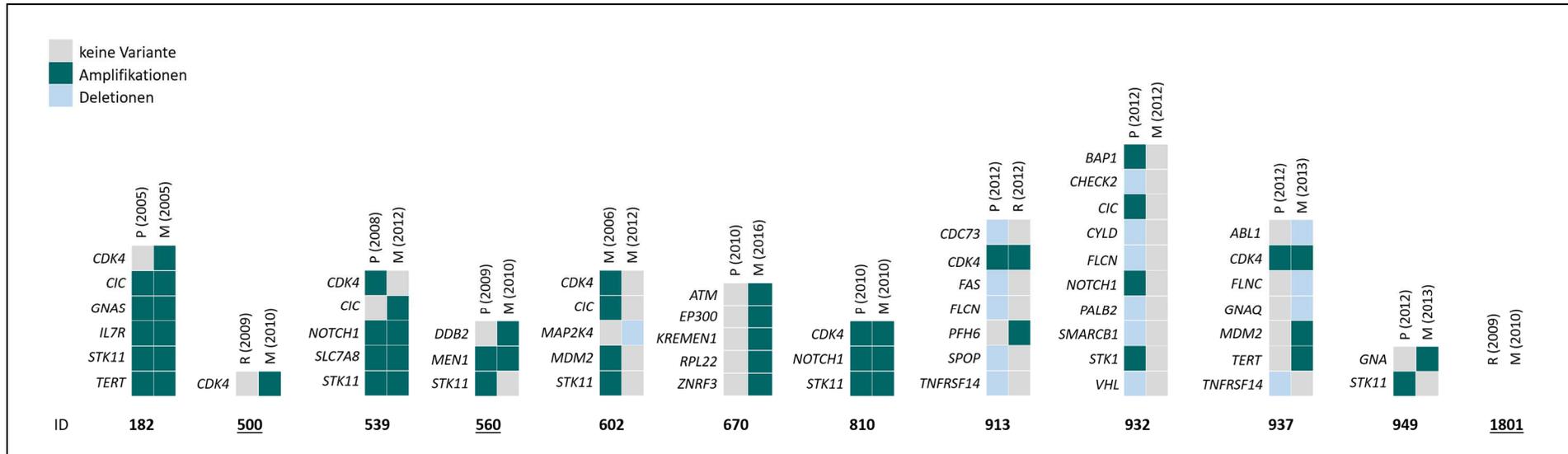


Abbildung 36: Vergleich der somatischen Kopienzahlveränderungen.

Die Tumorkopie sind nach ID sortiert. Um welche Probe es sich handelt (M, P, R) und wann diese entnommen wurde (Jahreszahl), ist über den Varianten angegeben. (Der Abbildung zugrunde liegende Daten wurden teilweise bereits publiziert [83])

Abkürzungen: ID = Identifikator; M = Metastase, P = Primärtumor; R = Rezidiv

ERGEBNISSE

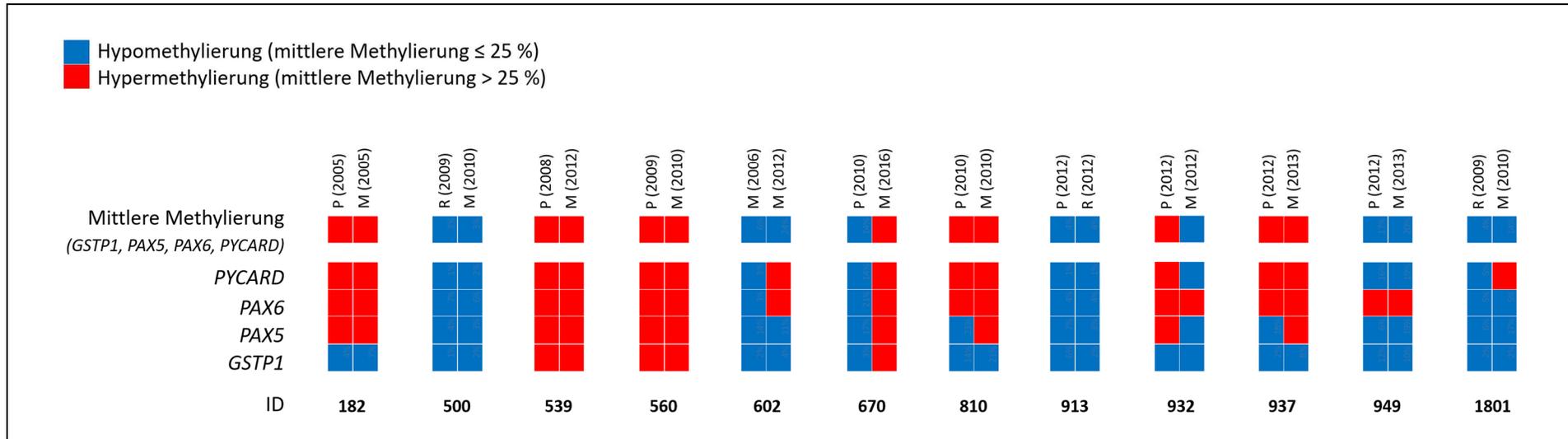


Abbildung 37: Vergleich des Methylierungsstatus.

Für alle Tumorprobenpaare (sortiert nach ID) ist der mittlere Methylierungsstatus der CpG-Inseln jedes einzelnen Gens und der mittleren Methylierung von *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* zusammen dargestellt. Beim Methylierungsstatus werden hypomethylierte (mittlere Methylierung \leq 25 %) und hypermethylierte (mittlere Methylierung $>$ 25 %) Proben unterschieden. Um welche Probe es sich handelt (M, P, R) und wann diese entnommen wurde (Jahreszahl), ist über den Varianten angegeben. (Der Abbildung zugrunde liegende Daten wurden bereits publiziert [83])

Abkürzungen: ID = Identifikator; M = Metastase; P = Primärtumor; R = Rezidiv

4 DISKUSSION

Obwohl die Untersuchung molekulargenetischer Marker im Zusammenhang mit der Prognosestellung und der Therapie von Nebennierenrindenzellenkarzinomen seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist, haben die daraus gewonnenen Erkenntnisse bisher keinen Einzug in den Klinikalltag gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich prognostische Marker, sowie prädiktive Marker und damit neue Therapieziele auf eine Art und Weise analysieren lassen, die auch im Klinikalltag einsetzbar wäre. Ein Teil der gewonnenen Daten und Erkenntnisse wurde bereits publiziert und wird in den folgenden Abschnitten noch einmal ausführlich diskutiert [82, 83].

4.1 Molekulargenetische Untersuchungen an DNA aus FFPE-Gewebe

Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien, die sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung von NNR-Cas – auch im Zusammenhang mit der Prognose oder Therapie der Betroffenen – beschäftigen (zum Beispiel [54, 55, 62, 72, 80]), kam in dieser Arbeit DNA aus FFPE-Gewebe zum Einsatz. Dass DNA, die aus FFPE-Gewebe isoliert wurde, geeignet ist, um damit molekulargenetische Verfahren durchzuführen und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist von zahlreichen Tumorentitäten publiziert [110, 111]. Durch den Vergleich von NGS-Daten, die mit DNA aus FFPE- beziehungsweise schockgefrorenem Gewebe generiert wurden, konnte gezeigt werden, dass kaum Unterschiede in der Qualität der Daten festzustellen sind [112]. In Pathologien gehört es seit einigen Jahren zur Routinediagnostik – neben histologischen Untersuchungen – auch molekulargenetische Analysen mit DNA aus FFPE-Gewebe durchzuführen, um prognostische und prädiktive Marker zu untersuchen. Dennoch waren zu Beginn der Arbeit – soweit bekannt – nur Daten einer kleinen NNR-Ca-Kohorte (29 Patient*innen) publiziert, bei der DNA aus FFPE-Gewebe verwendet worden war, um Daten für einen personalisierten Therapieansatz zu finden [113]. Während der Zeit der Datengenerierung für diese Arbeit wurden weitere Arbeiten von einer kleinen (10 Patienten) und einer größeren NNR-Ca-Kohorten (62 Patienten) veröffentlicht, die Sequenzierungsergebnisse zeigen, die mit DNA aus FFPE-Gewebe durchgeführt wurden und sich auf die Suche von potentiellen Therapiezielen konzentrierten [114] beziehungsweise den Zusammenhang der häufigsten molekulargenetischen Veränderungen zu den pathologischen und klinischen Merkmalen der Tumoren untersuchten [115]. Mit dieser Arbeit und den daraus publizierten Daten [82], konnte an der – soweit bekannt – bis dato größten NNR-Ca-Kohorte bestätigt werden, dass DNA aus FFPE-Tumormaterial verwendet werden

kann, um sie für die zielgerichtete Untersuchung molekulargenetischer prognostischer und prädiktiver Marker zu verwenden, die für den routinemäßigen Einsatz geeignet wären.

Wie in der Literatur beschrieben, sind auch die Tumorproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, in der Anzahl der gefundenen somatischen Varianten sehr heterogen. Bei der Auswertung der Sequenzierdaten wurden Tumoren ohne Varianten gefunden, aber auch Tumoren, in denen bis zu 16 (retrospektive Studie) beziehungsweise 9 Varianten (prospektive Studie) gefunden wurden. Auf den ersten Blick gering, ergeben sich – bezogen auf die analysierten Bereiche der Panels von 160 beziehungsweise 100 Genen – verhältnismäßig hohe Werte für die mittlere und mediane Mutationslast (siehe 3.1.1 und 3.2.1). Assié et al. und Juhlin et al. beziehungsweise Zheng et al. finden – wie in der Einleitung bereits erwähnt (siehe 1.4.2) – ebenfalls Tumorproben mit wenigen Varianten, aber auch „hypermutierte“ [54, 64] beziehungsweise „ultramutierte“ Tumoren [55]. In diesen Studien wurde eine mittlere Mutationslast von 0,6 beziehungsweise 0,9 somatischen kodierenden Varianten/Mb ermittelt [54, 55]. Die der hier untersuchten Kohorten sind verhältnismäßig höher, da selektiv Gene angereichert wurden, die bereits im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen beschrieben wurden. Da eine zuverlässige Berechnung der Mutationslast erst ab einer Panelgröße von etwa 1,1 Mb – je nach Anzahl der gefundenen Varianten – möglich ist [116], wurden diese nicht für weitere Auswertungen berücksichtigt.

Die Arbeiten von Assié et al., Zheng et al. und Juhlin et al. geben auch umfassenden Einblick, in welchen Genen und Signalwegen Veränderungen gefunden werden [54, 55, 64]. Übereinstimmend mit den Daten dieser Publikationen, wurden auch in den hier untersuchten Kohorten am häufigsten Varianten im P53/Rb-Signalweg beziehungsweise dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg gefunden (siehe auch Abbildung 13 und Abbildung 33). Der Anteil an Tumoren in denen SNVs und kleine Indels in *TP53* und *RB1* beziehungsweise *CTNNB1*, *APC* und *ZNRF3* gefunden wurden, stimmen tendenziell mit Literaturangaben überein [54, 55, 64]. Erwartungsgemäß wurden in beiden Kohorten auch somatische SNVs, kleine Indels und CNAs in den Genen *ATRX*, *DAXX*, *MEN1* und *TERT* gefunden [54, 55, 64]. Die Produkte dieser Gene sind an der Chromatin-Remodellierung beteiligt, die bei bis zu 22 % der NNR-Cas verändert sind [54, 55]. In den untersuchten Kohorten wurden außerdem Veränderungen in *ATM*, *BRCA1* und *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* gefunden, deren Produkte eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen. Somatische Varianten in diesen Genen wurden im Zusammenhang mit NNR-Cas bisher eher selten beschrieben [55]. In der retrospektiven Studie wurden nach *TP53* und *CTNNB1* die meisten Einzelnukleotidaustausche und kleinen Indels in *NF1* detektiert. Zheng et al. waren die Ersten, die den „Katalog der bekannten NNR-Ca-Treibergene“, unter anderen, um *NF1* erweiterten [55].

Unerwartet häufig – im Vergleich zu Assié et al. (2 % der Kohorte) [54] beziehungsweise Zheng et al. (6 % der Kohorte) [55] – wurden im retrospektiven Studienteil Amplifikationen von *CDK4* detektiert. Außerdem wurden häufig Kopienzahlveränderungen von *STK11*, *TNFRSF4*, *SMARCB1* und *NOTCH1* gefunden, die in geringeren Frequenzen ebenfalls in der NNR-Ca-TCGA-Kohorte [55] detektiert, aber vorher noch nicht explizit im Zusammenhang mit NNR-Cas beschrieben worden waren. Abweichungen in den Frequenzen sind auf unterschiedlichen Cut-Offs bei der Auswertung zurückzuführen. In dieser Arbeit wurden auch heterozygote Kopienzahlveränderungen berücksichtigt, bei Assié et al. explizit nur Amplifikationen mit hohem Level (> 4 Genkopien) oder nur homozygote Deletionen [54]. Nicht analysiert werden konnten im retrospektiven Studienteil Kopienzahlveränderungen von *CDKN2A* und *ZNRF3*, die bei Zheng et al. als wiederkehrend deletiert beziehungsweise bei 16 % der Kohorte als homozygot deletiert beschrieben sind [55]. Eine einfache und kostengünstige Analyse von CNAs zum Beispiel mittels quantitativer PCR war aufgrund unterschiedlicher Qualität der DNA von Tumorproben aus FFPE-Gewebe und Referenzproben (DNA aus Blut) nicht möglich. Die *CDK4*-Amplifikationen, die anhand der NGS-Daten gefunden worden waren, wurden in einer kleinen Stichprobenzahl mit FISH-Analysen untersucht und bestätigt (siehe 3.1.6 Abbildung 32). Diese Untersuchung war aus zeitlichen Gründen und Kostengründen jedoch nicht für alle Gene möglich, von denen häufige Kopienzahlveränderungen in NNR-Cas beschrieben sind.

Details zum Vergleich der hier generierten Sequenzierdaten mit den Daten der TCGA-Kohorte sind in Abschnitt 7.1 in Tabelle 19 und Tabelle 20 und in Abschnitt 7.2 in Abbildung 39 bis Abbildung 50 zu finden.

Die Daten zu den Kopienzahlveränderungen sollten in der retrospektiven Studie außerdem genutzt werden, um die Tumorproben einer von drei chromosomalen Signaturen zuzuordnen, die von Zheng et al. [55] definiert worden waren. Da die ursprüngliche Definition und Auswertung auf WES-Daten basiert, die zudem mit DNA aus ff-Material durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass eine derartige Analyse mit Daten, die mit FFPE-Material generiert und kleinen Panels, wie sie hier verwendet wurden und bei denen Chromosomenarme teilweise nur durch ein Gen repräsentiert werden, zu ungenau ist, um sie im Klinikalltag zuverlässig einsetzen zu können. Auch weil die Anzahl der analysierten Gene im Custom Panel der prospektiven Studie weiter reduziert wurde, wurde die Analyse der CN Signaturen als ungeeignet betrachtet.

In Anlehnung an die Methylierungsanalysen von Jouinot et al. mittels MS-MLPA [72] wurden der Methylierungsstatus der CpG-Inseln der Tumorsuppressorgene *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* mittels Pyrosequenzierung untersucht. Trotz unterschiedlicher Analysemethoden – bedingt durch die Verwendung von DNA aus FFPE-Gewebe – konnte ein ähnlicher Anteil hypermethylierter Proben (retrospektive Studie: 30,8 %; prospektive

Studie: 60 %) wie in der französischen Kohorte (42,9 % hypermethylierte Proben) [72] detektiert werden.

Fazit zur Durchführbarkeit molekulargenetischer Analysen an DNA aus FFPE-Gewebe

Insgesamt zeigen die Sequenzierergebnisse der retro- und der prospektiven Studie, die mit den publizierten Daten anderer Kohorten [54, 55, 64] größtenteils übereinstimmen, die gute Durchführbarkeit der gewählten molekulargenetischen Untersuchungen an DNA aus FFPE-Gewebe. Dies gilt vor allem für die Detektion der Einzelnukleotidaustausche, der kleinen Insertionen und Deletionen und der Methylierungsunterschiede. Einschränkungen mussten in Bezug auf die Analyse der Kopienzahlveränderungen gemacht werden. In einem routinemäßigen Einsatz sollte eine Bestätigung von Kopienzahlveränderungen auf DNA-Ebene mit geeigneten Methoden – zum Beispiel SNP-Arrays – durchgeführt oder die Expression der entsprechenden RNA oder Proteine auf Veränderungen hin untersucht werden. Dies gilt vor allem für die Gene, bei denen die Information Relevanz für die Behandlung der Patient*innen hat.

Für den Einsatz in der Patientenversorgung müssen angewendete Methoden zur Untersuchung von Markern weitere Kriterien erfüllen. Die Analysemethoden, die bei der Patientenversorgung zum Einsatz kommen, sollten unter anderem einfach und standardisiert durchzuführen sein [117], so dass mit geringem Zeit-, Kosten- und Personalaufwand zügig zuverlässige Ergebnisse zur Verfügung stehen, Bedingungen also, die in einem Routine-diagnostiklabor mit standardisierten Arbeitsabläufen gegeben sind, so dass eine Bearbeitungszeit von 10 Tagen, wie sie zum Beispiel für die Testung von molekularen Markern in Lungenkarzinomen bis zur Vorlage der Ergebnisse empfohlen wird, möglich ist [118]. Die Bearbeitungszeit innerhalb dieses Forschungsprojektes war deutlich länger. Die komplette Laborarbeit – inklusive Qualitätskontrolle und Sequenzier Vorbereitungen – und Auswertung der Sequenzierungen (NGS (und ZNRF3-Sanger-Sequenzierung) und Pyrosequenzierungen) dauerte im Idealfall für 12 Patient*innen circa 6 Wochen. Hinzugerechnet werden muss außerdem noch die Zeit bis zur Einbettung und Beurteilung der Tumorproben in der Pathologie, die Vorbereitung der FFPE-Schnitte und die Isolation der DNA. Das bedeutet insgesamt eine Zeitspanne, die, für den routinemäßigen Einsatz, bei einer möglicherweise schnell fortschreitenden Krebserkrankung, zu lange ist. Die Kosten für die Untersuchungen in der retrospektiven Studie – wobei nur die Materialkosten einberechnet sind – belaufen sich pro Patient*in auf circa 800 Euro. Die Sequenzierungen im Rahmen der prospektiven Studie sind, durch die Verwendung eines Custom Panels – also eines individuell zusammengestellten Panels –, mit 1200 Euro noch teurer. Doch auch der

Kostenfaktor wird in einem routinemäßigen Einsatz mit Hochdurchsatz wahrscheinlich deutlich günstiger ausfallen.

4.2 Prognostische Marker

Durch Auswertung der Sequenzierdaten der retrospektiven Kohorte und der Korrelation zu den Überlebensdaten der Patient*innen konnten Zusammenhänge zwischen den untersuchten molekulargenetischen Veränderungen und der Länge des progressionsfreien Überlebens bestätigt werden. Mit den einzelnen molekularen Markern ließen sich jeweils zwei bis drei Untergruppen differenzieren, die sich in der Länge ihres progressionsfreien Überlebens signifikant unterscheiden. Bereits durch das Vorhandensein von 2 oder mehr proteinverändernden Varianten pro Tumorprobe – im Vergleich zu maximal einer Variante pro Probe – ist das Risiko für einen Progress der Erkrankung etwa doppelt so hoch. Damit konnten die Ergebnisse von Zheng et al., die einen Zusammenhang zwischen der „Mutationsdichte“ und der Zeit bis zum Progress zeigen konnten [55], mit einem zielgerichteten Sequenzieransatz bestätigt werden.

Ebenso konnte bestätigt werden, dass es für die Prognose der Patient*innen relevant ist, welche Gene und Signalwege von Veränderungen betroffen sind. Vor allem Veränderungen in Genen des Wnt/ β -Catenin- und des P53/Rb-Signalwegs – und davon hauptsächlich *TP53*, *CTNNB1* und *ZNRF3* – sind bei NNR-Cas in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose beschrieben [64, 65, 119]. Daher wurde der Fokus für die Überlebenszeitanalysen auf das Vorhandensein von Varianten in Genen dieser Signalwege gelegt. Patient*innen ohne Tumorvarianten in den beiden Signalwegen beziehungsweise Varianten nur im P53/Rb-Signalweg hatten dabei das längste PFS. Patient*innen die sowohl Veränderungen in Genen des Wnt/ β -Catenin- als auch des P53/Rb-Signalwegs aufweisen, haben die schlechteste Prognose. Sehr kurz war das progressionsfreie Überleben bei drei von vier Patient*innen in deren Tumoren sowohl Veränderungen in *TP53* als auch *CTNNB1* gefunden worden waren (2, 3 und 10 Monate). Hier handelt es sich um eine Konstellation, die bisher nur bei wenigen Tumorproben aus zwei Kohorten detektiert wurde [54, 55] beziehungsweise davor als ein nicht gemeinsam auftretendes Ereignis angesehen wurde [65].

Als weiterer prognostischer Marker konnte der Methylierungsstatus der CpG-Inseln von *GSTP1*, *PAX5*, *PAX6* und *PYCARD* – wie von Jouinot et al. beschrieben [72] – bestätigt werden. Patient*innen, in deren Tumoren eine mittlere Methylierung über 25 %, also eine Hypermethylierung, detektiert wurde, hatten ein schlechteres PFS als Patient*innen mit hypomethylierten Tumoren.

Ein Zusammenhang zwischen der Länge des PFS der Patient*innen und den chromosomalen Signaturen – definiert von Zheng et al. [55] und angepasst an Panel-Daten

– konnte zwar auch in dieser Kohorte gezeigt werden, allerdings war die Auswertung – ausgehend von nur 160 Genen – schwierig.

Letzendlich wurden drei von vier untersuchten und in dieser Arbeit vorgestellten prognostischen Marker zum molekularen Score kombiniert, mit dem vier Patientengruppen differenziert werden können, die ein signifikant unterschiedliches progressionsfreies Überleben haben.

Der Vergleich des molekularen Scores mit dem mGRAS-Score – gebildet aus den klinischen und histopathologischen Markern Grad, Resektionsstatus, Alter und Vorhandensein von Symptomen – zeigte, dass keiner der beiden dem anderen in der prognostischen Stärke überlegen ist. Wie bereits publiziert, ließ sich bei dieser Kohorte erst durch die Kombination von mGRAS- und molekularem Score zum KOMBI-Score eine sensitivere und spezifischere Methode finden, die Wahrscheinlichkeit für einen Progress innerhalb von 24 Monaten für die Patienten vorherzusagen [82].

Das Ergebnis, dass die Kombination der unterschiedlichen Marker zukünftig eine optimierte Prognosestellung und Patientversorgung ermöglicht, wird von einer Studie aus dem Jahr 2019 gestützt [120]. Assié et al. bezogen neben Daten aus DNA-Sequenzierungen, Methylierungsanalysen und SNP-Arrays auch Daten aus Genexpressionsanalysen von *BUB1B* und *PINK1* in einen „3-D targeted classifier“ ein [120]. Die Einteilung der NNR-Ca-Patient*innen in Gruppen mit unterschiedlicher Prognose anhand eines Genexpressionsprofils ist gut untersucht [60, 65, 76, 119]. Dass die zielgerichtete Untersuchung der Expression von *BUB1B* und *PINK1* als prognostischer Marker in NNR-Cas verwendet werden kann, wurde von de Reyniès et al. gefunden [119] und in einer unabhängigen Kohorte bestätigt [121]. Die Expression der beiden Gene war auch in Tumorproben der retrospektiven Kohorte untersucht worden (Datenerhebung und –auswertung sind nicht Teil dieser Dissertation). Allerdings konnte qualitativ ausreichende RNA nur aus circa 1/3 der Proben der retrospektiven Studie isoliert werden. So wurden die Ergebnisse der Expressionsanalysen – obwohl ebenfalls eine prognostische Rolle gefunden werden konnte – nicht in den molekularen Score einberechnet. Dies könnte am Alter der Proben liegen, da in anderen Studien gezeigt wurde, dass RNA aus FFPE-Gewebe generell verwendet werden kann, um zielgerichtet Expressionsanalysen durchzuführen [122]. Inwiefern die Untersuchung von RNA – die im Vergleich zu DNA instabiler ist – für einen routinemäßigen Einsatz überhaupt praktikabel ist, müssen weitere Studien zeigen.

Fazit zur Analyse molekularer, prognostischer Marker

Soweit bekannt, wurde mit der Veröffentlichung des COMBI-Scores 2018 [82] erstmalig ein prognostischer Score aus einer Kombination molekularer und klinischer und

histopathologischer Daten präsentiert. Vor allem Patient*innen mit einem niedrigen COMBI-Score, bei denen eine vollständige Resektion der Tumoren möglich ist, könnten von den Erkenntnissen profitieren. Bei anderen Patient*innen, die anhand des COMBI-Scores einer Gruppe mit schnellem Progress zugeordnet werden, müsste eventuell direkt über aggressivere post-operative Therapien nachgedacht werden. Hier müssen allerdings erst einmal prospektive klinische Studien zeigen, ob bei der einen Patientengruppe auf adjuvante Therapien verzichtet werden und ein regelmäßiges Follow-Up genügen könnte und welche Therapiemöglichkeiten für die anderen Gruppen bestehen.

4.3 Prädiktive molekulare Marker und zielgerichtete Therapien

In den letzten Jahren und Jahrzehnten haben sich die Therapiemöglichkeiten für einige Tumorentitäten verändert. Ein besseres Verständnis der Vorgänge, die zur Tumorentwicklung beitragen, ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien. Während herkömmliche Chemotherapeutika unspezifisch und systemisch auf sich schnell teilende Zellen wirken – also auch schädlich für gesunde, sehr teilungsaktive Zellen sein können –, werden bei der zielgerichteten Krebstherapie Strukturen und Signalwege angegriffen, die nur in den Krebszellen verändert sind und diesen so einen Wachstumsvorteil verschaffen. Während sich mit der Untersuchung der molekularen Marker kein prädiktiver Marker zum Ansprechen auf die herkömmlichen Therapien finden ließ, konnte CDK4 als vielversprechendstes Ziel für eine zielgerichtete Therapie identifiziert werden. *CDK4*-Amplifikationen wurden in der retrospektiven Studie in 43 % und in der prospektive Studie in 14 % der Tumoren gefunden. Die Wirkung von CDK4/6-Inhibitoren – im Speziellen Palbociclib – wurden bereits in Phase II-Studien bei der Behandlung von Patient*innen mit Liposarkomen gezeigt [123, 124]. In den Studien wurden Patient*innen behandelt, deren Tumoren *CDK4*-Amplifikationen aufweisen und RB-positiv sind. Bei Brustkrebspatientinnen fortgeschrittenen Stadiums ist Palbociclib bereits von EMA und FDA zur Therapie zugelassen (siehe 6.2 [Int. 37] und [Int. 38]). Allerdings werden hier Hormonrezeptoren und HER2 als prädiktive Marker untersucht [125]. De Martino et al. und Ross et al. identifizierten *CDK4*-Amplifikationen bereits als potentielle prädiktive Marker für die zielgerichtete Therapie von NNR-Ca-Patient*innen [62, 113]. Bisher wurden bei NNR-Cas jedoch nur Zellkulturexperimente mit Palbociclib durchgeführt, in denen aber ein vielversprechender, dosisabhängiger Effekt auf die Zellviabilität gezeigt wurde [126, 127].

Ausgehend vom Evidenzlevel wären auch Veränderungen, die in *BRAF*- und *MDM2* gefunden wurden, geeignete Therapieziele. Missense Varianten in *BRAF* – vor allem an Position p.Val600 – werden bereits in verschiedenen Tumorentitäten mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (zum Beispiel [128, 129]). Der Einsatz von *MDM2*-Inhibitoren bei

Liposarkomen wurde in präklinischen Studien untersucht [130]. Bei beiden Genen waren in dieser Kohorte jedoch nur sehr wenige Proben von Veränderungen betroffen.

Die meisten anderen gefundenen Veränderungen in Genen, die als Therapieziele bei OncoKB gelistet sind, entsprechen nicht den Varianten, die als prädiktive Marker genutzt werden. Bei weiteren Therapeutika gibt es bisher nur eine biologische Evidenz für die Wirksamkeit.

Wird noch einmal der Grundgedanke der zielgerichteten Therapie aufgegriffen, dass die Ziele angegriffen werden, die häufig verändert sind und den Tumorzellen Wachstumsvorteile bieten, wäre bei Nebennierenrindenzarzinomen und auch bei vielen anderen Tumorentitäten zum Beispiel auch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein wichtiges Ziel. Geforscht wird an verschiedenen Therapeutika, die im Wnt/ β -Catenin-Signalweg an verschiedenen Punkten, von den extrazellulären Wnt-Liganden bis hin zu den intrazellulären Transkriptionskomplexen, angreifen [131]. In Nebennierenrindenzarzinomzelllinien (NCI-H295) wurde zum Beispiel die Reaktion auf Gabe von PNU-74654 – ein Inhibitor, der die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF (engl. T cell factor) behindert – untersucht. Die Zelllinie trägt – wie auch 25 der in dieser Arbeit untersuchten 157 Tumoren – eine *CTNNB1*-Variante, die zur konstitutiven Aktivierung von β -Catenin führt, und reagierte auf die Behandlung unter anderem mit verringerter Zellproliferation und Akkumulation von β -Catenin im Zellkern, sowie erhöhter Apoptoserate [132]. In vivo besteht jedoch das Problem, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homeostase verschiedener Gewebe spielt, weswegen es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt [133].

Fazit zur Untersuchung prädiktiver Marker

Die Daten zeigen, dass mit einem verhältnismäßig kleinen Panel potentielle Therapieziele, die auf Einzelnukleotidaustauschen, kleinen Insertionen oder Kopienzahlveränderungen einzelner Gene beruhen, gefunden werden können, was auch schon von Ross et al. gezeigt wurde [113]. Ob diese Informationen bei einer heterogenen Erkrankung wie dem Nebennierenrindenzarzinom allerdings ausreicht, um erfolgreich zielgerichtet Patient*innen zu therapieren, ist fraglich. Wo die Einfachheit der zielgerichteten Untersuchungen für zuverlässige prognostische Marker offensichtlich genügt, ist dies für die Identifikation von prädiktiven Markern und Therapiezielen nicht der Fall. Weitere Forschung in diesem Bereich ist dringend nötig.

4.4 Vergleich von Tumorprobenpaaren

Erkenntnisse zur Veränderung von molekularen Markern konnten durch die Untersuchung und den Vergleich von Sequenzierdaten von Tumorpaaren, die jeweils einer Patientin oder einem Patienten entnommen worden waren, gewonnen werden. Ein Tumorpaar war synchron – also während einer OP – resektiert worden, alle anderen metachron in Abständen von Monaten bis zu 6 Jahren. Verglichen wurde die Anzahl und Art der Einzelnukleotidaustausche, kleinen Insertionen und Deletionen und Kopienzahlveränderungen und Methylierungsstatus bei den Tumorpaaren. Diese Ergebnisse wurden (teilweise) zusammen mit den Daten einer französischen Kohorte publiziert, an denen ebenfalls SNVs und kleine Indels, Kopienzahlveränderungen und außerdem chromosomale Signaturen untersucht wurden [83].

Veränderungen der Anzahl und Art von SNVs und kleinen Indels wurden in der Würzburger Kohorte bei 8 von 12 Probenpaaren gesehen. Varianten konnten im zweiten Tumor nicht mehr und andere wiederum neu detektiert werden. Letzteres betrifft auch 3 Fälle, in denen Veränderungen in *ZNRF3* beziehungsweise *TP53* erst in den Metastasen gefunden wurden. Sie sind als Gene beschrieben, die die Tumorgenese von NNR-Cas vorantreiben und bei Patient*innen mit schlechter Prognose detektiert werden [64, 134]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Veränderungen die Bildung von aggressiven Subklonen vorantreiben, die dann wiederum zu Metastasierung und schlechter Prognose führen [83].

Verschiedenen Tumorproben einer Patientin oder eines Patienten wurde in NNR-Cas erstmalig von Vatrano et al. untersucht, die ebenfalls eine Heterogenität der Tumorpaare beschrieben [115]. Andere Daten zu solchen Vergleichen fehlen. Gara et al. analysierten zwar von 14 Patient*innen mehrere Metastasen und sehen eine Übereinstimmung von 37 – 57 % bei den detektierten Varianten, vergleichen die Daten aber nicht mit den entsprechenden Primärtumoren [135].

Die Kopienzahlveränderungen sind zwischen den Tumorpaaren deutlich unterschiedlicher. Nur in einem von 12 Paaren wurden die gleichen Varianten im Primärtumor und der Metastase gefunden. Eine Heterogenität wird zwar auch bei Vatrano et al. beschrieben [115] und ist auch bei 2 von 14 Tumorpaaren der französischen Kohorte zu sehen [83], bei den hier gezeigten Proben aber höchstwahrscheinlich auf einen technischen Fehler durch die Art der Anreicherung beziehungsweise das Vorgehen bei der Sequenzierung zurückzuführen. Nur zwei der Tumorpaare wurde zusammen mit der passenden Referenzprobe sequenziert. Alle anderen Zusatztumoren wurden in separaten Läufen analysiert.

Der mittlere Methylierungsstatus der CpG-Inseln der vier untersuchten Gene bleibt bei den meisten Tumorpaaren (10 von 12) gleich. In 4 von 12 Paaren ändert sich jedoch der Methylierungsstatus von ein bis zwei Genen in einen hypermethylierten Status, ohne dass

sich der gesamte Methylierungsstatus ändert. Die Tatsache, dass bei NNR-Cas mit einem CIMP-Phänotyp unterschiedliche Methylierungsstatus detektiert wurden [55, 70] und Methylierungsveränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung eine Rolle spielen können [136], lässt vermuten, dass sich bei einigen Tumoren der Methylierungsstatus über die Zeit verändert. Insgesamt scheint der Methylierungsstatus als prognostischer Marker jedoch stabiler als die Untersuchung von Veränderungen auf DNA-Ebene.

Fazit zum Vergleich von Tumorprobenpaaren

Der hier gezeigte Vergleich der Sequenzierdaten von Tumorpaaren wirft ein neues Licht auf die bisher untersuchten molekularen prognostischen Marker. Während die auf DNA-Ebene gefundenen Veränderungen Ergebnisse einer anderen kleinen Kohorte bestätigen [115], wurde der Vergleich von Methylierungsdaten in dieser Kohorte und chromosomalen Patterns in der französischen Kohorte [83] zum ersten Mal gezeigt. Die Kohorten sind definitiv zu klein, um finale Aussagen treffen zu können. Die Daten suggerieren jedoch, dass der Methylierungsstatus und chromosomale Signaturen stabilere prognostische Marker sind als die Veränderungen auf DNA-Ebene. Vor einem Einsatz als molekulare prognostische Marker in der Routinediagnostik sollten die Veränderungen unbedingt an größeren Kohorten von Tumorpaaren validiert werden. Interessant wäre auch eine Untersuchung weiterer prognostischer Marker, zum Beispiel die Expression von *BUB1B* und *PINK*, auf Heterogenität in Metastasen und Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren der entsprechenden Patient*innen. Erkenntnisse hieraus könnten zukünftig auch Relevanz für den Einsatz von minimal invasiven Methoden, wie der Liquid Biopsy, zur Nachverfolgung des Ansprechens auf Therapien beziehungsweise des Progresses haben.

5 AUSBLICK

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich ausgewählte molekulare prognostische Marker und potentiell targetierbare Veränderungen zielgerichtet an DNA aus FFPE-Gewebe untersuchen lassen. Mittelfrististiges Ziel ist es, einen Leitfaden für ein zielgerichtetes Patientenmanagement unter Verwendung molekularer Daten beim Nebennierenkarzinom zu etablieren. Aktuell fehlen hierzu allerdings noch weitere Daten der prospektiven Studie. Aufgrund der Seltenheit von NNR-Cas dauert es lange, bis Proben einer ausreichend großen Kohorte gesammelt und untersucht sind. Um valide Daten zu bekommen, sollte diese als multizentrische Studie stattfinden, wofür ENSAT, das Europäische Netzwerk zur Untersuchung von Adrenalen Tumoren, einen idealen Rahmen bietet. Bisher wurden in verschiedenen Studien aus unterschiedlichen Ländern und Kompetenzzentren mit unterschiedlichem Material, teils anderen molekularen Markern und Analysemethoden gearbeitet. Immer neue Untersuchungen und Publikationen identifizieren weitere molekulare Marker, die mit dem Überleben der NNR-Ca-Patient*innen korreliert sind und Analysen weiter vereinfachen könnten. So wurde zum Beispiel die Hypermethylierung von *G0S2* alleine als Marker für besonders schnell progrediente NNR-Cas identifiziert [137]. Letztendlich müssen sich die Kompetenzzentren festlegen, welche Marker am geeignetsten erscheinen, um Anwendung im Klinikalltag zu finden, und diese in einer groß angelegten, prospektiven Studie untersuchen.

Bis zuverlässige prädiktive Marker und zielgerichtete Therapeutika für die Behandlung der Patient*innen mit NNR-Cas gefunden werden, ist noch intensive Forschungsarbeit nötig. Dennoch stellt die hier vorgelegte Arbeit eine gute Grundlage, um weitere Schritte in Richtung eines personalisierten Patientenmanagements bei NNR-Ca-Patient*innen zu gehen.

6 VERZEICHNISSE UND QUELLEN

6.1 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hiddemann, W., C.R. Bartram, and H. Huber, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
4. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *The Global Burden of Cancer 2013*. JAMA Oncol, 2015. **1**(4): p. 505-27.
5. Badve, S. and G.L. Kumar, *Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine*. 2018: Springer International Publishing.
6. Constancio, V., et al., *DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types*. Cells, 2020. **9**(3).
7. Leong, A.S. and Z. Zhuang, *The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment*. Pathobiology, 2011. **78**(2): p. 99-114.
8. Sawyers, C., *Targeted cancer therapy*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 294-7.
9. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
10. Mutschler, E., et al., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 140 Tabellen*. 2007: Wiss. Verlag-Ges.
11. Spinas, G.A. and S. Fischli, *Endokrinologie und Stoffwechsel: Grundlagen und Klinik prägnant und anschaulich dargestellt*. 2001: Thieme.
12. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. Ann Intern Med, 2003. **138**(5): p. 424-9.
13. Fassnacht, M., et al., *Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, 2016. **175**(2): p. G1-G34.
14. Gatta, G., et al., *Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe*. Eur J Cancer, 2011. **47**(17): p. 2493-511.
15. Kebebew, E., et al., *Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress?* World J Surg, 2006. **30**(5): p. 872-8.
16. Kerkhofs, T.M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993*. Eur J Cancer, 2013. **49**(11): p. 2579-86.
17. Else, T., et al., *Adrenocortical carcinoma*. Endocr Rev, 2014. **35**(2): p. 282-326.
18. Fassnacht, M., et al., *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification*. Cancer, 2009. **115**(2): p. 243-50.
19. Fassnacht, M. and B. Allolio, *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(2): p. 273-89.
20. Fassnacht, M., et al., *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, 2018. **179**(4): p. G1-G46.
21. Glenn, J.A., et al., *Longitudinal patterns of recurrence in patients with adrenocortical carcinoma*. Surgery, 2019. **165**(1): p. 186-195.
22. Venkatesh, S., et al., *Adrenal cortical carcinoma*. Cancer, 1989. **64**(3): p. 765-9.

23. Abiven, G., et al., *Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(7): p. 2650-5.
24. Hermsen, I.G., et al., *Extremely long survival in six patients despite recurrent and metastatic adrenal carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(6): p. 911-9.
25. Lubitz, J.A., L. Freeman, and R. Okun, *Mitotane use in inoperable adrenal cortical carcinoma*. JAMA, 1973. **223**(10): p. 1109-12.
26. Hermsen, I.G., et al., *Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(6): p. 1844-51.
27. Haak, H.R., et al., *Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients*. Br J Cancer, 1994. **69**(5): p. 947-51.
28. Baudin, E., et al., *Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1385-92.
29. Terzolo, M., et al., *Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection*. Eur J Endocrinol, 2013. **169**(3): p. 263-70.
30. Kostianinen, I., et al., *Adrenocortical carcinoma: presentation and outcome of a contemporary patient series*. Endocrine, 2019.
31. Fassnacht, M., et al., *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2189-97.
32. Henning, J.E.K., et al., *Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(11): p. 4323-4332.
33. Else, T., et al., *Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(2): p. 455-61.
34. Bilimoria, K.Y., et al., *Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors*. Cancer, 2008. **113**(11): p. 3130-6.
35. Asare, E.A., et al., *A novel staging system for adrenocortical carcinoma better predicts survival in patients with stage I/II disease*. Surgery, 2014. **156**(6): p. 1378-85; discussion 1385-6.
36. Lughezzani, G., et al., *The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation*. Eur J Cancer, 2010. **46**(4): p. 713-9.
37. Berruti, A., et al., *Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer*. Eur Urol, 2014. **65**(4): p. 832-8.
38. Beuschlein, F., et al., *Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(3): p. 841-9.
39. Assie, G., et al., *Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 148-54.
40. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
41. de Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. Br J Cancer, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
42. Pyo, J.S., G. Kang, and J.H. Sohn, *Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis*. Int J Biol Markers, 2016. **31**(2): p. e204-10.
43. Luo, Z.W., et al., *Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 123.

44. Duregon, E., et al., *Validation of the prognostic role of the "Helsinki Score" in 225 cases of adrenocortical carcinoma*. Hum Pathol, 2017. **62**: p. 1-7.
45. Papathomas, T.G., et al., *An International Ki67 Reproducibility Study in Adrenal Cortical Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2016. **40**(4): p. 569-76.
46. Margonis, G.A., et al., *Adrenocortical Carcinoma: Impact of Surgical Margin Status on Long-Term Outcomes*. Ann Surg Oncol, 2016. **23**(1): p. 134-41.
47. Erdogan, I., et al., *The role of surgery in the management of recurrent adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(1): p. 181-91.
48. Libe, R., et al., *Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study*. Ann Oncol, 2015. **26**(10): p. 2119-25.
49. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 214-218.
50. Bertherat, J. and X. Bertagna, *Pathogenesis of adrenocortical cancer*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(2): p. 261-71.
51. Gruschwitz, T., et al., *Improvement of histopathological classification of adrenal gland tumors by genetic differentiation*. World J Urol, 2010. **28**(3): p. 329-34.
52. Giordano, T.J., *Classification of adrenal cortical tumors: promise of the 'molecular' approach*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(6): p. 887-92.
53. Barreau, O., et al., *Clinical and pathophysiological implications of chromosomal alterations in adrenocortical tumors: an integrated genomic approach*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(2): p. E301-11.
54. Assie, G., et al., *Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma*. Nat Genet, 2014. **46**(6): p. 607-12.
55. Zheng, S., et al., *Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma*. Cancer Cell, 2016. **30**(2): p. 363.
56. Valsesia, A., et al., *The Growing Importance of CNVs: New Insights for Detection and Clinical Interpretation*. Front Genet, 2013. **4**: p. 92.
57. Kjellman, M., et al., *Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4219-23.
58. Dohna, M., et al., *Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(2): p. 145-52.
59. Stephan, E.A., et al., *Adrenocortical carcinoma survival rates correlated to genomic copy number variants*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(2): p. 425-31.
60. Szabo, P.M., et al., *Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed*. Oncogene, 2010. **29**(21): p. 3163-72.
61. Ronchi, C.L., et al., *Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors - evidence for an adenoma carcinoma sequence?* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73959.
62. De Martino, M.C., et al., *Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(10): p. 4080-8.
63. Hao, H.X., et al., *ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 195-200.
64. Juhlin, C.C., et al., *Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(3): p. E493-502.
65. Ragazzon, B., et al., *Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers*. Cancer Res, 2010. **70**(21): p. 8276-81.
66. Lehnert, H., et al., *Epigenetik – Grundlagen und klinische Bedeutung: Aus der Vortragsreihe der Medizinischen Gesellschaft Mainz e.V.* 2018: Springer Berlin Heidelberg.

67. Riggs, A.D. and P.A. Jones, *5-methylcytosine, gene regulation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1983. **40**: p. 1-30.
68. Rechache, N.S., et al., *DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(6): p. E1004-13.
69. Fonseca, A.L., et al., *Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(10): p. 949-60.
70. Barreau, O., et al., *Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(1): p. E174-84.
71. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
72. Jouinot, A., et al., *DNA Methylation Is an Independent Prognostic Marker of Survival in Adrenocortical Cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(3): p. 923-932.
73. Mulvihill, M.J., et al., *Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor*. Future Med Chem, 2009. **1**(6): p. 1153-71.
74. Ekyalongo, R.C. and D. Yee, *Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target*. NPJ Precis Oncol, 2017. **1**.
75. Gicquel, C., et al., *Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(6): p. 1444-53.
76. Giordano, T.J., et al., *Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis*. Am J Pathol, 2003. **162**(2): p. 521-31.
77. Barlaskar, F.M., et al., *Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 204-12.
78. Haluska, P., et al., *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **65**(4): p. 765-73.
79. Fassnacht, M., et al., *Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 426-35.
80. Garinet, S., et al., *Calling Chromosome Alterations, DNA Methylation Statuses, and Mutations in Tumors by Simple Targeted Next-Generation Sequencing: A Solution for Transferring Integrated Pangenomic Studies into Routine Practice?* J Mol Diagn, 2017. **19**(5): p. 776-787.
81. McShane, L.M., et al., *REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK)*. Nat Clin Pract Urol, 2005. **2**(8): p. 416-22.
82. Lippert, J., et al., *Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(12): p. 4511-4523.
83. Jouinot, A., et al., *Intratumor heterogeneity of prognostic DNA-based molecular markers in adrenocortical carcinoma*. Endocr Connect, 2020. **9**(7): p. 705-714.
84. Lang, G., *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2012: Springer Vienna.
85. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
86. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
87. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
88. Hayatsu, H., Y. Wataya, and K. Kazushige, *The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine*. J Am Chem Soc, 1970. **92**(3): p. 724-6.

89. Shapiro, R. and J.M. Weisgras, *Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine*. Biochem Biophys Res Commun, 1970. **40**(4): p. 839-43.
90. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
91. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
92. Nyren, P., B. Pettersson, and M. Uhlen, *Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay*. Anal Biochem, 1993. **208**(1): p. 171-5.
93. Quillien, V., et al., *Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients*. Cancer, 2012. **118**(17): p. 4201-11.
94. Pertea, M., X. Lin, and S.L. Salzberg, *GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1185-90.
95. Yeo, G. and C.B. Burge, *Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals*. J Comput Biol, 2004. **11**(2-3): p. 377-94.
96. Reese, M.G., et al., *Improved splice site detection in Genie*. J Comput Biol, 1997. **4**(3): p. 311-23.
97. Zhang, M.Q., *Statistical features of human exons and their flanking regions*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(5): p. 919-32.
98. Shapiro, M.B. and P. Senapathy, *RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(17): p. 7155-74.
99. Bamford, S., et al., *The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 355-8.
100. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D1062-D1067.
101. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
102. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. p1.
103. Zerbino, D.R., et al., *Ensembl 2018*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D754-D761.
104. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-91.
105. Chakravarty, D., et al., *OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base*. JCO Precis Oncol, 2017. **2017**.
106. Feuk, L., A.R. Carson, and S.W. Scherer, *Structural variation in the human genome*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(2): p. 85-97.
107. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2010. **26**(5): p. 589-95.
108. Fujita, P.A., et al., *The UCSC Genome Browser database: update 2011*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D876-82.
109. Quinlan, A.R. and I.M. Hall, *BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features*. Bioinformatics, 2010. **26**(6): p. 841-2.
110. Frampton, G.M., et al., *Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(11): p. 1023-31.
111. Van Allen, E.M., et al., *Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 682-8.

112. Spencer, D.H., et al., *Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens*. J Mol Diagn, 2013. **15**(5): p. 623-33.
113. Ross, J.S., et al., *Next-generation sequencing of adrenocortical carcinoma reveals new routes to targeted therapies*. J Clin Pathol, 2014. **67**(11): p. 968-73.
114. Kieler, M., et al., *Analysis of 10 Adrenocortical Carcinoma Patients in the Cohort of the Precision Medicine Platform MONDTI*. Oncology, 2018. **94**(5): p. 306-310.
115. Vatrano, S., et al., *Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas*. Mod Pathol, 2018. **31**(8): p. 1257-1269.
116. Chalmers, Z.R., et al., *Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden*. Genome Med, 2017. **9**(1): p. 34.
117. Duffy, M.J., *Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers*. Med Princ Pract, 2013. **22**(1): p. 4-11.
118. Lindeman, N.I., et al., *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(6): p. 828-60.
119. de Reynies, A., et al., *Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival*. J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1108-15.
120. Assie, G., et al., *Value of Molecular Classification for Prognostic Assessment of Adrenocortical Carcinoma*. JAMA Oncol, 2019.
121. Fragoso, M.C., et al., *Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(1): p. 61-7.
122. Plaska, S.W., et al., *Targeted RNAseq of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue to Differentiate Among Benign and Malignant Adrenal Cortical Tumors*. Horm Metab Res, 2020. **52**(8): p. 607-613.
123. Dickson, M.A., et al., *Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(16): p. 2024-8.
124. Dickson, M.A., et al., *Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2016. **2**(7): p. 937-40.
125. Verma, S., et al., *Palbociclib in Combination With Fulvestrant in Women With Hormone Receptor-Positive/HER2-Negative Advanced Metastatic Breast Cancer: Detailed Safety Analysis From a Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Study (PALOMA-3)*. Oncologist, 2016. **21**(10): p. 1165-1175.
126. Fiorentini, C., et al., *Palbociclib inhibits proliferation of human adrenocortical tumor cells*. Endocrine, 2018. **59**(1): p. 213-217.
127. Liang, R., et al., *Targeted Gene Expression Profile Reveals CDK4 as Therapeutic Target for Selected Patients With Adrenocortical Carcinoma*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 219.
128. Hyman, D.M., et al., *Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations*. N Engl J Med, 2015. **373**(8): p. 726-36.
129. Long, G.V., et al., *Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(19): p. 1813-1823.
130. Tovar, C., et al., *MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2587-97.
131. Yang, K., et al., *The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies*. Lab Invest, 2016. **96**(2): p. 116-36.

VERZEICHNISSE UND QUELLEN

132. Leal, L.F., et al., *Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis*. *Oncotarget*, 2015. **6**(40): p. 43016-32.
133. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(7): p. 513-32.
134. Libe, R., et al., *Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 844-50.
135. Gara, S.K., et al., *Metastatic adrenocortical carcinoma displays higher mutation rate and tumor heterogeneity than primary tumors*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 4172.
136. Kanwal, R. and S. Gupta, *Epigenetic modifications in cancer*. *Clin Genet*, 2012. **81**(4): p. 303-11.
137. Mohan, D.R., et al., *Targeted Assessment of GOS2 Methylation Identifies a Rapidly Recurrent, Routinely Fatal Molecular Subtype of Adrenocortical Carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(11): p. 3276-3288.

6.2 Internetquellen

- [Int. 1]** National Cancer Institute at the National Institute of Health, „What is cancer“ 2015 [Online]. Verfügbar: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Zugriff am 09.05.2019]
- [Int. 2]** Vfa.bio Die forschenden Pharmaunternehmen, „Der Wert innovativer Krebstherapien“ 2018 [Online]. Verfügbar: <https://www.vfa-bio.de/vb-de/aktuelle-themen/branche/der-wert-innovativer-krebstherapien.html>. [Zugriff am 04.10.2020]
- [Int. 3]** Robert Koch Institut, „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ 2016 [Online]. Verfügbar: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile. [Zugriff am 28.05.2019]
- [Int. 4]** International Agency for Research on Cancer, „Cancer Tomorrow“ [Online]. Verfügbar: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. [Zugriff am 27.06.2019]
- [Int. 5]** vfa. Die forschenden Pharmaunternehmen, „In Deutschland zugelassene Arzneimittel für die Personalisierte Medizin“ [Online]. Verfügbar: <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/datenbanken-zu-arzneimitteln/individualisierte-medizin.html>. [Zugriff am 17.10.2020]
- [Int. 6]** International Cancer Genome Consortium, „Home“ [Online]. Verfügbar: <https://www.icgc-argo.org/page/72/introduction-and-goals->. [Zugriff am 22.03.2021]
- [Int. 7]** National Cancer Institute, „The Cancer Genome Atlas Program“ [Online]. Verfügbar: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>. [Zugriff am 17.06.2019]
- [Int. 8]** Deutsche Krebshilfe, „Brustkrebs“ [Online]. Verfügbar: <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/haeufige-krebsarten/brustkrebs/>. [Zugriff am 23.10.2020]
- [Int. 9]** Zentrum für Krebsregisterdaten, „Krebsarten – Brustkrebs (Mammakarzinom)“ [Online]. Verfügbar: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html. [Zugriff am 24.10.2020]
- [Int. 10]** Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik & Poliklinik I, „Nebennierenkarzinom“ [Online]. Verfügbar: <https://www.ukw.de/medizinische-klinik-i/endokrinologie/schwerpunkte/endokrine-tumoren/nebennierenkarzinom/> [Zugriff am 13.06.2019]
- [Int. 11]** UICC, „What is TNM“ 2019. [Online]. Verfügbar: <https://www.uicc.org/resources/tnm>. [Zugriff am 03.05.2019]
- [Int. 12]** World Medical Association, „WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects“. [Online]. Verfügbar: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/> [Zugriff am 27.05.2019]

VERZEICHNISSE UND QUELLEN

- [Int. 13]** Qiagen, „GeneRead DNA FFPE Handbook“ 2014. [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=e8894854-8dc7-4318-8b1f-fa094286e4c0&lang=en>. [Zugriff am 30.12.2020]
- [Int. 14]** Macherey-Nagel, „Genomic DNA from blood“ [Online]. Verfügbar: https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNABlood.pdf. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 15]** ThermoFisher Scientific, „Qubit 4 Fluorometer“ [Online]. Verfügbar: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer.html>. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 16]** ThermoFisher Scientific, „Qubit Fluorometer Instruction Manual“ [Online]. Verfügbar: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.27078.file.dat/qubit-usermanual.pdf>. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 17]** Agilent Technologies, „Agilent High Sensitivity DNA Kit Guide“ [Online]. Verfügbar: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/High%20Sensitivity_DNA_KG.pdf. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 18]** Qiagen, „Product Details – Principle of the QIAseq DNA QuantiMIZE System.“ [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/us/shop/sequencing/qiaseq-dna-quantimize-kits/?catno=DNQC-100Y#productdetails>. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 19]** Qiagen, „GeneRead DNA QuantiMIZE Assay Handbook“ 2015. [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=6746d106-51be-4e14-a812-d8b04d08e161&lang=en>. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 20]** Qiagen, „GeneRead DNA QuantiMIZE Data Analysis Template, 384-well,“ [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=ef0391af-0e5b-44c4-a8b1-ab651ae69558&lang=en>. [Zugriff am 29.04.2019]
- [Int. 21]** SNP Check, „Gene Tools SNP Check“ [Online]. Verfügbar: <https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>. [Zugriff am 30.04.2019]
- [Int. 22]** National Center for Biotechnology Information, „Basic Local Alignment Search Tool“ [Online]. Verfügbar: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. [Zugriff am 30.04.2019]
- [Int. 23]** Qiagen, „EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook“ (2014) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=15863f2d-9d1c-4f12-b2e8-a0c6a82b2b1e&lang=en>. [Zugriff am 30.04.2019]
- [Int. 24]** Qiagen, „EpiTect Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook“ (2012) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=96b87a18-4894-432a-ae20-6c18dfb9ba20&lang=en>. [Zugriff am 30.04.2019]
- [Int. 25]** Institute of Enzymology, „BiSearch: Primer Design and Search Tool“ [Online]. Verfügbar: <http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch>. [Zugriff am 30.04.2019]

VERZEICHNISSE UND QUELLEN

- [Int. 26]** MRC Holland, „SALSA MLPA ME002 Tumour suppressor mix 2 probemixbasic research“ [Online]. Verfügbar: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=_tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID=_D_QEZ5XwgtM. [Zugriff am 21.05.2019]
- [Int. 27]** Qiagen, „PyroMark Q96 Vacuum Workstation Quick-Start Guide “ (2012) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c150836a-aeac-495a-a553-8b7cb18bd3c0&lang=en>. [Zugriff am 01.05.2019]
- [Int. 28]** Qiagen, „PyroMark Q96 MD User Manual“ (2012) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=7d172c54-3796-49ca-9e23-b25df058f2c1&lang=en>. [Zugriff am 06.05.2019]
- [Int. 29]** Qiagen, „PyroMark Gold Q96 Reagents Handbook“(2014) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c1422d31-57a3-4924-a509-a6b898235b06&lang=en>. [Zugriff am 01.05.2019]
- [Int. 30]** Qiagen, „GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 Handbook“ (2015) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=0c3d3eb1-ff6b-43f2-8eb6-810f2449051f&lang=en>. [Zugriff am 01.05.2019]
- [Int. 31]** Qiagen, „QIaseq Targeted DNA Panel Handbook“ (2017) [Online]. Verfügbar: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=8907edbe-a462-4883-ae1b-2759657e7fd0&lang=en>. [Zugriff am 01.05.2019]
- [Int. 32]** Zytovision, „ZytoLight SPEC CDK4/CEN 12 Dual Color Probe – Handbuch“ (2018) [Online]. Verfügbar: https://www.zytovision.com/downloads_products/manuals/engl/z-2103-ce-ivd-engl.pdf. [Zugriff am 01.05.2019]
- [Int. 33]** Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, „FastQC“ [Online]. Verfügbar: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. [Zugriff am 22.07.2019]
- [Int. 34]** Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, „Trim Galore“ [Online]. Verfügbar: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. [Zugriff am 22.07.2019]
- [Int. 35]** Cutadapt, „Cutadapt“ [Online]. Verfügbar: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>. [Zugriff am 22.07.2019]
- [Int. 36]** Broad Institute, „Picard“ [Online]. Verfügbar: <http://broadinstitute.github.io/picard>. [Zugriff am 22.07.2019]
- [Int. 37]** European Medicines Agency, „Ibrance“ [Online]. Verfügbar: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ibrance>. [Zugriff am 31.03.2021]
- [Int. 38]** U.S. Food & Drug Administration, „Palbociclib (IBRANCE)“ [Online]. Verfügbar: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/palbociclib-ibrance>. [Zugriff am 31.03.2021]

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktuelle und zukünftige Behandlungsstrategien für Patient*innen mit NNR-Ca.....	21
Abbildung 2: Überblick über den Projektplan.....	23
Abbildung 3: FFPE-Block mit Tumormaterial und zugehörigem HE-gefärbtem Schnitt.....	30
Abbildung 4: Prinzip der Qualitätsbestimmung mit den DNA QuantiMIZE Assay Kits.....	33
Abbildung 5: Veränderungen in der DNA-Sequenz durch die Bisulfitkonvertierung.....	36
Abbildung 6: Vorbereitung auf die Pyrosequenzierung.....	39
Abbildung 7: Erstellung des Pipettierschemas für die Pyrosequenzierung.....	40
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs der Pyrosequenzierung.....	41
Abbildung 9: Ablauf der Anreicherung mit dem GeneRead DNA Seq Human Comprehensive Cancer Panel.....	44
Abbildung 10: Ablauf der Anreicherung mit dem QIAseq Targeted DNA Custom-Panel... ..	46
Abbildung 11: Variantenvergleich zum Filtern von somatischen SNVs und kleinen Indels.....	49
Abbildung 12: Beispiele für die drei chromosomalen Signaturen.....	53
Abbildung 13: Häufig von Veränderungen betroffene Signalwege in der retrospektiven Studie.....	60
Abbildung 14: Methylierungsstatus der Proben der retrospektiven Studie.....	61
Abbildung 15: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Anzahl somatischer, proteinverändernder Varianten.....	63
Abbildung 16: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – chromosomale Signaturen.....	64
Abbildung 17: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Methylierungsstatus.....	65
Abbildung 18: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – molekularer Score.....	66
Abbildung 19: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – ENSAT-Tumorstadium.....	67
Abbildung 20: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 81 Patient*innen – hormonelle Aktivität.....	68
Abbildung 21: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Vorhandensein von Symptomen.....	69
Abbildung 22: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Proliferationsindex Ki-67.....	70

Abbildung 23: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 104 Patient*innen – Resektionsstatus.....	70
Abbildung 24: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – Alter der Patient*innen bei Erstdiagnose.....	71
Abbildung 25: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – mGRAS-Score.....	72
Abbildung 26: Überlebenszeitanalyse (PFS) mit Daten von 107 Patient*innen – COMBI-Score.....	73
Abbildung 27: Vergleich der prognostischen Stärke des COMBI- und des mGRAS-Scores.....	74
Abbildung 28: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – molekularer Score.....	75
Abbildung 29: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – mGRAS-Score.....	76
Abbildung 30: Überlebenszeitanalyse (DFS) mit Daten von 74 Patient*innen – COMBI-Score.....	77
Abbildung 31: Evidenzlevel von prädiktiven Biomarkern (Stand 2019).	79
Abbildung 32: Überprüfung der <i>CDK4</i> -Kopienzahlveränderungen mittels FISH-Analysen. 84	
Abbildung 33: Häufig von Varianten betroffene Signalwege in der prospektiven Studie. ...	88
Abbildung 34: Methylierungsergebnisse der prospektiven Studie.....	89
Abbildung 35: Vergleich der somatischen SNVs und kleinen Indels.	94
Abbildung 36: Vergleich der somatischen Kopienzahlveränderungen.	95
Abbildung 37: Vergleich des Methylierungsstatus.	96
Abbildung 38: Lage der Sequenzierprimer für die Methylierungsanalyse.	154
Abbildung 39: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>TP53</i> -Varianten.	155
Abbildung 40: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>CTNNB1</i> -Varianten.....	156
Abbildung 41: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>NF1</i> -Varianten.	157
Abbildung 42: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>APC</i> -Varianten.	158
Abbildung 43: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>ZNRF3</i> -Varianten.	159
Abbildung 44: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>MEN1</i> -Varianten.....	160
Abbildung 45: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>ATRX</i> -Varianten.	161
Abbildung 46: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>GNAS</i> -Varianten.....	162
Abbildung 47: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>RB1</i> -Varianten.....	163
Abbildung 48: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>DAXX</i> -Varianten.	164
Abbildung 49: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>NOTCH1</i> -Varianten.	165
Abbildung 50: Lage der gefundenen proteinverändernden <i>EGFR</i> -Varianten.....	166

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien zur Einteilung der NNR-Cas in Stadien anhand der ENSAT-Kriterien.	13
Tabelle 2: Klinische und histopathologische Daten der Kohorte der retrospektiven Studie (n = 107).	25
Tabelle 3: Daten zur Behandlung der Patient*innen während des Betreuungszeitraums (n = 107).	26
Tabelle 4: Untersuchte Tumorprobenpaare.	27
Tabelle 5: Klinische und histopathologische Daten der Kohorte der prospektiven Studie (n = 50).	28
Tabelle 6: Gene, die in der retro- bzw. der prospektiven Studie untersucht wurden.	42
Tabelle 7: Qualitätswerte des mGRAS-Scores im Vergleich zum COMBI-Score.	74
Tabelle 8: Potentielle Therapieziele mit Evidenzlevel 1-3A – retrospektive Studie.	81
Tabelle 9: Therapieziele mit Evidenzlevel 4 oder nicht targetierbare Varianten in potentiellen Therapiezielen – retrospektive Studie.	81
Tabelle 10: Potentielle Therapieziele mit Evidenzlevel 1-3A – prospektive Studie.	90
Tabelle 11: Therapieziele mit Evidenzlevel 4 oder nicht targetierbaren Varianten in potentiellen Therapiezielen.	90
Tabelle 12: PCR-Primer für die Analyse von <i>ZNRF3</i> .	124
Tabelle 13: Primer für Methylierungsanalysen.	126
Tabelle 14: Liste aller sequenzierten Gene.	127
Tabelle 15: Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen – Daten der retrospektiven Studie.	132
Tabelle 16: Somatische Kopienzahlveränderungen – Daten der retrospektiven Studie ...	143
Tabelle 17: Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen – Daten der prospektiven Studie.	146
Tabelle 18: Somatische Kopienzahlveränderungen – Daten der prospektiven Studie	150
Tabelle 19: Anteil an somatischen SNVs und kleinen Indels pro Gen – Vergleich zwischen retro- und prospektiver Studie und Literaturangaben (NNR-Ca-TCGA-Studie [101, 102]).	151
Tabelle 20: Der Anteil an somatischen CNAs pro Gen – Vergleich zwischen retro- und prospektiver Studie und Literaturangaben (NNR-Ca-TCGA-Studie [101, 102]).	153

6.5 Abkürzungsverzeichnis

	°C	Grad Celsius
	Δ	delta
	μg	Mikrogramm
	μl	Mikroliter
	∞	unendlich
A	A	Adenin; alternativ: Assay (bei Pyrosequenzierung)
	abs.	absolut
	ACC	adrenocortical carcinoma
	Amp	Amplifikation
	APS	Adenosin 5' Phosphosulfat
	AS	Aminosäure
	ATP	Adenosintriphosphat
B	bp	Basenpaare
	Bio	biotinyliert
	Bis	bisulfitkonvertiert
C	C	Cytosin
	c.	kodierende Position
	Ca	Karzinom
	CEN	Zentromer
	CIMP	CpG-Methylation Phenotype
	CNA	Kopienzahlveränderung (engl. Copy Number Variation)
	COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
	CpG	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin
	Ct	Schwellenwertzyklus (engl. cycle threshold)
D	Del	Deletion
	Delins	Deletion und Insertion
	DFS	krankheitsfreies Überleben (engl. disease free survival)
	dH ₂ O	destilliertes Wasser
	DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
	dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
	dNMP	Desoxynukleosidmonophosphat
	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (auch zu finden als dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
	ds	doppelsträngig
E	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EMA	Europäische Arzneimittelbehörde (engl. European Medicines Agency)
	ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
	Ex	Exon
	Exo	Exonuklease
F	F	Forward
	FC	Fold Change
	FDA	Food and Drug Administration
	ff	fresh frozen
	FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet

VERZEICHNISSE UND QUELLEN

	FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	g	Gramm
	g.	genomisch (bei Variantenpositionen)
	G	Guanin
	GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
	GRCh	Genome Reference Consortium human genome
H	h	human
	HE	Hämatoxylin-Eosin
	HR	Hazard Ratio
I	ICGC	International Cancer Genome Consortium
	ID	Identifikator
	Indel	Insertionen und Deletionen
K	k.A.	keine Angaben
	Kb	Kilobase
	KI	Konfidenzintervall
L	L	Liter
	LRV	Leserasterverschiebung
M	m	männlich
	M	Metastase; alternativ: Molar (bei Reagenzienzusammensetzungen)
	MAF	Minor Allele Frequency
	Max	Maximum
	Mb	Megabase
	mg	Milligramm
	Min	Minimum
	ml	Milliliter
	mM	Millimolar
	MS-MLPA	methylierungssensitive multiplex ligationsabhängige Probenamplifikation
N	n	Anzahl (engl. number)
	N	Lymphknoten (engl. nodule)
	NA	keine Angaben (engl. not available)
	NCI	National Cancer Institute
	ng	Nanogramm
	NGS	Next-Generation Sequencing
	nM	Nanomol
	NMD	Nonsense-vermittelter Abbau (engl. nonsense-mediated decay)
	NNR-Ca	Nebennierenrindenzarzinom (engl. ACC (adrenocortical carcinoma))
	NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (engl. non small cell lung cancer)
O	OP	Operation
	OS	Gesamtüberleben (engl. overall survival)
P	P	Probe; alternativ: Primärtumor
	p.	Aminosäureposition
	PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
	PFS	progressionsfreies Überleben (engl. progression free survival)
	pg	Pikogramm

VERZEICHNISSE UND QUELLEN

	pmol	Pikomol
	PP _i	Pyrophosphat
	Pyro	Pyrosequenzierung
Q	QC-Score	Qualitätsscore
	qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R	R	Resektion (R0, R1, R2 und RX); alternativ: Revers (bei Primern) oder Rezidiv (bei Tumoren)
	RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
	ROC	Receiver Operating Curve
	ROI	Region Of Interest
S	S	Assay (bei Benennung der Sequenzierprimer für Pyrosequenzierung)
	SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
	SBS	Sequenzierung durch Synthese (engl. Sequencing-by-Synthesis)
	SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
	SNV	Einzelnukleotidaustausch (engl. Single Nucleotide Variant)
T	T	Tumor (bei Klassifikation); alternativ: Thymin (bei Nukleotiden)
	TCGA	The Cancer Genome Atlas
	TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
	TMB	Mutationslast (engl. Tumor Mutational Burden)
U	U	Einheit (engl. Unit); alternativ: Uracil
	UICC	Union for International Cancer Control
	UMI	Unique Molecular Identifier
V	VAF	Allelfrequenz einer Variante (engl. Variant allele frequency)
	V/Var	Variante
W	w	weiblich
	WES	Whole Exome Sequencing
	WGS	Whole Genome Sequencing
	WHO	World Health Organization
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem

7 ANLAGE

7.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle 12: PCR-Primer für die Analyse von *ZNRF3*.

Aufgeführt sind die Namen der Primer, die Primersequenzen in 5' → 3'-Richtung und die Amplikonlänge in Basenpaaren (bp). Die Primersequenzen wurden bereits publiziert [82] und werden hier mit Genehmigung der Oxford University Press veröffentlicht (Lizenznummer: 4933651316969).

Name	Primersequenz 5' → 3'	Amplikonlänge [bp]
ZNRF3-Ex2-F	AAGTTTTGACGTTACTTTTGGC	369
ZNRF3-Ex2-R	ACCCAGCATGGCTCTTCTCCATAATC	
ZNRF3-Ex3-F	CATCCCTGAAGTCACCTAAGTTGG	339
ZNRF3-Ex3-R	ACCGCTCTGAGATGAGGGTGACATG	
ZNRF3-Ex4.1-F	CAGTGTTCCCTCCCTCCAGCCTT	243
ZNRF3-Ex4.1-R	ACCCTGGATCCTTGCTCGAGCCACTT	
ZNRF3-Ex4.2-F	CTGAACCAGGGCTCTGAAGA	250
ZNRF3-Ex4.2-R	ACCGGAATGAAAGCCCAAGGGAAATA	
ZNRF3-Ex5-F	CGGTCACCCCATCTTTATCC	327
ZNRF3-Ex5-R	ACCTAAGGTGACGAGAGTCCTGG	
ZNRF3-Ex6.1-F	GAATCGTGTGTCATGTCCCT	262
ZNRF3-Ex6.1-R	ACCAGACAGATGGCACAGTCGG	
ZNRF3-Ex6.2-F	GCAGGCTCTAGAGAAGATGGAA	265
ZNRF3-Ex6.2-R	ACCGGGCCCTGTCCTTCTAGGT	
ZNRF3-Ex7-F	TCCTTGGTCTATGCTGGACTC	314
ZNRF3-Ex7-R	ACCACGGTGTTCTGAGTGTTC	
ZNRF3-Ex8.1-F	CCCTTTAGCCTCTGACACCA	311
ZNRF3-Ex8.1-R	ACCGAATAGAGGCTCTGCTCCCC	
ZNRF3-Ex8.2-F	CACAGGACCAACGCCATC	299
ZNRF3-Ex8.2-R	ACCGCTGCCTTGGAGAAGCTG	
ZNRF3-Ex8.3-F	GCCTACATCCGCAGCTACCCA	323
ZNRF3-Ex8.3-R	ACCAAGAGCAGGCTGCCACTGC	

ANLAGE

Name	Primersequenz 5' → 3'	Amplikonlänge [bp]
ZNRF3-Ex8.4-F	TACTACTTCCAGGGCCTCAGCTA	324
ZNRF3-Ex8.4-R	ACCAGAGTCACTGGAGGAACAGTGG	
ZNRF3-Ex8.5-F	CAGTGGCAGCCTGCTCTT	322
ZNRF3-Ex8.5-R	ACCGATGAAGGGGTCATAGTCGC	
ZNRF3-Ex8.6-F	AGTGCCACTGTTCCCTCCAGT	342
ZNRF3-Ex8.6-R	ACCAGGTGGACACCTGATCCC	
ZNRF3-Ex8.7-F	CCCTGTTCGTGCCAGTGAG	336
ZNRF3-Ex8.7-R	ACCCCCTTCCAGGTCCTCCT	
ZNRF3-Ex8.8-F	TGCAGCCTGGAGATGAACTA	285
ZNRF3-Ex8.8-R	ACCAGAGCCCTCGTAGAGGTGG	
ZNRF3-Ex8.9-F	CTCAGGAGGACCTGGAAGG	358
ZNRF3-Ex8.9-R	ACCCCGAGTAGTCCTCAGTGTAGCA	
ZNRF3-Ex8.10-F	GAAGCTCCCAGGGCTTGTA	302
ZNRF3-Ex8.10-R	ACCGCCCAGATCACAGTCCACAT	
ZNRF3-Ex8.11-F	CAGTACACGCTCACCGAGGA	334
ZNRF3-Ex8.11-R	ACCTAGGGAAGTTGGCCCTGAC	
ZNRF3-Ex8.12-F	GACTGCCAAGGGACCCAC	330
ZNRF3-Ex8.12-R	ACCAGACAAGACGACCCTGATGG	
ZNRF3-Ex9-F	TAGCATACACAGGCCTGCCA	305
ZNRF3-Ex9-R	ACCCCACTTTTGTGTGTTTGTCAAAGCTA	

Abkürzungen: bp = Basenpaare; Ex=Exon; F=Foward; R=Reverse

ANLAGE

Tabelle 13: Primer für Methylierungsanalysen.

Neben den Gennamen sind die Bezeichnungen der Primer angegeben und für welchen Schritt diese verwendet wurden (PCR oder Sequenzierung). Die Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Außerdem ist die Amplikonlänge des PCR-Produkts und die Anzahl der analysierten CpGs pro Assay angegeben. Die Primersequenzen wurden bereits in [82] publiziert und werden hier mit Genehmigung der Oxford University Press veröffentlicht (Lizenznummer: 4933651316969).

Gen	Name	Verwendung	Primersequenz (5'→3')	Amplikonlänge [bp]	Anzahl CpGs
<i>PAX5</i>	hPAX5-Bis-F	PCR	GTGTTTGGTAATATTGTTAGTTTTTGTAAAT		
	hPAX5-Bis-Bio-R	PCR	*AAAAAAAAAAAAAACTTCAACCTAC	290	
	hPAX5-Pyro-S1	Sequenzierung A1	GTATATGGAGATGTTATAG		6
	hPAX5-Pyro-S2	Sequenzierung A2	GTATGTTTTAATAGAAGGTG		7
<i>PAX6</i>	hPAX6-Bis-F	PCR	GGGAGAGGGAGTATTTAAT		
	hPAX6-Bis-Bio-R	PCR	*TCATCATCCTCCAACAAAACACTTC	194	
	hPAX6-Pyro-S1	Sequenzierung A1	GGGAGAGGGAGTATTTAAT		5
	hPAX6-Pyro-S2	Sequenzierung A2	GTTGTTTTGTATAAAGTAATATT		3
	hPAX6-Pyro-S3	Sequenzierung A3	TGGGTTTGAAAAGGG		4
<i>PYCARD</i>	hPYCARD-Bis-F	PCR	GGGATTTTGGAGTTATGGGG		
	hPYCARD-Bis-Bio-R	PCR	*CCATCTCCTACAAACCCATAT	256	
	hPYCARD-Pyro-S1	Sequenzierung A1	GGGATTTTGGAGTTATGGGG		9
	hPYCARD-Pyro-S2	Sequenzierung A2	TTTAAGAAGTTTAAGTTGAA		10
	hPYCARD-Pyro-S3	Sequenzierung A3	GGTTAGTTTTTATTTGGAGAT		7
<i>GSTP1</i>	hGSTP1-Bis-F	PCR	GGGGTTTAGGGAGTAAATAGATAGTA		
	hGSTP1-Bis-Bio-R	PCR	*CCCTCTCCCCTACCCTATAA	149	
	hGSTP1-Pyro-S1	Sequenzierung A1	AGTAAATAGATAGTAGGAAGAG		9
	hGSTP1-Pyro-S2	Sequenzierung A2	GGGGGAAATTTTTTAAGA		4

* 5'-biotinylierter Primer

Abkürzungen: A = Assay; Bio = biotinyliert; Bis = Bisulfitkonvertiert; bp = Basenpaare; CpG = Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin; F = Forward; h = human; R = Reverse; PCR = Polymerase Chain Reaction; Pyro = Pyrosequenzierung; S = Assay

ANLAGE

Tabelle 14: Liste aller sequenzierten Gene.

Angegeben sind die Gene in alphabetischer Reihenfolge, auf welchem Chromosom das entsprechende Gen liegt, die verwendete Referenzsequenz, sowie die Anzahl der Regionen, die mit den Anreicherungen abgedeckt wurden. Für Gene, die nicht für die CNA-Analyse verwendet wurden, wurde graue Schriftfarbe verwendet.

Gen	Chromosom	Referenzsequenz	Regionen
<i>ABL1</i> (c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase)	9	NM_007313.2	10
<i>AKT1</i> (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)	14	NM_005163.2	13
<i>AKT2</i> (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2)	19	NM_001626.4	13
<i>ALK</i> (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase)	2	NM_004304.4	29
<i>AMER1</i> (APC membrane recruitment protein 1)	X	NM_152424.3	1
<i>APC</i> (adenomatous polyposis coli)	5	NM_000038.5	15
<i>AR</i> (androgen receptor)	X	NM_000044.3	8
<i>ARID1A</i> (AT rich interactive domain 1A (SWI-like))	1	NM_006015.4	19
<i>ARID2</i> (AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like))	12	NM_152641.2	21
<i>ASXL1</i> (additional sex combs like 1 (Drosophila))	20	NM_015338.5	12
<i>ATM</i> (ataxia telangiectasia mutated)	11	NM_000051.3	62
<i>ATRX</i> (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)	X	NM_000489.3	35
<i>BAP1</i> (BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase))	3	NM_004656.2	16
<i>BCL6</i> (B-cell CLL/lymphoma 6)	3	NM_001130845.1	8
<i>BCOR</i> (BCL6 corepressor)	X	NM_001123385.1	14
<i>BRAF</i> (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)	7	NM_004333.4	17
<i>BRCA1</i> (breast cancer 1, early onset)	17	NM_007294.3	22
<i>BRCA2</i> (breast cancer 2, early onset)	13	NM_000059.3	26
<i>BRIP1</i> (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1)	17	NM_032043.2	19
<i>BTK</i> (Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase)	X	NM_000061.2	18
<i>BUB1B</i> (BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B)	15	NM_001211.5	23
<i>CARD11</i> (caspase recruitment domain family, member 11)	7	NM_032415.4	24
<i>CBL</i> (Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase)	11	NM_005188.3	16
<i>CBLB</i> (Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase B)	3	NM_170662.3	18
<i>CCNE1</i> (cyclin E1)	19	NM_001238	11
<i>CD79A</i> (CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha)	19	NM_001783.3	5
<i>CD79B</i> (CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta)	17	NM_000626.2	6
<i>CDC27</i> (cell division cycle 27)	17	NM_001256	19
<i>CDC73</i> (cell division cycle 73)	1	NM_024529.4	17
<i>CDH1</i> (cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial))	16	NM_004360.3	15
<i>CDK12</i> (cyclin-dependent kinase 12)	17	NM_016507.2	14

ANLAGE

Gen	Chromosom	Referenzsequenz	Regionen
<i>CDK4</i> (cyclin-dependent kinase 4)	12	NM_000075.3	7
<i>CDKN2A</i> (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9	NM_000077.4	3
<i>CHEK2</i> (checkpoint kinase 2)	22	NM_007194.3	13
<i>CIC</i> (capicua homolog (Drosophila))	19	NM_015125.3	20
<i>CREBBP</i> (CREB binding protein)	16	NM_004380.2	31
<i>CRLF2</i> (cytokine receptor-like factor 2)	X/Y	NM_022148	6
<i>CSF1R</i> (colony stimulating factor 1 receptor)	5	NM_005211.3	21
<i>CTNNB1</i> (catenin (cadherin-associated protein), beta 1)	3	NM_001098210.1	14
<i>CYLD</i> (cylindromatosis (turban tumor syndrome))	16	NM_001042355.1	16
<i>DAXX</i> (death-domain associated protein)	6	NM_001141969.1	7
<i>DDB2</i> (damage-specific DNA binding protein 2)	11	NM_000107.2	10
<i>DDR2</i> (discoidin domain receptor tyrosine kinase 2)	1	NM_006182.2	16
<i>DICER1</i> (dicer 1, ribonuclease type III)	14	NM_00177438.2	25
<i>DNMT3A</i> (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha)	2	NM_022552.4	22
<i>ECT2L</i> (epithelial cell transforming sequence 2 oncogene-like)	6	NM_001077706.2	20
<i>EGFR</i> (epidermal growth factor receptor)	7	NM_005228.3	27
<i>EP300</i> (E1A binding protein p300)	22	NM_001429.3	31
<i>EPCAM</i> (epithelial cell adhesion molecule)	2	NM_002354.2	8
<i>ERBB2</i> (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian))	17	NM_001005862.1	26
<i>ERBB3</i> (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian))	12	NM_001005915.1	3
<i>ERBB4</i> (v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian))	2	NM_001042599.1	27
<i>ERCC5</i> (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5)	13	NM_000123.2	15
<i>ESR1</i> (estrogen receptor 1)	6	NM_000125.3	8
<i>EZH2</i> (enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila))	7	NM_004456.4	19
<i>FAM46C</i> (family with sequence similarity 46, member C)	1	NM_017709.3	1
<i>FANCA</i> (Fanconi anemia, complementation group A)	16	NM_000135.2	42
<i>FANCD2</i> (Fanconi anemia, complementation group D2)	3	NM_001018115.1	42
<i>FANCE</i> (Fanconi anemia, complementation group E)	6	NM_021922.2	10
<i>FAS</i> (Fas (TNF receptor superfamily, member 6))	10	NM_000043.4	9
<i>FBXO11</i> (F-box protein 11)	2	NM_025133.4	31
<i>FBXW7</i> (F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase)	4	NM_001013415.1	11
<i>FGFR2</i> (fibroblast growth factor receptor 2)	10	NM_001144915	17
<i>FGFR3</i> (fibroblast growth factor receptor 3)	4	NM_000142.4	16
<i>FGFR4</i> (fibroblast growth factor receptor 4)	5	NM_002011	17
<i>FH</i> (fumarate hydratase)	1	NM_000143.3	10
<i>FLCN</i> (Folliculin)	17	NM_144997.5	11

ANLAGE

Gen	Chromosom	Referenzsequenz	Regionen
<i>FLT3</i> (fms-related tyrosine kinase 3)	13	NM_004119.2	23
<i>FUBP1</i> (far upstream element (FUSE) binding protein 1)	1	NM_003902.3	20
<i>GATA1</i> (GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1))	X	NM_002049.3	5
<i>GATA2</i> (GATA binding protein 2)	3	NM_032638.4	5
<i>GATA3</i> (GATA binding protein 3)	10	NM_001002295.1	5
<i>GNA11</i> (guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class))	19	NM_002067.2	6
<i>GNAQ</i> (guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide)	9	NM_002072.3	6
<i>GNAS</i> (GNAS complex locus)	20	NM_000516.5	12
<i>GPC3</i> (glypican 3)	X	NM_004484.3	8
<i>GRIN2A</i> (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A)	16	NM_000833.3	12
<i>H3F3A</i> (H3 histone, family 3A)	1	NM_002107.4	3
<i>HIST1H3B</i> (histone cluster 1, H3b)	6	NM_003537.3	1
<i>HNF1A</i> (HNF1 homeobox A)	12	NM_000545.5	9
<i>HRAS</i> (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)	11	NM_176795.3	4
<i>HSPH1</i> (heat shock 105kDa/110kDa protein 1)	13	NM_006644.2	18
<i>IDH1</i> (isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble)	2	NM_005896.2	8
<i>IDH2</i> (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial)	15	NM_002168.2	10
<i>IKZF1</i> (IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros))	7	NM_006060.5	7
<i>IL6ST</i> (interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor))	5	NM_002184.3	15
<i>IL7R</i> (interleukin 7 receptor)	5	NM_002185.3	8
<i>JAK1</i> (Janus kinase 1)	1	NM_002227.2	24
<i>JAK2</i> (Janus kinase 2)	9	NM_004972.3	23
<i>JAK3</i> (Janus kinase 3)	19	NM_000215.3	23
<i>KDM6A</i> (lysine (K)-specific demethylase 6A)	X	NM_021140.2	28
<i>KDR</i> (kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase))	4	NM_002253.2	30
<i>KIT</i> (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog)	4	NM_000222.2	20
<i>KLF6</i> (Kruppel-like factor 6)	10	NM_001160124.1	4
<i>KMT2D</i> (lysine (K)-specific methyltransferase 2D)	12	NM_003482.3	54
<i>KRAS</i> (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)	12	NM_004985.3	4
<i>KREMEN1</i> (kringle containing transmembrane protein 1)	22	NM_001039570	10
<i>MAP2K1</i> (mitogen-activated protein kinase kinase 1)	15	NM_002755.3	11
<i>MAP2K2</i> (mitogen-activated protein kinase kinase 2)	19	NM_030662.3	10
<i>MAP2K4</i> (mitogen-activated protein kinase kinase 4)	17	NM_003010.2	10
<i>MAP3K1</i> (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase)	5	NM_005921.1	19
<i>MAP4K3</i> (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3)	2	NM_003618.3	33
<i>MCAM</i> (melanoma cell adhesion molecule)	11	NM_006500	16

ANLAGE

Gen	Chromosom	Referenzsequenz	Regionen
<i>MDM2</i> (Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse))	12	NM_002392.4	10
<i>MED12</i> (mediator complex subunit 12)	X	NM_005120.2	45
<i>MEN1</i> (multiple endocrine neoplasia I)	11	NM_000244.3	9
<i>MET</i> (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor))	7	NM_001127500.1	20
<i>MLH1</i> (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli))	3	NM_000249.3	19
<i>MSH2</i> (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli))	2	NM_000251.2	16
<i>MSH6</i> (mutS homolog 6 (E. coli))	2	NM_001281492	13
<i>MTOR</i> (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase))	1	NM_004958.3	57
<i>MUTYH</i> (mutY homolog (E. coli))	1	NM_001128425.1	15
<i>MYC</i> (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian))	8	NM_002467.4	3
<i>MYD88</i> (myeloid differentiation primary response 88)	3	NM_002468.4	5
<i>NF1</i> (neurofibromin 1)	17	NM_000267.3	55
<i>NF2</i> (neurofibromin 2 (merlin))	22	NM_000268.3	16
<i>NFE2L2</i> (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)	2	NM_006164.4	4
<i>NFKBIA</i> (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)	14	NM_020529.2	5
<i>NOTCH1</i> (notch 1)	9	NM_017617.3	33
<i>NOTCH2</i> (notch 2)	1	NM_024408.3	33
<i>NPM1</i> (nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin))	5	NM_002520.6	11
<i>NRAS</i> (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog)	1	NM_002524.4	4
<i>PALB2</i> (partner and localizer of BRCA2)	16	NM_024675.3	13
<i>PAX5</i> (paired box 5)	9	NM_016734.1	10
<i>PBRM1</i> (polybromo 1)	3	NM_0181042.4	29
<i>PDGFRA</i> (platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide)	4	NM_006206.4	22
<i>PHF6</i> (PHD finger protein 6)	X	NM_032458.2	9
<i>PIK3CA</i> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha)	3	NM_006218.2	18
<i>PIK3R1</i> (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha))	5	NM_181504.3	10
<i>PMS2</i> (PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae))	7	NM_000535.5	11
<i>PPP2R1A</i> (protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha)	19	NM_014225.5	15
<i>PRDM1</i> (PR domain containing 1, with ZNF domain)	6	NM_001198.3	7
<i>PRKAR1A</i> (protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha)	17	NM_002734.3	10
<i>PTCH1</i> (patched 1)	9	NM_000264.3	22
<i>PTEN</i> (phosphatase and tensin homolog)	10	NM_000314.4	8
<i>PTPN11</i> (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11)	12	NM_002834.3	14
<i>RAC1</i> (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1))	7	NM_018890.3	6
<i>RB1</i> (retinoblastoma 1)	13	NM_000321.2	26
<i>RET</i> (ret proto-oncogene)	10	NM_020975.4	19

ANLAGE

Gen	Chromosom	Referenzsequenz	Regionen
<i>ROS1</i> (c-ros oncogene 1 , receptor tyrosine kinase)	6	NM_002944.2	43
<i>RPL22</i> (ribosomal protein L22)	1	NM_000983	4
<i>SCN7A</i> (sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha subunit)	2	NM_002976	24
<i>SDHB</i> (succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip))	1	NM_003000.2	8
<i>SDK1</i> (sidekick cell adhesion molecule 1)	7	NM_152744	46
<i>SETD2</i> (SET domain containing 2)	3	NM_014159.6	20
<i>SF3B1</i> (splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa)	2	NM_001005526.1	5
<i>SLC7A8</i> (solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8)	14	NM_001267036.1	9
<i>SMAD4</i> (SMAD family member 4)	18	NM_005359.5	11
<i>SMARCA4</i> (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4)	19	NM_001128849.1	35
<i>SMARCB1</i> (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1)	22	NM_003073.3	8
<i>SMO</i> (smoothened, frizzled family receptor)	7	NM_005631.4	12
<i>SPOP</i> (speckle-type POZ protein)	17	NM_003563.3	9
<i>SRC</i> (v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian))	20	NM_005417.3	10
<i>STK11</i> (serine/threonine kinase 11)	19	NM_000455.4	8
<i>SUFU</i> (suppressor of fused homolog (Drosophila))	10	NM_016169.3	12
<i>TERF2</i> (telomeric repeat binding factor 2)	16	NM_005652	11
<i>TERT</i> (telomerase reverse transcriptase)	5	NM_001193376.1	15
<i>TNFAIP3</i> (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3)	6	NM_001270507.1	8
<i>TNFRSF14</i> (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14)	1	NM_003820.2	8
<i>TP53</i> (tumor protein p53)	17	NM_000546.5	10
<i>TSC1</i> (tuberous sclerosis 1)	9	NM_000368.4	21
<i>TSC2</i> (tuberous sclerosis 2)	16	NM_000548.3	41
<i>TSHR</i> (thyroid stimulating hormone receptor)	14	NM_000369.2	10
<i>U2AF1</i> (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1)	21	NM_006758.2	7
<i>VHL</i> (von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase)	3	NM_000551.3	3
<i>WT1</i> (Wilms tumor 1)	11	NM_024426.4	10
<i>XPC</i> (xeroderma pigmentosum, complementation group C)	3	NM_004628.4	16
<i>ZNF2</i> (zinc finger protein 2)	2	NM_021088.2	4
<i>ZNRF3</i> (zinc and ring finger 3)	22	NM_001206998	9
<i>ZRSR2</i> (zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2)	X	NM_005089.3	11

ANLAGE

Tabelle 15: Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen – Daten der retrospektiven Studie

Zu jeder untersuchten Probe (nach ID sortiert) sind alle gefundenen Varianten mit Gen, Position (genomisch ((g.) (GRCh37));kodierend (c.) und Änderungen auf Proteinebene (p.-Position (NM-Nummer siehe Tabelle 14)), Abdeckung und Variantenfrequenz angegeben. Der Zusatztumor von Tumorkaasen ist mit „_2“ gekennzeichnet. Die Daten wurden bereits veröffentlicht [82] und werden hier in reduzierter Form und mit Genehmigung der OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 4933651316969) gezeigt.

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
182						
182_2						
1082	<i>SMO</i>	chr7:g.128846133G>A	c.1063G>A	p.Gly355Ser	2902	13
1093	<i>ABL1</i>	chr9:g.133760216G>A	c.2596G>A	p.Ala866Thr	105	12,4
1093	<i>APC</i>	chr5:g.112175941insA	c.4653dup	p.Glu1552Argfs*7	1185	76
1093	<i>CIC</i>	chr19:g.42795009G>A	c.2089G>A	p.Ala697Thr	113	12
1093	<i>CIC</i>	chr19:g.42795016C>T	c.2096G>A	p.Ala699Val	109	11
1098	<i>NF1</i>	chr17:g.29548948G>A	c.1721+1G>A	p.?	776	19
1098	<i>TP53</i>	chr17:g.7577581A>T	c.700T>A	p.Tyr234Asn	1240	18
1109	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266056_41266057delAG	c.53_54del	p.Arg18Lysfs*5	4420	42
1109	<i>RB1</i>	chr13:g.49030416C>T	c.1891C>T	p.Gln631*	4080	20
1109	<i>RB1</i>	chr13:g.49037942T>A	c.2182T>A	p.Tyr728Asn	6343	40
1109	<i>PALB2</i>	chr16:g.23634316T>C	c.2970A>G	p.Glu990Glu	2580	43
1110	<i>U2AF1</i>	chr21:g.44524486A>G	c.71T>C	p.Ile24Thr	844	23
1132	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266104G>T	c.101G>T	p.Gly34Val	1983	42
1132	<i>EP300</i>	chr22:g.41573605C>T	c.5890C>T	p.Pro1964Ser	570	68
1132	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29445215_29445216delTG	c.1046_1047delTG	p.Val349Glyfs*117	K.A.	K.A.
1154	<i>DAXX</i>	chr6:g.33289151delA	c.401del	p.Leu134Profs*10	866	49
1154	<i>GNAS</i>	chr20:g.57484597G>C	c.681G>C	p.Gln227His	1924	51
1154	<i>MEN1</i>	chr11:g.64575521G>A	c.511C>T	p.Gln171*	1108	65
1154	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29383048C>T	c.301-16C>T	p.?		
1174	<i>ESR1</i>	chr6:g.152332929_152332930delinsTT	c.1235_1235+1delinsTT	p.?	2241	54
1174	<i>AMER1</i>	chrX:g.63410734G>A	c.2433C>T	p.Ile811Ile	1456	65
1182	<i>APC</i>	chr5:g.112174407insA	c.3118dup	p.Arg1040Lysfs*8	469	13
1182	<i>BCOR</i>	chrX:g.39916480C>T	c.4523G>A	p.Gly1508Asp	143	21

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1183						
1184	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	1911	44
1184	<i>GNAS</i>	chr20:g.57484420C>T	c.601C>T	p.Arg201Cys	4004	43
1204						
1209						
1212	<i>ATM</i>	chr11:g.108117718delGTATTT	c.929_934del	p.Ser310_Leu312delinsIle	1939	58
1212	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98268765G>A	c.318C>T	p.Leu106Leu	1735	49
1217	<i>RB1</i>	chr13:g.48941645A>T	c.955A>T	p.Lys319*	1056	29
1217	<i>TP53</i>	chr17:g.7578205C>T	c.644G>A	p.Ser215Asn	3311	38
1226	<i>KMT2D</i>	chr12:g.49420258delG	c.15490del	p.Gln5164Lysfs*79	1969	21
1229						
1234	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136_41266138del	c.133_135del	p.Ser45del	3550	43
1234	<i>JAK2</i>	chr9:g.5081820T>G	c.2530T>G	p.Phe844Val	4889	23
1235						
1251						
1255	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	4363	45
1255	<i>KMT2D</i>	chr12:g.4942643G>C	c.12049C>G	p.Pro4017Ala	5064	27
1256	<i>BRCA2</i>	chr13:g.32937441C>A	c.8102C>A	p.Ser2701Tyr	5893	45
1256	<i>CREBBP</i>	chr16:g.3795330G>A	c.3748C>T	p.Arg1250Trp	3603	33
1256	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266137C>G	c.134C>G	p.Ser45Cys	7234	63
1256	<i>DAXX</i>	chr6:g.33288300insC	c.1107dup	p.Ser370Glufs*5	3019	58
1256	<i>KDR</i>	chr4:g.5955038C>G	c.3507G>C	p.Gln1169His	7819	32
1256	<i>MSH6</i>	chr2:g.48030783A>G	c.3007A>G	p.Thr1003Ala	4917	41
1256	<i>NF1</i>	chr17:g.29559126C>G	c.3233C>G	p.Ser1078*	2126	60
1256	<i>RET</i>	chr10:g.43619247G>T	c.2930G>T	p.Ser977Ile	2841	41
1256	<i>SLC7A8</i>	chr14:g.23607234C>G	c.304-1G>C	p.?	6166	12
1256	<i>TP53</i>	chr17:g.7578290C>T	c.560-1G>A	p.?	3005	63
1256	<i>WT1</i>	chr11:g.32452076C>G	c.10G>C	p.Gly4Arg	454	56
1256	<i>ALK</i>	chr2:g.29519819G>A	c.1752C>T	p.Val584Val	5518	21
1256	<i>CBLB</i>	chr3:g.105453003G>C	c.1072-19	p.?	4857	39

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1256	<i>ESR1</i>	chr6:g.152129200G>T	c.153G>T	p.Val51Val	1805	30
1256	<i>TSC2</i>	chr16:g.2129204G>T	c.3131+7G>T	p.?	2275	33
1258	<i>CIC</i>	chr19:g.42795844G>A	c.2833G>A	p.Val945Met	289	10
1258	<i>CIC</i>	chr19:g.42796775C>T	c.3233C>T	p.Pro1078Leu	385	10
1258	<i>TP53</i>	chr17:g.7579329T>C	c.358A>G	p.Lys120Glu	887	87
1260	<i>APC</i>	chr5:g.112175903G>T	c.4612G>T	p.Glu1538*	570	65
1260	<i>TP53</i>	chr17:g.7579320delCA	c.365_366del	p.Val122Aspfs*26	680	73
1267						
1269	<i>APC</i>	chr5:g.112175993dup	c.4702dup	p.Asp1568Glyfs*2	2907	42
1269	<i>NF1</i>	chr17:g.29554268C>G	c.2284C>G	p.Leu762Val	2738	42
1282	<i>DNMT3A</i>	chr2:g.25466783_25466786del	c.1917_1920del	p.Phe640Metfs*10	3305	59
1296	<i>BCL6</i>	chr3:g.187447009G>T	c.1184C>A	p.Pro395His	578	39
1296	<i>EZH2</i>	chr7:g.148515005C>A	c.1204G>T	p.Glu402*	4827	41
1296	<i>FBXW7</i>	chr4:g.153249504C>A	c.920G>T	p.Trp307Leu	1364	32
1296	<i>KDM6A</i>	chrX:g.44949156G>T	c.3717G>T	p.Trp1239Cys	2048	82
1296	<i>TP53</i>	chr17:g.7577509C>A	c.772G>T	p.Glu258*	963	85
1296	<i>ROS1</i>	chr6:g.117706957C>A	c.2193G>T	p.Leu731Leu	2005	41
1296	<i>PMS2</i>	chr7:g.6029474G>T	c.1101C>A	p.Val367Val	773	43
1296	<i>CSF1R</i>	chr5:g.149441421G>T	c.1627-9C>A	p.?	751	45
1316	<i>KDM6A</i>	chrX:g.44922933_44922941del	c.1794_1802del	p.Thr599_Ser601del	2930	16
1316	<i>TERT</i>	chr5:g.1282707G>C	c.1606C>G	p.Leu536Val	4090	35
1344						
1351	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	3264	37
1362	<i>FANCE</i>	chr6:g.35423873C>T	c.598C>T	p.Arg200Cys	752	62
1362	<i>H3F3A</i>	chr1:g.226253419G>A	c.191G>A	p.Arg64His	863	64
1362	<i>KDR</i>	chr4:g.55964358G>A	c.2455C>T	p.Arg819*	8572	18
1362	<i>KIT</i>	chr4:g.55561755C>T	c.145C>T	p.Arg49Cys	1984	39
1362	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139404395C>T	c.2759G>A	p.Gly920Asp	3428	67
1362	<i>PBRM1</i>	chr3:g.52643399G>A	c.2497C>T	p.Arg833Cys	610	26
1362	<i>TP53</i>	chr17:g.7577120C>T	c.818G>A	p.Arg273His	3767	68

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1372	<i>APC</i>	chr5:g.112175665delT	c.4374del	p.Thr1459Leufs*14	584	69
1408	<i>APC</i>	chr5:g.112175952delA	c.4666del	p.Thr1556Leufs*9	1566	65
1431	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266137C>T	c.134C>T	p.Ser45Phe	1655	43
1460	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	2241	29
1460	<i>MEN1</i>	chr11:g.64573109G>A	c.1198C>T	p.Gln400*	886	30
1480	<i>ABL1</i>	chr9:g.133759425G>A	c.1748G>A	p.Gly583Asp	2476	42
1480	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41246715G>T	c.692C>A	p.Thr231Asn	1892	42
1480	<i>FBXW7</i>	chr4:g.153253747C>T	c.745+1G>A	p.?	395	35
1480	<i>MED12</i>	chrX:g.70344137G>A	c.1873G>A	p.Ala625Thr	1795	51
1480	<i>MYC</i>	chr8:g.128751151G>A	c.688G>A	p.Ala230Thr	2366	29
1482						
1489						
1491						
1533	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266137C>T	c.134C>T	p.Ser45Phe	2445	72
1542	<i>TP53</i>	chr17:g.7578429delC	c.501del	p.Gln167Hisfs*3	922	62
1553	<i>KDR</i>	chr4:g.55961086C>T	c.2854G>A	p.Val952Ile	772	82
1553	<i>MEN1</i>	chr11:g.64572505C>A	c.1365+1G>T	p.?	332	85
1553	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29440795delA	c.661delA	p.Ile221Phefs*22	K.A.	K.A.
1553	<i>GPC3</i>	chrX:g.132834059G>T	c.1033-3C>A	p.?	3478	42
1557	<i>DNMT3A</i>	chr2:g.25523021dup	c.164dup	p.Lys56Glnfs*9	876	82
1557	<i>GNAS</i>	chr20:g.57484421G>A	c.602G>A	p.Arg201His	2340	28
1595						
1619						
1665						
183	<i>AR</i>	chrX:g.66931247G>A	c.1889G>A	p.Arg630Gln	7398	34
183	<i>ATRX</i>	chrX:g.76937683C>T	c.3065	p.1022	7958	59
183	<i>PPP2R1A</i>	chr19:g.52716301C>T	c.745C>T	p.Arg249Cys	146	10
183	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29440766A>T	c.634-2A>T	p.?	K.A.	K.A.
216	<i>ATRX</i>	chrX:g.76872199C>T	c.5449-1G>A	p.?	248	22
216	<i>BCL6</i>	chr3:g.187446247G>A	c.1441C>T	p.Gln481*	332	13

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
216	<i>BCL6</i>	chr3:g.187446313G>A	c.1375C>T	p.Arg459Cys	182	13
216	<i>PALB2</i>	chr16:g.23647464G>A	c.403C>T	p.Pro135Ser	263	19
216	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98209397C>T	c.4141G>A	p.Val1381Met	161	35
216	<i>TP53</i>	chr17:g.7578406C>T	c.524C>T	p.Arg175His	4816	50
216	<i>ATM</i>	chr11:g.108106566G>A	c.496+5G>A	p.?	482	30
216	<i>BCOR</i>	chrX:g.39911657C>A	c.4977-4G>T	p.?	2489	23
216	<i>CBLB</i>	chr3:g.105464766G>A	c.840C>T	p.?	240	29
216	<i>MAP2K1</i>	chr15:g.66729250C>T	c.438+20C>T	p.?	654	50
216	<i>MED12</i>	chrX:g.70341169A>C	c.736-8A>C	p.?	2773	25
216	<i>RB1</i>	chr13:g.49051481T>A	c.2664-10T>A	p.?	674	26
216	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98209458G>A	c.4080C>T	p.Ser1360Ser	2323	18
279	<i>CDH1</i>	chr16:g.68856054C>T	c.1862C>T	p.Pro621Leu	5725	12
279	<i>ROS1</i>	chr6:g.117714495A>T	c.1165-11T>A	p.?		
282	<i>GRIN2A</i>	chr16:g.9934641G>A	c.1514C>T	p.Ala505Val	3817	14
282	<i>TP53</i>	chr17:g.7579311C>G	c.375+1G>C	p.?	1583	33
282	<i>RET</i>	chr10:g.43610145C>T	c.2097C>T	p.Ser699Ser	127	10
282	<i>PIK3CA</i>	chr3:g.178942473T>A	c.2295-15T>A	p.?	868	23
282	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29438571G>A	c.501+14G>A	p.?	K.A.	K.A.
355	<i>DAXX</i>	chr6:g.33289558C>T	c.145G>A	p.Gly49Arg	102	15
392						
459	<i>ATRX</i>	chrX:g.76814142G>A	c.6502C>T	p.Gln2168*	3017	30
459	<i>CSF1R</i>	chr5:g.149441339G>A	c.1700C>T	p.Thr567Met	3185	45
459	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266125C>T	c.122C>T	p.Thr41Ile	1933	28
459	<i>GNA11</i>	chr19:g.3113445C>T	c.439C>T	p.Arg147Cys	2129	48
459	<i>MEN1</i>	chr11:g.64574660T>C	c.830A>G	p.His277Arg	6124	24
459	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139401336C>T	c.3733G>A	p.Val1245Met	4275	29
459	<i>PBRM1</i>	chr3:g.52582249G>A	c.4579C>T	p.Arg1527*	699	24
459	<i>RB1</i>	chr13:g.48947629G>A	c.1215+1G>A	p.?	417	80
459	<i>TP53</i>	chr17:g.7577121G>A	c.817C>T	p.Arg273Cys	5036	89
488						

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
500	<i>NF1</i>	chr17:g.29654535C>T	c.5224C>T	p.Gln1742*	2866	53
500_2	<i>NF1</i>	chr17:g.29654535C>T	c.5224C>T	p.Gln1742*	4102	47
511						
526	<i>APC</i>	chr5:g.112151238C>T	c.881C>T	p.Ser294Phe	4317	34
526	<i>APC</i>	chr5:g.112173435A>G	c.2144A>G	p.His715Arg	5325	29
526	<i>FBXO11</i>	chr2:g.48035376C>G	c.2413G>C	p.Asp805His	4758	31
526	<i>MSH2</i>	chr2:g.47641400A>G	c.793-8A>G	p.?	1042	21
528	<i>NF1</i>	chr17:g.29586074G>A	c.4294G>A	p.Val1432Ile	371	33
534	<i>BRCA2</i>	chr13:g.32913732A>T	c.5240A>T	p.Asn1747Ile	527	42
534	<i>EGFR</i>	chr7:g.55268104C>A	c.2944C>A	p.Gln982Lys	1757	10
534	<i>NF1</i>	chr17:g.29486027G>C	c.205-1G>C	p.?	547	86
534	<i>TP53</i>	chr17:g.7574003G>A	c.1024C>T	p.Arg342*	1205	86
539	<i>BCOR</i>	chrX:g.39922288delCT	c.3883_3884del	p.Leu1296Phefs*29	280	62
539	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266134delCTT	c.133_135del	p.Ser45del	2479	26
539_2	<i>BCOR</i>	chrX:g.39922288delCT	c.3883_3884del	p.Leu1296Phefs*29	367	64
539_2	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266134delCTT	c.133_135del	p.Ser45del	1482	26
551	<i>DAXX</i>	chr6:g.33289560C>T	c.143G>A	p.Arg48Lys	104	15
559	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98209205T>A	c.4333A>T	p.Ser1445Cys	1003	30
560						
560_2						
565	<i>APC</i>	chr5:g.112176008G>T	c.4717G>T	p.Glu1573*	3075	68
57	<i>GNAS</i>	chr20:g.57484584A>G	c.668A>G	p.Asp223Gly	5995	12
57	<i>TP53</i>	chr17:g.7577108C>A	c.830G>T	p.Cys277Phe	7595	75
602	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29446189_29446201del	c.2020_2032de	p.Glu674Profs*95	K.A.	K.A.
602_2	<i>MYC</i>	chr8:g.128752754T>A	c.915T>A	p.Pro305Pro	2712	16
604	<i>NF1</i>	chr17:g.29665156A>G	c.6755A>G	p.Lys2252Arg	2910	18
604	<i>TP53</i>	chr17:g.7578482delG	c.447del	p.Thr150Hisfs*20	1871	61
612	<i>SMARCB1</i>	chr22:g.24175865A>G	c.1093A>G	p.Ile365Val	2686	36
612	<i>TSC2</i>	chr16:g.2138598C>T	c.5411C>T	p.Thr1804Ile	106	10
615	<i>CIC</i>	chr19:g.42795009G>A	c.2089G>A	p.Ala697Thr	117	14

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
615	<i>CIC</i>	chr19:g.42795016C>T	c.2096G>A	p.Ala699Val	117	15
615	<i>TP53</i>	chr17:g.7574012C>A	c.1015G>T	p.Glu339*	1624	46
620	<i>CDK4</i>	chr12:g.58145431G>A	c.70C>T	p.Arg24Cys	3256	34
620	<i>GRIN2A</i>	chr16:g.9943671G>A	c.1270C>T	p.Pro424Ser	3634	31
620	<i>TP53</i>	chr17:g.7577610T>C	c.673-2A>G	p.?	559	73
635	<i>SETD2</i>	chr3:g.47058716A>G	c.7562T>C	p.Leu2521Pro	2748	53
635	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139399334G>A	c.4809C>T	p.Asn1603Asn	361	79
641						
649	<i>BUB1B</i>	chr15:g.40502387delCT	c.2363_2364del	p.Ser788Cysfs*29	5833	10
649	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266113C>G	c.110C>G	p.Ser37Cys	1652	29
655						
659	<i>MEN1</i>	chr11:g.64572613G>A	c.1258C>T	p.Arg420*	560	69
659	<i>TP53</i>	chr17:g.7578526C>T	c.404G>A	p.Cys135Tyr	2022	52
659	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29439357_29439373del	c.572_588del	p.Leu191Glnfs*19	K.A.	K.A.
663	<i>JAK2</i>	chr9:g.5070003A>T	c.1592A>T	p.His531Leu	1168	25
663	<i>PRKAR1A</i>	chr17:g.66511618_66511619insGTTAT	c.78_79insGTTAT	p.Ile27Valfs*104	1274	29
663	<i>TP53</i>	chr17:g.7578275_7578277delGAG	c.572_574del	p.Pro191delCTC	1398	54
663	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29439347G>A	c.562G>A	p.Ala188Thr	K.A.	K.A.
663	<i>DICER</i>	chr14:g.95581986A>G	c.1907+18T>C	p.?		
671	<i>APC</i>	chr5:g.112173301delA	c.2010del	p.Lys670Asnfs*	504	79
671	<i>HIST1H3B</i>	chr6:g.26031935C>G	c.354G>C	p.Val118Val		
699						
704	<i>BRAF</i>	chr7:g.140453136A>T	c.1799T>A	p.Val600Glu	2060	47
704	<i>CIC</i>	chr19:g.42795007G>T	c.2087G>T	p.Arg696Leu	135	13
704	<i>CIC</i>	chr19:g.42795009G>A	c.2089G>A	p.Ala697Thr	135	25
704	<i>CIC</i>	chr19:g.42795015G>A	c.2095G>A	p.Ala699Thr	135	24
704	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266125C>T	c.122C>T	p.ThrT41Ile	1392	19
704	<i>DAXX</i>	chr6:g.33289560C>T	c.143G>A	p.Arg48Lys	102	18
704	<i>TSC1</i>	chr9:g.135787786G>A	c.796C>T	p.Pro266Ser	883	33
704	<i>ABL1</i>	chr9:g.133760530G>A	c.2901G>A	p.Pro970Pro	771	15

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
704	<i>FGFR2</i>	chr10:g.123324962C>T	c.366G>A	p.Val122Val	365	19
704	<i>TSC2</i>	chr16:g.2122879C>T	c.2250C>T	p.Leu750Leu	729	30
704	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29446288T>C	c.2119T>C	p.Leu707Leu	K.A.	K.A.
707	<i>ATRX</i>	chrX:g.76920173delT	c.3904del	p.Arg1302Glufs*	1507	78
707	<i>FLCN</i>	chr17:g.17119709delG	c.1285del	p.His429Thrfs*39	449	59
707	<i>JAK1</i>	chr1:g.65306997delT	c.2580del	p.Lys860Asnfs*16	1624	62
707	<i>JAK1</i>	chr1:g.65325833delG	c.1289del	p.Pro430Argfs*2	1859	65
707	<i>MLH1</i>	chr3:g.37070285delC	c.1420del	p.Arg474Glyfs*17	2761	58
707	<i>NF1</i>	chr17:g.29486050delA	c.233del	p.Asn78Ilefs*7	289	64
707	<i>ALK</i>	chr2:g.29443614C>T	c.3603G>A	p.Gly1201Gly	2824	12
725	<i>ATRX</i>	chrX:g.76918921delT	c.4070del	p.Lys1357Argfs*	3468	49
725	<i>MEN1</i>	chr11:g.64573134G>A	c.1173C>T	p.Gly391Gly	695	56
725	<i>MLH1</i>	chr3:g.37092052_37092055del	c.2179_2182del	p.His727Phefs*55	3671	21
725	<i>SETD2</i>	chr3:g.47165197_47165199del	c.927_929del	p.Lys310del	1545	58
725	<i>TP53</i>	chr17:g.7578212G>A	c.637C>T	p.Arg213*	2808	58
725	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29445215_29445216dupTG	c.1046_1047dupTG	p.Glu350Trpfs*14	K.A.	K.A.
725	<i>PRDM1</i>	chr6:g.106555052G>A	c.2169G>A	p.Leu723Leu	921	54
725	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139391243G>A	c.6948C>T	p.Ser2316Ser	928	13
736	<i>GNAS</i>	chr20:g.57485047A>G	c.881A>G	p.Gln294Arg	7586	79
736	<i>TP53</i>	chr17:g.7578407G>T	c.523C>A	p.Arg175Ser	543	73
739						
742	<i>ATM</i>	chr11:g.108186757G>A	c.6115G>A	p.Glu2039Lys	5841	39
742	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139399420C>A	c.4723G>T	p.Val1575Leu	1913	63
742	<i>TSC2</i>	chr16:g.2112581G>A	c.1341G>A	p.Ala447Ala		
747						
767						
803	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266104G>T	c.101G>T	p.Gly34Val	2489	35
807						
810	<i>MEN1</i>	chr11:g.64577457C>T	c.125G>A	p.Gly42Asp	579	70
810	<i>PRKAR1A</i>	chr17:g.66526414delC	c.974-3del	p.?	1800	68

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
810_2	<i>MEN1</i>	chr11:g.64577457C>T	c.125G>A	p.Gly42Asp	407	88
810_2	<i>PRKAR1A</i>	chr17:g.66526414delC	c.974-3del	p.?	1328	89
810_2	<i>TP53</i>	chr17:g.7574018G>A	c.1009C>T	p.Arg337Cys	1328	89
811	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41244429C>T	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	905	16
811	<i>CDK4</i>	chr12:g.58145430C>A	c.71G>T	p.Arg24Leu	3018	28
811	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266110A>C	c.107G>T	p.His36Pro	784	14
811	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41268796A>G	c.1034A>G	p.Lys345Arg	3687	14
811	<i>BCOR</i>	chrX:g.39911657C>A	c.4977-4G>T	p.?	1374	20
811	<i>FGFR3</i>	chr4:g.1807465C>T	c.1646-12C>T	p.?	196	18
811	<i>FGFR3</i>	chr4:g.1807980C>T	c.1960-4C>T	p.?	132	13
827	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	2236	40
828	<i>ARID1A</i>	chr1:g.27106459C>T	c.6070C>T	p.Arg2024Trp	728	80
828	<i>ATRX</i>	chrX:g.76875920G>A	c.5215C>T	p.Arg1739*	2564	77
828	<i>CDH1</i>	chr16:g.68856089G>A	c.1897G>A	p.Gly633Arg	4211	57
828	<i>EGFR</i>	chr7:g.55231514C>T	c.1720C>T	p.Arg574Trp	2885	21
828	<i>TP53</i>	chr17:g.7577120C>T	c.818G>A	p.Arg273His	3752	76
828	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29440824_29440825ins50	c.690_691ins50	p.Leu231Thrfs*29	K.A.	K.A.
828	<i>ABL1</i>	chr9:g.133750393C>T	c.1281C>T	p.Pro427Pro	4954	39
828	<i>ALK</i>	chr2:g.29446190C>T	c.3359+18G>A	p.?	1549	76
828	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139404178C>T	c.2969+7G>A	p.?	2554	44
828	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98209692C>T	c.3846G>A	p.Pro1282Pro	724	34
828	<i>SMARCA4</i>	chr19:g.11152114C>T	c.4398C>T	p.Asp1466Asp	11397	23
831	<i>EGFR</i>	chr7:g.55270220G>A	c.3173G>A	p.Cys1058Tyr	222	21
831	<i>MEN1</i>	chr11:g.64572586C>A	c.1285G>T	p.Glu429*	383	54
831	<i>CSF1R</i>	chr5:g.149465928C>T	c.49+14G>A	p.?	156	14
831	<i>EGFR</i>	chr7:g.55266396C>A	c.2702-14C>A	p.?	187	30
831	<i>ERBB2</i>	chr17:g.37876094C>A	c.1856+7C>A	p.?	1034	67
831	<i>FGFR3</i>	chr4:g.1807460G>T	c.1646-17G>T	p.?	126	13
860	<i>BRAF</i>	chr7:g.140453136A>T	c.1799T>A	p.Val600Glu	2624	38
866						

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
868	<i>MSH2</i>	chr2:g.47690191del	c.1408del	p.Val470*	1694	15
868	<i>NF1</i>	chr17:g.29541485delA	c.1413del	p.Val472*	1012	14
868	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139396253G>A	c.5585C>T	p.Pro1862Leu	462	12
868	<i>TP53</i>	chr17:g.7577120C>T	c.818G>A	p.Arg273His	3528	13
868	<i>U2AF1</i>	chr21:g.44513292C>T	c.643G>A	p.Gly215Ser	696	15
868	<i>GPC3</i>	chrX:g.132670290C>T	c.1605G>A	p.Ala535Ala	1881	22
908	<i>NF1</i>	chr17:g.29556915dupG	c.2913dup	p.Leu972Alafs*3	307	88
908	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139401045G>T	c.3948C>A	p.Cys1316*	981	12
913	<i>ATRX</i>	chrX:g.76872106A>T	c.5541T>A	p.Tyr1847*	6174	88
913	<i>ATRX</i>	chrX:g.76939856_76939858delTCT	c.890_892del	p.Lys297del	1653	90
913	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41243773delCTC	c.3772_3774del	p.Glu1258del	3477	81
913	<i>BRCA2</i>	chr13:g.32972575G>A	c.9925G>A	p.Glu3309Lys	3956	72
913	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41267212delAAG	c.800_802del	p.Glu267del	11896	30
913	<i>GNAS</i>	chr20:g.57429913del	c.1406del	p.Asp4679Alafs*36	827	46
913	<i>KDM6A</i>	chrX:44929462_44929465del	c.2562_2565del	p.Ile854Metfs*12	3979	89
913	<i>MAP3K1</i>	chr5:g.56178576_56178578del	c.3549_3551del	p.Glu1187del	6286	17
913	<i>MSH2</i>	chr2:g.47705451G>A	c.2251G>A	p.Gly751Arg	1242	82
913	<i>NF1</i>	chr17:g.29664541_29664544del	c.6520_6523del	p.Glu2174Leufs*4	7420	81
913	<i>PTPN11</i>	chr12:g.112926270C>T	c.1403C>T	p.Thr468Met	12056	16
913	<i>TP53</i>	chr17:g.7577548C>T	c.733G>A	p.Gly245Ser	2825	81
913	<i>TSC1</i>	chr9:g.135786081T>C	c.1142-2A>G	p.?	10618	17
913	<i>TSC1</i>	chr9:g.135787834delTC	c.746_747del	p.Arg249Ilefs*5	9548	29
913	<i>FLT3</i>	chr13:g.28636180C>T	c.192G>A	p.Gly64Gly	4271	82
913	<i>KDR</i>	chr4:g.55972048C>T	c.1596G>A	p.Ala532Ala	5198	46
913_2	<i>APC</i>	chr5:g.112177539T>C	c.6248T>C	p.Ile2083Thr	3409	15
913_2	<i>ATRX</i>	chrX:g.76872106A>T	c.5541T>A	p.Tyr1847*	2198	53
913_2	<i>ATRX</i>	chrX:g.76939856_76939858delTCT	c.890_892del	p.Lys297del	138	43
913_2	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41243773delCTC	c.3772_3774del	p.Glu1258del	1255	35
913_2	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41267216_41267218delAAG	c.800_802del	p.Glu267del	5271	20
913_2	<i>FAM46C</i>	chr1:g.118166010C>T	c.520C>T	p.Arg174Trp	3175	17

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
913_2	<i>FGFR2</i>	chr10:g.123239120G>A	c.2099C>T	p.Pro700Leu	1492	19
913_2	<i>GNAS</i>	chr20:g.57429913delC	c.1406del	p.Asp469Alafs*36	506	31
913_2	<i>KDM6A</i>	chrX:44929462_44929465delAATT	c.2562_2565del	p.Ile854Metfs*12	2979	52
913_2	<i>MAP3K1</i>	chr5:g.56178576_56178578delGAA	c.3549_3551del	p.Glu1187del	1065	15
913_2	<i>MSH2</i>	chr2:g.47705451G>A	c.2251G>A	p.Gly751Arg	184	33
913_2	<i>NF1</i>	chr17:g.29664541_29664544delGAGA	c.6520_6523del	p.Glu2174Leufs*4	6902	34
913_2	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139395162G>A	c.5776C>T	p.Arg1926Cys	1241	17
913_2	<i>TP53</i>	chr17:g.7577548C>T	c.733G>A	p.Gly245Ser	1245	34
913_2	<i>TSC1</i>	chr9:g.135786081T>C	c.1142-2A>G	p.?	6339	16
913_2	<i>XPC</i>	chr3:g.14201312G>A	c.919C>T	p.Arg307Trp	5211	16
913_2	<i>FLT3</i>	chr13:g.28636180C>T	c.192G>A	p.Gly64Gly	3057	33
922	<i>NF1</i>	chr17:g.29554308_29554317del	c.2324_2325+8del	p.Glu775Glyfs*18	2146	56
922	<i>TP53</i>	chr17:g.7578378_7578392del	c.538_552del	p.Glu180_Asp184del	2036	74
926						
932						
932_2	<i>CREBBP</i>	chr16:g.3929815C>T	c.85+18G>A	p.?	155	46
937	<i>CDK12</i>	chr17:g.37618451A>T	c.127A>T	p.Lys43*	242	10
937	<i>EGFR</i>	chr7:g.55270220G>A	c.3173G>A	p.Cys1058Tyr	109	36
937	<i>EGFR</i>	chr7:g.55249005G>T	c.2303G>T	p.Ser768Ile	4272	12
937	<i>PPP2R1A</i>	chr19:g.52716304C>T	c.748C>T	p.Gln250X	124	34
937	<i>PRDM1</i>	chr6:g.106553798C>T	c.1361C>T	p.Ser454Phe	199	19
937_2						
949	<i>ZNRF3</i>	chr12:g.29383047T>C	c.301-17T>C	p.?	K.A.	K.A.
949_2	<i>ZNRF3</i>	chr12:g.29439321C>T	c.536C>T	p.Pro179Leu	K.A.	K.A.
950	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29383184G>A	c.421G>A	p.Gly141Ser	K.A.	K.A.
993	<i>RB1</i>	chr13:g.49030485G>A	c.1960G>A	p.Val654Met	556	81
993	<i>GNAS</i>	chr20:g.57484421G>A	c.602G>A	p.Arg201His	2203	21

Abkürzungen: chr = Chromosom; ID = Identifikator; K.A. = keine Angaben; VAF = Allelfrequenz der Variante (engl. Variant Allele Frequency)

Tabelle 16: Somatische Kopienzahlveränderungen – Daten der retrospektiven Studie

Die Proben sind nach ID sortiert. Der Zusatztumor von Tumorpaaren ist mit „_2“ gekennzeichnet.

ID	Gene mit Amplifikationen	Gene mit Deletionen
1082	<i>CDK4, MDM2</i>	<i>FLCN, MAP2K4</i>
1093	<i>CIC, GNA11, NOTCH1, TERT</i>	<i>BRIP1, DNMT3A, PIK3R1, SMAD4</i>
1098	<i>CDK4, FGFR3, NOTCH1, STK11</i>	<i>MAP2K4</i>
1109	0	<i>CHEK2, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1110	0	<i>TNFRSF14</i>
1132	<i>ABL1, CDK4, MDM2, TSC1</i>	<i>CHEK2, FLCN, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1154	<i>NOTCH1, CDK4</i>	<i>MAP2K4, SMAD4, PHF6</i>
1174	<i>CDK4, GNA11, STK11</i>	<i>CHEK2, GNAQ, SMARCB1</i>
1182	0	<i>BRCA2, RB1</i>
1183	<i>CDK4, FGFR3, GNA11, STK11</i>	<i>ECT2L, FGFR2, FLCN, MAP2K4, SMAD4, TNFRSF14</i>
1184	<i>CDK4, MDM2</i>	<i>TNFRSF14</i>
1204	<i>FGFR3</i>	0
1209	<i>CDK4</i>	<i>FLCN, TNFRSF14</i>
1212	<i>FGFR3, STK11</i>	<i>SMARCB1</i>
1217	0	<i>MAP2K4</i>
1226	<i>GNA11, MYC</i>	<i>CHEK2, FLCN, GNAQ, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1229	0	0
1234	<i>FGFR3, NOTCH1</i>	<i>BRAF, CHEK2, EZH2, MSH2, RB1, SDHB, SLC7A8, SMAD4, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1235	0	<i>SMARCB1, TNFRSF14</i>
1251	0	0
1255	<i>GNA11, SMARCA4</i>	<i>SDHB, TNFRSF14</i>
1256	0	<i>FLCN, TNFRSF14</i>
1258	<i>DDB2</i>	<i>FLCN, MAP2K4, RB1</i>
1260	<i>CDK4, STK11</i>	<i>CSF1R, FLCN, GNAQ, MAP2K4, TNFRSF14</i>
1267	<i>CDK4, MDM2, U2AF1</i>	<i>CARD11, FLNC, SDHB, SMARCB1, SMO, TNFRSF14</i>
1269	<i>NOTCH1, STK11, TERT</i>	<i>BRIP1, EZH2, MLH1, MSH2, SPOP, TNFRSF14</i>
1282	<i>CDK4</i>	0
1296	<i>CDK4, ZRSR2</i>	<i>FLCN, SDHB, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1316	<i>FGFR3, STK11</i>	<i>SMARCB1</i>
1344	<i>CIC, STK11</i>	<i>SMARCB1, CHEK2</i>
1351	<i>FGFR3, GNA11, STK11</i>	<i>FLCN, GNAQ, TNFRSF14</i>
1362	<i>CDK4</i>	0
1372	0	0
1408	<i>CDK4, STK11</i>	0
1431	0	0
1460	0	0
1480	<i>MYC</i>	<i>FLCN, SMARCB1, TNFRSF14</i>
1482	0	<i>TNFRSF14, FLNC</i>
1489	<i>FGFR3, GNA11, NOTCH1, PRKAR1A, STK11</i>	<i>CDK12, FLCN, NF1, TNFRSF14</i>
1491	<i>CDK4, MDM2</i>	0
1533	<i>STK11</i>	0

ANLAGE

ID	Gene mit Amplifikationen	Gene mit Deletionen
1542	GNAS	TNFRSF14
1553	STK11	0
1557	APC, CSF1R, FGFR3, NPM1, TERT	CHEK2, JAK1, SDHB, SMARCB1, TNFRSF14
1595	STK11, CIC	0
1619	NOTCH1, STK11	0
1665	FGFR3, STK11	SMARCB1, CHEK2
182	0	0
182_2	TERT, ILR7, STK11, CIC, GNAS	0
183	CDK4, GNA11, IL7R	0
216	NOTCH1	MAP4K3, EPCAM, BRIP1
279	FGFR3	0
282	0	0
355	CDK4	0
392	CDK4, STK11	0
459	ABL1, NOTCH1, CDK4	MAP2K4
488	FGFR3, NOTCH1, STK11	FGFR2
500	0	0
500_2	CDK4	0
511	CDK4, STK11, GNA11	0
526	CDK4	SMARCB1
528	0	0
534	CDK4, STK11	TNFRSF14
539	CDK4, NOTCH1, SLC7A8, STK11	0
539_2	CIC, NOTCH1, SLC7A8, STK11	0
551	0	0
559	0	0
560	MEN1, STK11	0
560_2	MEN1, DDB2	0
565	TERT, CDK4	TNFRSF14, BRIP1
57	CDK4	CDC73, TNFRSF14, SCL7A8, FLCN, CHEK2
602	CDK4, CIC, MDM2, STK11	0
602_2	0	MAP2K4
604	CDKN2A, TERT	0
612	CDK4, GNA11	0
615	TERT, NOTCH1	EPCAM, BRCA2, RB1
620	NOTCH1	0
635	CDK4, NOTCH1	0
641	TERT, IL7R, MDM2, CDK4, GNA11	MAP2K4, SMARCB1
649	STK11	0
655	PIK3R1, NPM1, IL7R, MAP3K1, KMT2D, ARID2, CDK4, ASXL1, GNAS	TNFRSF14, SMARCB1
659	CDK4	0
663	0	MLH1
671	CDK4, GNA11, TERT, NOTCH1	FLCN, MAP2K4
699	CDK4, FGFR3, STK11	CHEK2, SMAD4, SMARCB1
704	GNA11, NOTCH1	0
707	CDK4	0

ANLAGE

ID	Gene mit Amplifikationen	Gene mit Deletionen
725	<i>CDK4, GNA11, NOTCH1</i>	0
736	<i>CDK4, GNA11, NOTCH1</i>	<i>FLCN, MAP2K4, RB1, SMAD4</i>
739	<i>CDK4</i>	0
742	0	0
747	<i>CDK4, TERT</i>	0
767	<i>GNAS</i>	<i>CHEK2, SMARCB1, TNFRSF14</i>
803	<i>CDK4, DDR2, MDM2, NOTCH1, TERT</i>	0
807	<i>STK11</i>	0
810	<i>CDK4, NOTCH1, STK11</i>	0
810_2	<i>CDK4</i>	0
811	0	<i>BRCA2, RB1, PHF6</i>
827	<i>IL6ST, MAP3K1, PIK3R1</i>	<i>ECT2L, FLCN, TNFRSF14</i>
828	<i>NOTCH1, CDK4, SDK11, GNA11</i>	0
831	<i>NOTCH1</i>	0
860	0	<i>SMARCB1</i>
866	<i>CDK4</i>	<i>CHEK2, FGFR2, SMARCB1, TNFRSF14</i>
868	0	<i>FLCN, TNFRSF14</i>
908	<i>CDK4, PIK3R1</i>	<i>TNFRSF14, SMARCB1, CHEK2</i>
913	<i>CDK4</i>	<i>CDC73, FAS, FLCN, SPOP, TNFRSF14</i>
913_2	<i>CDK4, PHF6</i>	0
922	<i>CDK4, GNA11, STK11</i>	0
926	0	0
932	<i>BAP1, CIC, NOTCH1, STK11</i>	<i>CHEK2, CYLD, FLCN, PALB2, SMARCB1</i>
932_2	0	0
937	<i>CDK4</i>	<i>TNFRSF14</i>
937_2	<i>CDK4, MDM2, TERT</i>	<i>ABL1, FLCN, TERT</i>
949	<i>STK11</i>	0
949_2	<i>GNA11</i>	0
950	<i>TERT</i>	<i>BRIP1</i>
993	<i>IL7R, STK11, TERT</i>	<i>TNFRSF14</i>

ANLAGE

Tabelle 17: Somatische Einzelnukleotidaustausche und kleine Insertionen und Deletionen – Daten der prospektiven Studie

Zu jeder untersuchten Probe (nach ID sortiert) sind alle gefundenen Varianten mit Gen, Position (genomisch ((g.) (GRCh37));kodierend (c.) und Änderungen auf Proteinebene (p.-Position (NM-Nummer siehe Tabelle 14)), Abdeckung der entsprechenden Position und Frequenz der detektierten Variante angegeben. Sequenzierte Zusatzumoren sind mit „_2“ gekennzeichnet.

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
0039	<i>CSF1R</i>	chr5:g.149449827C>T	c.1237G>A	p.Gly413Ser	112	57
0039	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	43	67
0039	<i>GNAS</i>	chr20:g.57429174C>T	c.854C>T	p.Ser285Phe	175	52
0039	<i>JAK1</i>	chr1:g.65330499T>C	c.1147A>G	p.Ser383Gly	72	92
0039	<i>KMT2D</i>	chr12:g.49434657T>C	c.6896A>G	p.Tyr2299Cys	175	56
0039	<i>MDM2</i>	chr12:g.69233096C>T	c.961C>T	p.Leu321Phe	147	44
0039	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139402584G>A	c.3333C>T	p.Asp1111Asp		40
0039	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98268765G>A	c.318C>T	p.Leu106Leu		46
0040						
0090	<i>EP300</i>	chr22:g.41560079G>T	c.3751G>T	p.Gly1251*	54	30
0090	<i>STK11</i>	chr19:g.1220644C>T	c.662C>T	p.Pro221Leu	150	33
0090	<i>SCN7A</i>	chr2:g.167289070C>A	c.2350G>T	p.Val784Leu	145	33
0090	<i>SMO</i>	chr7:g.128848660C>T	c.1325C>T	p.Ala442Val	172	14
0090	<i>TP53</i>	chr17:g.7577534C>A	c.747G>T	p.Arg249Ser	77	12
0138						
0151	<i>MEN1</i>	chr11:g.64572586C>T	c.1285G>A	p.Glu429Lys	668	69
0151	<i>CDKN2A</i>	chr9:g.21994358G>A	c.96C>T	p.Ala32Ala	125	13
0220						
0249						
0250	<i>NF1</i>	chr17:g.29654862G>T	c.5546+5G>T	p.?	992	47
0317	<i>MEN1</i>	chr11:g.64571916delT	c.1738del	p.Ile580Serfs*13	1664	83
0317	<i>TP53</i>	chr17:g.7578398G>C	c.532C>G	p.His178Asp	1021	79
0317	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29445616G>T	c.1447G>T	p.Glu483*	1441	84
0318						
1122						
1133						

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1150						
1341	<i>BRIP</i>	chr17:g.59761402C>T	c.3005G>A	p.Trp1002*	1408	44
1341	<i>EP300</i>	chr22:g.41525934G>A	c.1209G>A	p.Trp403*	550	45
1341	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29445696delC	c.1530del	p.Thr511Profs*59	535	83
1341	<i>JAK1</i>	chr1:g.65305476G>A	c.2652C>T	p.Gly884Gly	341	88
1341	<i>FGFR4</i>	chr5:g.176522589G>A	c.1686G>A	p.Leu562Leu	1381	28
1358	<i>MEN1</i>	chr11:g.64575467delCCCAGGCAT	c.566_574del	p.Val189_Phe191del	242	63
1358	<i>MEN1</i>	chr11:g.64577330_64577333del	c.249_252del	p.Ile85Serfs*33	155	18
1358	<i>ATRX</i>	chrX:g.76938514C>A	c.2234G>T	p.Ser745Ile	161	24
1358	<i>TP53</i>	chr17:g.7578406C>T	c.524G>A	p.Arg175His	177	22
1358	<i>CDK4</i>	chr12:g.58145055C>G	c.289G>C	p.Asp97His	549	13
1358	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266124A>G	c.121A>G	p.Thr41Ala	145	13
1398	<i>TP53</i>	chr17:g.7578457C>T	c.473G>A	p.Arg158His	1026	39
1411						
1466	<i>PRKAR1A</i>	chr17:g.66526063_66526067dup	c.894_898dupGGTCA	p.Ala300Glyfs*33	81	67
1498	<i>SETD2</i>	chr3:g.47158173C>A	c.4526G>T	p.Arg1509Ile	1747	30
1498	<i>CREBBP</i>	chr16:g.3819172C>G	c.3060+3G>C	p.?	1713	41
1518	<i>STK11</i>	chr19:g.1221241T>A	c.764T>A	p.Phe255Tyr	677	32
1518	<i>TP53</i>	chr17:g.7577121G>A	c.817C>T	p.Arg273Cys	409	52
1518	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29439400C>G	c.615C>G	p.Ile205Met	369	67
1518	<i>CIC</i>	chr19:g.42793200C>T	c.1092C>T	p.Asp364Asp		
1564						
1583	<i>TP53</i>	chr17:g.7578218T>C	c.631A>G	p.Thr211Ala	37	59
1583	<i>ATM</i>	chr11:g.108173632A>G	c.5372A>G	p.Asp1791Gly	89	75
1583	<i>MEN1</i>	chr11:g.64573790G>T	c.978C>A	p.Tyr326*	327	79
1635	<i>RB1</i>	chr13:g.48919335G>C	c.500G>C	p.Arg167Thr	131	70
1635	<i>TP53</i>	chr17:g.7578457C>T	c.473G>A	p.Arg158His	252	74
1635	<i>KDM6A</i>	chrX:g.44938403_44938407del	c.2951_2955delTCTCT	p.Phe984Tyrf*2	148	86
1635	<i>RB1</i>	chr13:g.48919335G>C	c.483C>A	p.Leu161Leu		
1664	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266125C>T	c.122C>T	p.Thr41Ile		

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1683						
1691	<i>PRKAR1A</i>	chr17:g.66521073T>A	c.523T>A	p.Tyr175Asn	222	33
1697	<i>ARID1A</i>	chr1:g.27106099G>A	c.5710G>A	p.Glu1904Lys	123	24
1697	<i>ARID1A</i>	chr1:g.27106279G>C	c.5890G>C	p.Glu1964Gln	154	23
1697	<i>ARID1A</i>	chr1:g.27106528G>C	c.6139G>C	p.Glu2047Gln	69	19
1725	<i>FGFR3</i>	chr4:g.1806663C>A	c.1379C>A	p.Pro460His	411	35
1725	<i>RET</i>	chr10:g.43597884C>T	c.432C>T	p.Arg144Arg	1413	24
1726	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136_41266138del	c.133_135del	p.Ser45del	114	75
1727	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	114	87
1735	<i>TERT</i>	chr5:g.1295077C>A	c.28C>T	p.Val10Leu	227	50
1741	<i>RB1</i>	chr13:g.49027160C>G	c.1727C>G	p.Ser576*	285	80
1741	<i>TP53</i>	chr17:g.7578239C>A	c.610G>T	p.Glu204*	176	73
1752	<i>MSH6</i>	chr2:g.48033403C>A	c.3707C>A	p.Ala1236Asp	310	16
1752	<i>TP53</i>	chr17:g.7579403delG	c.284delC	p.Ser95Phefs*28	143	40
1753	<i>APC</i>	chr5:g.112174199A>G	c.29088A>G	p.Ser970Gly	68	35
1753	<i>KIT</i>	chr4:g.55598052G>T	c.2249G>T	p.Arg750Ile	84	33
1753	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	85	46
1753	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41244527T>C	c.3021A>G	p.Ser1007Ser	68	12
1763	<i>FBXO11</i>	chr2:g.48037494T>C	c.2047A>G	p.Ile683Val	754	44
1763	<i>CSF1R</i>	chr5:g.149449847	c.1217T>C	p.Val406Ala	976	32
1763	<i>MEN1</i>	chr11:g.4577203_64577206del	c.376_379del	p.Trp126Thrfs*27	342	80
1801	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	84	44
1801_2	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	67	85
1801_2	<i>BRCA1</i>	chr17:g.41215921C>T	c.5122G>A	p.Ala1708Thr	63	21
1812	<i>APC</i>	chr5:g.112175929_112175933del	c.4638_4642del	p.Asn1546Lysfs*11		
1831	<i>ATRX</i>	chrX:g.76939999C>A	c.635G>T	p.Arg212Leu	1414	45
1831	<i>ATRX</i>	chrX:g.76940001dup	c.747dup	p.Arg250Serfs*10	1397	43
1888	<i>CTNNB1</i>	chr3:g.41266136T>C	c.133T>C	p.Ser45Pro	107	66
1919	<i>ATRX</i>	chrX:g.76814319T>G	c.6327-2A>C	p.?	121	35
1919	<i>SCN7A</i>	chr2:g.167318981G>T	c.1001C>A	p.Thr334Lys	525	36

ANLAGE

ID	Gen	g.-Position und Basenaustausch	c.-Position und Basenaustausch	p.-Position und Aminosäureaustausch	Abdeckung	VAF [%]
1919	<i>TP53</i>	chr17:g.7578213del	c.636del	p.Arg213Aspfs*34	67	54
1950	<i>TP53</i>	chr17:g.7578455C>G	c.475G>C	p.Ala159Pro	750	43
2021						
2034	<i>MEN1</i>	chr11:g.64573211A>G	c.1096T>C	p.Tyr366His	110	82
2034	<i>NF1</i>	chr17:g.29528175>T	c.1183A>T	p.Lys395*	121	90
2034	<i>DAXX</i>	chr6:g.33289501C>A	c.202G>T	p.Glu68*	112	93
2045	<i>APC</i>	chr5:g.112177242del	c.5951del	p.Asn1984Metfs*60	199	56
2065	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29444443delCAC	c.982_984del	p.His328del	748	27
2080	<i>TP53</i>	chr17:g.7578526C>T	c.404G>A	p.Cys135Tyr	103	87
2088						
2171	<i>WT1</i>	chr11:g.32410677G>A	c.1496C>T	p.Ala499Val	115	24
255	<i>CREBBP</i>	chr16:g.3817777C>T	c.3194G>A	p.Ser1065Asn	194	28
670						
670_2	<i>ARID1A</i>	chr1:g.27101402delC	c.4689del	p.Met14564*	443	73
670_2	<i>CREBBP</i>	chr16:g.3778597G>A	c.6451C>T	p.Arg2151Trp	1056	38
670_2	<i>EGFR</i>	chr7:g.55273258A>G	c.3581A>G	p.Asn1194Ser	2153	38
670_2	<i>MSH6</i>	chr2:g.48027009_48027011delinsATA	c.1887_1889delinsATA	p.Asp629_Ala630delinsGlu*	547	69
670_2	<i>TP53</i>	chr17:g.7577539G>A	c.742C>T	p.Arg248Trp	1506	36
670_2	<i>TP53</i>	chr17:g.7578406C>T	c.524G>A	p.Arg175His	1335	39
670_2	<i>ZNRF3</i>	chr22:g.29444376G>A	c.913-1G>A	p.?	335	66
670_2	<i>NOTCH1</i>	chr9:g.139405121G>A	c.2724C>T	p.Ile908Ile	880	21
670_2	<i>PTCH1</i>	chr9:g.98215819G>A	c.3390C>T	p.Ala1130Ala	2718	42

Abkürzungen: chr = Chromosom; ID = Identifikator; VAF = Variant Allele Frequency

ANLAGE

Tabelle 18: Somatische Kopienzahlveränderungen – Daten der prospektiven Studie

Die Proben sind nach ID sortiert. Der Zusatztumor von Tumorkopien ist mit „_2“ gekennzeichnet.

ID	Gene mit Amplifikationen	Gene mit Deletionen
0039	0	0
0040	0	BRCA2
0090	0	0
0138	0	FGFR3, NOTCH1
0151	FGFR4, CSF1R, PPP2R1A	CDKN2A, RB1
0220	0	0
0249	IL7R, TERT	MSH2, CDKN2A, EPCAM
0250	0	0
0317	FGFR4, CSF1R	0
0318	TERT	0
1122	0	ATM, KREMEN1, ZNRF3
1133	DAXX, TERT	0
1150	MDM2, DAXX, CDK4	ETCL2
1341	0	0
1358	0	0
1398	0	0
1411	ABL1, NOTCH1	ATM, CDKN2A, JAK2
1466	0	0
1498	FGFR4, RET, CSF1R	0
1518	0	0
1564	0	JAK2, ATM
1583	NOTCH1, TERT	0
1635	0	0
1664	0	0
1683	0	0
1691	MDM2, BRIP1, CDK4, PPP2R1A	FGFR3, TNFRSF14, TSC2, SMARCB1, NOTCH1
1697	0	0
1725	TERT	KMD6A, CDKN2A
1726	0	0
1727	0	0
1735	MYC, SMO, CDK4, GNA11	BRCA2, JAK2, TP53, RB1
1741	0	KREMEN1, ZNRF3
1752	0	0
1753	GNA11	0
1763	IL7R	MAP2K4
1801	0	0
1801_2	0	0
1812	STK11, CDK4, CIC, TERT, GNA11	JAK2, RB1
1831	CDK4, MDM2	FGFR3, SMO, NOTCH1
1888	0	FANCE, FGFR3, TNFRSF14
1919	0	0
1950	0	0
2021	0	0
2034	0	0
2045	0	0

ANLAGE

ID	Gene mit Amplifikationen	Gene mit Deletionen
2065	<i>MDM2, CDK4</i>	<i>KREMEN1</i>
2080	0	<i>SETD2</i>
2088	0	<i>ZNRF3</i>
2171	<i>ARID1A, CIC, GNA11, NOTCH1, PPP2R1A, STK11</i>	<i>ATM, ATRX, BRCA2, KDM6A</i>
255	<i>CDK4</i>	<i>CHEK2, EP300, KREMEN1</i>
670	0	0
670_2	0	<i>ATM, EP300, KREMEN1, RPL22, ZNRF3</i>

Abkürzungen: ID = Identifikator

Tabelle 19: Anteil an somatischen SNVs und kleinen Indels pro Gen – Vergleich zwischen retro- und prospektiver Studie und Literaturangaben (NNR-Ca-TCGA-Studie [101, 102]).

Aufgelistet sind alle Gene, in denen in der retrospektiven Studie mindestens eine Variante gefunden wurde. Sie sind sortiert nach der Häufigkeit der gefundenen Varianten in der retrospektiven Studie, angefangen mit *TP53*, in dem die meisten Einzelnukleotidaustausche und kleinen Indels gefunden wurden.

Gen	Retrospektive Studie Anteil in [%]	Prospektive Studie Anteil in [%]	NNR-Ca-TCGA-Studie Anteil in [%]
<i>TP53</i>	22,4	28	19,8
<i>CTNNB1</i>	16,8	16	15,4
<i>NF1</i>	11,2	4	5,5
<i>APC</i>	8,4	6	4,4
<i>ZNRF3</i>	8,4	10	4,4
<i>MEN1</i>	7,4	14	7,7
<i>ATRX</i>	6,5	8	4,4
<i>GNAS</i>	6,5	2	5,5
<i>CIC</i>	5,6	/	1,1
<i>DAXX</i>	4,7	2	3,3
<i>EGFR</i>	4,7	2	2,2
<i>NOTCH1</i>	4,7	/	/
<i>RB1</i>	4,7	4	2,2
<i>BRCA1</i>	2,8	2	/
<i>BRCA2</i>	2,8	/	/
<i>KDM6A</i>	2,8	2	1,1
<i>KDR</i>	2,8	/	1,1
<i>ABL1</i>	1,9	/	1,1
<i>ATM</i>	1,9	2	5,5
<i>BCL6</i>	1,9	/	/
<i>BCOR</i>	1,9	/	2,2
<i>BRAF</i>	1,9	/	1,1
<i>CDH1</i>	1,9	/	1,1
<i>CDK4</i>	1,9	2	/
<i>DNMT3A</i>	1,9	/	/
<i>ESR1</i>	1,9	/	/
<i>FBXW7</i>	1,9	/	/
<i>GRIN2A</i>	1,9	/	/

ANLAGE

Gen	Retrospektive Studie Anteil in [%]	Prospektive Studie Anteil in [%]	NNR-Ca-TCGA-Studie Anteil in [%]
<i>JAK1</i>	1,9	2	1,1
<i>JAK2</i>	1,9	/	1,1
<i>KMT2D</i>	1,9	2	4,4
<i>MLH1</i>	1,9	/	2,2
<i>MSH2</i>	1,9	/	2,2
<i>PBRM1</i>	1,9	/	1,1
<i>PPP2R1A</i>	1,9	/	/
<i>PRKAR1A</i>	1,9	4	5,5
<i>PTCH1</i>	1,9	/	2,2
<i>SETD2</i>	1,9	/	2,2
<i>TSC1</i>	1,9	/	/
<i>U2AF1</i>	1,9	/	1,1
<i>AR</i>	0,9	/	/
<i>ARID1A</i>	0,9	8	/
<i>BUB1B</i>	0,9	/	/
<i>CDK12</i>	0,9	/	1,1
<i>CREBBP</i>	0,9	6	1,1
<i>CSF1R</i>	0,9	4	1,1
<i>EP300</i>	0,9	4	1,1
<i>EZH2</i>	0,9	/	/
<i>FANCE</i>	0,9	/	/
<i>FBXO11</i>	0,9	2	/
<i>FLCN</i>	0,9	/	1,1
<i>GNA11</i>	0,9	/	/
<i>H3F3A</i>	0,9	/	1,1
<i>KIT</i>	0,9	2	/
<i>MAP3K1</i>	0,9	/	2,2
<i>MED12</i>	0,9	/	1,1
<i>MSH6</i>	0,9	4	1,1
<i>MYC</i>	0,9	/	/
<i>PALB2</i>	0,9	/	/
<i>PRDM1</i>	0,9	/	/
<i>PTPN11</i>	0,9	/	1,1
<i>RET</i>	0,9	/	2,2
<i>SLCA8</i>	0,9	/	/
<i>SMAD4</i>	0,9	/	/
<i>SMARCB1</i>	0,9	/	/
<i>SMO</i>	0,9	2	2,2
<i>TERT</i>	0,9	2	2,2
<i>TSC2</i>	0,9	/	3,3
<i>WT1</i>	0,9	2	1,1

Abkürzungen: n = Anzahl

Tabelle 20: Der Anteil an somatischen CNAs pro Gen – Vergleich zwischen retro- und prospektiver Studie und Literaturangaben (NNR-Ca-TCGA-Studie [101, 102]).

Aufgelistet sind alle Gene, in denen in der retrospektiven Studie mindestens zwei CNAs gefunden wurden. Sie sind sortiert nach der Häufigkeit der gefundenen Varianten in der retrospektiven Studie. In Klammern hinter dem Anteil ist ergänzt, ob Amplifikationen und/oder Deletionen gefunden wurden. Mit Abstand gelistet sind Angaben zu *ZNRF3* und *CDKN2A*, zu denen in der retrospektiven Studie keine Daten generiert werden konnten.

Gen	Retrospektive Studie Anteil in [%]	Prospektive Studie Anteil in [%]	NNR-Ca-TCGA-Studie Anteil in [%]
<i>CDK4</i>	43 (Amp)	14 (Amp)	6,7 (Amp)
<i>STK11</i>	30,8 (Amp)	4 (Amp)	3,4 (Amp)
<i>TNFRSF14</i>	29,9 (Del)	4 (Del)	2,2/1,1 (Amp/Del)
<i>SMARCB1</i>	21,5 (Del)	2 (Del)	Jeweils 1,1 (Amp/Del)
<i>NOTCH1</i>	20,6 (Amp)	12 (Amp/Del)	3,4 (Amp)
<i>FLCN</i>	19,6 (Del)	/	1,1 (Del)
<i>GNA11</i>	16,8 (Amp)	8 (Amp)	/
<i>CHEK2</i>	13,1 (Del)	2 (Del)	3,4 (Del)
<i>FGFR3</i>	12,1 (Amp)	8 (Del)	3,4 (Amp)
<i>TERT</i>	12,1 (Amp)	12 (Amp)	13,4 (Amp)
<i>MAP2K4</i>	11,2 (Del)	2 (Del)	1,1 (Del)
<i>MDM2</i>	7,5 (Amp)	8 (Amp)	6,7 (Amp)
<i>SMAD4</i>	6,5 (Del/Amp)	/	1,1 (Del)
<i>CIC</i>	5,6 (Amp)	4 (Amp)	/
<i>RB1</i>	5,6 (Del)	6 (Del)	4,5 (Del)
<i>BRIP1</i>	4,7 (Del)	2 (Amp)	2,2 (Amp)
<i>IL7R</i>	4,7 (Amp)	4 (Amp)	2,2 (Amp)
<i>SDHB</i>	4,7 (Del)	/	/
<i>GNAS</i>	3,7 (Amp)	/	1,1 (Amp)
<i>GNAQ</i>	3,7 (Del)	/	1,1 (Amp)
<i>PIK3R1</i>	3,7 (Amp/Del)	/	3,1 (Amp)
<i>BRCA2</i>	2,8 (Del)	6 (Del)	1,1 (Del)
<i>FGFR2</i>	2,8 (Del)	/	/
<i>MSH2</i>	2,8 (Del)	2 (Del)	1,1 (Amp)
<i>SLC7A8</i>	2,8 (Del/Amp)	/	/
<i>ABL1</i>	1,9 (Amp)	2 (Amp)	jeweils 2,2 (Amp/Del)
<i>CDC73</i>	1,9 (Del)	/	1,1 (Amp)
<i>CSF1R</i>	1,9 (Amp und Del)	6 (Amp)	2,2 (Amp)
<i>ECT2L</i>	1,9 (Del)	2 (Del)	jeweils 1,1 (Amp/Del)
<i>EPCAM</i>	1,9 (Del)	2 (Del)	1,1 (Del)
<i>EZH2</i>	1,9 (Del)	/	1,1 (Del)
<i>MAP3K1</i>	1,9 (Amp)	/	3,4 (Amp)
<i>MLH1</i>	1,9 (Del)	/	/
<i>NPM1</i>	1,9 (Amp)	/	2,2 (Amp)
<i>PHF6</i>	1,9 (Del)	/	/
<i>SPOP</i>	1,9 (Del)	/	1,1 (Amp)
<i>ZNRF3</i>	K.A.	6 (Del)	16,9 (Del)
<i>CDKN2A</i>	K.A.	8 (Del)	6,7 (Del)

Abkürzungen: Amp = Amplifikation; Del = Deletion; K.A. = keine Angaben

7.2 Ergänzende Abbildungen

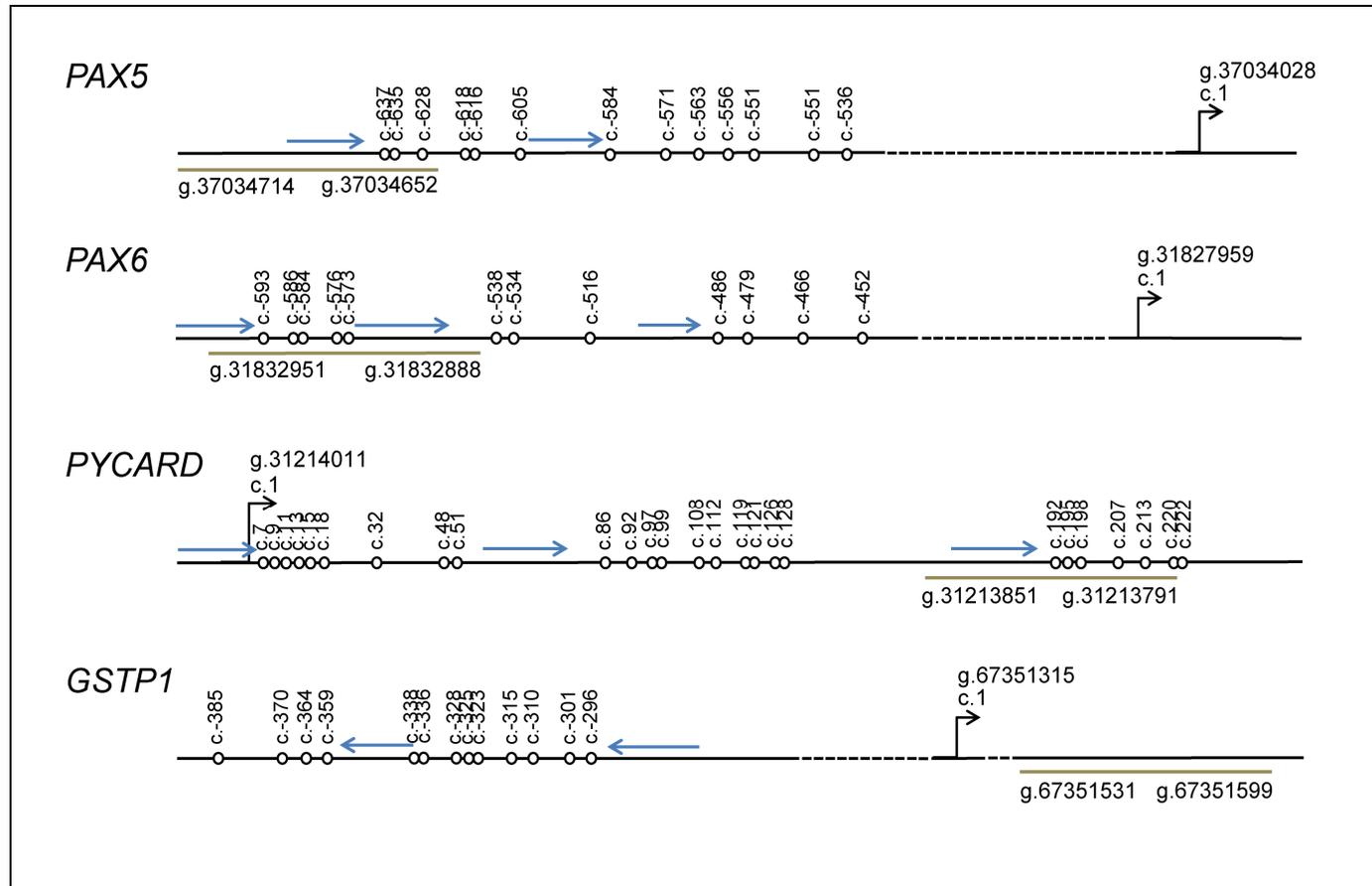


Abbildung 38: Lage der Sequenzierprimer für die Methylierungsanalyse.

Durch Verwendung der Sequenzierprimer (blaue Pfeile) können die nachfolgenden (in Orientierung zur Pfeilrichtung) CpGs (schwarze Kreise) auf Methylierung hin untersucht werden. Die Positionen der CpGs sind in Bezug zum Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil; c.1) angegeben. Die grüne Linie markiert, wo die jeweiligen MS-MLPA-Sonden binden würden (g.-Positionen darunter: 5'-Ende bzw. 3' Ende der spezifischen Bindestelle). Referenzsequenz GRCh37. (bereits publiziert [82]; Veröffentlicht mit Genehmigung von OXFORD UNIVERSITY PRESS (Lizenznummer: 4933651316969))

ANLAGE

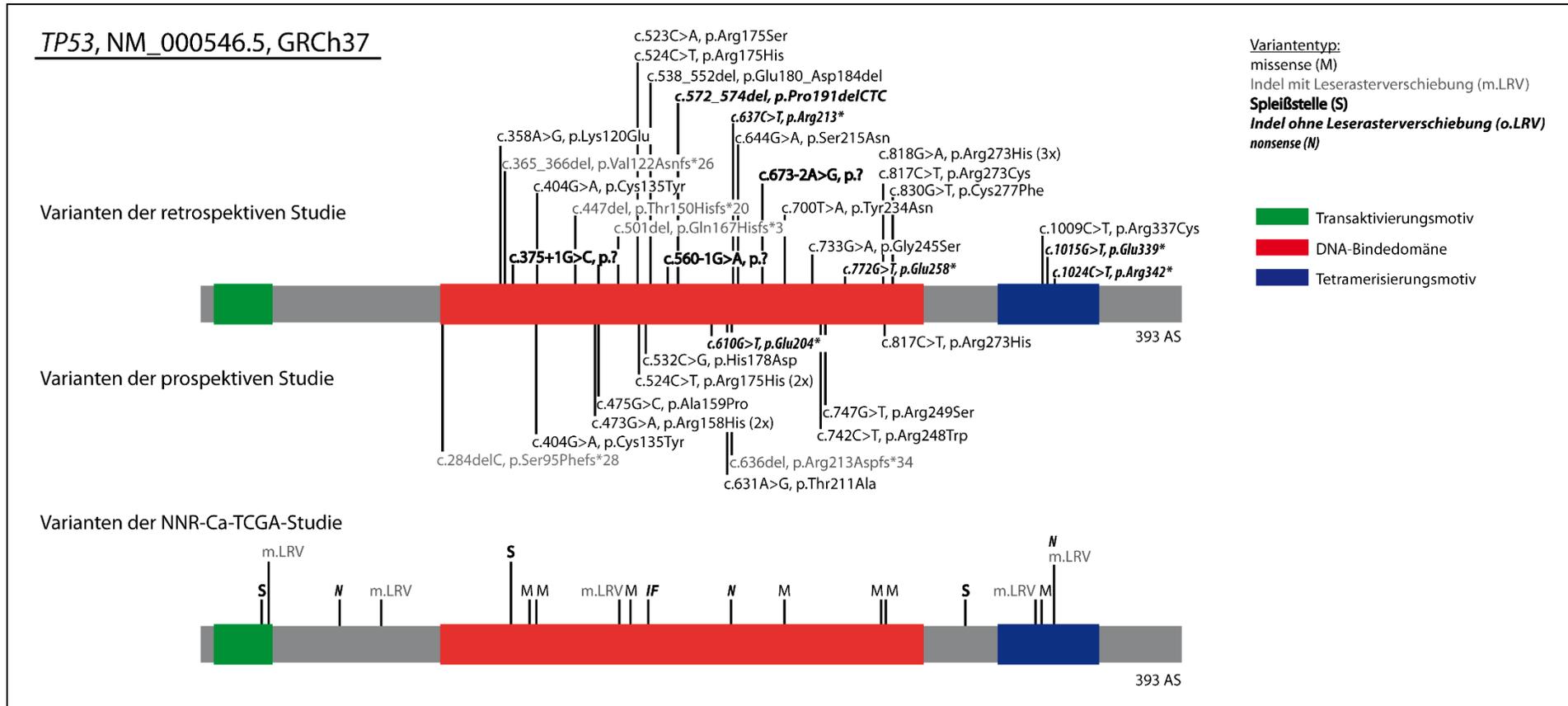


Abbildung 39: Lage der gefundenen proteinverändernden TP53-Varianten.

Sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Studie sind die Veränderungen in der DNA-Bindedomäne (rot) und in der Tetramerisierungsdomäne (blau) lokalisiert. Bei den Varianten handelt es sich um missense und nonsense Varianten, Spleißstellenveränderungen und Insertionen und Deletionen mit und ohne Leserasterverschiebung. Zum Vergleich ist die Lage der Varianten aus der NNR-Ca-TCGA-Studie dargestellt (untere Proteinsequenz). Es ist nur die Art der Variante angegeben. Die Varianten sind ebenfalls größtenteils in der DNA-Bindedomäne und der Tetramerisierungsdomäne des Proteins lokalisiert und unterschiedlicher Art. Bei Varianten, die mehrfach detektiert wurden, ist die Häufigkeit hinter der Position in Klammern angegeben. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinon; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

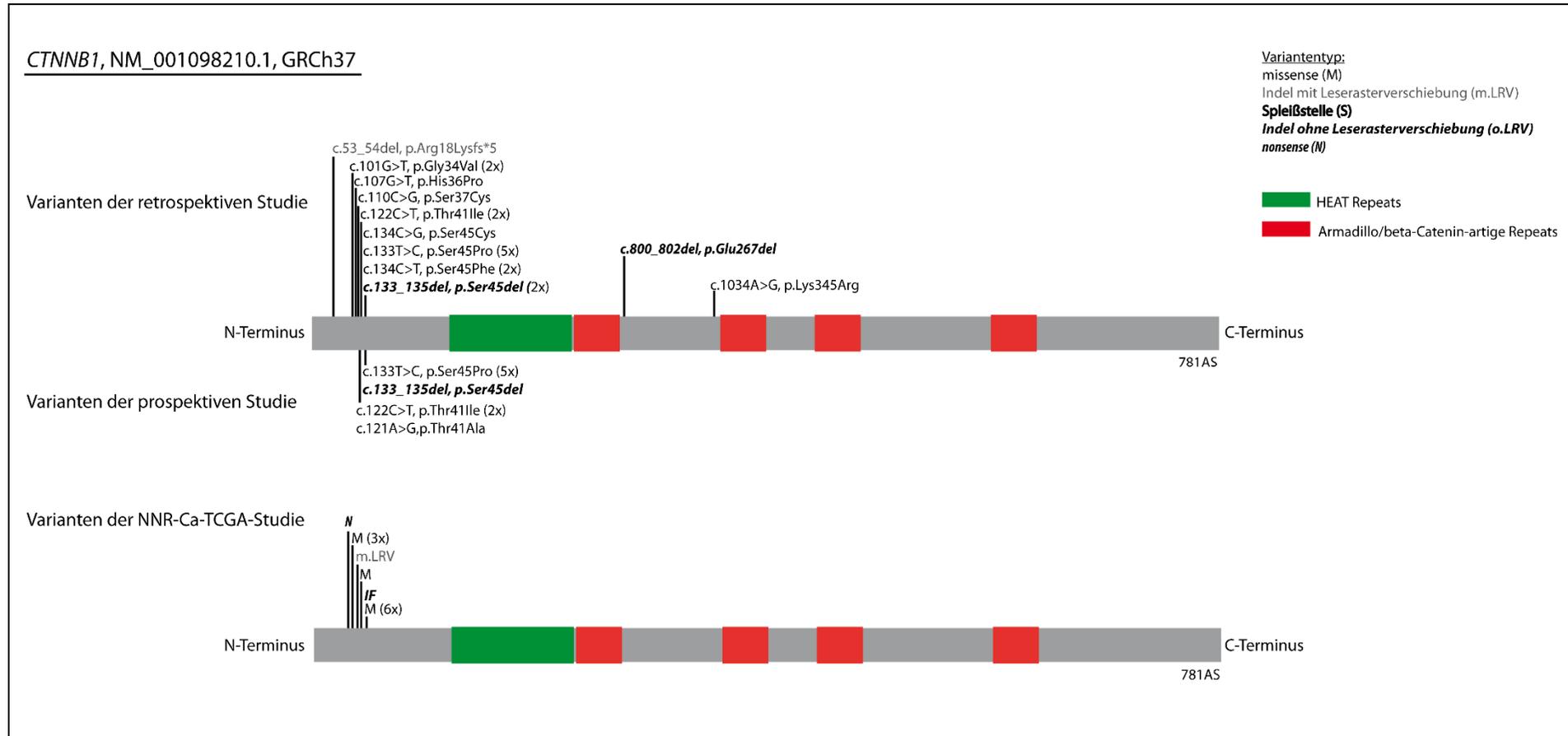


Abbildung 40: Lage der gefundenen proteinverändernden *CTNNB1*-Varianten.

Sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Studie wurden die meisten Veränderungen in der Nähe des N-Terminus des Proteins gefunden. Besonders häufig von Veränderungen betroffen war Position p.45 (10 beziehungsweise 6 Tumoren mit Varianten; Anzahl der jeweils gezählten Veränderungen in Klammern hinter der Position angegeben). Die Veränderungen sind größtenteils missense Varianten. In den Tumoren, die in der NNR-Ca-TCGA-Studie untersucht wurden, war diese Position ebenfalls häufig verändert. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

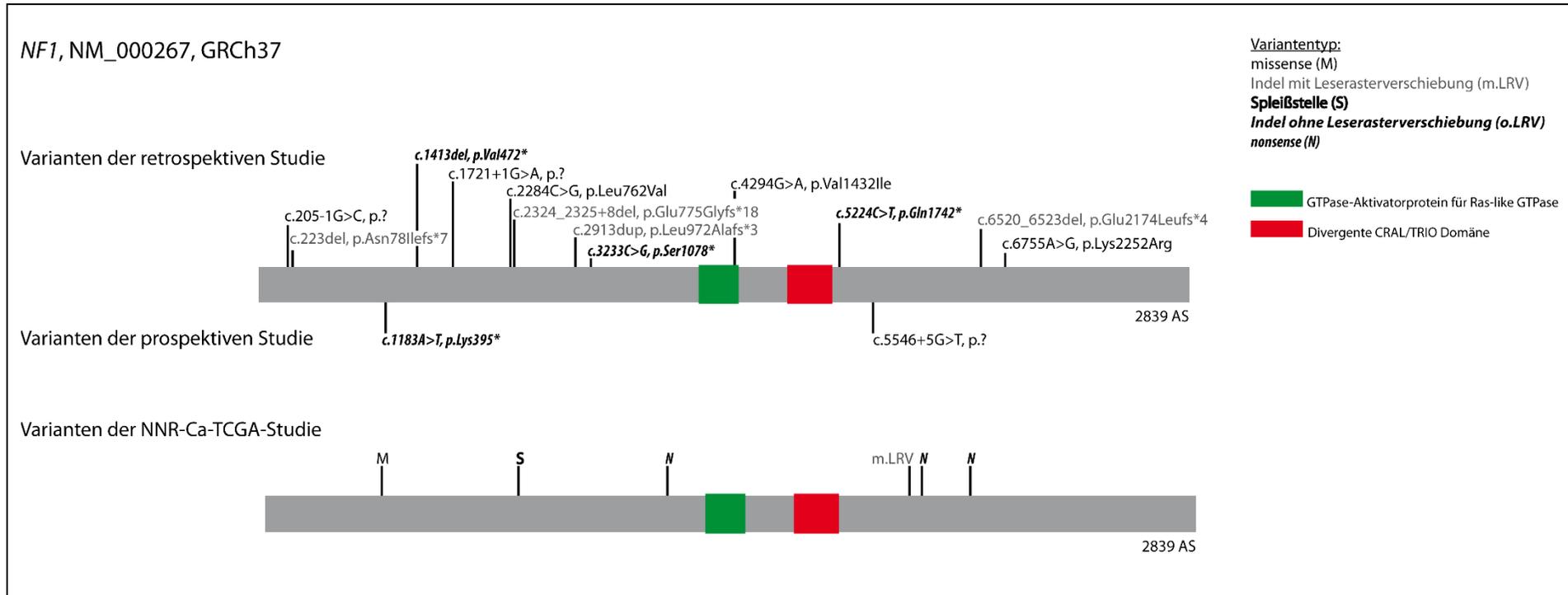


Abbildung 41: Lage der gefundenen proteinverändernden *NF1*-Varianten.

Sowohl in der retrospektiven als auch in der prospektiven Studie sind die Veränderungen über das gesamte Protein verteilt. Bei den Varianten handelt es sich um missense und nonsense Varianten, Deletionen und Duplikationen, die zu Leserasterverschiebungen führen, aber auch Varianten, die die Spleißstellen verändern. Dies entspricht den Daten der NNR-Ca-TCGA-Studie. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinon; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

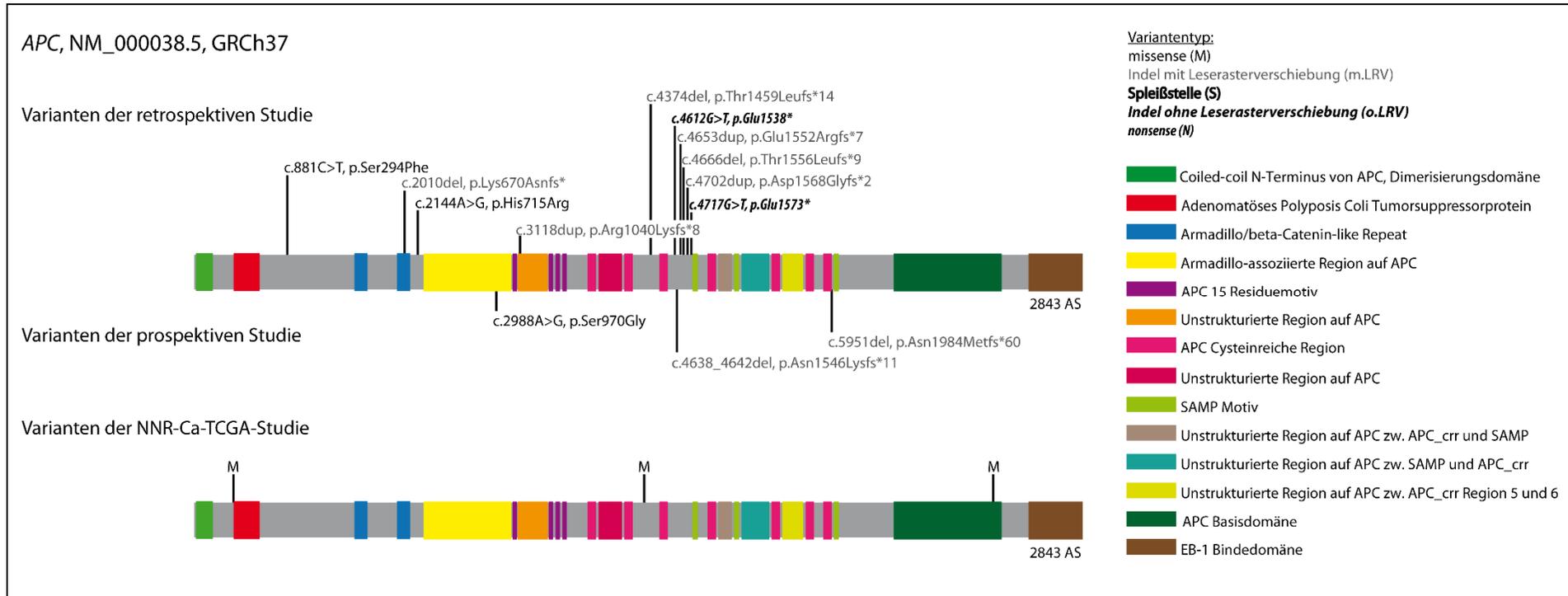


Abbildung 42: Lage der gefundenen proteinverändernden APC-Varianten.

Die Veränderungen, die in der retrospektiven Studie gefunden wurden, finden sich hauptsächlich mittig in der zweidimensional dargestellten Proteinsequenz (n = 6; zwischen p.1459 und p.1573). Die gefundenen Varianten sind zu 80 % trunkierende Varianten (nonsense Varianten oder Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung). Die Varianten, die in der prospektiven Studie und in der Kohorte der NNR-Ca-TCGA-Kohorte gefunden wurden, clustern nicht. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinon; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

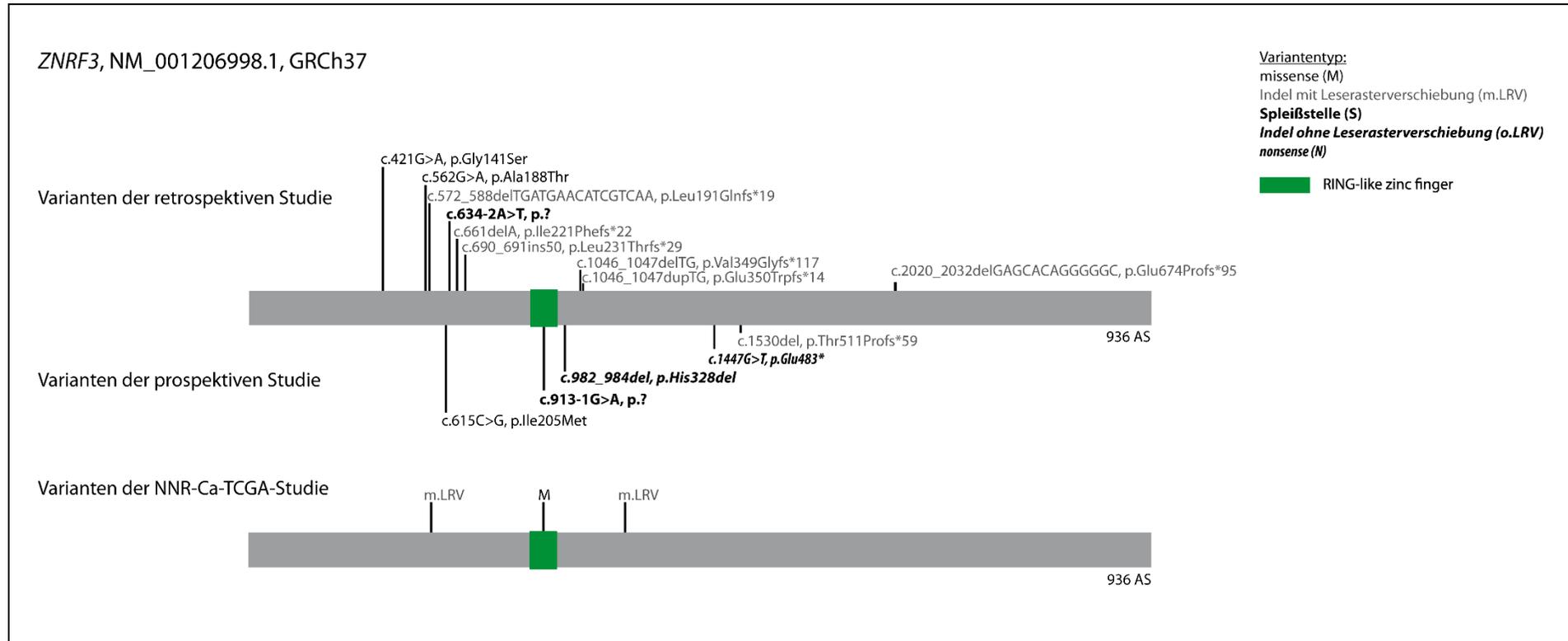


Abbildung 43: Lage der gefundenen proteinverändernden *ZNRF3*-Varianten.

Die Veränderungen, die in den beiden Teilstudien gefunden wurden, sind über die Proteinsequenz verteilt. In beiden Kohorten sind die gefundenen Varianten hauptsächlich trunkierende Varianten (Spleißstellenveränderungen, nonsense Varianten oder Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung; 7 von 9 Varianten in der retrospektiven Studie; 3 von 5 in der prospektiven Studie). Die Anzahl der gefundenen Varianten der NNR-Ca-TCGA-Studie ist vergleichsweise gering (3 Varianten bei 89 Proben). (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinon; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

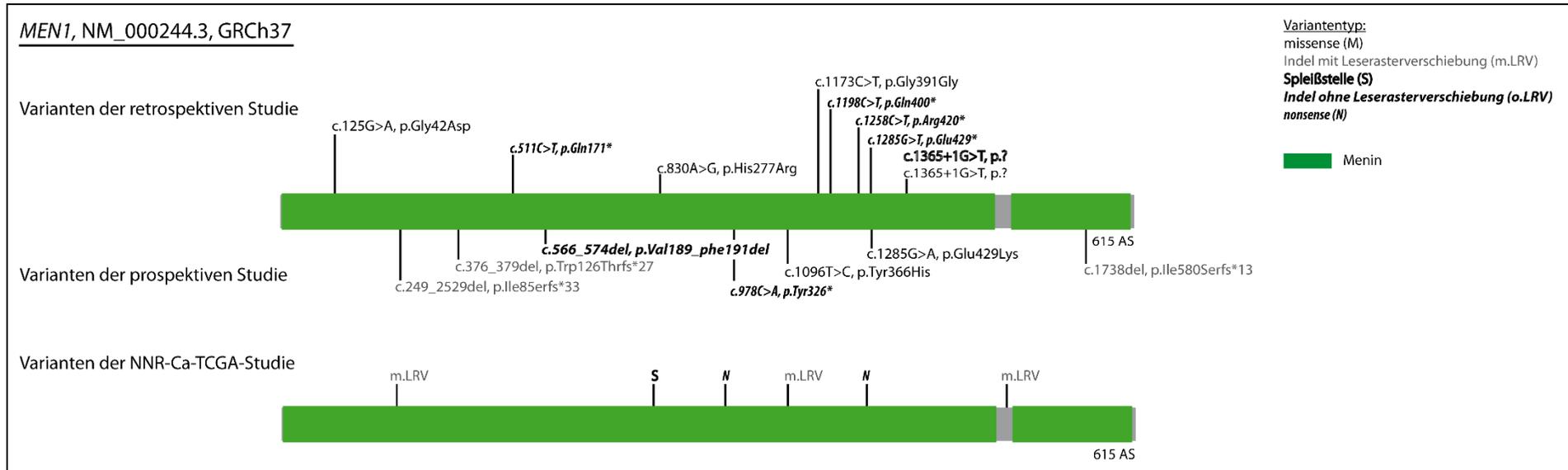


Abbildung 44: Lage der gefundenen proteinverändernden *MEN1*-Varianten.

Die Veränderungen, die in den beiden Teilstudien gefunden wurden, sind über die Proteinsequenz verteilt. In beiden Kohorten sind die gefundenen Varianten hauptsächlich trunkierende Varianten (Spleißstellenveränderungen, nonsense Varianten oder Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung; 5 von 8 Varianten in der retrospektiven Studie; 5 von 7 in der prospektiven Studie). Die Varianten der NNR-Ca-TCGA-Kohorte entsprechen diesen Daten. Die gefundenen trunkierenden Varianten sind ebenfalls über die komplette Proteinsequenz verteilt. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

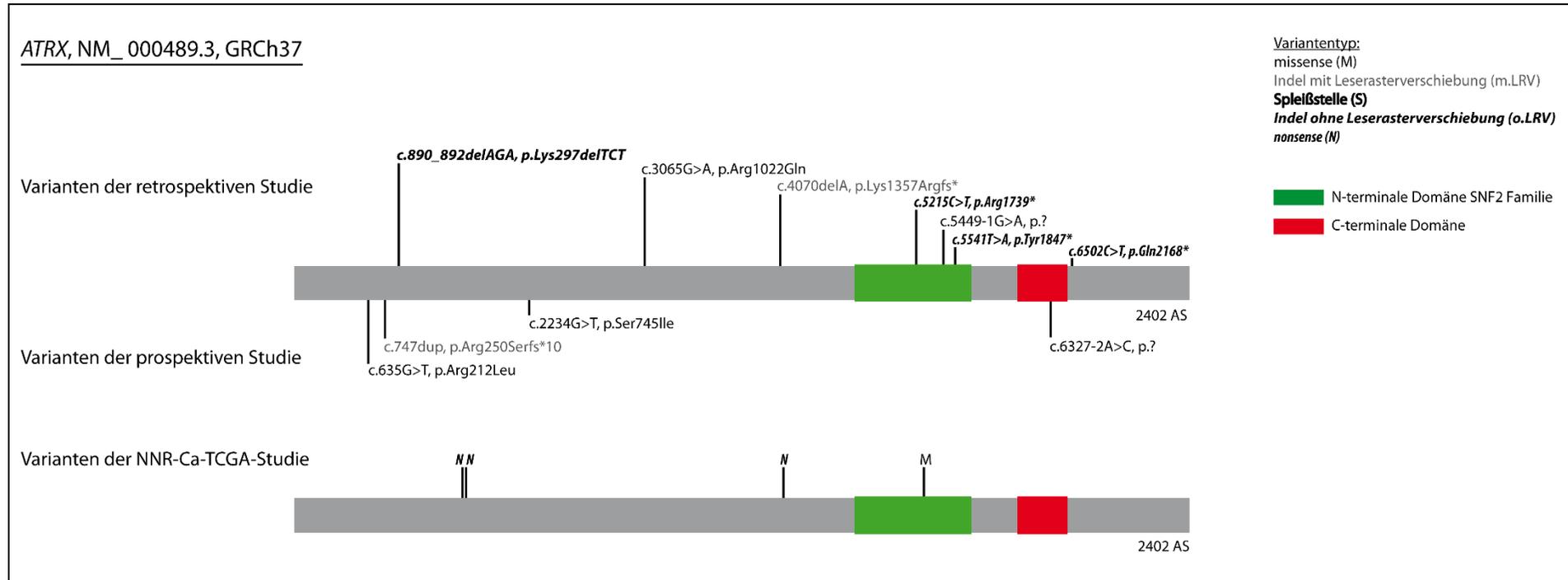


Abbildung 45: Lage der gefundenen proteinverändernden ATRX-Varianten.

Die Veränderungen, die in den beiden Teilstudien gefunden wurden, sind über die Proteinsequenz verteilt. In der retrospektiven Studie handelt es sich hauptsächlich um trunkierende Varianten (Spleißstellenveränderungen, nonsense Varianten oder Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung; 5 von 7 Varianten). In der Kohorte, die im Rahmen der NNR-Ca-TCGA-Studie untersucht wurden, sind 3 von 4 Varianten, die über die Proteinsequenz verteilt sind, trunkierend (nonsense Varianten). (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

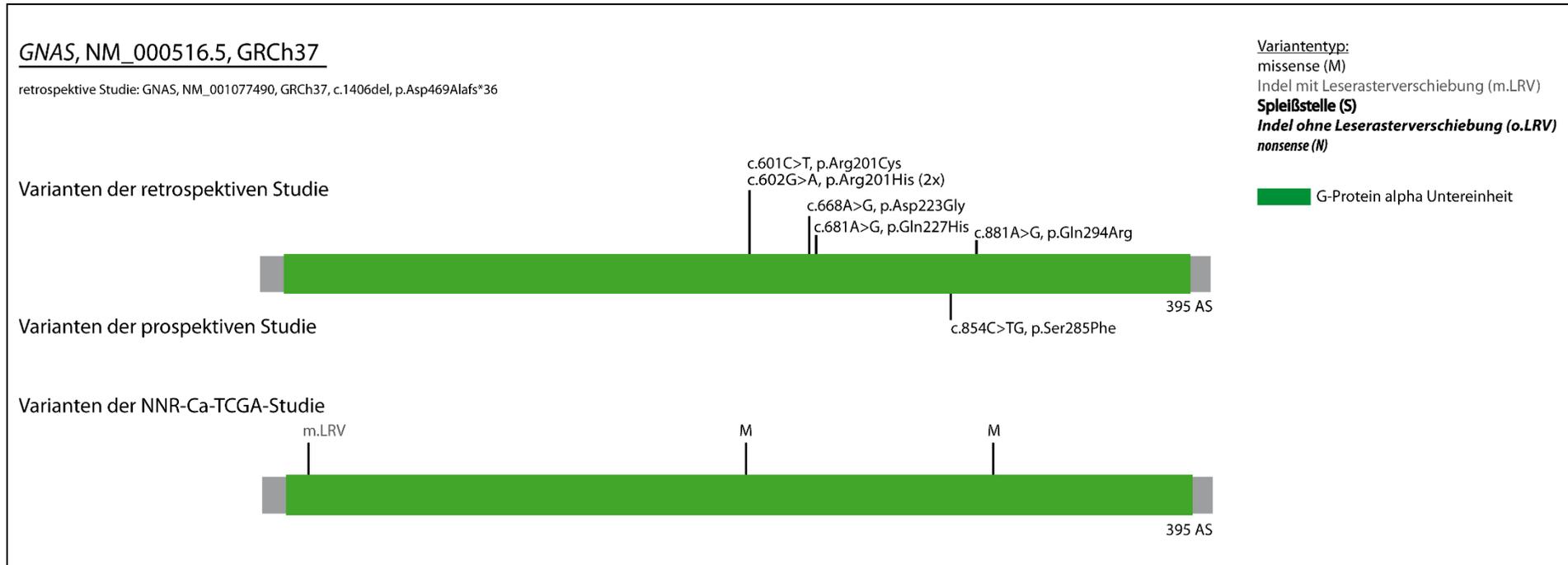


Abbildung 46: Lage der gefundenen proteinverändernden GNAS-Varianten.

Bei den Veränderungen handelt es sich ausschließlich um missense Varianten, die keinem bestimmten Hotspot zuzuordnen sind. In der NNR-Ca-TCGA-Studie wurde neben missense Mutationen eine Deletion mit Leserasterverschiebung gefunden. Bei Varianten, die mehrfach detektiert wurden, ist die Häufigkeit hinter der Position in Klammern angegeben. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

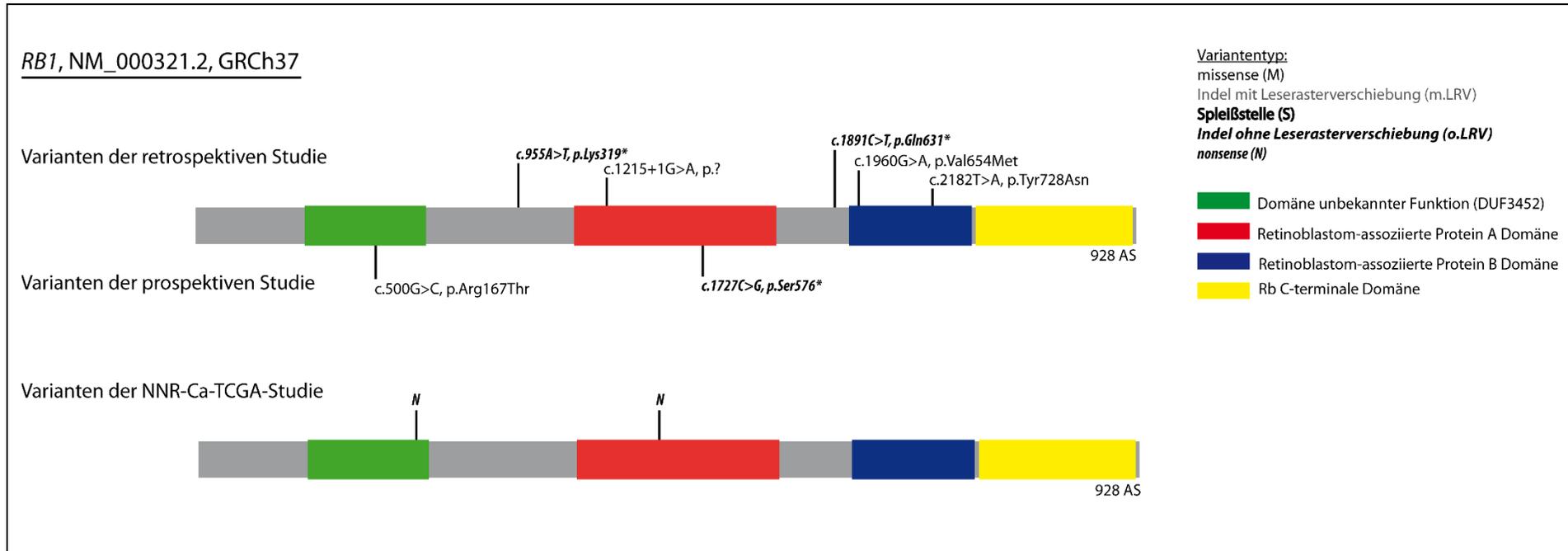


Abbildung 47: Lage der gefundenen proteinverändernden RB1-Varianten.

Die gefundenen RB1-Varianten sind über die Proteinsequenz verteilt. Bei den Varianten handelt es sich um missense und nonsense Varianten und Veränderung der Spleißstellen. In der NNR-Ca-TCGA-Studie wurden zwei trunkierende Varianten gefunden. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenzarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

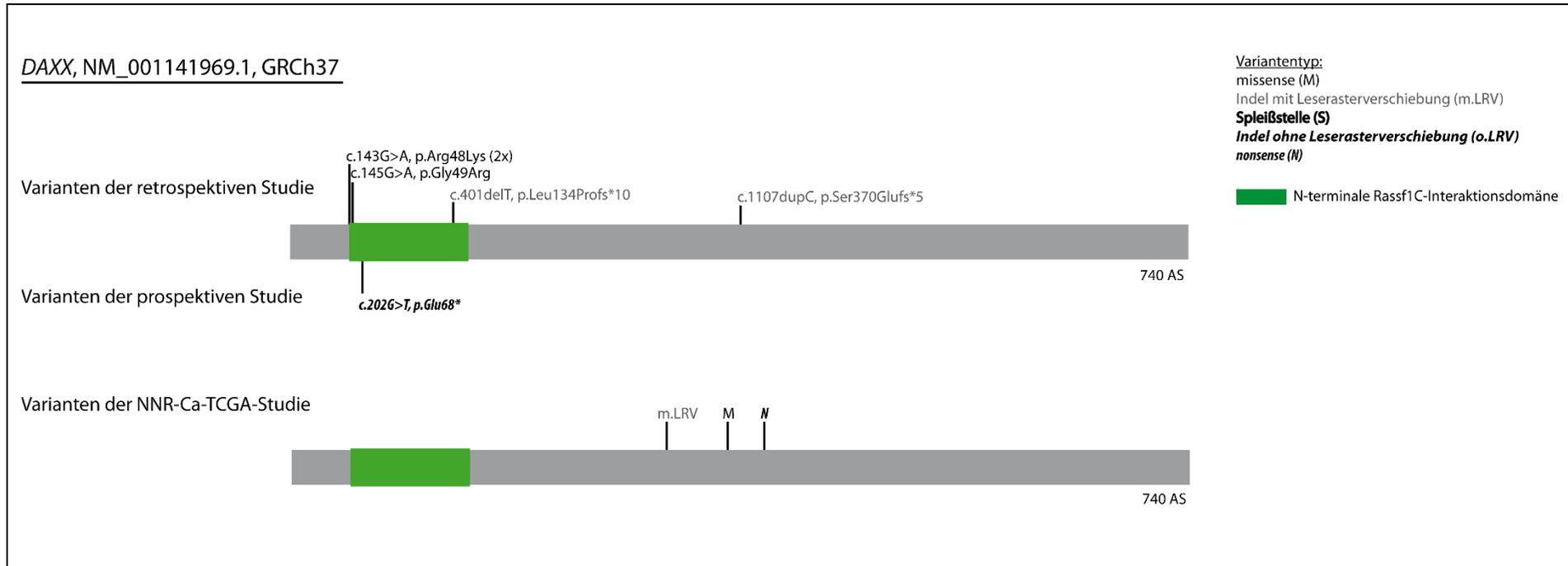


Abbildung 48: Lage der gefundenen proteinverändernden *DAXX*-Varianten.

In der retrospektiven Studie wurden, wie auch in der NNR-Ca-TCGA-Kohorte, sowohl missense als auch trunkierende Varianten gefunden. In der prospektiven Studie wurde nur eine nonsense Variante gefunden. Bei Varianten, die mehrfach detektiert wurden, ist die Häufigkeit hinter der Position in Klammern angegeben. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

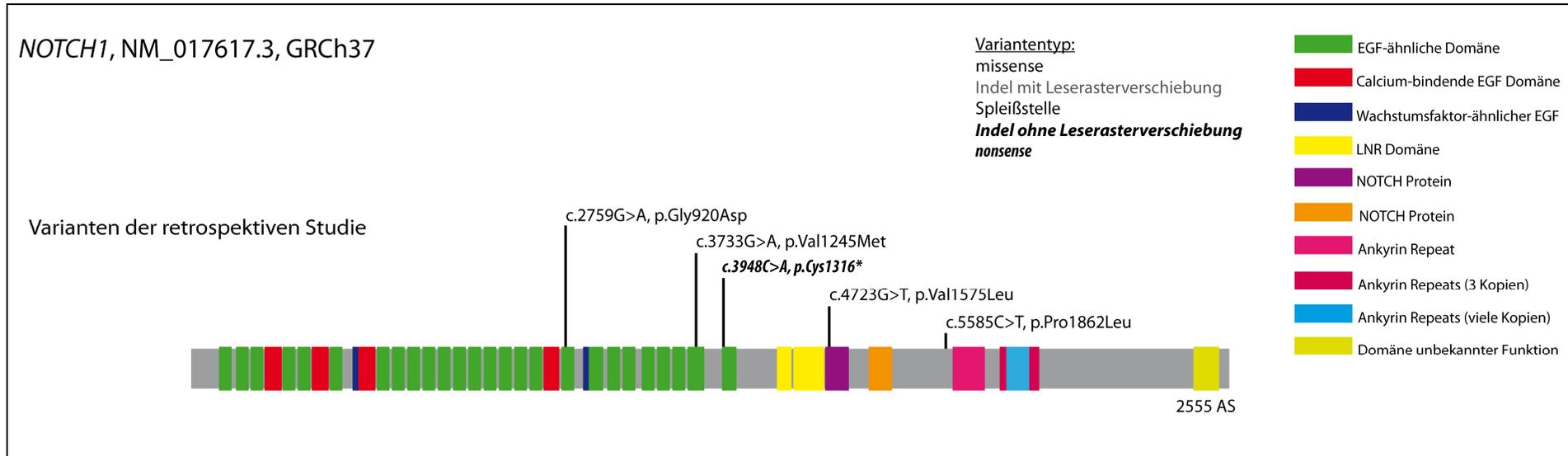


Abbildung 49: Lage der gefundenen proteinverändernden *NOTCH1*-Varianten.

Die Veränderungen sind über die Proteinsequenz verteilt und hauptsächlich missense Varianten. In der prospektiven Studie konnten in den bisher untersuchten 50 Tumorproben keine Proteinsequenz-verändernden *NOTCH1*-Varianten gefunden werden. Ebenso wurden in der NNR-Ca-TCGA-Studie keine Einzel-nukleotidaustausche oder kleinen Indels in *NOTCH1* berichtet. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

ANLAGE

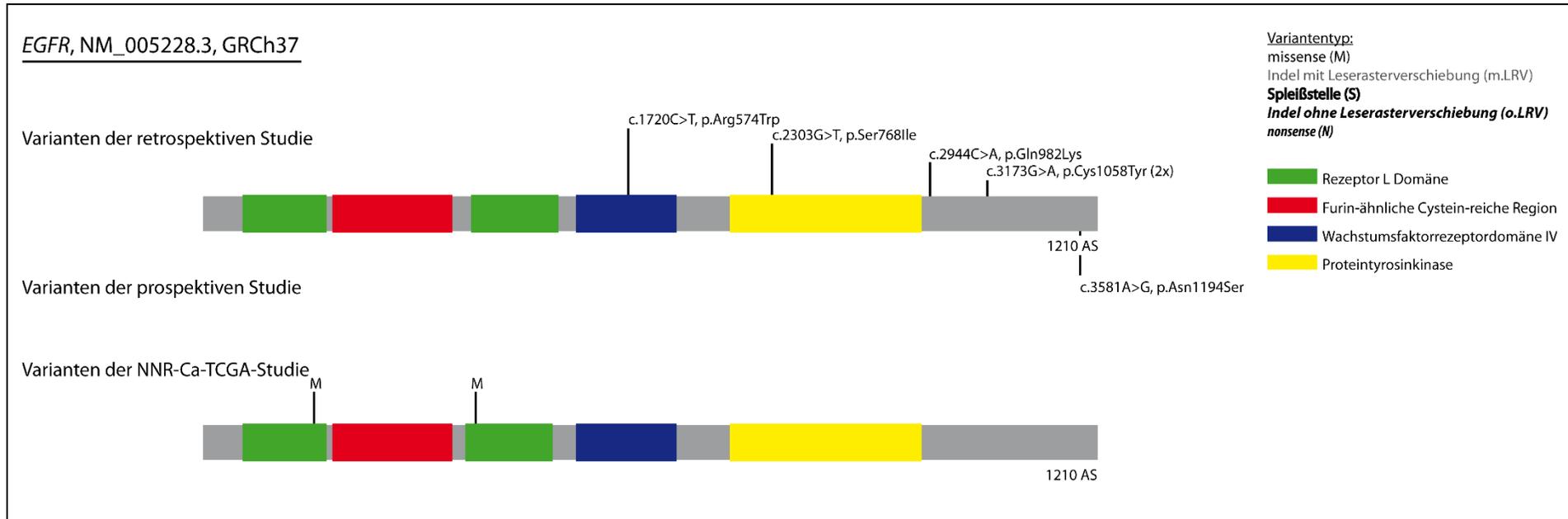


Abbildung 50: Lage der gefundenen proteinverändernden EGFR-Varianten.

Die Veränderungen sind über die Proteinsequenz verteilt. Die gefundenen Varianten sind ausschließlich missense Varianten. Ebenso wurden in der NNR-Ca-TCGA-Kohorte zwei missense Varianten beschrieben. Bei Varianten, die mehrfach detektiert wurden, ist die Häufigkeit hinter der Position in Klammern angegeben. (Abbildung erstellt mit Hilfe des MutationMapper [101, 102]; Informationen zu den NNR-Ca-TCGA-Daten siehe [101, 102])

Abkürzung: AS = Aminosäuren; NNR-Ca = Nebennierenrindenkarzinom; TCGA = The Cancer Genome Atlas

CURRICULUM VITAE

PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Publikationen

Intratumor heterogeneity of prognostic DNA-based molecular markers in adrenocortical carcinoma

Jouinot A, [Lippert J](#), Fassnacht M, de La Villeon B, Septier A, Neou M, Perlemoine K, Appenzeller S, Sibony M, Gaujoux S, Dousset B, Libe R, Groussin L, Ronchi CL, Assié G, Bertherat J.

Endocr Connect. 2020 Jul;9(7):705-714. doi: 10.1530/EC-20-0228.

Targeted Gene Expression Profile Reveals CDK4 as Therapeutic Target for Selected Patients With Adrenocortical Carcinoma

Liang R, Weigand I, [Lippert J](#), Kircher S, Altieri B, Steinhauer S, Hantel C, Rost S, Rosenwald A, Kroiss M, Fassnacht M, Sbiera S, Ronchi CL.

Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Apr 16;11:219. doi: 10.3389/fendo.2020.00219. eCollection 2020.

Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication

[Lippert J](#), Appenzeller S, Liang R, Sbiera S, Kircher S, Altieri B, Nanda I, Weigand I, Gehrig A, Steinhauer S, Riemens RJM, Rosenwald A, Müller CR, Kroiss M, Rost S, Fassnacht M, Ronchi CL.

J Clin Endocrinol Metab. 2018 Dec 1;103(12):4511-4523. doi: 10.1210/jc.2018-01348.

Kongressbeiträge

- 11/2018** Auszeichnung mit dem "Bruno Allolio Award 2018 for Research on Adrenocortical Carcinoma" für die Publikation "Targeted molecular analysis in adrenocortical carcinomas: a strategy towards improved personalized prognostication.", Lippert et al., JCEM, 2018
17. Tagung des European Network for the Study of Adrenal Tumors in Florenz, Italien
- 06/2018** **Identification of a molecular signature for prognostic classification and individualized cancer therapy in ACC**
Aktualisiert
- Lippert J, Appenzeller S, Steinhauer S, Rost S, Wolf B, Gehrig A, Müller CR, Fassnacht M, Ronchi CL
18. Internationale Nebennierenkonferenz in München
Posterpräsentation (ausgezeichnet mit dem „Brownie and Schimmer New Investigator Poster Award“)
- 03/2018** **Identification of a molecular signature for prognostic classification and individualized cancer therapy in ACC**
Aktualisiert
- Lippert J, Appenzeller S, Steinhauer S, Rost S, Wolf B, Gehrig A, Müller CR, Fassnacht M, Ronchi CL
- Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Münster
Posterpräsentation (nominiert für einen Posterpreis)
- 03/2017** **Identification of a molecular signature for prognostic classification and individualized cancer therapy in ACC**
- Lippert J, Appenzeller S, Steinhauer S, Rost S, Wolf B, Gehrig A, Müller CR, Fassnacht M, Ronchi CL
- Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Bochum
Posterpräsentation

DANKSAGUNG

Von der Idee hin zur Konkretisierung eines Forschungsprojekts, zur Planung und technischen Umsetzung, zur Auswertung und Bewertung der generierten Daten bis hin zur Publikation dauert es Jahre. Die Forschungsergebnisse sind in den seltensten Fällen auf die Arbeit nur einer Person zurückzuführen. Zum Gelingen meiner Arbeit haben viele Personen große und kleine – aber immer wichtige – Beiträge geleistet.

Ein herzliches Dankeschön geht an PD Dr. Cristina L. Ronchi, die mit ihrer Projektidee und der Anfrage wegen einer Kooperation an das Institut für Humangenetik herangetreten war, woraus das interessante und sehr anwendungsbezogene Projekt zum Thema meiner Doktorarbeit entstand. Danke für die sehr gute Betreuung über den gesamten Zeitraum bei mitunter großer räumlicher Distanz und die Übernahme des Erstgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Jörg Schultz – der dankenswerterweise die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat –, Dr. Andrea Gehrig und Prof. Dr. Müller-Reible für das Interesse an dieser Arbeit und immer sehr anregende Diskussion bei alljährlichen Meetings. Ein großer Dank geht an PD Dr. Simone Rost, der offiziell keine Betreuungsaufgabe zugeteilt war, die aber dennoch allzeit großes Interesse an meiner Arbeit zeigte und jederzeit ein offenes Ohr für alle meine Belange im Rahmen der Promotion hatte.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter*innen des Instituts für Humangenetik– besonders allen Mitarbeiter*innen der AG Rost – für die gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft. Das gilt vor allem für Dr. Ann-Kathrin Zaum, meiner „Mit-Doktorandin“, die mir bei Computerfragen aller Art geholfen hat und mit der ich Freude über gelungene Experimente, aber auch Frust bei Misslingen teilen konnte.

Ich bedanke mich herzlich bei Sonja Steinhauer vom Team der Endokrinologie der Universitätsklinik Würzburg für die Isolation und zuverlässige Lieferung von DNA sowie bei Dr. Silke Appenzeller vom Comprehensive Cancer Center Mainfranken für die Unterstützung bei bioinformatischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für ihre uneingeschränkte Unterstützung, für Rat und Tat in vielerlei Hinsicht und ihr Vertrauen.