

Aus der
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Innere Medizin
Klinik III - Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Junghanß

**Durchführbarkeit einer komplexen NGS-Analyse
zur Identifikation
prognostischer und therapeutisch relevanter Biomarker
bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med)

Vorgelegt von
Helge Marius Ningel, geb. am 14.11.1998 in Nürtingen
Eingereicht am 20.11.2024
Verteidigt am 10.12.2025

-
1. Gutachter: Prof. Dr. med Christian Junghanß (Universität Rostock)
 2. Gutachter: Prof. Dr. med Andreas Erbersdobler (Universität Rostock)
 3. Gutachter: Prof. Dr. med. Chia-Jung Busch (Universität Greifswald)
-

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.1	Next Generation Sequencing (NGS)	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Verschiedene Arten des NGS	2
1.1.3	Untersuchung erworbener Resistenzmechanismen durch NGS	3
1.2	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)	5
1.2.1	Ätiologie	5
1.2.2	Therapie	5
1.2.3	Prognose	6
1.3	NGS bei HNSCC	7
II.	Zielstellung	9
III.	Material und Methoden	11
3.1	Materialien	11
3.2	Methoden	15
3.2.1	Studiendesign	15
3.2.2	Auswahl der Pilotkohorte	16
3.2.3	Auswahl des komplexen Panels	17
3.2.4	Sequenzierung	18
IV.	Ergebnisse	25
4.1	Klinische Charakterisierung der Pilotkohorte	25
4.2	Sequenzierung mit dem konventionellen Panel	26
4.3	Auswahl des komplexen Panels	29
4.3.1	Design Custom tNGS-Panel	29
4.3.2	Vergleich Custom tNGS-Panel mit kommerziellen Panels	33
4.4	Sequenzierung mit dem komplexen Panel	35
4.4.1	Klinische Charakterisierung der Patienten mit auswertbaren Sequenzierdaten	35

4.4.2	Übersicht Sequenzierdaten	37
4.4.3	Mutierte Gene	42
4.4.4	Actionable Targets	43
4.4.5	Vergleich der Primarius- und vRezidiv-Proben	46
4.4.6	Vergleich klinischer Gruppen	50
4.4.7	Tumormutationslast und Mikrosatelliteninstabilität	53
4.4.8	Loss of Heterozygosity	54
V.	Diskussion	56
5.1	Pilotkohorte	56
5.2	Überprüfung der DNA-Qualität mit etabliertem Panel	57
5.3	Auswahl des komplexen Panels	58
5.3.1	Design eines Custom-NGS-Panels für HNSCC	58
5.3.2	Vergleich des Custom Panels mit kommerziellen Panels	59
5.4	Eignung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	60
5.4.1	Informationsgewinn durch den Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	60
5.4.2	Performance des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	61
5.5	Wahl des Cutoffs	64
5.6	Mutierte Gene	66
5.7	Tumormutationslast und Mikrosatelliteninstabilität	68
5.8	Identifikation von prognostischen Markern und therapeutischen Targets	69
5.9	Vergleich der Primarius- und vRezidiv-Proben	71
5.10	Vergleich der Sequenzierdaten der klinischen Gruppen	72
5.11	Loss of Heterozygosity	72
VI.	Zusammenfassung	74
VII.	Thesen	77
VIII.	Literatur	79

IX.	Anhang	94
9.1	Ergänzende Tabellen	94
9.2	Ergänzende Abbildungen	102
X.	Lebenslauf	108
XI.	Danksagung	109
XII.	Eidesstattliche Versicherung	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte	11
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 3:	Kits und Reagenzien	12
Tabelle 4:	Software	14
Tabelle 5:	Grundlegende Klinische Charakteristika der Pilotkohorte	25
Tabelle 6:	Auszug aus Sequenzierdaten mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2	27
Tabelle 7:	Übersicht über die enthaltenen Gene im zweiten Design des Custom Panels	31
Tabelle 8:	Übersicht über die enthaltenen Gene im dritten Design des Custom Panels	32
Tabelle 9:	Klinische Charakteristika der Patienten mit auswertbaren Sequenzierdaten.	35
Tabelle 10:	Übersicht über die sequenzierten Proben mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	37
Tabelle 11:	Übersicht über die Sequenzierparameter mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	39
Tabelle 12:	Anzahl der Calls pro Gen für alle Patienten mit auswertbaren Proben	40
Tabelle 13:	Übersicht über Calls, die bei mehreren Patienten detektiert wurden	41
Tabelle 14:	Mutationsfrequenz der mutierten Gene	42
Tabelle 15:	Onkogene und/oder Actionable Mutationen in Patienten mit Sequenziererergebnissen von Primarius und vRezidiv	44
Tabelle 16:	Onkogene und/oder actionable Mutationen in Patienten mit nur einem Sequenziererergebnis von Primarius oder vRezidiv	45
Tabelle 17:	Vergleich der Patienten nach Tumordifferenzierung	50
Tabelle 18:	Vergleich der Patienten nach medikamentöser Therapie	51
Tabelle 19:	Vergleich der Patienten nach Therapieansprechen	52
Tabelle 20:	Vergleich der Patienten nach PD-L1-Status	52
Tabelle 21:	Positionen mit detektiertem Loss of Heterozygosity	54
Tabelle 22:	Übersicht über die Sample Level LOH	55
Tabelle 23:	Häufigkeit der mutierten Gene der Pilotkohorte im Vergleich mit cBioPortal-Datensatz66	
Tabelle 24:	Die häufigsten mutierten Gene im cBioPortal-Datensatz im Vergleich mit Pilotkohorte	67
Tabelle 25:	qPCR-Ergebnisse Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2	94
Tabelle 26:	Sequenzierparameter mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2	95
Tabelle 27:	Übersicht über die enthaltenen Gene im ersten Design des Custom Panels	96
Tabelle 28:	Sequenzierparameter mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	98
Tabelle 29:	qPCR-Ergebnisse Oncomine™ Comprehensive Assay Plus	99
Tabelle 30:	Mutationsfrequenz aller mutierten Gene im Vergleich mit cBioPortal	100
Tabelle 31:	Korrelation der Überlebenszahl mit der Anzahl an Mutationen pro Probe	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MAPK-Signalweg und Einsatz von zielgerichteter Krebstherapie beim Malignen Melanom	3
Abbildung 2: Studiendesign	16
Abbildung 3: Überblick Methoden.	19
Abbildung 4: Auswertbarkeit der Proben bei Sequenzierung mit Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel	28
Abbildung 5: Überblick über den Prozess des Designs des Custom Panels	29
Abbildung 6: Vergleich der enthaltenen Gene im Custom Panel und Oncomine™ Comprehensive Assay Plus.	34
Abbildung 7: Auswertbarkeit der Proben bei Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive	38
Abbildung 8: Übersicht über die mutierten Gene in Patienten mit auswertbarer Primarius- und vRezidiv-Probe.	47
Abbildung 9: Übersicht über die mutierten Gene in Patienten mit nur einer auswertbaren Probe	48
Abbildung 10: Lollipop Plot mit allen detektierten Varianten im TP53 Gen	49
Abbildung 11: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 201 und Patient Nr. 198	102
Abbildung 12: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 211 und Patient Nr. 220	103
Abbildung 13: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 184	104
Abbildung 14: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 182 und Patient Nr.200	105
Abbildung 15: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 229 und Patient Nr.227	106
Abbildung 16: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 232 und Patient Nr.161	107

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BED-Datei	Browser Extensible Data-Datei
CDS	Coding Sequence; Proteinkodierende Sequenz
CNV	Copy Number Variation
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CPS	Combined Positivity Score
CSV-Datei	Comma Separated Value-Datei
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated Protein 4
DNA	Desoxyribonucleic acid
ESCAT	ESMO Scale for Clinical Actionability for Molecular Targets
ESMO	European Society for Medical Oncology
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
hg19	Human genome 19
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
kb	Kilobase
LOH	Loss-of-Heterozygosity
Mb	Megabase
MNV	Multi-Nucleotide Variation
MSI	Microsatellite Instability
NGS	Next Generation Sequencing
n.v.	Nicht verfügbar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Cell Death Protein-1
PD-L1	Programmed Death-Ligand-1
PFS	Progression Free Survival

pM	Picomol
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SNV	Single-Nucleotide Variation
TMB	Tumour Mutational Burden
tNGS	targeted Next Generation Sequencing
TSV-Datei	Tab Separated Value-Datei
UDG	Uracil DNA Glycosylase
VAF	Variant Allele Frequency
WES	Whole Exome Sequencing

I. Einleitung

1.1 Next Generation Sequencing (NGS)

1.1.1 Allgemeines

Die grundlegende Prämisse der Tumorgenetik ist, dass Tumore durch angeborene und erworbene Alterationen der DNA verursacht werden. Die molekulare Charakterisierung von Tumoren ermöglicht es, diese Alterationen zu untersuchen und den Tumor gegebenenfalls in Abhängigkeit der molekularen Signatur zu behandeln. Hierdurch kam es in den vergangenen Jahren zu einem Paradigmenwechsel in der Tumorthherapie, weg von einer unspezifischen zytotoxischen Therapie hin zu einer individuellen Therapie, basierend auf der molekularen Charakterisierung des Tumors.

Ein Ansatz, die molekulare Pathologie eines Karzinoms zu untersuchen, ist die Sequenzierung der Tumor-DNA mittels Next Generation Sequencing. Dieses Verfahren der Hochdurchsatzsequenzierung löst die Sanger Sequenzierung, die Sequenziermethode der „ersten Generation“ in vielen Anwendungsbereichen ab. Obwohl die Sequenzierung nach Sanger seit mehreren Jahrzehnten durchgeführt wurde und wird, ist sie immer auf eine kleine Anzahl von Proben und eine kleine Anzahl von Genabschnitten beschränkt. Mit dem Aufkommen von NGS können komplette Genome wesentlich zeit- und kosteneffizienter systematisch untersucht werden, wodurch eine umfassende molekulare Charakterisierung von Tumoren ermöglicht wird. Dabei ersetzt die parallele Sequenzierung relevanter Nukleinsäureabschnitte die Anwendung von zeitintensiver Stufendiagnostik.

Sowohl mit der Sanger Sequenzierung als auch mit NGS können Punktmutationen, Insertionen, Deletionen oder Amplifikationen detektiert werden. Allerdings sind NGS-Methoden durch eine höhere Sensitivität gekennzeichnet. Je nach Sequenziertiefe des untersuchten Nukleinsäureabschnitts wird eine Sensitivität im niedrigen einstelligen Prozentbereich ermöglicht (2-5%), sodass auch Allele mit einer niedrigen Allelfrequenz sicher detektiert werden können. Dadurch können auch Alterationen bei Proben mit niedrigem Tumorzellanteil oder geringer Probenmenge, wie beispielsweise Biopsien, detektiert werden. Mit der Sanger Sequenzierung ist hingegen die Detektion von Alterationen erst ab Allelfrequenzen von etwa 20% möglich [1]. Die Möglichkeit der Detektion von Alterationen mit sehr niedrigen Allelfrequenzen wirft aber auch die Frage nach der klinischen Relevanz dieser Alterationen im niedrigen Frequenzbereich auf. Während besonders für hämatologische Neoplasien die Bedeutung von Alterationen niedriger Allelfrequenz besser bekannt ist [2], ist für solide Tumoren in einigen Fällen noch unklar, inwieweit eine genetische Veränderung mit der klinischen Präsentation im Zusammenhang steht. Hierfür bedarf es der Korrelation von Sequenzierdaten mit dem klinischen Outcome der Patienten in groß angelegten Studien [3].

1.1.2 Verschiedene Arten des NGS

Je nach Anwendungsgebiet und Intention kann die Größe der sequenzierten Bereiche stark variieren. Einerseits besteht die Option der Panel-Sequenzierung. Ein NGS-Panel besteht aus einer definierten Auswahl an Genen, deren Nukleinsäureabschnitte mithilfe der entsprechenden Primer vervielfältigt und sequenziert werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit die Gesamtheit aller Exone beziehungsweise das gesamte Genom zu sequenzieren. Hierbei spricht man von Exom-Sequenzierung (Whole-Exome-Sequencing, kurz: WES) bzw. der Gesamt-Genom-Sequenzierung (Whole-Genome-Sequencing, kurz: WGS).

Die Alterationen des Genoms einer Tumorzelle sind nicht gleichmäßig verteilt. Einige Gene sind aufgrund positiver Selektion in der Karzinogenese häufiger betroffen als andere und entscheidend für die Tumorentstehung, man spricht von cancer driver genes bzw. Treibergenen [3]. Dabei handelt es sich häufig um Onkogene oder Tumorsuppressorgene. Es ist zudem bekannt, dass einige Genabschnitte häufiger von Alterationen betroffen sind als andere [4]. Diese Regionen werden als Hotspot-Bereiche bezeichnet. Das Wissen über Driver Gene und Hotspots ermöglicht es, die Sequenzierung auf diese Genabschnitte zu beschränken. Bei Panels dieser Art spricht man von targeted-NGS-Panels (kurz: tNGS-Panel). In der Onkologie sind die tNGS-Panels gegenwärtig die am häufigsten verwendete Methode, da sie aufgrund der geringeren Größe kostengünstiger sind, schnellere Laufzeiten ermöglichen und gegenüber umfangreicheren Panels eine höhere Coverage zulassen [5]. So empfiehlt die European Society for Medical Oncology (ESMO) ausdrücklich, die Anwendung von tNGS-Panels im Rahmen von molekularen Screening-Programmen, um die klinische Forschung voranzutreiben und die Entwicklung neuer Therapien zu gewährleisten [6]. Bei gleicher Sequenzierleistung kann mit kleineren Panels eine deutlich höhere Abdeckung relevanter Bereiche erreicht werden, wodurch insbesondere Alterationen niedrigerer Allelfrequenz sicherer beurteilt werden können. Darüber hinaus vereinfacht die Fokussierung auf klinisch relevante Gene die bioinformatische Auswertung. Viele der Treibergene sind tumorübergreifend relevant. Allerdings variiert die Mutationshäufigkeit der Gene und auch die Lokalisation der Hotspots je nach Tumorentität. Demzufolge sind spezifische tNGS-Panel für die jeweilige Tumorentität notwendig, um die Gesamtheit der relevanten Gene abzudecken.

Die Idee eines tumorspezifischen NGS-Panels ist nicht neu, so existieren bereits für andere Entitäten kommerzielle Panel, wie beispielsweise das Ion AmpliSeq™ Comprehensive Ovarian Cancer Research Panel für das Ovarialkarzinom. Die parallele Sequenzierung von bestimmten tumorrelevanten Genen mittels des NGS als Tool für Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung ist beispielsweise für das Lungenkarzinom bereits in den Leitlinien zu finden [7].

Den tNGS-Panels gegenüber stehen die Exom-Sequenzierung (Whole-Exome-Sequencing, WES) und die Gesamt-Genom-Sequenzierung (Whole-Genome-Sequencing). Die

Sequenzierdaten bei dieser Art der Sequenzierung sind umfangreicher und vollständiger, es werden auch Alterationen erfasst, die außerhalb von bekannten Hotspot-Bereichen liegen. Dies ist besonders für monogene und seltene Erkrankungen von Vorteil [8]. Allerdings sind hierfür sehr leistungsstarke und kostenintensive Sequenziergeräte erforderlich, die nur an größeren Standorten verfügbar und daher nicht im dezentralisierten Setting anwendbar sind. Hinzu kommt, dass der therapeutische und ökonomische Nutzen des WES gegenüber dem tNGS in im klinischen Alltag der Onkologie noch nicht vollständig geklärt ist [9].

1.1.3 Untersuchung erworbener Resistenzmechanismen durch NGS

Die molekularen Charakteristika sind dynamisch. So unterliegen Tumore zusätzlicher Mutationen im Verlauf, welche die bereits erwähnte inter- und intratumorale Heterogenität zwischen Primarius und Metastase oder Rezidiv bedingen [10, 11]. Die Kenntnis der Veränderungen auf molekularer Ebene, die einer Therapieresistenz zugrunde liegen, erlaubt ein gezieltes Eingreifen und Anpassen der Therapie. Diese Mechanismen werden durch folgendes Beispiel veranschaulicht: Bei Patienten, die ein Malignes Melanom mit der BRAF-V600-Mutation aufweisen, wird der BRAF-Inhibitor Dabrafenib eingesetzt [12]. Hierdurch kommt es zur Inhibition des deregulierten MAPK-Signalwegs und führt damit zur Einschränkung des Tumorwachstums. Dadurch kommt es häufig zur Therapieresistenzen, die mit Mutationen in MEK Genen und anderen Genen des MAPK-Signalwegs in Verbindung gebracht werden, siehe Abbildung 1 [13]. Dies führte zur Kombination von Dabrafenib mit dem MEK-Inhibitor Trametinib, welche sich der alleinigen Therapie mit Dabrafenib überlegen zeigte [14].

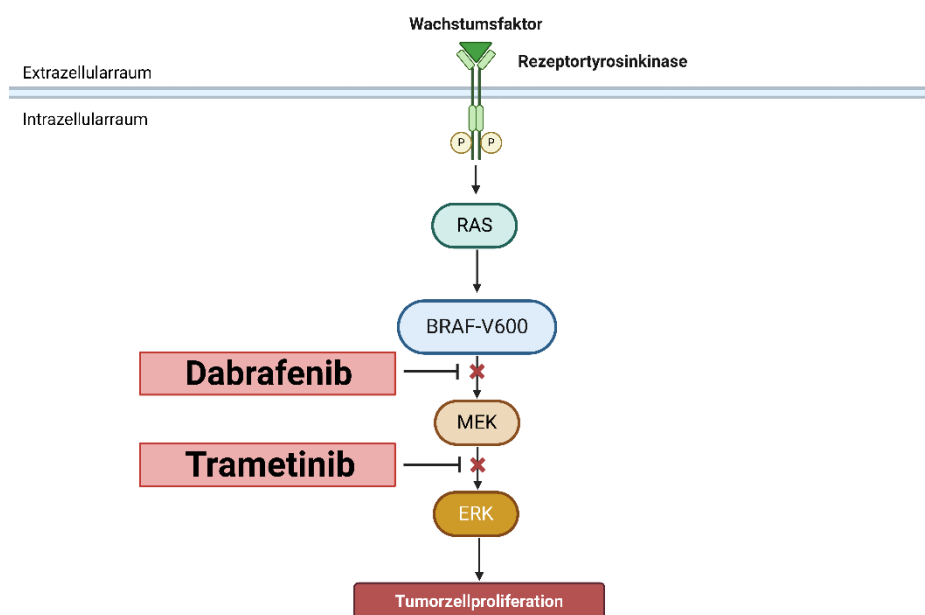


Abbildung 1: MAPK-Signalweg und Einsatz von zielgerichteter Krebstherapie beim Malignen Melanom

Durch Kombination Des BRAF-Inhibitors Dabrafenib und dem MEK-Inhibitor Trametinib werden Resistenzmechanismen aufgehoben. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Allerdings befindet sich diese Studie noch in Phase 1 (Trial: NCT03022409). Das angeführte Beispiel zeigt, dass die Kombination von zielgerichteter Therapien, deren Ansprechraten in Zukunft weiter verbessern könnte. Für eine kombinierte Anwendung bei koexistierenden Mutationen, ist jedoch die Kenntnis über die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen notwendig. Diese lassen sich mithilfe des NGS erfassen.

Daher bedarf es mehrerer Sequenzierläufe im Verlauf der Erkrankung, um mithilfe des Vergleichs der Mutationsprofile von Primarius und Rezidiv neue Resistenzmechanismen aufzudecken oder Alterationen nachzuweisen, für die ein bekannter Zusammenhang mit Therapieresistenz besteht. Insbesondere bei Patienten, die nach anfänglichem Ansprechen ein Progress aufweisen oder bei Patienten, die ein Tumorrezidiv erleiden, kann durch erneute Sequenzierung auf Resistenzmechanismen geschlossen werden. Durch Kenntnis dieser Resistenzmechanismen, denen im Idealfall eine Alteration in einem actionable Target zugrunde liegt, lässt sich so die weitere Therapie anpassen und optimieren. Obwohl daher gematchte Proben aus Primarius und Rezidiv ausgewertet werden sollten, um die Aussagekraft der Sequenzierdaten zu maximieren, gibt es bislang nur wenige Datensätze dieser Art für die einzelnen Tumorentitäten.

1.2 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)

1.2.1 Ätiologie

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC) gehören zu den Kopf-Hals-Tumoren und machen etwa 90% der Tumore dieser Entität aus. Kopf-Hals-Tumore stellen eine heterogene Gruppe an bösartigen Tumoren dar, die in Mundhöhle, Pharynx und Larynx auftreten [15]. Sie sind die sechsthäufigste Tumorentität weltweit [16], und gehören zu den zehn häufigsten Tumorentitäten in Deutschland [17]. Die Inzidenz lag im Jahr 2016 bei etwa 17 000 Neuerkrankungen, davon waren über 70 % Männer [18]. Die Inzidenz zeigt regionale Unterschiede, in Mecklenburg Vorpommern lag sie über dem Bundesdurchschnitt, für Männer sogar deutschlandweit am höchsten [18].

Die Hauptrisikofaktoren sind Rauchen, Alkoholkonsum und die chronische Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) [19, 20]. HPV-Infektionen spielen insbesondere für die Pathogenese von Plattenepithelkarzinomen im Bereich des Oropharynx eine wichtige Rolle [17]. Dabei weisen HPV-positive Tumore gegenüber HPV-negativen HNSCC ein distinktes molekulares Aberrationsprofil auf [21], zeigen eine höhere Radiosensitivität und ein besseres Gesamtüberleben [22].

1.2.2 Therapie

In der derzeitigen Behandlung von soliden Tumoren gewinnen personalisierte Therapien zunehmend an Bedeutung. So konnte in den letzten 20 Jahren durch den Einsatz von zielgerichteter Krebstherapie (englisch: targeted therapy) und Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren in vielen Tumorentitäten eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielt werden [23–25]. Zielgerichtete Therapien greifen auf molekularer Ebene zielgenau in die Signaltransduktion aberrant regulierter Signalwege ein und hemmen so das Tumorwachstum, ohne gesunde Zellen direkt zu schaden. Dies geschieht meist durch Inhibition sog. Schlüssel-Kinasen oder durch Bindung an deren Liganden [26]. So wird beispielsweise seit einigen Jahren der VEGF-Antikörper Bevacizumab in Kombination mit Paclitaxel in der Erstlinientherapie beim metastasierten Mammakarzinom eingesetzt [27]. Aktuell (Stand 09/2024) ist in der Behandlung von HNSCC aus dem Bereich der zielgerichteten Therapien lediglich der EGFR-Antikörper Cetuximab zugelassen [28]. In der rezidierten oder metastasierten Situation werden für Cetuximab als Monotherapie Ansprechraten von nur 10-15% verzeichnet [29]. Immuncheckpoint-Inhibitoren binden als Antikörper spezifisch an CTLA-4 oder an den PD-1-Rezeptor beziehungsweise dessen Liganden PD-L1. Durch Blockade dieser inhibitorischen Checkpoints kommt es zu einer verringerten Proliferationshemmung der T-Zellen durch die Tumorzellen und die antitumorale Immunantwort wird wieder reaktiviert [30]. Für die Behandlung von HNSCC ist der PD-1-Antikörper Nivolumab zugelassen bei Progress während oder nach einer platin-basierten Chemotherapie [31]. Auf Basis der Keynote-048 Studie wurde kürzlich der

PD-1-Antikörper Pembrolizumab in der palliativen Erstlinientherapie von HNSCC zugelassen [24].

Im Allgemeinen umfasst die derzeitige Therapie des HNSCC Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie. Wird ein kurativer Ansatz verfolgt, erfolgt bei resektablem Tumor eine Operation mit adjuvanter Radiochemotherapie je nach postoperativem histologischen Stadium. Ist der Tumor nicht resektabel, wird eine definitive Radiochemotherapie durchgeführt [28]. Seit 2020 soll gemäß der S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms im palliativen Setting zunächst der PD-L1-Status mittels des CPS-Score bestimmt werden [28]. Ist der PD-L1-Status positiv ($\text{CPS} > 1$), erfolgt die Behandlung mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie (Cisplatin und 5-FU). Ist der PD-L1-Status negativ, soll eine Chemotherapie nach dem TPExtreme-Schema erfolgen. Dieses Schema stellt eine Modifizierung des Extreme-Schemas dar und besteht aus der Kombination von EGFR-Antikörper Cetuximab, Cisplatin und Docetaxel [28, 32].

1.2.3 Prognose

Die Prognose der Patienten mit HNSCC ist mit einer 5 Jahres Überlebensrate von etwa 50% schlecht [22]. Rund die Hälfte der Patienten erleidet ein Rezidiv [33]. Die Überlebenszeit für Patienten in der rezidierten bzw. metastasierten Situation beträgt etwa i.d.R. 6-10 Monate [34]. Die einzige bisher zugelassene zielgerichtete Therapie mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab kann in vielen Fällen die Entwicklung von Resistenzen nicht verhindern, die Ansprechraten in der rezidierten/metastasierten Situation liegen bei 10-15% [29], [35, 36]. Auch das Ansprechen auf die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ist nicht einheitlich und schwer vorherzusagen. Weniger als 20% der Patienten, die mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt werden, zeigen ein dauerhaftes Ansprechen [37]. Dies weist darauf hin; dass PD-L1 als alleiniger Marker wenig aussagekräftig ist, um das Therapieansprechen vorherzusagen. Einer der wesentlichen Gründe für das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapien ist die hohe molekulare intra- und intertumorale Heterogenität bei HNSCC [11, 21]. Die mit den aktuell angewandten Therapien erzielten Ansprechraten zeigen, dass es einer aussagekräftigeren Stratifizierung der Patienten bedarf, um diese Heterogenität besser abzubilden.

Daher sollten neben klassisch morphologischen Analysen auch umfangreiche Untersuchungen zur molekularen Pathologie erfolgen, um eine möglichst präzise Charakterisierung des Tumors vorzunehmen. Durch Identifizierung spezifischer molekulare Subtypen können Patienten identifiziert werden, die von einer Deeskalation bzw. Eskalation der Therapie profitieren. Hierdurch kann eine bessere Therapieauswahl gewährleistet werden. Zudem wird die Anwendung neuer zielgerichteter Therapien, über den EGFR-Antikörper Cetuximab hinaus, ermöglicht.

1.3 NGS bei HNSCC

Für HNSCC gibt es zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit (Stand 09/2024) kein umfassendes, spezifisches kommerziell erhältliches tNGS-Panel. Dennoch ist die Relevanz der molekularen Diagnostik für HNSCC in der Literatur mehrfach belegt. So wurde in einigen Studien das mit HNSCC assoziierte molekulare Mutationsprofil untersucht und charakteristische Mutationen identifiziert [21, 33, 38]. Die Gene mit der höchsten Mutationsfrequenz bei HNSCC sind unter anderem TP53, TTN, FAT1, CDKN2A, NOTCH1 und KMT2D [21, 38–41]. Ein Großteil der bisherigen Studien wurde retrospektiv durchgeführt. Nur wenige Studien berücksichtigen den klinischen Verlauf. Es wurde beispielsweise in HPV-negativem HNSCC gezeigt, dass trunkierende TP53 Mutationen mit einer schlechteren Prognose [42] und FAT1 Mutationen mit einer besseren Prognose assoziiert sind [43]. Zusätzlich wurden einige Gene als Biomarker identifiziert, die sog. actionable targets für zielgerichtete Therapien darstellen. Zu diesen zählen u.a. PIK3CA, CDKN2A und BRCA2 [25]. So wird beispielsweise der PI3K-Inhibitor Alpelisib bei Subgruppen von Patienten mit fortgeschrittenem Mammakarzinom mit PIK3CA-Mutation eingesetzt, eine Verlängerung des Progressionsfreien Überlebens konnte hier erreicht werden [44]. Für HNSCC wird derzeit Buparlisib, ein oral verfügbarer PI3K-Inhibitor getestet. Phase-II-Daten legen eine gute Wirksamkeit besonders bei HPV negativen HNSCC nahe [45]. Aktuell läuft mit der BURAN-Studie eine Phase-III-Studie, deren Ergebnisse mit Spannung erwartet werden (Trial: NCT04338399). Auch für die Kombination zweier zielgerichteter Therapien bei koexistierenden Mutationen wie in 1.1.3 beschrieben, wird beim HNSCC derzeit die Kombination des PARP-Inhibitors Olaparib mit einem ATR-Inhibitor untersucht [46]. Dies verdeutlicht, dass Patienten mit genomischen Aberrationen in actionable targets schon jetzt in klinische Studien mit zielgerichteter Therapie eingeschlossen und behandelt werden können. Mit der Zulassung neuer Therapien wird die Bedeutung des NGS weiter zunehmen.

Neben einzelnen molekularen Aberrationen können durch komplexere targeted-NGS-Panel (kurz: tNGS) auch molekulare Charakteristika wie die Tumormutationslast (Tumor Mutation Burden; kurz: TMB) und der Mikrosatellitenstatus bestimmt werden. Für solide Tumoren mit einer hohen Tumormutationslast wurde ein schlechteres Ansprechen auf Radiochemotherapie, allerdings ein besseres Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren gezeigt [47, 48]. Solide Tumore die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, zeigen ein besseres Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren [49, 50].

Trotz dieses Wissens ist der Nutzen einer Anwendung eines NGS-Panels zur Identifizierung genomischer Aberrationen als Biomarker für Prognose und Therapie von HNSCC im klinischen Alltag noch nicht vollständig geklärt. Geschuldet ist dies vor allem dem Mangel an komplexeren großen Datensätzen, bedingt durch das bisherige Fehlen eines einheitlichen tNGS-Panels, welches das heterogene Mutationsspektrum beim HNSCC abbildet. Eine

Anwendung eines tNGS-Panels in der konventionellen Diagnostik von HNSCC Patienten findet daher bisher nicht statt. Die Implementierung eines HNSCC-spezifischen Panels könnte weitere Hinweise über dessen Nutzen liefern und eine flächendeckende Anwendung ermöglichen. Eine Korrelation der erhobenen Sequenzierdaten mit dem klinischen Outcome ist dabei notwendig, um den Informationsgewinn und den klinischen Nutzen des NGS bei HNSCC in Zukunft zu optimieren.

II. Zielstellung

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Untersuchung der Durchführbarkeit einer DNA-Sequenzierung an FFPE-Material bei HNSCC-Patienten mit einem spezifischen und komplexen tNGS-Panel. Die Machbarkeit eines solchen Panels soll insbesondere im Hinblick auf eine Anwendung für Routinediagnostik und Forschung untersucht werden. Für diese Untersuchung werden vier Teilziele definiert:

Zunächst soll aus der Kopf-Hals-Tumor-Datenbank der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin des Zentrums für Innere Medizin III der Universitätsmedizin Rostock eine Pilotkohorte definiert werden.

Dann soll untersucht werden, inwieweit die DNA der Pilotkohorte, welche aus asserviertem FFPE-Probenmaterial isoliert wurde, für konventionelle NGS-Analysen geeignet ist. Hierzu soll eine Sequenzierung mit dem bereits etablierten und in der diagnostischen Routine angewandten Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 durchgeführt und hinsichtlich der Sequenzierungsqualität ausgewertet werden.

Zum anderen soll ein geeignetes tNGS-Panel definiert werden, um eine spezifischere und komplexe NGS-Analyse bei HNSCC-Patienten durchzuführen. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit kein umfassendes Panel für HNSCC kommerziell erhältlich war (Stand 09/2024), soll ein bedarfsgerechtes Custom-tNGS-Panel designet werden. Hierfür soll eine Auswahl an Genen getroffen werden, welche die häufigsten und wichtigsten molekularen Alterationen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich beinhaltet. Das Custom-Panel soll dann hinsichtlich Rentabilität, Leistung und Durchführbarkeit mit kommerziellen tNGS-Genpanels verglichen werden, um ein möglichst geeignetes Panel zur Identifikation prognostischer und therapierelevanter Biomarker in HNSCC auszuwählen.

Mit dem ausgewählten Panel soll dann eine NGS-Analyse an einer Pilotkohorte aus oben genannter Kopf-Hals-Tumor-Datenbank erfolgen, um die Durchführbarkeit einer komplexen NGS-Analyse an FFPE-Material zu untersuchen und die Sequenzierdaten mit den klinischen Charakteristika zu korrelieren. Die Pilotkohorte soll dabei Patienten umfassen, die mit einem palliativen Ansatz behandelt wurden und im Verlauf der Erkrankung ein Rezidiv aufwiesen. Dabei soll von jedem Patienten DNA-Material vom ersten Tumornachweis (Primarius-Probe) und vom letzten verfügbaren Tumornachweis (Rezidiv-Probe) sequenziert werden, um Veränderungen im molekularen Mutationsprofil im Krankheitsverlauf erfassen zu können und etwaige erworbene Resistenzmechanismen aufzudecken.

Kurzgefasst ergeben sich demzufolge die folgenden Ziele:

1. Definierung einer Pilotkohorte von HNSCC-Patienten, die an der Universitätsmedizin Rostock behandelt wurden.
2. Überprüfung, ob die aus altem, asserviertem FFPE-Material isolierte DNA der Patienten der Pilotkohorte prinzipiell für eine NGS-Analyse geeignet ist. Dies soll durch eine Sequenzierung mit einem etablierten und in der Routinediagnostik angewandten Panel erfolgen.
3. Identifizierung eines komplexen NGS-Panels für HNSCC. Hierfür soll ein spezifisches und bedarfsgerechtes tNGS-Panels designt und mit kommerziellen Panels verglichen werden.
4. Sequenzierung der DNA der Pilotkohorte mit dem komplexen Panel und Korrelation mit den klinischen Daten zur Evaluation des Panels hinsichtlich der Eignung zur Identifikation prognostischer und therapeutisch relevanter Biomarker in Routinediagnostik und Forschung des HNSCC.

III. Material und Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 1: Geräte

Gerätebezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Pipettensatz (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl, 2.5 µl)		Eppendorf AG
Pipetten Rainin, Pipet Lite		Mettler Toledo
Centrifuge 5418R	5401000010	Eppendorf AG
Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	552031	Biozym
ProFlex™ 3 x 32-well PCR System	4484073	Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Qubit™ Fluorometer 2.0	Q32866	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.
IKA® Vortex 1	0004047700	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
DynaMag™-2 Magnet	12321D	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	4453534	Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion OneTouch™ 2 System	4474779	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion Chip™ Minifuge	4479673	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion Chef™ Instrument	4484177	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) System	4462921	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion GeneStudio™ S5 Plus System		Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Reinstwasseranlage ELGA Pro Flex3		Veolia

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Artikelnummer	Hersteller
Qubit™ Assay Tubes	Q32856	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
DNA LoBind® Tubes, 1.5 ml	0030108051	Eppendorf AG
PCR Tubes, 0.2 ml	0030124332	Eppendorf AG
MicroAmp™ Clear Adhesive Film		Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc.
MicroAmp™ Optical Film Compression Pad		Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc.
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte		Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc.
SafeSeal SurPhob Spitzen, verschiedene Größen		Biozym Scientific GmbH

Tabelle 3: Kits und Reagenzien

Kits und Reagenzien	Artikelnummer	Hersteller
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		Qiagen
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Q32854	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Agencourt AMPure XP beads	A63880	Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit	4471250	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
IonCode™ Barcode Adapters	A29751	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2	4475346	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	4480441	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion Library TaqMan™	4468802	Ion Torrent™

Quantitation Kit		Thermo Fisher Scientific Inc.
Oncomine™ Comprehensive Assay Plus, automated library preparation	A49667	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Oncomine™ Comprehensive Assay Plus, manual library preparation	A48577	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit	A27739	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion PGM™ Enrichment Beads	4478525	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit	A25592	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion PGM™ Hi-Q™ Chef Kit	A25948	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion PGM™ Hi-Q™ View Chef 400 Kit	A30798	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8	A29024	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion 550™ Kit – Chef	A34541	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion 318™ Chip Kit v2 BC	4488150	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion 316™ Chip Kit v2 BC	4488149	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Ion 550™ Chip Kit	A34537	
Ion PGM™ Wash 2 Bottle Kit	A25591	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Agencourt™ AMPure™ XP Kit	NC9959336	Beckman Coulter
Nuklease-freies-Wasser	AM9932	Ion Torrent™ Thermo Fisher Scientific Inc.
Natriumhydroxid 10 mol/l	SIAL72068-100ML	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Software

Software	Version	Hersteller
Ion Reporter™ Software	5.18	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Integrative Genomics Viewer (IGV)	2.10.2	University of California San Diego and the Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology (MIT) and Harvard (USA)
QuantStudio Software for ViiA™ 7 Real-Time PCR System	1.2.4	Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Ion Ampliseq Designer	7.4.6	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Zunächst wurden 24 Patienten aus der Kopf-Hals-Tumor-Datenbank als Pilotkohorte definiert. Für jeden Patienten wurden jeweils die Gewebeproben des Tumors bei Erstdiagnose (Primarius-Probe) sowie der letzte verfügbare Tumornachweis (Rezidiv-Probe) ausgewählt. Daraufhin wurde aus den, in FFPE-Material asservierten Gewebeproben, die DNA isoliert. Zunächst musste überprüft werden, ob die isolierte DNA grundsätzlich für eine Hochdurchsatzanalyse mittels NGS geeignet ist. Hierfür wurden 19 der Proben mit dem im Hämatologischen Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock routinemäßig angewandten Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 sequenziert und hinsichtlich der Qualität der Sequenzierdaten ausgewertet. Parallel wurde spezifisch für HNSCC ein Custom-tNGS-Panel designet und mit komplexen kommerziellen Panels verglichen, um ein möglichst geeignetes Panel auszuwählen. Das ausgewählte Panel wurde etabliert und daraufhin eine Sequenzierung der ausgewählten Proben durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden dann ausgewertet, analysiert in klinischen Gruppen gegenübergestellt.

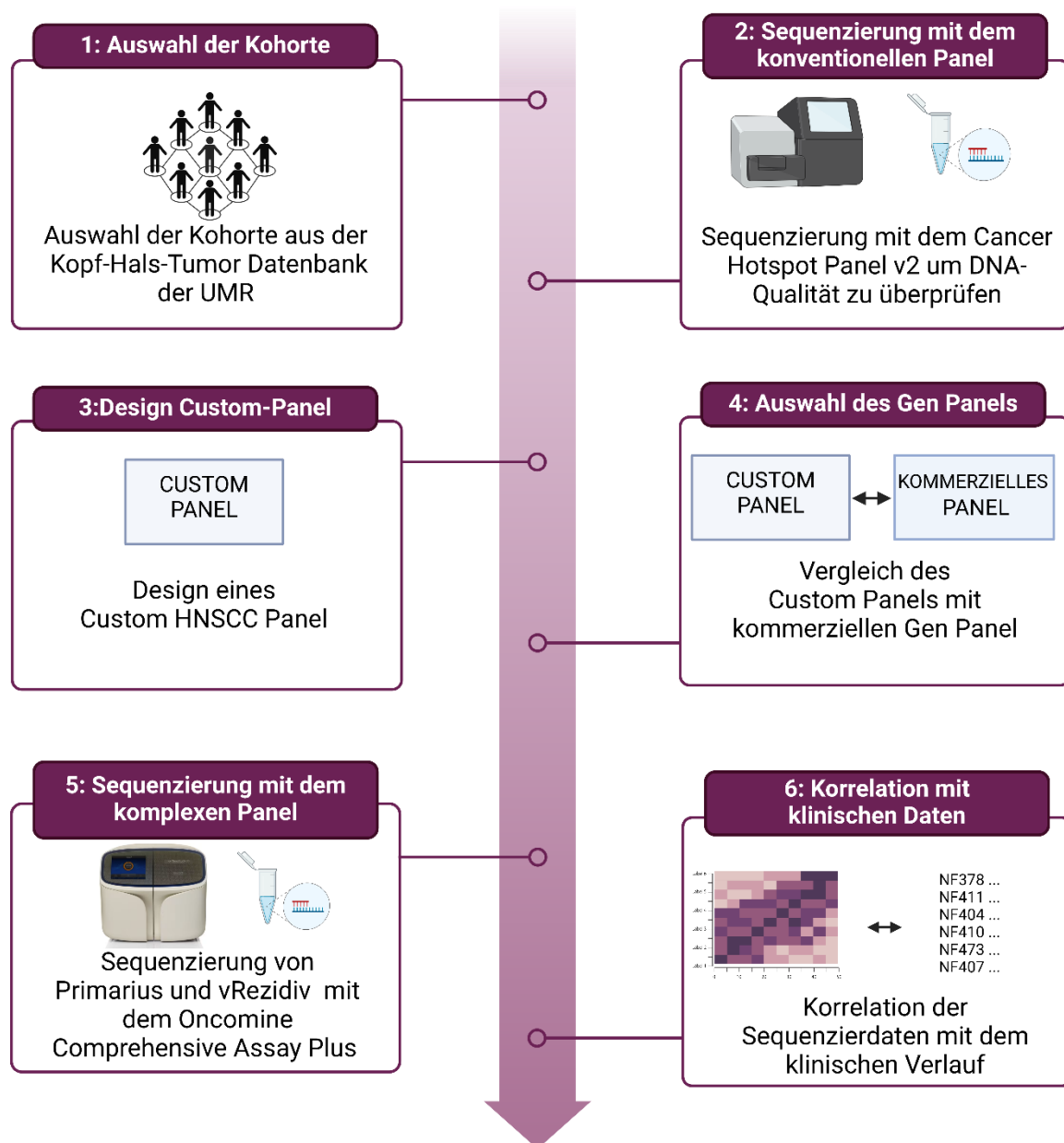


Abbildung 2: Studiendesign

Abbildung erstellt mit Biorender.com [51]. Modifiziert mit Grafik des Ion GeneStudio™ S5 Plus System von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/A38194>, abgerufen am 18.11.2023

3.2.2 Auswahl der Pilotkohorte

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde seit 2010 eine zentrale Datenbank aufgebaut, die alle in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin des Zentrums für Inneren Medizin der Universitätsmedizin Rostock stationär oder ambulant betreuten Kopf-Hals-Tumor Patienten der Jahre 2010-2020 (n=259) umfasst. Jeder Patient erhielt bei Datenbankeinschluss eine Patientennummer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus der Datenbank die Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (HNSCC) ausgewählt, die mindestens ein Rezidiv im Rahmen der Erkrankung aufwiesen und mit einem palliativen Ansatz behandelt wurden. Außerdem mussten mindestens zwei Gewebeproben, die im Rahmen der Erkrankung zeitlich getrennt

voneinander entnommen wurden, vorhanden sein. Diese Proben waren als Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler) archiviert. Die Verwendung der Tumopräparate ist durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock als ethisch unbedenklich eingestuft worden (Registriernummer: A 2020-0227).

3.2.3 Auswahl des komplexen Panels

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit war kein umfassendes, komplexes tNGS-Panel, welches für die Sequenzierung der DNA von Patienten mit HNSCC konzipiert wurde, kommerziell erhältlich (Stand 09/2024). Deshalb wurde ein Custom Panel erstellt und dieses mit den kommerziellen Panels verglichen, um herauszufinden, welches Panel für die Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit am besten geeignet ist.

3.2.3.1 Design eines Custom tNGS-Panels für HNSCC

Das Custom Panel wurde mithilfe des Ion Ampliseq Designers [52] erstellt. Mit dieser Webanwendung, lassen sich die Primer für eine NGS-Analyse mit der Ion Torrent Plattform generieren und bestellen. Nach erfolgtem Panel Design liefert der Ion Ampliseq Designer Informationen zur Panelgröße (in Megabasen; Mb), zur Größe der Amplikons (in Basenpaaren; bp) zu der zur erwartenden Coverage und dem Preis des Panels.

Für die Auswahl an Genen, die durch das Custom Panel abgedeckt werden sollen, wurde zunächst eine Literatursuche durchgeführt. Die erste Genauswahl erfolgte dabei nach drei Kriterien: Es wurden zum einen die Gene ausgewählt, die in HNSCC häufig Mutationen aufweisen. Zum anderen wurden Gene ausgewählt, die für die Therapieentscheidung mit Target- und Immuntherapien relevant sind. Zudem wurden Gene aus Panels ausgewählt, die im Rahmen anderer Arbeiten für eine Sequenzierung von HNSCC verwendet wurden [16, 47].

Die Auswahl der am häufigsten mutierten Gene in HNSCC stützte sich auf dem cBioPortal [53]. Das cBioPortal ist eine Webanwendung, welche die genomischen Datensätze von publizierten Studien zusammenfasst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle HNSCC Datensätze, die im cBioPortal verfügbar waren, zusammengefasst und die Gene nach Mutationshäufigkeit geordnet. Die Sequenzierdaten dieser Datensätze wurden mittels Whole Exome Sequencing bzw. Whole Genome Sequencing erhoben. Bei sich überschneidenden Datensätzen wurde nur einer der Datensätze ausgewählt. Die zusammengefassten Daten konnten als txt.-Datei heruntergeladen werden.

Die Auswahl der relevanten Gene für die Therapieentscheidung bestand aus Genen, die das Therapieansprechen für die Therapie mit PD-1-Inhibitoren prädiktieren und Genen, die im Falle einer Alteration als mögliches Ziel für eine zielgerichtete Krebstherapie gelten (actionable genes).

Im ersten und zweiten Design wurde die komplette kodierende Sequenz (CDS) abgedeckt. Im dritten Design erfolgte eine Reduzierung der Panelgröße unter anderem dadurch, dass für Gene, bei denen sich die Mutationen vor Allem auf bestimmte Bereiche (sog. Hotspots) konzentrieren, nur diese Hotspot-Bereiche im Design abgedeckt wurden: Für Gene, die ebenfalls mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 erfasst werden, wurde die Hotspot-Bereiche des Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 übernommen. Für die anderen Gene wurden diese Bereiche einzeln, mithilfe der Webanwendung COSMIC-Datenbank v92 [54] herausgesucht. Diese Datenbank gibt unter anderem für einzelne Gene die Mutationshäufigkeit für jede Aminosäure-Position entlang des Gens an. So konnten Hotspot-Bereiche definiert werden, die besonders häufig Mutationen aufweisen. Da die Bereiche in der COSMIC-Datenbank nur durch Aminosäure-Positionen im Referenzgenom hg38 angegeben sind, wurden diese mittels der Software Integrative Genomics Viewer (IGV) Version 2.10.2 [55] in genomische Koordinaten im Referenzgenom hg19 übersetzt. Die Hotspot-Bereiche wurden dann als BED-Datei gespeichert. Da diese Bereiche auch Introns enthielten, wurden die Exon-Bereiche durch den Abgleich mit BED-Dateien, die nur die genomischen Koordinaten für die CDS der betreffenden Gene enthielten, extrahiert. Die erhaltenen Dateien wurden als CSV-Datei zusammengeführt und in den Ion AmpliSeq Designer [52] hochgeladen.

3.2.3.2 Vergleich Custom NGS-Panel mit kommerziellen Panels

Bei der Auswahl eines adäquaten Gen Panels spielten folgende Kriterien eine Rolle: Abdeckung des Mutationsspektrums der Kopf-Hals-Tumoren, Erfassung molekularbiologische Marker bezüglich Prognose und Therapie der Kopf-Hals-Tumoren (z.B.: TMB, MSI) und finanzielle sowie standortbezogene Durchführbarkeit. Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Custom Panel wurde mit den kommerziell erhältlichen Oncomine™ Comprehensive Assay Plus und dem Oncomine™ Comprehensive Assay v3 im Hinblick auf die genannten Kriterien verglichen.

3.2.4 Sequenzierung

Für eine NGS-Analyse sind mehrere Arbeitsschritte notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenzierung mit zwei verschiedenen Panels durchgeführt, einem konventionellen Panel zum Überprüfen der DNA-Qualität (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2) und einem komplexen Panel zur Detektion molekularer Aberrationen in der Pilotkohorte (Oncomine™ Comprehensive Assay Plus). Die Arbeitsschritte überschneiden sich teilweise und sind daher im Folgenden zusammen dargestellt. Ein Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte und die Unterschiede gibt Abbildung 3.

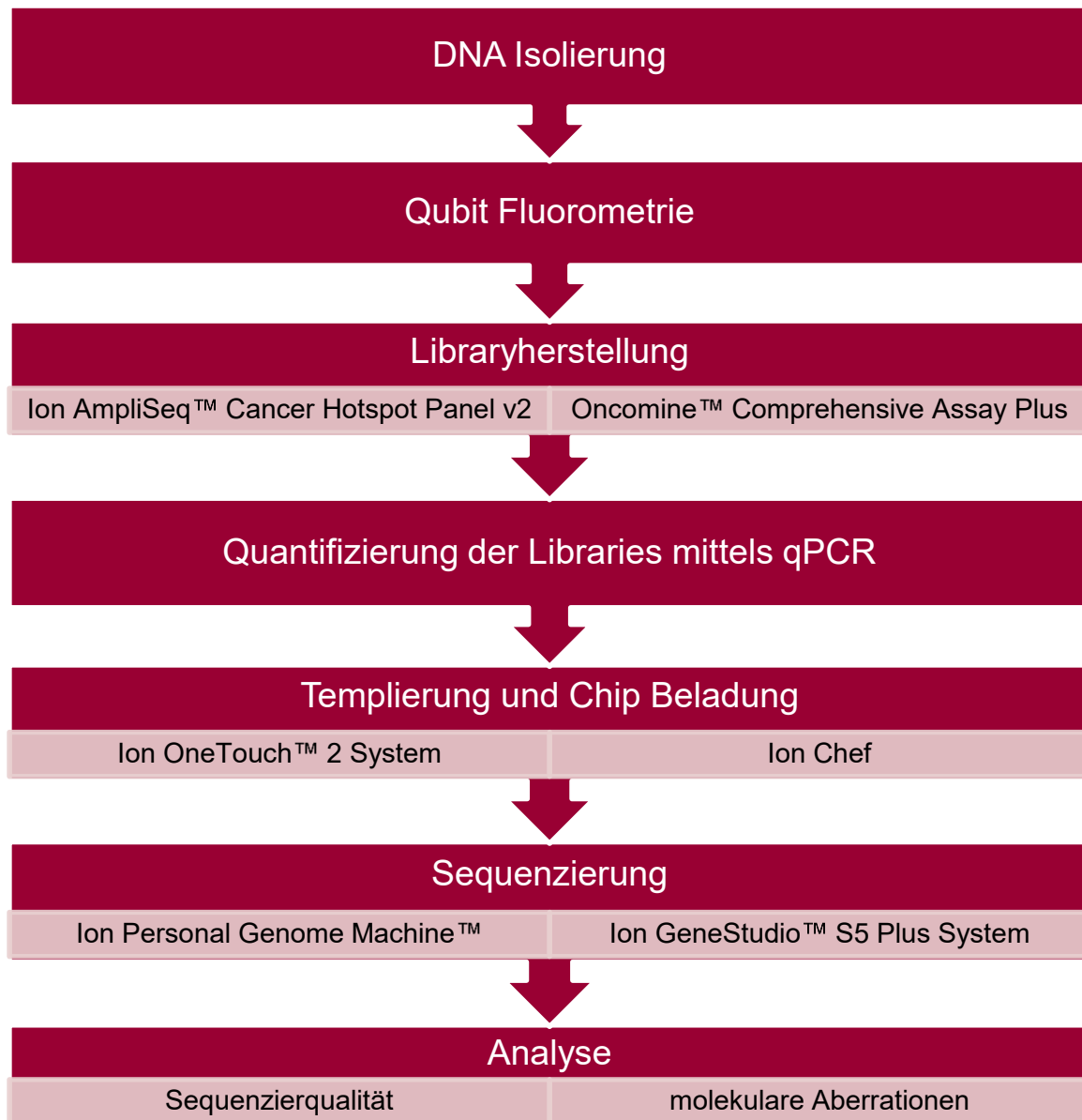


Abbildung 3: Überblick Methoden

Links: Arbeitsschritte für Sequenzierung zur Überprüfung der DNA-Qualität; Rechts: Arbeitsschritte für Sequenzierung zur Detektion molekularer Aberrationen

3.2.4.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus FFPE-Gewebe und wurde durch das Institut für Pathologie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler) unter Verwendung des QIAmp DNA FFPE Tissue Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

3.2.4.2 Qubit Fluorometrie

Für das NGS ist eine genaue Quantifizierung des Anteils an intakter doppelsträngiger DNA (dsDNA) notwendig. Hierfür wurde das Qubit™ dsDNA HS Assay Kit am Qubit™ Fluorometer 2.0 nach Herstellerangaben im Qubit dsDNA HS Assay Kits User Guide Revision B.0 [1], ein-

gesetzt. Die Methode beruht auf einer Fluoreszenzmessung: Ein im Kit enthaltener Fluoreszenzfarbstoff emittiert nur Licht einer bestimmten Wellenlänge, wenn er an dsDNA gebunden vorliegt. Zunächst wurde mittels *E. coli*-DNA bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt. Diese diente als Referenz für die dann erfolgende Konzentrationsbestimmung. Die Proben wurden durch Verdünnung mit Nuklease-freiem-Wasser für das Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 auf eine Konzentration von 2ng DNA/μl und für das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus Panel auf 5ng DNA/μl eingestellt.

3.2.4.3 Libraryherstellung mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2

Um die DNA-Sequenz der Proben auszulesen, wird durch eine PCR zunächst eine Bibliothek an Amplikons hergestellt. Diese Amplikon-Bibliothek wird im Folgenden als Library bezeichnet. Die Libraryherstellung wurde nach Angaben des Herstellers im Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 User Guide Revision F.0 (Seite 20-31) [2] durchgeführt. Abweichend von den Herstellerangaben wurden Reaktionen nicht in 96-Well-Platten, sondern in einzelnen Tubes (für PCR-Reaktionen: 0.2 ml PCR Tubes; alle anderen Reaktionen in DNA LoBind® Tubes, 1.5 ml (beide Eppendorf AG, Hamburg, Germany)), durchgeführt. Um die verschiedenen Proben zu den einzelnen Patienten zuweisen zu können, wurden bestimmte Basensequenzen zur Kennung, sog. Barcodes aus dem Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit angewandt. Für die Amplifizierungsreaktion wurden jeweils 5 μl Proben mit einer DNA-Konzentration von 2ng/μl eingesetzt, also 10 ng DNA pro Reaktion. Die Anzahl der Amplifikationszyklen wurde auf 23 Zyklen eingestellt, mit einer Anneal/Extend-Zeit von 4 Minuten. Proben, für die sich nach der ersten Libraryherstellung eine DNA-Konzentration von deutlich unter 50 pM der qPCR ergab, wurden mit 25 Zyklen wiederholt. Hierdurch konnte zumeist eine Vergrößerung der DNA-Konzentration erzielt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem DynaMag™-2 Magnet. Nach der Aufreinigung wurden die Pellets mit 30 μl anstelle von 50 μl Low-TE eluiert, da die im Low-TE enthaltenen Salze die Polymerase der Multiplex PCR inhibieren könnten.

3.2.4.4 Libraryherstellung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus können DNA und RNA Libraries hergestellt werden, im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA untersucht. Die Libraries wurden manuell und auch automatisiert hergestellt. Die FFPE Konservierung von Tumorgewebe kann zur Deaminierung von Cytosin führen, was eine C:G>T:A Veränderung zur Folge hat [56]. Um diesen Störeffekt zu minimieren, wurden zunächst alle Proben mit Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) behandelt, um die deaminierten Basen zu entfernen. Dies erfolgte nach Herstellerangaben im Oncomine™ Comprehensive Assay Plus User Guide Revision D.0 (Seiten 33-34)[56]. Zur Kennung der Proben wurden IonCode™ Barcode Adapters angewandt. Die manuelle Libraryherstellung erfolgte nach Oncomine™ Comprehensive Assay Plus User Guide Revision D.0

(Seiten 33-40) [56]. Abweichend von den Herstellerangaben wurden Reaktionen nicht in 96-Well-Platten, sondern in einzelnen Tubes (für PCR-Reaktionen: 0.2 ml PCR Tubes; alle anderen Reaktionen DNA LoBind® Tubes, 1.5 ml (beide Eppendorf AG)), durchgeführt. Die Amplifizierungsreaktion der abzudeckenden DNA-Bereiche (sog. DNA-Targets) wurde zunächst mit 10ng DNA und 15 Zyklen durchgeführt. Aufgrund von Häufung niedriger Konzentrationen der Libraries, wurde die Zyklenzahl auf 17 Zyklen erhöht, wodurch zumeist eine Vergrößerung der Konzentration erzielt werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Dyna-Mag™-2 Magnet. Nach der Aufreinigung wurden die Pellets mit 30 µl anstelle von 50 µl Low-TE eluiert.

Die Automatisierte Libraryherstellung erfolgte nach Angaben des Herstellers im Oncomine™ Comprehensive Assay Plus User Guide Revision D.0 (Seiten 19-21,24-27) [56] und Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the IonChef™ System User Guide Revision E.0 (Seiten 22-40) [57]. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Entfernung deaminierter Basen in einzelnen 0,2 ml PCR Tubes (Eppendorf AG) durchgeführt und das Reaktionsgemisch erst anschließend in die IonCode™ Barcode Adapters 96-well PCR-Platte überführt. Gemäß den Angaben des Herstellers für dieses Panel wurde für die Amplifizierungsreaktion am Ion Chef™ Instrument eine Zyklenzahl von 16 mit einer Anneal/Extension-Zeit von 16 Minuten eingestellt. Das erhaltene Produkt wies laut Hersteller eine DNA-Konzentration von etwa 100pM auf. Eine Kontrolle mittels qPCR war hierbei vom Hersteller nicht vorgesehen.

3.2.4.5 Quantifizierung der Libraries mittels qPCR

Die Quantifizierung der Libraries wurde nach Oncomine™ Comprehensive Assay Plus User Guide Revision D.0 (Seiten 41-42) [56] durchgeführt. Dabei wurde der Fast Run Mode für 96-Well Fast Platten gewählt. Zusätzlich zur 1:100 Verdünnung wurde eine 1:1000 Verdünnung angesetzt, um Pipettierfehler zu verringern. Libraries mit einer Konzentration von mindestens 50 pM wurden anschließend bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Für Proben, mit einer Library Konzentration von deutlich unter 50 pM, wurde die Libraryherstellung wiederholt. Bei erneutem Unterschreiten von 50 pM, wurde die Probe verworfen.

3.2.4.6 Planung des Sequenzierlaufes mit der Torrent Suite™ Software

Für jede Sequenzierung muss mit der Torrent Suite™ Software ein sog. „Run Plan“ erstellt werden. Ein Run Plan enthält digitale Anweisungen für das Ion Chef™ Instrument und die eigentlichen Sequenziergeräte, und ermöglicht die Kontrolle während der Templierung, Sequenzierung und der Datenanalyse. Die Erstellung des Run Plans erfolgte für die Sequenzierung mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 nach den Herstellerangaben im *Ion PGM™ Hi-Q™ Chef Kit User Guide C.0* (Seiten 19-25) [58]. Dabei wurde ausgewählt: CHP2.20131001.designed.bed als BED-Datei, Anzahl der Flows 500 und Ion Xpress™

Barcodes. Für die Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erfolgte die Erstellung des Run Plans nach den Herstellerangaben im Oncomine™ Comprehensive Assay Plus User Guide Revision D.0 (Seiten 47-55) [56]. Für die manuelle Library-Herstellung wurde als Library Kit das Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus, für die automatisierte Library-Herstellung das Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8 definiert. Dabei wurden folgende Optionen ausgewählt: OCAPlus.20210430.designed.bed. als BED-Datei, Anzahl der Flows 500 und Ion-Code Barcodes.

3.2.4.7 Templierung und Chip Beladung

Die Templierung und Beladung der Sequenzierchips wurde sowohl mit dem Ion OneTouch™ 2 System als auch automatisiert mit dem Ion Chef™ Instrument durchgeführt. Libraries, die mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 hergestellt wurden, wurden mittels einer Emulsions-PCR am Ion OneTouch™ 2 Instrument und einem anschließenden Waschschrift am Ion OneTouch™ ES templatiert. Diese Arbeitsschritte erfolgten nach Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit User Guide Revision B.0 (Seiten 15-46) [59]. Dabei wurde das Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit – 200 ausgewählt und die Libraries abweichend von den Herstellerangaben auf 180 pM verdünnt. Das erhaltene Produkt wurde im Anschluss manuell mit einer Pipette auf den Ion 316™ oder den Ion 318™ Chip geladen. Dies erfolgte nach Herstellerangaben im Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit User Guide (Seiten 31-40) [60]. Für die Libraries, die mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus hergestellt wurden, fand die Templierung und Chip Beladung automatisiert am Ion Chef™ Instrument statt. Die Libraries wurden auf 50 pM verdünnt. Das Einstellen des Geräts und die korrekte Herausnahme des Chips wurde nach Herstellerangaben im Ion 550™ Kit – Chef User Guide Revision C.0 (Seiten 26-52) [61] durchgeführt.

3.2.4.8 Sequenzierung mit der Ion Personal Genome Machine™

Die Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 Libraries, dienten zur Prüfung ob die aus den FFPE-Proben isolierte DNA grundsätzlich für Hochdurchsatzanalysen mittels NGS geeignet ist. Sie wurden mit der Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) sequenziert. Die Sequenzierung wurde nach Vorgaben der Routinediagnostik vorgenommen. Diese Schritte erfolgten nach Herstellerangaben im Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit User Guide Revision E.0 (Seiten 21-41) [60]. Zur Sequenzierung wurden Ion 316™ oder Ion 318™ Chips verwendet.

3.2.4.9 Sequenzierung mit dem Ion GeneStudio™ S5 Plus System

Die Libraries, die mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus hergestellt wurden, dienten der Detektion von Aberrationen und wurden aufgrund der Panel-Größe über das Ion GeneStudio S5 Plus System sequenziert. Die Initialisierung und Sequenzierung mit dem Ion GeneStudio™ S5 Plus System wurde nach Herstellerangaben im Ion 550™ Kit Chef User Guide

Revision C.0 (Seiten 55-61) [61] durchgeführt. Der Waschschrift erfolgte bei diesem Gerät automatisiert.

3.2.4.10 Analyse

Beim Sequenzierlauf (sog. Run) entstandene Rohdaten (sog. Reads) wurden auf dem Ion PGM™ Torrent Server gespeichert und durch die Torrent Suite™ Software zu BAM-Dateien formatiert. Ein von dieser Software erstellte Datei, der sog. „Runreport“, ermöglichte die Einsicht in die wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Proben- und Datenqualität des jeweiligen Laufs wie unter anderem die Beladung des Sequenzier-Chips, die Anzahl der zugeordneten Reads, die durchschnittliche Read Länge und das Verhältnis von klonalen zu polyklonal beladenen Spheres. In der Ion Reporter™ Software Version 5.18 wurden mithilfe von Software Plugins die Sequenzierdaten gefiltert und ausgewertet. Der Abgleich der sequenzierten DNA-Abschnitte mit einem Referenzgenom (sog. Alignment) wurde mit dem humanen Referenzgenom hg19 vorgenommen. Für das Filtern der detektierten Aberrationen wurde für das Ion Ampliseq™ Cancer Hotspot Panel v2 ein Routine-NGS-Workflow des Hämatologischen Speziallabors der Universitätsmedizin Rostock angewandt. Für das Oncomine Comprehensive Assay Plus Panel wurde der in der Software bestehende Oncomine Comprehensive Plus - w2.3 - DNA - Single Sample Workflow angewandt. Dabei wurde die Oncomine Extended 5.18v2 filter chain mit dem Oncomine Variant Annotator v3.2 plugin genutzt. Die Sequenzierdaten wurden als TSV-Dateien heruntergeladen und mithilfe von Microsoft Excel analysiert und verglichen. Um Calls zu detektieren und von Sequenzierfehlern zu unterscheiden, wurde für den Oncomine™ Comprehensive Assay Plus eine Coverage von mindestens 350 reads pro Base festgelegt. Calls mit einer Coverage von unterhalb 350X sollten dann herausgefiltert werden, wenn zudem die Allelabdeckung des aberranten Allels unterhalb von 10X lag. Der Cutoff für die Allelfrequenz des aberranten Allels (= variant allele frequency; VAF) wurde mit mindestens 20% definiert. Calls mit einer VAF < 20% wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die vom Hersteller empfohlene Grenze von 22 Millionen mapped Reads wurde unter Berücksichtigung dieser zusätzlichen Filter auf 15 Millionen mapped Reads herabgesetzt. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Arten von Varianten betrachtet:

Einzelnukleotidvarianten (engl.: single nucleotide variants; im Folgenden als SNV bezeichnet), Multinukleotidvarianten (engl.: multi nucleotide variants; im Folgenden als MNV bezeichnet), Insertionen, Deletionen und komplexe Varianten.

Um die Varianten bezüglich ihres onkogenen Effekts beurteilen zu können, wurde die OncoKB Datenbank angewandt [62]. Angaben darüber, ob eine Variante ein potenzielles Target (sog. actionable Target) für eine zielgerichtete Therapie darstellt, erfolgten gemäß Marret et al. [25], welche die Targets mithilfe der ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets) gemäß ihrer klinischen Evidenz einstufen. Die ESCAT reicht von I bis X. (Sinngemäß

bedeuten die Evidenzgrade: I=Target geeignet für Implementierung in klinischen Alltag; II=Vorteil durch zielgerichtete Therapie wahrscheinlich, jedoch zusätzliche Daten nötig; III=klinischer Nutzen in anderen Tumoren bzw.- für ähnliche Targets nachgewiesen; IV=präklinische Evidenz als potentiell Target; V=Evidenz als potentiell Co-Target; X= keine Evidenz als potentiell Target [63]).

Die vom Oncomine™ Comprehensive Assay Plus ebenfalls erfassten Ergebnisse zum Loss-of-Heterozygosity wurden separat zu den oben genannten Varianten betrachtet, es wurde keine zusätzliche Filterung vorgenommen. Loss-of-Heterozygosity beschreibt durch somatische Aberration ausgelösten Verlust eines heterozygoten Allels [64]. Loss-of-Heterozygosity kann einen Verlust der copy number zur Folge haben, der als copy number loss LOH (CNL-LOH) bezeichnet wird. Auch ein Erhalt der copy number durch Genkonversion oder Duplikation des verbliebenen Allels ist möglich und wird als copy number neutral LOH (CNN-LOH) bezeichnet. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erfasst CNL-LOH und CNN-LOH für 21 Gene, die alle Teil des HRR-Systems sind: ATM, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, NBN, PALB2, POLD1, POLE, PPP2R2A, PTEN, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L und TP53. Zusätzlich wird die sample level LOH als Maß für die genomische Instabilität erfasst. Sie gibt den genomweiten Anteil von Loss-of-Heterozygosity (sample level LOH) an. Das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erfasst zudem die Tumormutationslast (kurz: TMB) als Mutationen pro Megabase (Mutationen/Mb). Als Cut-off zur Distinktion zwischen hoher (TMB-high) und niedriger Tumormutationslast (TMB-low) wurden 10 Mutationen/Mb gewählt. Die Qualitätsparameter für die TMB wurden nach Angaben des Herstellers angewandt: War der Wert für die Deaminierung (Deamination Score) > 60 und zudem das Verhältnis von C:G>T:A Substitutionen > 25%, wurde der TMB-Wert gemäß den Herstellerangaben nicht ausgewertet. Um Defekte im DNA-Mismatch-Reparatur System zu detektieren, wurde die DNA auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht. Die Mikrosatelliteninstabilität wurde mittels eines MSI-Wertes erfasst. Als Cutoff zur Distinktion zwischen mikrosatellitenstabil (microsatellite stable; MSS) und mikrosatelliteninstabil (microsatellite instable; MSI) wurde der vom Hersteller für die Ion Reporter™ Software Version 5.18 empfohlene MSI-Wert von 25 gewählt. Die vom Oncomine™ Comprehensive Assay Plus ebenfalls erfassten Angaben zur copy number variation (CNV) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet.

IV. Ergebnisse

4.1 Klinische Charakterisierung der Pilotkohorte

Initial wurden 24 Patienten als Pilotkohorte ausgewählt. Einen Überblick über die klinischen Charakteristika liefert Tabelle 5.

Tabelle 5: Grundlegende Klinische Charakteristika der Pilotkohorte

Charakteristik		Alle Patienten (n=24)
Alter bei Erstdiagnose in Jahren (Bereich)		61 (44-84)
Geschlecht	weiblich	3
	männlich	21
Lokalisation (ICD-Code)	Mundboden (C04)	7
	Hypopharynx (C013)	4
	Tonsille (C09)	3
	Zunge (C02)	3
	Zahnfleisch (C03)	2
	Oropharynx (C10)	1
	Sonstige	4
Tabakkonsum	Ja	11
	Nein	1
	Unbekannt	12
Alkoholkonsum	Ja	9
	Nein	15
	Unbekannt	0
HPV-Status	Positiv	4
	Negativ	12
	Unbekannt	8
Tumordifferenzierung	G2	15
	G3	7
	Unbekannt	2

Der Erfassungszeitraum erstreckt sich von 2008 bis 2020, wobei die Erstdiagnose nur für drei Patienten vor 2016 gestellt wurde. Von den 24 Patienten waren 21 Männer und drei Frauen. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug 61 Jahre (Bereich von 44 bis 84 Jahren). Bei den Patienten war die häufigste Tumorlokalisierung der Mundboden (sieben Patienten, 29%), gefolgt vom Hypopharynx (vier Patienten, 17%) und der Tonsille und Zunge (jeweils drei Patienten, 12%).

Der Raucherstatus war bei 12 Patienten bekannt, davon waren elf Patienten Raucher. Bei 15 Patienten (63%) lag keine Information zum Raucherstatus vor. Insgesamt neun Patienten (38%) gaben regelmäßigen Alkoholkonsum an, während 15 Patienten (63%) einen regelmäßigen Alkoholkonsum verneinten.

Der HPV-Status war bei vier Patienten (16%) positiv und bei 12 Patienten (50%) negativ, während der Status bei acht Patienten (33%) unbekannt war. Die Tumordifferenzierung war bei 15 Patienten (63%) als G2 (mäßig differenziert) und bei sieben Patienten (29%) als G3 (schlecht differenziert) eingestuft, bei zwei Patienten (8%) war das Grading unbekannt.

4.2 Sequenzierung mit dem konventionellen Panel

Zunächst musste überprüft werden, ob die Qualität der aus FFPE-Material isolierten DNA grundsätzlich für eine NGS-Analyse ausreicht. Hierfür wurden die ersten vom Institut für Pathologie der Universität Rostock bereitgestellten Proben mit dem im Hämatologischen Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock routinemäßig angewandtem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 sequenziert. Dieses vergleichsweise kleine, konventionelle Panel umfasst Hotspot Regionen von 50 Genen und enthält 207 Amplikons. Mit den Primern dieses Panels wurde für 22 Proben eine Library hergestellt. Mittels der qPCR war es möglich, die DNA-Konzentration der Libraries zu überprüfen, bevor sie sequenziert wurden. Drei der 22 Proben wurden verworfen, da die gewünschte Library-Konzentration von mindestens 50 pM deutlich unterschritten wurde. Die durchschnittliche DNA-Konzentration betrug in der Gruppe der sequenzierten Libraries 537,69 pM, in der Gruppe der verworfenen Libraries 24,77 pM. Eine Übersicht über die qPCR Ergebnisse liefert Tabelle 25 im Anhang. Folglich konnten 19 Proben von Patienten aus der Pilotkohorte mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 sequenziert werden. Die Auswertung der Qualitätsparameter der Sequenzierung ergab die in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse. Für die vollständige Tabelle siehe Tabelle 26 im Anhang.

Tabelle 6: Auszug aus Sequenzierdaten mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2

Probennummer	Uniformity of Amplicon Coverage	Amplikons mit ≥500 Reads	Amplicons reading end-to-end
NF373	97,58%	97,58%	99,03%
NF375	57,49%	58,45%	96,62%
NF376	97,58%	98,07%	99,52%
NF377	95,65%	96,14%	99,03%
NF374	90,82%	93,72%	100,00%
NF378	97,58%	97,10%	99,03%
NF379	95,65%	95,65%	99,03%
NF380	95,65%	95,65%	99,03%
NF381	95,65%	93,24%	99,03%
NF382	98,55%	95,17%	99,03%
NF403	88,41%	82,61%	99,52%
NF406	99,52%	99,03%	99,52%
NF409	97,10%	96,62%	99,03%
NF410	90,91%	90,34%	99,03%
NF411	96,62%	92,27%	99,03%
NF412	98,07%	99,03%	99,03%
NF413	97,58%	96,14%	99,03%
NF414	69,57%	68,12%	96,62%
NF417	96,14%	84,54%	99,03%

Die uniformity of amplicon coverage gibt an, wie ausgeglichen die Amplikons sequenziert wurden. Der Wert wird angegeben durch den Anteil an Amplikons, deren coverage mindestens 20% der mittleren amplicon coverage beträgt [65]. Nur bei drei Proben (16%) lag der Wert unterhalb von 90%. Der Anteil an Amplikons mit mindestens 500 reads war nur bei vier Proben (18%) kleiner 90% und nur bei zwei Proben (9%) kleiner 80%. Der Wert amplicons reading end-to-end gibt den Anteil an Amplikons an, die vollständig sequenziert wurden. Er betrug durchschnittlich 98.80%. Die durchschnittliche Abdeckung der Amplikons (Amplicon Coverage) betrug 2268 reads/Amplikon (Bereich: 1330–4189). Mit den erzielten Sequenzierungsergebnissen war die sichere Detektion von genetischen Varianten in 17 von 22 Proben (77%) gut möglich (siehe Abbildung 4), sodass die Qualität der DNA der Pilotkohorte als prinzipiell ausreichend befunden wurde, um eine NGS-Analyse durchzuführen.

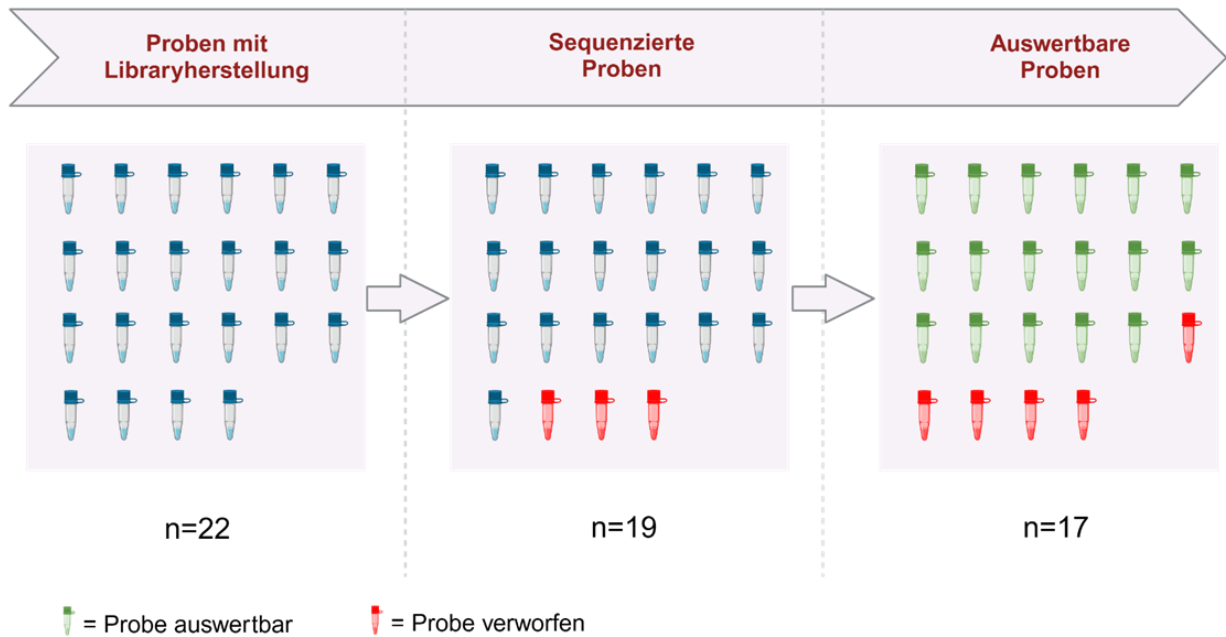


Abbildung 4: Auswertbarkeit der Proben bei Sequenzierung mit Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel

Die DNA-Konzentration der Library wurde mittels qPCR überprüft. Nur Libraries mit einer Konzentration von annähernd 50 pM wurden sequenziert. Abbildung erstellt mit BioRender.com

4.3 Auswahl des komplexen Panels

4.3.1 Design Custom tNGS-Panel

Das Custom Panel wurde mithilfe des Ion Ampliseq Designers [52] erstellt. Mit dieser Webanwendung, lassen sich Primer für eine NGS-Analyse mit der Ion Torrent Plattform designen. Nach erfolgtem Panel Design liefert der Ion Ampliseq Designer Informationen zur Panelgröße (in Megabasen; Mb), zur Anzahl der benötigten Amplikons, zu der zur erwartenden Coverage und dem Preis des Panels. Für die detaillierte Methodik siehe 3.2.3.1. Einen Überblick über den Prozess des Designs des Custom Panels gibt Abbildung 5.

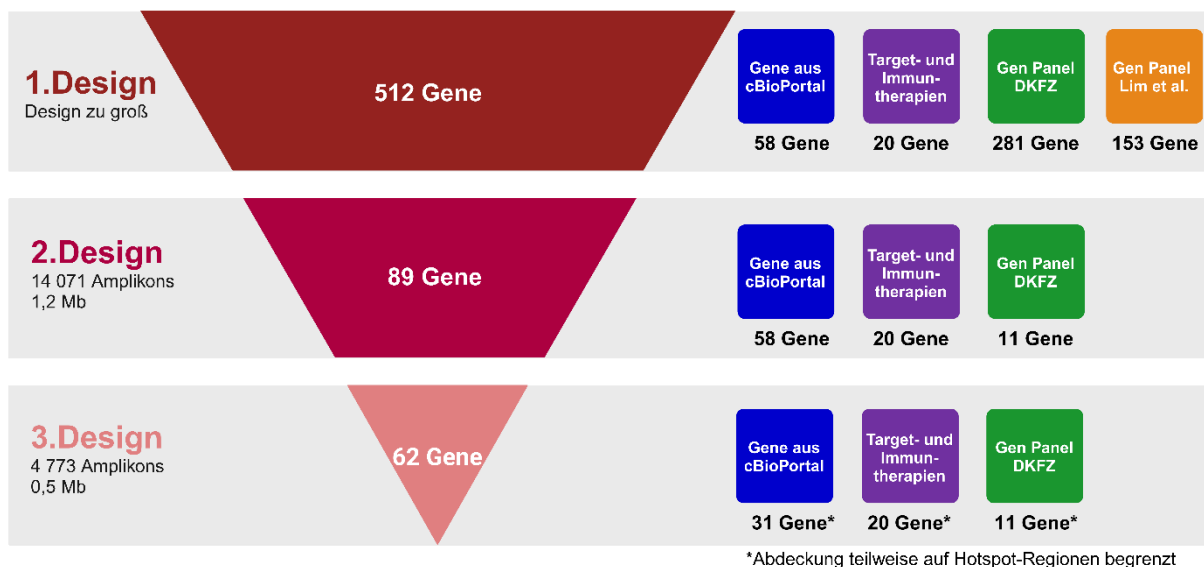


Abbildung 5: Überblick über den Prozess des Designs des Custom Panels

Abbildung erstellt mit BioRender.com

Für das erste Design wurden zum einen Gene ausgewählt, die in HNSCC häufig Mutationen aufweisen. Hierfür wurden mithilfe der Webanwendung cBioPortal die Sequenzierdaten von fünf Studien [21, 38–40, 66] zusammengefasst. Die Sequenzierdaten dieser Studien setzten sich insgesamt aus den Sequenzierdaten von 434 verschiedenen Proben zusammen, die mit Whole Exome Sequencing bzw. Whole Genome Sequencing erhoben wurden. Gene, die in mindestens 5% der ausgewählten Proben mutiert waren, wurden in das Custom Panel integriert. Dies waren 58 Gene (siehe Abbildung 5, Blauer Kasten). Zum anderen wurden Gene ausgewählt, die für die Therapieentscheidung mit Target- und Immuntherapien relevant sind. Dabei wurden JAK1 und JAK2 ebenso wie die Mismatch-Reparatur-Gene MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 hinzugefügt, da sie das Therapieansprechen für die Therapie mit PD-1-Inhibitoren prädiktieren [49, 67]. 14 weitere Gene wurden zur Auswahl hinzugefügt, da sie im Falle einer Alteration als mögliches Ziel für eine zielgerichtete Therapie gelten [16, 21, 68] (siehe Abbildung 5, lila Kasten).

Zudem wurden Gene aus Panels ausgewählt, die im Rahmen anderer Arbeiten für eine Sequenzierung von HNSCC verwendet wurden und nicht Teil der bisherigen Auswahl waren. Dies waren zum einen 281 Gene aus dem 327-Gen-Panel des Deutschen Krebsforschungszentrums [69] (siehe Abbildung 5, grüner Kasten) und 153 Gene aus einem Custom Panel von Lim, Cho et al. aus einer Machbarkeitsstudie für NGS bei HNSCC [16] (siehe Abbildung 5, oranger Kasten). Das erste Design umfasste somit 512 Gene. Beim Hochladen der Gene in den Ion Ampliseq Designer zeigte sich, dass das Panel zu groß war für den Ion Ampliseq Designer. Für eine vollständige Liste der Gene des ersten Designs siehe Tabelle 27 im Anhang.

Die Größe des Panels wurde daher in einem zweiten Design reduziert. Es wurden erneut die 58 Gene aus dem cBioPortal ausgewählt, ebenso wie die Gene, die für die Therapieentscheidung mit Target- und Immuntherapien relevant sind. Aus dem 327-Gen-Panel des Deutschen Krebsforschungszentrums wurden nur die elf Gene ausgewählt, die von Eder, Hess et al. in [47] als die am häufigsten mutierten Gene beschrieben wurden, aber nicht Teil der 58 Gene aus dem cBio Datensatz waren. Die 153 Gene aus dem Custom Panel von Lim, Cho et al. [16] waren nicht mehr Teil des zweiten Designs. Das zweite Design umfasste somit noch 89 Gene (siehe Tabelle 7). Das Design eines Custom Panels durch den Ion Ampliseq Designer war hiermit möglich. Bei Abdeckung der kompletten kodierenden Sequenz aller Gene (CDS) ergab sich eine Größe von 1,2 Mb und 14 071 Amplikons waren nötig um die ausgewählten Gene abzudecken.

Bei einer Sequenzierung mit dem Ion PGM™ System unter Verwendung des Sequenzierchips mit der größten Kapazität von 5 Mio. Reads pro Chip (Ion 318™ Chip) und der Annahme von der herkömmlichen Amplikon-Coverage von 500x wäre die Sequenzierung von nur etwa 0,7 Proben pro Chip möglich. Es bedurfte daher einer Reduzierung des Panels in einem dritten Design.

Häufig mutierte Gene in HNSCC		Gene relevant für PD-1-Blockade und zielgerichtete Therapie	
Gene aus cBioPortal		Gen Panel DKFZ	Target- und Immuntherapien
TP53 TTN FAT1 CDKN2A NOTCH1 PIK3CA MUC16 CSMD3 KMT2D SYNE1 LRP1B PCLO DNAH5 USH2A FLG NSD1 RYR2 CASP8 SI PKHD1L1 RELN DMD FAM135B KMT2C XIRP2 HUWE1 COL11A1 PAPPA2 FAT3	PCDH15 ZFHX4 CUBN FAT4 PLEC AHNAK COL22A1 DNAH9 EP300 APOB HRAS DNAH8 HERC2 ADGRV1 NAV3 FBXW7 MUC5B CREBBP SPEN PRDM9 ZNF804B FAT2 LAMA2 DST LRP2 RYR3 SYNE2 MACF1 PCDH11X	SMARCA4 APC ATRX KDM6A EGFR MYH11 PIK3R1 RB1 ATM NF2 SMAD4	JAK1 JAK2 MLH1 MSH2 MSH6 PMS2 CCND1 DDR2 EPHA2 ERBB2 FGFR1 FGFR2 FGFR3 IGF1R KRAS MET MYC NF1 NRAS PTEN

Blauer Kasten: Am häufigsten mutierte Gene in cBioPortal Datensatz [21, 38–40, 66].

Grüner Kasten: Am häufigsten mutierte Gene bei Sequenzierung mit DKFZ Panel [47].

Lila Kasten: Gene Relevant für Immuntherapie und zielgerichtete Therapie [16, 21, 49, 67, 68].

Tabelle 8. Zudem wurden für einige Gene die Primer so gewählt, dass nur die Hotspot-Bereiche abgedeckt wurden. Dies war allerdings nur möglich, wenn bekannt war, dass sich die Mutationen vor allem auf Hotspots konzentrieren (Details siehe unter 3.2.3.1). Von 22 Genen wurde die komplette kodierende Sequenz (CDS) im Design abgedeckt, für 40 Gene nur die Hotspot-Bereiche. Diese Verkleinerungen des Panels ergaben eine Panelgröße von etwa 500kb und 4800 Amplikons.

Tabelle 8: Übersicht über die enthaltenen Gene im dritten Design des Custom Panels

Häufig mutierte Gene in HNSCC		Gene relevant für PD-1-Blockade und zielgerichtete Therapie	
Gene aus cBioPortal		Gen Panel DKFZ	
TP53 TTN FAT1 CDKN2A* NOTCH1* PIK3CA* MUC16 CSMD3 KMT2D SYNE1 LRP1B* PCLO DNAH5* USH2A* FLG* NSD1	RYR2 CASP8 SI PKHD1L1* RELN* KMT2C* ZFHX4* PLEC* EP300* HRAS* FBXW7* MUC5B* CREBBP* PRDM9* LRP2*	APC* ATM* ATRX EGFR* KDM6A MYH11 NF2 PIK3R1* RB1* SMAD4* SMARCA4*	JAK1* JAK2* MLH1* MSH2 MSH6* PMS2*
			CCND1 DDR2 EPHA2 ERBB2* FGFR1* FGFR2* FGFR3* IGF1R KRAS* MET* MYC NF1* NRAS* PTEN*

Bei mit * Markierten Genen wurden die Hotspot-Bereiche abgedeckt, bei allen anderen die komplette kodierende Sequenz (=CDS)

Blauer Kasten: Am häufigsten mutierte Gene in cBioPortal Datensatz [21, 38–40, 66].

Grüner Kasten: Am häufigsten mutierte Gene bei Sequenzierung mit DKFZ Panel [47].

Lila Kasten: Gene Relevant für Immuntherapie und zielgerichtete Therapie [16, 21, 49, 67, 68].

Bei einer Sequenzierung mit dem Ion PGM™ System unter Verwendung des Sequenzierchips mit der größten Kapazität von 5 Mio. Reads pro Chip (Ion 318™ Chip) und der Annahme von der herkömmlichen Amplikon-Coverage von 500x wäre bei einem Panel dieser Größe die Sequenzierung von etwa 2 Proben pro Chip möglich. Folglich hatte das dritte Design des Custom Panels eine Größe, mit der eine Sequenzierung mit dem Ion PGM™ System möglich wäre.

4.3.2 Vergleich Custom tNGS-Panel mit kommerziellen Panels

Beim Vergleich von Custom Panels mit kommerziellen Panels zeigten die kommerziellen Panels einige Vorteile. Sie sind zwar unspezifisch für HNSCC, und damit bedarf es eines größeren Panels, um die wichtigen Gene in HNSCC abzudecken. Allerdings sind kommerzielle Panels bereits validiert und durch Iterationen optimiert, wohingegen die Implementierung eines Custom Panels einer sorgfältigen Etablierung bedarf [70]. Entscheidend war jedoch, dass das Custom Panel nur in großen Verpackungsgrößen ab 1000 Reaktionen erhältlich war, während kommerzielle Panels bereits ab 24 Reaktionen verfügbar waren. Zum einen sollte aber vor der Sequenzierung einer großen Kohorte zunächst nur eine deutlich kleinere Pilotkohorte sequenziert werden, um dann das Panel evaluieren zu können. Zum anderen stellte eine Verpackungsgröße von 1000 Reaktionen mit einem Preis von einem mittleren fünfstelligen Betrag einen finanziellen Aufwand dar, der im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar war. Daher wurde entschieden, für die komplexe NGS-Analyse der Proben der Pilotkohorte ein kommerzielles Panel zu verwenden.

Unter den kommerziell erhältlichen tNGS-Panels erwies sich der Oncomine Comprehensive Assay Plus am besten geeignet. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus ist mit einer Panelgröße von 1,5 Mb und 13 473 Amplikons zwar deutlich größer als das Custom Panel, erfasst aber mit der Tumormutationslast (TMB) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zusätzlich prognostisch wichtige molekularbiologische Marker. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus enthält 44 von 62 Genen, die auch im Custom Panel abgedeckt werden (siehe Abbildung 6), wohingegen der Oncomine™ Comprehensive Assay v3 nur 36 der 62 Gene abdeckt. Darüber hinaus werden TMB und MSI vom Oncomine™ Comprehensive Assay v3 nicht erfasst. Deshalb entschied man sich für eine Sequenzierung der Pilotkohorte mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. Die Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus war aufgrund der Größe des Panels nicht mit dem Ion PGM™ System nicht möglich. Daher wurde für diese Arbeit leihweise das Ion GeneStudio™ S5 Plus System zur Verfügung gestellt um die Sequenzierung vornehmen zu können. Abbildung 6 zeigt den Vergleich der enthaltenen Gene im Custom Panel und Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. Die vom Oncomine™ Comprehensive Assay Plus ebenfalls erfassten Informationen zur Copy Number Variation (CNV) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgewertet.

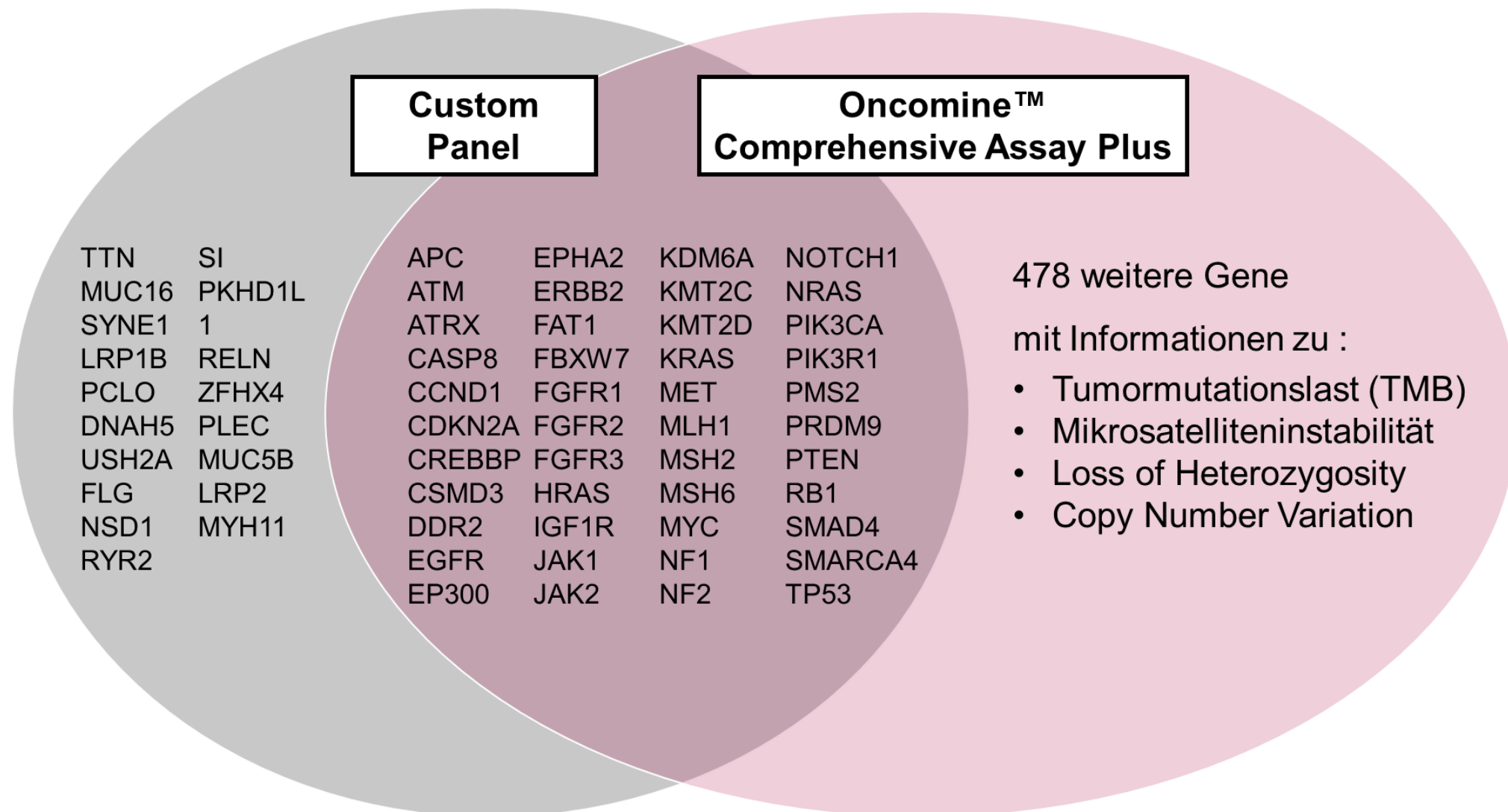


Abbildung 6: Vergleich der enthaltenen Gene im Custom Panel und Oncomine™ Comprehensive Assay Plus.

4.4 Sequenzierung mit dem komplexen Panel

4.4.1 Klinische Charakterisierung der Patienten mit auswertbaren Sequenzierdaten

Die Sequenzierung mit Oncomine™ Comprehensive Assay Plus war für 48 Proben von 24 Patienten geplant. Es konnten jedoch nur von elf Patienten auswertbare Sequenzierungsergebnisse erhoben werden. Einen Überblick über die klinischen Charakteristika dieser elf Patienten gibt Tabelle 9.

Tabelle 9: Klinische Charakteristika der Patienten mit auswertbaren Sequenzierdaten.

Charakteristik		Alle Patienten (n=24)	Patienten mit auswertbaren Sequenzierdaten (n=11)
Alter bei Erstdiagnose in Jahren (Bereich)		61 (44-84)	56 (44-84)
Geschlecht	weiblich	3	1
	männlich	21	10
Lokalisation (ICD-Code)	Mundboden (C04)	7	2
	Hypopharynx (C013)	4	3
	Tonsille (C09)	3	1
	Zunge (C02)	3	2
	Zahnfleisch (C03)	2	1
	Oropharynx (C10)	1	0
	Sonstige	4	2
Tabakkonsum	Ja	11	5
	Nein	1	0
	Unbekannt	12	6
Alkoholkonsum	Ja	9	3
	Nein	15	0
	Unbekannt	0	8
HPV-Status	Positiv	4	1
	Negativ	12	7
	Unbekannt	8	3
Tumordifferenzierung	G2	15	6
	G3	7	3
	Unbekannt	2	2

Von den elf Patienten, für die Sequenzierdaten erhoben werden konnten, waren zehn Männer und eine Frau. Der Erfassungszeitraum erstreckt sich von 2008 bis 2020, wobei der Zeitpunkt der Erstdiagnose nur für einen Patienten vor 2017 lag. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug 56 Jahre (Bereich von 44 bis 84 Jahren). Bei acht Patienten (73%) wurde der letzte Tumornachweis pathologisch als ein Rezidiv beurteilt. Bei drei Patienten (27%) wurde ein Rezidiv vermutet, allerdings konnte eine Unterscheidung zwischen Residualtumor und Rezidiv pathologisch nicht sicher beurteilt werden. Daher wird die Gesamtheit der letzten Tumornachweise im Folgenden als vRezidiv zusammengefasst. Die mediane Überlebenszeit vom Startzeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Endzeitpunkt Tod betrug 422 Tage. Die häufigste Tumorklassifikationen waren im Bereich des Hypopharynx (3 Patienten; 27%), und im Bereich der Zunge und des Mundbodens (jeweils 2 Patienten = 18%). Bei 9 Patienten (82%) war die Tumordifferenzierung (sog. Grading) bekannt, davon war das Tumorgewebe bei sechs Patienten (67%) mäßig differenziert (G2) und bei drei Patienten (33%) schlecht differenziert (G3). Die Gruppe mit mäßig differenzierten Tumorgewebe (G2) hatte dabei nach dem Kaplan-Meier Schätzer eine längere mediane Überlebenszeit (575 Tage) als die Gruppe mit schlecht differenziertem Tumorgewebe (407 Tage). Der Raucherstatus war bei fünf Patienten (45%) bekannt, davon waren alle Raucher (100%). Drei der Patienten (27%) gaben regelmäßigen Alkoholkonsum an, bei den anderen Patienten war der Alkoholkonsum unbekannt. Zur Erfassung des HPV-Status wurde ein p16 Nachweis durchgeführt. Sieben Patienten (64%) waren p16 negativ, ein Patient (9%) p16 positiv, bei 3 Patienten (27%) fehlte die Angabe. Der PD-L1-Status war bei 2 Patienten positiv, bei den Anderen wurde er nicht bestimmt. Fünf Patienten (45%) hatten schon vorher eine andere Tumorerkrankung, drei davon erhielten im Rahmen dieser eine Radiotherapie, bei einem der Patienten fehlte die Angabe. Folglich hatten mindestens sieben der elf Patienten (64%) im Vorfeld der HNSCC-Erkrankung noch keine Radiotherapie erhalten. Im Rahmen der HNSCC-Erkrankung wurden sieben Patienten (64%) vor der medikamentösen Therapie operiert, neun Patienten (82%) erhielten Radiotherapie. Die im Rahmen der HNSCC-Erkrankung durchgeführten medikamentösen Therapien wurden in drei Gruppen eingeteilt: Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren (=PD-1-Antikörper, Nivolumab, Pembrolizumab), klassische Therapie (Chemotherapie und/oder Gabe von EGFR-Antikörper (Cetuximab)) und die rein supportive Therapie. Fünf Patienten (45%) erhielten Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren und klassische Therapie, ein Patient (9%) erhielt nur klassische Therapie und fünf Patienten (45%) erhielten reine Supportion. Für fünf der sechs Patienten, die Immuntherapie und/oder klassische Therapie erhielten, war eine Aussage bezüglich des Therapieansprechens möglich. Alle fünf Patienten erhielten eine Kombination aus Immuntherapie und klassischer Therapie. Davon zeigten vier Patienten ein Ansprechen (=Responder), im Sinne einer Krankheitsstabilisierung (stable disease; SD) oder einer bildgebenden Remission (complete- oder partial remission; CR/PR). Ein Patient zeigte kein Ansprechen auf die

Therapie (Non-Responder), hierbei waren in der Bildgebung ein Größenprogress bekannter Manifestationen beziehungsweise neue Manifestationen zu sehen.

4.4.2 Übersicht Sequenzierdaten

Insgesamt wurde von 39 Proben eine Library mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus hergestellt. Davon wurden 16 Libraries mit dem IonChef™ Instrument hergestellt, hierbei war vor der Sequenzierung prozessbedingt keine Kontrolle der Library-Konzentration durchgeführt worden; sodass alle 16 Libraries auch sequenziert wurden. 23 Libraries wurden mit dem manuellen Kit hergestellt. Bei der manuellen Library-Herstellung, war eine Kontrolle der Library-Konzentration mittels qPCR möglich. Acht von 23 Libraries die manuell hergestellt wurden, konnten sequenziert werden. Es mussten 15 Libraries verworfen werden, weil die benötigte Library-Konzentration von etwa mindestens 50 pM in der qPCR nicht erreicht werden konnte. Die durchschnittliche Library-Konzentration betrug in der Gruppe der sequenzierten Proben 56,61 pM, in der Gruppe mit den verworfenen Proben 7,92 pM. Für die vollständigen Ergebnisse der qPCR siehe Tabelle 29 im Anhang. Insgesamt wurden folglich 24 Proben mit dem OCA Plus Panel sequenziert.

Die Sequenzierung ergab bei den 24 sequenzierten Proben durchschnittlich eine Anzahl von 24,07 ($\pm 17,31$) Millionen Reads pro Probe. Die durchschnittliche Basenabdeckung lag bei 2288 Reads pro Base. Bei elf Proben (46%) war die Anzahl der Reads pro Probe unter der vom Hersteller empfohlenen Grenze von 22 Millionen mapped Reads. Bei sieben Proben (29%) lag der Wert unter der im Rahmen dieser Arbeit definierten Grenze von ca. 15 Millionen Reads. Diese sieben Proben wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, somit waren insgesamt 17 von initial 39 Proben (Erfolgsrate 43,6%) auswertbar.

Tabelle 10: Übersicht über die sequenzierten Proben mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

	Anzahl Proben manuelle Libraryherstellung	Anzahl Proben automatisierte Libraryherstellung	Anzahl Proben Gesamt
Libraryherstellung	23	16	39
Librarykonzentration >50 pM	8	keine qPCR	Unbekannt + 8
Sequenzierung	8	16	24
Auswertbare Sequenzierdaten	7	10	17

Bei der manuellen Libraryherstellung wurde die DNA-Konzentration der Library mittels qPCR überprüft. Nur Libraries mit einer Konzentration von annähernd 50 pM wurden sequenziert. Bei der automatisierten Libraryherstellung war vom Hersteller keine Kontrolle der DNA-Konzentration vorgesehen. Unter den auswertbaren Proben befand sich eine Probe, die im Rahmen der Etablierung doppelt sequenziert wurde. Daher wurden 16 Proben ausgewertet.

Eine Probe wurde ausgeschlossen, da sie im Rahmen der Etablierung der Methode doppelt sequenziert wurde, sodass insgesamt 16 Proben von elf der 24 Patienten für die weitere Analyse verfügbar waren (Siehe Abbildung 7).

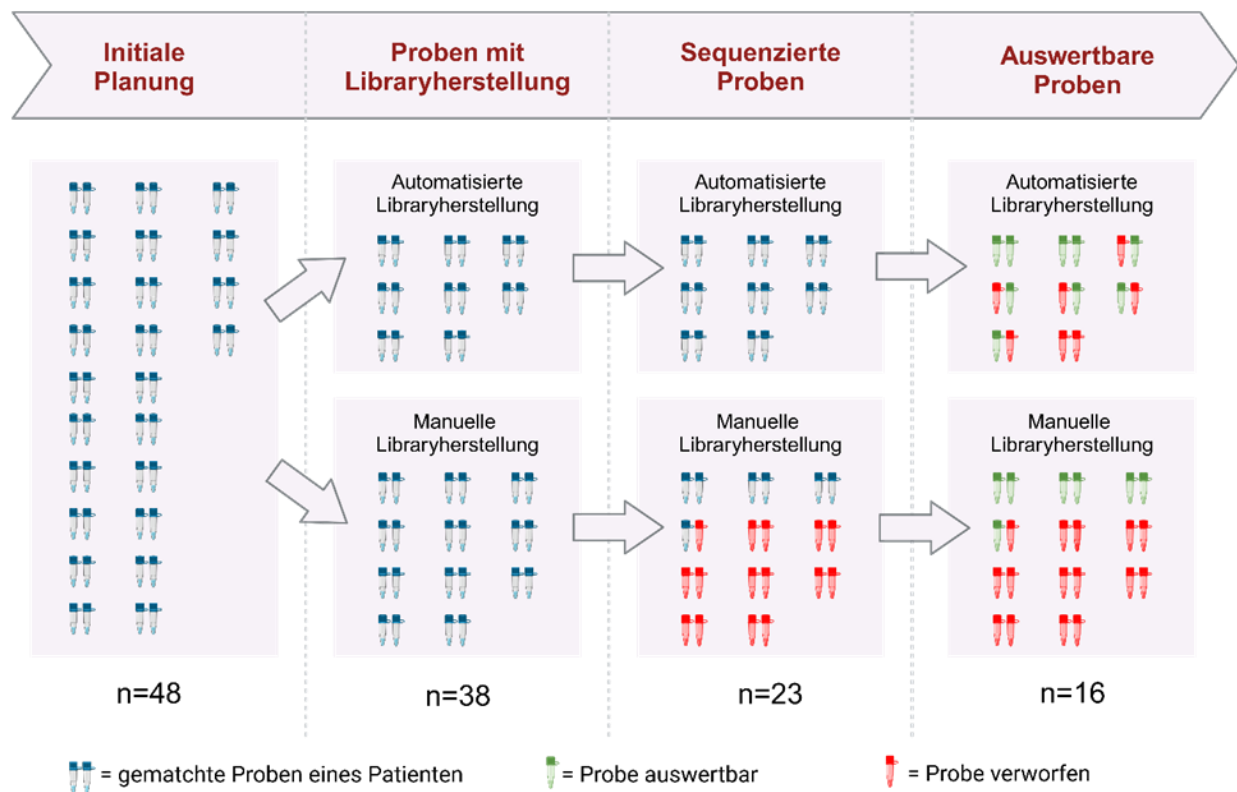


Abbildung 7: Auswertbarkeit der Proben bei Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Bei der manuellen Libraryherstellung wurde die DNA-Konzentration der Library mittels qPCR überprüft. Nur Libraries mit einer Konzentration von annähernd 50 pM wurden sequenziert. Bei der automatisierten Libraryherstellung war vom Hersteller keine Kontrolle der DNA-Konzentration vorgesehen. Die im Rahmen der Etablierung doppelt sequenzierte Probe wurde in dieser Abbildung nicht berücksichtigt.

Für die 16 Proben war der Anteil von Amplikons mit mindestens 500 reads und Basen mit einer Basenabdeckung von mindestens 500X durchschnittlich 86%. Der Anteil von Amplikons mit mindestens 500 reads und Basen mit einer Basenabdeckung von mindestens 500X war in neun Proben (56%) $\geq 90\%$, in einer Probe (6%) $\geq 80\%$ und in den anderen sechs Proben (38%) $\geq 70\%$. Einen Überblick über die Sequenzierparameter liefert Tabelle 11. Für die vollständigen Daten siehe Tabelle 28 im Anhang.

Tabelle 11: Übersicht über die Sequenzierparameter mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

	Mapped Reads in Millionen	Amplikons mit ≥500 Reads In %	Uniformity of Am- plicon Coverage in %
Alle Proben (n=24)	24,07 (± 17,31)	66,8 (± 31,8)	89,0 (± 8,3)
Ausgewertete Pro- ben (n=16)	31,54 (± 15,25)	86,2 (± 9,4)	91,0 (± 4,6)

Wert in Klammern gibt die Standardabweichung an. Vollständige Tabelle siehe Tabelle 28 Anhang

Durch die 16 auswertbaren Proben lagen von fünf der elf Patienten sowohl für den Primarius und das vRezidiv Sequenziererergebnisse vor. Für jeweils drei Patienten lagen nur für den Primarius beziehungsweise das vRezidiv Sequenziererergebnisse vor. Die Erfassung der Mikrosatelliteninstabilität war bei allen Patienten erfolgreich. Die Erfassung der Tumormutationslast (kurz: TMB) war bei 14 von den 16 Patienten erfolgreich. Ein Loss-of-Heterozygosity (kurz: LOH) wurde an zwölf verschiedenen Positionen festgestellt.

Mit der unter 3.2.4.10 näher beschriebenen Filterung durch die Ion Reporter™ Software Version 5.18 mit dem Oncomine Comprehensive Plus - w2.3 - DNA - Single Sample Workflow erhält man unter Berücksichtigung der Variantentypen SNV, MNV, Insertionen, Deletionen und komplex, eine Gesamtanzahl von 4473 unterschiedlicher, detektierter Varianten, verteilt auf die 16 Proben. Durch das Herausfiltern von Calls mit einer variant allele frequency (VAF) unterhalb von 20% verringert sich die Anzahl unterschiedlicher, detektierter Varianten auf 85. Aus diesen 85 Varianten wurden 27 Varianten identifiziert, die gemäß OncoKB einen onkogenen Effekt haben und/oder ein potenzielles therapeutisches Target darstellen. Da in den verschiedenen Proben einige gleiche Calls detektiert wurden, beträgt die Gesamtanzahl 108 Calls. Davon wurden 59 Calls in der Primarius Gruppe und 49 Calls in der vRezidiv Gruppe detektiert. Von den 108 Calls waren 83 SNV, 6 MNV, 4 Insertionen, 4 Deletionen und 11 komplexe Varianten. Bei 32 der 108 Calls lag die Coverage unterhalb von 350X. Da jedoch bei keinem Call die Coverage des aberranten Allels unterhalb von 10X lag, wurden sie bei der Auswertung beibehalten. Eine Übersicht über die Anzahl der Calls pro Gen für alle Patienten mit auswertbaren Proben gibt Tabelle 12.

Tabelle 12: Anzahl der Calls pro Gen für alle Patienten mit auswertbaren Proben

Gen	Pat. 201		Pat. 198		Pat. 211		Pat. 220		Pat. 184		Pat. 182		Pat. 200		Pat. 229		Pat. 227		Pat. 232		Pat. 161	
	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
TP53																						
MAML3																						
KMT2D																						
NOTCH1																						
TPMT																						
NTRK1																						
ZMYM3																						
CSMD3																						
FANCC																						
HLA-A																						
ZFHX3																						
ATRX																						
BRCA2																						
CDKN2A																						
CUL4B																						
CYP2D6																						
ERAP1																						
HLA-B																						
IDH2																						
NOTCH3																						
RMDN2-AS1																						
TERT																						
USP40																						
APC																						
ASXL1																						
ATR																						
AXL																						
BRCA1																						
CDKN2B																						
COG1																						
CREBBP																						
DCAF4L2																						
DICER1																						
EP300																						
FGFR1																						
GHR																						
LRCH2																						
MSH3																						
MTERF4																						
MYCN																						
OR4C3																						
PHF6																						
PIK3CA																						
POLD1																						
PRKAR1A																						
PTEN																						
QRSL1																						
RAD52																						
RASA1																						
RECQL4																						
SMAD4																						

Weiß: 0 Calls
 Hellblau: 1 Call
 Dunkelblau: 2 Calls
 P: Primarius-Probe
 R: vRezidiv-Probe
 Die grau hinterlegten Proben wurden nicht sequenziert.
 Alle detektierten Calls mit VAF > 20%.

Gen	Referenztranskript	Kodierung	Anzahl Patienten
KMT2D	NM_003482.4	c.11791C>T	3
NTRK1	NM_002529.3	c.1810C>T	3
TPMT	NM_000367.5	c.719A>G	2
TPMT	NM_000367.5	c.460G>A	2
RMDN2	NM_144713.5	c.776G>A	2
ZMYM3	NM_201599.3	c.2447C>T	2
ZFHX3	NM_006885.4	c.9610_9611insC	2
MAML3	NM_018717.5	*	2

41

4.4.3 Mutierte Gene

Bei der Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus wurde über alle 16 Proben hinweg 108 Varianten in insgesamt 51 unterschiedlichen Genen detektiert. Die am häufigsten mutierten Gene waren dabei TP53 (in 8 von 16 Proben mutiert, 50%) , MAML3 (44%), KMT2D (38%), NOTCH1 (38%) und NTRK1 (25%). Bei den acht sequenzierten Proben des ersten Tumornachweis waren die drei am häufigsten mutierten Gene TP53 (63%), KMT2D (50%), NOTCH1 (50%), bei den acht sequenzierten Proben des letzten Tumornachweises waren es MAML3 (63%), TP53 (38%) und unter Anderem TPMT (25%). Eine Übersicht über die am häufigsten mutierten Gene und die Verteilung der Mutationen zwischen erstem und letzten Tumornachweis gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Mutationsfrequenz der mutierten Gene

Gen	alle Proben (n=16)	Primarius (n=8)	vRezidiv (n=8)
TP53	50,00%	62,50%	37,50%
MAML3	43,75%	25,00%	62,50%
KMT2D	37,50%	50,00%	25,00%
NOTCH1	37,50%	50,00%	25,00%
NTRK1	25,00%	25,00%	25,00%
CSMD3	18,75%	25,00%	12,50%
FANCC	18,75%	25,00%	12,50%
TPMT	18,75%	12,50%	25,00%
ZFHX3	18,75%	37,50%	0,00%
ATRX	12,50%	12,50%	12,50%
BRCA2	12,50%	12,50%	12,50%
CUL4B	12,50%	12,50%	12,50%
CYP2D6	12,50%	25,00%	0,00%
ERAP1	12,50%	12,50%	12,50%
HLA-A	12,50%	0,0%	25,00%
HLA-B	12,50%	12,50%	12,50%
IDH2	12,50%	12,50%	12,50%
NOTCH3	12,50%	25,00%	0,00%
RMDN2	12,50%	25,00%	0,00%
TERT	12,50%	12,50%	12,50%
USP40	12,50%	12,50%	12,50%
ZMYM3	12,50%	12,50%	12,50%

Vollständige Tabelle siehe Tabelle 30 im Anhang.

4.4.4 Actionable Targets

Die detektierten Varianten wurden daraufhin untersucht, ob sie gemäß Marret et al. in [25] als „actionable“ Targets werden und somit also ein potentielles Ziel für eine zielgerichtete Therapie darstellen. Dabei wurden 19 Varianten gefunden, die als potenzielles Target in HNSCC-Patienten fungieren könnten, siehe Tabelle 15 und Tabelle 16. Mit der Variante c.216C>A im CDKN2A Gen wurde in einem rezidierten Tumor ein Target identifiziert, welche in ESCAT-Level IIA eingestuft wurde. Des Weiteren wurden mit den Varianten c.10095_10095delCinsGAATTATATCT in BRCA2, c.4102_4103delGCinsTA in BRCA1, c.3140A>G in PIK3CA und c.195C>G in PTEN vier Varianten detektiert, die zum ESCAT-Level IIIA eingestuft wurden. Die anderen detektierten „actionable“ targets, hatten einen niedrigeren Grad klinischer Evidenz oder wurden von Marret et al. nicht eingestuft [25].

Tabelle 15: Onkogene und/oder Actionable Mutationen in Patienten mit Sequenzierergebnissen von Primarius und vRezidiv

Gen	Referenz-transkript	Kodierung	Mutationstyp	Effekt	Anzahl Primarius	Anzahl vRezidiv	Actionable?	Evidenz gemäß ESCAT
ATRX	NM_000489.6	c.1171C>T	Nonsense	Likely Oncogenic	1	0	nein	-
BRCA2	NM_000059.4	c.10095_10095delCins GAATTATATCT	Insertion	Likely Oncogenic	1	1	ja	IIIA
FANCC	NM_000136.3	c.276G>A	Nonsense	Likely Oncogenic	1	1	nein	-
HLA-A	NM_001242758.1	c.538_539delTTinsCA	Missense	Likely Oncogenic	0	1	nein	-
HLA-A	NM_001242758.1	c.538_539delTTinsCG	Missense	Likely Oncogenic	0	1	nein	-
NOTCH1	NM_017617.5	c.1093C>T	Missense	Likely Oncogenic	1	1	ja	keine Angabe
NOTCH1	NM_017617.5	c.6159_6169delCAAA- GATATGC	Deletion	Oncogenic	1	0	ja	keine Angabe
NOTCH3	NM_000435.3	c.2405G>A	Nonsense	Likely Oncogenic	1	0	nein	-
PIK3CA	NM_006218.4	c.3140A>G	Missense	Nicht verfügbar	1	0	ja	IIIA
RECQL4	NM_004260.4	c.2296+1C>G	Splice_Site	Likely Oncogenic	1	0	nein	-
TERT	NM_198253.3	c.-124C>A	5'Flank	Oncogenic	1	0	ja	keine Angabe
TERT	NM_198253.3	c.-138CC>TT	5'Flank	Oncogenic	0	1	ja	keine Angabe
TP53	NM_000546.6	c.1024C>T	Nonsense	Likely Oncogenic	1	1	ja	V
TP53	NM_000546.6	c.832C>T	Missense	Likely Oncogenic	1	0	ja	V
TP53	NM_000546.6	c.711G>A	Missense	Likely Oncogenic	1	0	ja	V
TP53	NM_000546.6	c.583A>T	Missense	Likely Oncogenic	1	0	ja	V
ZFHX3	NM_006885.4	c.2379_2385delCTCG CCGinsCGCCC	Deletion	Likely Oncogenic	1	0	nein	-

Die Angaben zum Effekt der Varianten sind gemäß OncoKB [62], die Informationen in den Spalten Actionable? und Evidenz sind entsprechend Marret et al. [25]. Die Einteilung der Mutationen als potentiell Target gemäß ESCAT reicht von I bis V: Sinngemäß I=Target geeignet für Implementierung in klinischen Alltag; II=Vorteil durch zielgerichtete Therapie wahrscheinlich, jedoch zusätzliche Daten nötig; III=klinischer Nutzen in anderen Tumoren bzw- für ähnliche Targets nachgewiesen; IV=präklinische Evidenz als potentielles Target; V=Evidenz als potentielles Co-Target[63]

Tabelle 16: Onkogene und/oder actionable Mutationen in Patienten mit nur einem Sequenzierergebniss von Primarius oder vRezidiv

Gen	Referenztranskript	Kodierung	Mutationstyp	Effekt	Anzahl Primarius	Anzahl vRezidiv	Actionable?	Evidenz gemäß ESCAT
TP53	NM_000546.6	c.854A>T	Missense	Oncogenic	1	0	Ja	V
TP53	NM_000546.6	c.742C>T	Missense	Likely Oncogenic	1	0	Ja	V
TP53	NM_000546.6	c.535C>T	Missense	Likely Oncogenic	0	1	Ja	V
TP53	NM_000546.6	c.469G>T	Missense	Likely Oncogenic	0	1	Ja	V
CDKN2A	NM_001195132.2	c.216C>A	Nonsense	Likely Oncogenic	0	1	Ja	IIA
BRCA1	NM_007294.4	c.4102_4103delGCinsTA	Nonsense	Likely Oncogenic	0	1	Ja	IIIA
SMAD4	NM_005359.6	c.413C>A	Nonsense	Likely Oncogenic	0	1	Nein	-
KMT2D	NM_003482.4	c.10841C>G	Nonsense	Likely Oncogenic	1	0	Ja	Keine Angabe
PTEN	NM_000314.8	c.195C>G	Nonsense	Likely Oncogenic	1	0	Ja	IIIA
NOTCH1	NM_017617.5	c.561delG	Deletion	Oncogenic	1	0	Ja	Keine Angabe

Die Angaben zum Effekt der Varianten sind gemäß OncoKB [62], die Informationen in den Spalten Actionable? und Evidenz sind entsprechend Marret et al. [25]. Die Einteilung der Mutationen als potentiell Target gemäß ESCAT reicht von I bis V: Sinngemäß I=Target geeignet für Implementierung in klinischen Alltag; II=Vorteil durch zielgerichtete Therapie wahrscheinlich, jedoch zusätzliche Daten nötig; III=klinischer Nutzen in anderen Tumoren bzw- für ähnliche Targets nachgewiesen; IV=präklinische Evidenz als potentielles Target; V=Evidenz als potentielles Co-Target; X= keine Evidenz als potentielles Target [63]

4.4.5 Vergleich der Primarius- und vRezidiv-Proben

Insgesamt lagen von 16 Proben auswertbare Sequenziererergebnisse vor. Davon gehörten acht Proben der Gruppe der Primarius und acht Proben der Gruppe vRezidiv an. In der Gruppe der Primarius-Proben wurden mehr Varianten detektiert (59 Calls) als in der Gruppe der vRezidiv Proben (49 Calls). Die Differenz der Mutationsfrequenz der einzelnen Gene zwischen den zwei Gruppen betrug im Mittel 12,99%. Bei den Genen MAML3 und ZFHX3 war diese Differenz mit jeweils 37,50% am größten (Siehe Tabelle 14, vollständige Tabelle siehe Tabelle 30 im Anhang).

Für MAML3 lag die Mutationsfrequenz in der Gruppe der Primarius bei 25% und in der Gruppe vRezidiv bei 62,50%. Für ZFHX3 lag die Mutationsfrequenz in der Gruppe der Primarius bei 37,5%, und in der Gruppe vRezidiv bei 0%. Eine Übersicht über die mutierten Gene bei den einzelnen Patienten geben Abbildung 8 und Abbildung 9.

Für fünf Patienten lagen Sequenziererergebnisse vom Primarius und vom vRezidiv vor. Hierbei zeigen sich hinsichtlich der mutierten Gene Unterschiede in den Mutationsmustern zwischen den Primarius- und vRezidiv-Proben. Während bei zwei Patienten eine geringe Zunahme der Anzahl an mutierten Genen in den Rezidivproben festgestellt wurde, war bei drei Patienten eine Reduktion der Anzahl mutierter Gene festzustellen. Insbesondere bei den Patienten Nummer 201 und 220 wurden in der vRezidiv-Probe deutlich weniger mutierte Gene festgestellt als in der Primarius Probe. Über die fünf Patienten mit zwei auswertbaren Proben wurden 66 Calls, verteilt auf 51 verschiedene Varianten detektiert. Es wurden dabei 28 der 66 Calls (42,4%) sowohl im Primarius als auch im vRezidiv detektiert. Hiervon wurden vier verschiedene Varianten identifiziert, für die laut OncoKB [21] ein onkogener Effekt bekannt war (siehe Tabelle 15). Von den 66 Calls wurden 27 Calls (40,9%) nur in den Primarius-Proben detektiert. Hiervon wurden zehn Varianten identifiziert, für die laut OncoKB [62] ein onkogener Effekt bekannt war. Elf Calls traten neu in der Gruppe vRezidiv auf, hiervon war laut OncoKB [62] für drei Varianten ein onkogener Effekt bekannt (siehe Tabelle 16). Für sechs der elf Patienten lag jeweils nur das auswertbare Sequenziererergebnis von einer Probe vor. Hiervon gehörten jeweils drei Proben zur Gruppe Primarius und vRezidiv. In dieser Gruppe wurden insgesamt 42 Calls detektiert, wovon zehn Varianten identifiziert wurden, für die laut OncoKB [62] ein onkogener Effekt bekannt war (Siehe Tabelle 16). Dabei wurden in der Gruppe vRezidiv mehr Calls (23 Calls) detektiert, als in der Gruppe der Primarius-Proben (19 Calls). Exemplarisch ist in Abbildung 10 der Lollipop-Plot des TP53 Gens mit den über alle 16 Proben verteilten detektierten Varianten dargestellt. Der Lollipop Plot zeigt eine schematische Darstellung des Gens mit den detektierten Varianten im Verhältnis zu den Aminosäuren Positionen, für welche das Gen kodiert.

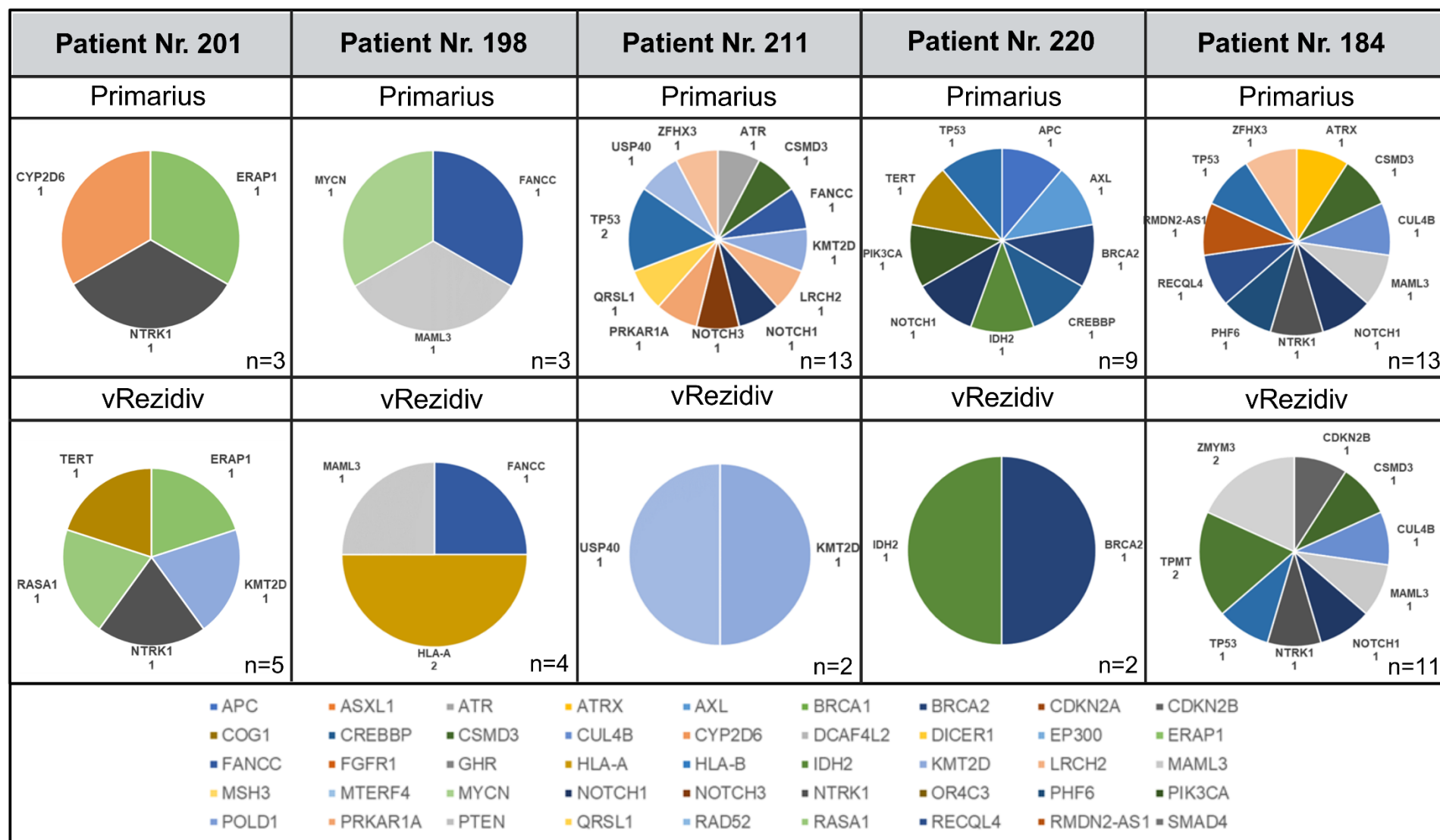


Abbildung 8: Übersicht über die mutierten Gene in Patienten mit auswertbarer Primarius- und vRezidiv-Probe.

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Größere Ansicht siehe Abbildungen 11-13 im Anhang. Abbildung erstellt mit BioRender.com

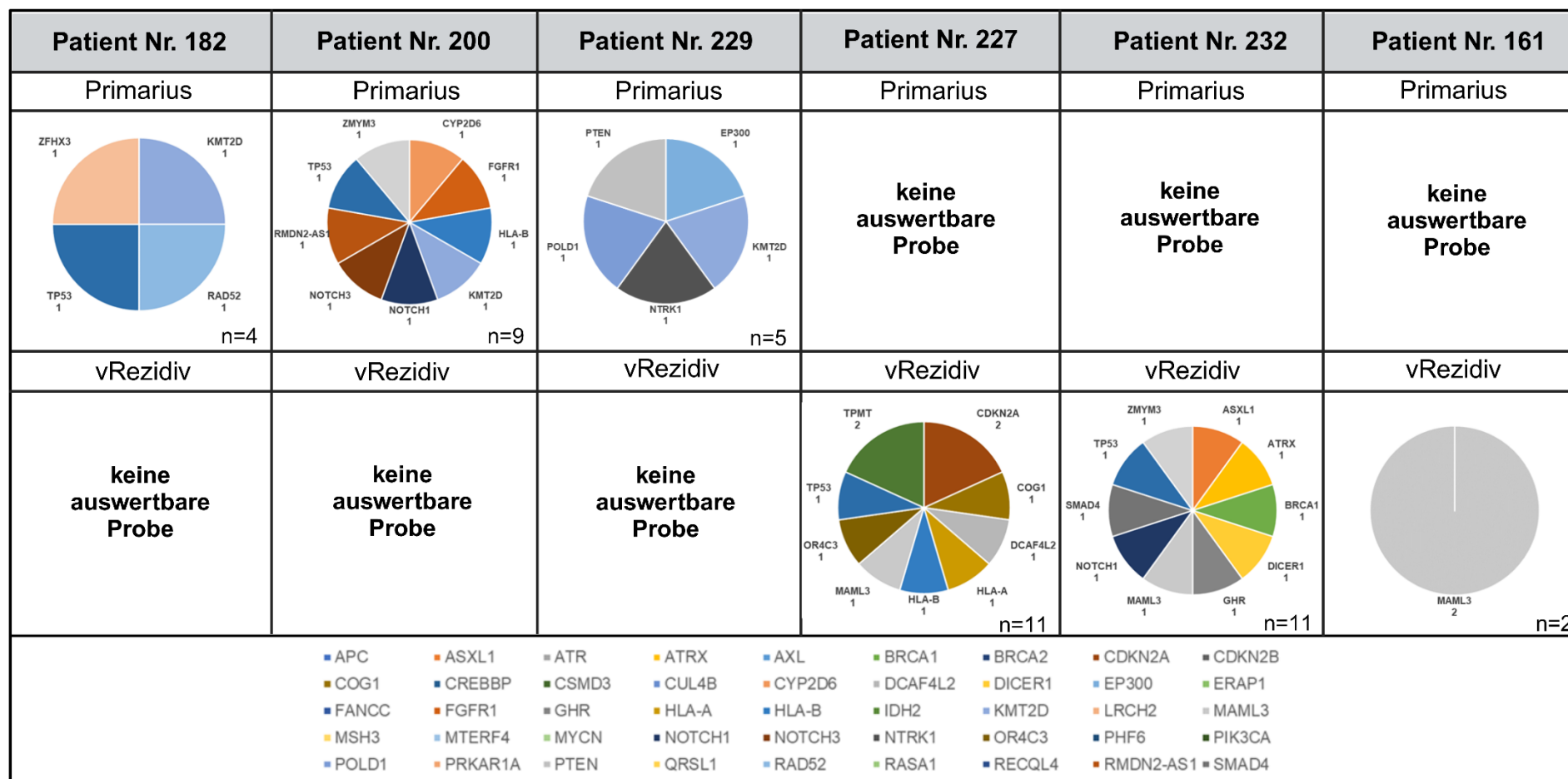


Abbildung 9: Übersicht über die mutierten Gene in Patienten mit nur einer auswertbaren Probe

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Größere Ansicht siehe Abbildungen 14-16 im Anhang. Abbildung erstellt mit BioRender.com

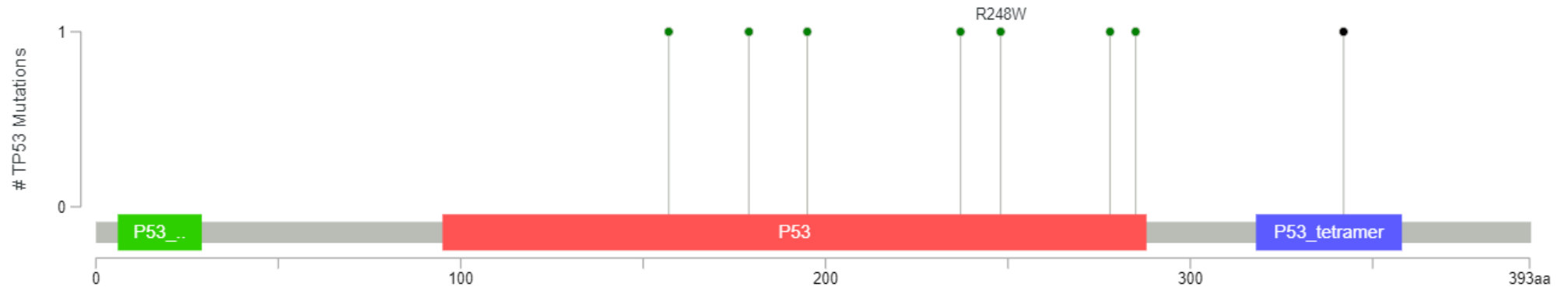


Abbildung 10: Lollipop Plot mit allen detektierten Varianten im TP53 Gen

Der graue Balken stellt das gesamte Protein entlang der X-Achse mit den verschiedenen Aminosäurepositionen (aa) dar. Die farbigen Kästen stellen spezifische funktionelle Domänen des TP53 dar (Grün: Transaktivierungsdomäne; Rot: DNA-Bindungsdomäne; Blau: Tetramerisierungsdomäne). Jede Position mit einer Mutation erhält einen Kreis, die Höhe der Linie hängt von der Anzahl der an diesem Codon entdeckten Mutationen ab. Abbildung erstellt mit cBioPortal [71, 72].

4.4.6 Vergleich klinischer Gruppen

Zum Vergleich der klinischen Gruppen ist anzuführen, dass es sich aufgrund der kleinen Gruppengröße der Pilotkohorte bei den Vergleichen lediglich um eine deskriptive Betrachtung der Sequenzierergebnisse handelt. Um statistisch signifikante Unterschiede nachzuweisen, ist eine Ausweitung der Pilotkohorte zu größeren Kohorten nötig.

4.4.6.1 Vergleich nach HPV-Status

Der HPV-positive Patient wies im Mittel weniger detektierte Calls (4 Calls pro Probe) auf als die Gruppe der HPV-negativen Patienten (6,45 Calls pro Probe). Auch die Anzahl an detektierten Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt war beim HPV-positiven Patienten mit zwei Varianten pro Probe etwas geringer als in der Gruppe der HPV-negativen Patienten mit durchschnittlich 2,18 onkogenen Varianten pro Probe.

4.4.6.2 Vergleich der Patienten nach Tumordifferenzierung

Die Gruppe mit Tumordifferenzierungsgrad G2 wies im Mittel mehr detektierte Calls (8,22 Calls pro Probe) als die Gruppe mit der Tumordifferenzierungsgrad G3 (4,00 Calls pro Probe). Auch die Anzahl an detektierten Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt war bei der Gruppe mit Tumordifferenzierungsgrad G2 mit durchschnittlich 2,33 Varianten pro Probe etwas höher als in der Gruppe mit dem geringeren Tumordifferenzierungsgrad G3 mit durchschnittlich 1,43 Varianten pro Probe.

Tabelle 17: Vergleich der Patienten nach Tumordifferenzierung

	G2 (n=6)	G3 (n=3)
Calls pro Probe	8,22	4,00
Varianten mit bekanntem onkogenem Effekt pro Probe	2,33	1,43

4.4.6.3 Vergleich der Patienten nach Therapie

Bei der Gruppe der Patienten, die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren und klassische Therapie erhielten wurden im Mittel weniger Calls pro Probe detektiert (5,50 Calls pro Probe), als in der Gruppe der Patienten die reine Supportion erhielten (8,38 Calls pro Probe) und mehr Calls als beim Patienten der klassische Therapie ohne zusätzliche Immuntherapie erhielt (4 Calls pro Probe). Die Gruppe die reine Supportion erhielt wies zudem mit durchschnittlich 2,25 Varianten pro Probe auch am meisten Varianten auf, für die ein onkogener Effekt bekannt war. Die Gruppe, die Immuntherapie und klassische Therapie erhielt, wies durchschnittlich 2,00 bekannte onkogene Varianten pro Probe auf, der Patient der nur klassische Therapie erhielt durchschnittlich 0,5 bekannte onkogene Varianten pro Probe.

Tabelle 18: Vergleich der Patienten nach medikamentöser Therapie

	Immuntherapie und klassische Therapie (n=5)	Klassische Therapie (n=1)	Supportive Therapie (n=5)
Calls pro Probe	5,50	4,00	8,38
Varianten mit bekanntem onkogenem Effekt pro Probe	2,00	0,5	2,25

4.4.6.4 Vergleich der Patienten nach Therapieansprechen

Der einzige Patient bei dem kein Ansprechen auf die Therapie registriert wurde (Non-Responder) zeigte mit fünf detektierten Calls pro Probe und einer detektierten Variante mit bekanntem onkogenen Effekt pro Probe keine wesentlichen Unterschiede verglichen mit der Gruppe der Responder mit durchschnittlich 6,87 detektierten Calls pro Probe und 1,93 detektierten Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt pro Probe.

Tabelle 19: Vergleich der Patienten nach Therapieansprechen

	Responder	Non-Responder
Calls pro Probe	6,87	5,00
Varianten mit bekanntem onkogenem Effekt pro Probe	1,93	1,00

4.4.6.5 Vergleich der Patienten nach PD-L1 Status

Die Patienten mit positivem PD-L1 Status wiesen im Mittel mehr detektierte Calls pro Probe (8,00 Calls pro Probe) auf als die Patienten mit unbekanntem PD-L1 Status (6,57 Calls pro Probe). Auch die Anzahl an Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt war bei den PD-L1 positiven Patienten durchschnittlich etwas größer (2,50 Varianten pro Probe) als bei den Patienten mit unbekanntem PD-L1 Status (2,10 Calls pro Probe).

Tabelle 20: Vergleich der Patienten nach PD-L1-Status

	PD-L1 positiv	PD-L1 unbekannt
Calls pro Probe	8,00	6,57
Varianten mit bekanntem onkogenem Effekt pro Probe	2,50	2,10

4.4.6.6 Vergleich der Patienten nach Vorbehandlung mit Radio-/Chemotherapie

Drei Patienten hatten bereits vor der HNSCC-Erkrankung im Rahmen einer anderen Tumorerkrankung Radio-/Chemotherapie erhalten und wiesen mit durchschnittlich 8,75 Varianten pro Probe mehr Varianten pro Probe auf als die Gruppe von Patienten, die vor der HNSCC-Erkrankung noch keine Radiotherapie erhielt mit 6,36 Varianten pro Probe. Die Anzahl an detektierten Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt war bei beiden Gruppen mit durchschnittlich jeweils zwei Varianten pro Probe identisch.

	Radio-/Chemotherapie im Vorfeld erhalten	Keine Radiochemotherapie im Vorfeld erhalten
Calls pro Probe	8,75	6,36
Varianten mit bekanntem onkogenem Effekt pro Probe	2,00	2,00

4.4.7 Tumormutationslast und Mikrosatelliteninstabilität

Der TMB-Wert lag bei zwei von 16 Proben (12,5%) oberhalb des Grenzwertes von zehn Mutationen/Mb, der Tumor galt in dieser Gruppe als TMB-high. Die Proben stammten beide aus einem Primarius. Der Mittelwert in dieser Gruppe betrug 10,89 Mutationen/Mb. Die gematchten Proben aus der Gruppe vRezidiv konnten nicht erfolgreich sequenziert werden, sodass keine zugehörigen TMB-Werte der Rezidive zu den zwei Proben vorliegen. Einer der zwei Patienten mit TMB-high Status wies mit 209 Tagen die kürzeste Überlebenszeit nach Erstdiagnose auf. Der andere Patient mit TMB-high Status war zum Zeitpunkt der Datenbankschließung noch am Leben (Zeit Erstdiagnose – Datenbankschluss 288 Tage). Bei 12 von 16 (75%) Proben lag der TMB-Wert unterhalb von zwei, der Tumor galt in dieser Gruppe als TMB-low. Der Mittelwert in dieser Gruppe betrug 5,78 Mutationen/Mb. Bei zwei von 16 Proben (12,5%) war trotz erfolgreicher Sequenzierung der TMB-Wert nicht auswertbar, da für die Qualitätsparameter Deaminierungswert und Verhältnis von C:G>T:A Substitutionen, die erforderlichen Werte nicht erfüllt wurden.

Bei allen ausgewerteten Proben lag der MSI Wert unterhalb von 25. Alle Tumore galten somit als mikrosatellitenstabil (MSS). Der MSI-Wert betrug im Mittel 3,69.

4.4.8 Loss of Heterozygosity

Die Auswertung der Loss of Heterozygosity (LOH) war bei elf von 16 Proben (69%) möglich. Dadurch lagen für insgesamt neun Patienten (82%) Informationen zum LOH-Status vor. Es wurde bei sechs Patienten an mindestens einer Position ein Loss of Heterozygosity festgestellt. Über alle Proben verteilt wurde an 12 verschiedenen Positionen 31-mal ein LOH detektiert. Bei allen betroffenen Genen handelt es sich gemäß OncoKB um ein Tumorsuppressorgen, mit Ausnahme von RAD54L [62]. Der Effekt des LOH war bei allen Genen ein Loss-of-Function. Es zeigte sich 12-mal ein LOH mit copy number loss (CNL-LOH) und 15-mal ein LOH mit einer neutralen copy number (CNN-LOH). Dabei wurde im ATM und CHEK1 Gen bei einem Patienten ein Loss-of Heterozygosity registriert, obwohl die copy number drei betrug. Eine Übersicht über die LOH-Ergebnisse liefert Tabelle 21.

Tabelle 21: Positionen mit detektiertem Loss of Heterozygosity

Gen	Chromosom	Start Position	End Position	Patienten mit CNL-LOH	Patienten mit CNN-LOH
PPP2R2A	8p21.2	26150700	26227954	1	0
CHEK2	22q12.1	29083868	29130729	1	0
BRCA2	13q13.1	32890491	32972932	0	2
RAD51D	17q12	33427950	33433499	0	1
RAD54L	1p34.1	46714017	46743978	0	1
POLD1	19q13.33	50902079	50921235	0	1
RAD51B	14q24.1	68290164	69061406	0	1
PTEN	10q23.31	89623659	89725309	1	2
NBN	8q21.3	90947783	90996842	1	0
ATM	11q22.3	108098341	108236285	3	3*
CHEK1	11q24.2	125496639	125525271	3	3*
BARD1	2q35	215593375	215674382	2	1

*Jeweils eine Probe mit Copy Number Gain mit copy number =3 anstelle copy number neutral LOH mit copy number=2; CNL: Copy Number Loss; CNN: Copy Number Neutral

Einen Überblick über den Anteil von Loss-of-Heterozygosity am gesamten Genom einer Probe (Sample Level LOH) als Maß für Genomische Instabilität liefert Tabelle 22. Der Anteil der Sample Level LOH betrug durchschnittlich 20,3%.

Tabelle 22: Übersicht über die Sample Level LOH

Patientennummer	Sample Level LOH In %
184	39,7*
201	Na
198	0,0
229	12,9
200	38,4
211	18,5
161	Na
182	35,4
220	0,7
227	6,4
232	30,4

*Die sample level LOH von Patient Nr.184 als einziger Patient mit 2 Proben wurde der Übersichtlichkeit wegen Gemittelt.

Von einem Patienten (Patientennummer 184) war sowohl für die Primarius-Probe als auch für die vRezidiv-Probe die Auswertung des LOH-Status verfügbar. In der Primarius-Probe wurden auf 11q22.3, 11q24.2, 1p34.1 und 17q12 die in Tabelle 21 aufgeführten CNN-LOH festgestellt. Bis auf den Verlust auf 17q12 zeigten sich in der vRezidiv-Probe alle LOH, die auch in der Primarius-Probe detektiert wurden. Zusätzlich wurden die in Tabelle 21 aufgeführten CNN-LOH auf 14q24.1 und 10q23.31 detektiert. Die sample level LOH betrug in der Primarius und vRezidiv Probe 30,8% und 48,7%.

V. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Durchführbarkeit einer komplexen NGS-Analyse bei HNSCC anhand einer Pilotkohorte untersucht. Durch eine einheitliche, erweiterte molekulare Diagnostik bei HNSCC soll die Identifikation prognostischer und therapeutisch relevanter Biomarker ermöglicht werden. Mithilfe dieser Biomarker soll perspektivisch durch eine verbesserte Patientenstratifizierung und die Anwendung neuer zielgerichtete Therapien die aktuell schlechte Prognose von Patienten mit HNSCC verbessert werden. Dies gilt insbesondere für Patienten in der rezidierten Situation. Während konventionelle NGS-Analysen bereits gut etabliert sind, zielt diese Arbeit auf die Anwendung komplexerer Panels ab, die umfassendere Informationen über genomische Aberrationen oder genübergreifende Marker wie Tumormutationslast und den Mikrosatellitenstatus liefern können. Dies stellt insbesondere bei der Analyse von FFPE-Material eine besondere Herausforderung dar. Zunächst sollte ein solches komplexes Panel identifiziert werden, wofür ein HNSCC spezifisches Custom Panel designt und mit den kommerziellen Panels hinsichtlich der Durchführbarkeit verglichen wurde. Mit dem ausgewählten Panel wurde dann die DNA der Pilotkohorte sequenziert. Dabei wurde überprüft, ob die aus FFPE-Material gewonnene DNA für komplexe NGS-Analysen geeignet ist und ob die Auswertung der Sequenzierdaten die Identifikation prognostischer und therapeutisch relevanter Biomarker ermöglicht. Die folgende Diskussion wird die erhobenen Ergebnisse im Kontext der Zielstellung und aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse näher beleuchten.

5.1 Pilotkohorte

Die Pilotkohorte stellt eine besondere Kohorte an HNSCC-Patienten dar, da im Verlauf bei fast allen Patienten ein Rezidiv festgestellt wurde. Lediglich bei drei Patienten (27%) konnte ein vermutetes Rezidiv pathologisch nicht sicher bestätigt werden. Die Auswahl von Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC erfolgte bewusst, da tumorübergreifend Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichtete Therapie bisher vor allem in der rezidierten und metastasierten Situation angewandt werden. Zudem können durch das Vorhandensein mehrerer Proben im Krankheitsverlauf erworbene Resistenzmechanismen erkannt werden. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug 56 Jahre, und war damit geringer als das deutschlandweite mediane Erkrankungsalter für Kopf-Hals-Tumoren mit 64 Jahren bei Männern und 66 Jahren bei Frauen [17]. Männer haben ein 2-4-fach erhöhtes Risiko an HNSCC zu erkranken [73]. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug dagegen in der Pilotkohorte 10 zu 1. Alle Patienten, für die der Status bezüglich Tabak- bzw. Alkoholkonsum bekannt war, gaben einen Konsum an. Dies unterstreicht den bekannten, großen Einfluss von Tabak -und Alkoholkonsum für die Entstehung von HNSCC. Rauchen gilt als Hauptrisikofaktor für HPV-negatives HNSCC und auch der Konsum von Alkohol gilt als wichtiger Risikofaktor [73]. Darüber hinaus konnte ein synergistischer Effekt für Rauchen und Alkoholkonsum festgestellt werden. Die drei häufigsten

Lokalisationen in der Pilotkohorte waren Hypopharynx (n=3), Zunge (n=2) und Mundboden (n=2), wohingegen die meisten Kopf-Hals-Tumoren im Oropharynx lokalisiert sind. Dies erklärt auch die niedrige Anzahl an HPV-positiven Patienten (n=1) in der Kohorte im Vergleich zu den HPV-negativen (n=7), da über 70% der Oropharynxkarzinome mit einer HPV-Infektion assoziiert sind [20], während die Prävalenz von positivem HPV-Status in den restlichen Lokalisationen von HNSCC deutlich geringer ist [74]. Der HPV-Status war für drei Patienten nicht bekannt. Da der HPV-Status aber hinsichtlich der molekularen Charakteristik und der Prognose eine entscheidende Rolle spielt [19, 21, 74], gilt es bei einer Ausweitung der Kohorte den HPV-Status von allen Patienten zu erfassen. Gleiches gilt für den PD-L1 Status. Er war nur für zwei Patienten (18%) bekannt. Für die Immuntherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ist der PD-L1-Status von entscheidender Bedeutung [48, 49, 67] und gemäß der aktuellen AWMF-Leitlinie für das Mundhöhlenkarzinom (Stand 09/2024) therapieentscheidend [28]. Eine mögliche Erklärung des niedrigen Anteils an Patienten mit bekanntem PD-L1 Status liefert der Erkrankungszeitraum der Kohorte von 2008 bis 2019. Eine Erfassung des PD-L1 Status gehörte zu dieser Zeit noch nicht zum Standard. Die Daten werden demnach in Zukunft vollständiger sein und sind für zukünftige Kohorten insbesondere für Aussagen bezüglich der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren unabdingbar. Der Differenzierungsgrad der HNSCC war in der gesamten Kohorte mäßig (G2) bis schlecht (G3). Dies geht mit den deutschlandweiten erfassten Daten einher: Nur eine Minderheit der Kopf-Hals-Tumoren sind gut differenziert [17]. Es ist davon auszugehen, dass der Differenzierungsgrad bei rezidierten Tumoren schlechter ist.

Um signifikante Aussagen, besonders beim Vergleich der klinischen Gruppen treffen zu können, bedarf es einer größeren Kohorte.

5.2 Überprüfung der DNA-Qualität mit etabliertem Panel

Bevor die Eignung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus untersucht werden konnte, musste eine ausreichende Qualität der verwendeten DNA mit einem Routine Panel sichergestellt werden. Hierfür wurden die verfügbaren Proben mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 sequenziert. Neben der Evaluation der DNA-Qualität erlaubte die Sequenzierung der gleichen Proben mit einem anderen Panel zudem eine bessere Einschätzung der Performance des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. Die konventionelle Mindestabdeckung von 500 reads, welche gewählt wird, um bei einem Cutoff von 2% Mutationen sicher von falsch positiven Signalen zu unterscheiden, wurde mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 in durchschnittlich über 90% der Amplikons erreicht. Ein wichtiges Kriterium in der Evaluation der DNA-Qualität ist die Fragmentierung der DNA [75]. Eine unzureichende DNA-Qualität durch Fragmentierung beeinflusst besonders die Amplifikation der langen Amplikons [76]. Mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 wurde eine end-to-end Sequenzierung, also eine

vollständige Sequenzierung des Amplikons, in annähernd 99% der Amplikons erreicht: Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bei einer durchschnittlichen Amplikonlänge von 154 bp (Bereich 111-187 bp) des Panels die Amplikons in einem Großteil der Fälle vollständig abgedeckt wurden. Die durchschnittliche Abdeckung der Amplikons betrug 2268 reads/Amplikon. Nakagaki et al. sequenzierten im Rahmen ihrer Studie 2018 ebenfalls mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 die FFPE-DNA von 74 Patienten mit Oralem Plattenepithelkarzinom (kurz: OSCC) [77]. Sie erzielten im Vergleich nur eine Abdeckung von 1123 reads/Base. Nakagaki et al. legten für eine erfolgreiche Sequenzierung folgende Mindestwerte fest: On-target reads >75%, coverage uniformity (>75%) und mittlere Abdeckungstiefe 250X. Dies erreichten sie in 36 von 74 Proben (48,6%). Dieselben Mindestwerte wurden im Rahmen dieser Arbeit dagegen in 17 von 19 Proben (89,5%) erreicht. Die hohe Rate an erfolgreich sequenzierten Proben, die überwiegend guten Qualitätsparameter und die Überlegenheit hinsichtlich der Erfolgsrate im Vergleich zu Proben anderen Studien weisen darauf hin, dass die DNA-Qualität der FFPE-Proben geeignet war, um eine Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus durchzuführen.

5.3 Auswahl des komplexen Panels

Die mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus detektierten Calls im Rahmen dieser Studie verteilen sich auf 51 Gene. Nur neun dieser 51 Gene wären auch mit dem deutlich kleineren Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 abgedeckt worden. Dies zeigt, dass ein kleines, kommerzielles, nicht HNSCC spezifisches tNGS-Panel das molekulare Mutationsprofil von HNSCC nur eingeschränkt widerspiegelt. Um die molekulare Charakterisierung zu verbessern und potentielle therapeutische Targets zu identifizieren, ohne direkt auf das wesentlich umfangreichere Whole-Exome-Sequencing zurückgreifen zu müssen, bedarf es also eines größeren und für HNSCC spezifischeren tNGS-Panels als das Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2.

5.3.1 Design eines Custom-NGS-Panels für HNSCC

Das Design eines spezifischen tNGS-Panels bietet besonders für die Anwendung an Kohorten mit nur einer Tumorentität Vorteile, da die Sequenzierung so deutlich gezieltere Informationen liefern kann als mit einem entitätsübergreifenden Panel. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Custom Panel Design erfüllte die für unsere Anwendung gestellten Voraussetzungen. Es wäre mit einer Größe von etwa 500 kb und 4800 Amplikons auch mit vergleichsweise kleinen Sequenziergeräten wie dem Ion PGM™ System anwendbar gewesen. Das Ion PGM™ System weist eine maximale Sequenzierkapazität von 5 Mio. Reads auf, sodass mit dem Custom Panel bei einer Coverage von 500X etwa 2 Proben pro Chip sequenziert werden

könnten. Zudem deckte das Design die am häufigsten mutierten und prognostisch relevanten Gene ab und lieferte Hinweise bezüglich potentiellen therapeutischen Targets.

Für HNSCC gibt es zum jetzigen Stand (09/2024) noch keine spezifischen, umfassenden NGS-Panel kommerziell zu erwerben. Weiterhin ist die Anzahl bereits in Academia verwendeter spezifischer HNSCC-Panel gering. Zudem kommt hinzu, dass diese Panel sich je nach Intention hinsichtlich Größe und Genauswahl unterscheiden. Shanmugam et al. veröffentlichten 2021 eine Studie zur Früherkennung von HNSCC durch Sequenzierung von DNA aus Speichelproben [78]. Angewandt wurde ein sieben Gene umfassendes Custom Panel. Die Auswahl der Gene beruhte auf den am häufigsten mutierten Genen aus vorherigen Studien. Alle sieben Gene waren auch Teil des Custom Panel Design im Rahmen dieser Arbeit.

Dongre et al. verfolgten in [79] einen ähnlichen Ansatz: Sie veröffentlichten 2021 ein Custom Panel bestehend aus 31 Genen, basierend auf den am häufigsten mutierten Genen in HNSCC. Zwanzig der 31 Gene des Panels von Dongre et al. waren auch Teil des im Rahmen dieser Studie designten HNSCC-Panels. Zusätzlich zu den Genen mit der höchsten Mutationsfrequenz wurden beim Panel Design im Rahmen dieser Arbeit auch relevante Gene für Target- und Immuntherapie ausgewählt. Einige dieser Gene waren folglich nicht Bestandteil des Panels von Dongre et al. Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie für die Aufnahme von Genen in das Panel, die sich sowohl nach den am häufigsten mutierten Genen, als auch nach den Genen mit Relevanz für Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichtete Therapie richtete, erscheint dabei am besten geeignet, um relevante klinische Informationen durch die Sequenzierung zu gewinnen. Durch eine reine Fokussierung auf die am häufigsten mutierten Gene wie bei Dongre et al. werden relevante Informationen für den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichteter Therapie nicht berücksichtigt.

Ein Jahr nach dem Design des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Custom Panels wurde 2021 von Marret et al. eine Arbeit zur Einstufung verschiedener molekularer Alterationen als potentielle Targets für zielgerichtete Therapien veröffentlicht [25]. Lediglich 17 der 34 Gene die von Marret et al. als potentielles Target beschrieben wurden, waren auch Teil des Custom Panels. Dies zeigt, dass es je nach Anwendung und Anforderung an das NGS-Panel verschiedener Designs bedarf und zeigt die Schwierigkeit der Vereinbarung der einerseits möglichst vollständigen Erhebung der relevanten Sequenzierdaten und andererseits der Reduktion der Panelgröße für eine bessere Durchführbarkeit. Daher benötigt es eine bessere, einheitlichere Priorisierung der Gene nach der klinischen Evidenz, insbesondere für die Anwendung einer zielgerichteten Therapie. Einteilungen wie die ESCAT scheinen hier der richtige Weg zu sein.

5.3.2 Vergleich des Custom Panels mit kommerziellen Panels

Trotz der Vorteile eines Custom Panels hinsichtlich der Spezifität entschied man sich im Rahmen dieser Arbeit für die Sequenzierung der Pilotkohorte für den Oncomine™ Comprehensive

Assay Plus. Wie in 4.3.2 beschrieben, war das Custom Panel nur in großen Verpackungsgrößen ab 1000 Reaktionen erhältlich. Da ein Kauf eines Panels in dieser Verpackungsgröße einen erheblichen finanziellen Aufwand von über 40 000€ darstellt, war eine Sequenzierung mit dem Custom Panel im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine Alternative um eine eigene Auswahl an Genen zu sequenzieren, stellen die Ion AmpliSeq On-Demand Panels dar, die schon ab acht Reaktionen erhältlich sind. Aus einer bestehenden Liste von Genen kann eine Auswahl getroffen werden um ein spezifisches On-Demand Panel zu erstellen [80]. Zur Zeit des Designs des Custom Panels im Rahmen dieser Arbeit war nur eine Minderheit der 62 Gene als Teil eines On-Demand Panels auswählbar, sodass dies keine zielführende Alternative darstellte. Die Liste an auswählbaren Genen wird aber stetig erweitert, sodass eine Sequenzierung der 62 Gene im Form eines On-Demand Panels mit kleineren Verpackungsgrößen in Zukunft möglich sein könnte. Dies gilt es in Erweiterung an diese Arbeit zu überprüfen.

5.4 Eignung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

5.4.1 Informationsgewinn durch den Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Die Sequenzierung der Tumor-DNA eines HNSCC Patienten mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus liefert viele, potentiell wichtige Informationen für Prognose und Therapie. Mit über 500 sequenzierten Genen deckt der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus viele der für HNSCC relevanten Gene ab. So sind mit Ausnahme von NSD1 alle 34 Gene, die von Marret et al. in [25] als die wesentlichen actionable Alterationen in HNSCC beschrieben wurden, Teil des Panels. Durch die Detektion der Tumormutationslast (TMB) liefert das Panel prognostisch wichtige Informationen zum Outcome in HNSCC nach Radiochemotherapie [47] und zum Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren [48, 81]. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erfasst zudem den Mikrosatellitenstatus, ein weiterer Prädiktor des Ansprechens auf Immuncheckpoint-Inhibitoren [49, 50, 81]. Im Rahmen der Phase-II Keynote-158 Studie wurde beispielsweise für das kolorektale Karzinom eine verbesserte Response in Patienten mit MSI-H Status beobachtet, sodass für Pembrolizumab eine Zulassung der FDA für alle Patienten mit MSI-H Status besteht, unabhängig der Tumorentität [24, 25]. Das Panel liefert darüber hinaus Informationen zur Copy Number Variation (CNV) und zum Loss-of-Heterozygosity (LOH). Beide Parameter geben Hinweise über chromosomale Instabilität und sind somit Prädiktoren für Karzinogenese und maligne Transformation [82]. Sie sind potentielle Marker für Prognose und Therapie [19, 83]. Das umfassende Spektrum zeigt den möglichen Informationsgewinn durch eine Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. Allerdings ist für eine Anwendung im klinischen Alltag beziehungsweise in Rahmen großer Studien eine einheitliche Auswertung nötig, um die erfassten Informationen vergleichbar zu machen und das volle Potential des Panels nutzen zu können.

Trotz einer Panelgröße von über 1 Mb, deckt der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus allerdings nicht alle relevanten Gene für HNSCC ab. So waren 16 der 62 Gene des im Rahmen dieser Arbeit designten Custom Panels nicht Teil des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. Darunter ist das NSD1 Gen, welches in einer 279 Patienten umfassenden Kohorte des The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) in 10% mutiert [21] war, NSD1 gilt gemäß OncoKb als Tumor Suppressor Gen [62]. Ebenso nicht Teil des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus sind TTN und MUC16, sie wurden in einer 528 HNSCC-Patienten umfassenden Kohorte des TCGA (eine Erweiterung der oben genannten TCGA Kohorte) mit einer Mutationsfrequenz für somatische Mutationen von respektive 39% und 19% beschrieben [19] und gehörten in dieser Kohorte zu den vier am häufigsten mutierten Genen. TTN und MUC16 werden allerdings gemäß OncoKB nicht als onkogen eingestuft [62].

5.4.2 Performance des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Für die potentielle Implementierung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus in den klinischen Alltag als zusätzliches Tool für Prognoseabschätzung und Therapiestratifizierung von HNSCC-Patienten, bedarf es einer zuverlässigen Panel Performance. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben: Von 39 Proben, für die eine Library-Herstellung begonnen wurde, konnten nur für 17 Proben auswertbare Sequenzierdaten erhoben werden (43,6%). Hierfür gibt es eine Vielzahl an möglichen Gründen, die allerdings nicht vollständig zu klären sind. Einer der möglichen Gründe ist eine unzureichende Qualität der aus den FFPE Proben isolierten DNA. Die eingeschränkte Qualität und Quantität der DNA bei Isolierung aus FFPE-Proben sind bekannt [84]. Eine der wesentlichen Schwierigkeiten bei der Sequenzierung stellt die hohe Rate an falsch positiven Mutationen aufgrund von Deaminierung von Cytosin dar. Die Deaminierung, ausgelöst durch Asservierung in FFPE, bewirkt eine Basenänderung von C zu T beziehungsweise von G zu A auf dem Antisense Strang (C:G > T:A) [85, 86]. Der durch Deaminierung ausgelöste Effekt wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit durch zwei verschiedene Strategien minimiert. Zum einen wurde gezeigt, dass die vor der Library-Herstellung durchgeführte Behandlung mit Uracil-DNA-Glykosylase den Artefakt durch Deaminierung signifikant reduziert [86–88]. Zum anderen wurde der Cutoff mit 20% so hoch gewählt, dass die durch Deaminierung verursachten Varianten, die meist eine geringe Allelfrequenz von unter 5% aufweisen [84], nicht als falsch positive Mutationen detektiert wurden. Dieser Effekt scheint demnach nicht der führende Grund für die beobachtete, vergleichsweise geringe Erfolgsrate des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus zu sein.

Vielmehr scheint die geringe DNA-Konzentration nach Isolierung und die geringe Amplifizierbarkeit ausschlaggebend für eine geringe Auswertbarkeit der Sequenzierungsergebnisse zu sein: Die Fixierung des Gewebes mit Formalin und die Lagerungsmodalitäten wie Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur beeinflussen die Ausbeute an isolierter DNA [89]. So konnte von

Guyard et al. gezeigt werden, dass nach rund 5 Jahren Lagerungsdauer nur noch 11% der ursprünglich verfügbaren DNA amplifizierbar waren. Dies deckt sich mit den unter 4.4.2 beschriebenen Ergebnissen, dass in 15 von 23 Proben (65,2%) die mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus sequenziert wurden, die geforderte Librarykonzentration von 50 pM nicht erreicht wurde. Dem ist entgegenzuhalten, dass die aufgrund zu geringer Librarykonzentration verworfenen Proben NF373, NF379 und NF409 die erforderliche Librarykonzentration bei Libraryherstellung mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 erreichten (Librarykonzentrationen siehe Anhang). Lediglich die Probe NF374 konnte mit beiden Panels nicht ausreichend amplifiziert werden (Siehe qPCR-Ergebnisse im Anhang). Wie bereits erwähnt, können besonders die längeren DNA Fragmente durch die von FFPE ausgelöste Fragmentierung schlechter amplifiziert werden [76]. Die schlechtere Amplifizierbarkeit von längeren DNA-Fragmenten erklärt jedoch nicht die in dieser Arbeit beobachtete schwächere Panel Performance des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus gegenüber dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, da der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus trotz der schlechteren Performance mit 118 bp (Bereich 60–168 bp) eine geringere durchschnittliche Amplikonlänge aufweist als das Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 mit 154 bp (Bereich 111-187 bp). Das Hauptproblem des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus liegt in der wesentlich höheren Anzahl an Primern (6738 Primern pro Pool in Pool 1 und 6735 Primern pro Pool in Pool 2) gegenüber dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (207 Primern pro Pool). Da die optimale Annealing-Temperatur der einzelnen Primer unterschiedlich ist, wird eine durchschnittliche Annealing-Temperatur für alle Primer eines Pools angewandt. Ist diese Temperatur zu gering für einzelne Primer, binden sie unspezifisch an Sequenzen, die der Zielsequenz ähneln und eine falsche Sequenz wird amplifiziert. Ist die Temperatur zu hoch für einzelne Primer, kommt es nicht zur Amplifikation [90]. Dies macht die PCR wesentlich komplexer und führt in Verbindung mit einer bereits ohnehin eingeschränkten Amplifizierbarkeit der DNA zu einer geringeren Abdeckung und somit zu einer geringeren Anzahl an auswertbaren Sequenzierungsergebnissen beim Oncomine™ Comprehensive Assay Plus.

Diese Arbeit ist zum derzeitigen Stand (09/2024) die einzige Arbeit, die Sequenzierdaten von einer HNSCC Kohorte mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erhoben hat. Vestergaard et al. veröffentlichten eine Studie mit 50 FFPE-Proben von Patienten mit Ovarialkarzinom, in der die Sequenzierung ebenfalls mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus durchgeführt wurde [91]. Sie beobachteten durchschnittlich 21,45 ($\pm 4,21$) Millionen mapped Reads und eine Uniformity von 92,53%. Demgegenüber stehen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen 24,07 ($\pm 17,31$) Millionen mapped Reads pro Probe und eine Uniformity von 88,89%. Ob Proben aufgrund zu geringer DNA-Konzentration nicht sequenziert werden konnten, geht aus der Veröffentlichung von Vestergaard et al. nicht hervor. Die durchschnittliche Anzahl der mapped Reads und die Uniformity war dennoch vergleichbar mit den von uns

erhobenen Werten. Die durchschnittliche Anzahl der mapped Reads lagen bei der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten etwas über, bei den Daten von Vestergaard et al. etwas unter dem vom Hersteller empfohlenen 22 Millionen Reads pro Probe. Allerdings war die beobachtete Standardabweichung für die Anzahl der mapped Reads in der Pilotkohorte mit 17,31 Millionen Reads um ein vielfaches größer als in der Studie von Vestergaard et al. mit 4,21 Millionen Reads [91]. Dies kann durch die sieben Proben erklärt werden, die aufgrund ihrer geringen Anzahl an mapped Reads (durchschnittlich 5,81 Millionen) von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden. Interessanterweise wurde die Library in sechs dieser sieben Proben automatisiert hergestellt. Eine Kontrolle der DNA-Konzentration der Library vor Sequenzierung, wie sie bei der manuellen Libraryherstellung mittels qPCR gegeben ist, fand gemäß Hersteller bei der automatisierten Libraryherstellung nicht statt. Die höhere Erfolgsrate der sequenzierten, manuell hergestellten Libraries weist darauf hin, dass ein solcher Kontrollschritt die Rate an auswertbaren Sequenziererergebnissen vergrößern könnte. Eine solche Kontrolle wäre beispielsweise mit dem Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis Kit möglich, mit welchem neben der Konzentration der Größe der DNA-Fragmente untersucht wird. Dennoch ist festzustellen, dass im Verhältnis zur Anzahl an Proben für die eine Library-Herstellung begonnen wurde, der Anteil an auswertbaren Ergebnissen insgesamt bei der automatisierten Libraryherstellung deutlich höher war (10 von 16 Proben, 62,5%) als bei der manuellen Library-Herstellung (7 von 23 Proben, 30,4%). Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die automatisierte Library-Herstellung der manuellen überlegen ist, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der Richtwert für die Library-Konzentration in der qPCR im Anschluss an die manuelle Library-Herstellung mit 50 pM zu hoch gesetzt wurde. So konnten 6 der 7 (86%) Proben, die manuell hergestellt wurden und dem Richtwert entsprachen, erfolgreich sequenziert werden. Möglicherweise hätten einige der Proben, die aufgrund zu geringer Library-Konzentration verworfen wurden, auch auswertbare Sequenzierdaten geliefert.

Es bleibt festzuhalten, dass trotz der stabilen Performance der Proben mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (auswertbare Sequenziererergebnisse in 77,8% aller Proben) eine ausreichend zuverlässige Sequenzierung mit dem komplexeren Oncomine™ Comprehensive Assay Plus (auswertbare Sequenziererergebnisse in 43,6% aller Proben) nicht möglich war. Eine Optimierung des Protokolls ist somit Voraussetzung, um die Performance des Panels verbessern. Die meisten verfügbaren Methoden zur Verbesserung der Sequenziererergebnisse zielen aber auf die bessere Kontrolle der DNA-Qualität ab, um DNA mit vergleichsweise schlechterer Qualität zu verwerfen, und verbessern nicht die Erfolgsrate insgesamt. Um allerdings tNGS-Panel auch für die Routinediagnostik anwenden zu können, bedarf es einer stabilen Panel Performance auch mit Proben vergleichsweise schlechterer Qualität, wie dies mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 gezeigt wurde. Dies war mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus nicht gegeben, eine Verbesserung der Performance des Panels an sich

ist nötig. Auch für die Anwendung im Bereich der Forschung ist eine Erfolgsrate von unter 50% nicht zuverlässig genug, um größere Studien durchzuführen.

Ist die Verbesserung des Panels an sich nicht möglich bleibt nur die Möglichkeit der Verwendung von DNA besserer Qualität; um die Rate an auswertbaren Sequenzierergebnissen zu verbessern. So gilt beispielsweise die Qualität von isolierter DNA aus Fresh Frozen Tissue der aus FFPE-Material überlegen [92]. Es gilt zu untersuchen, ob die Verwendung von DNA aus Fresh Frozen Tissue die Performance des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus verbessern würde. Aufgrund höherer Kosten und aufwendiger Protokolle ist Fresh Frozen Tissue im klinischen Alltag jedoch kein Standard und daher nicht immer verfügbar. Die Probenasservierung in FFPE-Material bietet den Vorteil einer einfacheren Handhabung und die breite Verfügbarkeit, da Gewebeproben ohnehin routinemäßig mittels FFPE asserviert werden. Dies zeigt, dass für eine breite Anwendung eines tNGS-Panels eine zuverlässige Sequenzierung an FFPE-Proben erstrebenswert wäre.

5.5 Wahl des Cutoffs

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection; LOD) von aberranten Allelen beträgt für die konventionelle Sanger-Sequenzierung etwa 20% [93], wohingegen beim Next Generation Sequencing eine Detektion von Allelen mit einer variant allele frequency (VAF) von 5% und niedriger möglich ist [94, 95]. Solide Tumoren gelten als heterogen [96], insbesondere auch HNSCC [19]. Obwohl davon ausgegangen wird, dass Tumorzellen von einer Stammzelle ausgehen, zeigen sie im Krankheitsverlauf ein heterogenes Erscheinungsbild hinsichtlich Morphologie, Proliferation und Oberflächenmolekülen [97]. Dies ist zum einen epigenetisch bedingt, zum anderen geht man davon aus, dass intratumoral, genetisch verschiedene Klone entstehen [98, 99]. So wurde für verschiedene solide Tumoren eine intratumorale klonale Heterogenität (ITH) dargestellt [100–102], insbesondere auch für HNSCC [11]. Diese intratumorale Heterogenität hat zur Folge, dass die VAF der somatischen Mutationen nicht über die Gesamtheit des Tumors identisch sind. Ein möglicher Ansatz, um die durchschnittliche VAF in der Gesamtheit des Tumors abzubilden, wäre die DNA von verschiedenen Entnahmeorten des Tumors zu sequenzieren. Dies wäre im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich gewesen und auch im klinischen Alltag nicht praktikabel. Um der Heterogenität des Tumors dennoch gerecht zu werden und vor allem die treibenden, biologisch relevanten Mutationen abzubilden, wurde der Cutoff für Calls mit $VAF \geq 20\%$ vergleichsweise hoch gewählt. Zudem gewährleistet ein Cutoff von 20% die Vergleichbarkeit mit Methoden geringerer Sensitivität, wie beispielsweise der Sanger Sequenzierung. Trotz der Heterogenität von soliden Tumoren ist ein Cutoff bei einer VAF von 2-5% nicht unüblich [77] und auch in dieser Kohorte denkbar. Für eine ausreichende Spezifität der Calls bei einem Cutoff bei $VAF \geq 2\%$ ist eine Abdeckung von 500x nötig [103], dies wäre in den auswertbaren Proben in durchschnittlich 86,2% der Amplikons erfüllt. Durch das

Herausfiltern von Calls mit einer VAF unterhalb von 20% verringert sich die Anzahl unterschiedlicher, detektierter Calls auf von 4473 auf 85. Es ist daher davon auszugehen, dass durch Herabsetzen des Cutoffs von 20% auf 5% deutlich mehr onkogene beziehungsweise actionable Alterationen berücksichtigt würden. Die Analyse dieser Calls und vor allem auch deren biologische Relevanz gilt es in Erweiterung an diese Arbeit zu untersuchen.

5.6 Mutierte Gene

Die Ergebnisse sind bezüglich der Mutationshäufigkeit der einzelnen Gene im Wesentlichen konkordant mit der Literatur. Vergleicht man die Sequenzierdaten dieser Arbeit mit den Sequenzierdaten von insgesamt 434 DNA-Proben von HNSCC Patienten zusammengefasst aus mehreren Studien [21, 38–40, 66] mittels der Webanwendung cBioPortal [71, 72], ergibt sich Tabelle 23. Vollständige Tabelle siehe Anhang.

Tabelle 23: Häufigkeit der mutierten Gene der Pilotkohorte im Vergleich mit cBioPortal-Datensatz

Gen	UMR alle Proben (n=16)	UMR Primarius (n=8)	UMR Rezidive (n=8)	cBioPortal (n=434)
TP53	50,00%	62,50%	37,50%	69,10%
MAML3	43,75%	25,00%	62,50%	0,40%
KMT2D	37,50%	50,00%	25,00%	14,80%
NOTCH1	37,50%	50,00%	25,00%	15,50%
NTRK1	25,00%	25,00%	25,00%	1,10%
CSMD3	18,75%	25,00%	12,50%	19,30%
FANCC	18,75%	25,00%	12,50%	1,00%
TPMT	18,75%	12,50%	25,00%	0,40%
ZFHX3	18,75%	37,50%	0,00%	2,80%
ATRX	12,50%	12,50%	12,50%	5,40%
BRCA2	12,50%	12,50%	12,50%	3,90%
CUL4B	12,50%	12,50%	12,50%	1,40%
CYP2D6	12,50%	25,00%	0,00%	0,60%
ERAP1	12,50%	12,50%	12,50%	0,40%
HLA-A	12,50%	0,0%	25,00%	3,30%
HLA-B	12,50%	12,50%	12,50%	3,10%
IDH2	12,50%	12,50%	12,50%	Nicht verfügbar
NOTCH3	12,50%	25,00%	0,00%	4,10%
RMDN2	12,50%	25,00%	0,00%	0,40%
TERT	12,50%	12,50%	12,50%	1,10%
USP40	12,50%	12,50%	12,50%	0,80%
ZMYM3	12,50%	12,50%	12,50%	2,50%

In den 3 mittleren Spalten sind die Mutationsfrequenzen der Gene aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden. Auf der rechten Seite sind die Mutationsfrequenzen von 434 DNA-Proben von HNSCC Patienten aus 5 Studien [21, 38–40, 66], die mittels der Webanwendung cBioPortal zusammengefasst wurden, aufgeführt. Vollständige Tabelle siehe Anhang.

Es ist festzustellen, dass die Mutationsfrequenzen der einzelnen Gene je nach Studie variieren. Sie sind zum Beispiel unter anderem davon abhängig, ob das verwendete Panel die gesamte kodierende Sequenz eines Gens oder lediglich einzelne Hotspot-Regionen abdeckt [77]. TP53 war sowohl in den Sequenzierdaten dieser Arbeit als auch im Datensatz aus dem cBioPortal das am häufigsten mutierte Gen. Es ergibt sich für die detektierten mutierten Gene eine Differenz der Mutationsfrequenz von durchschnittlich 8,19% zu den Daten aus dem cBioPortal. Für nur vier der 51 detektierten mutierten Gene war diese Abweichung > 15%. Besonders groß war diese Differenz für MAML3 (43,35%). Im cBioPortal Datensatz war das MAML3 Gen in nur einer von 279 Proben mutiert (0,40%), während MAML3 im Rahmen dieser Arbeit in sieben von 16 Proben mutiert war (Mutationsfrequenz 43,75%). insbesondere in den Proben des letzten Tumornachweises (in fünf von acht Proben mutiert, Mutationsfrequenz 62,50%). Mit NOTCH1 (Mutationsfrequenz 37,50%) und NOTCH3 (Mutationsfrequenz 12,50%) wiesen neben MAML3 auch andere Gene des NOTCH Signalwegs eine höhere Mutationsfrequenz auf als die Proben aus dem cBioPortal Datensatz, mit jeweils 15,50% und 4,10%. Daher ist davon auszugehen, dass Mutationen im NOTCH-Signalweg bei den Tumoren dieser Pilotkohorte eine wichtige Rolle spielten. Eine HNSCC spezifische zielgerichtete Therapie, die in die Signalkaskade des NOTCH-Signalweg eingreift, wird diskutiert [104].

Tabelle 24: Die häufigsten mutierten Gene im cBioPortal-Datensatz im Vergleich mit Pilotkohorte

Gen	Mutationsfrequenz cBioPortal	Mutationsfrequenz alle Proben	Mutationsfrequenz erster Tumornachweis	Mutationsfrequenz letzter Tumornachweis
TP53	69,10%	50,00%	62,50%	37,50%
TTN	37,20%	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert
FAT1	19,60%	0,00%	0,00%	0,00%
CSMD3	19,30%	18,75%	25,00%	12,50%
CDKN2A	19,20%	6,25%	0,00%	12,50%
MUC16	19,10%	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert
SYNE1	17,70%	Nicht Sequenziert	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert
LRP1B	16,50%	Nicht Sequenziert	Nicht sequenziert	Nicht sequenziert
PIK3CA	16,00%	6,25%	12,50%	0,00%
NOTCH1	15,50%	37,50%	50,00%	25,00%

Von den zehn Genen, die im cBioPortal-Datensatz am häufigsten somatisch mutiert sind (siehe Tabelle 24), wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs Gene untersucht. Fünf dieser sechs Gene wiesen Mutationen mit einer VAF von >20% auf. Lediglich beim FAT1 Gen ließen sich keine Mutationen mit einer VAF >20% feststellen. Trotz der umfassenden Größe des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus, waren vier der zehn Gene nicht Teil des Panels. Dies

verdeutlicht, die Schwierigkeit durch ein unspezifisches Panel alle Entitäten sinnvoll abzudecken.

5.7 Tumormutationslast und Mikrosatelliteninstabilität

In der Pilotkohorte konnten durch die Sequenzierung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus zwei Patienten (18%) mit einem TMB-high Tumor (≥ 10 Mutationen/Mb) identifiziert werden. Dies deckt sich mit den Werten in der Literatur. Hier wird dieser Anteil mit etwa 20% angegeben. [105]. Durch die Detektion der TMB liefert das Panel prognostische Hinweise zum Outcome in HNSCC nach Radiochemotherapie. So konnte von Eder et al. gezeigt werden, dass ein TMB-high Status mit einem schlechterem Gesamtüberleben nach Radiochemotherapie einhergeht [47]. Dabei muss man jedoch berücksichtigen, dass die Grenze für die Distinktion zwischen TMB-high und TMB-low von Eder et al. bei ≥ 5 Mutationen/Mb festgelegt wurde. In der Pilotkohorte wiesen sechs Patienten ≥ 5 Mutationen/Mb auf (55%). Jedoch erhielt keiner dieser sechs Patienten Radiochemotherapie. Von den 2 Patienten mit TMB-high Tumor mit ≥ 10 Mutationen/Mb erhielt ein Patient eine Immuncheckpoint-Therapie mit Pembrolizumab und zeigte eine gute Response in Form einer Remission bzw. Krankheitsstabilisierung. Dies unterstreicht die Rolle der TMB für das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren: Patienten mit soliden Tumoren mit TMB-high Status zeigen eine besseren Response auf Immuncheckpoint-Inhibitoren [48, 81, 106]. Der andere Patient mit TMB-high Tumor erhielt eine Radiotherapie. Dieser Patient wies mit 209 Tagen die kürzeste Überlebenszeit der gesamten Kohorte auf. Basierend auf dem TMB-Status hätte dieser Patient möglicherweise von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitiert. Gemäß Eder et al. sind Tumoren mit TMB-high Status mit einer höheren Prävalenz von TP53 Mutationen assoziiert [47]. Auch in der Pilotkohorte dieser Arbeit wiesen die Tumore mit TMB-high Status durchschnittlich mehr TP53 Mutationen (1 Mutation/Probe) auf als die Tumore mit TMB-low Status (0,5 Mutation/Probe).

Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erfasst zudem die Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Es wurde festgestellt, dass Patienten mit Tumoren, die eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-high) aufweisen, ein besseres Ansprechen auf PD-1 Blockade durch Immuncheckpoint-Inhibitoren zeigen [49, 50, 81]. Alle HNSCC-Tumoren in der Pilotkohorte galten als mikrosatellitenstabil (MSS). Dies ist erwartbar, denn die Inzidenz von MSI-high in HNSCC wird mit 1,2% angegeben [107]. Der MSI-Status wird gleichermaßen wie der TMB-Status mit einem Evidenzgrad von IC der ESCAT eingestuft und ist damit gemäß der Skala geeignet, im klinischen Alltag eingesetzt zu werden [25, 63]. Der TMB-Status wurde in 14 der 16 auswertbaren Proben erfasst, der MSI-Status wurde in allen 16 auswertbaren Proben erfasst. Es lässt sich also festhalten, dass der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus in den erfolgreich sequenzierten Proben zuverlässig den Status der Tumormutationslast und Mikrosatelliteninstabilität erfasst. Damit liefert das Panel wichtige Informationen für Prognose und insbesondere für die

Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, die mit einem weniger komplexen NGS-Panel nicht erfasst werden.

5.8 Identifikation von prognostischen Markern und therapeutischen Targets

Insgesamt wurden gemäß OncoKB 27 verschiedene onkogene Varianten detektiert [62]. Hierbei ist anzuführen, dass die Beurteilung einer Variante bezüglich ihres onkogenen Effekts abhängig von der verwendeten Datenbank ist. Nicht alle Varianten, die von OncoKB als unbekannt eingestuft wurden, wurden auch in anderen Datenbanken wie Clinvar [108] und PolyPhen-2 [109] als unbekannt gelistet und umgekehrt. So wurde beispielsweise die in der Pilotkohorte im RASA1 Gen detektierte c.2120G>A Mutation von OncoKB als unbekannt, und von PolyPhen-2 als pathogen eingestuft [62, 109]. Der Übersichtlichkeit wegen, wurde sich auf die Bewertung des onkogenen Effekts der Varianten mit OncoKB beschränkt.

Von den 27 onkogenen Varianten wurden 19 Varianten von Marret et al. als potentiell therapeutisches Target (=actionable) eingestuft [25]. Bei 2 Patienten wurde eine Mutation am 5'Ende in der Promoter-Region detektiert. Das TERT Gen kodiert für die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase und unterliegt in den meisten differenzierten Zellen einer transkriptionellen Repression. Aktivierende Mutationen in diesem Gen sind daher an der Immortalisierung von Tumorzellen beteiligt [110]. TERT Promotor Mutationen sind insbesondere bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Mundraum mit einem gehäuftem Auftreten von Rezidiven assoziiert [111], was das gehäufte Auftreten in der Pilotkohorte erklärt. TERT Promotor Mutationen gelten darüber hinaus als actionable für HNSCC [25]. So wurde beispielsweise von Gomez et al. [112] eine Inhibierung des Telomerase Enzyms und eine Einleitung der Tumorzellseneszenz durch den bei HIV Infektionen eingesetzten Reverse-Transkriptase-Inhibitor Azidothymidin festgestellt [113].

Bei einem Patienten wurde in der vRezidiv-Probe im CDKN2A Gen die Nonsense Mutation c.216C>A detektiert. Inaktivierende Mutationen im CDKN2A Gen sorgen durch Disinhibition für eine Überaktivität der Cyklin-abhängigen Kinasen CDK4/6 [114]. Dies erklärt den CDK4/6-Inhibitor Palbociclib als mögliche Therapie bei Trägern dieser Mutationen in HNSCC. Palbociclib besitzt eine Zulassung der EMA für das HR-positive, Her2-negative, lokal fortgeschrittene oder metastasierte Mammakarzinom [115]. In einer Phase-II-Studie konnte in HNSCC ein längeres Gesamtüberleben durch Palbociclib in Kombination mit Cetuximab gegenüber Cetuximab mit Placebo festgestellt werden, diese Verlängerung war allerdings nicht signifikant [116]. Dennoch wurde die Evidenz für trunkierende Mutationen im CDKN2A Gen gemäß Marret et al. mit IIA eingestuft. Ein Vorteil durch den Einsatz von Palbociclib ist demnach wahrscheinlich, es werden allerdings noch mehr Daten benötigt.

Des Weiteren wurden vier Varianten als potentielle therapeutische Targets mit einem Evidenzgrad von IIIA gemäß Marret et al. [25], detektiert: Im BRCA2 Gen wurde bei einem Patienten

die Frame-Shift Deletion-insertion c.10095_10095delCinsGAATTA-TATCT in Primarius und vRezidiv detektiert, während bei einem anderen Patienten im BRCA1 Gen die Nonsense Mutation c.4102_4103delGCinsTA im vRezidiv detektiert wurde. Bei beiden Mutationen handelt es sich um eine trunkierende Mutation. Diese Art von Mutationen im BRCA1 und BRCA2 Gen gelten als actionable durch den PARP-Inhibitor Olaparib. Olaparib wird beispielsweise in der Erhaltungstherapie von Ovarialkarzinomen bei Patienten mit BRCA1 und/oder BRCA2 Mutationen eingesetzt [117, 118] Olaparib wird bei HNSCC Patienten derzeit im Rahmen von klinischen Studien angewandt [119, 120].

Im PI3K/Akt/mTOR Signalweg wurden bei zwei Patienten Varianten detektiert, die potentielle therapeutische Targets in HNSCC darstellen. Bei einem Patienten wurde im PIK3CA Gen die Missense Mutation c.3140A>G im Primarius detektiert. Diese aktivierende Mutation hat eine Substitution von Histidin zu Arginin zur Folge (H1047R) und gilt als onkogen [121]. In einer Phase-III-Studie konnte bei Patienten mit HR-positivem, Her2-negativem Mammakarzinom, die Träger dieser Art von PIK3CA-Mutation waren, eine Verlängerung des Progressionsfreien Überlebens (PFS) durch den PI3K-Inhibitor Alpelisib festgestellt werden [44]. Alpelisib erhielt daraufhin eine Zulassung durch die EMA [122] Derzeit läuft eine Phase-I/II Studie zur Anwendung von Alpelisib in Kombination mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor Tipifarnib für das rezidierte/metastasierte HNSCC mit PIK3CA Mutation und/oder HRAS Überexpression [123]. Der PI3K-Inhibitor Buparlisib zeigte in einer Phase-II-Studie in Kombination mit Paclitaxel ein verbessertes Outcome in HNSCC [45].

Bei einem Patienten wurde im PTEN Gen die Nonsense Mutation c.195C>G im Primarius detektiert. Das PTEN Gen kodiert als Tumorsuppressorgen die PIP3-Phosphatase, welche im PI3K/Akt/mTOR Signalweg als Gegenspieler der PI3-Kinase eine negativ-modulierende Funktion einnimmt [124]. Inaktivierende Mutationen im PTEN Gen führen demnach zur Disinhibition des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs und zum Tumorzellwachstum [125]. Akt-Inhibitoren stellen deshalb eine mögliche Therapie bei Trägern einer solchen Mutation dar [126]. Der AKT-Inhibitor Capivasertib (AZD5363) zeigte im Rahmen einer Phase-II-Studie in Kombination mit Paclitaxel eine Verbesserung des PFS und Gesamtüberlebens im Triple-negativem Mammakarzinom [127], der AKT-Inhibitor Ipatasertib zeigte im Rahmen einer Phase-III-Studie in Kombination mit Abiraterone eine Verbesserung des PFS beim metastasiertem Prostatakarzinom [128].

Trotz des in dieser Arbeit verwendeten, vergleichsweise hohen Cutoffs von 20% konnten in den 11 Patienten der Pilotkohorte 19 actionable Targets identifiziert werden. Dies zeigt, dass der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus durchaus das Potential besitzt, Patienten anhand ihrer molekularen Charakteristika für zielgerichtete Therapien zu stratifizieren. Auch wenn Therapeutika für ein Großteil dieser Targets erst im Rahmen von klinischen Studien angewandt werden, ist davon auszugehen, dass die Anzahl an verfügbaren und zugelassenen

zielgerichteten Therapien in Zukunft steigen wird. Hierfür bedarf es jedoch groß angelegter Studien. Hierbei ist die EORTC-1559-HNCG Studie zu erwähnen [129]. In dieser Phase-II-Umbrella-Studie werden von rezidierten/metastasierten HNSCC Biopsien entnommen und zentralisiert mit einem 13 Gen umfassenden tNGS-Panel sequenziert. Je nach Biomarker erfolgt dann die Einteilung in einen Therapiearm. Alle 13 Gene, die für die Einteilung in die verschiedenen Therapiearme entscheidend sind, werden durch den Oncomine™ Comprehensive Assay Plus abgedeckt. Dies unterstreicht das Potential des Panels für die Stratifizierung von Patienten und deren Einteilung in Therapiegruppen mit zielgerichteter Therapie.

5.9 Vergleich der Primarius- und vRezidiv-Proben

Die Sequenzierung von Proben aus Primarius und Rezidiv ermöglichte den Vergleich dieser Gruppen um Veränderungen der molekularen Charakteristika im Verlauf zu untersuchen. Insgesamt lagen acht Proben aus der Gruppe der Primaries und acht Proben der Gruppe vRezidiv vor. In der Gruppe der Primaries-Proben wurden mehr Varianten detektiert (59 Calls) als in der Gruppe der vRezidiv Proben (49 Calls). Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da man grundsätzlich davon ausgeht, dass Tumoren mit der Zeit immer mehr Mutationen akkumulieren [130]. Dennoch weisen Primärtumoren oft eine komplexe klonale Struktur mit einer Vielzahl von genetischen Mutationen auf, was die Behandlung erschwert und zu einer Resistenzentwicklung beitragen kann. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Stransky et al. unterstützt, die die Molekularen Signaturen von HNSCC beschrieb und hervorhob, dass primäre Tumoren eine breite Palette genetischer Veränderungen zeigen, was auf eine größere klonale Vielfalt und damit eine höhere Heterogenität hindeutet [38].

Im Gegensatz dazu sind Rezidivtumoren oft durch einen selektiven Druck während der Behandlung geprägt, was zu einer Dominanz weniger Subklone führen kann [131]. Dies liefert eine mögliche Erklärung, warum die Patienten mit der Nummer 211 und 220 in unserer Analyse eine Abnahme der Mutationsvielfalt in den Rezidivproben zeigten.

Ein weiterer wesentlicher Punkt beim Vergleich der Sequenzierdaten der Primaries- mit der vRezidiv-Gruppe ist der Cutoff mit einer VAF von mindestens 20%, um Mutationen zu berücksichtigen wie bereits unter 5.6 diskutiert. Nach der klonalen Evolution von heterogenen Tumoren sind Varianten, die erst später im Tumorverlauf entstehen, meist auf wenige Subklone begrenzt. Daher weisen sie meist eine geringere VAF auf als Varianten, die schon zu Beginn der Karzinogenese entstanden sind [11]. Daher ist es gut möglich, dass durch den vergleichsweise hoch gewählten Cutoff einige neu entstandene Mutationen in der vRezidiv-Gruppe nicht detektiert wurden.

Für das MAML3 Gen lag die Mutationsfrequenz in der Gruppe der Primaries bei 25% und in der Gruppe vRezidiv bei 62,5%. MAML3 ist ein protein-kodierendes Gen, das für Transkriptions-Koaktivatoren kodiert, die in den NOTCH Signalweg involviert sind [132]. Das MAML3

Gen wurde bereits für das kleinzellige Lungenkarzinom als potentielles therapeutisches Target erwogen [133]. Mutationen im Bereich des NOTCH Signalwegs gelten für HNSCC als progressionsfördernd, was eine mögliche Erklärung für die hohe Mutationsfrequenz in den Proben des letzten Tumornachweises der Patienten darstellen könnte [104].

Von fünf Patienten konnten die gematchten Proben aus Primarius und vRezidiv ausgewertet werden. Hierbei konnten von den insgesamt 59 Calls aus den Proben der Primaries noch 28 Calls (47,4%) in den vRezidiv Proben detektiert werden. Von den 14 Varianten mit bekanntem onkogenen Effekt aus den Primaries Proben wurden in den vRezidiv Proben noch vier detektiert (28,6%). Hedberg et al. sequenzierten in einer ähnlich angelegten Studie die DNA von acht HNSCC-Patienten mit gematchten Tumorproben bestehend aus Primarius und Rezidiv mittels Exom-Sequenzierung (WES). Im Gegensatz zu unseren Daten zeigte die Rezidiv-Gruppe hier mehr Mutationen pro Probe als die Primaries-Gruppe. Des Weiteren detektierten sie 90,1% der Varianten und 100% der Treibermutationen aus den Proben der Primaries auch in den Proben der Rezidive [33]. Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede liegt bei dem von uns angewandten, vergleichsweise hohen Cutoff mit $VAF \geq 20\%$. Es ist gut möglich, dass viele der Calls, die im Primaries detektiert wurden, im vRezidiv mit einer VAF unterhalb des Cutoffs weiter bestehen. Der von Hedberg et al. angewandte Cutoff geht aus der Veröffentlichung nicht hervor [33].

In der Pilotkohorte dieser Arbeit traten elf Calls neu in den vRezidiv Proben auf, sie machten 28,2% der in dieser Gruppe detektierten Calls aus, wohingegen dieser Anteil bei Hedberg et al. 40% betrug. Der vergleichsweise hohe Cutoff von $VAF \geq 20\%$ liefert auch hier die mögliche Erklärung für den geringeren Anteil an neu aufgetretenen Varianten in den vRezidiv-Proben im Vergleich mit Hedberg et al., wie oben beschrieben.

5.10 Vergleich der Sequenzierdaten der klinischen Gruppen

Die Gruppengröße der einzelnen klinischen Gruppen war zu gering, um statistisch signifikante Aussagen zu treffen. Daher wird hier auf eine Einordnung der beobachteten Ergebnisse in die Daten der Literatur verzichtet.

5.11 Loss of Heterozygosity

Loss of Heterozygosity gilt als die häufigste molekulargenetische Alteration in der Tumorentstehung. Ein Loss-of-Function in Tumorsuppressorgenen wird häufig durch Loss of Heterozygosity ausgelöst und fördert die Tumorprogression [134, 135]. Insgesamt wurde ein Loss of Heterozygosity an 12 verschiedenen Positionen detektiert (siehe Tabelle 21). Da es sich bei allen detektierten Genen um Tumorsuppressorgene handelt und der Effekt bei allen Varianten ein Loss-of-Function ist, sind prinzipiell alle LOH Varianten in der Lage die Karzinogenese zu fördern. Dennoch wird in der Literatur bestimmten LOH-Loci eine besondere Rolle als

prognostische Biomarker in verschiedenen Entitäten zugeschrieben [135]. Ein Teil der detektierten LOH wird auch im Zusammenhang mit der Prognose in HNSCC in der Literatur aufgeführt: Der detektierte Loss of Heterozygosity auf 10q23.31 im PTEN Gen, auf 13q13.1 im BRCA2 Gen und auf 2q35 im BARD1 Gen sind in HNSCC mit einer schlechteren Prognose assoziiert [136–138].

Obwohl die Detektion des Loss-of-Heterozygosity sequenzspezifisch ist, fungiert LOH auch als ein Marker für genomische Instabilität, da sie durch viel größere DNA-Veränderungen ausgelöst wird. Dazu gehören unter anderem Deletionen, der Verlust ganzer Chromosomen, uniparentale Disomie, und Rekombination [139]. Genomische Instabilität erleichtert die Karzino-genese [140]. In der Literatur existieren keine bestehenden Werte zur Sample Level LOH. Die erhobenen Werte lassen sich daher aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit nur schlecht in die Literatur einordnen.

VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte im Wesentlichen die Durchführbarkeit einer komplexen NGS-Analyse bei HNSCC an FFPE-Material anhand einer Pilotkohorte untersucht werden. Im Zuge dessen wurden zunächst 24 Patienten aus der Kopf-Hals-Tumor-Datenbank der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin des Zentrums für Innere Medizin III der Universitätsmedizin Rostock als Pilotkohorte definiert. Ausgewählt wurden HNSCC-Patienten, die mindestens ein Rezidiv im Rahmen der Erkrankung aufwiesen, die mit einem palliativen Ansatz behandelt wurden und von welchen mindestens zwei entnommene Gewebeproben im Rahmen des HNSCC vorlagen. Um die grundsätzliche Eignung dieser Proben für eine NGS-Analyse zu überprüfen, wurde die aus altem asservierten FFPE-Material isolierte DNA mit dem routinemäßig angewandten Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 sequenziert. Mit den erzielten Sequenzierergebnissen war die sichere Detektion von genetischen Varianten in 17 von 22 Proben möglich, sodass die Qualität der DNA als ausreichend befunden wurde, um sie mit einem komplexeren, für HNSCC spezifischeren Panel zu sequenzieren. Die Qualitätsparameter waren dabei vergleichbaren Sequenzierdaten aus der Literatur überlegen.

Im nächsten Schritt sollte ein komplexes NGS-Panel identifiziert werden, um eine umfassendere Untersuchung des Molekularen Mutationsprofil bei HNSCC vornehmen zu können. Um ein möglichst geeignetes Panel zu finden, wurde zunächst ein HNSCC-spezifisches Custom Panel designt. Es beinhaltete die am häufigsten mutierten Gene bei HNSCC und deckte zudem Gene ab, die potentielle Targets für zielgerichtete Therapien darstellen. Durch die Beschränkung auf Hotspot Regionen bei Genen mit ungleichmäßigem Mutationsprofil konnte mit 500kb eine Panelgröße erreicht werden, mit der eine Sequenzierung auch auf kleineren Sequenziergeräten effektiv möglich wäre. Der Vergleich mit anderen Custom Panels für HNSCC zeigte, dass je nach Intention die Auswahl der sequenzierten Gene variiert. Eine einheitliche Priorisierung der Gene nach ihrer Relevanz durch Expertenkomitees erscheint notwendig. Durch die Auswahl von Genen, die im Falle einer Alteration die Anwendung von zielgerichteten Therapien ermöglichen, eröffnen sich neue, kausale Therapieoptionen für die Patienten.

Das Custom Panel wurde daraufhin hinsichtlich der Durchführbarkeit und des Nutzens mit kommerziellen tNGS-Panels verglichen. Das Custom Panel konnte nur in großen Verpackungsgrößen bestellt werden, wodurch der Packungspreis im mittleren fünfstelligen Bereich lag. Mit den im Rahmen dieser Arbeit zu Verfügung stehenden finanziellen Mitteln war daher die Anwendung des Custom Panels zur Sequenzierung der Pilotkohorte nicht möglich. Von den verfügbaren kommerziellen Panels zeigt das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus die größte Übereinstimmung mit dem erstellten Custom Panel. Daher wurde das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus für eine mögliche Implementierung ausgewählt. Dieses Panel ist nicht spezifisch für HNSCC, liefert aber zusätzlich Informationen zu TMB, MSI und Copy Number Variation, die in HNSCC für Prognose und Therapie eine wichtige Rolle spielen. So können

Patienten identifiziert werden, die von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren oder einer zielgerichteten Therapie profitieren würden. Das Panel ist, verglichen mit anderen verfügbaren tNGS-Panels, sehr umfangreich. Dadurch kann die Heterogenität des HNSCC gut abgebildet werden, ohne auf die wesentlich umfangreichere und aufwändigere Whole-Exome-Sequenzierung zurückgreifen zu müssen.

Die Eignung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus wurde durch die Sequenzierung der Pilotkohorte untersucht. Dabei konnten von 39 Proben, für die eine Library-Herstellung begonnen wurde, nur von knapp weniger als der Hälfte auswertbare Sequenzierergebnisse erhoben werden. Die geringe Rate an auswertbaren Sequenzierergebnissen in dieser Arbeit zeigt, dass sich das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus aufgrund der Performance nur bedingt für die klinische Diagnostik und Forschung von HNSCC Patienten an FFPE-Material eignet. Es bekräftigt zudem die Schwierigkeit der Sequenzierung von aus FFPE-Material isolierter DNA mit komplexen tNGS-Panels. Es bedarf einer Optimierung der Panel Performance. Dabei könnte eine Kontrolle der DNA-Qualität und -Quantität helfen, die Erhebung von nicht auswertbaren Sequenzierergebnissen zu vermeiden. Die Kontrolle der DNA-Qualität steigert allerdings nicht die Rate an auswertbaren Sequenzierergebnissen insgesamt. So erscheint vor allem die Verwendung von DNA besserer Qualität vielversprechend. Es gilt zu überprüfen, inwieweit die Verwendung von DNA aus frisch gefrorenem Gewebe (Fresh Frozen Tissue) die Rate an auswertbaren Sequenzierergebnissen steigert.

Die auswertbaren Sequenzierergebnisse zeigen jedoch auch, dass das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus bei erfolgreicher Sequenzierung durchaus wichtige Informationen liefert. So wurden über die 16 ausgewerteten Proben verteilt 19 Varianten identifiziert, die ein potentielles Target für eine zielgerichtete Therapie darstellen. Eine Behandlung dieser Patienten mit der entsprechenden Therapie wäre im Rahmen von Studien schon jetzt möglich. Es ist dabei davon auszugehen, dass die Zahl an zugelassenen zielgerichteten Therapien in Zukunft steigen wird. Zudem wurden zwei Patienten mit einem TMB-high Tumor identifiziert, die von einer Therapie mit dem für HNSCC bereits zugelassenen Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab profitieren würden [106]. Die fünf am häufigsten mutierten Gene in der Pilotkohorte waren TP53, MAML3, KMT2D, NOTCH1 und NTRK1. Beim Vergleich mit Daten aus der Literatur war die Mutationshäufigkeit insbesondere für das MAML3 Gen deutlich höher.

So bleibt die Sequenzierung mit dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Custom Panel weiterhin eine interessante Option, deren Durchführbarkeit es in Zukunft zu prüfen gilt. Es ist wesentlich kleiner als das Oncomine™ Comprehensive Assay Plus; dafür aber spezifischer für HNSCC. Mit der stetigen Entwicklung des NGS und der verfügbaren Optionen, ist davon auszugehen, dass eine Durchführung in Zukunft auch in kleinerem Umfang möglich sein wird. Mit der Etablierung eines spezifischen Panels mit einer zuverlässigen Performance, bedarf es

daraufhin einer Ausweitung der Pilotkohorte, um signifikante Aussagen über die Korrelation des klinischen Outcomes mit den Sequenzierdaten machen zu können.

VII. Thesen

1. Die Anwendung von NGS ermöglicht die Anwendung neuer zielgerichteter Therapien basierend auf dem molekularen Mutationsprofil. Es ist davon auszugehen, dass die Anzahl an verfügbaren und zugelassenen zielgerichteten Therapien in Zukunft steigen wird.
2. Es bedarf einer aussagekräftigeren Stratifizierung der Patienten mit HNSCC, um die inter- und intratumorale Heterogenität von HNSCC besser abzubilden und somit Ansprechraten bestehender Therapien zu verbessern.
3. Kleine tNGS-Panel, die nur wenige Gene umfassen, reichen für eine umfassende Patientenstratifizierung nicht aus, da sie das molekulare Mutationsprofil nur sehr eingeschränkt widerspiegeln.
4. Die Durchführung von tNGS mit einem anwendungs- und entitätsspezifischen Panel ist dem Whole Exome Sequencing hinsichtlich der Machbarkeit im Setting der Universitätsmedizin Rostock überlegen.
5. Für ein entitätsspezifisches tNGS-Panel für die Anwendung in Diagnostik, Therapie und Forschung bedarf es einer Strategie für die Aufnahme von Genen in das Panel, die sich sowohl nach den am häufigsten mutierten Genen, als auch nach den Genen mit Relevanz für Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichteter Therapien richtet.
6. Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Custom Panel ist vom Panel Design für die Anwendung in Diagnostik, Therapie und Forschung von Patienten mit HNSCC grundsätzlich gut geeignet. Die Durchführbarkeit besonders hinsichtlich der Panel Performance an DNA aus FFPE-Material gilt es zu überprüfen.
7. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus ist von den auf der IonTorrent™-Plattform verfügbaren kommerziellen tNGS Panels am besten geeignet für die Anwendung in Diagnostik, Therapie und Forschung von Patienten mit HNSCC.
8. Für die potentielle Implementierung des Oncomine™ Comprehensive Assay Plus in den klinischen Alltag bedarf es einer zuverlässigen Panel Performance, die in der Pilotkohorte bei den DNA-Proben aus FFPE Material nicht gegeben war.

9. Sind die Sequenziererergebnisse mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus auswertbar, so erfasst der Assay zusätzlich zuverlässig den Status der Tumormutationslast und der Mikrosatelliteninstabilität.
10. Die Anwendung eines komplexen tNGS-Panels mit vielen Primern an DNA mit eingeschränkter Amplifizierbarkeit scheint zu einem großen Anteil nicht auswertbaren Sequenziererergebnissen zu führen. Dies scheint auch zu gelten, wenn mit derselben DNA an kleineren Panels eine vergleichsweise sehr hohe Rate an auswertbaren Ergebnissen erzielt wurde.
11. Es ist anzunehmen, dass im Herstellerprotokoll für die Libraryherstellung mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus der Mindestwert für die Librarykonzentration mit 50 pM sehr hoch gewählt wurde. Es ist gut möglich, dass einige Proben mit einer Librarykonzentration unterhalb von 50 pM trotzdem auswertbare Sequenziererergebnisse liefern würden.
12. Ein hoher Cutoff für die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz $\geq 20\%$ wird der Heterogenität von soliden Tumoren, insbesondere HNSCC gerecht. Dadurch werden vor allem die treibenden, biologisch relevanten Mutationen abgebildet.
13. Es ist anzunehmen, dass viele der Calls, die in der Primarius-Gruppe detektiert wurden, in der Gruppe vRezidiv mit einer Allelfrequenz unterhalb des Cutoffs von 20% weiter bestehen.
14. Der Oncomine™ Comprehensive Assay Plus besitzt durchaus das Potential, Patienten anhand ihrer molekularen Charakteristika für zielgerichtete Therapien zu stratifizieren. So konnten trotz eines vergleichsweise hohen Cutoffs für die VAF, durchschnittlich annähernd zwei actionable Targets pro Patient identifiziert werden.
15. Die Anwendung von tNGS-Panels wie dem Custom Panel oder dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus erscheint zum aktuellen Zeitpunkt (2024) besonders im Rahmen von Umbrella-Studien sinnvoll. Hierbei werden die Patienten basierend auf den Tumormutationen in mutationsspezifische Therapiearme eingeteilt.

VIII. Literatur

1. Cheng LY, Haydu LE, Song P, Nie J, Tetzlaff MT, Kwong LN, Gershenwald JE, Davies MA, Zhang DY (2021) High sensitivity sanger sequencing detection of BRAF mutations in metastatic melanoma FFPE tissue specimens. *Sci Rep* 11(1):9043. doi:10.1038/s41598-021-88391-5
2. Bomben R, Rossi FM, Vit F et al (2021) TP53 Mutations with Low Variant Allele Frequency Predict Short Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 27(20):5566–5575. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0701
3. Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, Mularoni L, Pich O, Bonet J, Kranas H, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N (2020) A compendium of mutational cancer driver genes. *Nature reviews. Cancer* 20(10):555–572. doi:10.1038/s41568-020-0290-x
4. Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, Gao J, Socci ND, Solit DB, Olshen AB, Schultz N, Taylor BS (2016) Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* 34(2):155–163. doi:10.1038/nbt.3391
5. Lassen UN, Makaroff LE, Stenzinger A, Italiano A, Vassal G, Garcia-Foncillas J, Avouac B (2021) Precision oncology: a clinical and patient perspective. *Future Oncol* 17(30):3995–4009. doi:10.2217/fon-2021-0688
6. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, Normanno N, Scarpa A, Robson M, Meric-Bernstam F, Wagle N, Stenzinger A, Bonastre J, Bayle A, Michiels S, Bièche I, Rouleau E, Jezdic S, Douillard J-Y, Reis-Filho JS, Dienstmann R, André F (2020) Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology* 31(11):1491–1505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014
7. Langer T (2024) S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms
8. Souche E, Beltran S, Brosens E et al (2022) Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *European journal of human genetics : EJHG* 30(9):1017–1021. doi:10.1038/s41431-022-01113-x
9. Schwarze K, Buchanan J, Taylor JC, Wordsworth S (2018) Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genet Med* 20(10):1122–1130. doi:10.1038/gim.2017.247
10. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C (2015) Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* 21(6):1258–1266. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1429

11. Rocco JW (2015) Mutant allele tumor heterogeneity (MATH) and head and neck squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology* 9(1):1–5. doi:10.1007/s12105-015-0617-1
12. Bowyer S, Lee R, Fusi A, Lorigan P (2015) Dabrafenib and its use in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma management* 2(3):199–208. doi:10.2217/mmt.15.21
13. Smalley KSM, Sondak VK (2015) Inhibition of BRAF and MEK in BRAF-mutant melanoma. *Lancet* 386(9992):410–412. doi:10.1016/S0140-6736(15)60972-2
14. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al (2015) Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 386(9992):444–451. doi:10.1016/S0140-6736(15)60898-4
15. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3):209–249. doi:10.3322/caac.21660
16. Lim SM, Cho SH, Hwang IG, Choi JW, Chang H, Ahn M-J, Park KU, Kim J-W, Ko YH, Ahn HK, Cho BC, Nam B-H, Chun SH, Hong JH, Kwon JH, Choi JG, Kang EJ, Yun T, Lee K-W, Kim J-H, Kim JS, Lee HW, Kim MK, Jung D, Kim JE, Keam B, Yun HJ, Kim S, Kim HR (2019) Investigating the Feasibility of Targeted Next-Generation Sequencing to Guide the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res Treat* 51(1):300–312. doi:10.4143/crt.2018.012
17. Wienecke A, Kraywinkel K (2019) Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologe* 25(3):190–200. doi:10.1007/s00761-019-0534-0
18. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, Berenberg-Gossler P von, Wienecke A (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut
19. Pérez Sayáns M, Chamorro Petronacci CM, Lorenzo Pouso AI, Padín Iruegas E, Blanco Carrión A, Suárez Peñaranda JM, García García A (2019) Comprehensive Genomic Review of TCGA Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC). *J Clin Med* 8(11). doi:10.3390/jcm8111896
20. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, Kimple RJ (2015) Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 21(3):138–146. doi:10.1097/PPO.0000000000000115

21. Participants are arranged by area of contribution and then by institution. (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517(7536):576–582. doi:10.1038/nature14129
22. Schmidt S, Linge A, Zwanenburg A et al (2018) Development and Validation of a Gene Signature for Patients with Head and Neck Carcinomas Treated by Postoperative Radio(chemo)therapy. *Clin Cancer Res* 24(6):1364–1374. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2345
23. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, Tavassoli M (2019) Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell death & disease* 10(8):540. doi:10.1038/s41419-019-1769-9
24. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, Jesus-Acosta A de, Delord J-P, Geva R, Gottfried M, Penel N, Hansen AR, Piha-Paul SA, Doi T, Gao B, Chung HC, Lopez-Martin J, Bang Y-J, Frommer RS, Shah M, Ghorri R, Joe AK, Pruitt SK, Diaz LA (2020) Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 38(1):1–10. doi:10.1200/JCO.19.02105
25. Marret G, Bièche I, Dupain C, Borcoman E, Du Rusquec P, Ricci F, Hescot S, Sablin M-P, Tresca P, Bello D, Dubot C, Loirat D, Frelaut M, Lecerf C, Le Tourneau C, Kamal M (2021) Genomic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Level of Evidence According to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT). *JCO Precis Oncol* 5:215–226. doi:10.1200/PO.20.00280
26. König IR, Fuchs O, Hansen G, Mutius E von, Kopp MV (2017) What is precision medicine? *Eur Respir J* 50(4). doi:10.1183/13993003.00391-2017
27. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL (2009) Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *JCO* 27(30):4966–4972. doi:10.1200/JCO.2008.21.6630
28. (2021) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/>. Zugriffen: 11. Dezember 2022
29. Vermorken JB, Trigo J, Hitt R, Koralewski P, Diaz-Rubio E, Rolland F, Knecht R, Amellal N, Schueler A, Baselga J (2007) Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *JCO* 25(16):2171–2177. doi:10.1200/JCO.2006.06.7447

30. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12(4):252–264. doi:10.1038/nrc3239
31. Woermann B (2017) Gemeinsame Stellungnahme von DGHO und DGHNO zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V Nivolumab (neues Anwendungsgebiet, Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs). <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/nivolumab/nivolumab-plattenepithelkarzinom-kopf-hals-bereich-dgho-stellungnahme-20170922.pdf>. Zugegriffen: 03. Januar 2023
32. Klinghammer K, Gauler T, Dietz A, Grünwald V, Stöhlmacher J, Knipping S, Schroeder M, Guntinas-Lichius O, Frickhofen N, Lindeman H-W, Fietkau R, Haxel B, Große-Thie C, Maschmeyer G, Zipfel M, Martus P, Knoedler M, Keilholz U (2019) Cetuximab, fluorouracil and cisplatin with or without docetaxel for patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CeFCiD): an open-label phase II randomised trial (AIO/IAG-KHT trial 1108). *Eur J Cancer* 122:53–60. doi:10.1016/j.ejca.2019.08.018
33. Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, Bauman JE, Freilino ML, Zeng Y, Wang L, Diergaarde BB, Gooding WE, Lui VWY, Herbst RS, Lifton RP, Grandis JR (2016) Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 126(1):169–180. doi:10.1172/JCI82066
34. Borel C, Jung AC, Burgy M (2020) Immunotherapy Breakthroughs in the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 12(9). doi:10.3390/cancers12092691
35. Leonard B, Brand TM, O'Keefe RA, Lee ED, Zeng Y, Kemmer JD, Li H, Grandis JR, Bhola NE (2018) BET Inhibition Overcomes Receptor Tyrosine Kinase-Mediated Cetuximab Resistance in HNSCC. *Cancer research* 78(15):4331–4343. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0459
36. Bhatia A, Burtneß B (2023) Treating Head and Neck Cancer in the Age of Immunotherapy: A 2023 Update. *Drugs* 83(3):217–248. doi:10.1007/s40265-023-01835-2
37. Wang Z, Goto Y, Allevato MM, Wu VH, Saddawi-Konefka R, Gilardi M, Alvarado D, Yung BS, O'Farrell A, Molinolo AA, Duvvuri U, Grandis JR, Califano JA, Cohen EEW, Gutkind JS (2021) Disruption of the HER3-PI3K-mTOR oncogenic signaling axis and PD-1 blockade as a multimodal precision immunotherapy in head and neck cancer. *Nat Commun* 12(1):2383. doi:10.1038/s41467-021-22619-w
38. Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333(6046):1157–1160. doi:10.1126/science.1208130
39. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, Zhao M, Ortega Alves MV, Chang K, Drummond J, Cortez E, Xie T-X, Di Zhang, Chung W, Issa J-PJ,

- Zweidler-McKay PA, Wu X, El-Naggar AK, Weinstein JN, Wang J, Muzny DM, Gibbs RA, Wheeler DA, Myers JN, Frederick MJ (2013) Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 3(7):770–781. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0537
40. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR et al (2011) Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333(6046):1154–1157. doi:10.1126/science.1206923
41. Morris LGT, Chandramohan R, West L, Zehir A, Chakravarty D, Pfister DG, Wong RJ, Lee NY, Sherman EJ, Baxi SS, Ganly I, Singh B, Shah JP, Shaha AR, Boyle JO, Patel SG, Roman BR, Barker CA, McBride SM, Chan TA, Dogan S, Hyman DM, Berger MF, Solit DB, Riaz N, Ho AL (2017) The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform. *JAMA oncology* 3(2):244–255. doi:10.1001/jamaoncol.2016.1790
42. Lindenbergh-van der Plas M, Brakenhoff RH, Kuik DJ, Buijze M, Bloemena E, Snijders PJF, Leemans CR, Braakhuis BJM (2011) Prognostic significance of truncating TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17(11):3733–3741. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0183
43. Kim KT, Kim B-S, Kim JH (2016) Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck* 38 Suppl 1(Suppl 1):E2021-9. doi:10.1002/hed.24372
44. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu Y-S, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin A-S, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D (2019) Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 380(20):1929–1940. doi:10.1056/NEJMoa1813904
45. Soulières D, Faivre S, Mesía R, Remenár É, Li S-H, Karpenko A, Dechaphunkul A, Ochsenreither S, Kiss LA, Lin J-C, Nagarkar R, Tamás L, Kim S-B, Erfán J, Alyasova A, Kasper S, Barone C, Turri S, Chakravartty A, Chol M, Aimone P, Hirawat S, Licitra L (2017) Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18(3):323–335. doi:10.1016/S1470-2045(17)30064-5
46. Gougis P, Moreau Bachelard C, Kamal M, Gan HK, Borcoman E, Torossian N, Bièche I, Le Tourneau C (2019) Clinical Development of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JNCI Cancer Spectrum* 3(4):pkz055. doi:10.1093/jncics/pkz055

47. Eder T, Hess AK, Konschak R, Stromberger C, Jöhrens K, Fleischer V, Hummel M, Balermipas P, Grün J von der, Linge A, Lohaus F, Krause M, Baumann M, Stuschke M, Zips D, Grosu AL, Abdollahi A, Debus J, Belka C, Pigorsch S, Combs SE, Budach V, Tinhofer I (2019) Interference of tumour mutational burden with outcome of patients with head and neck cancer treated with definitive chemoradiation: a multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group. *Eur J Cancer* 116:67–76. doi:10.1016/j.ejca.2019.04.015
48. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, Sher X, Liu XQ, Lu H, Nebozhyn M, Zhang C, Lunceford JK, Joe A, Cheng J, Webber AL, Ibrahim N, Plimack ER, Ott PA, Seiwert TY, Ribas A, McClanahan TK, Tomassini JE, Loboda A, Kaufman D (2018) Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* 362(6411). doi:10.1126/science.aar3593
49. Le DT, Uram JN, Wang H et al (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372(26):2509–2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596
50. Le DT, Durham JN, Smith KN et al (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357(6349):409–413. doi:10.1126/science.aan6733
51. (2023) Scientific Image and Illustration Software | BioRender. <https://www.biorender.com/>. Zugegriffen: 17. April 2023
52. (2020) Ion AmpliSeq Designer. <https://ampliseq.com/login/login.action>. Zugegriffen: 11. August 2022
53. (2020) cBioPortal for Cancer Genomics. https://www.cbioportal.org/study-summary?id=hnsk_mdanderson_2013%2Chnsk_tcga_pan_can_atlas_2018%2Chnsk_jhu%2Chnsk_broad%2Chnc_mskcc_2016. Zugegriffen: 11. August 2022
54. Cosmic (2020) COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. Zugegriffen: 11. August 2022
55. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29(1):24–26. doi:10.1038/nbt.1754
56. Thermo Fisher Scientific (2021) Oncomine Comprehensive Assay Plus User Guide (Pub. No. MAN0018490 D.0)
57. Thermo Fisher Scientific (2017) Ion AmpliSeq Library Preparation on the Ion Chef System User Guide (Pub. No. MAN0013432 Rev. E.0)
58. Thermo Fisher Scientific (2017) Ion PGM Hi-Q Chef Kit User Guide (Pub. No. MAN0010919 Rev. C.0)

59. Thermo Fisher Scientific (2017) Ion PGM Hi-Q OT2 Kit User Guide (Pub. No. MAN0010902 Rev. B.0)
60. Thermo Fisher Scientific (2017) Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit User Guide (Pub. No. MAN0009816 Rev. E.0)
61. Thermo Fisher Scientific (2019) Ion 550 Kit – Chef User Guide (Pub.No. MAN0017275 C.0)
62. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM et al (2017) OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017. doi:10.1200/PO.17.00011
63. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, Ng CKY, Bedard PL, Tortora G, Douillard J-Y, van Allen EM, Schultz N, Swanton C, André F, Puzstai L (2018) A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Annals of Oncology* 29(9):1895–1902. doi:10.1093/annonc/mdy263
64. Dunnen JT den, Dagleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux A-F, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PEM (2016) HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human mutation* 37(6):564–569. doi:10.1002/humu.22981
65. (2021) Coverage Analysis metrics. <https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-7355C2DB-5AC9-4EF6-B166-1F55ABE0F1BA.html>. Zugegriffen: 09. August 2022
66. Luc G. T. Morris, Raghu Chandramohan, Lyndsay West, Ahmet Zehir, Debyani Chakravarty, David G. Pfister, Richard J. Wong, Nancy Y. Lee, Eric J. Sherman, Shrujal S. Baxi, Ian Ganly, Bhuvanesh Singh, Jatin P. Shah, Ashok R. Shaha, Jay O. Boyle, Snehal G. Patel, Benjamin R. Roman, Christopher A. Barker, Sean M. McBride, Timothy A. Chan, Snjezana Dogan, David M. Hyman, Michael F. Berger, David B. Solit, Nadeem Riaz, Alan L. Ho (2017) The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers. *JAMA Oncol*
67. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, Kalbasi A, Grasso CS, Hugo W, Sandoval S, Torrejon DY, Palaskas N, Rodriguez GA, Parisi G, Azhdam A, Chmielowski B, Cherry G, Seja E, Berent-Maoz B, Shintaku IP, Le DT, Pardoll DM, Diaz LA, Tumei PC, Graeber TG, Lo RS, Comin-Anduix B, Ribas A (2017) Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov* 7(2):188–201. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-1223
68. Galot R, Le Tourneau C, Guigay J, Licitra L, Tinhofer I, Kong A, Caballero C, Fortpied C, Bogaerts J, Govaerts A-S, Staelens D, Raveloarivahy T, Rodegher L, Laes J-F, Saada-Bouid E, Machiels J-P (2018) Personalized biomarker-based treatment strategy for

- patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: EORTC position and approach. *Ann Oncol* 29(12):2313–2327. doi:10.1093/annonc/mdy452
69. Zwirner K, Hilke FJ, Demidov G, Socarras Fernandez J, Ossowski S, Gani C, Thorwarth D, Riess O, Zips D, Schroeder C, Welz S (2019) Radiogenomics bei Kopf-Hals-Tumoren: Korrelation von bildgebender Heterogenität und somatischen Mutationen in TP53, FAT1 und KMT2D. *Strahlenther Onkol* 195(9):771–779. doi:10.1007/s00066-019-01478-x
70. Wang D, Ma K, Deng W, Li J, Xiang S, Zhang Y, Fu Y, Dai H, Huang B (2021) Development and Analytical Validation of a Targeted Next-Generation Sequencing Panel to Detect Actionable Mutations for Targeted Therapy. *Onco Targets Ther* 14:2423–2431. doi:10.2147/OTT.S299381
71. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6(269):pl1. doi:10.1126/scisignal.2004088
72. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2(5):401–404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
73. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR (2020) Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 6(1):92. doi:10.1038/s41572-020-00224-3
74. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M (2012) Human papillomavirus in non-opharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head and neck pathology* 6 Suppl 1(Suppl 1):S104-20. doi:10.1007/s12105-012-0368-1
75. McDonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, Wang C, Zschunke M, Gorman JA, Kopp KJ, Cunningham JM (2019) Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLoS ONE* 14(4):e0211400. doi:10.1371/journal.pone.0211400
76. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, van Tran Nhieu J, Allory Y, Moroch J, Georges O, Fournet J-C, Zafrani E-S, Leroy K (2017) DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch* 471(4):491–500. doi:10.1007/s00428-017-2213-0
77. Nakagaki T, Tamura M, Kobashi K, Omori A, Koyama R, Idogawa M, Ogi K, Hiratsuka H, Tokino T, Sasaki Y (2018) Targeted next-generation sequencing of 50 cancer-related genes in Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 40(9):1010428318800180. doi:10.1177/1010428318800180
78. Shanmugam A, Hariharan AK, Hasina R, Nair JR, Katragadda S, Irusappan S, Ravichandran A, Veeramachaneni V, Bettadapura R, Bhati M, Ramaswamy V, Rao VUS, Bagadia

- RK, Manjunath A, Manjunath NML, Solomon MC, Maji S, Bahadur U, Bettgowda C, Papadopoulos N, Lingen MW, Hariharan R, Gupta V, Agrawal N, Izumchenko E (2021) Ultrasensitive detection of tumor-specific mutations in saliva of patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Cancer* 127(10):1576–1589. doi:10.1002/cncr.33393
79. Dongre HN, Haave H, Fromreide S, Erland FA, Moe SEE, Dhayalan SM, Riis RK, Sapkota D, Costea DE, Aarstad HJ, Vintermyr OK (2021) Targeted Next-Generation Sequencing of Cancer-Related Genes in a Norwegian Patient Cohort With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Novel Actionable Mutations and Correlations With Pathological Parameters. *Frontiers in Oncology* 11:734134. doi:10.3389/fonc.2021.734134
80. (2023) Ion AmpliSeq On-Demand Panels for Targeted Sequencing | Thermo Fisher Scientific - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-select-targets/ampliseq-target-selection/ion-ampliseq-on-demand-panels-targeted-sequencing.html>. Zugegriffen: 10. April 2023
81. Xiao J, Li W, Huang Y, Huang M, Li S, Zhai X, Zhao J, Gao C, Xie W, Qin H, Cai S, Bai Y, Lan P, Zou Y (2021) A next-generation sequencing-based strategy combining microsatellite instability and tumor mutation burden for comprehensive molecular diagnosis of advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 21(1):282. doi:10.1186/s12885-021-07942-1
82. Odell EW (2021) Aneuploidy and loss of heterozygosity as risk markers for malignant transformation in oral mucosa. *Oral Diseases* 27(8):1993–2007. doi:10.1111/odi.13797
83. Zhou W, Zhao Z, Wang R, Han Y, Wang C, Yang F, Han Y, Liang H, Qi L, Wang C, Guo Z, Gu Y (2017) Identification of driver copy number alterations in diverse cancer types and application in drug repositioning. *Molecular oncology* 11(10):1459–1474. doi:10.1002/1878-0261.12112
84. Bhagwate AV, Liu Y, Winham SJ, McDonough SJ, Stallings-Mann ML, Heinzen EP, Davila JI, Vierkant RA, Hoskin TL, Frost M, Carter JM, Radisky DC, Cunningham JM, Degnim AC, Wang C (2019) Bioinformatics and DNA-extraction strategies to reliably detect genetic variants from FFPE breast tissue samples. *BMC Genomics* 20(1):689. doi:10.1186/s12864-019-6056-8
85. Spencer DH, Sehn JK, Abel HJ, Watson MA, Pfeifer JD, Duncavage EJ (2013) Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J Mol Diagn* 15(5):623–633. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.05.004
86. Do H, Dobrovic A (2015) Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 61(1):64–71. doi:10.1373/clinchem.2014.223040

87. Berra CM, Torrezan GT, Paula CA de, Hsieh R, Lourenço SV, Carraro DM (2019) Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. *Appl Cancer Res* 39(1):1–6. doi:10.1186/s41241-019-0075-2
88. Serizawa M, Yokota T, Hosokawa A, Kusafuka K, Sugiyama T, Tsubosa Y, Yasui H, Nakajima T, Koh Y (2015) The efficacy of uracil DNA glycosylase pretreatment in amplicon-based massively parallel sequencing with DNA extracted from archived formalin-fixed paraffin-embedded esophageal cancer tissues. *Cancer Genetics* 208(9):415–427. doi:10.1016/j.cancergen.2015.05.001
89. Groelz D, Viertler C, Pabst D, Dettmann N, Zatloukal K (2018) Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLOS ONE* 13(9):e0203608. doi:10.1371/journal.pone.0203608
90. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research* 18(21):6409–6412. doi:10.1093/nar/18.21.6409
91. Vestergaard LK, Oliveira DNP, Poulsen TS, Høgdall CK, Høgdall EV (2021) Oncomine™ Comprehensive Assay v3 vs. Oncomine™ Comprehensive Assay Plus. *Cancers (Basel)* 13(20):5230. doi:10.3390/cancers13205230
92. Gao XH, Li J, Gong HF, Yu GY, Liu P, Hao LQ, Liu LJ, Bai CG, Zhang W (2020) Comparison of Fresh Frozen Tissue With Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Mutation Analysis Using a Multi-Gene Panel in Patients With Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* 10:310. doi:10.3389/fonc.2020.00310
93. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 12(4):425–432. doi:10.2353/jmoldx.2010.090188
94. Misyura M, Zhang T, Sukhai MA, Thomas M, Garg S, Kamel-Reid S, Stockley TL (2016) Comparison of Next-Generation Sequencing Panels and Platforms for Detection and Verification of Somatic Tumor Variants for Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn* 18(6):842–850. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.06.004
95. Kuderer NM, Burton KA, Blau S, Rose AL, Parker S, Lyman GH, Blau CA (2017) Comparison of 2 Commercially Available Next-Generation Sequencing Platforms in Oncology. *JAMA Oncol* 3(7):996–998. doi:10.1001/jamaoncol.2016.4983
96. Johann DJ, Rodriguez-Canales J, Mukherjee S, Prieto DA, Hanson JC, Emmert-Buck M, Blonder J (2009) Approaching solid tumor heterogeneity on a cellular basis by tissue proteomics using laser capture microdissection and biological mass spectrometry. *Journal of proteome research* 8(5):2310–2318. doi:10.1021/pr8009403

97. Park SY, Gönen M, Kim HJ, Michor F, Polyak K (2010) Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *The Journal of clinical investigation* 120(2):636–644. doi:10.1172/JCI40724
98. D'Amico SC, Leshchiner I, Haase K et al (2021) Characterizing genetic intra-tumor heterogeneity across 2,658 human cancer genomes. *Cell* 184(8):2239–2254.e39. doi:10.1016/j.cell.2021.03.009
99. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260):23–28. doi:10.1126/science.959840
100. Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, Wongsurawat VJ, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Risques R-A, Rabinovitch PS, Reid BJ (2006) Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nature genetics* 38(4):468–473. doi:10.1038/ng1768
101. Campbell LL, Polyak K (2007) Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6(19):2332–2338. doi:10.4161/cc.6.19.4914
102. Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tsuzuki T, Hayashi I, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J (1995) Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *The American journal of pathology* 147(4):1112–1122
103. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN (2017) Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 19(3):341–365. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.01.011
104. Fukusumi T, Califano JA (2018) The NOTCH Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res* 97(6):645–653. doi:10.1177/0022034518760297
105. Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN et al (2019) Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature genetics* 51(2):202–206. doi:10.1038/s41588-018-0312-8
106. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, Chung HC, Kindler HL, Lopez-Martin JA, Miller WH, Italiano A, Kao S, Piha-Paul SA, Delord J-P, McWilliams RR, Fabrizio DA, Aurora-Garg D, Xu L, Jin F, Norwood K, Bang Y-J (2020) Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multi-cohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol* 21(10):1353–1365. doi:10.1016/S1470-2045(20)30445-9

107. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y, Kim T-M, Park PJ (2017) A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 8(1):15180. doi:10.1038/ncomms15180
108. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic acids research* 46(D1):D1062-D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153
109. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248
110. Yuan X, Larsson C, Xu D (2019) Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* 38(34):6172–6183. doi:10.1038/s41388-019-0872-9
111. Yu Y, Fan D, Song X, Zakeri K, Chen L, Kang J, McBride S, Tsai CJ, Dunn L, Sherman E, Katabi N, Dogan S, Cracchiolo J, Cohen M, Boyle JO, Lee M, Valero C, Wang J, Wong R, Morris L, Riaz N, Lee N (2021) TERT Promoter Mutations Are Enriched in Oral Cavity Cancers and Associated With Locoregional Recurrence. *JCO Precis Oncol* 5. doi:10.1200/PO.20.00515
112. Gomez DE, Armando RG, Alonso DF (2012) AZT as a telomerase inhibitor. *Front. Oncol.* 2:113. doi:10.3389/fonc.2012.00113
113. Ruden M, Puri N (2013) Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer treatment reviews* 39(5):444–456. doi:10.1016/j.ctrv.2012.06.007
114. Liggett WH, Sidransky D (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *JCO* 16(3):1197–1206. doi:10.1200/JCO.1998.16.3.1197
115. EMA Europa Ibrance, INN-palbociclib. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ibrance-epar-product-information_de.pdf. Zugriffen: 12. Dezember 2022
116. Adkins DR, Lin J-C, Sacco A, Ley J, Oppelt P, Vanchenko V, Komashko N, Yen C-J, Wise-Draper T, Lopez-Picazo Gonzalez J, Radulovic S, Shen Q, Thurm H, Martini J-F, Hoffman J, Huang X, Melichar B, Tahara M (2021) Palbociclib and cetuximab compared with placebo and cetuximab in platinum-resistant, cetuximab-naïve, human papillomavirus-unrelated recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A double-blind, randomized, phase 2 trial. *Oral Oncol* 115:105192. doi:10.1016/j.oraloncology.2021.105192
117. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M, Lisyanskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, Gourley C, Banerjee S, Oza A, González-Martín A,

- Aghajanian C, Bradley W, Mathews C, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, DiSilvestro P (2018) Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 379(26):2495–2505. doi:10.1056/NEJMoa1810858
118. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, Gebiski V, Penson RT, Oza AM, Korach J, Huzarski T, Poveda A, Pignata S, Friedlander M, Colombo N, Harter P, Fujiwara K, Ray-Coquard I, Banerjee S, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, Pautier P (2017) Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18(9):1274–1284. doi:10.1016/S1470-2045(17)30469-2
119. Karam SD, Reddy K, Blatchford PJ, Waxweiler T, DeLouize AM, Oweida A, Somerset H, Marshall C, Young C, Davies KD, Kane M, Tan AC, Wang XJ, Jimeno A, Aisner DL, Bowles DW, Raben D (2018) Final Report of a Phase I Trial of Olaparib with Cetuximab and Radiation for Heavy Smoker Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* 24(20):4949–4959. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0467
120. Psyrri A, Gkotszamanidou M, Papaxoinis G, Krikoni L, Economopoulou P, Kotsantis I, Anastasiou M, Souliotis VL (2021) The DNA damage response network in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *ESMO open* 6(2):100075. doi:10.1016/j.esmoop.2021.100075
121. Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V, Chan E, Durinck S, Edgar KA, Kljavin NM, Rivers CS, Gnad F, Roose-Girma M, Haverty PM, Fedorowicz G, Heldens S, Soriano RH, Zhang Z, Wallin JJ, Johnson L, Merchant M, Modrusan Z, Stern HM, Seshagiri S (2013) Conditional activation of *Pik3ca*(H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. *Oncogene* 32(3):318–326. doi:10.1038/onc.2012.53
122. EMA Europa Piqray, INN - alpelisib. EMA Europa. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/piqray-epar-medicine-overview_de.pdf. Zugegriffen: 12. Dezember 2022
123. Hanna GJ, Perez CA, Ho AL, Gillison ML, Adkins D, Dayoub A, Saunders A, Leoni M, Dale S, Nie K, Dmitrienko A (2022) A phase 1/2 trial to evaluate the safety and antitumor activity of tipifarnib and alpelisib for patients with PIK3CA-mutated/amplified and/or HRAS-overexpressing recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *JCO* 40(16_suppl):TPS6104-TPS6104. doi:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS6104
124. Lee Y-R, Chen M, Pandolfi PP (2018) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19(9):547–562. doi:10.1038/s41580-018-0015-0

125. Georgescu M-M (2010) PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 1(12):1170–1177. doi:10.1177/1947601911407325
126. Martorana F, Motta G, Pavone G, Motta L, Stella S, Vitale SR, Manzella L, Vigneri P (2021) AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Front Pharmacol* 12:662232. doi:10.3389/fphar.2021.662232
127. Schmid P, Abraham J, Chan S, Wheatley D, Brunt M, Nemsadze G, Baird R, Park YH, Hall P, Perren T, Stein RC, László M, Ferrero J-M, Phillips M, Conibear J, Sarker S-J, Prendergast A, Cartwright H, Mousa K, Turner NC (2018) AZD5363 plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (PAKT): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *JCO* 36(15_suppl):1007. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.1007
128. Bono JS de, Giorgi U de, Rodrigues DN, Massard C, Bracarda S, Font A, Arranz Arija JA, Shih KC, Radavoi GD, Xu N, Chan WY, Ma H, Gendreau S, Riisnaes R, Patel PH, Maslyar DJ, Jinga V (2019) Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clin Cancer Res* 25(3):928–936. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0981
129. Galot R, Licitra LF, Le Tourneau C, Guigay J, Tinhofer I, Kong AH, Caballero CA, Fortpied C, Govaerts A-S, Staelens D, Raveloarivahy T, Laes J-F, Canon J-LR, Henry S, Saada-Bouزيد E, Machiels J-PH (2018) EORTC 1559-HNCG: A pilot study of personalized biomarker-based treatment strategy or immunotherapy in patients with recurrent/metastatic (R/M) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN)—"UPSTREAM". *JCO* 36(15_suppl):TPS6095-TPS6095. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS6095
130. O'Connor MJ (2015) Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular cell* 60(4):547–560. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.040
131. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C (2013) The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501(7467):338–345. doi:10.1038/nature12625
132. Nam Y, Sliz P, Song L, Aster JC, Blacklow SC (2006) Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* 124(5):973–983. doi:10.1016/j.cell.2005.12.037
133. ONISHI H, Ichimiya S, YANAI K, UMEBAYASHI M, NAKAMURA K, YAMASAKI A, IMAIZUMI A, NAGAI S, MURAHASHI M, OGATA H, MORISAKI T (2018) RBPJ and MAML3: Potential Therapeutic Targets for Small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research* 38(8):4543–4547. doi:10.21873/anticancer.12758
134. Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, Lingen M, Sauk JJ (2018) Molecular markers associated with development and progression of

- potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 125(6):650–669. doi:10.1016/j.oooo.2018.03.012
135. Zhang X, Sjöblom T (2021) Targeting Loss of Heterozygosity: A Novel Paradigm for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(1). doi:10.3390/ph14010057
136. Gasparotto D, Vukosavljevic T, Piccinin S, Barzan L, Sulfaro S, Armellin M, Boiocchi M, Maestro R (1999) Loss of heterozygosity at 10q in tumors of the upper respiratory tract is associated with poor prognosis. *International journal of cancer* 84(4):432–436. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990820)84:4<432::aid-ijc18>3.0.co;2-#
137. Sabbir MG, Roy A, Mandal S, Dam A, Roychoudhury S, Panda CK (2006) Deletion mapping of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients: correlation with prognosis of the tumour. *International journal of experimental pathology* 87(2):151–161. doi:10.1111/j.0959-9673.2006.00467.x
138. Yamamoto N, Mizoe Je, Numasawa H, Tsujii H, Shibahara T, Noma H (2003) Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39(8):796–805. doi:10.1016/s1368-8375(03)00079-4
139. Makishima H, Maciejewski JP (2011) Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin Cancer Res* 17(12):3913–3923. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2900
140. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

IX. Anhang

9.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle 25: qPCR-Ergebnisse Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2

Probenkennung	DNA-Konzentration (pM)
NF373	847,73
NF374	12,86
NF374v2	134,98
NF375	480,20
NF376	1304,71
NF377	2606,82
NF378	292,52
NF379	70,16
NF380	432,61
NF381	209,52
NF382	227,16
NF403	78,07
NF406	1357,02
NF409	680,26
NF410	173,18
NF411	349,97
NF412	387,23
NF413	194,97
NF414	28,89
NF414v2	301,03
NF415	32,57
NF417	88,01

Die Fett unterlegten Proben wurden sequenziert, die anderen Proben wurden aufgrund zu geringer DNA-Konzentration verworfen.

Tabelle 26: Sequenzierparameter mit dem Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2

Probennummer	Uniformity of Amplicon Coverage	Amplikons mit ≥500 Reads	Amplicons reading end-to-end	Anteil der On target- reads	Finale Chip Beladung	Klonale/ Polyklonale	Mapped reads
NF373	97,58%	97,58%	99,03%	99.31%	69	72/28	531727
NF375	57,49%	58,45%	96,62%	99.27%	69	72/28	544346
NF376	97,58%	98,07%	99,52%	99.59%	69	72/28	870629
NF377	95,65%	96,14%	99,03%	99.13%	69	72/28	536382
NF374	90,82%	93,72%	100,00%	99.08%	68	71/29	646626
NF378	97,58%	97,10%	99,03%	99.17%	68	71/29	429120
NF379	95,65%	95,65%	99,03%	98.72%	68	71/29	450682
NF380	95,65%	95,65%	99,03%	98.72%	68	71/29	450682
NF381	95,65%	93,24%	99,03%	99.03%	68	71/29	277911
NF382	98,55%	95,17%	99,03%	98.82%	68	71/29	337581
NF403	88,41%	82,61%	99,52%	97.70%	68	67/33	422789
NF406	99,52%	99,03%	99,52%	94.49%	68	67/33	53144
NF409	97,10%	96,62%	99,03%	99.24%	68	67/33	472302
NF410	90,91%	90,34%	99,03%	99.23%	68	67/33	494282
NF411	96,62%	92,27%	99,03%	98.76%	68	67/33	29577
NF412	98,07%	99,03%	99,03%	96.16%	68	67/33	59981
NF413	97,58%	96,14%	99,03%	99.23%	68	67/33	397655
NF414	69,57%	68,12%	96,62%	98.88%	68	67/33	490578
NF417	96,14%	84,54%	99,03%	99.18%	68	67/33	286601

Tabelle 27: Übersicht über die enthaltenen Gene im ersten Design des Custom Panels

Gene aus cBioPortal		Gen Panel DKFZ				Target- und Immuntherapien		Gen Panel Lim et al.			
TP53	PCDH15	ACACA	EPHA7	LTBP1	PTPRZ1	JAK1	CCND1	ABL1	CTNNA2	IDH2	PIK3CD
TTN	ZFHX4	ACTC1	ERBB4	MACC1	RAC1	JAK2	DDR2	ABL2	CTNND2	IKBKE	PIK3R2
FAT1	CUBN	ADCY2	ETV6	MAGEL2	RAD51C	MLH1	EPHA2	AKT3	CTSK	IL7R	PIK3R3
CDKN2A	FAT4	AFF1	EYA1	MAP2	RAP1A	MSH2	ERBB2	ARAF	CTTN	ITGB3	PIK3R6
NOTCH1	PLEC	AGTR1	EZH2	MAP3K7	RAP1B	MSH6	FGFR1	ARID2	DAXX	KDM5A	PPFIA2
PIK3CA	AHNAK	AJUBA	F13B	MAPK1	RASA1	PMS2	FGFR2	ASH1L	DNMT1	KDM5C	PPP2R1A
MUC16	COL22A1	AKAP12	F5	MAPK9	RB1		FGFR3	ASXL1	DNMT3B	KLHL1	PRB1
CSMD3	DNAH9	AKT1	FAM101A	MBD1	RB1CC1		IGF1R	AURKA	DOT1L	KLHL6	PRB2
KMT2D	EP300	AKT2	FAM155A	MED1	RBM5		KRAS	AURKB	DUSP27	LAMB3	PRKCI
SYNE1	APOB	ALB	FAM222B	MED12	RECQL4		MET	AXL	EPCAM	LAMC2	PTCH1
LRP1B	HRAS	ALDH1L1	FANCA	MME	REG1A		MYC	BAP1	EPHA1	MAP2K1	PTK2B
PCLO	DNAH8	ALK	FANCB	MS4A14	RET		NF1	BARD1	EPHA4	MAP2K2	RAD50
DNAH5	HERC2	ANKRD30B	FANCC	MTOR	RGS17		NRAS	BIRC3	EPHA5	MAP2K4	RAD51
USH2A	ADGRV1	ANO1	FANCD2	MUC6	RHOA		PTEN	BRCA1	EPHB1	MAP3K1	RAF1
FLG	NAV3	APC	FANCE	MYH1	ROS1			BRD3	EPHB4	MAP3K8	RASSF1A
NSD1	FBXW7	AR	FANCF	MYH10	RUNX1T1			BRD4	ERBB	MAP3K9	RICTOR
RYR2	MUC5B	ARH-	FANCG	MYH11	RXRA			BRD7	ERBB3	MBD2	RIT1
CASP8	CREBBP	GAP35	FANCI	MYH9	SDHA			BUB1	ERG	MDM4	RPS6KA1
SI	SPEN	ARID1A	FANCL	NBN	SELP			CBL	FAM123B	MLL1	RPTOR
PKHD1L1	PRDM9	ASAP1	FANCM	NCOR1	SEMA5A			CCND2	FBN2	MLL2	SETD2
RELN	ZNF804B	ASNS	FCRL4	NCOR2	SER-			CCND3	FES	MLL4	SIRT2
DMD	FAT2	ASXL3	FIGN	NCR1	PINB4			CDH9	FGFR4	MLL3	SMAD2
FAM135B	LAMA2	ATM	FLT3	NECAB1	SETBP1			CDK12	FOXP1	MYCL1	SMAD3
KMT2C	DST	ATR	FN1	NEUROD6	SIN3A			CDK6	GATA1	MYCL	BRG1
XIRP2	LRP2	ATRX	FOSL2	NF2	SIRT1			CDK8	GATA2	MYCN	SMARCB1
HUWE1	RYR3	AURKC	FOXO3	NFE2L2	SIRT3			CDKN1B	GATA3	NFKBIA	SOCS1
COL11A1	SYNE2	AXIN2	GABRB3	NOTCH2	SLC26A7			CDKN2B	GNA11	NKX2-1	SOX10
PAPPA2	MACF1	B2M	GRID2	NOTCH3	SLC9A1			CDKN2C	GNA13	NPM1	SOX2
FAT3	PCDH11X	BCL11A	GRM1	NPY5R	SLIT2			CEBPA	GNAQ	PAK3	STAT3
		BCL9	GSTM2	NTM	SLITRK4			CEP350	GNAS	PAK5	STAT4
		BECN1	HDAC6	NUP214	SLX4			CFTR	GPR98	PAK7	STYK1
		BIRC6	HFM1	OR2J2	SMAD4			CHD2	HDAC1	PDGFRB	TET2
		BLM	HIST1H1B	OR2L13	SMARCA2			CHD4	HDAC2	PDK1	TOP1
		BRAF	HIST1H2BD	OR2M2	SMARCA4			CHD5	HDAC3	PIK3C2A	TRIO
		BRCA2	HIST1H2BK	OR2T12	SMO			CHD7	HDAC5	PIK3C2B	TSC1
		BRIP1	HIST1H4E	OR4C11	SORCS1			CHEK1	HDAC7A	PIK3C2G	TSC2
		BRWD3	HNRNPA2B1	OR4M2	SPTBN1			CHEK2	HDAC9	PIK3C3	VHL
		C6	HOXD10	OR52E2	SRC			CRKL	IDH1	PIK3CB	WHSC1L1
		C9ORF135	HSPG2	OR56A1	STEAP4			CTNNA1			
		CD163	IFNGR1	OR5D13	STK11						
		CD1E	IL1RAPL1	PABPC5	SULF1						
		CDH1	IL6ST	PALB2	SYNCRIP						
		CDH10	INPP5D	PBRM1	SYNE3						
		CDH11	INPPL1	PCDH10	TARP						
		CDH5	ITGB1	PDGFRA	TEK						
		CDK4	JAK3	PEG3	TERF1						
		CHD1L	KCNT2	PEX11A	TERF2						
		CLDN18	KDM5B	PFKP	TERT						
		CNTNAP5	KDM6A	PIK3CG	TG						
		COL1A2	KDR	PIK3R1	TGFBR2						
		CPXCR1	KEAP1	PIWIL1	THBS1						
		CRABP2	KIT	PKD1	TLN1						
		CTCF	KMT2A	PKN1	TLR4						
		CTNNB1	KRT14	PLCB1	TP63						
		CUL3	KRT5	PLSCR4	TPO						
		CUX1	LAMA1	POM121L12	TPP1						
		DACH1	LAMA3	POT1	TRIM24						
		DCC	LAMA4	PRDX4	TRIM58						

		DICER1 DNM2 DNMT3A DOCK1 DOK6 DPP10 DPPA4 DSP EGFR EIF3A EIF4G1 EPAS1 EPB41L3 EPA3	LAMA5 LBP LCP1 LILRB1 LIMK1 LIN28B LINGO2 LRFN5 LRP1 LRP6 LRRC4C LRRK2	PRIM2 PRKDC PRMT5 PROX1 PRSS1 PRUNE2 PTPN11 PTPRA PTPRC PTPRD PTPRF PTPRT	TRRAP TTF1 UBE3A UBR5 UGT2B7 USP9X VCAN WRN XPO1 ZBTB16 ZIC1 ZNF737 ZNF750						
--	--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--

Von allen Genen wurde in diesem Design die gesamte kodierende Sequenz abgedeckt(=CDS).

Blauer Kasten: Am häufigsten mutierte Gene in cBioPortal Datensatz [21, 38–40, 66].

Grüner Kasten: Am häufigsten mutierte Gene bei Sequenzierung mit DKFZ Panel [47].

Lila Kasten: Gene Relevant für Immuntherapie und zielgerichtete Therapie [16, 21, 49, 67, 68].

Tabelle 28: Sequenzierparameter mit dem Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Probenkennung	Mapped Reads in Millionen	Amplikons mit ≥500 Reads In %	Uniformity of Amplicon Coverage in %
NF374v1	13,92	44,6	76,6
NF375v1	36,75	92,7	92,0
NF376v1	27,96	77,9	81,9
NF378v1	05,98	31,4	93,1
NF380v1	27,78	93,0	94,8
NF381v1	37,37	92,7	90,3
NF381v2	32,31	69,0	72,5
NF382v1	37,68	84,3	84,1
NF382v2	07,43	39,9	92,7
NF404v1	31,43	94,0	94,5
NF406v1	04,30	08,4	96,1
NF410v1	32,02	91,3	91,8
NF412v1	02,21	05,8	63,3
NF412v2	17,99	71,8	86,3
NF413v1	16,80	74,3	90,4
NF414v1	24,29	78,3	84,1
NF417v1	44,72	96,3	96,0
NF423v1	18,11	78,3	93,9
NF424v1	29,48	92,2	93,8
NF425v1	06,62	24,4	93,7
NF426v1	00,28	00,0	91,6
NF427v1	28,28	93,0	95,3
NF428v1	79,10	98,1	95,7
NF510v1	14,93	70,4	91,1
Alle Proben (n=24)	24,07 (± 17,31)	66,8 (± 31,8)	89,0 (± 8,3)
Ausgewertete Proben (n=16)	31,54 (± 15,25)	86,2 (± 9,4)	91,0 (± 4,6)

Werte in Klammern geben Standardabweichung an.

Tabelle 29: qPCR-Ergebnisse Oncomine™ Comprehensive Assay Plus

Probenkennung	DNA-Konzentration (pM)
NF373	3,23
NF373v2	7,98
NF374	16,12
NF376	26,89
NF379	2,77
NF379v2	4,94
NF381	51,04
NF382	85,49
NF409	6,47
NF409v2	1,56
NF412	110,78
NF413	41,87
NF414	34,63
NF424	46,48
NF504	17,00
NF510	55,73
NF511	8,38
NF513	0,71
NF514	9,30
NF520	10,01
NF540	15,20
NF542	10,15
NF543	4,93

Die fett unterlegten Proben wurden sequenziert, die anderen Proben wurden aufgrund zu geringer DNA-Konzentration verworfen.

Tabelle 30: Mutationsfrequenz aller mutierten Gene im Vergleich mit cBioPortal

Gen	Mutationsfrequenz alle Proben (n=16)	Mutationsfrequenz Primarius (n=8)	Mutationsfrequenz vRezdiv (n=8)	cBio- Portal (n=434)
TP53	50,00%	62,50%	37,50%	69,10%
MAML3	43,75%	25,00%	62,50%	0,40%
KMT2D	37,50%	50,00%	25,00%	14,80%
NOTCH 1	37,50%	50,00%	25,00%	15,50%
NTRK1	25,00%	25,00%	25,00%	1,10%
CSMD3	18,75%	25,00%	12,50%	19,30%
FANCC	18,75%	25,00%	12,50%	1,00%
TPMT	18,75%	12,50%	25,00%	0,40%
ZFHX3	18,75%	37,50%	0,00%	2,80%
ATRX	12,50%	12,50%	12,50%	5,40%
BRCA2	12,50%	12,50%	12,50%	3,90%
CUL4B	12,50%	12,50%	12,50%	1,40%
CYP2D6	12,50%	25,00%	0,00%	0,60%
ERAP1	12,50%	12,50%	12,50%	0,40%
HLA-A	12,50%	0,00%	25,00%	3,30%
HLA-B	12,50%	12,50%	12,50%	3,10%
IDH2	12,50%	12,50%	12,50%	n.v.
NOTCH 3	12,50%	25,00%	0,00%	4,10%
RMDN2- AS1	12,50%	25,00%	0,00%	n.v.
TERT	12,50%	12,50%	12,50%	1,10%
USP40	12,50%	12,50%	12,50%	0,80%
ZMYM3	12,50%	12,50%	12,50%	2,50%
APC	6,50%	12,50%	0,00%	4,20%
ASXL1	6,50%	0,00%	12,50%	2,80%
ATR	6,25%	12,50%	0,00%	4,70%
AXL	6,25%	12,50%	0,00%	1,40%
BRCA1	6,25%	0,00%	12,50%	2,80%
CDKN2 A	6,25%	0,00%	12,50%	19,20%
CDKN2 B	6,25%	0,00%	12,50%	1,40%
COG1	6,25%	0,00%	12,50%	0,80%
CREBB P	6,25%	12,50%	0,00%	5,50%

DCAF4L2	6,25%	0,00%	12,50%	2,90%
DICER1	6,25%	0,00%	12,50%	2,50%
EP300	6,25%	12,50%	0,00%	5,90%
FGFR1	6,25%	12,50%	0,00%	0,60%
GHR	6,25%	0,00%	12,50%	1,10%
LRCH2	6,25%	12,50%	0,00%	0,70%
MSH3	6,25%	0,00%	12,50%	0,80%
MTERF4	6,25%	0,00%	12,50%	0,40%
MYCN	6,25%	12,50%	0,00%	0,40%
OR4C3	6,25%	0,00%	12,50%	1,10%
PHF6	6,25%	12,50%	0,00%	0,40%
PIK3CA	6,25%	12,50%	0,00%	16,00%
POLD1	6,25%	12,50%	0,00%	1,40%
PRKAR1A	6,25%	12,50%	0,00%	0,80%
PTEN	6,25%	12,50%	0,00%	2,50%
QRSL1	6,25%	12,50%	0,00%	n.v.
RAD52	6,25%	12,50%	0,00%	0,60%
RASA1	6,25%	0,00%	12,50%	4,00%
RECQL4	6,25%	12,50%	0,00%	2,00%
SMAD4	6,25%	0,00%	12,50%	2,10%

In den 3 mittleren Spalten sind die Mutationsfrequenzen der Gene aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden. Auf der rechten Seite sind die Mutationsfrequenzen von 434 DNA-Proben von HNSCC Patienten aus 5 Studien [21, 38–40, 66], die mittels der Webanwendung cBioPortal zusammengefasst wurden, aufgeführt.

Tabelle 31: Korrelation der Überlebenszahl mit der Anzahl an Mutationen pro Probe

		Anzahl Mutationen pro Probe	Anzahl onkogene Mutationen pro Probe
Zeit ED - Tod in Tagen	Pearson-Korrelation	-0,548	-0,186
	Signifikanz (2-seitig)	0,160	0,659
	Anzahl Patienten	8	8

Eine Korrelation der Zeit von Erstdiagnose bis zum Tod in Tagen mit der Anzahl an detektierten Mutationen pro Probe mittels der Pearson Korrelation ergibt $r = -0,548$. Wird die Zeit Von Erstdiagnose bis Tod in Tagen mit der Anzahl an detektierten onkogenen Mutationen korreliert so erhält man nach Pearson-Korrelation $r = -0,186$. Diese Ergebnisse sind bei einem 95% Konfidenzintervall nicht signifikant.

9.2 Ergänzende Abbildungen

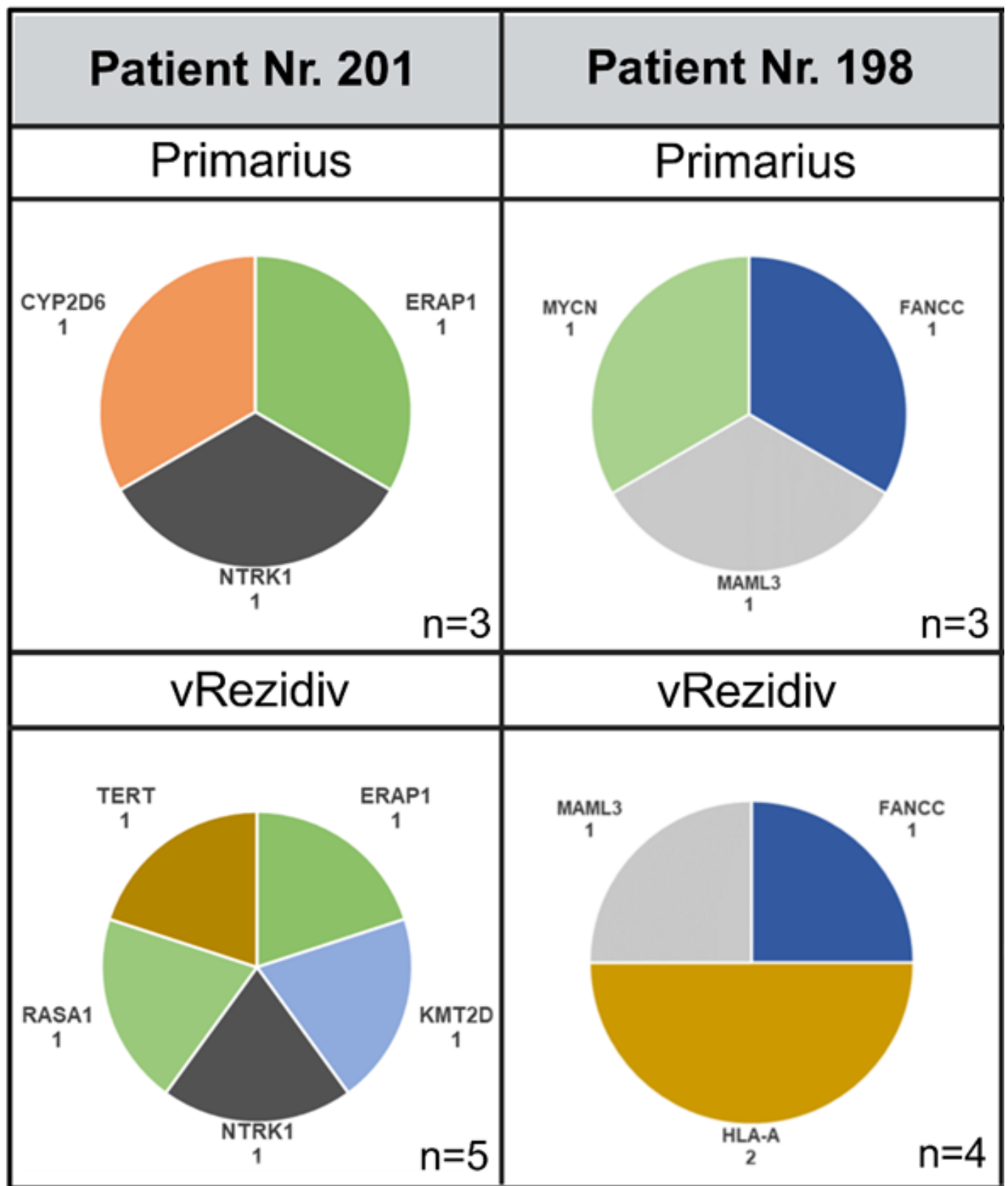


Abbildung 11: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 201 und Patient Nr. 198

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

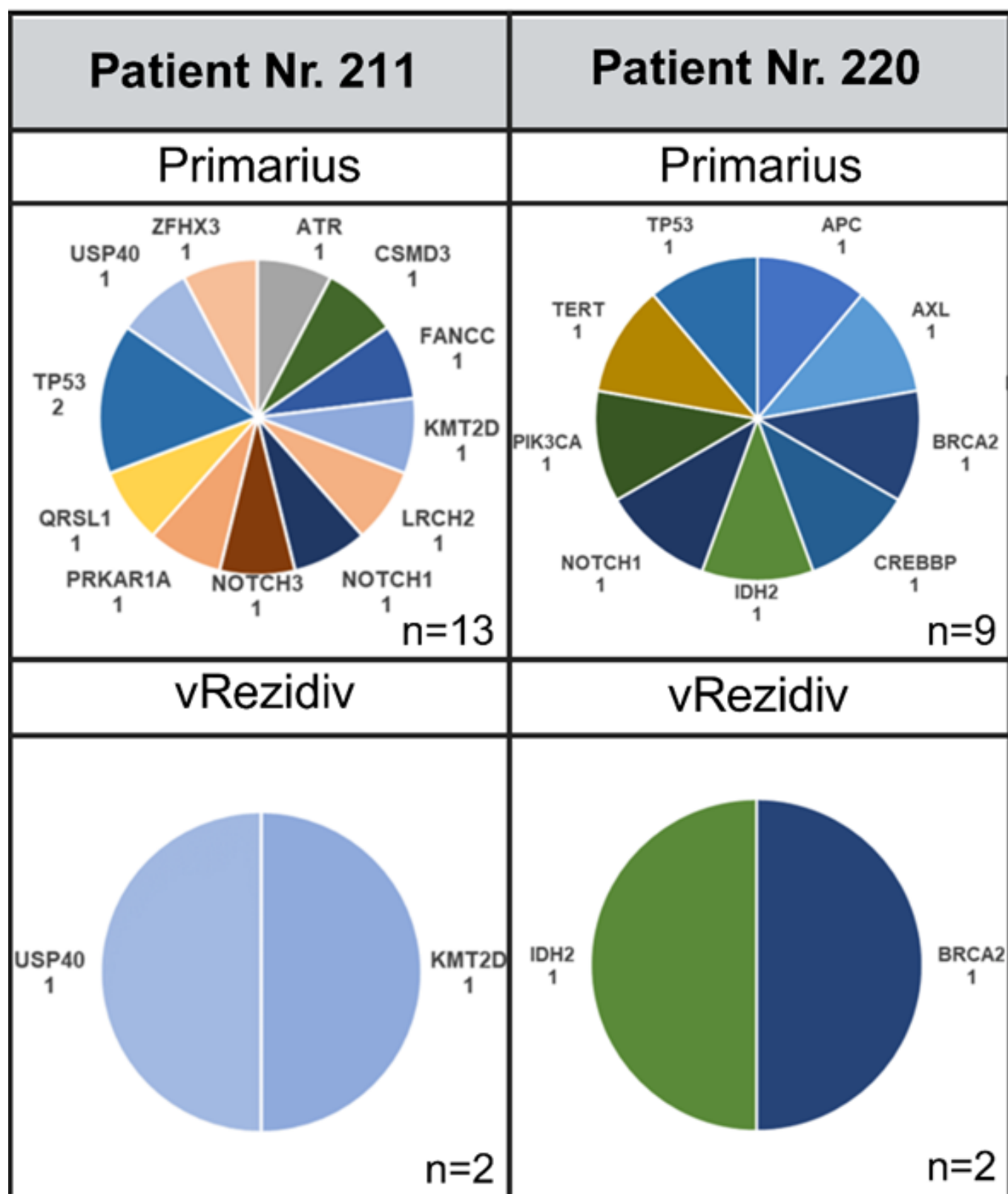


Abbildung 12: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 211 und Patient Nr. 220

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

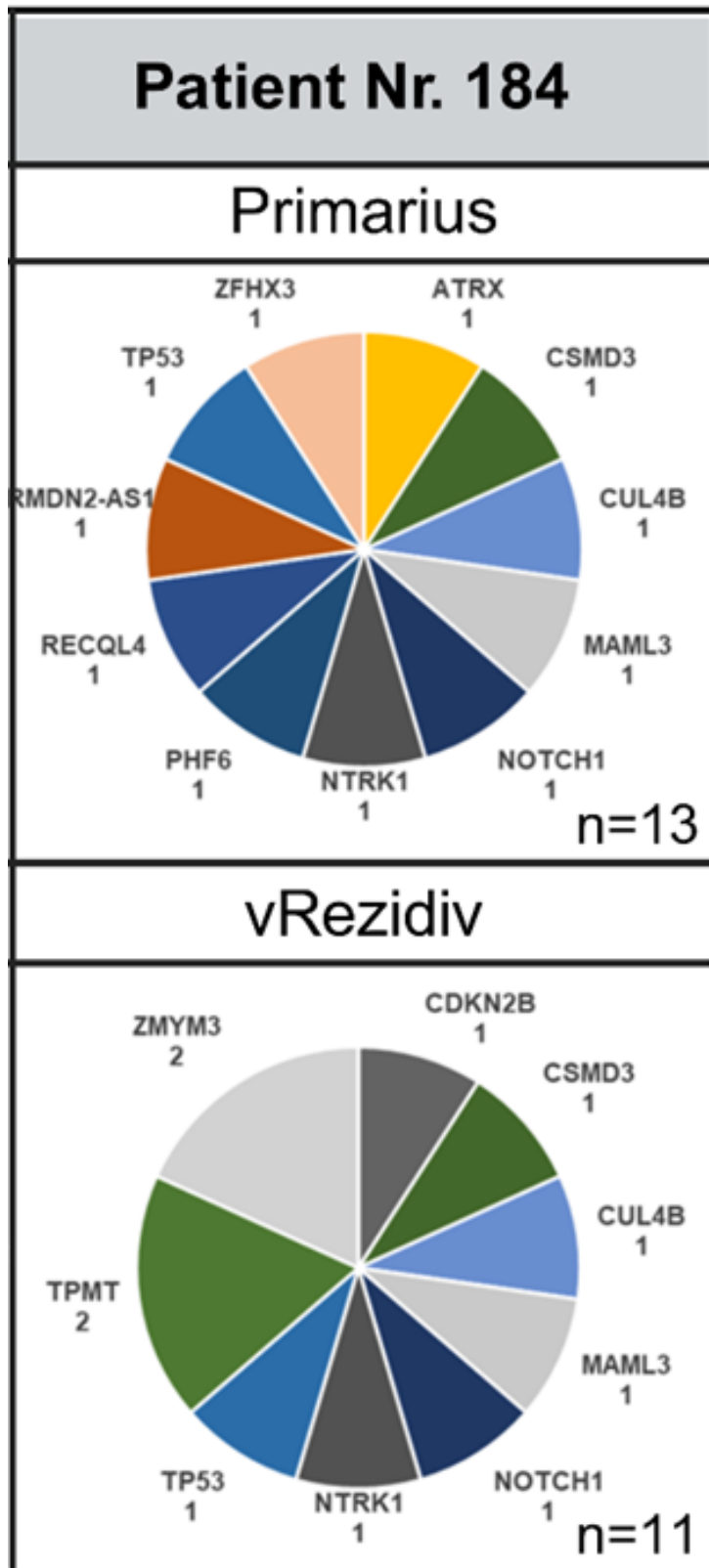


Abbildung 13: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 184
N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

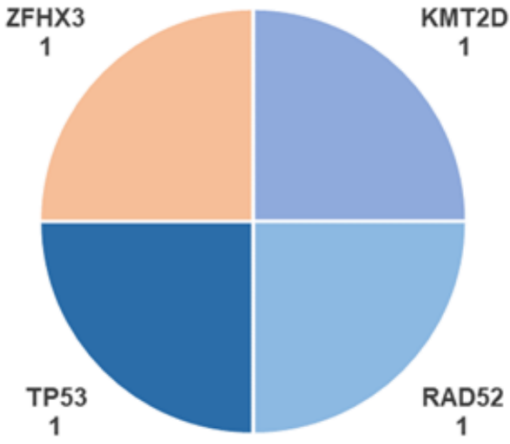
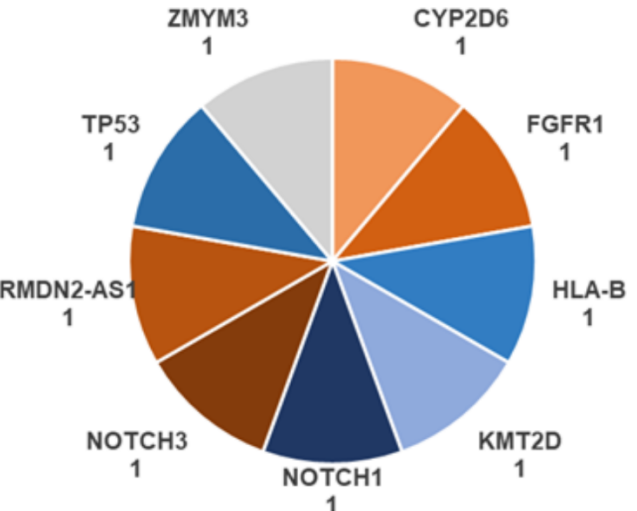
Patient Nr. 182	Patient Nr. 200
Primarius	Primarius
 n=4	 n=9
vRezidiv	vRezidiv
keine auswertbare Probe	keine auswertbare Probe

Abbildung 14: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 182 und Patient Nr.200
N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

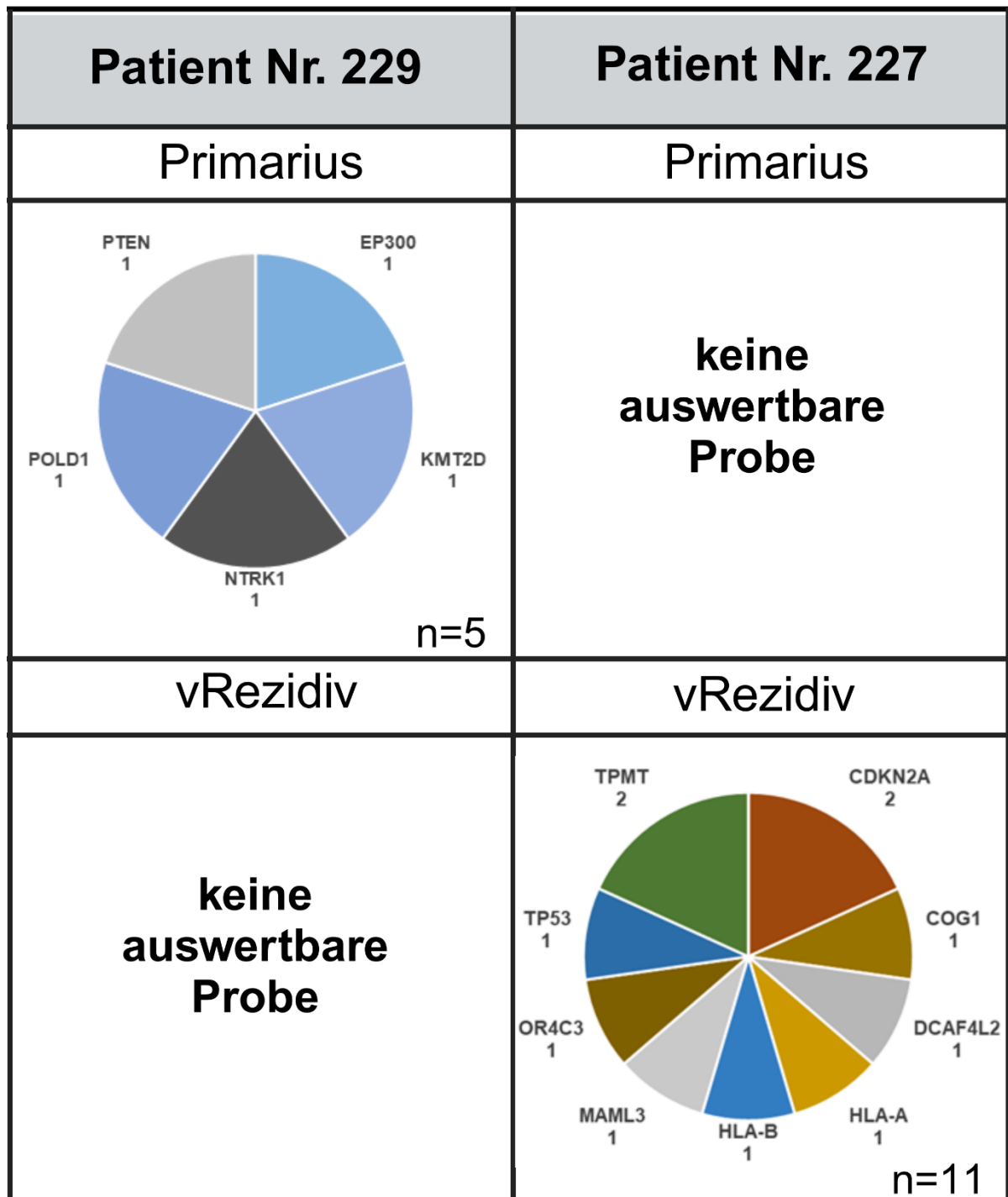


Abbildung 15: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 229 und Patient Nr.227

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

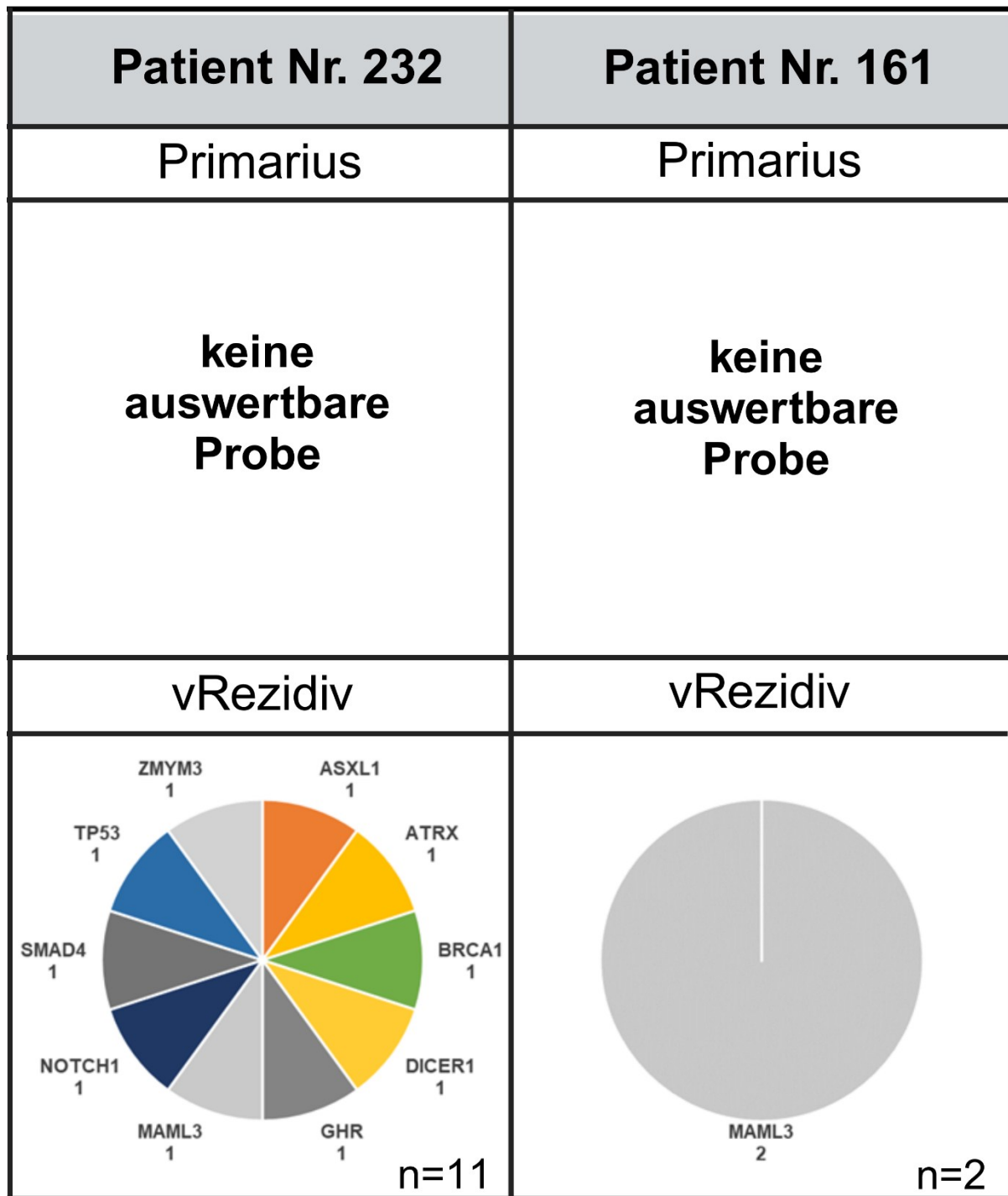


Abbildung 16: Übersicht über die mutierten Gene in Patient Nr. 232 und Patient Nr.161

N=Anzahl der Mutationen pro Probe. Abbildung erstellt mit BioRender.com

X. Lebenslauf

Name: Helge Marius Ningel

Geburtsdatum: 14.11.1998 in Nürtingen, Baden Württemberg

Schule und Studium

2017 - dato	Studium der Humanmedizin Universität Rostock 1. Staatsexamen 08/2019 2. Staatsexamen 10/2023
2017	Allgemeine Hochschulreife Hölderlin Gymnasium Nürtingen

Praktika

Seit 08/2019	Famulaturen 03/2020 Anästhesiologie und Intensivmedizin Medius Klinik Nürtingen 07/2020 Praxis für Innere Medizin Gemeinschaftspraxis Dres. Ningel Nürtingen 08/2021 Herzchirurgie Deutsches Herzzentrum München 02/2022 Hämatologie und Onkologie Hospital Universitario Donostia - Spanien 11/2022 Kardiologie Universitätsklinikum Rostock Praktisches Jahr 11/2023 - 03/2024 Innere Medizin Krankenhaus Barmherzige Brüder München 04/2024 - 06/2024 Anästhesiologie und Intensivmedizin LMU Klinikum München, Campus Großhadern 07/2024 - 10/2024 Chirurgie Stadtpital Triemli Zürich - Schweiz
---------------------	---

XI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich während der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben. Hierbei gilt mein besonderer Dank an Dr. Hugo Murua Escobar, ebenso wie Prof. Christian Junghanß, Dr. Christina Große-Thie und Dr. Claudia Maletzki für die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ein sehr großer Dank gilt auch dem Institut für Pathologie unter der Leitung von Prof. Erbersdobler und dessen Mitarbeitern für die Bereitstellung der DNA-Proben, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich bei Saskia Krohn und Gudrun Knübel bedanken, die mir während der vielen Stunden im Labor stets mit Rat und Tat und nicht zuletzt mit aufmunternden Worten beiseite standen. Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihre stetige Unterstützung und Ermutigung während der Arbeit an dieser Dissertation.

XII. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

20.11.2024

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)