

**Detektion von Mutationen in Angiosarkomen mittels
targetiertem Next Generation Sequencing**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Berger, Johannes

aus Leipzig

Gießen 2018

Aus der Abteilung Molekularpathologie des Instituts für Pathologie, unter der Leitung
von Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner, des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. A. Bräuninger

Gutachter: Prof. Dr. med. L. Fink

Tag der Disputation: 02.07.2019

„Cancer is, in essence, a genetic disease.”

Bert Vogelstein, 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sarkome	1
1.2 Angiosarkome	1
1.2.1 Definition	1
1.2.2 Klassifikation und Ätiologie	2
1.2.3 Histologie	3
1.2.4 Pathogenese	3
1.2.5 Therapie	5
1.3 DNA-Sequenzierung	6
1.3.1 Sequenzierung der zweiten Generation - Next Generation Sequencing	7
1.3.2 Targetiertes Next Generation Sequencing (tNGS)	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit	9
2. Material	10
2.1 Patientenproben	10
2.2 Primer für PCR und Sanger-Sequenzierung	11
2.3 Geräte	11
2.4 Kits	11
2.5 Chemikalien und Reagenzien	12
2.6 Puffer	13
2.7 Gebrauchsmaterialien	13
2.8 Antikörper (Immunhistochemie)	13
3. Methoden	14
3.1 DNA-Isolation	14
3.1.1 Extraktion der DNA	14
3.1.2 Konzentrationsbestimmung der DNA	14
3.2 DNA-Sequenzierung mittels targetiertem Next Generation Sequencing	15
3.2.1 Präparation der DNA-Library	15
3.2.2 Klonale Amplifikation der DNA-Sequenzen	20
3.2.3 Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente	24
3.2.4 Bioinformatische Datenauswertung	26
3.3 Klassische DNA-Sequenzierung	27
3.3.1 Primerdesign	28
3.3.2 Fast-PCR-Reaktion	29
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	29

Inhaltsverzeichnis

3.3.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
3.3.5	Sanger-Sequenzierung.....	30
3.4	Immunhistochemie	32
3.4.1	EphB4-Protein-Expressions – Analyse	34
4.	Ergebnisse.....	35
4.1	Next Generation Sequencing	35
4.1.1	Übersicht über die Librarypräparation.....	35
4.1.2	Übersicht der Sequenzierungsläufe.....	37
4.1.3	Variant Calling mittels VariantCaller.....	37
4.1.4	Eingrenzung der gefunden Varianten	38
4.1.5	Im Sanger-Sequencing verifizierte somatische Mutationen.....	40
4.1.6	Übersicht über die verifizierten somatischen Mutationen	42
4.2	Immunhistochemie mittels EphB4-Antikörpern bei Patientenproben	44
5.	Diskussion.....	46
5.1	Diskussion von Material und Methoden.....	46
5.2	Einordnung der Mutationen	48
5.2.1	Genomische Instabilität durch Gen-Mutationen in TP53	49
5.2.2	Bedeutung somatischer Mutationen in Rezeptor- Tyrosinkinase	51
5.2.3	Veränderungen in Genen der RTK-assoziierten Signaltransduktion	53
5.2.4	Bewertung weiterer verifizierter somatischer Mutationen	54
5.3	Fazit und Perspektiven.....	55
	Zusammenfassung.....	56
	Summary.....	57
	Anhang.....	58
	Abkürzungsverzeichnis	72
	Abbildungsverzeichnis	74
	Tabellenverzeichnis	76
	Literaturverzeichnis	77
	Erklärung zur Dissertation.....	86
	Danksagung.....	87
	Lebenslauf	88
	Publikationen.....	89

1. Einleitung

1.1 Sarkome

Sarkome sind eine heterogene Gruppe seltener maligner Tumore, ausgehend von Geweben mesenchymalen Ursprungs. Etwa 1 % der bösartigen Neoplasien beim Menschen gehören zur Gruppe der Sarkome. Es wird zwischen Tumoren des Weichgewebes und des Knochens unterschieden [1-3]. Tumore des Weichgewebes (soft tissue sarcomas) treten insgesamt häufiger auf als Tumore des Knochens [4]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren; Männer sind häufiger als Frauen betroffen. Die von Zellen des Binde- und Stützgewebes, des Endothels oder der Muskulatur ausgehenden malignen Neoplasien können überall im Körper entstehen [1]. Häufige primäre Tumorlokalisationen sind die Extremitäten, der Rumpf, das Retroperitoneum oder Kopf und Hals [5]. Bisher sind über 50 verschiedene histologische Unterformen der Sarkome bekannt. Dabei gelten als häufige Entitäten u.a. das maligne fibröse Histiozytom (mit 28 % die häufigste Entität unter den Sarkomen), das Liposarkom (15 %) und das Leiomyosarkom (12 %) [1, 5]. Auf genomischer Ebene lassen sich Weichgewebesarkome in 2 Gruppen einteilen. So werden Tumore mit spezifischen genetischen Veränderungen und gewöhnlich einfachen Karyotypen, sowie Tumore mit unspezifischen genetischen Veränderungen und komplexen Karyotypen unterschieden. Etwa $\frac{1}{3}$ der Sarkome zeichnet sich durch rekurrierende chromosomale Translokationen aus; für etwa $\frac{2}{3}$ der Sarkome fehlen rekurrente genetische Signaturen, wobei sie über eine Vielzahl genetischer Abberationen verfügen [6, 7]. Ressing et. al sammelten erstmals spezifische Daten zur Inzidenz von Sarkomen in Deutschland. Für 2012 werden insgesamt 6.430 Neuerkrankungen angegeben, wobei Frauen – im Gegensatz zu Informationen der WHO Klassifikation – häufiger als Männer betroffen waren (♂ : n=3.045, ♀ : n=3.385). Die Gruppe der Weichgewebesarkome repräsentiert mit 4554 Fällen (71 %) die größte Gruppe unter den Sarkomen [8].

1.2 Angiosarkome

1.2.1 Definition

Angiosarkome sind hochmaligne, von den Endothelzellen der Blut- oder Lymphgefäße ausgehende Neoplasien. Sie treten selten auf und machen etwa 2 % aller Weichgewebesarkome aus [9]. Ressing et. al geben für Deutschland die Inzidenz für Angiosarkome mit 6 % unter allen Weichgewebesarkomen an [8].

1.2.2 Klassifikation und Ätiologie

Angiosarkome gehören zur Gruppe der malignen Gefäßtumore. Sie können im Gefäßsystem des gesamten Körpers auftreten und sind häufig im Weichgewebe lokalisiert. Ihre genaue Ätiologie ist nicht bekannt. Bei Angiosarkomen handelt es sich typischerweise um eine Tumorerkrankung des höheren Lebensalters. Der Erkrankungsgipfel liegt durchschnittlich im 7. Lebensjahrzent, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind [10]. Es werden kutane, lymphödem-assoziierte und strahleninduzierte Angiosarkome, sowie Angiosarkome des tieferen Weichgewebes unterschieden [9]. In $\frac{2}{3}$ der Fälle präsentieren sich Angiosarkome als oberflächliche Tumore der Haut – vor allem im Kopf- und Halsbereich; in $\frac{1}{4}$ der Fälle wird der Tumor im tieferen Weichgewebe diagnostiziert [1, 11]. Angiosarkome zeichnen sich häufig durch einen äußerst komplexen Karyotyp aus – unter den Weichgewebesarkomen besitzen sie im Vergleich sogar die höchste Mutationslast [12, 13]. Meist kommt es zum spontanen Auftreten des malignen Tumors. Allerdings ist die Transformation aus primär benignen Neoplasien (u.a. Hämangiomen) möglich [9, 14, 15].

Bestimmte Risikofaktoren für die Entstehung von Angiosarkomen wurden identifiziert. Eine Radiotherapie mit ionisierender Strahlung im Rahmen der Behandlung von soliden Tumoren oder Lymphomen gilt als unabhängiger Risikofaktor [9, 11]. Dieser Zusammenhang konnte beispielsweise für die Therapie des Mammakarzinoms aufgezeigt werden: 5-10 Jahre nach erfolgter adjuvanter Strahlentherapie entwickelten sich gehäuft Angiosarkome in den bestrahlten Körperregionen. Allerdings ist nicht eindeutig geklärt, ob die erhöhte Tumorprävalenz primär auf die eigentliche Bestrahlung oder die nach Mastektomie entstandenen Lymphödeme zurückzuführen sind, da chronische Lymphödeme ebenso zur Entwicklung von Angiosarkomen führen können (Stewart-Treves-Syndrom) [16-18]. In diesem Kontext wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Mutationen der DNA-Reparaturgene *BRCA1* und *BRCA2* und der Genese von Angiosarkomen nach einer Mammakarzinom-Therapie diskutiert [19].

Weitere exogene Faktoren für die Entstehung von Angiosarkomen sind bekannt: Etwa jedes dritte in der Leber lokalisierte Angiosarkom ist auf eine Exposition gegenüber chemischen Noxen wie Vinylchlorid (zur Herstellung von PVC) zurückzuführen [11, 20]. Auch besteht bei Exposition mit den Chemikalien Thoriumdioxid, Arsen und Radium, sowie bei langfristigem Gebrauch anaboler Steroide, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Angiosarkomen [21, 22].

Bei 3 % der Patienten treten Angiosarkome in Verbindung mit einem genetisch veranlagten Syndrom auf [11]. So können u.a. das bilaterale Retinoblastom, die Neurofibromatose Typ I oder Xeroderma pigmentosum mit dem Auftreten bösartiger Gefäß-

tumore assoziiert sein [23-25]. Andere Weichgewebstumore stehen hingegen mit diesen Krankheiten nicht in Verbindung.

1.2.3 Histologie

Die Histologie von Angiosarkomen stellt sich vielfältig dar. Das Spektrum reicht von hoch differenzierten hin zu wenig differenzierten, anaplastischen Neoplasien [26]. Angiosarkome bestehen aus proliferierenden, atypischen Endothelzellen, welche gefäßartige, irregulär sinusoidale und dysfunktionale Netzwerke ausbilden; teilweise sind vollständig undifferenzierte Zellen zu finden [27]. Charakteristisch sind rudimentär ausgebildete vaskuläre Strukturen, die sich im Gegensatz zu normalen Gefäßen durch eine unregelmäßige Form und ein infiltratives Wachstum ins umliegende Gewebe auszeichnen. Ausgeprägte Einblutungen in das Gewebe und nekrotische Areale sind häufig zu finden. Die Zellkerne erscheinen teils rundlich unauffällig, teils spindelförmig. Weiterhin präsentieren sich atypische Zellen mit verstärkter Mitoseaktivität [1, 28-30].

Für eine eindeutige histo- bzw. molekularpathologische Identifizierung des Tumors spielen Methoden der Oberflächencharakterisierung eine wesentliche Rolle. Gewöhnlich von Gefäßzellen exprimierte vaskuläre Antigene sind ebenfalls bei Angiosarkomen vorhanden und können detektiert werden. So sind meist der von-Willebrand-Faktor, das endotheliale Adhäsionsmoleküle CD31 und das Progenitorzell-Antigen CD34 als Oberflächenmarker in Angiosarkomen nachweisbar [1, 31]. In kutan lokalisierten Angiosarkomen können darüber hinaus spezifische lymphatische Endothelmarker genutzt werden. Dazu gehört der Oberflächenrezeptor LYVE-1, der möglicherweise zur Differenzierung zwischen benignen und malignen Gefäßtumoren dienen kann, sowie die Markerproteine PROX1 und Podoplanin [28, 32, 33]. Der Antikörper MIB-1 (ein Ki-67-Antikörper) kann als Marker für die Zellproliferation und so der Einschätzung von Wachstum sowie Differenzierungsgrad des Tumors dienen [34].

1.2.4 Pathogenese

Die Pathogenese des Angiosarkoms ist größtenteils ungeklärt. Umfassende genomische Analysen mit großen Fallzahlen standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch aus. Im Mittelpunkt der Tumorgenese von Angiosarkomen steht ein verändertes Wachstum der Endothelzellen. Über eine Transformation gesunder Endothel- in Tumorzellen kommt es zur Entartung gefäßauskleidender Zellen. Es resultiert eine unkontrollierte Zellproliferation und ein Gefäßtumor manifestiert sich.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Erforschung der Pathogenese von Angiosarkomen lassen sich in 2 Gruppen gliedern. (1) Durch Bestimmung veränderter Expressionsmuster (Expressionsanalyse) einzelner Gene konnten Rückschlüsse auf assoziierte Signalwege und relevante Schlüsselgene vorgenommen werden. (2) Mittels

Mutationsanalysen von Angiosarkomgenomen waren wichtige, vermutlich in die Pathogenese von Angiosarkomen involvierte Gene, identifizierbar.

(1) Veränderte Expressionsmuster: Eine besondere Relevanz besitzt die Gruppe der „vascular endothelial growth factors“ (*VEGF*; z.B. *VEGF-A*; *VEGF-C*) mit den beiden funktionell ähnlichen Tyrosinkinasen VEGF-Rezeptor 1 (*VEGFR-1*; *FMS* related tyrosine kinase 1, *FLT*) und dem VEGF-Rezeptor 2 (*VEGFR-2*; kinase insert domain receptor, *KDR*). So konnte einer veränderten *VEGFR-1* und *VEGFR-2*-Expression eine die Zellproliferation positiv beeinflussende Wirkung in endothelialen Tumorzellen zugeordnet werden [35]. Miettinen et al. wiesen immunhistochemisch in 96 % (n=85/89) ihrer untersuchten Angiosarkome eine starke Anfärbbarkeit für *VEGFR-2* (*KDR*) als Hinweis auf eine starke Genexpression nach [36]. In weiteren Studien konnten verstärkte Expressionen bzw. Akkumulation im Zellkern u.a. von „basic fibroblast growth factor“ (*bFGF*; *FGF2*), welcher mitogene, d.h. zellteilungsanregende, sowie angiogenetische Aktivität besitzt, seines Rezeptors (*bFGF-R*), *Notch1*, *MDM-2* und *TP53* in Angiosarkomen nachgewiesen werden [37-39].

(2) Genomische Veränderungen und Mutationsanalyse: Die bisherigen Studien konzentrieren sich auf Veränderungen in einer kleinen Gruppe häufig in Tumoren mutierter Gene. So konnten Behjati et al. u.a. in 20 % der untersuchten Angiosarkome (3/15) *TP53*-Mutationen feststellen [40]. Italiano et al. kamen hingegen zu der Schlussfolgerung, dass Veränderungen in *TP53*, die zu den häufigsten tumorassoziierten Mutationen überhaupt gehören, in Angiosarkomen nur selten vorkommen [41].

In einer Studie aus dem Jahr 2014 mit 39 Angiosarkomen wurden mittels Sequenzierung des gesamten Genoms (whole genome sequencing) bzw. gezielter Gensequenzierung (targeted sequencing) und anschließender Mutationsanalyse rekurrente *PTPRB*- und *PLCG1*-Mutationen in Angiosarkomen nachgewiesen [40]. *PTPRB* kodiert für eine Endothel-spezifische Angiogenese-inhibierende Tyrosin-Phosphatase; *PLCG1* stellt einen wichtigen Mediator für die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) u.a. in Endothelzellen dar. In 26 % der Proben (10/39) waren Genmutationen in *PTPRB* und in 20 % der Proben (3/15) Mutationen in *PLCG1* nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden von Murali et al. publiziert: Unter 34 sequenzierten Angiosarkomen waren Mutationen in 29 % (10/34) der Fälle bei *PTPRB*, sowie in 14,7 % (5/34) bei *PLCG1* detektierbar [42].

Kunze et al. nutzten für ihre Studie einen targeted Next Generation Sequencing (tNGS)-Ansatz und zeigten bei kardialen Angiosarkomen weitergehend spezifische Mutationen in *KDR* (*VEGFR-2*), *MLL2* und *PLCG1*. In 30 % (3/10) der in die Untersuchung eingeschlossenen kardialen Angiosarkome war mittels gezielter Gensequenzierung eine R707Q-Mutation in der SH2-Domäne von *PLCG1*

nachweisbar, der eine dauerhafte *PLCG1*-Aktivierung zugeschrieben wird. Darüber hinaus konnte die für Angiosarkome übergeordnete Bedeutung von *KDR* bzw. assoziierter Signalwege (*KDR/PLCG1*-Signalweg) dargestellt werden [43].

Als weiterer Hinweis auf die Bedeutung genomischer Veränderungen für die Angiosarkomgenese konnten Allel-Imbalancen bzw. ein loss of heterocycosity (LOH) bei Tumorsuppressorgenen durch Domfeh et al. für verschiedenen Loci aufgezeigt werden (Loci: 11p13, 13q14 und 17p13; für *WT-1*, *RB* und *TP53*) [44].

1.2.5 Therapie

Die Prognose von Angiosarkomen ist noch immer ungünstig. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt zwischen 31 % und 43 % [9, 24, 45]. Seit vielen Jahren hat sich die Gesamtüberlebenszeit für die Patienten – auch unter Therapie – nicht maßgeblich verbessert. Eine vollständige Remission wird in der Regel nicht erreicht. Häufig orientiert sich die Therapie an der Erhaltung eines „stable states“. Der palliativen Therapie kommt frühzeitig eine wesentliche Bedeutung zu. Allgemein richtet sich das therapeutische Vorgehen nach bestehenden Leitlinien der Therapie von Weichgewebesarkomen, wobei bis heute systematische Therapieempfehlungen für die spezifische Behandlung von Angiosarkomen noch ausstehen und eine entitätsspezifische Therapie nur ansatzweise existiert. Die Therapie der Wahl besteht in der wenn möglich vollständigen chirurgischen Tumorresektion in Kombination mit Radio- und Chemotherapie [45, 46]. Entscheidend für die Therapieauswahl ist das Tumorstadium. Handelt es sich um einen lokal begrenzten, nicht metastasierten Tumor, wird eine kurative Therapie forciert. Das bedeutet, der Tumor wird vollständig reseziert. Anschließend erfolgt in der Regel eine Radiotherapie. Liegt bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes, metastasiertes Erkrankungsstadium vor, kommt chemotherapeutischen Behandlungsschritten eine wesentliche Bedeutung zu. Empfehlungen sehen als Erstlinientherapie Anthracycline (Doxorubicin) vor. Durch ihre anti-angiogenetische Wirkung ist eine Kombination mit Taxanen (Paclitaxel, Docetaxel) sowie ggf. Gemcitabin (Off-Label-Use) in der Zweitlinientherapie möglich; ebenso auch der (kombinierte) Einsatz mit dem PDGFR α -Antikörper Olaratumab. Patienten mit bereits erhaltener Chemotherapie können mit Oxazaphosphorinen wie Ifosfamid behandelt werden. Trabectedin (Ecteinascidin 743, ET-743) ist in der Europäischen Union für die Zweitlinientherapie ebenso zugelassen [46, 47].

In neuen Studien wurde der therapeutische Nutzen des Einsatzes anti-angiogenetisch wirksamer Medikamente untersucht. Der VEGFR-Inhibitor Pazopanib ist in der aktuellen DGHO-Leitlinie für die Therapie des Angiosarkoms bereits berücksichtigt. Weitere anti-angiogenetisch wirksame Wirkstoffe sind bis heute weder

in der Monotherapie fortgeschrittener Angiosarkome noch in der Kombinationstherapie mit zytotoxischer Chemotherapie außerhalb klinischer Studien empfohlen. Hemmstoffe im VEGF-Signalweg, die die tumorassoziierte Angiogenese blockieren, sind bereits eine tragende Säule der Therapiegestaltung bei verschiedenen Tumorentitäten und könnten zukünftig auch bei der Therapie von (Angio-)Sarkomen eine größere Bedeutung erhalten. Zwei Wirkstoffe sind an dieser Stelle besonders wichtig: Sorafenib und Bevacizumab. In einigen Phase II Studien wurde eine Therapie mit dem Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib durchgeführt. Sorafenib wirkt u.a. über die Hemmung des VEGF-Signalwegs anti-angiogenetisch [48]. In der größten zur Wirkung bei Sarkomen durchgeführten Studie wurden 122 fortgeschrittene Weichgewebesarkome, darunter 37 Angiosarkome, auf ihr Ansprechverhalten auf Sorafenib untersucht. In 14 % (5/37) konnte eine (partielle) Remission, in 57 % (21/37) ein stabiler Krankheitsverlauf dokumentiert werden [49]. Bevacizumab hingegen wirkt als spezifischer Angiogenesehemmer. Es blockiert als monoklonaler Antikörper selektiv VEGF-A und verhindert dadurch dessen stimulative Wirkung auf die Ausbildung neuer Blutgefäße und wirkt der Tumorproliferation entgegen. Dabei liegt dem Einsatz von Bevacizumab bei Angiosarkomen eine besondere Rationale zugrunde: führt bei anderen soliden Tumoren Bevacizumab durch Hemmung der Angiogenese zu einem „Tumor-Starving“, soll bei Angiosarkomen die Tumorbildung selbst durch Blockade des primären Wachstumsstimulus der Tumorzellen unterbunden werden. Allerdings besteht aufgrund sich widersprechender Studienergebnisse aktuell keine eindeutige Empfehlung zum Einsatz von Bevacizumab bei Angiosarkomen [50-52]. Auch dem Tyrosinkinase-Inhibitor Vandetanib wird durch seine Wirkung über VEGF- und EGF-Rezeptoren eine antiproliferative Wirkung auf Angiosarkomzellen zugeschrieben [53].

1.3 DNA-Sequenzierung

Maligne Erkrankungen resultieren überwiegend als Folge erworbener somatischer Veränderungen im Erbgut [54]. Daher ist eine genauere Kenntnis über die DNA-Sequenz von Tumorzellen für ein besseres Verständnis der Pathogenese von Tumorerkrankungen essentiell. Mittels DNA-Sequenzierung ist dies möglich.

Das 1977 von Frederick Sanger vorgestellte Verfahren zur DNA-Sequenzierung, welches auf der kettenabbrechenden Didesoxymethode (Kettenabbruchmethode) basiert, markierte einen wichtigen Meilenstein in der Geschichte der DNA-Analyse. Waren frühere Versuche einzelne Gene zu sequenzieren in den 1970er und 1980er Jahren noch sehr zeit- und arbeitsaufwendig, wurde mit der Durchführung des *Human Genome Projects* und dessen erfolgreicher Beendigung nach über 12 jähriger Arbeit 2003 eine neue Ära genetischer Analysen

des menschlichen Erbguts eingeläutet [55-58]. Erstmals konnten die über 3 Milliarden Basenpaare, die für die ca. 20 000 Gene des Menschen kodieren, umfassend beschrieben werden. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurde die Grundlage für die umfangreiche Untersuchung auf Veränderungen im Erbgut geschaffen und dadurch die systematische Suche nach Ursachen für die Entstehung verschiedener Erkrankungen möglich. Seither haben sich die Möglichkeiten der DNA-Sequenzierung massiv erweitert. Mit Einführung schnellerer und kostengünstigerer Verfahren des NGS in den 2000er Jahren wurde die DNA-Sequenzierung revolutioniert.

1.3.1 Sequenzierung der zweiten Generation - Next Generation Sequencing

Mit Hilfe von NGS ist es möglich, umfangreiche genomische Informationen über einen Tumor zu gewinnen. Innerhalb eines Sequenzierungslaufs können parallel im Hochdurchsatzverfahren millionenfach kurze DNA-Amplifikate schnell, akkurat und kostengünstig sequenziert und so die Basenabfolge des Erbguts ermittelt werden, wobei unterschiedliche Methoden entwickelt und weiter angepasst werden [59, 60]. Es kann zwischen verschiedenen Sequenzierungsstrategien unterschieden werden, welche sich im Umfang der Sequenzierung der zu untersuchenden Gen- bzw. DNA-Bereiche, der Komplexität der erhaltenen Datensätze, dem mit der anschließenden Datenauswertung assoziierten Aufwand, der praktisch-technischen Handhabung und den verbundenen Kosten unterscheiden. Auch das Ausgangsmaterial spielt für die Auswahl der Sequenzierungsmethode eine Rolle. Grundsätzlich kann daher die vollständige DNA (whole genome sequencing), das gesamte Exom (whole exome sequencing, WES) oder gezielt eine Auswahl an Genen oder Mutations-Hotspots (targeted next generation sequencing, tNGS) auf molekulargenetischer Ebene analysiert und die exakte Abfolge der einzelnen Nukleotide bestimmt werden.

Whole genome sequencing umfasst die Sequenzierung der gesamten DNA. Es besitzt einige signifikante Vorteile gegenüber allen anderen Sequenzierungsstrategien: so können Mutationen auf nicht proteinkodierenden DNA-Abschnitten (Introns) sowie alle strukturellen DNA-Veränderungen (bspw. solitäre Exon-Deletionen) nachgewiesen werden [61, 62]. Dies ist wichtig, ist die Bedeutung von Genveränderung in den nicht kodierenden Genabschnitten (Introns) für die Tumorentstehung und Tumorprogression doch größtenteils noch ungeklärt [63]. Bezüglich einer möglichen genaueren Aussagekraft bzgl. detektierbarer Varianten im Exom gibt es allerdings divergierende Forschungsergebnisse: Belkadi et al. wiesen WGS gegenüber WES eine zuverlässigere Detektion von Varianten im Exon zu, wohingegen Lam et al. eine umgekehrte Schlussfolgerung zogen [64, 65]. Doch scheint WGS insgesamt eine gleichmäßigere Coverage als WES

zu erreichen [66]. Allerdings ist häufig WGS weder möglich noch notwendig.

Whole exome sequencing ermöglicht die Sequenzierung der Gesamtheit aller proteinkodierenden DNA-Abschnitte. Da das Exom nur etwa 2 % der DNA umfasst, aber etwa 85 % der krankheitsverursachenden Mutationen enthält, ist WES vor allem für viele klinische Fragestellungen die Methode der Wahl [67-69]. Dies macht WES zu einer kostengünstigen und einer deutlich weniger umfangreiche Datenauswertung erfordernden Alternative zur Sequenzierung des gesamten Genoms. Gleichzeitig ermöglicht es ein wesentlich größeres Ergebnisspektrum als die Sequenzierung lediglich einer Auswahl von Genen (tNGS).

Wichtige aktuelle Projekte umfassender Genomsequenzierung sind u.a. der The Cancer Genome Atlas (TCGA), bei dem eine Vielzahl wichtiger Tumorentitäten systematisch mittels Sequenzierung erforscht wird oder das 100.000 Genoms Project in England, einem der weltweit größten Sequenzierungsprojekte.

1.3.2 Targetiertes Next Generation Sequencing (tNGS)

Das tNGS dient der gezielten Sequenzierung einer Auswahl von Genen. Durch die Fokussierung des Interesses auf bereits als häufig-verändert bekannte, Onko- und Tumorsuppressorgene, kann die Suche nach relevanten genetischen Aberrationen sehr zielgerichtet verlaufen [70, 71]. Die Auswahl der als bislang für die Tumorgenese relevant bekannten Gene führt – im Verhältnis zu WES bzw. WGS – zu einem deutlich reduzierten Datensatz und umfangreiche bioinformatische Auswertungsprozesse können vermieden werden.

Von besonderem Interesse für das bessere Verständnis der Pathogenese onkologischer Erkrankungen ist die Detektion von Treibermutationen. Diese befinden sich meist im Bereich bekannter *cancer genes*, d.h. Mutation tragenden Genen, für die ein kausaler Zusammenhang mit der Onkogenese nachgewiesen werden konnte. Mittels tNGS ist es möglich diese 200-350 häufig in Tumoren mutierten Gene zu sequenzieren und deren Basensequenz zu analysieren [54, 72]. Die Vorauswahl der zu untersuchenden Gene ermöglicht eine höhere Coverage bei gleichzeitig niedrigerem finanziellen Aufwand im Vergleich zu Sequenzierungsansätzen, welche das gesamte Genom abdecken [73]. Nur eine ausgewählte Gruppe von Genen auf Veränderungen zu untersuchen, führt somit zu einer gesteigerten Kosteneffizienz.

Bei der Auswahl der Sequenzierungsstrategie muss das vorliegende Ausgangsmaterial beachtet werden: zwar ist für eine möglichst umfangreiche und vollständige Sequenzierung von Tumorgenomen eine Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) bzw. des gesamten Exoms (WES) das Mittel der Wahl, doch können – wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt – Formalin-fixierte und in Paraffin

eingebettete Gewebeproben (formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE) dafür nur bedingt verwendet werden. Ensel et al. konnten im direkten Vergleich von FFPE- und von frisch eingefrorenen Gewebeproben (fresh frozen tissue samples, FFTS) eine Überlegenheit von FFTS-Proben für das WES eindeutig nachweisen [74]. Weiterhin konnten sie die für den Einsatz von DNA aus FFPE-Proben bekannten Schwierigkeiten bestätigen: häufig liegt eine niedrigere Qualität der DNA vor; außerdem bestehen zusätzlich artifiziell bedingte Sequenzveränderungen. Allerdings zeigten Spencer et al., dass für tNGS – im Vergleich zu WES und WGS – die Validität der Sequenzierungsdaten aus FFPE-Proben denen aus FFTS-Proben qualitativ gleichwertig ist. Zwar waren Unterschiede zu Gunsten der FFTS-Proben festgestellt worden, doch wurden diese abschließend von den Autoren als vernachlässigbar eingeschätzt, was tNGS auch für den Einsatz in der hier vorliegenden Untersuchung qualifizierte [75].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Pathogenese von Angiosarkomen ist noch weitgehend unverstanden. Umfangreiche Studien zu genetischen Aberrationen standen zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit noch aus. Um ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser seltenen Tumorentität zu erhalten, sollte in einem explorativen Ansatz mittels tNGS das genomische Tumorprofil untersucht und Aberrationen identifiziert werden. 10 als FFPE-Proben vorliegende Angiosarkome sollten dazu systematisch auf Mutationen innerhalb relevanter Tumorsuppressor- und Onkogene untersucht und zum Ausschluss von Genpolymorphismen mit ebenfalls vorliegender Keimbahn-DNA (Referenzgewebe) verglichen werden. Dazu wurde die Ion Torrent Sequenzierungstechnologie zur gezielten Analyse einer umfassenden Auswahl an „cancer genes“ verwendet. Mittels des eingesetzten Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panels, einem umfangreichen Primerpool bestehend aus über 16.000 Primerpaaren in mehreren Multiplex-PCR-Ansätzen, sollten Genveränderungen für 409 der nach gegenwärtigem Forschungsstand in die Tumorentstehung involvierter Schlüsselgene bzw. häufig beschriebene Mutationen in Exonen von Tumorsuppressor- und Onkogenen identifiziert werden (Übersicht siehe Abb. 51, im Anhang). Eine bestumfassende Mutationsdetektion in einem whole-exome-sequencing-Ansatz war aufgrund des Vorliegens der Biopsien als FFPE-Proben nicht durchführbar. Die im tNGS gefundenen Mutationen sollten anschließend mittels PCR und spezifischer Primer sowie nachfolgend durch das Sanger-Sequenzierungsverfahren verifiziert werden. In einem späteren Schritt sollten zusätzlich weiterführende Untersuchungen bezüglich einer möglichen veränderten Funktionalität betroffener Gene eingesetzt werden.

2. Material

2.1 Patientenproben

Bei den untersuchten Angiosarkomen handelte es sich um 10 FFPE-Gewebeproben. Für die Untersuchung wurde das Tumorgewebe mittels Makrodissektion aus den Präparaten isoliert. Zu jedem Tumorblock lag gleichzeitig ein Referenzblock mit tumorfreiem Gewebe desselben Patienten für die Genomanalyse vor. Das Genom der Referenzgewebe diente der Unterscheidung zwischen tumorspezifischen somatischen Mutationen und auch im Referenzgenom vorhandenen Keimbahnvarianten. Alle histologischen Präparate wurden vom pathologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie durch die Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster bereitgestellt. Die Tumor- und Referenzbiopsien wurden im Zeitraum zwischen 2005 und 2012 gesammelt. Ein positives Ethikvotum vom 10.04.2014 liegt vor. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der Patientenproben:

Tabelle 1: Übersicht der 10 Angiosarkome unter Angabe der primären Tumorlokalisation

Nr.	Lokalisation
1	Leber
2	Leber
3	Lunge
4	Leber
5	Zwerchfell
6	Leber
7	Unbekannt
8	Schleimhaut
9	Knochen
10	Haut

2.2 Primer für PCR und Sanger-Sequenzierung

In Tabelle 8 (siehe Anhang) sind die Sequenzen aller verwendeten Primer zur Verifikation von Mutationen aufgelistet. Alle Primer wurden von Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (D) bezogen.

2.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
ABI Genetic Analyzer	3730xl	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Autoklav	2540 el	Tuttnauer, Breda (NL)
Bioanalyzer	2100	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
Fluorometer	Qubit Qubit 2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Gelkammer	Xcell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific
Ion Torrent System	Ion OneTouch Ion OneTouch ES Ion PGM	Life Technologies Life Technologies Life Technologies
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica, Wetzlar (D)
Magnetbank	Invitrogen DynaMag-2	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührstab	IKA RCT	IKA, Stauffen i. Br. (D)
Maxwell System	Maxwell 16	Promega, Madison (WI)
Mikrotom	SM2000R	Leica
Pipetten	0,5-10/10-100/100- 1000 µl	Biohit, Helsinki (FIN)
Präzisionswaage	PM480 Delta Range	Mettler-Toledo, Columbus (OH)
Thermoblock	Thermomixer comfort Hybex MS Incubator	Eppendorf, Hamburg (D) SciGene, Sunnyvale (CA)
Thermozykler	Veriti 96-Well Fast Thermal Cyclers	Life Technologies
Vortexer	VF2	IKA
Zentrifugen	5417R 5415R Rotanta/ TRC Heraeus Biofuge 15R Heraeus Biofuge pico	Eppendorf Eppendorf Hettich, Tuttlingen (D) Thermo Scientific Thermo Scientific

2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BigDye Terminator v3.1 Cycle Seq. Kit	Life Technologies
Dako REAL D. S.AP/RED Rabbit/Mouse	Dako, Glostrup (DK)
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Venlo (NL)

Material

Bezeichnung	Hersteller
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	Life Technologies
High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent Technologies
Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel	Life Technologies
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0	Life Technologies
Ion OneTouch 200 Template Kit v2	Life Technologies
Ion PGM 200 Sequencing Kit	Life Technologies
Ion Sphere Quality Control Kit	Life Technologies
Maxwell 16 FFPE Ti LEV DNA Purification Kit	Promega
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Agarose (1-2 % w/v)	Lonza, Basel (CH)
Agencourt AMPure XP Reagent	Beckman Coulter, Brea (CA, USA)
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen (D)
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO, USA)
Dako Antibody Dilute	Dako
DynaBeads MyOne Streptavidin C1	Life Technologies
EDTA	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe (D)
ExoSAP-IT	Affymetrix
Formamid	Sigma-Aldrich, St. Louis
GeneRuler Low Range DNA Marker	Thermo Fisher Scientific
Hämatoxylin	Dako
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Nitriumcitrat (Trinatriumcitrat-Dihydrat)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nuklease-freies Wasser	Life Technologies
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Sigma-Aldrich
Tween 20	Carl Roth
Xylol	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Merck

Wann immer verfügbar, entsprach die Qualität der eingesetzten Chemikalien dem molecular biology grade.

2.6 Puffer

Citratpuffer	<p><i>Stammlösung A (SL A):</i> 0,1 M Zitronensäure (1,05 g) Aqua destillata (50 ml)</p> <p><i>Stammlösung B (SL B):</i> 0,1 M Natriumcitrat (1,47 g) Aqua destillata (50 ml)</p> <p><i>Citratpuffer:</i> 1,8 ml SL A + 8,2 ml SL B ad 100 ml Aqua destillata</p>
TBE (5x)	<p>54,5 g Tris Base 27,8 g Borsäure 2,9 g EDTA ad 1000 ml Aqua destillata</p>
TBS (20x)	<p>18 g Tris Base 137 g HCl 175,6 g NaCl ad 1000 ml Aqua destillata</p>

2.7 Gebrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläschen (24 x 26 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen (D)
DNA LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg (D)
MicroAmp PRC-Tubes (0,1 ml, 0,2 ml)	Life Technologies
Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck
Qubit Assay Tubes	Life Technologies
Rainin SR-L10F pipette tips	Mettler-Toledo, Columbus (OH, USA)
Rainin SR-L200F pipette tips	Mettler-Toledo
SafeSeal Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf (D)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One
Wägeschalen	Carl Roth

2.8 Antikörper (Immunhistochemie)

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Referenz	Hersteller
EphB4 (U-200)	Kaninchen, pAK	1:50-1:500	sc-130753	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (CA)
EphB4 (H-200)	Kaninchen, pAK	1:50-1:500	sc-5536	Santa Cruz Biotechnology

3. Methoden

3.1 DNA-Isolation

3.1.1 Extraktion der DNA

Die für die Untersuchung verwendeten Biopsien lagen als FFPE-Gewebeproben vor. Über ein Standard-Dünnschnittverfahren wurden mittels Schlittenmikrotom 2 – 5 µm dicke Gewebeschichten für die Isolation der DNA hergestellt. Abhängig von der Größe der einzelnen Tumorbiopsien wurden je 4 bis 10 Schnitte für den Isolationsprozess verwendet. Durch eine histologische Voruntersuchung der Biopsien konnten relevante Gewebeareale auf jeweils angefertigten HE-Schnitten eingezeichnet und so gezielt Tumor- bzw. Normalbereiche mittels Mikrodissektion zur DNA-Extraktion isoliert werden. Für die DNA-Extraktion wurde das Maxwell 16 FFPE LEV (Low-Elution Volume) DNA Purification Kit verwendet. Dazu wurden als erstes je 180 µl Incubation Buffer in die vorbereiteten 1,5 ml Reaktionsgefäße (Tubes) gegeben. Anschließend wurden die Gewebeausschnitte in die Reaktionsgefäße überführt und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Die Tubes wurden mittels Vortexgerät gemischt und kurz abzentrifugiert, sodass die Dissektate vollständig von Flüssigkeit bedeckt waren. Im nächsten Schritt wurden die Reaktionsgefäße über Nacht (für mind. 8 Stunden) in einem Thermoschüttler bei 70°C inkubiert, um das Paraffin aufzulösen und eine Zelllyse zu erreichen. Am nächsten Arbeitstag wurden 400 µl Lysis Buffer hinzugegeben, die Reaktionsgefäße erneut gemischt und anschließend die Probenansätze in die erste Kammer der vom Hersteller gelieferten Extraktionskartusche überführt. Folgend wurden 50 µl Elution Buffer in das Elutions-Tube gefüllt und die Extraktionskartuschen in das Maxwell 16 MDx Research Instrument gestellt. Das automatische DNA-Aufreinigungsprogramm wurde gestartet. Dabei basiert die Technik dieses Systems zur Aufreinigung auf dem Einsatz paramagnetischer Siliciumdioxid-beschichteter Eisenkügelchen, welche an die DNA binden und während der einzelnen Aufreinigungsschritte als Transporter dienen [76]. Nach dem abgelaufenen Programm wurde die DNA in neue Reaktionsgefäße überführt.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Für diese Messung wurde das Qubit Fluorometer genutzt. Technisch basiert die Konzentrationsbestimmung auf dem Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die DNA-Doppelstränge interkaliert. Durch die Interkalierung kommt es zu einer verstärkten Fluoreszenz des Farbstoffs, welche anschließend quantitativ ermittelt und mit Messwerten zweier vorverdünnter DNA-Standards verglichen wird und somit die DNA-Konzentration bestimmt werden kann. Für die Durchführung wurden das Qubit

dsDNA HS Assay Kit für DNA-Konzentrationen zwischen 10 pg/µl – 100 ng/µl und das Qubit dsDNA BR Assay Kit für DNA-Konzentrationen zwischen 100 pg/µl – 1 µg/µl verwendet. Eine Qubit working solution (1:200) wurde aus 1 µl DNA und 199 µl Qubit dsDNA HS/BR Buffer, sowie den zwei Messstandards Standard 1 und Standard 2 als Referenzen hergestellt. Die Proben und die Messstandards wurden für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann nach vom Hersteller vorgegebenen Arbeitsschritten mit dem Qubit Fluorometer gemessen.

3.2 DNA-Sequenzierung mittels targetiertem Next Generation Sequencing

Zur molekulargenetischen Untersuchung der Tumorproben wurde in der vorliegenden Arbeit ein tNGS durchgeführt. Als Plattform diente dazu die Ion Torrent – Personal Genome Machine (PGM). Die Abfolge der Sequenzierung lässt sich dabei in 4 aufeinanderfolgende Schritte aufteilen: 1) Herstellung einer DNA-Library, 2) klonale Amplifikation, 3) Sequenzierungsreaktion und 4) Bioinformatische Auswertung (siehe Abbildung 1).

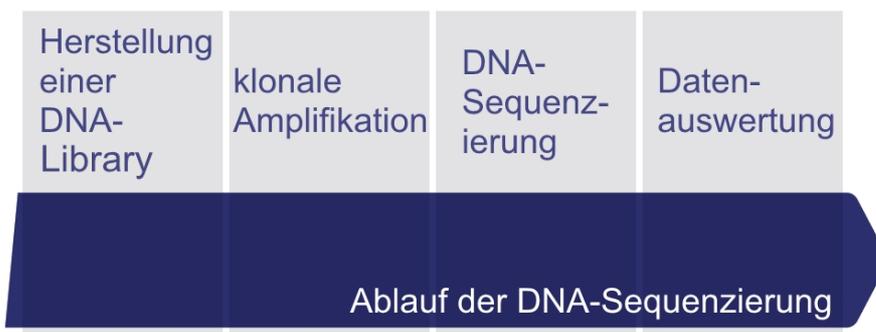


Abbildung 1: Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der DNA-Sequenzierung (eigene Darstellung modifiziert nach Product Bulletin Proton™ exome sequencing, Life Technologies Corporation, 2012)

3.2.1 Präparation der DNA-Library

Für die Sequenzierung musste eine DNA-Library mittels Multiplex-PCR (16.000 Primerpaare in 4 einzelnen Ansätzen) erstellt werden, in der sich die zu untersuchende DNA millionenfach vervielfältigt in kurzen DNA-Fragmenten befand. An den 5' und 3'-Enden wurden Sequenzierungs-Adapter gebunden. Diese Adapter waren für die nächsten Arbeitsschritte – die klonale Amplifikation und die Sequenzierungsreaktion – notwendig (siehe Kapitel 3.2.3). Um während der Sequenzierung eine automatische Zuordnung der mit Referenz- oder Tumor-DNA-tragenden Amplifikaten angereicherten ISPs zu ermöglichen bzw. um während eines Sequenzierungslaufs mehrere Proben einsetzen zu können, wurden die erstellten DNA-Fragmente bereits während der Librarypräparation mit IonExpress Library-Barcodes markiert. Abbildung 2 stellt die zusammengesetzten DNA-Fragment-Strukturen dar.

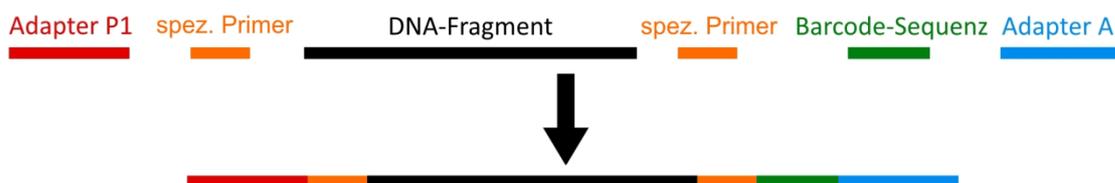


Abbildung 2: Darstellung eines Amplifikats und seiner Adapter. Zusammensetzung eines Amplifikats mit den gebundenen Adaptern, die als Bindestellen für die Primer der klonalen Amplifikation fungieren.

Synthese der DNA-Amplifikate

An die DNA-Isolation von Tumor- und Referenzproben aus den FFPE-Biopsien anschließend, wurde die DNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Für die folgende Synthese der DNA-Amplifikate wurde das AmpliSeq Library Kit 2.0 und der Comprehensive Cancer Panel (CCP)-Primerpool eingesetzt. Für die Amplifikation wurde dabei das folgende Ansatzschema verwendet:

5x Ion AmpliSeq HiFi MasterMix	4 µl
2x Ion AmpliSeq Primerpool 1-4 (des CCP)	10 µl
10 ng genomische DNA	1 µl
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl Gesamtvolumen

Die folgende Amplifikations-PCR im Thermocycler lief im Multiplexansatz nach folgendem Programm ab:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
1. Enzymaktivierung	99°C	2 Min.	-
2. Denaturierung	99°C	15 Sek.	} 15x
Primer Annealing/Elongation	60°C	8 Min.	
3. Abkühlung	10°C	∞	-

An diesem Punkt war eine Lagerung über Nacht bei 10°C bzw. für einen längeren Zeitraum bei -20°C möglich.

Partieller Verdau der Primer-Sequenzen

Um eine anschließende Bindung der Adapter an die Amplifikate zu ermöglichen, mussten die Primer-Sequenzen mittels partiellem Verdau teilweise entfernt werden. Dies wurde durch die Zugabe von 2 µl FuPa-Reagenz (einem Enzymmix) in den PCR-Ansatz gewährleistet. Der genaue Ablauf dieser Reaktion bleibt Wissen des Herstellers. Mittels Pipettierung erfolgte die Durchmischung des Ansatzes und folgendes Inkubationsschema wurde angewendet:

Methoden

50°C	10 Min.
55°C	10 Min.
65°C	20 Min.
10°C	bis max. 60 Min.

Bindung der Adapter an die DNA-Fragmente (Adapter-Ligation)

Nach der teilweisen Entfernung der Primer-Sequenzen war die Bindung von 2 Adapter-Molekülen (P1 und A) jeweils an das 3' bzw. 5'-Ende der DNA-Fragmente möglich. Diese Adapter stellen die Voraussetzung für die spätere Bindung an die Ion Sphere Particles (ISPs; über P1) für die klonale Amplifikation bzw. die Sequenzierungsreaktion dar und dienen durch den Einbau von Barcode-Adaptoren (Ion Xpress Barcode X) als Markierung der individuellen Patientenprobe. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

Probe	22 µl
Switch Solution	4 µl
Ion AmpliSeq Adapters	2 µl
DNA Ligase	2 µl

Mittels Pipettierung erfolgte die Durchmischung des Ansatzes und folgendes Inkubationsschema wurde angewendet:

22°C	30 Min.
72°C	10 Min.
10°C	Hold

Nach diesem Arbeitsschritt war eine Lagerung der Proben bei -20°C möglich.

Aufreinigung der Library

Im Rahmen der Aufreinigung des Library-Ansatzes wurden überschüssige Primer, Adapter, ungebundene dNTPs und Salze unter Einsatz von magnetischen Kügelchen (Beads) entfernt (Agencourt AMPure XP Reagent). Die Methode basiert auf der SPIR-Technologie (solid-phase reversible immobilization), bei der die Beads als Selektoren für DNA-Fragmente mit einer Länge größer 100 bp (laut Hersteller) eingesetzt werden. Dabei sind die Beads paramagnetisch, verhalten sich also nur innerhalb eines externen Magnetfelds magnetisch. Daher sammeln sie sich an der der Magnetbank zugewandten Gefäßwand. Die Hülle der Beads ist mit Carboxylgruppen beschichtet. So können die negativ geladenen DNA-Fragmente bei gleichzeitiger Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) und Natriumchlorid (NaCl) reversibel an die Carboxylgruppen

auf der Beadoberfläche binden. Die Größe der Bead-gebundenen DNA-Fragmente ist dabei von der eingesetzten PEG-Konzentration bzw. dem DNA/Bead-Verhältnis abhängig. Ursächlich dafür sind u.a. die höhere Gesamtladungskapazität und die damit verbundene stärkere elektrostatische Interaktion größerer und kleinerer DNA-Moleküle. Nach der Bindung der DNA werden im anschließenden Waschvorgang überschüssige Substanzen weggespült, wobei die Amplifikate an den Beads verbleiben [77, 78].

Zur Aufreinigung der Library wurde die Probe je Primer-Pool in ein 1,5 ml Reagenzgefäß (Eppendorf DNA-LoBind-Tube) überführt. Hinzu wurden 45 µl Agencourt AMPure XP Reagent gegeben und die Suspension durch Pipettieren gemischt. Bei Raumtemperatur folgte für 5 Minuten eine Inkubation. Im nächsten Schritt wurde das einzelne Tube in eine Magnetbank eingesetzt und für weitere 3 Minuten inkubiert, bis sich die Suspension aufklärte. Der Überstand wurde verworfen ohne dabei das Beads-Pellet an der Gefäßwand zu beschädigen. Im folgenden Waschschrift wurden 150 µl 70-prozentiges Ethanol der Probe beigefügt, für 30 Sekunden inkubiert und anschließend das Tube 2x in seiner Halterung in der Magnetbank gedreht. Das Ethanol wurde entfernt und der Waschschrift ein zweites Mal durchgeführt. Abschließend wurde das Beads-Pellet bei offenem Kappenverschluss für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Eluierung und Amplifikation der DNA-Fragmente

Nach dem vorangegangenen Aufreinigungsprozess waren die DNA-Fragmente noch immer an die Beads gebunden. Im nun folgenden Schritt wurden diese wieder abgelöst und der Ansatz für eine weitere Amplifikation der DNA-Fragmente vorbereitet. Dazu wurde das jeweilige 1,5 ml Tube aus der Magnetbank herausgenommen. Anschließend wurden 50 µl Platinum PCR SuperMix High Fidelity sowie 2 µl Library Amplification Primer Mix hinzugegeben. Die Suspension wurde durch auf- und abpipettieren gemischt und für 2 Minuten in die Magnetbank gestellt, um die eluierten Beads an der Gefäßwand zu sammeln. Als nächstes wurde der Überstand (~ 50 µl) in ein Fast-reaction-Tube für die PCR übertragen. Die Amplifikation im Thermocycler lief dann nach folgendem Programm ab:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
1. Enzymaktivierung	98°C	2 Min.	-
2. Denaturierung	98°C	15 Sek.	} 5x
Primer Annealing/Elongation	60°C	1 Min.	
3. Abkühlung	10°C	∞	-

An dieser Stelle war eine Lagerung bei -20°C möglich.

Aufreinigung der vollständigen amplifizierten Library

Der nächste Arbeitsschritt gliederte sich in eine 2-malige Aufreinigung der amplifizierten Library. Im ersten Durchlauf wurde die eingesetzte genomische DNA (Input-DNA) an die Beads gebunden, während die Amplifikate (für die Sequenzierung) und Primer in der Lösung verblieben. Dazu wurde das PCR-Produkt des vorangegangenen Arbeitsschritts aus dem Fast-reaction-Tube in ein 1,5 ml DNA-LoBind-Tube überführt und 25 µl Agencourt AMPure XP Reagent-Beads (0,5x Volumen des Probenvolumens) hinzugegeben. Die Suspension wurde gemischt, für 5 Minuten inkubiert und anschließend für weitere 5 Minuten in der Magnetbank zwischengelagert. Der Überstand wurde für den zweiten Durchlauf in ein neues 1,5 ml DNA-LoBind-Tube übertragen, die Beads mit der Input-DNA verworfen.

Im zweiten Durchlauf banden die Amplifikate an die neu hinzugegebenen Beads, wodurch lediglich die Sequenz in der Lösung verblieben. Hierfür war die Zugabe von 60 µl Agencourt AMPure XP Reagent (1,2x Volumen des Probenvolumens) notwendig. Die Suspension wurde gemischt, für 5 Minuten inkubiert und für 3 Minuten auf die Magnetbank gesetzt, bis eine vollständige Aufklärung eingetreten war. An die Beads waren nun die Amplifikate gebunden; der Überstand wurde verworfen. Als nächstes wurden unter Zugabe von 150 µl 70-prozentigem Ethanol, mit welchem die Probe für 30 Sekunden inkubiert wurde, die Beads samt Amplifikaten gewaschen. Der Überstand wurde nachfolgend wieder entfernt und der Waschschrift mit Ethanol wiederholt. Anschließend wurde der Überstand vollständig verworfen und die Probe bei geöffnetem Gefäßdeckel für 5 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Im folgenden Arbeitsschritt wurde die finale Stock-Lösung der Library hergestellt. Dazu wurden zur Eluierung der Amplifikate von den Beads 50 µl Low TE der Probe hinzugegeben und das Beads-Pellet aufgelöst. Die Suspension wurde für 2 Minuten auf die Magnetbank gestellt und der Überstand als Stock-Lösung in ein neues 1,5 ml DNA-LoBind-Tube übertragen. Die fertigen, gelösten DNA-Libraries wurden bei -20°C im Tiefkühlfach eingelagert.

Quantifizierung der Library

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Konzentration der erstellten Libraries bestimmt. Mittels des Qubit 2.0 Fluorometers und dem verwendeten Qubit dsDNA HS Assay Kit (siehe Kapitel 3.1.2) erfolgte die Quantifizierung der Library-DNA. Angestrebt wurden Konzentrationen zwischen 0,2 – 0,8 ng/µl.

Qualitätskontrolle der DNA-Library mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers

Zur Bestimmung der Länge der amplifizierten DNA-Fragmente war eine Analyse mittels des Agilent 2100 Bioanalyser Systems notwendig. Dazu wurde mit dem High Sensitivity DNA Analysis Kit 1 µl der Library untersucht.

Technisch basiert dieses Verfahren darauf, dass in einer miniaturisierten Gelelektrophorese die einzelnen DNA-Fragmente automatisch der Länge nach in einem sogenannten DNA-Chip aufgetrennt werden. Farbstoff-Moleküle interkalieren zwischen den DNA-Strängen und können so durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenzintensitäten werden in Abhängigkeit von der Länge als Peaks in einem Elektropherogramm bzw. als Banden in einer digitalen Gel-Visualisierung abgebildet. Ein parallel zur Probe mitlaufender Größenmarker aus DNA-Strängen bekannter Länge dient als Referenz und definiert eine Standardkurve von Wanderungszeit und Fragmentgröße für die untersuchten DNA-Amplifikate (siehe Abbildung 3). In der digitalen Auswertung sollten bei erfolgreicher Amplifikation im Elektropherogramm DNA-Längenpeaks zwischen 125-300 bp dargestellt werden. Anschließend war die Konzentrationsbestimmung der amplifizierten Sequenzen in pmol/L (pM) möglich.

Für die folgenden Schritte der klonalen Amplifikation war eine Verdünnung der Libraries auf 20 pM notwendig. Nach dem Verdünnungsschritt konnten die 4 Primer-Mix-Ansätze jedes Falls im gleichen Verhältnis zu je 10 µl zusammengeführt werden.

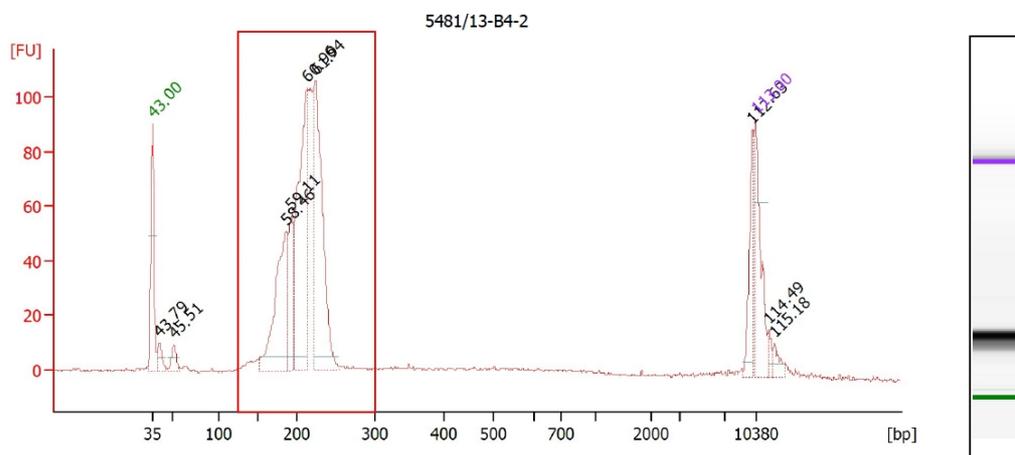


Abbildung 3: Darstellung eines Amplifikat-Ansatzes im Elektropherogramm der Bioanalyser-Untersuchung (beispielhaft für Fall 2, Primerpool 2). Der markierte Bereich umfasst den Amplifikat-Längenbereich von 125-300 pb; die Peaks rechts und links zeigen die Marker.

3.2.2 Klonale Amplifikation der DNA-Sequenzen

Aufgrund der beschränkten Detektionssensitivität der pH-Sensoren für die Sequenzierungsreaktion auf dem Halbleiter-Chip, ist eine direkt an die Library-Präparation anschließende Sequenzierung einzelner Moleküle nicht möglich. Für eine erfolgreiche Sequenzierung muss als Zwischenschritt eine klonale Amplifikation der

einzelnen DNA-Fragmente zwischengeschaltet werden. Dazu erfolgt zuerst eine Hybridisierung der DNA-Fragmente an winzige Reaktionskugeln, die sog. Ion Sphere Particles (ISPs). Anschließend werden diese Fragmente mittels einer Emulsions-PCR (emPCR) durch klonale Amplifikation identisch an den ISPs vervielfältigt, bis sie deren Oberfläche bedecken [79]. Man erhält somit die mit Amplifikaten beladenen template-positiven Ion Sphere Particles. Durch das Auswaschen leerer ISPs (sog. non templated Ion Sphere Particles; ISPs an welche während der klonalen Amplifikation keine DNA gebunden hat) erfolgt in einem abschließenden Schritt die zusätzliche Anreicherung (enrichment). Das Ergebnis sind die enriched ISPs. Mit diesen wird der Ion-Chip beladen. Millionen mit den verschiedenen DNA-Fragmenten angereicherte ISPs werden jeweils separat in die Wells des Halbleiter-Chips eingefügt – für einen adäquaten Sequenzierungsprozess ein ISP pro Well – und die Basenabfolge bestimmt.

Emulsions-PCR (emPCR) mittels ISPs im *Ion OneTouch System*

Die emPCR eröffnet die Möglichkeit, innerhalb des winzigen Reaktionsraumes eines Wassertropfens ein spezifisches, an ein ISP gebundenes DNA-Fragment vielfach zu amplifizieren. Simultan werden dazu in einer Reaktion Millionen von Amplifikationen durchgeführt. D.h. jedes der template-positiven ISPs wird von einem Wassertropfen innerhalb einer Öl-Lösung umgeben, der den Reaktionsraum der microdroplet-PCR definiert. Innerhalb der separaten Tropfen, in welchen sich zu Beginn jeweils ein ISP und ein DNA-Fragment befinden, erfolgt parallel die millionenfache klonale Amplifikation der DNA-Sequenzen, wobei die Primer an die A- und P1-Adapter binden.

Schlüsselmodule für die emPCR sind die ISPs. Auf ihrer Oberfläche befinden sich eine Vielzahl von P1-Oligo-Sequenzen. An diese ist die spätere Bindung der DNA-Fragmente mittels Adaptern möglich. An der Oberfläche jedes ISP wird zu Beginn ein DNA-Fragment über den P1-Adapter an eine P1-Oligo-Sequenz gebunden (template-positive ISP). Dieser P1-Adapter dient weiterhin als Primer für die klonale Amplifikation. Während der Phase der Denaturierung löst sich das zu amplifizierende DNA-Fragment von der P1-Oligo-Sequenz ab, kann an eine neue P1-Oligo-Sequenz binden und ein weiteres Amplifikat generieren. Der A-Adapter am 5'-Ende liegt bereits biotinyliert vor, was relevant für den späteren Aufreinigungsprozess ist. Abbildung 4 stellt den Ablauf schematisch dar.

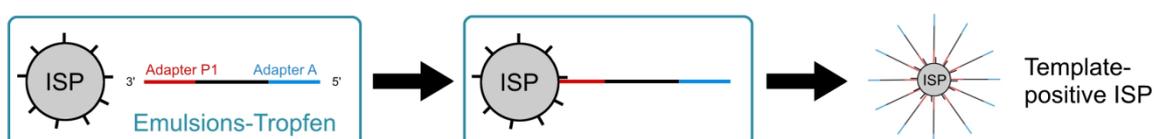


Abbildung 4: Bindung der Amplikate an die ISPs - Zustand vor der emPCR bzw. Zustand nach emPCR-Amplifizierung zu Template-positiven ISPs

In der praktischen Durchführung schloss sich an die Vorbereitung des Ion OneTouch System-Geräts die Zusammenstellung des PCR-Ansatzes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß nach folgenden Vorgaben an:

Nuklease-freies Wasser	280 µl
Ion OneTouch 2x Reagent Mix	500 µl
Ion OneTouch Enzyme Mix	100 µl
Amplifizierte Library, 20pM	20 µl
Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particles	100 µl

Vor Zugabe in den emPCR-Ansatz wurden die ISPs für 1 Minute mit einem Vortex-Gerät gemischt. Anschließend erfolgte eine Durchmischung des gesamten emPCR-Ansatzes und die Übertragung auf die Ion OneTouch Plus Reaction Filter, sowie die Zugabe von 1500 µl Reaktions-Öl (Reaction Oil) als Medium für die emPCR. Abschließend wurde das Filtersystem invertiert und in das Ion OneTouch System-Gerät eingesetzt. Die emPCR startete ein vierstündiges Programm, wobei die klonalen Amplifikate als template-positive ISPs in 2 Recovery-Tubes gesammelt wurden.

Aufreinigung und Anreicherung der Template-positiven ISPs

In den beiden Recovery-Tubes des Ion OneTouch Systems befanden sich nach Beendigung der klonalen Amplifikation die template-positiven sowie die non-template-positiven ISPs. Im letzten Schritt wurden diese zentrifugiert und ISP-Pellets am Boden beider Recovery-Tubes gebildet. Anschließend wurde der Überstand bis auf ~50 µl entfernt, die beiden ISP-Pellets in der verbliebenen Recovery-Solution resuspendiert und beide in ein 1,5 ml DNA-LoBind-Tube überführt. Folgend wurde 1 ml Ion OneTouch Wash Solution hinzugegeben. An diesem Punkt war eine Lagerung der Probe bei 2°C – 8°C für max. 3 Tage möglich. Im Anschluss daran wurde die Suspension für 2,5 Minuten bei 25.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl entfernt und das verbliebene und aufgereinigte ISP-Pellet mittels Auf- und Abpipettieren für 30 Sekunden vollständig resuspendiert.

Mittels der an die DNA-Fragmente bindenden Aufreinigungs-Beads erfolgte die Selektion der template-positiven ISPs. Die eingesetzten Beads waren von einer Streptavidin-Hülle umgeben, durch welche sie die template-positiven ISPs über die biotinylierten Primer binden konnten. So war es möglich, dass während der Aufreinigung alle ISPs, an die keine DNA-Fragmente und damit auch keine Beads gebunden hatten, ausgewaschen wurden. Diese ISP-Anreicherung (enrichment) erfolgte vollautomatisiert mit Hilfe des Ion OneTouch ES-Geräts und einer 8-Well-Platte, die wie vorgegeben beladen wurde:

Methoden

Well 1	noch nicht aufgereinigte ISPs	130 µl
Well 2	MyOne Beads	500 µl
Well 3 – 5	Ion OneTouch Wash Solution	300 µl
Well 6	Leer	-
Well 7	Melt-Off solution	300 µl
Well 8	Leer	-

Vor der Beladung der 8-Well-Platte musste eine Melt-Off Solution (für Well 7) in einem 1,5 ml DNA-LoBind-Tube hergestellt werden. Diese Melt-Off Solution war bei Bedarf an jedem Arbeitstag neu vorzubereiten und wurde wie folgt angesetzt:

Nuklease-freies Wasser	865 µl
1 M NaOH	125 µl
10 % Tween 20 in Nuklease-freiem Wasser	10 µl

Ebenfalls vor der Beladung der 8-Well-Platte war die Zugabe der MyOne Beads in der MyOne Beads Wash Solution (für Well 2) notwendig, in der die Beads für den Anreicherungs-schritt gelöst wurden. Dazu wurden 130 µl MyOne Beads Wash Solution in ein neues 1,5 ml DNA-LoBind-Tube überführt und 13 µl Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads, welche zuvor 30 Sekunden mittels Vortexer gemischt wurden, beigegeben. Die Suspension wurde anschließend für 2 Minuten auf eine Magnetbank (DynaMag-2) gestellt und anschließend der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurden die MyOne Beads erneut in 130 µl MyOne Beads Wash Solution resuspendiert. Vor dem Starten des Enrichment-Programms des Ion OneTouch ES-Geräts wurden aus Well 1 (ISPs) 2 µl für die spätere Qualitätskontrolle der ISPs in einem neuen 0,2 ml PCR-Tube gesichert. Anschließend wurde das Programm gestartet.

Nach ca. 35 Minuten wurde der Lauf automatisch beendet und die enriched ISPs in ein 0,2 ml PCR-Tube überführt. Die Probe wurde für 1,5 Minuten bei 15,500 g zentrifugiert und der Überstand bis auf ein Volumen von ~10 µl abgenommen, ehe das erhaltene ISP-Pellet am Gefäßboden in 200 µl Ion OneTouch Wash Solution mittels 10-maligem Auf- und Abpipettierens resuspendiert wurde. Dieser Zentrifugationsschritt wurde ein zweites Mal wiederholt und der Überstand erneut bis auf 10 µl abgenommen. Die Probe wurde auf 100 µl Volumen mit der Ion OneTouch Wash Solution aufgefüllt und das Pellet resuspendiert. 90 µl wurden anschließend im Kühlschrank bei 2°C - 8°C für maximal 3 Tage eingelagert, ehe sie zur Beladung des Ion-Chips weiter verwendet wurden. 10 µl wurden zur ISP-Qualitätskontrolle verwendet.

Ion Sphere Particles–Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle stellte sicher, dass der Arbeitsschritt der ISP-Anreicherung unter Nutzung des Ion OneTouch ES-Geräts erfolgreich abgelaufen und die Sequenzierung mittels der enriched ISPs adäquat durchzuführen war.

2 µl ISPs wurden vor dem Start des Enrichment-Programms aus Well 1 der 8-Well-Platte gesammelt, sowie 10 µl nach dem Anreicherungsschritt aus dem Proben-Gefäß. Genutzt wurde das für das Qubit 2.0 Fluorometer ausgelegte Ion Sphere Quality Control Kit. Es wurden 2 an Oligonukleotide gekoppelte Fluoreszenz-Farbstoffe eingesetzt, die an die ISPs hybridisierten: Alexa Fluor 488, das an alle vorhandenen ISPs über den P1-Adapter binden, sowie Alexa Fluor 647, das nur template-positive ISPs über den A-Adapter detektieren kann (Abbildung 5).

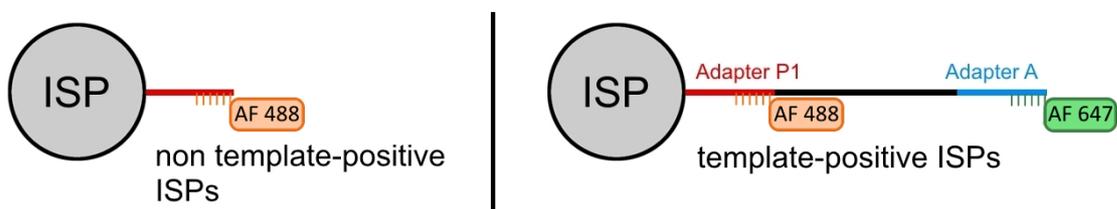


Abbildung 5: Schematische Darstellung template- und non-template-positiver ISPs

Für die Hybridisierung der Farbstoff-Sequenzen an die DNA-Fragmente musste ein spezielles PCR-Programm genutzt werden. Den ISPs wurden 19 µl Annealing Buffer, sowie 1 µl Ion Probes (AF 488, AF 647) hinzugegeben und dieser Ansatz gemischt. Anschließend wurden beide Tubes im Thermocycler bei 95°C für 2 Minuten und für weitere 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei müsste der Messwert für Alexa Fluor 488 nach der ISP-Anreicherung insgesamt gesunken sein, da nominal die Anzahl der ISPs durch die Anreicherung abgenommen hat. Der Messwert für Alexa Fluor 647 hingegen müsste zugenommen haben, da die Anzahl an template-positiven ISPs durch die ISP-Anreicherung stark zugenommen haben sollte. Nach der Messung wurde das Verhältnis zwischen den Messwerten vor und nach Anreicherung über einen vom Hersteller gelieferten Excel-Kalkulator ermittelt. Vor Anreicherung der ISPs sollte der Anteil template-positiver ISPs bei 10-30 % liegen, nach Anreicherung bei >50 % [79].

3.2.3 Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente

Die DNA-Sequenzierung mittels der Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) basiert auf der Protonen-Detektion mittels Halbleiter-Technologie. Es handelt sich bei dem Ion Torrent System um ein sequencing by synthesis-Verfahren: simultan zur Sequenzierung kommt es zur Detektion der Nukleotidabfolge [80]. Biochemische Grundlage für die Sequenzierung ist die Messung eines Reaktionsproduktes der klassischen DNA-Synthesereaktion: während der komplementären DNA-Synthese

durch die DNA-Polymerase wird beim Einbau eines jeden Nukleotids ein Proton freigesetzt. Dessen Freisetzung bzw. die dadurch bedingte pH-Wert-Veränderung kann mit Hilfe hochsensitiver Sensoren gemessen werden. Wird ein passendes (d.h. komplementäres) Nukleotid eingebaut, steigt die Protonen-Konzentration und der pH-Wert ändert sich. Wird kein Nukleotid eingebaut, wird kein H^+ -Ion freigesetzt und der pH-Wert ändert sich nicht [80, 81]. Bei jeder Flutung des Chips mit einem dNTP wird der pH-Wert ermittelt und so ein Einbau- bzw. Nicht-Einbau berechnet. Anschließend ist ein Waschschriff notwendig, um die überschüssigen dNTPs zu entfernen und das neutrale pH-Ausgangsniveau für die nächste Flutung der Wells wiederherzustellen. Der Sequenzierungsprozess setzt sich dabei aus 130 Reaktionszyklen zusammen, wobei in jedem Zyklus der Ion Chip nacheinander mit den 4 dNTPs geflutet wird.

Der genutzte Sequenzierchip (Ion 318 Chip, siehe Abbildung 6) verfügt über etwa 11,3 Millionen Mikro-Wells, in denen Sensoren die Sequenzierungsreaktion wahrnehmen können. Diese Wells dienen als Mikro-Reaktionsräume, wobei im Idealfall durch die Beladung des Chips in jedem Mikro-Well ein ISP vorliegt.

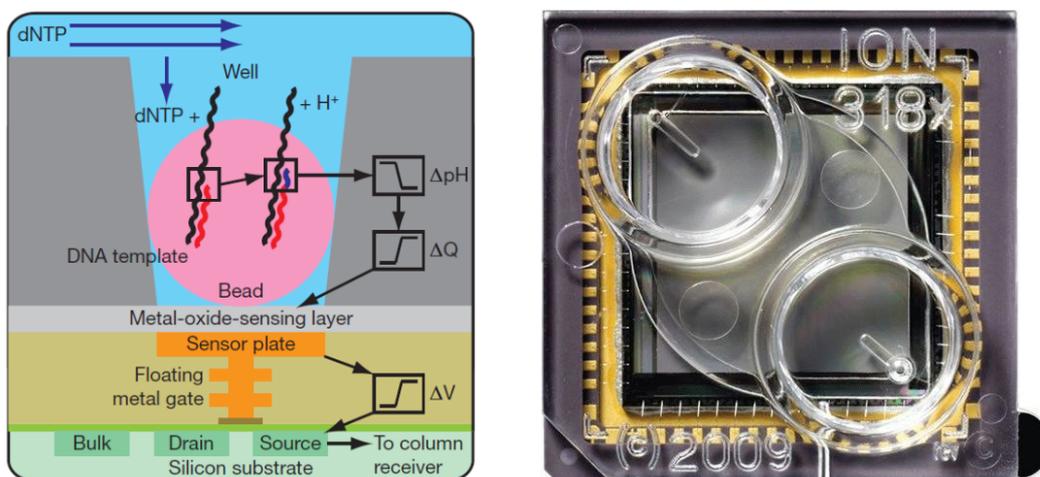


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Mikro-Wells mit ablaufender Sequenzierungsreaktion und Abbildung eines Ion 318 Chips, Quelle: nach Rothberg [80]

Für den Ablauf der Sequenzierung wurde die PGM vorbereitet, 2 Reinigungsgänge durchlaufen und die dNTP-Stocks aufgefüllt. Weiterhin wurden den angereicherten Template-positiven ISPs spezielle Sequenzierungs-Primer, sowie Control Ion Sphere Particles und als Grundmedium ein Annealing Buffer hinzugegeben. Die Control Ion Sphere Particles dienten später als Nachweis für einen erfolgreichen Sequenzierungsvorgang. Folgender Ansatz wurde verwendet:

angereicherte, Template-positive ISPs	90 μ l
Control Ion Sphere Particles	5 μ l
Annealing Buffer	100 μ l

Der Ansatz wurde mittels Auf- und Abpipettierens gemischt und bei 15.500 g für 2 Minuten zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Überstand bis auf ca. 15 µl entfernt, ohne das ISP-Pellet am Gefäßboden zu stören. Anschließend wurde das Pellet in den verbleibenden 15 µl resuspendiert und in ein neues PCR-Tube übertragen. Weiter wurden 12 µl Sequencing Primer hinzugegeben und folgender Inkubationsschritt im Thermocycler zur Primeranlagerung durchgeführt:

95°C 2 Min.

37°C 2 Min.

Dem Reaktionsvolumen (27 µl) wurden 3 µl PGM 200 Sequencing Polymerase hinzugefügt, der Ansatz gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Ion Chip mittels Spülung mit Isopropanol (100 µl) und Annealing Buffer (100 µl) für die Beladung vorbereitet. Abschließend wurde die Probe auf den Chip geladen, der Ion Chip in die PGM eingesetzt und das Sequenzierungsprogramm nach den Vorgaben des Hersteller-Protokolls gestartet.

3.2.4 Bioinformatische Datenauswertung

Die originalen Sequenzierungsdaten wurden auf dem hausinternen zentralen Ion Torrent Server gesammelt. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte anschließend unter Verwendung der vom Hersteller bereitgestellten Software (Torrent Suite Software). Über ein Plugin wurden die Sequenzierungsdaten aufbereitet, mit einem bekannten Referenzgenom (Genome Reference Consortium Human Build 37 GRCh37; UCSC Genome Browser, Version hg19) abgeglichen und die so erhaltenen Datensätze abgespeichert. Mittels eines Variant Callers erfolgte durch den Abgleich mit dem Referenzgenom eine Variantenbestimmung. Die einzelnen Varianten wurden aus den Sequenzierungsdaten aufgerufen sowie gleichzeitig bereits bekannte SNPs markiert.

Varianten die eine Frequenz von $\geq 10\%$ bei einer Lesetiefe von mindestens 20 Reads aufwiesen, wurden in einer ersten Auswertungsstufe aus der Datensammlung herausgefiltert. Lag ein Basenaustausch vor, der aber nicht für eine neue Aminosäure kodierte, bedeutete dies eine „stille Mutation“ und von einer weitergehenden Untersuchung wurde abgesehen. Das Gleiche galt für Mutationen, die sich im Bereich von Introns befanden. Weiterhin deuteten vermeintliche Mutationen in Regionen mit vielfacher Häufung ein- und desselben Basenpaares (Homopolymere) eher auf einen Methoden-assoziierten Fehler beim Ablesen der Basenabfolge hin, weshalb diese Varianten nicht als Mutation gewertet und ebenfalls herausgefiltert wurden.

Besonders wichtig für die Mutationsanalyse war die sichere Unterscheidung zwischen echten Mutationen und Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Diese stellt

an sich eine große Herausforderung dar. SNPs sind sehr häufig, wobei im individuellen Genom ca. je 1000bp ein SNP auftritt [82]. Auch besteht für die bestehenden SNP-Datenbanken eine Unvollständigkeit der verzeichneten Varianten. Daher kommt dem Vergleich zwischen der DNA aus Tumorgewebe und aus gesundem Referenzgewebe eine wichtige Bedeutung zu. Konnte ein spezifischer Basenaustausch, der zwar vom Referenzgenom (hg19) abwich aber im Referenz- wie auch im Tumorgewebe des Patienten vorhanden war, festgestellt werden, wurde ein SNP angenommen. Ein Basenaustausch der nur in der Tumor-DNA aber nicht im Referenzgewebe detektiert wurde, wies hingegen mit größerer Sicherheit auf eine somatische Mutation hin.

Die mittels des Variant Callers vom Referenzgenom abweichenden Varianten wurden in Form einer Excel-Tabelle dargestellt. In einem folgenden Arbeitsschritt konnten mit dem vom Broad-Institut, Boston entwickelten Integrative Genomic Viewer (IGV) die erhaltenen Datensätze (BAM-Files) eingesehen werden. Eine Visualisierung und Analyse der Sequenzierungsdaten war möglich und die einzelnen Varianten konnten eingeordnet werden. Um auch Gen-Polymorphismen, die aufgrund einer zu geringen Lesetiefe (Coverage) beim Variantenabgleich nicht aufgerufen wurden, zu detektieren und um eine größtmögliche Trennschärfe zwischen SNPs und Mutationen gewährleisten zu können, wurden zusätzlich alle relevanten Varianten manuell über die SNP:GeneView-Funktion der NCBI-Datenbank auf die Möglichkeit als bereits bekannte Genvariation hin überprüft. Für die letztlich potenziell relevanten Varianten wurde im nächsten Schritt mittels spezifischer Primer eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt, dem zum Untersuchungszeitpunkt noch zur Verifikation geforderten Goldstandard.

3.3 Klassische DNA-Sequenzierung

Im Rahmen der Mutationsverifizierung wurden folgende Arbeitsschritte durchlaufen:

- 1) Primerdesign,
- 2) Fast-PCR-Reaktion,
- 3) Agarose-Gelelektrophorese,
- 4) Aufreinigung der PCR-Produkte und
- 5) Sanger-Sequenzierung (siehe Abbildung 7):



Abbildung 7: Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der klassischen DNA-Sequenzierung (eigene Darstellung modifiziert nach Product Bulletin Proton™ exome sequencing, Life Technologies Corp. 2012)

3.3.1 Primerdesign

Alle mit dem Ion Torrent System detektierten Mutationen mussten mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Bedingt durch die teils relativ niedrige Lesetiefe war zum Zeitpunkt der Untersuchung die Bestätigung durch die Goldstandard-Methode notwendig. Standen für das tNGS das CCP mit einem umfangreichen Primerpool zur Verfügung, musste für die Sanger-Sequenzierung für jede einzelne potenzielle Mutation ein individuelles Primerpaar zur Amplifikation eines entsprechenden genomischen Fragments entworfen werden.

Primer-Konstruktion

Im Integrative Genomic Viewer konnte die Basensequenz des relevanten Genabschnitts im Bereich der zu verifizierenden Mutation angezeigt werden. Dieser entsprechend wurde die Basensequenz für einen Vorwärtsprimer und einen Rückwärtsprimer erstellt. Dabei mussten einige Vorgaben in der Primerkonstruktion beachtet werden: der Abstand zwischen dem Primeransatzpunkt und der zu überprüfenden Mutation sollte jeweils ca. 20 Aminosäuren (ca. 60-65 Nukleotide) betragen, die Schmelztemperatur (T_m) musste zwischen 55°C und 72°C liegen, wobei die beiden Primer nicht mehr als 1°C voneinander abweichen sollten und ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Adenin-Thymin bzw. Cytosin-Guanin-Basenpaaren war anzustreben (GC-Paare zwischen 40 % - bis max. 60 %). Innerhalb der letzten 5 Basen-Paare am 3'-Ende mussten mindestens 2 GC-Paare, optimalerweise 3 GC-Paare enthalten sein. Mit dem T_m Calculator (Applied Bio-systems, Life Technologies) wurden anschließend die Primerpaare erstellt und die Schmelztemperatur für das Annealing, als wesentlichem Funktionsparameter, ermittelt. Im nächsten Schritt wurden über den Hersteller Eurofins Genomics die Primer bestellt.

Primerüberprüfung

Die gelieferten Primer mussten vor ihrer Verwendung in aqua ad injectabilia gelöst werden und wurden als Stock-Lösungen auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l verdünnt, welche dann zu einer 5 pmol/ μ l-Arbeitslösung verdünnt wurde. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit wurde eine laborinterne Standard-DNA verwendet. Ein PCR-Ansatz wurde standardmäßig (siehe Kapitel 3.4.1) vorbereitet und die PCR durchgeführt. In einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.2) konnte die adäquate DNA-Amplifikation der Standard-DNA und somit die Funktionstüchtigkeit der zu überprüfenden Primerpaare evaluiert werden.

3.3.2 Fast-PCR-Reaktion

Zur Amplifikation der DNA für die Sanger-Sequenzierung wurde im ersten Schritt folgender Fast-PCR-Ansatz in einem 0,1 ml Fast-PCR-Tube vorbereitet:

Nuklease-freies Wasser	7 µl
Vorwärts-Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts-Primer (5 pmol/µl)	1 µl
2x GeneAmp Fast PCR Master Mix	10 µl
Proben-DNA	1 µl

Der 2x GeneAmp Fast PCR Master Mix enthielt u.a. AmpliTaq DNA Polymerase, GeneAmp PCR Buffer, dNTPs, MgCl₂ und stellte ein vom Produzenten vorgegebenes Set aller notwendigen Reagenzien für die PCR dar. Folgendes Fast-PCR-Programm wurde im Thermocycler durchlaufen:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
1. Initiale Denaturierung	98°C	10 s	-
2. Denaturierung	94°C	10 s	} 40x
Primer Annealing/Elongation	63°C	20 s	
3. Abkühlung	4°C	∞	-

Parallel zu den zu untersuchenden Proben (Tumor-DNA; Referenz-DNA) wurde für jedes Primer-Paar für den PCR-Lauf eine Negativ-Kontrolle eingesetzt, bei welcher das DNA-Volumen durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Amplifikation mittels Fast-PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 2-prozentiges Agarosegel hergestellt. 50 ml 0,5-facher TBE-Puffer wurden in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 1 g Agarose-Pulver vermischt. Die Suspension wurde erhitzt, bis sich das Agarose-Pulver vollständig gelöst hatte. Anschließend wurden unter einem Abzug 2 µl Ethidiumbromid beigegeben und das Agarose-Gel in die vorbereitete Gel-Kammer gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den DNA-Basen und fluoresziert unter Bestrahlung mit ultra-violettem Licht. Nach ca. 30 Min. war das Gel soweit abgekühlt, dass es in die Elektrophorese-Halterung eingesetzt und anschließend vollständig mit 0,5-fachem TBE-Puffer bedeckt werden konnte. Eine Gel-Tasche wurde mit dem Längenmarker GeneRuler Low Range DNA Ladder (Ladder:6x DNA loading dye; 1:3) beladen. Je 5 µl des PCR-Produkts wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und 1 µl 6x DNA loading dye hinzugegeben. Die Gel-Taschen wurden

anschließend mit den PCR-Produkten beladen und die Gelelektrophorese bei einer angelegten Spannung von 124-130 V gestartet. Die Beurteilung der nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte nach abgeschlossener Elektrophorese in einer UV-Kammer mittels Fotodokumentation.

3.3.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach der Amplifikation war eine Aufreinigung der PCR-Produkte für die spätere Sequenzierungs-PCR notwendig. Für diesen Reinigungsschritt wurde ExoSAP-IT verwendet, dessen Funktion auf zwei Enzymen basiert: durch die Exonuklease I werden nicht genutzte Primer aus der PCR abgebaut; durch die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) werden nicht-gebundene Nukleotide dephosphoryliert. Nach Zugabe von ExoSAP-IT zum PCR-Produkt wurde der Ansatz in einem ersten Schritt auf Reaktionstemperatur erwärmt, um die verbliebenen Primer und Nukleotide durch den applizierten Enzymmix abzubauen. Nach der Reaktionszeit wurden über eine starke Erwärmung des Ansatzes die Enzyme wieder inaktiviert.

Nach Entnahme von 5 µl PCR-Ansatz für die Gelelektrophorese wurden 4 µl ExoSAP-IT zum Rest hinzugegeben und ein Inkubations-Programm durchlaufen:

37°C	15 Min.
80°C	15 Min.

Die aufgereinigten PCR-Produkte waren nun für die Sequenzierungs-PCR einsetzbar.

3.3.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen: der DNA-Amplifikation mit markierten Nukleotiden und der Basenabfolge-Analyse mittels Elektrophorese. Bei der Sequenzierungs-PCR werden während der Polymerisierung mit Farbstoff markierte Nukleotide (Didesoxyribonukleosid-Triphosphate, ddNTPs) in die sich verlängernden DNA-Stränge eingebaut, die bei Einbau zu einem Abbruch der DNA-Verlängerung führen, da eine fehlende 3'-OH-Gruppe die weitere Elongation verhindert. Es werden mittels dieser Kettenabbruchmethode vielfach Einzelstrang-DNA-Amplifikate unterschiedlicher Länge synthetisiert. Nach einem Aufreinigungsschritt werden die Einzelstrang-DNA-Amplifikate mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Fragmentlänge bestimmt und anschließend die DNA-Sequenz in einem Chromatogramm dargestellt.

Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierungs-PCR wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Folgender Ansatz wurde vorbereitet:

Methoden

Nuklease-freies Wasser	4,5 µl
BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5x)	2 µl
BigDye Mix 3.1	1 µl
Spez. Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1 µl

Bei geringer DNA-Ausbeute konnten für den PCR-Ansatz statt 1 µl des aufgereinigten PCR-Produkts 3 µl verwendet und dafür 2 µl weniger Nuklease-freies Wasser eingesetzt werden. Der Sequencing Buffer enthielt standardmäßig alle notwendigen Ressourcen für die PCR; im BigDye Mix 3.1 waren die Fluorochrom-markierten Nucleotide für die Polymerisation enthalten. Folgendes Programm wurde ausgewählt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
1. Initiale Denaturierung	96°C	60 s	-
2. Denaturierung	96°C	10 s	} 25x
Primer Annealing	50°C	5 s	
Elongation	60°C	75 s	
3. Abkühlung	4°C	∞	-

Aufreinigung der Syntheseprodukte der Sequenzierungs-PCR

Nach der Sequenzierungs-PCR war ein erneuter Aufreinigungsschritt notwendig, um die nicht eingebauten Terminator-Nucleotide vom PCR-Produkt zu trennen. Dafür wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit (250) verwendet. Über einen einfachen Zentrifugationsschritt konnten die Amplifikate durch Entfernung der überschüssigen Terminator-Nucleotide für die Kapillarelektrophorese aufgereinigt werden. Nach Herstellerangaben wurden für jedes PCR-Produkt Aufreinigungssäulen aus einem Collection Tube und dem Filtersystem zusammengesetzt und diese Säulen zentrifugiert (2.800 rpm, 3 Min, Raumtemperatur). Nach diesem Vorbereitungsschritt wurden die Collection Tubes verworfen und die Filtersysteme in vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit 10 µl Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und die Lösung auf das Gel-Pad des Filtersystems übertragen. Mittels einer weiteren Zentrifugation des Ansatzes bei 2.800 rpm für 4 Minuten erfolgte die Aufreinigung und das Produkt, in 1,5 ml Tubes gesammelt, war zur Elektrophorese einsetzbar.

Kapillar-Elektrophorese mit dem ABI 3730xl Genetic Analyzer

Der zweite Teil der Sanger-Sequenzierung bestand aus der Analyse der Basenabfolge mittels Elektrophorese. Mit dem für diese Untersuchung verwendeten ABI 3730xl

genetic Analyzer war eine vollständig automatische Hochdurchsatz-Kapillarelektrophorese möglich, die auf dem Einsatz fluoreszierender DNA-Fragmente basiert. Das Funktionsprinzip ist folgendes: Zuerst werden die Kapillaren mit POP-7 Polymer aufgefüllt. Anschließend werden die Kapillaren mit den Fluoreszenz-Farbstoffmarkierten Produkten der Sequenzierungsreaktion durch elektrokinetische Injektion (electrokinetic injection) beladen. Im nächsten Schritt, der eigentlichen Elektrophorese, werden die Fragmente beim Durchwandern des Transportmediums der Größe nach aufgetrennt. Erreichen sie das Detektionsfeld, werden die Farbstoffmoleküle durch einen Laserstrahl angeregt zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz-Emissionen werden dabei spektral in ihre unterschiedlichen Wellenlängen durch einen Spektrograph (Prisma) aufgeteilt und von einer CCD-Kamera detektiert.

Nach Beladung der 96-Well Probenplatte mit Formamid als Lösungsmittel und der darauf folgenden Übertragung der Proben in die Wells wurde die Platte in das Gerät eingesetzt und die DNA-Analyse gestartet. Dieser Vorgang lief parallel in allen beladenen Proben-Wells ab. Die dabei gewonnenen Fluoreszenz-Daten wurden während der Analyse mit einer vom Hersteller gelieferten Software gesammelt und in einem Elektropherogramm für die spätere Auswertung visualisiert.

3.4 Immunhistochemie

Mit Hilfe von Immunhistochemie ist es möglich mittels spezifischen Antikörpern eine immunenzymatisch vermittelte Färbung in Zellen befindlicher Proteine durchzuführen und dadurch Erkenntnisse über die Expression, sowie über die genaue Lokalisation innerhalb der Gewebe bzw. auch innerhalb der Zellen zu gewinnen (membranassoziiert, zytoplasmatisch oder nukleär). Verwendet wurde dazu das Dako REAL Detection System AP/RED Rabbit/Mouse. Für die Untersuchung wurden 2 verschiedene Antikörper gegen das Protein EPHB4 eingesetzt, welche als polyklonale Antikörper (pAK) an verschiedenen Epitopen des Proteins binden sollten.

Dako REAL Detection System AP/RED Rabbit/Mouse

Die Funktionsweise ist folgende: Das auf der LSAB-Methode (Labeled Streptavidin-Biotin-Methode) basierende System funktioniert über einen biotinylierten sekundären Verbindungsantikörper, welcher zuerst an die Fc-Domäne des eingesetzten spezifischen primären Antikörpers bindet und an dessen Biotinmarkierung im nächsten Arbeitsschritt das mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidin binden kann. In einem weiteren Schritt wird eine Chromogen-Lösung hinzugegeben und das Chromogen mittels der gebundenen alkalischen Phosphatase aus einem farblosen Zustand in einen Farbkomplex umgewandelt. Der Arbeitsablauf gliederte sich in

3 Kernarbeitsschritte: 1) Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval) und Inkubation der entparaffinierten Gewebeschnitte mit einem spezifischen primären Antikörper, 2) Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Verbindungs-Antikörper und 3) Zugabe des mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidins.

Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Zunächst wurden mittels Mikrotom 2-5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, diese auf der Oberfläche eines Wasserbads entfaltet und auf spezielle SuperFrost Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte getrocknet, um eine optimale Haftung des Gewebes auf der Glasoberfläche zu sichern. Der nächste Arbeitsschritt diente der Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden diese für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden (meist über Nacht) angetrocknet. Der eigentliche Färbeprozess der Gewebeschnitte begann mit einer 2-stufigen Entparaffinierung. Dazu erfolgte eine Inkubation in Xylol für 10 Minuten und für erneute 2 Minuten. Anschließend mussten die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe durchlaufen (2x 100 %-Ethanol, 2x 96 %-Ethanol, 1x 70 %-Ethanol). Als nächstes wurde ein Waschschrift mit Tris-1x-Puffer und ein weiterer mit Wasser durchgeführt. Die Schnitte wurden folgend zum Zweck der Antigendemaskierung für 15 Minuten in Citratpuffer gekocht, darauf folgend für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und 3x mit Tris-1x-Puffer gewaschen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten primären Antikörper, wozu nach dessen Zugabe die Gewebeschnitte in einer Feuchtkammer für mindestens 3 Stunden (meist über Nacht) bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurden. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte 3x mit Tris-1x-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation für 30 Minuten mit dem sekundären biotinylierten Verbindungsantikörper (Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies, Fläschchen A). Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut 3x mit Tris-1x-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte mit der mit Streptavidin konjugierten alkalischen Phosphatase (Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), Fläschchen B) bedeckt und für 15 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Chromogen-Lösung vorbereitet. Dazu wurden 750 µl Puffer (Dako REAL AP Substrate Buffer, Fläschchen F) mit den 3 Chromogen-Ansätzen (Dako REAL Chromogen Red 1, Red 2 und Red 3; Fläschchen D, E und F) zu je 30 µl zu einem Gesamtvolumen von 840 µl gemischt. Abschließend wurden 2,94 µl Levamisol zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase der Chromogen-Lösung hinzugegeben und der Ansatz mit Hilfe eines Vortexers durchmischt. Die fertige Chromogen-Lösung wurde benutzt, um die Schnitte nach Ablauf der 15-minütigen Inkubationszeit mit der mit Streptavidin konjugierten alkalischen Phosphatase und dem anschließenden 3-maligen Waschen

mit Tris-1x-Puffer vollständig zu bedecken und für 5-7 Minuten zu inkubieren. Als nächstes wurden die Schnitte erneut 3x mit Tris-1x-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte zur besseren Bewertbarkeit der Antikörperfärbung eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin, welches 1:4 mit Wasser verdünnt wurde und für 5-10 Sekunden auf die Gewebeschnitte aufgetragen wurde. Die Schnitte wurden danach kurz in ein Wassergefäß getaucht und direkt für 1 Minute in laufendem Leitungswasser gebläut. Durch die Hämatoxylin-Färbung erschienen die Nukleoli der Zellen noch rötlich, änderten allerdings durch Anhebung des pH-Werts während des Bläuens ihre Farbe in bläulich-violett. Es folgten ein letzter Waschvorgang mit Tris-1-Puffer und das Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe (1x 70 %-Ethanol, 2x 96 %-Ethanol, 2x 100 %-Ethanol), um das Wasser aus dem Gewebe zu drängen. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Gewebeschnitte vorsichtig abgeklopft, mit dem Eindeckmedium Pertex bedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt.

3.4.1 EphB4-Protein-Expressions – Analyse

Die Expressionsanalyse erfolgte basierend auf der Bewertung des Anfärbeverhaltens der einzelnen Gewebeschnitte. Mittels Lichtmikroskop (Leica DM IL) konnte nach der Immunhistochemie eine qualitative Einschätzung vorgenommen werden, bei der die Stärke der Färbung beurteilt wurde. Eingesetzt wurden zwei gegen EphB4 gerichtete, verschiedene Antikörper: SC-130753 (Antikörper 1, AK1) und SC-5536 (Antikörper 2, AK2). Als Färbungsreferenz für die immunhistochemischen Färbungen wurden Enterozyten aus Kolorektalkarzinomen – als adäquate Referenz laut *The Human Protein Atlas (THPA)* – als EphB4-Positivkontrollen verwendet. Die Auswahl von Gefäßendothel als Vergleichszelltyp ergab sich aus der *THPA*-Empfehlung; weitere vorgeschlagene Zelltypen (glanduläre Zellen, periphere Nerven-/Ganglionzellen) lagen als Vergleichszellen nicht in den Angiosarkomen vor. Die Auswertung erfolgte durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Dreyer, Oberarzt im Institut für Pathologie Gießen.

4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das molekulare Profil von Angiosarkomen untersucht. Dazu sollte für 10 als FFPE-Proben vorliegende Fälle ein tNGS durchgeführt und anschließend die gefundenen somatischen Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Das tNGS wurde mit der Ion Torrent Personal Genome Machine unter Einsatz des Comprehensive Cancer Panels (CCP) durchgeführt, einem Gen-Panel mit welchem die Amplifikation einer Genauswahl von 409 häufig in Tumoren mutierten Onko- und Tumorsuppressorgenen – aufgeteilt in 4 Primerpools mit insgesamt etwa 16.000 Primern – möglich war (Übersicht siehe Abb. 51, im Anhang) [83]. Der experimentelle Ablauf stellte sich dabei folgendermaßen dar: Für jeden Fall wurde nach Makrodissektion aus Tumor- und Referenzgewebe genomische DNA extrahiert und jeweils für das Tumor- und Referenzgenom eine Library mittels Genamplifikation hergestellt. Durch das Variant Calling wurden die Varianten der Tumor- und Referenz-DNA jedes untersuchten Falls aufgerufen und als Tabellenregister in Excel dargestellt. Im Anschluss konnten die Tabellen miteinander abgeglichen und Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) direkt bzw. nach Überprüfung in einer SNP-Datenbank identifiziert werden. Anschließend konnten die potenziellen somatischen Mutationen durch Sanger-Sequenzierung verifiziert werden, um alle Fälle zusammenfassend zwecks Vertiefung des Pathogeneseverständnis miteinander vergleichen zu können.

4.1 Next Generation Sequencing

4.1.1 Übersicht über die Librarypräparation

Für alle Fälle erfolgte im Anschluss an die DNA-Isolation eine fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe Kap. 3.1.2). Für 6 Fälle (Fall 1, 2, 3, 4, 7, 10) waren die Voraussetzungen für eine Librarypräparation erfüllt, da eine ausreichende DNA-Menge sowohl für das Referenz- als auch das Tumorgewebe gewonnen werden konnte (siehe Kap. 3.2.2); in einem Fall (Fall 6) wurde zwar eine Library erstellt, jedoch ohne abschließend eine vollständige Auswertung vornehmen zu können (siehe Kap. 4.1.4). Für 3 Fälle (Fall 5, 8, 9) wurde wegen zu geringer DNA-Mengen kein tNGS durchgeführt.

Dabei konnte für Fall 5 lediglich eine DNA mit einer Konzentration des Referenzmaterials von 1,76 ng/µl gewonnen werden. Für die dennoch für das Tumorgenom versuchsweise erstellte Library (40,5 ng/µl) ergaben sich zwar suffiziente Messwerte in der Qubit- und Agilentmessung, doch waren für die anschließend erstellte Library des Referenzgewebes weder mittels der Qubit- noch der Agilent-Messkontrollen Werte oberhalb der Nachweisgrenze messbar (siehe Tabelle 2 &

Tabelle 7, im Anhang).

Für Fall 8 wurde eine sehr niedrige DNA-Konzentration des Referenzgewebes von 2,41 ng/µl gemessen. Daher wurde für das Referenz- und das Tumorgewebe eine Library mit nur je einem eingesetzten Primerpool erstellt (siehe Tabelle 2). Anschließend musste aufgrund kritisch niedriger DNA-Konzentrationen beider erstellter Libraries ($C_{RG}=0,13$ ng/µl; $C_T=0,1$ ng/µl) von einer Sequenzierung abgesehen werden.

Da es sich bei Fall 9 um ein im Knochen lokalisiertes Angiosarkom handelte, wurde bereits für die klinische Routinediagnostik eine Entkalkung des Gewebes mittels Dinatrium-EDTA-Lösung vorgenommen. Dies führte möglicherweise zur Degeneration der Tumorzell-DNA, weshalb auf eine tNGS-Analyse verzichtet werden musste.

Tabelle 2: Übersicht über die Konzentrationen (C_{DNA}) der aus den FFPE-Proben isolierten DNA sowie die Qubit-Messwerte im Anschluss an die Library-Präparation

Fall	Entität	C_{DNA} [ng/µl]	DNA-Konzentration der Library [ng/µl]			
			Primerpool-1	Primerpool-2	Primerpool-3	Primerpool-4
1	RG	54,8	0,221	0,12	0,274	0,17
	Tumor	37,2	0,539	0,312	0,366	- *
2	RG	47,6	0,480	0,581	0,501	0,219
	Tumor	64,3	0,256	0,620	0,469	0,524
3	RG	17,8	0,491	0,454	0,493	0,545
	Tumor	42,9	0,402	0,849	0,214	0,309
4	RG	105	0,202	0,527	0,331	0,481
	Tumor	100	0,348	0,203	0,303	0,870
5	RG	1,76	- *	- *	- *	- *
	Tumor	40,5	0,239	0,170	0,611	0,584
6	RG	20,07	0,110	0,207	0,160	0,100
	Tumor	46,2	0,130	0,150	0,180	0,140
7	RG	178	0,538	0,549	0,290	0,369
	Tumor	328	0,703	0,964	0,948	0,744
8	RG	2,41	0,130	- *	- *	- *
	Tumor	253	- *	0,10	- *	- *
9	RG	0,362	- *	- *	- *	- *
	Tumor	0,265	- *	- *	- *	- *
10	RG	14,9	0,190	0,258	0,231	0,160
	Tumor	378	0,313	0,333	0,335	0,209
* keine Messung möglich						

4.1.2 Übersicht der Sequenzierungsläufe

Nach Herstellung der Libraries (siehe Kap. 3.2.1) folgte eine Analyse der DNA-Amplifikate mittels des High Sensitivity DNA Analysis Kits für den Agilent Bioanalyzer (siehe Kap. 3.2.1; Messwerte siehe Tabelle 7, im Anhang). Anschließend konnte die für die Sequenzierung vorab notwendige klonale Amplifikation der DNA-Fragmente durchgeführt werden (siehe Kap. 3.2.2; Messwerte siehe Tabelle 7, im Anhang).

Im Rahmen des tNGS wurde für jeden Fall die Sequenzierung des Referenz- und des Tumorgenoms gemeinsam auf einem Chip durchgeführt. Dafür standen auf den eingesetzten Ion 318 Chips $\sim 11,3 \cdot 10^6$ Wells als Mikrodetektorräume für die Erfassung der Basenabfolge zur Verfügung. Eine vollständige Beladung aller Wells (100 %) war in der Regel nicht möglich, dennoch wurde eine hohe Beladungs-Dichte mit ISPs angestrebt (siehe Abbildung 51, im Anhang). Eine Übersicht der einzelnen Sequenzierungsläufe ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der Sequenzierungsläufe

	Fall						
	1	2	3	4	6	7	10
Auswertbare Reads, $\times 10^6$							
Referenz-DNA	3,02	2,63	2,98	1,53	3,99	2,19	3,21
Tumor-DNA	3,57	2,72	1,66	2,94	2,61	2,32	3,69
Ø-Coverage*							
Referenz-DNA	180,6	151,8	181,4	93,16	236,6	120,8	190,4
Tumor-DNA	211,4	158,2	101,0	182,6	152,8	129,3	224,4
targetierte Basen mit einer Coverage $\geq 20x$							
Referenz-DNA [%]	93,86	93,60	94,02	87,33	93,76	87,44	93,88
Tumor-DNA [%]	94,63	93,17	89,93	93,82	92,10	93,51	94,32
Ø Amplifikat-Länge							
Referenz-DNA [bp]	107	103	109	109	107	99	106
Tumor-DNA [bp]	105	104	109	110	106	101	108
* Ø-Coverage = durchschnittliche Anzahl des Ablesens eines bestimmten Nukleotids							

4.1.3 Variant Calling mittels VariantCaller

Das Variant Calling dient dazu, aus den erhaltenen Sequenzierungsdatensätzen zuerst durch Abgleich mit einem Referenzgenom (hg19; siehe Kap. 3.2.4) und der anschließenden paarweisen Gegenüberstellung der DNA-Sequenz von Tumor- und Normalgewebe die bestehenden somatischen Varianten zu detektieren [84]. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür die VariantCaller Software von Ion Torrent (Torrent Suite Software) verwendet. Durch den Sequenzabgleich mit einem Referenzgenom (Ion hg19 Reference) wurden abweichende Varianten in der Referenz- und Tumor-DNA ermittelt sowie die häufigsten SNPs herausgefiltert.

Der VariantCaller generierte für jede einzelne Probe einen Datensatz, welcher die vom Referenzgenom abweichenden Varianten in einer Excel-Tabelle darstellte. Dadurch konnten die zwei für jeden Fall generierten Datensätze in Form zweier Excel-Tabellen bereitgestellt werden: in der ersten Tabelle waren alle vom Referenzgenom abweichenden Varianten im Referenzgewebe der individuellen Probe aufgeführt, in der zweiten Tabelle alle im Tumor detektierten Varianten. Im folgenden Arbeitsschritt wurden beide Excel-Tabellen übereinander gelegt und so für jeden der untersuchten Fälle die Varianten aus Tumor- und Referenzgewebe miteinander abgeglichen, identische Varianten (SNPs) herausgefiltert und allein die im Tumorgewebe existenten Varianten weiter untersucht.

4.1.4 Eingrenzung der gefundenen Varianten

Grundsätzlich stellt die Unterscheidung zwischen Varianten mit sehr niedrigen Allelfrequenzen und falsch positiven Varianten u.a. als Folge von Sequenzierungsfehlern durch die Sequenzierungsplattform oder Artefakten des Sequenzalignments, eine Herausforderung dar [85]. Daher existierten auch in der vorliegenden Arbeit im Anschluss an das Variant Calling häufig falsch positive Varianten, welche manuell durch visuelle Überprüfung der Basenabfolge im IGV ausgeschlossen werden mussten. Um ihre Anzahl auf ein Minimum zu reduzieren und nur potenziell somatische Mutationen zu detektieren, wurde für jeden Fall nach folgendem Procedere verfahren:

1) Überprüfung aller Varianten auf eine Base Coverage von je $\geq 20x$

An sich ist bei der Sequenzierung ein technischer Ablesefehler eines Nukleotids von einer genomischen Variante nicht zu unterscheiden [86]. Eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Unterscheidung zwischen richtig und falsch positiven Varianten ist daher – unabhängig des eingesetzten NGS Analyse-Tools – eine möglichst hohe Coverage. Als Orientierungsgröße kann eine Coverage von $\geq 20x$ angenommen werden [87]. Daher musste in der vorliegenden Arbeit zuerst kontrolliert werden, dass für alle generierten Varianten eine Base Coverage von $\geq 20x$ erreicht wurde. Varianten unterhalb dieser Grenze wurden in der weiteren Untersuchung nicht berücksichtigt.

2) Selektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von $\geq 10\%$

Niedrige Allelfrequenzen gehen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für falsch positive Varianten einher [88]. Daher wurden nur jene Varianten, welche mit einer Allelfrequenz von $\geq 10\%$ nachweisbar waren, für die Untersuchung ausgewählt. Varianten mit einer niedrigeren Frequenz wurden ausgeschlossen.

3) Abgleich aller Varianten im Tumor- und Referenzgewebe mittels IGV

Mit Hilfe des IGV wurden die generierten Datensätze dargestellt und nach visueller

Untersuchung der Basensequenz die Varianten im Tumorgenom mit einer Lage in Intron- bzw. in nicht-kodierenden DNA-Bereichen sowie „stille Mutationen“ aussortiert.

4) Selektion der nicht im Variant Calling aufgerufenen SNPs

Weiterhin konnten durch den visuellen Abgleich von individuellem Referenz- und Tumorgenom im IGV Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), welche nicht durch den Variant Caller aufgerufen worden waren, von somatischen Mutationen unterschieden und ebenfalls herausgefiltert werden.

5) Abgleich der potenziell somatischen Mutationen mit einer SNP-Datenbank

Da in einigen Fällen individuelle SNPs aufgrund der niedrigen Coverage nicht im Variant Calling aufgerufen wurden und auch in der IGV-Darstellung nicht als solche erkennbar waren, mussten die potenziell somatischen Mutationen zum Ausschluss bereits als SNPs bekannter Varianten auf einen Eintrag in der SNP:GeneView-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hin überprüft werden.

6) Zusammenstellung einer finalen Liste potenziell somatischer Mutationen

Für das weitere Vorgehen wurde abschließend ein Register erstellt, welches final nur die potenziellen somatischen Mutationen enthielt, welche mittels Sanger-Sequenzierung überprüft werden sollten.

Tabelle 4 zeigt eine detaillierte Übersicht über die Fälle der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des zuvor beschriebenen Procedere der Eingrenzung und Validierung der gefundenen somatischen Mutationen.

Tabelle 4: Übersicht über die Fälle 1, 2, 3, 4, 6, 7 & 10

Varianten	Fall 1	Fall 2	Fall 3	Fall 4	Fall 6	Fall 7	Fall 10
nach Variant Calling:							
Referenz-DNA	1093	945	1152	937	2909	954	5874
Tumor-DNA	2194	978	1102	910	4920	1047	1150
nur im Tumorgenom nach Abgleich mit Referenz-DNA nachweisbar	1296	91	184	124	3974	250	224
nach Cut-Off VAF* \geq 10 %:	95	51	41	105		129	26
nach Cut-Off VAF \geq 15 %**:					48		
davon SNPs	16	13	9	46	7	69	23
- nicht durch Software aufgerufene SNPs (nach Vgl. von Tumor- & Referenzgewebe)	11	5	3	27	6	68	22
- laut Datenbankabgleich	5	8	6	19	1	1	1
Lage in Introns	51	17	24	44	18	41	2
Lage in nicht-kodierenden Bereichen	6	3	-	-	1	-	-

Varianten	Fall 1	Fall 2	Fall 3	Fall 4	Fall 6	Fall 7	Fall 10
„stille Mutationen“	6	2	2	4	7	7	-
potenziell somatische Mutationen mit Auswirkung auf die Proteinsequenz	16	16	6	11	15	12	1
im Sanger-Sequencing somatische Mutation bestätigt	1	16	4	10	-	12	1
* VAF = Variantenfrequenz ** siehe Kapitel 4.1.5							

4.1.5 Im Sanger-Sequencing verifizierte somatische Mutationen

Für die Verifikation der potenziellen somatischen Mutationen wurde eine Sanger-Sequenzierung mittels PCR mit spezifischen Primern zur Amplifikation der Mutations-tragenden Genregionen durchgeführt (siehe Kap. 3.3.5). Tabelle 5 gibt einen Überblick über die final bestätigten somatischen Mutationen. Die Anordnung richtet sich dabei nach Fallzugehörigkeit sowie ansteigender Allelfrequenz.

Tabelle 5: Übersicht der mittels PCR mit spezifischen Primerpaaren durch Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen

Fall	Gen	Variante	Exon	VAF (%) (tNGS)	Coverage (tNGS)
1	TP53	c.659A>G, p.Y220C	6	15,6	237
2	TPR	c.4274A>T, p.Q1425L	31	10,3	145
	FN1	c.6908G>A, p.R2303H	45	10,6	66
	NSD1	c.5047G>T, p.A1683S	14	13,5	349
	CDK12	c.581A>C, p.H194P	1	14,2	113
	MYD88	c.490G>T, p.D164Y	2	18,6	59
	REL	c.1808T>C, p.M603T	11	25,3	95
	MALT1	c.1076A>G, p.N359S	9	26,6	177
	TP53	c.718A>C, p.S240R	7	27,3	150
	SYNE1	c.10524G>T, p.L3508F	66	28,6	185
	TP53	c.526T>G, p.C176G	5	28,8	80
	KDR	c.2210G>T, p.C737F	15	30,3	132
	PTPRD	c.3167A>G, p.D1056G	30	32,3	99
	AMER1	c.2525A>T, p.E842V	2	39,4	66
	AMER1	c.2527G>C, p.E842V	2	39,4	66
	KDR	c.3686G>A, p.R1229Q	28	43,0	128
ATRX	c.4808G>A, p.Q1603R	17	43,3	30	
3	IRS2	c.2320G>A, p.A774T	1	16,1	341
	ASXL1	c.917G>A, p.S306N	9	16,3	178
	CDK8	c.92C>T, p.T31I	1	19,0	58

Fall	Gen	Variante	Exon	VAF (%) (tNGS)	Coverage (tNGS)
	PKHD1	c.7489G>A, p.G2497R	48	24,7	81
4	CSMD3	c.5470C>G, p.Q1824E	33	27,4	201
	NIN	c.3490C>A, p.Q1164K	18	33,0	403
	KDM5C	c.1720A>T, p.N574Y	12	36,5	203
	EGFR	c.283A>G, p.T95A	3	37,2	113
	EP300	c.3584A>G, p.Q1195R	19	38,2	374
	IGF2R	c.4599T>G, p.S1533R	33	42,4	302
	FN1	c.4036G>C, p.E1346Q	26	44,7	85
	MTOR	c.6712G>T, p.G2238C	48	45,1	235
	LRP1B	c.11402C>G, p.T3801S	75	45,5	165
	TP53	c.490A>T, p.K164*	5	45,9	183
7	ROS1	c.863A>T, p.Q288L	9	10,0	110
	PIK3CA	c.1183G>T, p.D395Y	7	10,0	40
	CREB1	c.749A>G, p.E250R	8	11,3	186
	ADAMTS20	c.3282T>A, p.H1094Q	23	11,4	114
	ATM	c.4533T>A, p.D1511E	30	12,5	416
	TRIM24	c.538G>T, p.V180F	3	13,2	151
	TP53	c.757T>G, p.T253P	7	15,3	236
	EPHB4	c.551G>A, p.C184Y	4	18,5	92
	EPHB4	c.535C>T, p.Q179*	4	19,4	93
	BCL9	c.1151A>C, p.Q384P	8	20,2	124
	CDH2	c.1705A>G, p.N569D	11	22,8	92
	IL6ST	c.2723A>T, p.Q908L	17	31,5	238
10	HRAS	c.182A>G, p.Q61R	3	35,4	130

Für 6 der 10 in die Untersuchung eingeschlossenen Angiosarkome konnte ein tNGS mit anschließender vollständiger Mutationsverifizierung mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt werden (Fall 1, 2, 3, 4, 7 & 10). In 4 Fällen (für Fall 5, 8 & 9 siehe Kap. 4.1.1) war dies nicht möglich, wobei Fall 6 eine Besonderheit darstellte: Für diesen Fall lag nach erfolgreicher Librarypräparation und Panel-Sequenzierung nur eine deutlich unterdurchschnittliche Base Coverage von 20-50x vor. Der Abgleich der Variantenlisten von Tumor- und Referenzgenom ergab 3974 Positionen, welche explizit nur für die Tumorsequenz dargestellt wurden – deutlich mehr als in den anderen Fällen (siehe Tabelle 3). Mit dem Cut-Off bei einer Variantenfrequenz $\geq 10\%$ verblieben 306 Varianten. Unter diesen waren viele SNPs nachweisbar, welche aufgrund der niedrigen Coverage nicht aufgerufen worden waren. Ein Cut-Off bei einer Variantenfrequenz

≥ 15 % grenzte die Anzahl der zu untersuchenden Varianten auf 15 ein. Aufgrund der niedrigen Coverage dieser Varianten Auswahl (Ø 39) wurde zunächst nur für 10 dieser Varianten eine Sanger-Sequenzierung mittels spezifischer Primer durchgeführt. Dabei konnte keine der Varianten verifiziert werden, weshalb auf die Überprüfung der übrigen 5 Varianten verzichtet und der Fall nicht weiter untersucht wurde.

Weiterhin zeigte sich bei der Verifikation, dass eher Varianten als somatische Mutationen bestätigt werden konnten, welche eine relativ hohe Frequenz aufwiesen (VAF ≥ 15 %). Varianten mit niedrigen Variantenfrequenzen (< 15 %) wurden hingegen häufig nicht verifiziert. Insgesamt waren durch PCR mittels spezifischer Primer und Sanger-Sequenzierung 66 % (44/66) der Varianten als somatische Mutation verifizierbar. Dabei wurden im Vergleich Varianten mit einer Frequenz ≥15 % zu 74 % (34/46), Varianten mit einer Frequenz < 15 % nur zu 50 % (10/20) bestätigt.

4.1.6 Übersicht über die verifizierten somatischen Mutationen

Von den für die Verifikation ausgewählten 107 Varianten bzw. potenziellen somatischen Mutationen konnten in der vorliegenden Arbeit abschließend 44 somatische Mutationen in 36 Genen mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Alle stellten Punktmutationen dar: in 42 Varianten war die Folge ein Aminosäurewechsel (Missense-Mutation), bei 2 Varianten ein Stop-Codon (Nonsense-Mutation). Die von Mutationen betroffenen Gene konnten anschließend 9 funktionellen Kategorien zugeordnet werden: Genomische Stabilität, Tyrosinkinasen, Tyrosinkinasen assoziiertes Signaling, NFκB Signaling, Epigenetik, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus, zelluläre Adhäsion und Kernhüllenproteine. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über alle bestätigten somatischen Mutationen unter Berücksichtigung der funktionellen Zuordnung.

Tabelle 6: Vollständige Übersicht aller bestätigter Missense- und Nonsense-Mutationen

Gen	Fall					
	1	2	3	4	7	10
Genomische Stabilität ATM TP53	Y220C	C176G; S240R		K164*	D1511E T253P	
Tyrosinkinasen EGFR EPHB4 IGF2R KDR ROS1		C737F; R1229Q		T95A S1533R	C184Y; Q179* Q288L	

Ergebnisse

Gen	Fall					
	1	2	3	4	7	10
Tyrosinkinasen assoziiertes Signaling HRAS IRS2 MTOR PIK3CA IL6ST PTPRD		D1056G	A774T	G2238C	D395Y Q908L	Q61R
NFκB Signaling MALT1 MYD88 REL		N359S D164Y M603T				
Epigenetik ASXL1 ATRX EP300 KDM5C		Q1603R	S306N	Q1195R N574Y		
Transkriptionsfaktoren BCL9 CREB1 NSD1 TRIM24		A1683S			Q384P E250R V180F	
Zellzyklus CDK8 CDK12 NIN		H194P	T31I	Q1164K		
Zelluläre Adhäsion CDH2 FN1 ADAMTS20		R2303H		E1346Q	N569D H1094Q	
Kernhüllenproteine SYNE1 TPR		L3508F Q1425L				
Nicht kategorisiert CSMD3 FAM123B (AMER1) LRP1B PKHD1		E842V; E843V	G2497R	Q1824E T3801S		

Insgesamt wurden keine rekurrenten Mutationen detektiert. Allerdings zeigten sich rekurrent betroffene Gene: *TP53*-Mutationen waren in 4 der 6 bzw. *FN1*-Mutationen in 2 der 6 vollständig untersuchten Angiosarkome nachweisbar. Außerdem wurden in Fall 2 zwei *KDR*-Mutationen sowie in Fall 7 zwei nah beieinander liegende Punktmutationen in *EPHB4* gefunden. In Fall 10 konnte für das Onkogen *HRAS* eine Hotspot-Mutation detektiert werden.

4.2 Immunhistochemie mittels EphB4-Antikörpern bei Patientenproben

Im Anschluss an die Mutations-Verifikation sollte untersucht werden, welche möglichen Auswirkungen den detektierten somatischen Mutationen zukommen bzw. inwieweit diese für die Tumorphagenese von Angiosarkomen relevant sein könnten.

EphB4 (Ephrin Type-B receptor 4) stellte sich dabei als interessanter Kandidat für eine weiterführende Untersuchung dar: In Fall 7 war es möglich gewesen, zwei dicht hintereinander liegende Mutationen in *EphB4* zu detektieren. So konnten eine Nonsense-Mutation (p.Gln179*; Exon 4) sowie eine Missense-Mutation (p.Cys184Tyr; Exon 4) nachgewiesen werden. Es sollte geklärt werden, ob eine verminderte Expression von EphB4 bzw. Funktionalität möglicherweise eine Relevanz für den Pathogenesemechanismus von Angiosarkomen darstellen könnte.

Folgende Rationale lag der Auswahl von *EphB4* zu Grunde: *EphB4* gehört zur Familie der Eph-Rezeptoren, einer Gruppe von Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche der Aufrechterhaltung von Kompartimentgrenzschichten dienen [89-91]. Die Lokalisation von Eph/Ephrinen in Gewebegrenzschichten ist von besonderer Bedeutung, da eine Geninaktivierung bzw. ein Verlust als Folge einer Stopp-Mutation zur Aufhebung der gerichteten Gewebestruktur führen und möglicherweise so invasives Wachstum von Tumorzellen begünstigen könnte [92-94]. Führen somatische Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen in aller Regel zu einer konstitutionellen Aktivierung, so wären die Eph-Rezeptoren eine der wenigen RTKs, bei welchen einer Gen-Inaktivierung – bedingt durch ihre Lokalisation an Gewebegrenzschichten – eine relevante Folge zukommen würde [95-97]. Bereits für eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten u.a. in Weichgewebesarkomen, ist ein verändertes bzw. erhöhtes Expressionsniveau von EphB4 nachgewiesen worden [98-101]. Allerdings wurden bisher nur Mutationen in *EphB4* beschrieben, welche zur Aktivierung nachfolgender Signalwege führten [102, 103].

Zur weiteren Einordnung der in der vorliegenden Arbeit bestätigten somatischen Mutationen sollte mittels immunhistochemischer Anfärbung und lichtmikroskopischer Einschätzung des Gefäßendothels im Referenzgewebe bzw. der Tumorzellen das EphB4-Expressionsverhalten evaluiert und dessen Expressionsniveau in allen 10 Fällen miteinander verglichen werden. Dabei wurden 2 verschiedene gegen EphB4

gerichtete Antikörper eingesetzt (siehe Kap. 3.4.1).

Bei der Auswertung zeigte sich über alle Fälle hinweg eine fast durchgehend schwache Anfärbbarkeit des Gefäßendothels im Referenzgewebe. Ebenso konnte eine schwache Anfärbbarkeit der Tumorzellen in nahezu allen Fällen beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich Fall 7 (mit den verifizierten EphB4-Mutationen) bezüglich des Expressionsverhaltens von EphB4 nicht von den anderen untersuchten Angiosarkomen (Nr. 1-6; 8-10) unterscheidet bzw. ließ sich keine durch die zwei bestätigten Mutationen verminderte Expression im Vergleich zu den Fällen ohne *EphB4*-Mutation nachweisen.

5. Diskussion

Die Diagnose einer malignen Tumorerkrankung bedeutet noch immer häufig eine infauste Prognose. Daher ist es von entscheidender Bedeutung betroffenen Patienten bessere, d.h. individuell zugeschnittene Therapiekonzepte anbieten zu können. Hierfür ist eine genaue Kenntnis des genetischen Hintergrunds eines Tumors notwendig. Einerseits ist das Wissen über Veränderungen im Tumorgenom ein Schlüsselfaktor für ein besseres Verständnis der Tumorentstehung und Tumorevolution [104]. Andererseits definiert dieses die Bandbreite der therapeutischen Möglichkeiten und bedeutet somit perspektivisch eine Verbesserung von Therapie und Prognose [13].

Dies trifft auch für die Gruppe der Sarkome zu: Italiano et al. konnten beispielsweise explizit für Weichgewebesarkome in 40 % der untersuchten Tumore (n=587) targetierbare Mutationen nachweisen, welche sich zukünftig bei betroffenen Patienten für zielgerichtete Therapieansätze anbieten könnten [105].

5.1 Diskussion von Material und Methoden

Angiosarkome sind sehr seltene Neoplasien. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten steht ihre genetische Erforschung heute noch am Anfang und umfangreiche Untersuchungen zu relevanten Mutationsmustern stehen bislang nur vereinzelt zur Verfügung. Dabei ist – auch im Vergleich zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Untersuchung – bekannt, dass Angiosarkome über äußerst komplexe Genome mit der höchsten Mutationslast unter den Weichgewebesarkomen verfügen [13]. In der Mehrzahl der bisherigen Studien konnten bei vergleichsweise nur kleinen Patientenkollektiven lediglich einzelne charakteristische Veränderungen im Tumorerbgut beschrieben werden. Dabei handelte es sich vorrangig um bereits aus anderen Tumorerkrankungen bekannte Onko- und Tumorsuppressorgene.

Da es sich bei Angiosarkomen um seltene Tumore handelt, die aufgrund der niedrigen Fallzahl über einen längeren Zeitraum gesammelt werden müssen, erfolgt dies im Rahmen der klinischen Arbeit häufig in Form von FFPE-Gewebeproben. Auch bei der hier vorliegenden Untersuchung standen 10 Angiosarkom-Biopsien in Form von FFPE-Gewebeproben zur Verfügung. Da diese allerdings nur bedingt für eine Exomsequenzierung geeignet sind, wurde für die Durchführung ein tNGS-Ansatz gewählt.

FFPE-Proben können als Standard-Ausgangsmaterial für tNGS bei soliden Tumoren angesehen werden [75, 106-109]. Allerdings erfolgte die Archivierung der Patientenproben über einen längeren Zeitraum (siehe Kap. 2.1). Dabei ist bekannt, dass eine langjährige Lagerung in Paraffin zur Beschädigung der DNA führt und Auswirkung auf die Qualität der DNA hat – was gleichzeitig Hinweise auf die Ursachen der aufgetretenen Schwierigkeiten bspw. in Fall 1 und 6 geben könnte [110, 111].

Diskussion der technischen Performance und Datenkonsistenz des tNGS

Von den 10 in die Untersuchung eingeschlossenen Angiosarkomen konnten 6 Fälle vollständig evaluiert werden. Für 4 Fälle war eine Library-Präparation bzw. vollständige Mutationscharakterisierung nicht durchführbar. Dabei waren die Ursachen unterschiedlich (siehe Kap. 4.1.1): Für Fall 5 war es bei zu niedriger DNA-Konzentration aus dem Referenzgewebe nicht möglich eine qualitativ ausreichende Library für das tNGS zu erstellen. In zwei weiteren Fällen war die DNA quantitativ bzw. qualitativ unzureichend: für Fall 8 konnten nur sehr geringe Ausgangskonzentrationen isolierter DNA aus dem Referenzgewebe gewonnen werden. Bei Fall 9 handelte es sich um eine Knochenbiopsie, für welche bereits beim Anlegen der FFPE-Blöcke zur routinemäßigen Diagnostik eine Entkalkung vorgenommen wurde, die eine DNA-Degeneration nach sich zog und die Biopsie für den Einsatz bei dieser Untersuchung disqualifizierte. Für Fall 6 konnte keine ausreichende Coverage (lediglich 39) erreicht werden bzw. ließ die Datenanalyse mittels des standardmäßig eingesetzten Torrent VariantCaller Plugin eine zielführende Mutationsdetektion nicht zu (siehe Kap. 4.1.5).

Die Zuverlässigkeit der mit NGS erhobenen Daten wird maßgeblich von der erreichten Coverage bestimmt [112-114]. Die Coverage beschreibt die durchschnittliche Anzahl des Ablesens eines bestimmten DNA-Abschnitts bzw. Nukleotids. Prinzipiell bedeutet eine höhere Coverage eine zuverlässigere Detektion von Mutationen mit niedrigeren Frequenzen (siehe Kap. 4.1.4). Dabei ist bekannt, dass eine höhere Coverage mit einer niedrigeren Fehlerrate in der Mutationsdetektion einhergeht [86]. So konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass eine niedrigere Coverage mit einer größeren Anzahl falsch positiver Varianten im Variant Calling einhergeht. Es ergaben sich – bedingt durch die verschiedenen Coverages – Unterschiede in der Detektionszuverlässigkeit von Mutationen. So lag die durchschnittliche Coverage zwischen 39 in Fall 6 und 208 in Fall 4. Beispielsweise wurden in Fall 1 bei einer (niedrigen) durchschnittlichen Coverage von 60 1296 Varianten gefunden, an denen Referenz- und Tumorgenom voneinander abwichen. Im Vergleich dazu wurden in Fall 2, bei welchem eine durchschnittliche Coverage von 121 vorlag, nur 91 Varianten mit Tumor-Referenz-Abweichung gefunden. In beiden Fällen wurden 16 Varianten als potenzielle somatische Mutationen herausgefiltert. In Fall 1 wurde nur 1 Mutation verifiziert, hingegen in Fall 2 alle 16 potenziellen somatischen Mutationen in der Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Bezüglich der Zahl der gefundenen Varianten ergab sich ebenso über alle sequenzierten Fälle hinweg ein sehr vielfältiges Bild (siehe Tabelle 4): Die Spannweite reichte von 91 Varianten in Fall 2 bis zu 3974 Varianten in Fall 6. Dabei lassen sich die

Fälle in zwei Gruppen aufteilen, jene mit einer Variantenanzahl zwischen etwa 100-250 (Fall 2, 3, 4, 7 & 10) und jene mit einer stark abweichenden Variantenanzahl (Fall 1 und Fall 6). Tendenziell konnten für die erste Gruppe zuverlässigere Mutationsprofile erstellt werden, was auf Probleme bei den beiden Fällen der zweiten Gruppe hindeutet. Bei den Verifikationshäufigkeiten ergeben sich ebenfalls sehr divergente Werte, die von 6 % (1/16, Fall 1) bis 100 % (16/16, Fall 2 & 2/12, Fall 7) reichten. Dabei ist erkennbar, dass vorrangig jene Varianten nicht mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert werden konnten, welche niedrige VAFs aufwiesen (siehe Kap. 4.1.5).

5.2 Einordnung der Mutationen

Mutationen im Genom sind häufig, doch nicht alle tragen zur Entstehung von Tumoren bei. Daher ist es wichtig, individuell die Bedeutung einzelner somatischer Mutationen für die Onkogenese zu klären [115]. Grundsätzlich werden zwei Formen von Mutationen hinsichtlich Relevanz für die Tumorentstehung unterschieden: sog. Treibermutationen (driver mutations) und Begleitmutationen (passenger mutations). Als Treibermutationen werden somatische Mutationen bezeichnet, die einen selektiven Wachstumsvorteil für die Tumorzelle bedeuten und die Tumorentstehung fördern. Begleitmutationen hingegen besitzen diese Eigenschaften nicht [54, 116]. Die Charakterisierung und Bewertung einzelner Mutationen bzw. die Identifizierung von Treibermutationen stellt dabei eine besondere Herausforderungen dar [117]. Dennoch lassen sich zu den verschiedenen Typen von Mutationen unterschiedliche Aussagen treffen bzw. werden diese unterschiedlich bewertet: Sowohl Baseninsertionen und Basendeletionen (Indels) die zu einem Frameshift führen, als auch Nonsense-Mutationen, bei denen durch Änderung der Basensequenz ein Stopcodon resultiert, besitzen in Tumorsuppressorgenen (wie bspw. *TP53*) mit großer Wahrscheinlichkeit das Potenzial von Treibermutationen, da sie maßgeblich einen Funktionsverlust bzw. eine Funktionseinschränkung des betroffenen Gens verursachen können. Deutlich schwieriger hingegen sind Missense-Mutationen in ihrer Relevanz für die Tumorgenese einzuordnen [118].

Es ist bekannt, dass von Mutationen schwerpunktmäßig betroffene Genabschnitte (Mutations-Hotspots) sowohl in Onkogenen als auch in Tumorsuppressorgenen vorkommen, wobei es sich gleichzeitig häufig bei Treibermutationen um Hotspot-Mutationen handelt [116, 119, 120]. Diese Hotspots finden sich vorrangig in Onkogenen, wo sie zur Genaktivierung und so zu einem onkogenetischen Funktionszugewinn führen [118, 121, 122]. Treibermutationen in Tumorsuppressorgenen führen hingegen in der Regel zu einer Geninaktivierung. Im Einzelfall ist es allerdings häufig nur durch Datenbankabgleich, statistische Berech-

nungen oder den Einsatz von computerbasierten Algorithmissystemen möglich, eine Aussage hinsichtlich des Status als Treiber- oder Begleitmutation treffen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine rekurrenten somatischen Mutationen detektiert werden. Allerdings war es möglich, somatische Mutationen in mehrfach betroffenen Genen nachzuweisen: *TP53*-Mutationen lagen in 4 der 6 bzw. *FN1*-Mutationen in 2 der 6 sequenzierten Angiosarkome vor. Des Weiteren wurden in fast allen Fällen somatische Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) oder Genen der RTK-assoziierten Signaltransduktion gefunden.

5.2.1 Genomische Instabilität durch Gen-Mutationen in TP53

TP53 ist ein wichtiger Garant genomischer Stabilität. Dabei beschreibt die genomische Stabilität die Fähigkeit einer Zelle, während Replikations- und Wachstumsprozessen die Integrität des Erbguts zu gewährleisten, spontan aufgetretene genetische Veränderungen zu erkennen, zu reparieren und fehlerhafte Zellen auszusortieren [123]. Genomische Instabilität hingegen ist nicht nur Charakteristikum eines Tumors sondern auch selbst treibende Kraft der Tumorphogenese [124, 125]. Bedingt durch Schäden in der DNA, Defekte in DNA-Reparaturmechanismen oder fehlende Intervention Zell-Zyklus-kontrollierender Gene kommt es zur Akkumulation genetischer Veränderungen in kritischen Genen und so zur Transformation normaler in präkanzerogene Zellen, aus denen sich im Verlauf Tumorzellen entwickeln können [126].

Für die Gruppe funktionell genomstabilisierender Gene wurde mit Hilfe des tNGS in zwei der im AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel abgedeckten Gene Mutationen gefunden. Betroffen waren *ATM* und *TP53* (siehe Kap. 4.1.6). Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei die im Tumorsuppressorgen *TP53* verifizierten somatischen Mutationen zu sein: insgesamt konnten 5 somatische Mutationen unabhängig voneinander im *TP53*-Gen nachgewiesen werden, die sich auf 4 der 6 untersuchten Angiosarkome (Fall 1, 2, 4 & 7) verteilten – wobei in Fall 2 sogar zwei *TP53*-Mutationen vorlagen. Alle *TP53*-Mutationen befanden sich an verschiedenen Loci und sind in der COSMIC-Datenbank bereits vielfach in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen worden. 3 dieser Mutationen waren in Hotspot-Bereichen zu finden; p.Y220C (Fall 1) und p.C176G (Fall 2) können sogar den 30 am häufigsten somatischen Punktmutationen in *TP53* zugeordnet werden [127-129].

TP53 (tumor protein 53) ist ein wichtiger Vertreter für Kontrollgene der genomischen Stabilität, da es bei erkannter DNA-Schädigung entweder einen Stopp des Zellzyklus für die DNA-Reparatur ermöglicht oder die Apoptose der betroffenen Zelle einleitet [130-132]. Das p53-Gen ist eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene und gleichzeitig das am häufigsten veränderte Gen in malignen Tumoren; eine

fehlerhafte Funktion des TP53-Signalwegs ist für die Mehrzahl aller Tumore bekannt [133-138]. Mutationen in *TP53* können sowohl zu einem loss-of-wild-type function (LOF), der eine Funktionseinschränkung bzw. einen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens bedeutet, führen, als auch zu einem gain-of-function i.S. eines onkogenetischen Funktionszugewinn gegenüber dem p53-Wildtyp [139-143]. Die Mutationen in *TP53* liegen gewöhnlich im Bereich der DNA-Bindungsdomäne zwischen den Codons 102-292 – was auch auf die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Varianten zutrif.

Auch in Weichgewebesarkomen können *TP53*-Mutationen häufig nachgewiesen werden. Laut der COSMIC-Datenbank liegen in ca. 25 % (28/106) der dort aufgeführten Angiosarkome somatische Mutationen in *TP53* vor: Murali et al. zeigten in einer tNGS-Studie mit 34 Angiosarkomen *TP53*-Mutationen für 35 % (12/34) der Fälle [42]. Hung et al. zeigten für 13,5 % bzw. 11,5 % (4/8) der eingeschlossenen Angiosarkome *TP53*-Mutationen [144]. Italiano et al. ermittelten hingegen nur in 4 % (2/52) der analysierten Angiosarkome Mutationen in *TP53* [41]. Dennoch wird angenommen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit somatische Mutationen in *TP53* maßgeblich an der Genese von Angiosarkomen beteiligt sind [145].

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Mutationen bzw. der Nachweis von Missense-Mutationen in 4 von 6 Fällen auf dem *TP53*-Gen stützt ebenfalls die Annahme, dass auch in der Angiosarkomgenese *TP53*-Mutationen eine besondere Bedeutung zukommt.

Bewertung der einzelnen gefundenen *TP53*-Mutationen

Die Unterscheidung zwischen Treiber- und Begleitmutationen ist trotz umfangreicher Sequenzierungsstudien noch immer eine große Herausforderung [146]. Um dennoch Vorhersagen bzgl. funktioneller Effekte von Missense-Mutationen treffen zu können, wurden Algorithmen-basierte Analysetools wie der Functional Analysis Through Hidden Markov Models-(FATHMM-)Score entwickelt [147, 148]. Der FATHMM-Score gilt als etablierte Methode zur Einordnung der funktionellen Relevanz somatischer Mutationen (sog. mutation impact) und wird ebenfalls von der COSMIC-Datenbank verwendet um mittels p-Wert-Bestimmung eine Vorhersagbarkeit bzgl. der Bedeutung einer Mutation (sog. FATHMM prediction) treffen zu können. Über ein Onlinetool (<http://www.fathmm.biocompute.org.uk/>) ist es möglich für die gefundenen Mutationen eine Aussage darüber zu erhalten, ob es sich möglicherweise um Krebs-assoziierte Treiber- oder Begleitmutationen handelt. Als Grenzwert zur Unterscheidung (sog. prediction threshold) zwischen einer wahrscheinlichen Treiber- bzw. Nicht-Treibermutation wird ein FATHMM-Score von $<-0,75$ angenommen, welchem eine Sensitivität von >92 % für

Treibermutationen zugerechnet wird [149]. Die Zuverlässigkeit und Aussagekraft dieses Scores bzw. ähnlicher anderer Analysetools ist allerdings umstritten.

Interessant ist nach Anwendung des FATHMM-Scores dennoch, dass nach diesem alle in der vorliegenden Arbeit detektierten *TP53*-Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Potenzial von Treibermutationen besitzen. Die einzelnen *TP53*-Mutationen können dennoch unterschiedlich eingeordnet werden:

Die in Fall 1 detektierte Variante p.Y220C ist die acht- bzw. neunthäufigste Missense-Mutation in *TP53*, welche funktionell zu einer Destabilisierung des p53-Proteins führt [127, 150-152]. Laut der COSMIC-Datenbank wurde p.Y220C bereits in über 350 Tumoren unterschiedlicher Entität nachgewiesen.

Auch der in Fall 2 detektierten *TP53*-Mutation p.C176G könnte das Potenzial einer Treibermutation zukommen. In COSMIC ist p.C176G für (bisher) 11 Tumore verzeichnet; im *TP53*-Codon 176 insgesamt wurden sogar schon mehr als 400x Missense-Mutationen (u.a. p.C176Y, p.C176F) gefunden. Seki et al. wiesen in ihrer WES-Studie p.C176G u.a. auch in einem Rhabdomyosarkom (1/60) nach [153].

Die ebenfalls in Fall 2 gefundene Missense-Mutation p.S240R könnte eine mögliche Treibermutation darstellen und wird in der COSMIC-Datenbank mehrfach aufgeführt [154, 155].

In Fall 4 konnte die Nonsense-Mutation p.K164* nachgewiesen werden, die ebenfalls bereits mehrfach in der COSMIC-Datenbank beschrieben worden ist. K164 fungiert als ein Hauptacetylierungsbereich in p53 und ist relevant für den Zellzyklusarrest [156].

Die in Fall 7 bestätigten Missense-Mutation p.T253P wurde ebenso bereits mehrfach in COSMIC beschrieben und könnte den Status einer potenziellen Treibermutation tragen.

5.2.2 Bedeutung somatischer Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) bilden eine Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren für eine Vielzahl extrazellulärer Moleküle. Sie besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der intrazellulären Signaltransduktion, wobei sie maßgeblich in die Zellproliferation und -differenzierung, das Zellüberleben und die Zellmigration involviert sind [157]. Für die Tumorgenese und Tumorprogression spielen Veränderungen und Mutationen in RTKs eine übergeordnete Rolle [158-160].

Mittels tNGS konnten in der vorliegenden Arbeit in 3 der untersuchten Angiosarkome Mutationen in RTKs ermittelt werden. Konkret wurden diese in den (Proto-)Onkogenen *EGFR*, *KDR*, *ROS1* und den (möglichen) Tumorsuppressorgenen *EPHB4* und *IGF2R* nachgewiesen (siehe Kap. 4.1.6).

Die detektierten somatischen Mutationen in Genen der Gruppe der RTKs lassen sich unterschiedlich einordnen. Allerdings handelt es sich bei keiner der nachgewiesenen Mutationen um Hotspot-Mutationen und mit Ausnahme der gefundenen Missense-Mutationen in *KDR* wurde bislang noch keine der verifizierten somatischen Mutationen in der COSMIC-Datenbank beschrieben.

KDR (Kinase insert domain receptor) ist ein bekanntes Onkogen. Es kodiert für VEGFR2, einen von drei VEGF-Rezeptoren, wobei sein Ligand VEGF als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Endothelzellproliferation, dem Zellüberleben und der Zellmigration dient [161-163]. Mutationen in *KDR* in Angiosarkomen sind relativ häufig und rekurrente Mutationen wurden in 7-10 % (n=8/113 bzw. n=4/39) der untersuchten Angiosarkome beschrieben [164, 165]. Kunze et al. aus dem Gießener Institut für Pathologie wiesen für die Subentität der kardialen Angiosarkome u.a. *KDR*-Mutationen in 2 Fällen nach: p.R720W, sowie p.T771K [43]. In der vorliegenden Arbeit konnten in Fall 2 ebenfalls zwei Missense-Mutationen in *KDR* detektiert werden (p.C737F und p.R1229Q), welche schon zuvor beschrieben wurden (Vgl. COSMIC). Damit bestätigt sich Exon 15 auch als ein möglicher für die Angiosarkomgenese relevanter Genabschnitt. Die beiden gefundenen Varianten liegen allerdings nicht im Bereich der Kinase-Domäne von VEGFR2, in welchem aktivierende Mutationen in RTKs häufig zu finden sind [166].

Die gefundene Missense-Mutation p.Q288L in *ROS1* (ROS proto-oncogene 1) wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Auch hier liegt die gefundene Mutation nicht im Bereich der Kinase-Domäne (Vgl. UniProt) [167].

EphB4 (Ephrin Type-B receptor 4) könnte nach Stand der gegenwärtigen Forschung ein Tumorsuppressorgen darstellen. Funktionell besteht eine paradoxe Wirkung in Bezug auf eine mögliche Involvierung in die Tumorgenese. In unterschiedlichen zellulären Kontexten konnte einerseits eine Tumorsuppressor-Aktivität und andererseits tumorsupportives Verhalten gezeigt werden [94, 101, 168-170]. Die zwei detektierten Mutationen (p.C184Y; p.Q179*) wurden bisher zwar noch nicht dokumentiert. Dennoch könnte einem durch eine Nonsense-Mutation bedingtem Loss-of-function eine direkt Involvierung im Sinne eines Tumorsuppressorgens in die Tumorgenese zukommen.

Die Mutationen in den beiden übrigen RTKs wurden noch nicht beschrieben:

Die detektierte Missense-Mutation in *EGFR* (epidermal growth factor receptor) p.T95A ist am wahrscheinlichsten eine weitere Begleitmutation. Zwar wird *EGFR* den Onkogenen zugerechnet und bereits häufig konnten Punktmutationen in *EGFR* in Sarkomen beschrieben werden, doch deutet die fehlende Lage in einem Hotspot-Bereich hin zu dieser Annahme.

Die funktionelle Relevanz einzelner Punktmutationen in *IGF2R* (Insulin like growth factor 2 receptor) ist bislang weitgehend unbekannt. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Missense-Mutation p.S1533R ist in COSMIC ebenfalls noch nicht beschrieben worden.

5.2.3 Veränderungen in Genen der RTK-assoziierten Signaltransduktion

Veränderungen in den Signalwegen können zu einem veränderten Zellverhalten führen, welches den Tumor definiert und spezifisch charakterisiert [116, 171]. Dabei kann die Tumorgenese als Fehlfunktion der bestehenden Signal-Netzwerke verstanden werden [172]. Mutationen können zu einer Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene und so zu einer Hyperaktivierung ihrer Signalwege führen. Ebenso können Mutationen eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verursachen und dadurch eine Inaktivierung der Signalaktivität bedingen [173].

In der vorliegenden Arbeit wurden 6 Mutationen in Genen des RTK-assoziierten Signalings gefunden, welche allerdings individuell unterschiedlich zu beurteilen sind.

In Fall 10 wurde mit p.Q61R eine somatische Mutation in *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) detektiert, für die eine Lage in einem Mutations-Hotspot bestimmt werden konnte. *HRAS*, ein häufig mutiertes Protoonkogen, besitzt signifikante Mutations-Hotspots in Codon 12 (50 %), Codon 13 und Codon 61 (40 %) [174-176]. Bezüglich der Relevanz bei Angiosarkomen wiesen Murali et al. in 12 % (4/34) der untersuchten Angiosarkome Mutationen in *HRAS* nach: 2x A59T, sowie 2x Q61L [42]. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Mutation p.Q61R wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben und dieser der Status einer aktivierenden Mutation zugeordnet [177, 178].

Sowohl die Protein-Kinase *MTOR* (mechanistic target of rapamycin) als auch die Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Untereinheit *PIK3CA* (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase catalytic subunit alpha) sind funktionell Teil des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs, in welchem sie durch ihre zentrale Position in verschiedene intrazelluläre Prozesse, u.a. den Zellzyklus, Apoptose und Prozesse der Angiogenese involviert sind [179-185]. *PIK3CA* gehört zu den am häufigsten mutierten Onkogenen bei Tumorerkrankungen [186-188]. Je et al. wiesen in ihrer Studie u.a. in 1 von 6 untersuchten Angiosarkomen eine *PIK3CA*-Punktmutation (P539S, Exon 9) nach [189]. Die in der vorliegenden Arbeit bestätigten somatischen Mutationen in *mTOR* und *PIK3CA* p.G2238C bzw. p.D395Y sind noch nicht in der COSMIC-Datenbank hinterlegt.

Weiterhin wurden drei weitere somatische Mutationen verifiziert:

PTPRD (Protein tyrosine phosphatase receptor type D) kodiert für eine Tyrosin-Phosphatase und wirkt als Tumorsuppressorgen [190-194]. Die in Fall 2 detektierte

somatische Mutation p.D1056G in *PTPRD* ist bislang noch nicht in der COSMIC-Datenbank verzeichnet.

In *IRS2* (insulin receptor substrate 2), einem intrazellulären Signalmolekül, konnte in Fall 3 mit p.A774T eine weitere Punktmutation verifiziert werden, bei welcher es sich möglicherweise um eine Begleitmutation handelt [195, 196]. Die detektierte Missense-Mutation p.A774T stellt laut COSMIC eine neue, noch nicht beschriebene Variante der Basensequenz innerhalb dieses Gens dar.

Die in Fall 7 detektierte Missense-Mutation p.Q908L in *IL6ST* (interleukin 6 signal transducer; gp130) ist in COSMIC ebenfalls noch nicht beschrieben worden. *IL6ST* kodiert für ein Transmembranprotein und wirkt als Signaltransduktions-Molekül, wobei es eine Aktivierung u.a. über den JAK-STAT-Signalweg von Janus Kinasen (JAKs) und STAT-Proteinen vermittelt [197-200].

5.2.4 Bewertung weiterer verifizierter somatischer Mutationen

Neben den verifizierten somatischen Mutationen, welche den funktionellen Kategorien der Genomischen Stabilität, den RTKs bzw. der RTK-assoziierten Signaltransduktion zuzuordnen waren, konnten weitere 25 Missense-Mutationen mittels PCR und spezifischen Primerpaaren im Sanger-Sequencing bestätigt werden. Diese verteilten sich auf 4 der 6 untersuchten Angiosarkome.

Mit Ausnahme von *FN1*, welches für das Glykoprotein Fibronectin kodiert, das in verschiedene Prozesse der Zellmigration und -adhesion (u.a. Metastasierung) involviert ist, war kein weiteres Gen rekurrent durch somatische Mutationen betroffen. Für beide in *FN1* gefundenen Mutationsloci (p.R2303H, Fall 2; p.E1346Q, Fall 4) sind bereits Varianten in der COSMIC-Datenbank in anderen Tumorentitäten dokumentiert worden. Trotzdem lässt sich der Status von *FN1* als Onkogen (noch) nicht bestätigen.

Alle weiteren somatischen Mutationen wurden bislang noch nicht beschrieben – mit Ausnahme von *SYNE 1*, *ATRX* und *PKHD1*, für welche die detektierten Varianten (p.L3508F, p.Q1603R bzw. p.G2497R) bereits in einem Ovarialkarzinom, einem niedriggradigen Gliom bzw. einem Melanom beschrieben werden konnten. Zu den übrigen verifizierten somatischen Mutationen kann keine Aussage getroffen werden.

5.3 Fazit und Perspektiven

Der Einsatz molekularbiologischer Sequenzierungsmethoden hat längst Einzug in die klinische Onkologie gehalten. Mit ihrer Hilfe konnten grundlegende pathophysiologische Prozesse und Wege der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten geklärt werden. Neuen (zielgerichteten) Therapiestrategien wurde nicht zuletzt durch den Einsatz des next generation sequencings die Tür geöffnet. Spezifisch für Sarkome konnte der Nutzen dieses methodischen Ansatzes in den vergangenen Jahren ebenfalls mit interessanten Studien bestätigt werden, auch wenn der therapeutische Nutzen der Forschungsergebnisse für diese Gruppe von Erkrankungen noch begrenzt ist. Für die 6 vollständig evaluierten Neoplasien konnten 44 Mutationen detektiert werden, die auf 36 Genen verteilt vorlagen. *TP53* war dabei mit 5 bestätigten Mutationen in 4 Fällen das am häufigsten von somatischen Mutationen betroffene Gen. Weiterhin waren in fast allen untersuchten Fällen RTKs bzw. Gene der RTK-assoziierten Signaltransduktion von somatischen Mutationen betroffen. Gleichzeitig konnte in *HRAS* eine somatische Mutation in einem Hotspot-Bereich nachgewiesen werden.

Weitere umfangreiche Sequenzierungsstudien mit möglichst großen Patientenkollektiven werden in der Zukunft möglicherweise Subgruppen mit spezifischen Mutationsprofilen definieren können. Dabei scheint es für das Studiendesign wichtig, Angiosarkome einzelner gemeinsamer Primärlokalisationen miteinander zu vergleichen. Denn wie bereits gezeigt wurde, sind unterschiedliche Risikofaktoren für spezifische Subgruppen charakteristisch. Möglicherweise wären so zielsicherer wiederkehrende Mutationsmuster innerhalb der Tumorgruppe detektierbar und könnten Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien liefern. Es bleibt abzuwarten, in welcher Form sich die medikamentöse Therapie von Angiosarkomen unter Berücksichtigung des individuellen Tumorprofils in den kommenden Jahren verändern wird.

Zusammenfassung

Angiosarkome sind eine Gruppe seltener hochmaligner Neoplasien, die ihren Krankheitsursprung in endothelialen Strukturen des Blut- und Lymphsystems haben. Molekulare Veränderungen in Tumorsuppressor- und Onkogenen werden als krankheitsursächlich diskutiert. Aufgrund der niedrigen Prävalenz sind umfassende molekularbiologische Charakterisierungsstudien schwierig durchzuführen. In der Folge fehlt es an spezifischen und effektiven Behandlungsstrategien. Damit einhergehend ist, abhängig vom Erkrankungsstadium bei Erstdiagnose, die Prognose der Patienten schlecht.

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe eines breitgewählten Panel-basierten Sequenzierungsansatzes (409 als Tumorpathogenese-relevant einzustufende Gene) eine umfassende molekulargenetische Charakterisierung von 10 Angiosarkomen unterschiedlicher Primärlokalisierung.

Zusammenfassend wurden in 36 der 409 untersuchten Gene insgesamt 44 somatische Mutationen detektiert. Dabei handelte es sich ausschließlich um Missense- und Nonsense-Mutationen. Das am häufigsten in den untersuchten Angiosarkomen mutierte Gen war TP53. Weiterhin fanden sich gehäuft somatische Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) oder Genen der RTK-assoziierten Signaltransduktion. Es wurden keine rekurrenten Mutationen gefunden.

Neben der Mutationsanalyse erfolgte außerdem eine immunhistochemische Analyse des Expressionsprofils von EPHB4, wobei sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Angiosarkomen zeigten.

Zusammenfassend sind typische bekannte Tumorsuppressor- und Onkogene auch in Angiosarkomen von Mutationen betroffen. Welche Bedeutung diesen molekularen Veränderungen hinsichtlich Tumorevolution und Krankheitsprogression zukommt, kann hinsichtlich des hier gewählten Ansatzes nicht beantwortet werden. Dazu ist eine breiter angelegte molekularbiologische Analyse mittels Whole-Exome- bzw. Whole-Genome-Sequencing größerer Patientenkollektive unumgänglich, um neue pathophysiologisch relevante Mechanismen zu detektieren, aus denen therapeutische Implikationen abgeleitet werden können.

Summary

Angiosarcomas are a group of rare malignant tumors originate from endothelial structures of the blood and lymphatic system. Molecular changes in tumor suppressor genes and oncogenes are hold responsible for the inception of the disease. Due to the low prevalence broad studies to characterize their molecular background are difficult to conduct. Hence specific and effective strategies treating the disease are still missing and the prognosis for affected patients is – depending of the status while initial diagnosis – poor.

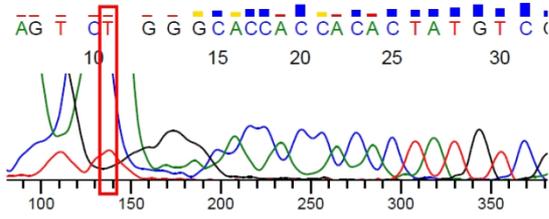
In the present study a comprehensive molecular genetic characterization of 10 angiosarcomas of different primary location was performed using a panel-based sequencing approach comprising 409 genes which are highly presumably involved in tumor pathogenesis. In the process 44 mutations in 36 of 409 investigated genes were detected. All of them appeared as missense or nonsense mutations. *TP53* was the most mutated gene in the present study. Moreover somatic mutations in receptor tyrosine kinases or associated genes were found several times. Recurrent mutations could not be confirmed.

Besides the analysis of the mutation profile an immunohistochemical analysis was conducted to examine the expression pattern of EPHB4, while differences between solitary angiosarcomas were not been detected.

In summary this study could point out that typically with cancer associated tumor suppressor and oncogene are also affected by somatic mutations in angiosarcomas. The meaning of these molecular changes in terms of tumor evolution and progress of the disease cannot be resolved in regard to the chosen method. Therefore further investigations including larger cohorts using whole exome or whole genome sequencing approaches will be necessary in the future to find pathophysiological mechanisms to invent new therapeutic strategies.

Anhang

1_TP53_T_US



1_TP53_T_LS

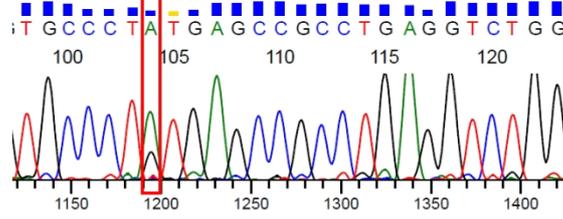
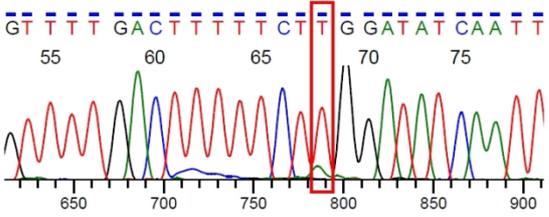


Abbildung 8: Mutationsbestätigung TP53, Fall 1

2_TPR_T_US



2_TPR_T_LS

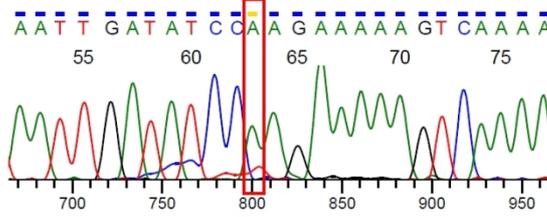
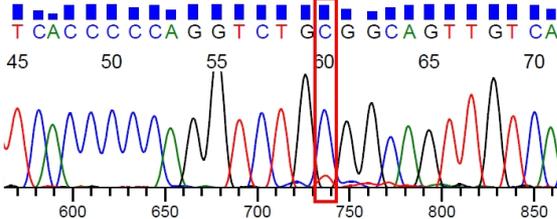


Abbildung 9: Mutationsbestätigung TPR, Fall 2

2_FN1_T_US



2_FN1_T_LS

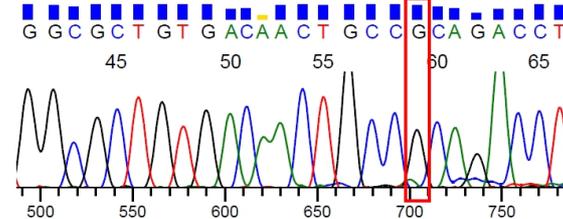
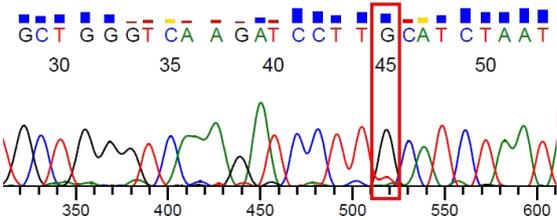


Abbildung 10: Mutationsbestätigung FN1, Fall 2

2_NSD1_T_US



2_NSD1_T_LS

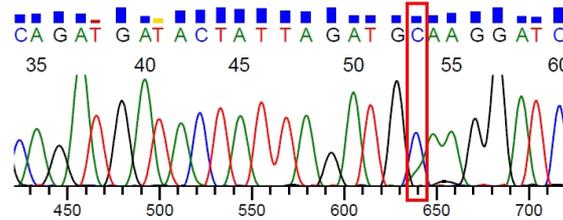
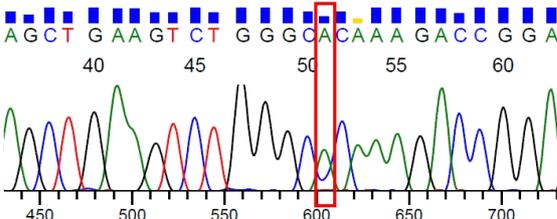


Abbildung 11: Mutationsbestätigung NSD1, Fall 2

2_CDK12_T_US



2_CDK12_T_LS

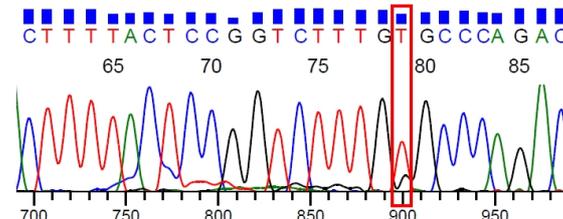
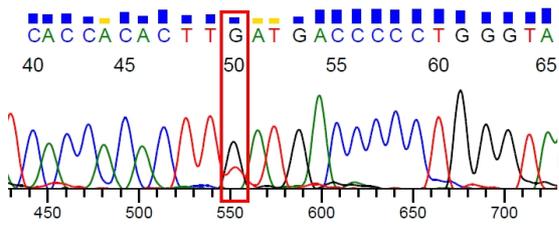


Abbildung 12: Mutationsbestätigung CDK12, Fall 2

2_MYD88_T_US



2_MYD88_T_LS

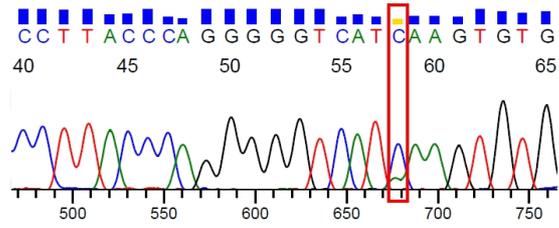
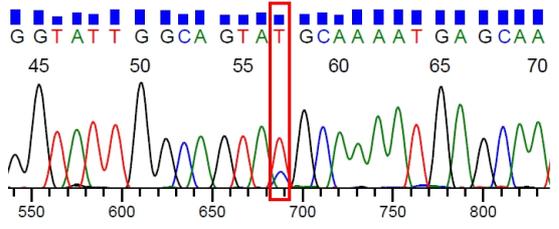


Abbildung 13: Mutationsbestätigung MYD88, Fall 2

2_REL_T_US



2_REL_T_LS

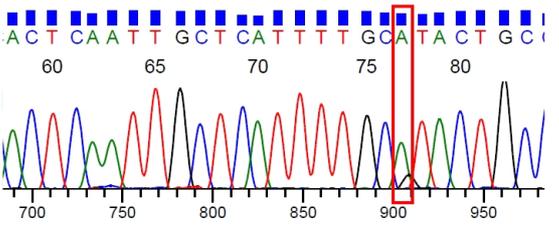
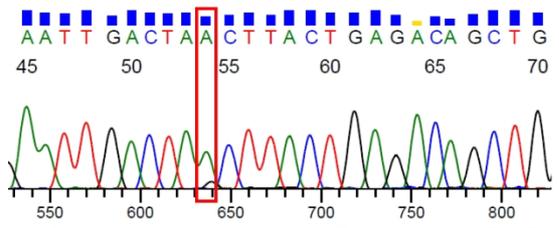


Abbildung 14: Mutationsbestätigung REL, Fall 2

2_MALT1_T_US



2_MALT1_T_LS

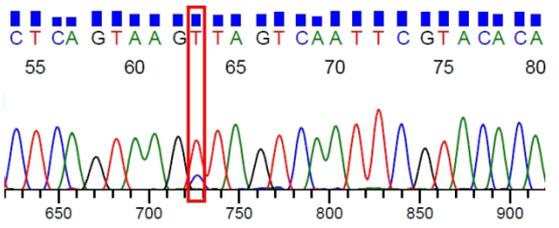
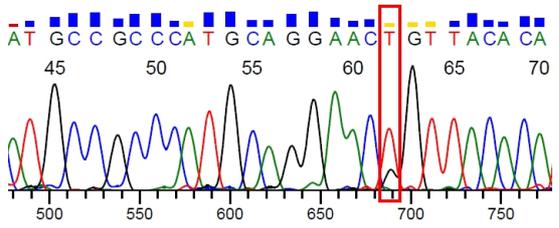


Abbildung 15: Mutationsbestätigung MALT1, Fall 2

2_TP53ex7_T_US



2_TP53ex7_T_LS

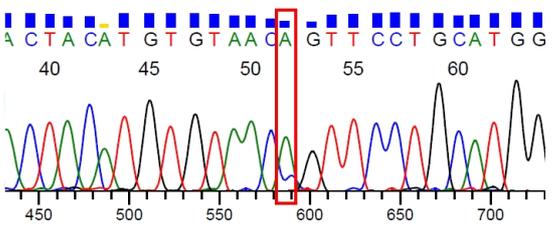
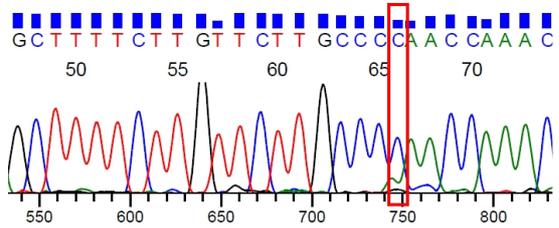


Abbildung 16: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 2

2_SYNE1_T_US



2_SYNE1_T_LS

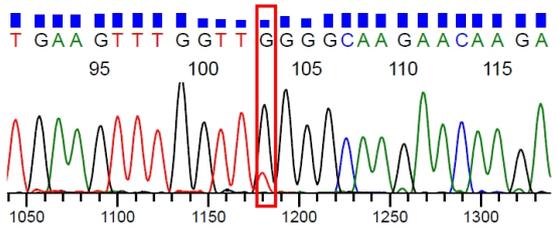
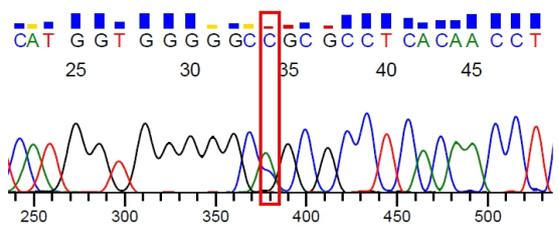


Abbildung 17: Mutationsbestätigung SYNE1, Fall 2

2_TP53ex5_T_US



2_TP53ex5_T_LS

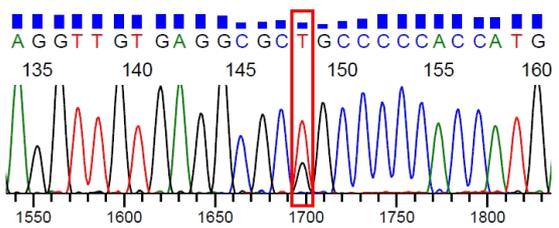
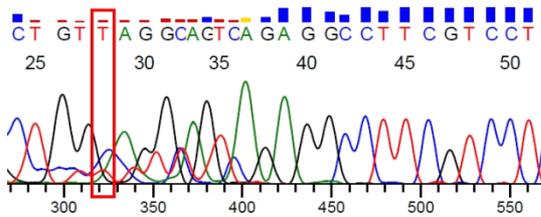


Abbildung 18: Mutationsbestätigung TP53ex5, Fall 2

2_KDRex15_T_US



2_KDRex15_T_LS

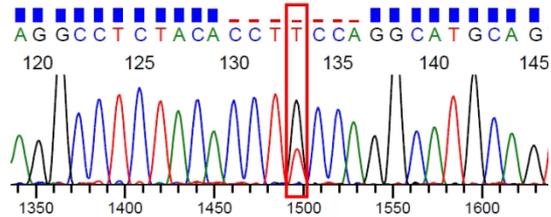
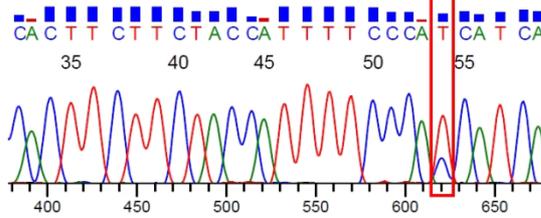


Abbildung 19: Mutationsbestätigung KDRex15, Fall 2

2_PTPRD_T_US



2_PTPRD_T_LS

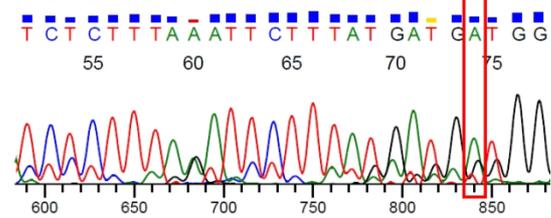
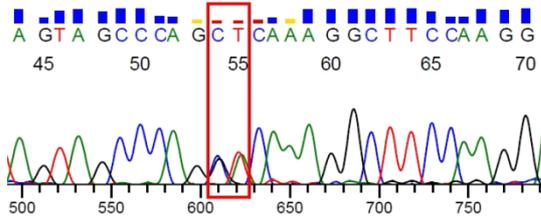


Abbildung 20: Mutationsbestätigung PTPRD, Fall 2

2_FAM123B_T_US



2_FAM123B_T_LS

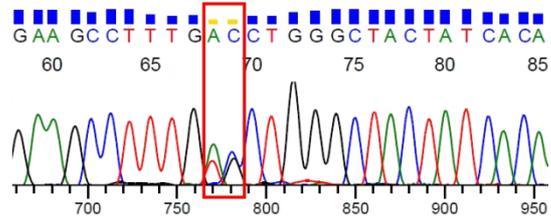
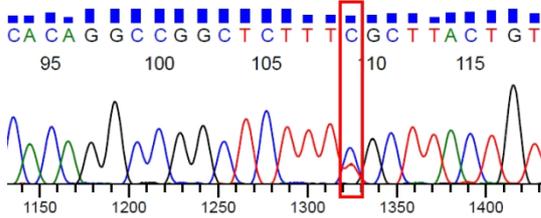


Abbildung 21: Mutationsbestätigung MALT1, Fall 2

2_KDRex28_T_US



2_KDRex28_T_LS

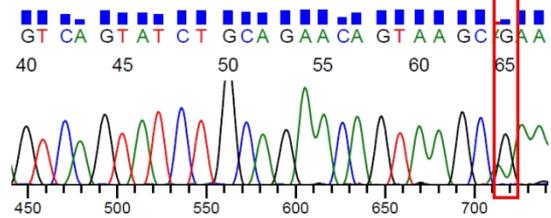
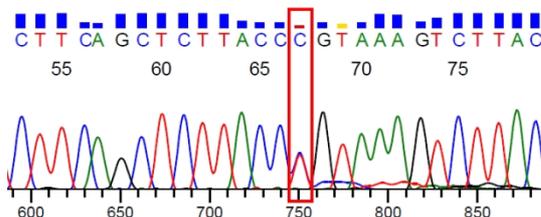


Abbildung 22: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 2

2_ATRX_T_US



2_ATRX_T_LS

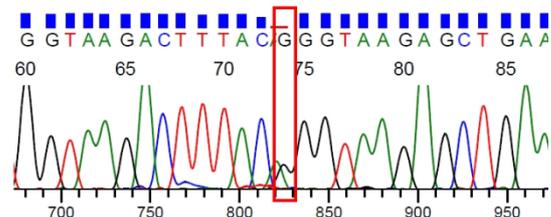
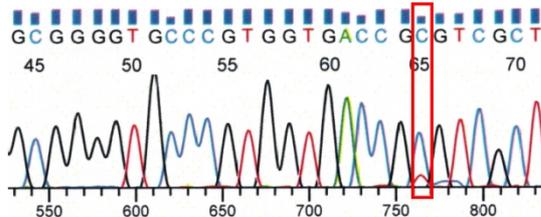


Abbildung 23: Mutationsbestätigung SYNE1, Fall 2

3_IRS2_T_US



3_IRS2_T_LS

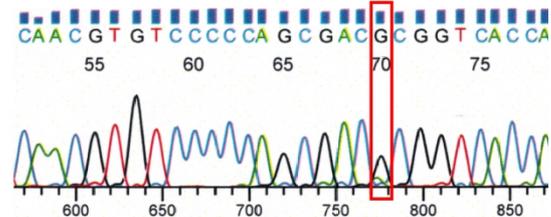
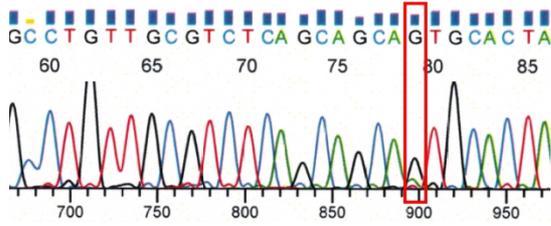


Abbildung 24: Mutationsbestätigung IRS2, Fall 3

3_ASXL1_T_US



3_ASXL1_T_LS

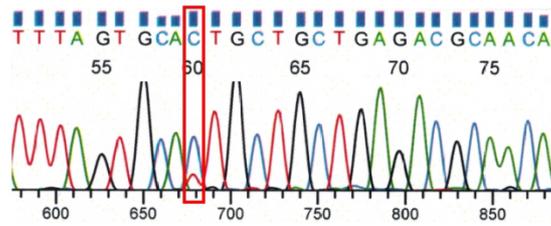
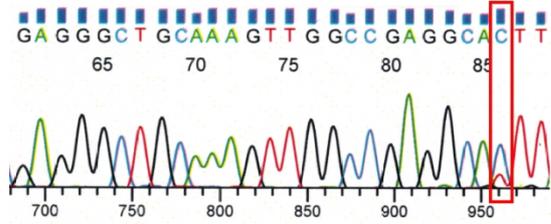


Abbildung 25: Mutationsbestätigung ASXL1, Fall 3

3_CDK8_T_US



3_CDK8_T_LS

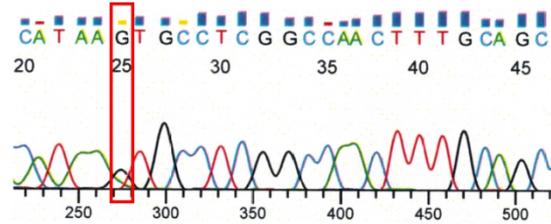
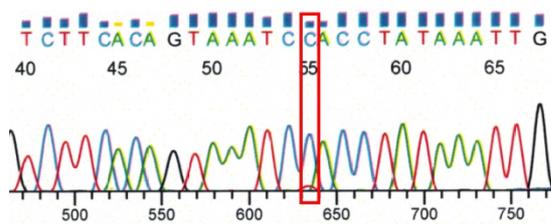


Abbildung 26: Mutationsbestätigung CDK8, Fall 3

3_PKHD1_T_US



3_PKHD1_T_LS

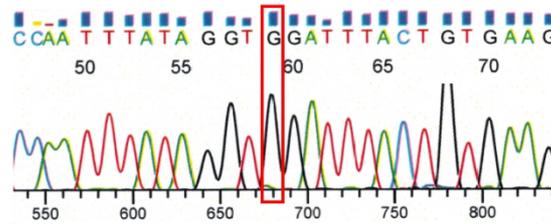
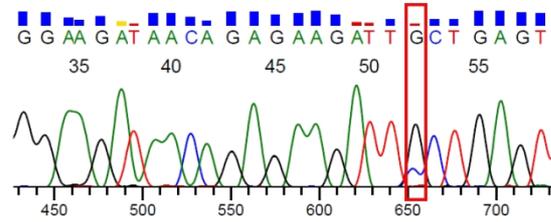


Abbildung 27: Mutationsbestätigung PKHD1, Fall 3

4_CSMD3_T_US



4_CSMD3_T_LS

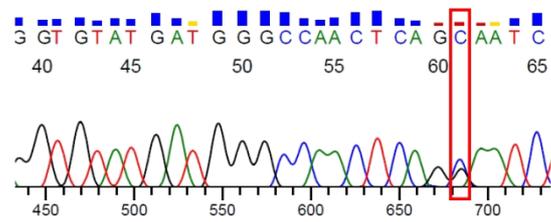
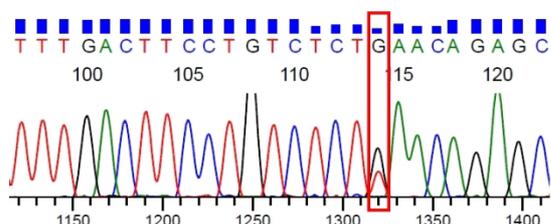


Abbildung 28: Mutationsbestätigung CSMD3, Fall 4

4_NIN_T_US



4_NIN_T_LS

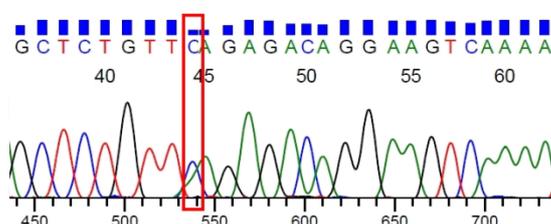
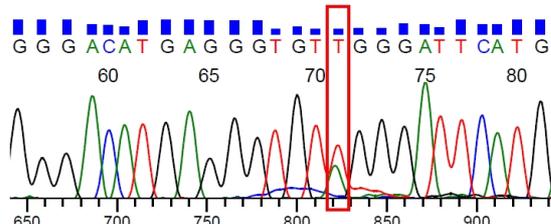


Abbildung 29: Mutationsbestätigung NIN, Fall 4

4_KDM5C_T_US



4_KDM5C_T_LS

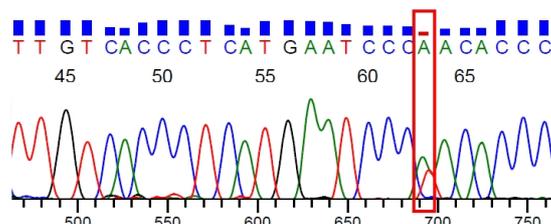


Abbildung 30: Mutationsbestätigung KDM5C, Fall 4

4_EGFR_T_US

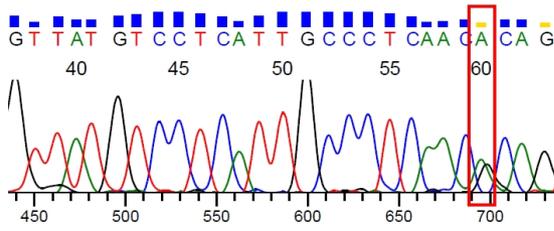
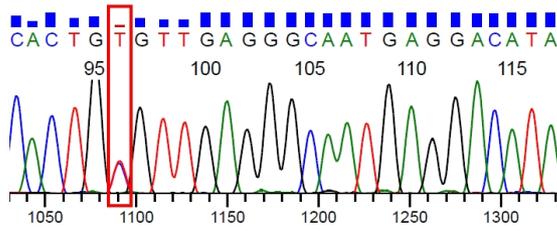
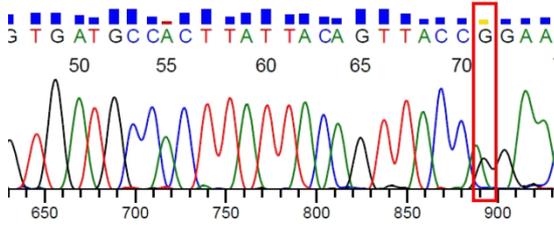


Abbildung 31: Mutationsbestätigung EGFR, Fall 4

4_EGFR_T_LS



4_EP300_T_US



4_EP300_T_LS

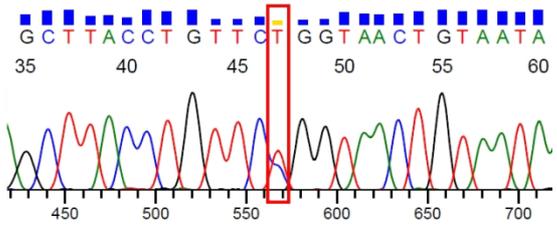
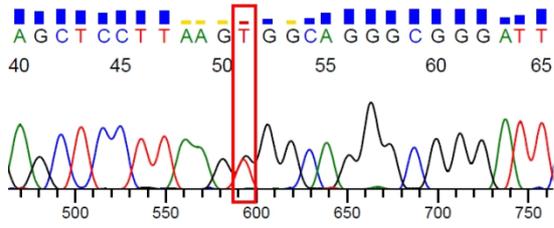


Abbildung 32: Mutationsbestätigung EP300, Fall 4

4_IGF2R_T_US



4_IGF2R_T_LS

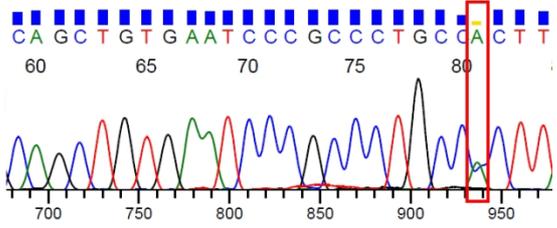
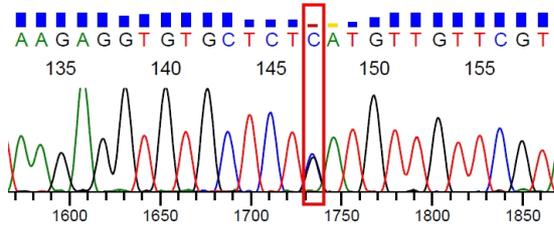


Abbildung 33: Mutationsbestätigung IGF2R, Fall 4

4_FN1_T_US



4_FN1_T_LS

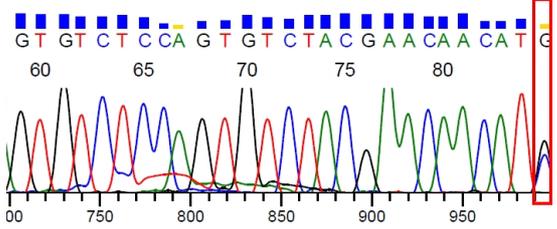
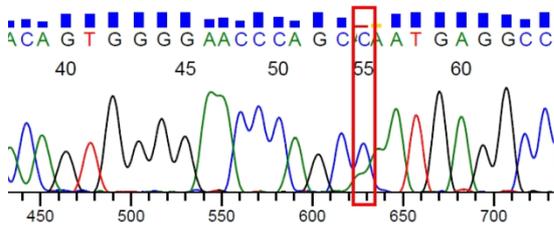


Abbildung 34: Mutationsbestätigung FN1, Fall 4

4_MTOR_T_US



4_MTOR_T_LS

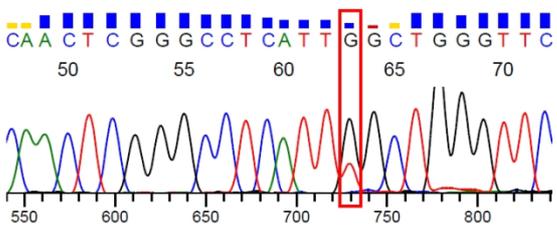
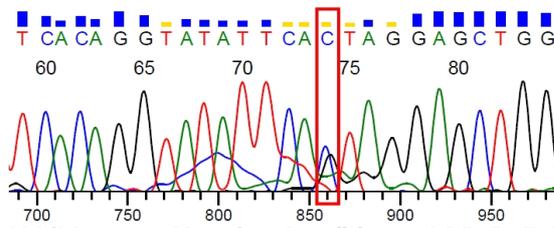


Abbildung 35: Mutationsbestätigung MTOR, Fall 4

4_LRP1B_T_US



4_LRP1B_T_LS

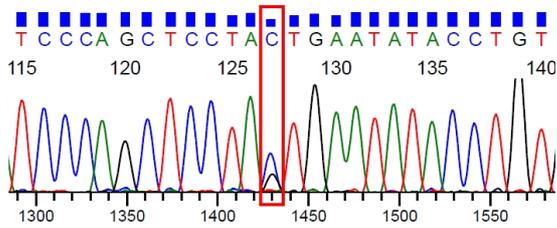
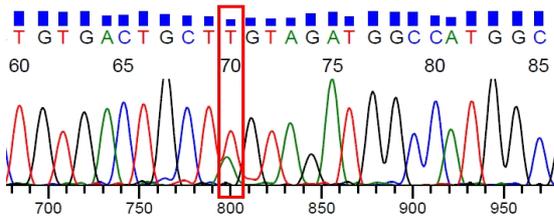


Abbildung 36: Mutationsbestätigung LRP1B, Fall 4

4_TP53ex5_T_US



4_TP53ex5_T_LS

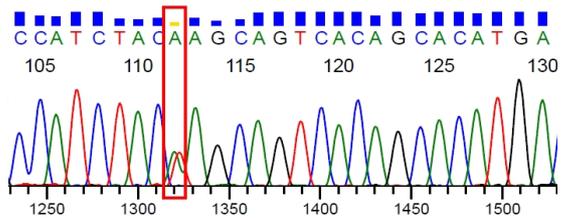
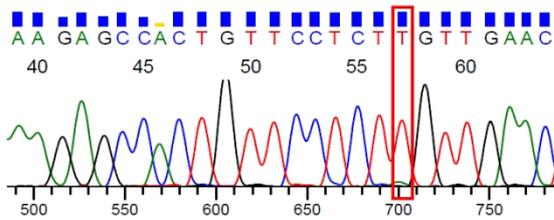


Abbildung 37: Mutationsbestätigung TP53ex5, Fall 4

7_ROS1_T_US



7_ROS1_T_LS

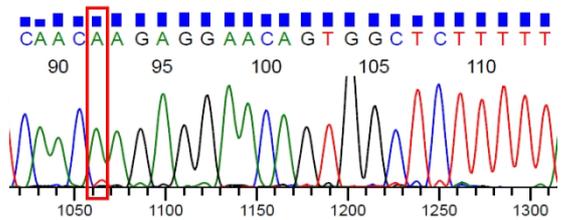
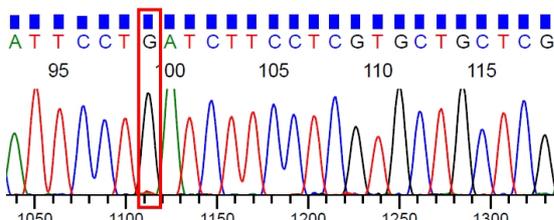


Abbildung 38: Mutationsbestätigung ROS1, Fall 7

7_PIK3CA_T_US



7_PIK3CA_T_LS

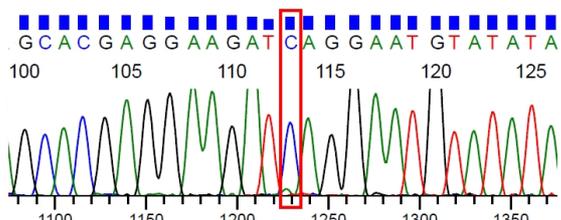
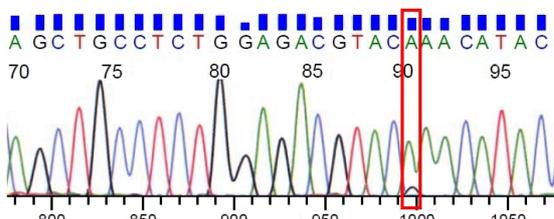


Abbildung 39: Mutationsbestätigung PIK3CA, Fall 7

7_CREB1_T_US



7_CREB1_T_LS

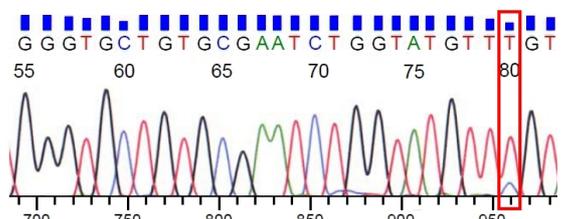
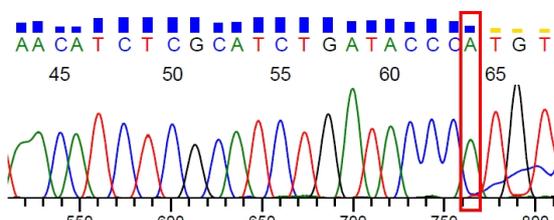


Abbildung 40: Mutationsbestätigung CREB1, Fall 7

7_ADAMTS20_T_US



7_ADAMTS20_T_LS

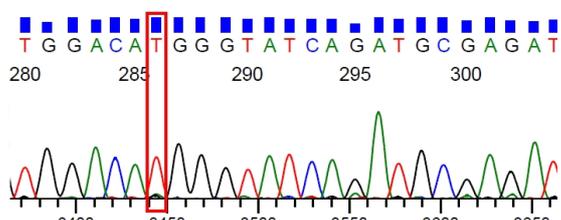
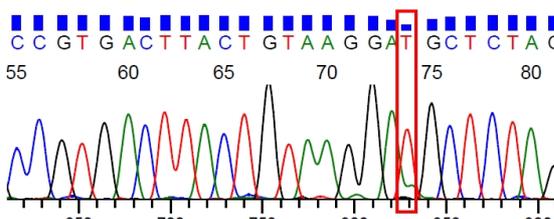


Abbildung 41: Mutationsbestätigung ADAMTS20, Fall 7

7_ATM_T_US



7_ATM_T_LS

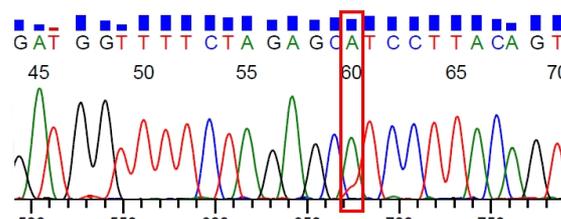
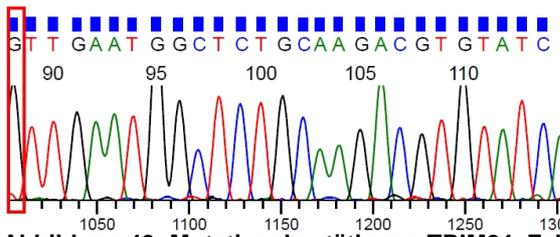


Abbildung 42: Mutationsbestätigung ATM, Fall 7

7_TRIM24_T_US



7_TRIM24_T_LS

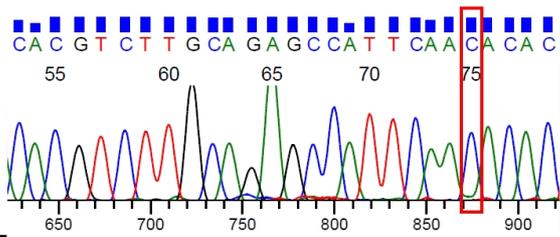
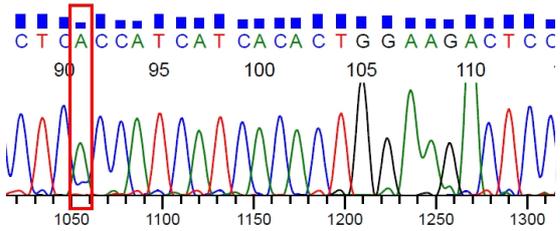


Abbildung 43: Mutationsbestätigung TRIM24, Fall 7

7_TP53ex7_T_US



7_TP53ex7_T_LS

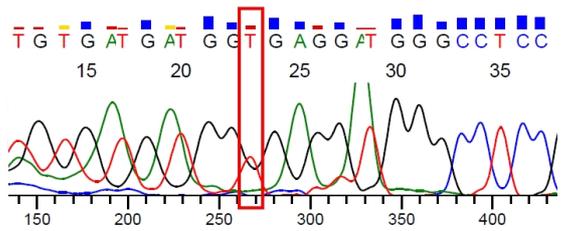
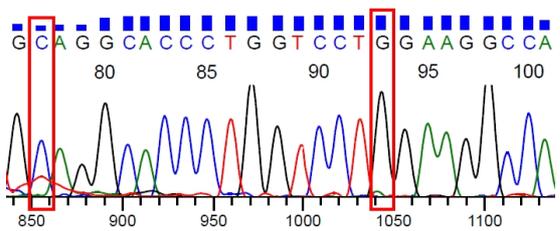


Abbildung 44: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 7

7_EPHB4_T_US



7_EPHB4_T_LS

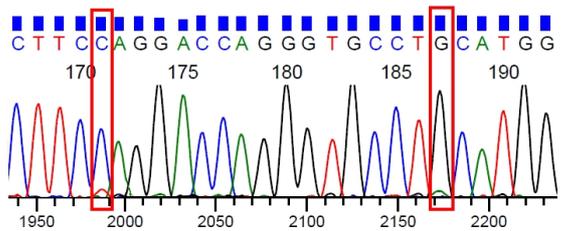
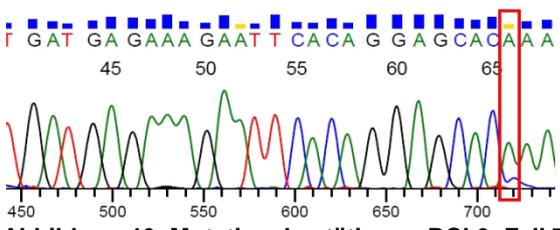


Abbildung 45: Mutationsbestätigung EPHB4, Fall 7

7_BCL9_T_US



7_BCL9_T_LS

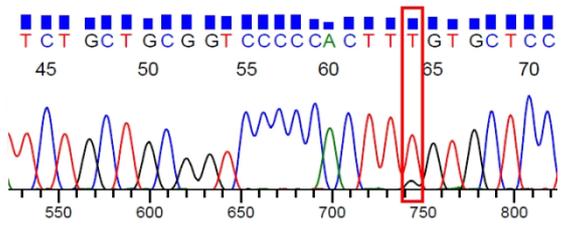
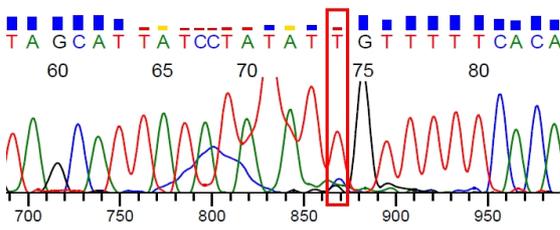


Abbildung 46: Mutationsbestätigung BCL9, Fall 7

7_CDH2_T_US



7_CDH2_T_LS

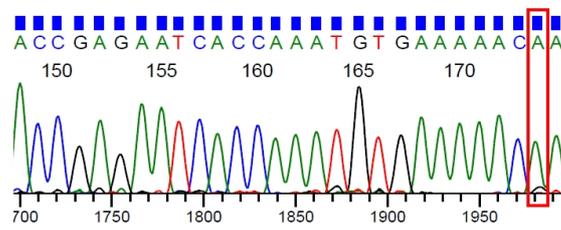
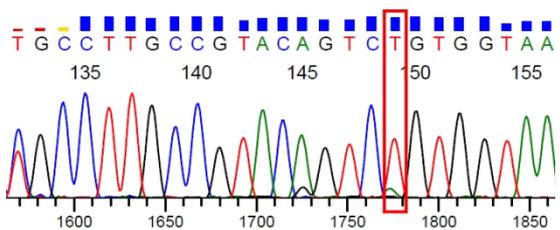


Abbildung 47: Mutationsbestätigung CDH2, Fall 7

7_IL6ST_T_US



7_IL6ST_T_LS

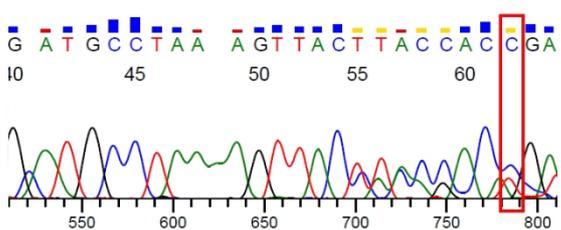


Abbildung 48: Mutationsbestätigung IL6ST, Fall 7

10_HRAS_T_US

10_HRAS_T_LS

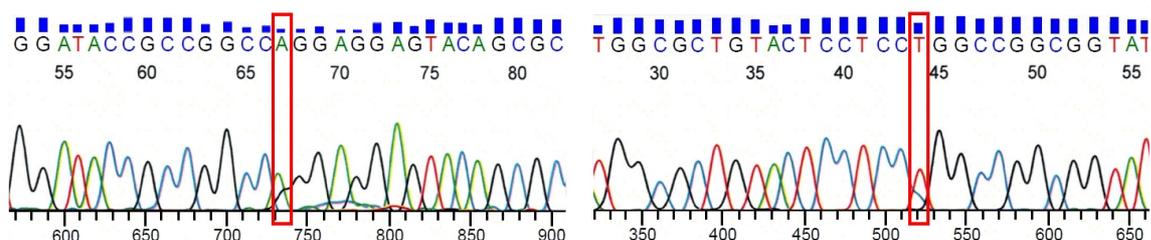


Abbildung 49: Mutationsbestätigung HRAS, Fall 10

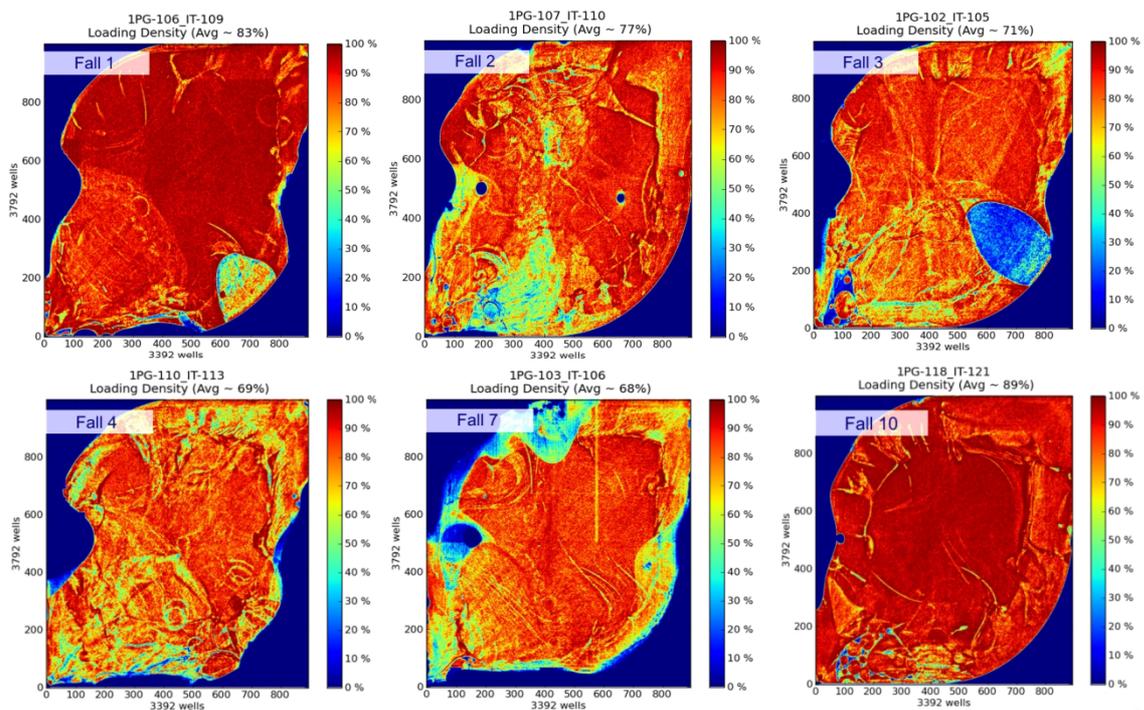


Abbildung 50: Virtuelle Darstellung der Chip-Beladung mit ISPs der einzelnen Fallproben

ABL1	AURKC	BTK	CEBPA	DDR2	ERG	FLT1	HLF
ABL2	AXL	BUB1B	CHEK1	DEK	ESR1	FLT3	HNF1A
ACVR2A	BAI3	CARD11	CHEK2	DICER1	ETS1	FLT4	HOOK3
ADAMTS20	BAP1	CASC5	CIC	DNMT3A	ETV1	FN1	HRAS
AFF1	BCL10	CBL	CKS1B	DPYD	ETV4	FOXL2	HSP90AA1
AFF3	BCL11A	CCND1	CMPK1	DST	EXT1	FOXO1	HSP90AB1
AKAP9	BCL11B	CCND2	COL1A1	EGFR	EXT2	FOXO3	ICK
AKT1	BCL2	CCNE1	CRBN	EML4	EZH2	FOXP1	IDH1
AKT2	BCL2L1	CD79A	CREB1	EP300	FAM123B	FOXP4	IDH2
AKT3	BCL2L2	CD79B	CREBBP	EP400	FANCA	FZR1	IGF1R
ALK	BCL3	CDC73	CRKL	EPHA3	FANCC	G6PD	IGF2
APC	BCL6	CDH1	CRTC1	EPHA7	FANCD2	GATA1	IGF2R
AR	BCL9	CDH11	CSF1R	EPHB1	FANCF	GATA2	IKBKB
ARID1A	BCR	CDH2	CSMD3	EPHB4	FANCG	GATA3	IKBKE
ARID2	BIRC2	CDH20	CTNNA1	EPHB6	FAS	GDNF	IKZF1
ARNT	BIRC3	CDH5	CTNNB1	ERBB2	FBXW7	GNA11	IL2
ASXL1	BIRC5	CDK12	CYLD	ERBB3	FGFR1	GNAQ	IL21R
ATF1	BLM	CDK4	CYP2C19	ERBB4	FGFR2	GNAS	IL6ST
ATM	BLNK	CDK6	CYP2D6	ERCC1	FGFR3	GPR124	IL7R
ATR	BMPR1A	CDK8	DAXX	ERCC2	FGFR4	GRM8	ING4
ATRX	BRAF	CDKN2A	DCC	ERCC3	FH	GUCY1A2	IRF4
AURKA	BRD3	CDKN2B	DDB2	ERCC4	FLCN	HCAR1	IRS2
AURKB	BRIP1	CDKN2C	DDIT3	ERCC5	FLI1	HIF1A	ITGA10
ITGA9	MALT1	MTR	NTRK1	PKHD1	RNASEL	SSX1	TPR
ITGB2	MAML2	MTRR	NTRK3	PLAG1	RNF2	STK11	TRIM24
ITGB3	MAP2K1	MUC1	NUMA1	PLCG1	RNF213	STK36	TRIM33
JAK1	MAP2K2	MUTYH	NUP214	PLEKHG5	ROS1	SUFU	TRIP11
JAK2	MAP2K4	MYB	NUP98	PML	RPS6KA2	SYK	TRRAP
JAK3	MAP3K7	MYC	PAK3	PMS1	RRM1	SYNE1	TSC1
JUN	MAPK1	MYCL1	PALB2	PMS2	RUNX1	TAF1	TSC2
KAT6A	MAPK8	MYCN	PARP1	POU5F1	RUNX1T1	TAF1L	TSHR
KAT6B	MARK1	MYD88	PAX3	PPARG	SAMD9	TAL1	UBR5
KDM5C	MARK4	MYH11	PAX5	PPP2R1A	SBDS	TBX22	UGT1A1
KDM6A	MBD1	MYH9	PAX7	PRDM1	SDHA	TCF12	USP9X
KDR	MCL1	NBN	PAX8	PRKAR1A	SDHB	TCF3	VHL
KEAP1	MDM2	NCOA1	PBRM1	PRKDC	SDHC	TCF7L1	WAS
KIT	MDM4	NCOA2	PBX1	PSIP1	SDHD	TCF7L2	WHSC1
KLF6	MEN1	NCOA4	PDE4DIP	PTCH1	SEPT9	TCL1A	WRN
KRAS	MET	NF1	PDGFB	PTEN	SETD2	TET1	WT1
LAMP1	MITF	NF2	PDGFRA	PTGS2	SF3B1	TET2	XPA
LCK	MLH1	NFE2L2	PDGFRB	PTPN11	SGK1	TFE3	XPC
LIFR	MLL	NFKB1	PER1	PTPRD	SH2D1A	TGFB2	XPO1
LPHN3	MLL2	NFKB2	PGAP3	PTPRT	SMAD2	TGM7	XRCC2
POT1	MLL3	NIN	PHOX2B	RAD50	SMAD4	THBS1	ZNF384
LPP	MLLT10	NKX2-1	PIK3C2B	RAF1	SMARCA4	TIMP3	ZNF521
LRP1B	MMP2	NLRP1	PIK3CA	RALGDS	SMARCB1	TLR4	
LTF	MN1	NOTCH1	PIK3CB	RARA	SMO	TLX1	
LTK	MPL	NOTCH2	PIK3CD	RB1	SMUG1	TNFAIP3	
MAF	MRE11A	NOTCH4	PIK3CG	RECQL4	SOCS1	TNFRSF14	
MAFB	MSH2	NPM1	PIK3R1	REL	SOX11	TNK2	
MAGEA1	MSH6	NRAS	PIK3R2	RET	SOX2	TOP1	
MAGI1	MTOR	NSD1	PIM1	RHOH	SRC	TP53	

Abbildung 51: Übersicht der 409 mittels Comprehensive Cancer Panel erfassten Tumorsuppressor- und Onkogene. Dunkel hinterlegte Felder: Genauwahl auch im Ion AmpliSeq Cancer Panel v2 enthalten

Tabelle 7: Übersicht Messwerte der Agilent & OneTouch-Messungen: Konzentrationsbestimmung mittels Agilent nach Librarypräparation, sowie ISPs vor bzw. nach Anreicherung (RG & TG zusammen).

Fall	Entität	Agilent [pmol/L]				ISP-Anreicherung im OneTouch		
		PP(1)	PP(2)	PP(3)	PP(4)	AF 488 Vor-/nachh.	AF 647 Vor-/nachh.	Verhältnis vor/nachh.
1	RG	895,4	262,8	2401,5	1441,5	1238,1 1069,0	230,6 1113	v:16,27% n: 89,69%
	TG	2058,9	1765,7	3639,9	270,8			
2	RG	4937,7	4917,8	4300,1	696,8	1066,6 614,7	170,6 687,7	v: 13,93% n: 99,69%
	TG	2817,2	786,7	5721,6	2711,4			
3	RG	1586,4	512,0	1145,4	1374,2	1043,5 514,5	194,8 641,1	v: 16,3% n:111,51 %
	TG	6347,5	5208,9	2967,2	1854,3			
4	RG	4347,5	4214,1	1269,1	2256,7	931,7 374,8	125,4 378,7	v: 11,68% n: 91,17%
	TG	3027,0	339,8	850,4	4609,6			
5	RG	-,---	-,---	-,---	-,---	-	-	-
	TG	1046,3	611,0	1895,6	4592,8			
6	RG	602,1	332,2	523,6	1094,1	816,4 510,1	187,2 561,9	v: 20,09% n: 98,54%
	TG	850,4	1155,7	368,6	516,7			
7	RG	1174,0	1536,3	4847,8	5500,9	617,4 249,4	97,4 263,2	v: 13,71% n: 96,79%
	TG	4039,8	4789,0	4047,8	3679,4			
8	RG	-	-	-	-	-	-	-
	TG	-	-	-	-			
9	RG	-	-	-	-	-	-	-
	TG	-	-	-	-			
10	RG	721,1	608,0	777,5	513,8	1342,3 845,9	292,9 919,6	v: 19,09% n: 96,34%
	TG	931,4	2109,5	1228,7	892,4			

PP=Primerpool, RG=Referenzgewebe, TG=Tumorgewebe, v=vorher, n=nachher, AF 488=Alexa Fluor Dye 488, AF 647=Alexa Fluor Dye 647

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten spezifischen Primer

Fall-Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
1	CIC-Ex20-US	AGAGTCGGGGCCTGGACAGC
	CIC-Ex20-LS	CGAGGGAAGGGGTATTTACAAGAGG
	MN1-Ex1-US	TGGAGCTGGGCTTGTGAAGG
	MN1-Ex1-LS	GCCGGACTTTGCTACGTCTGC
	USP9X-Ex43-US	GTTTTATTTCTTTTGCAGGGCAATGG
	USP9X-Ex43-LS	ACAAGCTTTTGCAAGTGTCATCCTAGC
	USP9X-Ex21-US	GGAAGTGACTTGATGATGTATTTGATCTGC
	USP9X-Ex21-LS	GGCGGCATAAGTTTCATAAGTACTCTTGC
	ATM-Ex13-US	AAAGATCTTACTTTCTTGAAGTGAACACCACC

Fall-Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
	ATM-Ex13-US	TTTCCTGCCCCTATTTCTCCTTCC
	TAF1-Ex5-US	TACATGCCAAAGGGTTTCTCTTCC
	TAF1-Ex5-US	CATCTTCAGATTCTGCCTGTGTTGC
	GATA1-Ex6-US	CTCCAGTCTGGGAGGCACAGG
	GATA1-Ex6-US	GTGGCTAACAGGCCCTGACAGC
	GPR124-Ex1-US	GGGGCGATGGGTTGATGG
	GPR124-Ex1-US	CTGGCCTGGTAGGGTACTCACAGG
	TP53-Ex6-US	GGCCTCTGATTCTCACTGATTGC
	TP53-Ex6-US	TCCTCCAGAGACCCAGTTGC
	BCL11B-Ex4-US	CCAGGAGCTCGCCGTA CTGC
	BCL11B-Ex4-US	AGTCGAGCTTCAGCATGGACTCG
2	TPR-Ex31-US	GATAAGTTTCTTCAAATACCTTATCCTGTTGTGC
	TPR-Ex31-US	GACTAACAACCAGAACTTAATTCAGAGTCTGAAGG
	FN1-Ex45-US	CTAATGCACTTACAGTGTGTTGTTCTCTGATGG
	FN1-Ex45-US	CTTTAACTCAAACACTAAATTACGATGTCCTCAGG
	HSP90AB-Ex11-US	ATCATGAAAGCCCAGGCACTTCG
	HSP90AB-Ex11-US	TCAAGGGAAAAGCCAGAAGATAGCAGG
	NSD1-Ex14-US	GTCGGTTGATGCGCTGTGTCC
	NSD1-Ex14-US	ACACAAAGCACCAGCTAACATTAACATGC
	CDK12-Ex1-US	AGGTAGCCAAAAGCAGCAGCAAGG
	CDK12-Ex1-US	GGAGCTGTCAGACCACTTCCTGTGG
	MYD88-Ex2-US	GAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGG
	MYD88-Ex2-US	CCATCTGCTTCAAACACCCATGC
	REL-Ex11-US	ATAACAGCATGATAAATGAGTCGGGACC
	REL-Ex11-US	GACAAATACAAAATGCTGCATCTATATAGGTGG
	MALT1-Ex9-US	GAAGGACAAGGTTGCCCTTTTGATAGG
	MALT1-Ex9-US	CTTGTCTAAAAGGAGTAAAACTCATCCACAGC
	SYNE1-Ex66-US	GATAAAGGAGGCCTTACCTGAAGATCACG
	SYNE1-Ex66-US	CAGCACACTGATGCTTTATAAAGTAATGTGTTCC
	KDR-Ex15-US	CCACTGACCTTCTATTATGAAAAATGCCTCC
	KDR-Ex15-US	GATGAAGGGCAGCATTATATTTTCTAAATTTCC
	TP53-Ex7-US	AAGGCGCACTGGCCTCATCTTG
	TP53-Ex7-US	CAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGG
	TP53-Ex5-US	CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCC
	TP53-Ex5-US	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAGC
	PTPRD-Ex30-US	TGTCAGCACAAATGAATATGATTTCTCAGG

Fall-Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
	PTPRD-Ex30-US	GACTATATATACATTTTCCAAAAGCTAGTGACATTGG
	AMER1-Ex2-US	CGAGGGAGGCTGCTCACACC
	AMER1-Ex2-LS	CTTTGACATCGCTGATGTGGAACG
	KDR-Ex28-US	TGCTTAGGCTAATATTTATCTAGCTAGTGTTTCATC
	KDR-Ex28-LS	GAAAGATAATGAACTTAGGTAGCCGATCTGC
	ATRX-Ex17-US	TTTATCTTCAGCCCCTACGACTGTGC
	ATRX-Ex17-LS	GTGTTTCAGTTTATGTGGGATTGCTGC
3	RET-Ex12-US	TCCCTCATTTCCAACATAGGAGGATCC
	RET-Ex12-LS	TGTGCCTGTGCCTGGCAGG
	PRKDC-Ex72-US	GTTGGTCACAGAAATCTGCCAGCG
	PRKDC-Ex72-LS	TTGAGAAAGCTTCAGTCATGCTCATGG
	IRS2-Ex1-US	GGCAAGGAGCTGTAGCAGCAGC
	IRS2-Ex1-LS	CAGTGGGTACATGCGCATGTGG
	ASXL1-Ex9-US	CCCTTTGCCTCTCTCTGGGTGG
	ASXL1-Ex9-LS	GCAAGCCGTCCGAGATGACC
	CDK8-Ex1-US	CAGCTCTCCGGCCTCAGAGG
	CDK8-Ex1-LS	GGCCCAGACACACACTCACC
	PKHD1-Ex48-US	AAGTCTTCCAAAATTGCTGCATGAGG
	PKHD1-Ex48-LS	AATATGCAATTTAAATCCTAAGACCATCACTCC
4	COL1 _{A1} -Ex37-US	CAGAGGGAGAACAGCCAACATCATCC
	COL1 _{A1} -Ex37-LS	GAGTGGCTTGGCCCTCTGTGC
	CSMD3-Ex33-US	CAAAGTCAGTCTTTAATCAGTAACTGATGCATGG
	CSMD3-Ex33-LS	CCGGGTTCTGTTGATCAGTGG
	NIN-Ex18-US	CCGCACATAACATCATTAGCTGTTCC
	NIN-Ex18-LS	GTGACCAGGCGGCATGTCC
	KDM5C-Ex12-US	AACCACCGCCACCACCACC
	KDM5C-Ex12-LS	CAGAACATTTGGAAGAAGTGATGAAGAAGC
	EGFR-Ex3-US	GTTCTTGAGTTCCTCAAAGAGAAATCACG
	EGFR-Ex3-LS	CATGGGCAGCTCCTTCAGTCC
	EP300-Ex19-US	GGTTTCTTTTGCAGTTGGAGTTCTCTCC
	EP300-Ex19-LS	GTGCTGGCTGGCCCATCC
	IGF2R-Ex33-US	CTCCAAGTCTCAGCTCCCTGG
	IGF2R-Ex33-LS	CACGAGAGACCACAGCACTCACC
	FN1-Ex26-US	CAGCGATAAAATCATACTGTGATGACAAAGG

Fall-Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
	FN1-Ex26-LS	CTGGGCGTGCTTTAGTTTCTCATGC
	MTOR-Ex48-US	TGCGATGCTCGATGTTGAGAAGG
	MTOR-Ex48-LS	GGGTATACTCTCTTTACGGTACACTAACCCCTGC
	LRP1B-Ex75-US	ATGTTTCTCTGAAATCCAGGCTTACAGC
	LRP1B-Ex75-LS	ATGGGGGCTTATATGGAGAGAAGACC
6	MAPK1-Ex6-US	TGGAGTCAGCATTGGGAACAGC
	MAPK1-Ex6-LS	GGTTCATTCCGACTCAGAGTTGATGG
	MCL1-Ex1-US	GCGCTTCCGCCAATCACC
	MCL1-Ex1-LS	GGGTCTTCCCAGTTTTTCTCAGC
	ARNT-Ex15-US	CCACCCCTGGGTGACTGC
	ARNT-Ex15-LS	TGGTTTCTGTTTGCTGAAACTGACACC
	PTPRD-Ex3-US	ACCCCGCAAACCTGTGAGTCTGG
	PTPRD-Ex3-LS	GCGGATCCACCACTGTATTGAGAGC
	COL1A1-Ex1-US	CTCCGGATCATCCACGTCTCG
	COL1A1-Ex1-LS	CTAGGGTCTAGACATGTTTCAGCTTTGTGG
	NUMA1-Ex24-US	GCTGCCGGGTGGTGATGC
	NUMA1-Ex24-LS	CAGGTCCTCCTCCATCTCCATACAGC
	SYNE1-Ex13-US	TCAGACAGAGGCAGTAGAACCTGTTGC
	SYNE1-Ex13-LS	CTATGTCAGGGCTTGATGAATGACAGC
	ROS1-Ex29-US	TTGCACTTGAGAATGACAATAAAGAGTGC
	ROS1-Ex29-LS	TTGGTCACTGGGCAAAAATAAGTGG
	ASXL1-Ex7-US	GCTGTGCCTTCAGGGTTCTCG
	ASXL1-Ex7-LS	AAATAAGTGCCACGCCACTCACC
	PKHD1-Ex16-US	CCACCCAACAGCTCCAATTGG
	PKHD1-Ex16-LS	TTCGAGGTCTCTGAAGGGCTTAATACTACC
7	ROS1-Ex9-US	CATCCAACCGAAGGCAATGTGC
	ROS1-Ex9-LS	TGACCAGCCTCTTTCAAGCACTAGTCC
	PIK3CA-Ex7-US	TGGTTGATCTTTGTCTTCGTGATTTGTAGG
	PIK3CA-Ex7-LS	GTGAAAAAATTCAATCAGCGGTATAATCAGG
	CREB1-Ex8-US	TTTGTTTCCCTTTTAGTCCAAAATACATGC
	CREB1-Ex8-LS	CTCTCTTTCGTGCTGCTTCTTCAGC
	ADAMTS-Ex23-US	TGTCTGTCACCTGGGGCGACTAGC
	ADAMTS-Ex23-LS	TCCTTAAATCATATTGACTGCTTTCTAAAATATCAGG
	ATM-Ex30-US	TCTCCCTATATTAGGCCTTCTTGATCATGG

Fall-Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
	ATM-Ex30-LS	AGATGAGTCAGAAAATTACCTGTTTCTGAACC
	TRIM24-Ex3-US	GTACGCATAGCTCGAGATAGGACCACC
	TRIM24-Ex3-LS	GCAAAGATCTCATTTATTACCTGGAGATACTTCC
	EPHB4-Ex4-US	CACGGGCACAACCAGCTCC
	EPHB4-Ex4-LS	TGAGCTGGGAAGAACAACAGTCC
	BCL9-Ex8-US	TATCTCAGGAGCAGCTGGAGCACC
	BCL9-Ex8-LS	TTGGGATTGGGCCATCATGG
	NSD1-Ex5-US	TTCTAGGTTTGCTGCCACAAACACTAGG
	NSD1-Ex5-LS	GAGTTCTCACTGGATATGCTTGATGACAGG
	CDH2-Ex11-US	CTTTAATTCCTGAGCATGCATGATGAGG
	CDH2-Ex11-LS	CTACAGAAATGCAAGTTAATGAGCCAGTTGC
	IL6ST-Ex17-US	GCTCATGTGAACTTCAGTTCATTTTTGTCC
	IL6ST-Ex17-LS	CAGATGCTTTTGGTCCAGGTAAGTACTGAGG
10	HRAS-Ex3-US	GGTCCCTGAGCCCTGTCCCTCC
	HRAS-Ex3-LS	TGTTGTTGATGGCAAACACACACAGG

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCP	Comprehensive Cancer Panel
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
emPCR	Emulsions-PCR
FFPE	Formalin-fixiert & in Paraffin-eingebettet
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
hg19	human genome 19
His	Histidin
Ile	Isoleucin
IGV	Integrative Genomic Viewer
IHC	Immunhistochemie
ISP	Ion Sphere Particle
kb	Kilo-Basenpaare
Leu	Leucin
LS	lower strand
Lys	Lysin
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1

Abkürzungsverzeichnis

Met	Methionin
Min	Minute(n)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NGS	Next Generation Sequencing
OG	Onkogen
pAK	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α
PGM	Personal Genome Machine
Phe	Phenylalanin
pOG	potenzielles Onkogen
PRC1	polycomb-group repressive complex protein 1
PRC2	polycomb-group repressive complex protein 2
Pro	Prolin
pTSG	potenzielles Tumorsuppressorgen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunden
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
tNGS	targeted Next Generation Sequencing
TSG	Tumorsupressorgen
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
u.a.	unter anderem
US	upper strand
Val	Valin
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der DNA-Sequenzierung	15
Abbildung 2: Darstellung eines Amplifikats und seiner Adapter.....	16
Abbildung 3: Darstellung eines Amplifikat-Ansatzes im Elektropherogramm	20
Abbildung 4: Bindung der Amplifikate an die ISPs - Zustand vor bzw. nach emPCR.....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung template- und non-template-positiver ISPs.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Mikro-Wells mit Sequenzierungsreaktion	25
Abbildung 7: Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der klassischen DNA-Sequenzierung	27
Abbildung 8: Mutationsbestätigung TP53, Fall 1.....	58
Abbildung 9: Mutationsbestätigung TPR, Fall 2	58
Abbildung 10: Mutationsbestätigung FN1, Fall 2	58
Abbildung 11: Mutationsbestätigung NSD1, Fall 2.....	58
Abbildung 12: Mutationsbestätigung CDK12, Fall 2.....	58
Abbildung 13: Mutationsbestätigung MYD88, Fall 2	59
Abbildung 14: Mutationsbestätigung REL, Fall 2	59
Abbildung 15: Mutationsbestätigung MALT1, Fall 2.....	59
Abbildung 16: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 2.....	59
Abbildung 17: Mutationsbestätigung SYNE1, Fall 2	59
Abbildung 18: Mutationsbestätigung TP53ex5, Fall 2.....	59
Abbildung 19: Mutationsbestätigung KDRex15, Fall 2.....	60
Abbildung 20: Mutationsbestätigung PTPRD, Fall 2	60
Abbildung 21: Mutationsbestätigung MALT1, Fall 2.....	60
Abbildung 22: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 2.....	60
Abbildung 23: Mutationsbestätigung SYNE1, Fall 2	60
Abbildung 24: Mutationsbestätigung IRS2, Fall 3	60
Abbildung 25: Mutationsbestätigung ASXL1, Fall 3	61
Abbildung 26: Mutationsbestätigung CDK8, Fall 3.....	61
Abbildung 27: Mutationsbestätigung PKHD1, Fall 3	61
Abbildung 28: Mutationsbestätigung CSMD3, Fall 4.....	61
Abbildung 29: Mutationsbestätigung NIN, Fall 4	61
Abbildung 30: Mutationsbestätigung KDM5C, Fall 4.....	61
Abbildung 31: Mutationsbestätigung EGFR, Fall 4	62
Abbildung 32: Mutationsbestätigung EP300, Fall 4	62
Abbildung 33: Mutationsbestätigung IGF2R, Fall 4.....	62
Abbildung 34: Mutationsbestätigung FN1, Fall 4	62
Abbildung 35: Mutationsbestätigung MTOR, Fall 4.....	62
Abbildung 36: Mutationsbestätigung LRP1B, Fall 4.....	62
Abbildung 37: Mutationsbestätigung TP53ex5, Fall 4.....	63
Abbildung 38: Mutationsbestätigung ROS1, Fall 7	63
Abbildung 39: Mutationsbestätigung PIK3CA, Fall 7	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 40: Mutationsbestätigung CREB1, Fall 7	63
Abbildung 41: Mutationsbestätigung ADAMTS20, Fall 7	63
Abbildung 42: Mutationsbestätigung ATM, Fall 7	63
Abbildung 43: Mutationsbestätigung TRIM24, Fall 7	64
Abbildung 44: Mutationsbestätigung TP53ex7, Fall 7	64
Abbildung 45: Mutationsbestätigung EPHB4, Fall 7	64
Abbildung 46: Mutationsbestätigung BCL9, Fall 7	64
Abbildung 47: Mutationsbestätigung CDH2, Fall 7	64
Abbildung 48: Mutationsbestätigung IL6ST, Fall 7	64
Abbildung 49: Mutationsbestätigung HRAS, Fall 10	65
Abbildung 50: Virtuelle Darstellung der Chip-Beladung mit ISPs der einzelnen Fallproben.....	65
Abbildung 51: Übersicht der 409 mittels CCP erfassten Tumorsuppressor- und Onkogene.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der 10 Angiosarkome unter Angabe der primären Tumorlokalisierung	10
Tabelle 2: Übersicht über die Konzentrationen (C_{DNA}) sowie die Qubit-Messwerte.....	36
Tabelle 3: Übersicht der Sequenzierungsläufe	37
Tabelle 4: Übersicht über die Fälle 1, 2, 3, 4, 6, 7 & 10	39
Tabelle 5: Übersicht der mittels PCR mit Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen	40
Tabelle 6: Vollständige Übersicht aller bestätigter Missense- und Nonsense-Mutationen	42
Tabelle 7: Übersicht Messwerte der Agilent & OneTouch-Messungen	67
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten spezifischen Primer	67

Literaturverzeichnis

1. **Fletcher CD, H.P., Mertens F, Bridge J.**, *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*, 3rd ed, 2002: IARC Press: Lyon
2. **Clark, M.A., et al.**, *Soft-Tissue Sarcomas in Adults*, New England Journal of Medicine, 2005, p. 701-711
3. **Taylor, B.S., et al.**, *Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets*, Nat Rev Cancer, 2011, p. 541-557
4. **Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal**, *Cancer statistics, 2015*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, p. 5-29
5. **Cormier, J.N. and R.E. Pollock**, *Soft Tissue Sarcomas*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2004, p. 94-109
6. **Antonescu, C.R.**, *The role of genetic testing in soft tissue sarcoma*, Histopathology, 2006, p. 13-21
7. **Hernando, E., et al.**, *The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas*, Nat Med, 2007, p. 748-53
8. **Ressing M. et al.**, *Incidence of sarcomas and histological subtypes in Germany, in Posterpräsentation, 32. Deutscher Krebskongress 2016* 2016.
9. **Young, R.J., et al.**, *Angiosarcoma*, Lancet Oncol, 2010, p. 983-91
10. **Antonescu, C.**, *Malignant vascular tumors--an update*, Mod Pathol, 2014, p. S30-8
11. **Penel, N., et al.**, *Angiosarcoma: state of the art and perspectives*, Crit Rev Oncol Hematol, 2011, p. 257-63
12. **Guillou, L. and A. Aurias**, *Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles*, Virchows Arch, 2010, p. 201-17
13. **Gounder, M.M., et al.**, *Impact of next-generation sequencing (NGS) on diagnostic and therapeutic options in soft-tissue and bone sarcoma*, Journal of Clinical Oncology, Abstrakt-Session, NGA Best of ASCO Conference 2017 Berlin, 2017, p. 11001-11001
14. **Rossi, S. and C.D. Fletcher**, *Angiosarcoma arising in hemangioma/vascular malformation: report of four cases and review of the literature*, Am J Surg Pathol, 2002, p. 1319-29
15. **Arbiser, J.L., et al.**, *Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo*, Am J Pathol, 2000, p. 1469-76
16. **Huang, J. and W.J. Mackillop**, *Increased risk of soft tissue sarcoma after radiotherapy in women with breast carcinoma*, Cancer, 2001, p. 172-80
17. **Virtanen, A., E. Pukkala, and A. Auvinen**, *Angiosarcoma after radiotherapy: a cohort study of 332,163 Finnish cancer patients*, Br J Cancer, 2007, p. 115-7
18. **Plichta, J.K. and K. Hughes**, *Radiation-Induced Angiosarcoma after Breast-Cancer Treatment*, N Engl J Med, 2017, p. 367
19. **West, J.G., et al.**, *BRCA mutations and the risk of angiosarcoma after breast cancer treatment*, Clin Breast Cancer, 2008, p. 533-7
20. **Thomas, L.B. and H. Popper**, *Pathology of angiosarcoma of the liver among vinyl chloride-polyvinyl chloride workers*, Ann N Y Acad Sci, 1975, p. 268-77
21. **Locker, G.Y., et al.**, *The clinical features of hepatic angiosarcoma: a report of four cases and a review of the English literature*, Medicine (Baltimore), 1979, p. 48-64
22. **Falk, H., et al.**, *Hepatic angiosarcoma associated with androgenic-anabolic steroids*, Lancet, 1979, p. 1120-3

23. **Penel, N., et al.**, *Frequency of certain established risk factors in soft tissue sarcomas in adults: a prospective descriptive study of 658 cases*, *Sarcoma*, 2008, p. 459386
24. **Fury, M.G., et al.**, *A 14-year retrospective review of angiosarcoma: clinical characteristics, prognostic factors, and treatment outcomes with surgery and chemotherapy*, *Cancer J*, 2005, p. 241-7
25. **Meis-Kindblom, J.M. and L.G. Kindblom**, *Angiosarcoma of soft tissue: a study of 80 cases*, *Am J Surg Pathol*, 1998, p. 683-97
26. **Mark, R.J., et al.**, *Angiosarcoma. A report of 67 patients and a review of the literature*, *Cancer*, 1996, p. 2400-6
27. **Koch, M., G.P. Nielsen, and S.S. Yoon**, *Malignant tumors of blood vessels: angiosarcomas, hemangioendotheliomas, and hemangiopericytomas*, *J Surg Oncol*, 2008, p. 321-9
28. **Vogt, T.**, [*Angiosarcoma*], *Hautarzt*, 2008, p. 237-48; quiz 249-50
29. **Boucher, L.D., et al.**, *Cytology of angiosarcoma. Findings in fourteen fine-needle aspiration biopsy specimens and one pleural fluid specimen*, *Am J Clin Pathol*, 2000, p. 210-9
30. **Cho, N.H., K.G. Lee, and M.G. Jeong**, *Cytologic evaluation of primary malignant vascular tumors of the liver. One case each of angiosarcoma and epithelioid hemangioendothelioma*, *Acta Cytol*, 1997, p. 1468-76
31. **De Young, B.R., et al.**, *CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas*, *Am J Clin Pathol*, 1998, p. 374-7
32. **Xu, H., et al.**, *Expression of a lymphatic endothelial cell marker in benign and malignant vascular tumors*, *Hum Pathol*, 2004, p. 857-61
33. **Miettinen, M. and Z.F. Wang**, *Prox1 transcription factor as a marker for vascular tumors-evaluation of 314 vascular endothelial and 1086 nonvascular tumors*, *Am J Surg Pathol*, 2012, p. 351-9
34. **Hasegawa, T.**, *Histological grading and MIB-1 labeling index of soft-tissue sarcomas*, *Pathol Int*, 2007, p. 121-5
35. **Jinnin, M., et al.**, *Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma*, *Nat Med*, 2008, p. 1236-1246
36. **Miettinen, M., et al.**, *Vascular endothelial growth factor receptor 2 as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma: an immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors*, *Am J Surg Pathol*, 2012, p. 629-39
37. **Yamamoto, T., et al.**, *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in angiosarcoma*, *J Am Acad Dermatol*, 1999, p. 127-9
38. **Young, R.J., et al.**, *Angiogenic growth factor expression in benign and malignant vascular tumours*, *Exp Mol Pathol*, 2014, p. 148-53
39. **Zietz, C., et al.**, *MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas*, *Am J Pathol*, 1998, p. 1425-33
40. **Behjati, S., et al.**, *Recurrent PTPRB and PLAG1 mutations in angiosarcoma*, *Nat Genet*, 2014, p. 376-379
41. **Italiano, A., et al.**, *Alterations of the p53 and PIK3CA/AKT/mTOR pathways in angiosarcomas: a pattern distinct from other sarcomas with complex genomics*, *Cancer*, 2012, p. 5878-87
42. **Murali, R., et al.**, *Targeted massively parallel sequencing of angiosarcomas reveals frequent activation of the mitogen activated protein kinase pathway*, *Oncotarget*, 2015, p. 36041-52
43. **Kunze, K., et al.**, *A recurrent activating PLAG1 mutation in cardiac angiosarcomas increases apoptosis resistance and invasiveness of endothelial cells*, *Cancer Res*, 2014, p. 6173-83

44. **Domfeh, A.B., M. Fichera, and J.L. Hunt**, *Allelic loss of 3 different tumor suppressor gene loci in benign and malignant endothelial tumors of the head and neck*, Arch Pathol Lab Med, 2006, p. 1184-7
45. **Fayette, J., et al.**, *Angiosarcomas, a heterogeneous group of sarcomas with specific behavior depending on primary site: a retrospective study of 161 cases*, Ann Oncol, 2007, p. 2030-6
46. *Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, Ann Oncol, 2014, p. iii102-12
47. **Jochen Schütte, S.B., Thomas Brodowicz**, *DGHO - Leitlinie zu Weichgewebssarkome (Weichteilsarkome) des Erwachsenen*, 2017
48. **Wilhelm, S.M., et al.**, *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*, Mol Cancer Ther, 2008, p. 3129-40
49. **Maki, R.G., et al.**, *Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas*, J Clin Oncol, 2009, p. 3133-40
50. **Biswas, B. and D. Dabkara**, *Bevacizumab in Advanced Angiosarcoma: What Is the Reality?*, J Clin Oncol, 2016, p. 764
51. **Agulnik, M., et al.**, *An open-label, multicenter, phase II study of bevacizumab for the treatment of angiosarcoma and epithelioid hemangioendotheliomas*, Ann Oncol, 2013, p. 257-63
52. **Ray-Coquard, I.L., et al.**, *Paclitaxel Given Once Per Week With or Without Bevacizumab in Patients With Advanced Angiosarcoma: A Randomized Phase II Trial*, J Clin Oncol, 2015, p. 2797-802
53. **Azzariti, A., et al.**, *Irradiation-induced angiosarcoma and anti-angiogenic therapy: a therapeutic hope?*, Exp Cell Res, 2014, p. 240-7
54. **Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal**, *The cancer genome*, Nature, 2009, p. 719-24
55. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*, Nature, 2004, p. 931-45
56. **Lander, E.S., et al.**, *Initial sequencing and analysis of the human genome*, Nature, 2001, p. 860-921
57. **Lander, E.S.**, *Initial impact of the sequencing of the human genome*, Nature, 2011, p. 187-97
58. **Venter, J.C., et al.**, *The sequence of the human genome*, Science, 2001, p. 1304-51
59. **Gagan, J. and E.M. Van Allen**, *Next-generation sequencing to guide cancer therapy*, Genome Med, 2015, p. 80
60. **Metzker, M.L.**, *Sequencing technologies - the next generation*, Nat Rev Genet, 2010, p. 31-46
61. **Gilissen, C., et al.**, *Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability*, Nature, 2014, p. 344-7
62. **Goodwin, S., J.D. McPherson, and W.R. McCombie**, *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies*, Nat Rev Genet, 2016, p. 333-51
63. **Jung, H., et al.**, *Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation*, Nat Genet, 2015, p. 1242-8
64. **Belkadi, A., et al.**, *Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, p. 5473-8
65. **Lam, H.Y., et al.**, *Performance comparison of whole-genome sequencing platforms*, Nat Biotechnol, 2011, p. 78-82
66. **Warr, A., et al.**, *Exome Sequencing: Current and Future Perspectives*, G3 (Bethesda), 2015, p. 1543-50

67. **van Dijk, E.L., et al.**, *Ten years of next-generation sequencing technology*, Trends Genet, 2014, p. 418-26
68. **Majewski, J., et al.**, *What can exome sequencing do for you?*, J Med Genet, 2011, p. 580-9
69. **Rabbani, B., M. Tekin, and N. Mahdieh**, *The promise of whole-exome sequencing in medical genetics*, J Hum Genet, 2014, p. 5-15
70. **Wagle, N., et al.**, *High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing*, Cancer Discov, 2012, p. 82-93
71. **Campeato, L.F., et al.**, *Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice*, Oncotarget, 2015, p. 34221-7
72. **Vogelstein, B. and K.W. Kinzler**, *The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out*, N Engl J Med, 2015, p. 1895-8
73. **Sun, Y., et al.**, *Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome?*, Hum Mutat, 2015, p. 648-55
74. **Oh, E., et al.**, *Comparison of Accuracy of Whole-Exome Sequencing with Formalin-Fixed Paraffin-Embedded and Fresh Frozen Tissue Samples*, PLoS One, 2015, p. e0144162
75. **Spencer, D.H., et al.**, *Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens*, J Mol Diagn, 2013, p. 623-33
76. **Oldham, A.L., et al.**, *Automated DNA extraction platforms offer solutions to challenges of assessing microbial biofouling in oil production facilities*, AMB Express, 2012, p. 60
77. **DeAngelis MM, W.D., Hawkins TL**, *Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products.*, Nucleic Acids Res., 1995, p. 4742-4743
78. **Bronner, I.F., et al.**, *Improved Protocols for Illumina Sequencing*, Curr Protoc Hum Genet, 2014, p. 18.2.1-18.2.42
79. **Kohn, A.B., et al.**, *Single-cell semiconductor sequencing*, Methods Mol Biol, 2013, p. 247-84
80. **Rothberg, J.M., et al.**, *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*, Nature, 2011, p. 348-52
81. **Loman, N.J., et al.**, *Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms*, Nat Biotechnol, 2012, p. 434-9
82. **Shastry, B.S.**, *SNPs: impact on gene function and phenotype*, Methods Mol Biol, 2009, p. 3-22
83. **Singh, R.R., et al.**, *Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours*, Br J Cancer, 2014, p. 2014-23
84. **Kroigard, A.B., et al.**, *Evaluation of Nine Somatic Variant Callers for Detection of Somatic Mutations in Exome and Targeted Deep Sequencing Data*, PLoS One, 2016, p. e0151664
85. **Spencer, D.H., et al.**, *Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single nucleotide variants in targeted next-generation sequence data*, J Mol Diagn, 2014, p. 75-88
86. **Sims, D., et al.**, *Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses*, Nat Rev Genet, 2014, p. 121-32
87. **Nielsen, R., et al.**, *Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data*, Nat Rev Genet, 2011, p. 443-51

88. **Griffith, M., et al.**, *Optimizing cancer genome sequencing and analysis*, Cell Syst, 2015, p. 210-223
89. **Pasquale, E.B.**, *Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, p. 462-75
90. **Cayuso, J., Q. Xu, and D.G. Wilkinson**, *Mechanisms of boundary formation by Eph receptor and ephrin signaling*, Dev Biol, 2015, p. 122-31
91. **Tepass, U., D. Godt, and R. Winklbauer**, *Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries*, Curr Opin Genet Dev, 2002, p. 572-82
92. **Pasquale, E.B.**, *Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond*, Nat Rev Cancer, 2010, p. 165-80
93. **Pasquale, E.B.**, *Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease*, Cell, 2008, p. 38-52
94. **Noren, N.K. and E.B. Pasquale**, *Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer*, Cancer Res, 2007, p. 3994-7
95. **Levine, R.L., et al.**, *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*, Cancer Cell, 2005, p. 387-97
96. **Yao, Z., et al.**, *Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS*, Nature, 2017, p. 234-238
97. **Lynch, T.J., et al.**, *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*, N Engl J Med, 2004, p. 2129-39
98. **Kumar, S.R., et al.**, *The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome*, Br J Cancer, 2007, p. 1083-91
99. **Stephenson, S.A., et al.**, *Receptor protein tyrosine kinase EphB4 is up-regulated in colon cancer*, BMC Mol Biol, 2001, p. 15
100. **Xia, G., et al.**, *Up-regulation of EphB4 in mesothelioma and its biological significance*, Clin Cancer Res, 2005, p. 4305-15
101. **Becerikli, M., et al.**, *EPHB4 tyrosine-kinase receptor expression and biological significance in soft tissue sarcoma*, Int J Cancer, 2015, p. 1781-91
102. **Ferguson, B.D., et al.**, *Novel EPHB4 Receptor Tyrosine Kinase Mutations and Kinomic Pathway Analysis in Lung Cancer*, Sci Rep, 2015, p. 10641
103. **Noren, N.K., et al.**, *Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, p. 5583-8
104. **Gerlinger, M., et al.**, *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*, N Engl J Med, 2012, p. 883-92
105. **Italiano, A., et al.**, *Genetic landscape of soft-tissue sarcomas: Moving toward personalized medicine*, Journal of Clinical Oncology, Abstrakt-Session, NGA Best of ASCO Conference 2017 Berlin, 2017, p. 11002-11002
106. **Hedegaard, J., et al.**, *Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue*, PLoS One, 2014, p. e98187
107. **Van Allen, E.M., et al.**, *Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine*, Nat Med, 2014, p. 682-8
108. **Gilbert, M.T., et al.**, *The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?*, PLoS One, 2007, p. e537

109. **Merriman, B. and J.M. Rothberg**, *Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing*, Electrophoresis, 2012, p. 3397-417
110. **Watanabe, M., et al.**, *Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods*, Exp Ther Med, 2017, p. 2683-2688
111. **Turashvili, G., et al.**, *Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques*, Exp Mol Pathol, 2012, p. 33-43
112. **Gargis, A.S., et al.**, *Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice*, Nat Biotechnol, 2012, p. 1033-6
113. **Wall, J.D., et al.**, *Estimating genotype error rates from high-coverage next-generation sequence data*, Genome Res, 2014, p. 1734-9
114. **Clark, M.J., et al.**, *Performance comparison of exome DNA sequencing technologies*, Nat Biotechnol, 2011, p. 908-14
115. **Greenman, C., et al.**, *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*, Nature, 2007, p. 153-8
116. **Vogelstein, B., et al.**, *Cancer genome landscapes*, Science, 2013, p. 1546-58
117. **Tokheim, C.J., et al.**, *Evaluating the evaluation of cancer driver genes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, p. 14330-14335
118. **Tokheim, C., et al.**, *Exome-Scale Discovery of Hotspot Mutation Regions in Human Cancer Using 3D Protein Structure*, Cancer Res, 2016, p. 3719-31
119. **Bailey, M.H., et al.**, *Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations*, Cell, 2018, p. 371-385.e18
120. **Hodis, E., et al.**, *A landscape of driver mutations in melanoma*, Cell, 2012, p. 251-63
121. **Baeissa, H., et al.**, *Identification and analysis of mutational hotspots in oncogenes and tumour suppressors*, Oncotarget, 2017, p. 21290-21304
122. **Kandoth, C., et al.**, *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*, Nature, 2013, p. 333-339
123. **Ferguson, L.R., et al.**, *Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition*, Semin Cancer Biol, 2015, p. S5-s24
124. **Gerlinger, M., et al.**, *Cancer: evolution within a lifetime*, Annu Rev Genet, 2014, p. 215-36
125. **Shen, Z.**, *Genomic instability and cancer: an introduction*, J Mol Cell Biol, 2011, p. 1-3
126. **Lord, C.J. and A. Ashworth**, *The DNA damage response and cancer therapy*, Nature, 2012, p. 287-94
127. **Baugh, E.H., et al.**, *Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?*, Cell Death Differ, 2018, p. 154-160
128. **Hollstein, M., et al.**, *p53 mutations in human cancers*, Science, 1991, p. 49-53
129. **Vogelstein, B. and K.W. Kinzler**, *p53 function and dysfunction*, Cell, 1992, p. 523-6
130. **Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine**, *Surfing the p53 network*, Nature, 2000, p. 307-10
131. **Kinzler, K.W. and B. Vogelstein**, *Life (and death) in a malignant tumour*, Nature, 1996, p. 19-20
132. **Vousden, K.H. and C. Prives**, *Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53*, Cell, 2009, p. 413-31
133. **Hanahan, D. and R.A. Weinberg**, *The hallmarks of cancer*, Cell, 2000, p. 57-70

134. **Nigro, J.M., et al.**, *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*, Nature, 1989, p. 705-8
135. **Baker, S.J., et al.**, *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*, Science, 1989, p. 217-21
136. **Kinzler, K.W. and B. Vogelstein**, *Cancer therapy meets p53*, N Engl J Med, 1994, p. 49-50
137. **Kim, M.P., Y. Zhang, and G. Lozano**, *Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer*, Front Oncol, 2015, p. 249
138. **Meek, D.W.**, *Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?*, Nat Rev Cancer, 2009, p. 714-23
139. **Brosh, R. and V. Rotter**, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*, Nat Rev Cancer, 2009, p. 701-13
140. **Hanel, W. and U.M. Moll**, *Links between mutant p53 and genomic instability*, J Cell Biochem, 2012, p. 433-9
141. **Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut**, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, p. a001008
142. **Muller P, A.J. and H. Vousden K** *Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities*, Cancer Cell, 2014, p. 304-17
143. **Muller, P.A. and K.H. Vousden**, *p53 mutations in cancer*, Nat Cell Biol, 2013, p. 2-8
144. **Hung, J., et al.**, *Sporadic versus Radiation-Associated Angiosarcoma: A Comparative Clinicopathologic and Molecular Analysis of 48 Cases*, Sarcoma, 2013, p. 798403
145. **Naka, N., et al.**, *Mutations of p53 tumor-suppressor gene in angiosarcoma*, Int J Cancer, 1997, p. 952-5
146. **Reimand, J. and G.D. Bader**, *Systematic analysis of somatic mutations in phosphorylation signaling predicts novel cancer drivers*, Mol Syst Biol, 2013, p. 637
147. **Shihab, H.A., et al.**, *Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models*, Hum Mutat, 2013, p. 57-65
148. **Shihab, H.A., et al.**, *Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts*, Hum Genomics, 2014, p. 11
149. **Shihab, H.A., et al.**, *Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions*, Bioinformatics, 2013, p. 1504-10
150. **Joerger, A.C. and A.R. Fersht**, *Structural biology of the tumor suppressor p53*, Annu Rev Biochem, 2008, p. 557-82
151. **Petitjean, A., et al.**, *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database*, Hum Mutat, 2007, p. 622-9
152. **Joerger, A.C. and A.R. Fersht**, *Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants*, Oncogene, 2007, p. 2226-42
153. **Seki, M., et al.**, *Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma*, Nat Commun, 2015, p. 7557
154. **Kamaraj, B. and A. Bogaerts**, *Structure and Function of p53-DNA Complexes with Inactivation and Rescue Mutations: A Molecular Dynamics Simulation Study*, PLoS One, 2015, p. e0134638
155. **Eldar, A., et al.**, *Structural studies of p53 inactivation by DNA-contact mutations and its rescue by suppressor mutations via alternative protein-DNA interactions*, Nucleic Acids Res, 2013, p. 8748-59
156. **Li, T., et al.**, *Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence*, Cell, 2012, p. 1269-83

157. **Lemmon, M.A. and J. Schlessinger**, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*, Cell, 2010, p. 1117-34
158. **Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich**, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*, Nat Rev Cancer, 2004, p. 361-70
159. **Fleuren, E.D., et al.**, *The kinome 'at large' in cancer*, Nat Rev Cancer, 2016, p. 83-98
160. **Ostman, A., C. Hellberg, and F.D. Bohmer**, *Protein-tyrosine phosphatases and cancer*, Nat Rev Cancer, 2006, p. 307-20
161. **Pare-Brunet, L., et al.**, *Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy*, Pharmacogenomics J, 2015, p. 397-404
162. **Shibuya, M.**, *Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases*, J Biochem, 2013, p. 13-9
163. **Olsson, A.K., et al.**, *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, p. 359-71
164. **Antonescu, C.R., et al.**, *KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors*, Cancer Res, 2009, p. 7175-9
165. **Huang, S.C., et al.**, *Recurrent CIC Gene Abnormalities in Angiosarcomas: A Molecular Study of 120 Cases With Concurrent Investigation of PLCG1, KDR, MYC, and FLT4 Gene Alterations*, Am J Surg Pathol, 2016
166. **McTigue, M.A., et al.**, *Crystal structure of the kinase domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2: a key enzyme in angiogenesis*, Structure, 1999, p. 319-30
167. **Davare, M.A., et al.**, *Structural insight into selectivity and resistance profiles of ROS1 tyrosine kinase inhibitors*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, p. E5381-90
168. **Salvucci, O. and G. Tosato**, *Essential roles of EphB receptors and EphrinB ligands in endothelial cell function and angiogenesis*, Adv Cancer Res, 2012, p. 21-57
169. **Doposo, H., et al.**, *The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis*, Cancer Res, 2009, p. 7430-8
170. **Noren, N.K., et al.**, *The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway*, Nat Cell Biol, 2006, p. 815-25
171. **Lemmon, M.A., et al.**, *The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators*, Cell, 2016, p. 1172-1184
172. **Kolch, W., et al.**, *The dynamic control of signal transduction networks in cancer cells*, Nat Rev Cancer, 2015, p. 515-27
173. **Sever, R. and J.S. Brugge**, *Signal transduction in cancer*, Cold Spring Harb Perspect Med, 2015
174. **Prior, I.A., P.D. Lewis, and C. Mattos**, *A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*, Cancer Res, 2012, p. 2457-67
175. **Fernandez-Medarde, A. and E. Santos**, *Ras in cancer and developmental diseases*, Genes Cancer, 2011, p. 344-58
176. **Boulalas, I., et al.**, *Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma*, J Urol, 2009, p. 2312-9
177. **Stenman, A., et al.**, *HRAS mutation prevalence and associated expression patterns in pheochromocytoma*, Genes Chromosomes Cancer, 2016, p. 452-9
178. **Miller, M.B., et al.**, *MAPK activation and HRAS mutation identified in pituitary spindle cell oncocyoma*, Oncotarget, 2016, p. 37054-37063
179. **Hardt, M., N. Chantaravisoot, and F. Tamanoi**, *Activating mutations of TOR (target of rapamycin)*, Genes Cells, 2011, p. 141-51

180. **Lai, K., M.C. Killingsworth, and C.S. Lee**, *Gene of the month: PIK3CA*, J Clin Pathol, 2015, p. 253-7
181. **Thomas, G.V., et al.**, *Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer*, Nat Med, 2006, p. 122-7
182. **Guertin, D.A. and D.M. Sabatini**, *An expanding role for mTOR in cancer*, Trends Mol Med, 2005, p. 353-61
183. **Laplane, M. and D.M. Sabatini**, *mTOR signaling in growth control and disease*, Cell, 2012, p. 274-93
184. **Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton**, *The TOR pathway: a target for cancer therapy*, Nat Rev Cancer, 2004, p. 335-48
185. **Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini**, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, p. 21-35
186. **Samuels, Y. and V.E. Velculescu**, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*, Cell Cycle, 2004, p. 1221-4
187. **Karakas, B., K.E. Bachman, and B.H. Park**, *Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers*, Br J Cancer, 2006, p. 455-9
188. **Samuels, Y. and T. Waldman**, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*, Curr Top Microbiol Immunol, 2010, p. 21-41
189. **Je, E.M., et al.**, *Mutational analysis of PIK3CA, JAK2, BRAF, FOXL2, IDH1, AKT1 and EZH2 oncogenes in sarcomas*, Apmis, 2012, p. 635-9
190. **Veeriah, S., et al.**, *The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, p. 9435-40
191. **Solomon, D.A., et al.**, *Mutational inactivation of PTPRD in glioblastoma multiforme and malignant melanoma*, Cancer Res, 2008, p. 10300-6
192. **Network, C.G.A.**, *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*, Nature, 2012, p. 61-70
193. **Ortiz, B., et al.**, *Deletion of Ptprd and Cdkn2a cooperate to accelerate tumorigenesis*, Oncotarget, 2014, p. 6976-82
194. **Walia, V., et al.**, *Mutational and functional analysis of the tumor-suppressor PTPRD in human melanoma*, Hum Mutat, 2014, p. 1301-10
195. **White, M.F.**, *Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins*, Can J Physiol Pharmacol, 2006, p. 725-37
196. **Sun, X.J., et al.**, *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*, Nature, 1995, p. 173-7
197. **Bonito, N.A., et al.**, *Control of gp130 expression by the mitogen-activated protein kinase ERK2*, Oncogene, 2014, p. 2255-63
198. **Heinrich, P.C., et al.**, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*, Biochem J, 1998, p. 297-314
199. **Schulze, K., et al.**, *Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets*, Nat Genet, 2015, p. 505-11
200. **Seton-Rogers, S.**, *Cytokine cues*, Nat Rev Cancer, 2011, p. 690

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. phil. nat. Andreas Bräuninger für die Vergabe dieses besonderen und interessanten Themas, für die Konzeptualisierung und seine Unterstützung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Kristin Hartung (geb. Kunze) für ihre interessierte und umfangreiche Teilnahme am Arbeitsprozess, ihr Engagement bei der Entwicklung und Mitgestaltung der Versuchsplanung und Umsetzung des Projekts, für die praktische Anleitung wesentlicher Versuchsstationen, sowie für ihre Verfügbarkeit zur Rücksprache bedanken. Ohne ihre Betreuung und Mitarbeit wäre diese Arbeit nicht durchführbar gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. T. Dreyer für die fachliche Unterstützung bei der histopathologischen Bewertung und immunhistochemischen Evaluation bedanken.

Außerdem möchte ich dem Biologisch-technischen Assistenten Herrn Sebastian Schäfer und den Medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kirsten-Susann Bommersheim und Frau Ann-Katrin Jestädt danken, die mir während des experimentellen Entstehungsprozesses hilfreich und unterstützend zur Seite standen.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle Herrn Philipp Rantzsch für seine zuverlässige und engagierte Hilfe bei der Formatierung der vorliegenden Arbeit danken.

Abschließend gilt mein Dank meinen beiden Eltern, sowie meinen Geschwistern Christina, Andreas und Maximilian für ihr Interesse, ihre Anteilnahme, sowie ihre hilfreichen und sachdienlichen Hinweise während der Entstehung der Arbeit und dem Verfassen der Dissertation.

Lebenslauf

Publikationen

Kunze K, Spieker T, Gamedinger U, Nau K, Berger J, Dreyer T, Sindermann JR, Hoffmeier A, Gattenlöhner S, Bräuninger A: A Recurrent Activating PLCG1 Mutation in Cardiac Angiosarcomas Increases Apoptosis Resistance and Invasiveness of Endothelial Cells. *Cancer Res.* 2014; 74:6173-83.