

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Pathologie und Neuropathologie  
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Analyse von ZNS-Tumoren bezüglich ihres FGFR1  
Mutationsstatus**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Engelhardt, Sophie Marie Vanessa**

**2023**

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. E. Staebler

Tag der Disputation: 27.02.2023

# INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis .....	3
Tabellenverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	11
1.1 Einteilung von Hirntumoren nach ZNS WHO-Grad und Genetik .....	11
1.2 Das genetische Profil von niedriggradigen Hirntumoren .....	12
1.3 Umschriebene astrozytäre Tumore.....	14
1.4 Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumore .....	17
1.5 Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumore .....	20
1.6 FGFR1 .....	23
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	24
2. Patientenauswahl, Material, Methoden und Statistik .....	25
2.1 Patientenkollektiv .....	25
2.2 Material und Methoden .....	26
2.3 Statistik.....	52
3. Ergebnisse .....	54
3.1 FGFR1-Immunhistochemie.....	54
3.2 Molekulare Stratifizierung und Pyrosequenzierung FGFR1 c.546 .....	
und c.656 .....	60

4. Diskussion .....	70
5. Zusammenfassung .....	75
6. Literaturverzeichnis .....	77
7. Erklärung zum Eigenanteil .....	85
8. Liste der Veröffentlichungen.....	87
Danksagung.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: FGFR1 Immunhistochemische Färbebeispiele (AK #44-1140G, Verdünnung 1:100) in LGG/MNGT-Tumorgewebe in 10facher Vergrößerung A Score 0=keine Anfärbung B Score 1=schwache Anfärbung C Score 2=mittlere Anfärbung D Score 3=starke Anfärbung.....	36
Abbildung 2: Mikrotom MTA-1 zur Herstellung eines TMA mit eingespanntem Akzeptorblock. ....	38
Abbildung 3: von l. nach r.: HE-Schnitt mit Markierung - bereits an Markierung gestanzter Paraffinblock (Donorblock)- TMA, der die so gewonnenen Stenzen aufnimmt (Akzeptorblock).....	39
Abbildung 4: Schematische Darstellung der RNA-Isolation mittels des FFPEasy Kits (Qiagen, Hilden) aus dem zugehörigen Handbook 07/21 S.10 <a href="http://www.qiagen.com/HB-0375">www.qiagen.com/HB-0375</a> .....	42
Abbildung 5: Exemplarisches Gelelektrophoresebild zur Erfolgskontrolle der c.546 Hotspot PCR Produkte mit zusätzlicher NTC (von links nach rechts). ...	47
Abbildung 6: FGFR1-IRS in Abhängigkeit der Tumorentität. ....	55
Abbildung 7: FGFR-1 IRS in Abhängigkeit zum ZNS WHO-Grad.....	56
Abbildung 8: FGFR-1 IRS in Abhängigkeit zum Geschlecht. ....	57
Abbildung 9: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zum Alter. ....	58
Abbildung 10: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zum Primär(P)-/Rezidivstatus(R). ...	59
Abbildung 11: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zur Tumorlokalisation.....	60
Abbildung 12: Verteilung der Non-FGFR1-Mutationen in 476 Tumoren (rot IDH1, gelb IDH2, hellblau LOH1p19q, lila TERT, türkis H3F3AK27M, orange KIAA-BRAF, dunkelgrau NF1, hellgrau unzureichendes Material). Die FGFR1 Pyrosequenzierkohorte (dunkelblau) zeigte keine bekannte Treibermutationen und wurde daraufhin auf FGFR1 c.546 und c.656 Hotspotmutationen analysiert.....	61
Abbildung 13: Entitätsübergreifende Verteilung der Tumorlokalisationen in der Pyrosequenzierkohorte (n=108), grün Temporallappen, rot Kleinhirn, gelb zentral, hellblau Frontallappen, helllila Parietallappen, violett Ventrikelsystem, hellorange Medulla oblongata, orange N. opticus, dunkelgrau multilokulär, hellrot Rückenmark, hellgrau ohne Angabe.....	64

Abbildung 14: Diagnosen und WHO Grad der Pyrosequenzierkohorte (grün DA, rot DNT, gelb PXA, hellblau GG, lila ODG, violett PA, orange PXA, dunkelgrau RGNT, hellgrau Andere.....	65
Abbildung 15: Exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K Wildtypfalles (wt).....	66
Abbildung 16: Exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K c.1638 C>A mutierten Falles. ....	66
Abbildung 17: exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K c.1638 C>G mutierten Falls. ....	66
Abbildung 18: exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 K656E c.1966 A>G mutierten Falls. ....	67
Abbildung 19: FGFR-1 Hotspotmutationsstatus c.546/c.656 in Abhängigkeit vom Alter.....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristische Mutationen der in dieser Arbeit untersuchten Entitäten nach „Table 2- Key Diagnostic Genes, Molecules, Pathways and/or Combinations in Major Primary CNS Tumors“. [2].....	14
Tabelle 2: Verwendete Materialien. ....	26
Tabelle 3: Reagenzien für 10xTBE Buffer. ....	27
Tabelle 4: Herstellung 0,5 m EDTA pH 8,0.....	27
Tabelle 5: Herstellung 10x TBE-Buffer. ....	27
Tabelle 6: Reagenzien zur Herstellung eines Agarosegels. ....	27
Tabelle 7: im Rahmen der Arbeit genutzte Kits. ....	28
Tabelle 8: im Rahmen der Arbeit genutzte Geräte und Software.....	29
Tabelle 9: BRAFV600E Primer.....	30
Tabelle 10: IDH 1/2 Primer.....	30
Tabelle 11: 1549 BRAF-KIAA-Fusionstranskript Primer. ....	31
Tabelle 12: 1p/19q Codeletion Primer. ....	31
Tabelle 13: TERT Primer.....	32
Tabelle 14: FGFR1 Primer. ....	32
Tabelle 15: Etablierung der IHC mit dem phospho-FGFR1 (Y653, Y654) Antikörper, wobei die Behandlung aller Proben des Kollektivs gemäß Versuch 9 (grau hinterlegt) durchgeführt wurde. ....	35
Tabelle 16: Schema des Mastermixes für die PCR ohne template-DNA von c.546.....	44
Tabelle 17: Schema des Mastermixes für die PCR ohne template-DNA von c.656.....	44
Tabelle 18: PCR-Protokoll FGFR1 (c.546) analog zur IDH2 Routine PCR. ....	45
Tabelle 19: PCR-Protokoll FGFR1 (c.656) analog zur IDH1 Routine PCR. ....	45
Tabelle 20: FGFR1 c.546 und c.656 PCR und Pyrosequenzierprimer.....	50
Tabelle 21: Schema des Binding Mix für die Pyrosequenzierung von FGFR1 c.546 und c.656. ....	51
Tabelle 22: Schema für den Annealing Mix für FGFR1 c.546 und c.656. ....	51
Tabelle 23: FGFR1 c.546 und c.656 Dispensation Order und Sequence to analyse. ....	52

Tabelle 24: FGFR1-Immunhistochemie über histologische Diagnosen mit n=Anzahl, Mittel IRS=Mittelwert des Immune-Reactivity-Scores sowie SD IRS=Standardabweichung des Immune-Reactivity-Scores. ....	56
Tabelle 25: Molekulargenetische Parameter der Gesamtkohorte aufgelistet nach Diagnose und Probenzahl sowie nachgewiesener Mutationen in IDH1/IDH2/TERT/BRAF-Fusion/LOH1p19q/NF1/K27M/FGFR1.....	62
Tabelle 26: Diagnosen, Anzahl, Epidemiologische Daten (niedrigstes Alter, Durchschnittsalter, höchstes Alter, Geschlecht) sowie Primär-/Rezidivstatus der Samples für FGFR1 Pyrosequenzierung und Immunhistochemie. ....	63
Tabelle 27: IRS und epidemiologische Daten (Geschlecht, Alter), Primär-/Rezidivstatus sowie Lokalisation der 13 Fälle mit c.546 oder c.656 FGFR1-Hotspot-Mutation, ANDERE=niedriggradiger neuroepithelialer Tumor. ....	69

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APS	Adenosin 5' Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	ATP-abhängige Helicase
bp	Basenpaare
BRAF/B-RAF	B-Raf codierendes Protein aus einer Serin/Threonin-Proteinkinase-Familie
BRAFV600E	Mutation in BRAF im Codon 600
CC1	Cell Conditioning 1
CC2	Cell Conditioning 2
CCD	charge-coupled device
CDKN2A/B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
cDNA	komplementäre DNA
CIC	Capicua Transcriptional Repressor- codierendes Gen
CNS	Central nervous system
DA	Diffuses Astrozytom
dATP-S	Desoxyadenosinalpha-Thiotriphosphat
DIA/DIG	desmoplastisches infantiles Astrozytom/ Gangliogliom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNT	Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	DoppelstrangDNA
eGBM	Epitheloides Glioblastom
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
EWSR1	Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1
F	female/weiblich
FANC	Fanconi anaemia complementation group
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FGF1	Fibroblast growth factor 1
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2

FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FUBP1	Far Upstream Element Binding Protein 1
FusTK	Fusionstranskript
GG	Gangliogliom
H3F3A	Histon-codierendes Gen
H3K27M	häufige Histonmutation in diffusen Midlinegliomen
HBGF	Heparin-bindende Wachstumsfaktoren
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu	Bestandteil der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1 (zytosolisch)
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2 (mitochondrial)
IHC	Immunhistochemie
IR	Immunreaktivität
IRS	Immunreaktivitätsscore
k	Tausend
KIAA1549-BRAF	Fusionen zwischen dem BRAF Gen und dem KIAA1549 Gen
KRAS	monomeres G-Protein
LGG	Low grade glioma/ Niedriggradiges Gliom
LOH1p/19q	Loss of heterozygosity
m	Male/männlich
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, Teil der Serin/Threonin-Kinase-Familie
Mb	Magabase (1 Million Basenpaare)
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MNGT	gemischte neuronale Gliatumore
MYB	Teil einer großen Genfamilie von Transkriptionsfaktoren
MYBL1	MYB Proto-Onkogen Like 1
n	Fallzahl
N. opticus	Nervus opticus
NF1	Neurofibromatose 1
NGS	Next-Generation Sequencing
NOS	not otherwise specified
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1 codierendes Gen
NTC	No-Template-Kontrolle
NTRK2	Neurotrophic Receptor Tyrosin Kinase 2

ODG	Oligodendrogliom
P	Primärtumor
p.K656E	Hotspotmutation in FGFR1 an Position 656
p.N546K	Hotspotmutation in FGFR1 an Position 546
PA	Pilozytisches Astrozytom
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PGNT	Papillärer glioneuronaler Tumor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PLNTY	polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young
PMA	Pilomyxoides Astrozytom
PPi	Pyrophosphat
PR	Progesteronrezeptor
PRKCA	Protein Kinase C Alpha
PRKDC	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
p-Wert	probability (Signifikanzwert)
PXA	Pleomorphes Xanthoastrozom
R	Rezidiv
RGNT	Rosettenbildender glioneuronaler Tumor des 4.Ventrikels
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SLC44A1-PRKCA	Cholin-Transporter member 1 (SLC44A1 )-Proteinkinase C alpha ( PRKCA)-Fusion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	TRIS- Borat- EDTA-Buffer
TCF12	Transkriptionsfaktor 12
TCGA	The Cancer Genome Atlas
Temp.	Temperatur
TERT	Telomerase reverse transcriptase
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TMA	Tissue Microarray
TP53	P53 Protein, ein Tumorsuppressor
UV	Ultraviolettes Licht

V	Volt
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Einteilung von Hirntumoren nach ZNS WHO-Grad und Genetik

Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) werden von der World Health Organisation (WHO) in vier Grade unterteilt, wobei sich Tumoren des WHO Grad 1 unter den Merkmalen einer niedrigen Proliferationsrate, sicherer Abgrenzung gegenüber dem benachbarten Hirnparenchym und der Möglichkeit einer Heilung nach alleiniger chirurgischer Therapie zusammenfassen lassen. WHO Grad 2 Tumoren sind durch ein langsames, aber dennoch infiltratives Wachstum mit einer erheblichen postoperativen Rezidivneigung charakterisiert, wenngleich oft erst nach mehreren Jahren. Typisch ist bei diffusen Gliomen eine Progressionstendenz hin zu höheren Malignitätsgraden. WHO Grad 3 Tumoren sind proliferationsaktiv, invasiv wachsend und zeigen deutlich histologische Merkmale der Anaplasie. Ein Rezidiv innerhalb weniger Jahre nach der Erstdiagnose ist trotz multimodaler Therapiekonzepte nahezu ausnahmslos beobachtet worden. Der hochgradigen histopathologischen Malignität der WHO Grad 4 Tumoren, insbesondere des Glioblastoms, entspricht dessen klinisches Verhalten, das durch sehr kurze Entwicklungsdauer, schnelles, invasives Wachstum, starke Neovaskularisation, Nekrosen und durch eine sich meist innerhalb der ersten 12 Monate manifestierende Rezidivbildung beschrieben werden kann. Die Einteilung fußte bis 2016 vor allem auf der Histologie und ergänzenden Gewebetests wie der Immunhistochemie. Andere wichtige Informationen sind unter anderem Alter der Patienten, Tumorlokalisation, Ausmaß sowie Vollständigkeit der operativen Resektion, aber auch molekulare Parameter, die im Laufe der Zeit immer wichtiger geworden sind und seit 2016 auch in die WHO-Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems integriert worden sind. Hiermit wurde ein Konzept entwickelt, wie ZNS-Tumordiagnosen im molekularen Zeitalter strukturiert sein sollten. So stellte die WHO 2016 unter anderem eine umfassende Umstrukturierung der diffusen Gliome vor [1]. In der fünften Aktualisierung aus dem Jahr 2021 wurde dieser Trend weiterverfolgt.

Molekulare Biomarker haben weiter an Bedeutung gewonnen, um sowohl ergänzende als auch definierende diagnostische Informationen bereitzustellen [2].

## **1.2 Das genetische Profil von niedriggradigen Hirntumoren**

Unter dem Begriff niedriggradige Gliome (LGG) und gemischt neuronal-gliale Tumore (MNGT) werden WHO Grad 1 und WHO Grad 2 Tumoren von astrozytärer, neuronaler, gemischt neuronal-gliale und oligodendrogliale Herkunft verstanden. Obwohl diese Tumoren ein langsames Wachstum zeigen, können sie mit signifikanter Morbidität und Mortalität aufgrund von Rezidiven und bei adulten Tumoren auch mit bösartiger Progression verbunden sein, trotz optimaler Resektion. In der 5. Ausgabe der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren wurden daher zahlreiche molekulargenetische Veränderungen mit klinisch-pathologischem Nutzen integriert, die die Grundlage für eine genaue Klassifizierung von ZNS-Neoplasmen bilden. Durch die veränderte Herangehensweise wurde auch die Bezeichnung „not otherwise specified“ (NOS) eingeführt. Diese kann zum einen von Zentren genutzt werden, die diese molekularen Analysen noch nicht hinreichend durchführen können [3], zum anderen für Tumoren, die keine bislang bekannte nachweisbare Mutation tragen und somit als noch nicht näher klassifizierbar gelten. In den letzten Jahren hat sich zur Klassifikation von LGG in pädiatrischen und erwachsenen Altersgruppen neben den morphologischen Kriterien die Molekulargenetik als wichtiger Baustein für integrative Diagnosen etabliert [4]. Das Next-Generation-Sequencing (NGS) hat gezeigt, dass sich pädiatrische und erwachsene LGG in ihren zugrunde liegenden molekularen Eigenschaften grundlegend unterscheiden, obwohl sie histologisch ähnlich sind. Dies wird auch durch die Trennung adulter und pädiatrischer Tumoren in der 5. Ausgabe der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren abgebildet. Pädiatrische LGG zeigen Veränderungen im Gen für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) und für die Serin/Threonin-Kinase B-Raf (BRAF) bei pilozytischen Astrozytomen und FGFR1-Veränderungen bei diffusen Astrozytomen, die

jeweils auf dem „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinase Signalweg konvergieren. Erwachsene LGG zeichnen sich durch Isocitrat-Dehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2) Mutationen und Mutationen der ATP-abhängigen Helikase (ATRX) in astrozytischen Tumoren und IDH1/2-Mutationen und 1p/19q-Codeletionen bei oligodendroglialen Tumoren aus. Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) Promotormutationen sind auch in LGG festgestellt worden und sind hauptsächlich bei Oligodendrogliomen anzutreffen. Diese Erkenntnisse haben verfeinerte Ansätze zur Klassifizierung dieser Tumoren ermöglicht. Darüber hinaus wirken sich viele der in LGG identifizierten molekularen Veränderungen direkt auf Prognose, Tumorbiologie und Entwicklung neuartiger Therapien aus. Demzufolge werden molekulare Analysen immer wichtiger und sind in der modernen Neuropathologie essenziell. In Tabelle 1 sind Schlüsselgene und Moleküle der in dieser Arbeit auf eine FGFR1-Hotspot-Mutation untersuchten Entitäten angeführt, die für die jeweilige Entität charakteristisch sind [2]

Entität	WHO Grad	Veränderung
<b>Astrozytäre Tumore</b>		
Pilozytisches Astrozytom (PA)	1	KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1
Pilomyxoides Astrozytom (PMA)	1	KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1
Pleomorphes Xanthoastrozytom (PXA)	2	BRAF, CDKN2A/B
<b>Diffuse astrozytäre Tumore</b>		
Diffuses Astrozytom (DA)	2	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B
Oligodendrogliom (ODG)	2	IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT Promoter, CIC, FUBP1, NOTCH1
<b>Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumore</b>		
Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor (DNT)	1	FGFR1, BRAF
Gangliogliom (GG)	1	BRAF
Papillärer glioneuronaler Tumor (PGNT)	1	PRKCA, BRAF
Rosettenbildender glioneuronaler Tumor (RGNT)	1	FGFR1, PIK3CA, NF1, BRAF

*Tabelle 1: Charakteristische Mutationen der in dieser Arbeit untersuchten Entitäten nach „Table 2- Key Diagnostic Genes, Molecules, Pathways and/or Combinations in Major Primary CNS Tumors“. [2]*

### 1.3 Umschriebene astrozytäre Tumore

#### 1.3.1 Pilozytisches Astrozytom

Das pilozytische Astrozytom (PA) ist ein niedriggradiger Hirntumor vom WHO Grad 1, der häufig bei Kindern auftritt. PA werden zu den astrozytären Tumoren gezählt, die zusammen 76,4 % aller Gliome ausmachen [5]. Bei Jugendlichen waren etwa 31,5 % der Hirntumoren Gliome, davon entfielen 8,3 % aller Tumoren in dieser Altersgruppe auf das PA [5]. Die Inzidenzrate des PA ist in den jüngeren Altersgruppen höher und sinkt mit zunehmendem Alter [5]. PA zeichnen sich klinisch durch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 94,4 % und einer durchschnittlichen 10-Jahres-Überlebensrate von über 90 % aus, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate in der Altersklasse von 0-14 Jahren bei 95,7 % liegt [5]. Bei vielen Patienten genügt eine chirurgische Intervention als

kurativer Ansatz, nur selten ist eine Malignisierung zu beobachten [6]. PA sind häufig in der Mittellinie gelegen, weisen meist eine klassische Morphologie auf und wurden schon vor über 80 Jahren als eigenständige Entität anerkannt [7]. Makroskopisch zeigt sich der Tumor als eine in 60 % der Fälle mit klaren Zysten durchwachsene, derbe, grau-weiße Knolle mit einem rötlichen Zentrum. Das Wachstum ist nur gering infiltrierend, in der Regel eher verdrängend. Mikroskopisch ist ein faserreiches und zellarmes Tumorbild darstellbar, welches charakteristischerweise längliche, bipolare Zellen mit haarförmigen Fortsätzen aufweist [7, 8]. Die Fortsätze sind in der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung eosinophil und bilden die für das PA typischen Rosenthal-Fasern. Dennoch ist es möglich, dass sich ein Spektrum an morphologischen Mustern zeigt, sodass die Unterscheidung beispielsweise zu diffusen Gliomen, die man intensiver therapiert, ohne ergänzende molekulare Diagnostik schwerfallen kann [9]. PA können überall im ZNS auftreten, wobei sie am häufigsten im Kleinhirn lokalisiert sind (42 %), gefolgt von supratentoriellen Läsionen (36 %), in der Sehbahn und im Hypothalamus (9 %), im Hirnstamm (9 %) und im Rückenmark (2 %) [10]. Molekulargenetisch wurde mithilfe von „high-throughput sequencing“ gezeigt, dass es sich bei der Entstehung von PA fast immer um einzelne Veränderungen des MAPK Signalwegs handelt, die in fast allen PA nachgewiesen wurden, sodass diese Entität höchstwahrscheinlich eine „single pathway“ Erkrankung ist [11]. Der am häufigsten beobachtete Mechanismus ist eine Tandem-Duplikation eines ungefähr 2 Megabasen (mb) Fragments des Chromosoms 7q, sodass es zu einer Fusion zweier Gene kommt [12]. Hieraus entsteht ein Fusionstranskript (FusTK), welches sich aus dem N-Terminus des KIAA1549 Gens und der Kinase-Domäne von BRAF zusammensetzt. Ein Nachweis von Fusionen zwischen den Genen BRAF und KIAA1549 ist als molekulargenetischer Parameter für die Differenzierung von ZNS-Tumoren hilfreich. Die KIAA1549-BRAF-Fusion wird häufiger bei jungen Patienten mit einer infratentoriellen Tumorlokalisation beobachtet [13]. Diese ist spezifisch für PA, sodass selbst bei histologisch überlappender Morphologie verschiedener Entitäten die Diagnose PA gestellt werden kann. Neben der am häufigsten beobachteten KIAA1549-BRAF-Fusion gibt es auch noch weitere

Fusionspartner, die den MAPK Signalweg beeinflussen sowie Mutationen von BRAFV600E, KRAS und NF1. Es wurden auch Mutationen in FGFR1 [14, 15] beobachtet.

### ***Pilomyxoides Astrozytom***

Das pilomyxoide Astrozytom (PMA) ist eine Variante des PA, histologisch durch angiozentrische Ausrichtung monomorpher, bipolarer Tumorzellen mit einem prominenten myxoidem Hintergrund gekennzeichnet [16]. Es gibt kaum großangelegte Studien, die PMAs als eigenständige Entität untersucht haben. Die bisher erhobenen Daten sprechen dafür, dass das PMA dem PA genetisch ähnelt [17, 18], zum Teil die KIAA1549-BRAF Fusion zeigt [19] und ebenso identisch zum PA primär chirurgisch therapiert wird. In der 5. Auflage der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren ist daher das PMA nicht mehr als eigenständige Entität beschrieben.

### **1.3.2 *Pleomorphes Xanthoastrozytom***

Das pleomorphe Xanthoastrozytom (PXA) ist ein umschriebenes Gliom mit WHO Grad 2 und beschreibt eine sehr seltene Entität mit einem Anteil von unter 1 % aller astrozytären Neoplasien. Der Tumor betrifft häufig Kinder und Jugendliche, durchschnittlich im Alter von 22 Jahren [20] und tritt gehäuft im Temporallappen auf. Makroskopisch erscheinen die Tumoren zystisch mit einem soliden Zentrum. Mikroskopisch präsentiert sich der Tumor mit großen, pleomorphen und häufig auch mehrkernigen Zellen, einem dichten perizellulären Retikulinnetzwerk und einer Vielzahl an eosinophilen Granularkörperchen. Die Ursprungszellen sind neoplastische Astrozyten, eine immunhistochemische neuronale Differenzierung ist aber ebenfalls beobachtet worden [21-23]. Die Mitoserate bei WHO Grad 2 PXA ist niedrig (<5 Mitosen pro 10 High-Power-Fields), bei WHO Grad 3 liegt die Mitoserate darüber. Die Prognose für das PXA ist hierbei bei einer Rezidivfreiheit in 70,9 % sowie einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90,4 % [24] gut. Auch das genetische Profil spielt eine wichtige Rolle zur Diagnosefindung, da durch den oben beschriebenen pleomorphen Zellcharakter deutlich wird, dass das WHO Grad 2 PXA

histologisch, radiologisch [25] aber auch molekulargenetisch manchmal nur schlecht von einem epitheloidem Glioblastom (eGBM, WHO Grad 4) abgegrenzt werden kann [26, 27]. Häufig findet sich eine Beteiligung des MAPK Signalwegs bei der Pathogenese von PXAs, den man als ein therapeutisches Target nutzen könnte [28]. Die meisten Alterationen finden sich in BRAF, wobei BRAFV600E hierbei mit bis zu 65 % am häufigsten mutiert ist [29] und bevorzugt bei jüngeren Patienten beobachtet wird [30]. Zudem gibt es Alterationen in TERT, der FANC- und NOTCH Familie, PRKDC und NF1 [30-32]. Es wurde ebenso eine QKI-RAF1 Fusion beschrieben [33] sowie eine KRAS Mutation in einem Fall beobachtet [31]. Die oben beschriebene Schwierigkeit PXA aufgrund ihrer Morphologie von höhergradigen Tumoren wie dem epitheloiden Glioblastom zu unterscheiden, stellt noch immer eine Herausforderung dar. Ein Diskriminator sind EGFR-Amplifikationen, da sich diese bei PXA nicht finden.

## **1.4 Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumore**

### **1.4.1 Diffuses Astrozytom**

Das diffuse Astrozytom (DA) ist ein seltener Hirntumor, der am häufigsten im Frontal- und Temporallappen lokalisiert ist und 10-15 % aller astrozytären Tumoren ausmacht [34]. Das DA zählt zu den niedriggradig malignen Gliomen mit WHO Grad 2. Für DA typisch ist ein langsames, aber diffus infiltrierendes Wachstum bei hoher Zelldifferenzierung. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 35 Jahren. Das Ausmaß der Resektion ist ein wichtiger prognostischer Faktor, durch das diffuse Wachstum doch nur unvollständig möglich. Daher werden viele Patienten zusätzlich mit einer Radiatio behandelt [35]. Die mediane Überlebenszeit unter Therapie beträgt 11 Jahre. Die kontinuierliche Integration molekularer und histopathologischer Merkmale hat, wie bereits in 1.1 dargestellt, auch bei DA zu Veränderungen der diagnostischen Kriterien und Einstufung der Tumoren geführt. In der aktuellen WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren von 2021 werden diffuse Gliome anhand molekularer Daten entweder

als diffuse Gliome vom Erwachsenentyp, als diffuse hochgradige Gliome vom pädiatrischen Typ oder als diffuse niedriggradige Gliome vom pädiatrischen Typ klassifiziert. Durch die Veränderungen in der Klassifikation von diffusen Gliomen vom erwachsenen und pädiatrischen Typ wird eine genauere Diagnostik als auch Prognose ermöglicht und kann, insbesondere im Falle von diffusen Gliomen pädiatrischer Art, mögliche zielgerichtete Strategien für therapeutische Interventionen einleiten. Histologisch ist zwar kein Unterschied festzumachen, jedoch gibt es Differenzen bezüglich der Häufigkeit, der Lokalisation und dem Verlauf. Insgesamt liegt die Inzidenzrate für DA bei 0,46/100.000, bei pädiatrischen Tumoren, definiert als Patientenalter <20 Jahre bei Erstdiagnose, bei 0,24/100.000, bei Erwachsenen hingegen bei 0,6/100.000 Fällen [5]. Bei den meisten jungen Patienten bilden sich die Tumoren in den cerebralen Hemisphären, aber auch ein signifikanter Teil ist im Thalamus lokalisiert, was bei Erwachsenen sehr ungewöhnlich ist. Zudem kommt es bei kindlichen Tumoren selten zu einer Malignisierung, bei Erwachsenen hingegen findet man zu circa 75 % eine anaplastische Progression [36]. Des Weiteren sind genetische Unterschiede zu finden. Die Häufigkeit der IDH1/2-Mutation ist beim DA hoch (74,1 %) [5]. DA vom adulten Typ sind seit der 5. Auflage der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren entweder durch eine IDH-Mutation [2, 37-39], oder Mutationen in TP53 oder ATRX charakterisiert [40]. Beim pädiatrischen Typ sind typischen Veränderungen hauptsächlich in BRAF, insbesondere BRAFV600E, zu finden. Amplifikation oder Rearrangement von MYB und MYBL1 sind in circa 41 % der Fälle beobachtet worden [41]. Weiterhin findet man FGFR1-Veränderungen oder KRAS Mutationen. In einem Fall wurde eine H3 K27 M Mutation, normalerweise im pädiatrischen diffusen High-Grade-Gliom der Mittellinie vorkommend, in einem pädiatrischen DA nachgewiesen [17]. Die Bezeichnung des DA, IDH-Wildtyp, stellt eine provisorische Bezeichnung dar, da man davon ausgeht, dass diese seltene Entität wahrscheinlich nach weiteren Analysen einer anderen Entität zugeordnet und reklassifiziert werden kann [1].

### **1.4.2 Oligodendrogliom**

Das Oligodendrogliom (ODG) ist ein diffus infiltrierendes, langsam wachsendes WHO Grad 2 Gliom mit hellzelligem Erscheinungsbild. Klinische Manifestationen können Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, aber auch epileptische Anfälle sein. Die Therapie besteht vor allem in der Resektion des Tumors, wird aber häufig mit einer Radio- oder Chemotherapie kombiniert. Molekulargenetisch charakteristisch ist einer IDH1/IDH2 Mutation sowie eine 1p/19q Codeletion (LOH1p/19q) [1]. Die meisten Fälle treten zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf. Auch eine TERT-Promoter-Mutation ist eine charakteristische Veränderung [42], andere Veränderungen sind Mutationen in CIC, FUBP1, TCF12, NOTCH1 und PIK3CA [43]. Falls kein LOH1p/19q nachweisbar ist, insbesondere bei jüngeren Patienten, muss der Tumor auf andere Differentialdiagnosen überprüft werden, da es durch eine uneindeutige Morphologie schwerfallen kann, diese von anderen LGG wie einem dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumor (DNT), klarzelligen Ependyom oder PA zu unterscheiden [15, 44]. Selbst nach Ausschluss dieser Entitäten weist eine kleine Untergruppe von morphologisch oligodendroglial aussehenden Tumoren weder eine IDH 1/2 oder TERT Mutation noch die LOH1p/19q auf. Diese Subgruppe ist häufig bei Kindern und Jugendlichen anzutreffen und wird deshalb auch ODG vom pädiatrischen Typ genannt. Diese Tumoren beherbergen am häufigsten solitäre pathogene Veränderungen im FGFR1-Onkogen, die eine Aktivierung der Kinase-Domäne über Genfusion, Tandemduplizierung oder Missense Mutationen verursachen, die sich an einem von zwei Hotspots lokalisieren (P.N546K oder P.K656E) [17, 41, 45]. Es wird vermutet, dass einige der als pädiatrischen ODG diagnostizierten Tumoren andere LGG mit oligodendrogliom-artigen Anteilen sind. Beispiele hierfür sind PA, die FGFR1-Alterationen sowie -Duplikationen beherbergen [15], aber auch „polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young“ (PLNTY), die eine starke CD34 Immunopositivität sowie Veränderungen in BRAF oder Fusionen mit FGFR2 und FGFR3 zeigen [46]. Weiterhin anzuführen sind LGG mit MYB oder MYBL1 transcription factor Gen Rearrangements [17, 47], die

oligodendrogliomartige Aspekte, ohne die sonst für ODG charakteristischen genetischen Veränderungen, aufweisen.

## **1.5 Neuronale und gemischt neuronal-gliale Tumore**

### **1.5.1 Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor**

Der dysembryoplastische neuroepitheliale Tumor (DNT) zählt zu den benignen Hirntumoren (WHO Grad 1) und ist häufig mit einer therapieresistenten Epilepsie assoziiert. DNT sind in der Regel superfiziell im Großhirn lokalisiert, vor allem im Temporallappen. Es sind jedoch auch infratentorielle Lokalisationen beschrieben worden [48]. Makroskopisch imponiert der Tumor als weiches und gallertartiges Gewebe. Das histologische Spektrum von DNT umfasst eine große Anzahl an morphologischen Varianten, weshalb für die genaue Identifizierung von DNT die klinische Präsentation als auch die Bildgebung zusätzlich zur Histologie einbezogen werden muss [49]. Histopathologische Merkmale des DNT ist das spezifische glioneuronale Element, das Vorhandensein von Säulen oligodendroglialer Zellen und sogenannten „floating neurons“. Molekulargenetisch finden sich bei DNT in bis zu 30 % BRAFV600E-Mutationen [50]. Veränderungen in FGFR1 sind 2021 in die 5. Aktualisierung der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren als eine charakteristische Veränderung bei dieser Entität aufgenommen worden [2].

### **1.5.2 Gangliogliom**

Gangliogliome (GG) sind langsam wachsende, umschriebene, niedriggradige ZNS-Tumoren (WHO Grad 1), die am häufigsten mit einer chronischen, pharmakoresistenten Epilepsie, meist des Temporallappens, assoziiert sind und etwa 2 % der primären Hirntumoren ausmachen. Radiologisch zeigt sich bei GG ein zystischer Aufbau mit zentralem Tumorknoten. Histologisch finden sich bei GG teils große dysplastisch imponierende neuronale sowie gliale Zellen. Durch die zwei Tumorkomponenten zählt das GG zu den gemischt neuronal-

glialen Tumoren. Das GG wird als eine „single-pathway“ Erkrankung angesehen, da hier die im Folgenden aufgeführten genetischen Veränderungen in den allermeisten Fällen den MAPK Signalweg aktivieren [51]. Die häufigste genetische Veränderung tritt im BRAF-Gen auf, insbesondere ist hier die BRAF V600E Mutation anzuführen, die bei 10-60 % der GG nachgewiesen wurde, wobei die Schwankungen auf verschiedene Studienpopulationen sowie die anatomische Lage des GG zurückzuführen sind [29, 47, 51-54]. Die BRAF V600E Mutation ist nicht spezifisch für das GG, da diese Mutation in einem breiten Spektrum der LGG und MNGT auftritt [51]. Ferner wurden in GG, die keine BRAF Veränderung hatten, Alterationen in NF1, NTRK2, EWSR1 [41], Hotspot-Mutationen in KRAS (p.Q61K), in-frame Genfusionen von FGFR2-INA, FGFR2-KIAA1598, ERC2-RAF1- und FGFR1-TACC1 sowie FGFR1-Hotspot-Mutationen beobachtet [51]. FGFR1-Rearrangements oder Mutationen, zu denen ebenfalls die in dieser Arbeit untersuchten FGFR1-Hotspot-Mutationen zählen, sind bisher nur in einer kleinen Anzahl histologisch bestätigter GG nachgewiesen worden [51].

### **1.5.3 Papillärer glioneuroner Tumor**

Der papilläre glioneuronale Tumor (PGNT) ist eine seltene niedriggrade Tumorentität mit astrozytärer und neuronaler Differenzierung, die <0.02 % der intrakraniellen Tumoren ausmachen [55]. Klinische Anzeichen können eine Epilepsie sein, da sie typischerweise im Bereich des Temporallappens lokalisiert sind [56]. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 27 Jahren. Die Therapie der PGNT ist primär chirurgisch und Rezidive sehr selten. In der Bildgebung stellen sich PGNT als gut abgegrenzte Raumforderungen mit Kontrastmittelaufnahme dar. Histopathologische Charakteristika sind die pseudopapilläre Architektur der astrozytären Tumorzellen um hyalinisierte Blutgefäße sowie Neurozyten mit oligodendroglialer Morphologie [57, 58]. Die Translokation t(9;17)(q31;q24), die eine SLC44A1-PRKCA Onkogen-Fusion bewirkt, wurde im Großteil der PGNT beschrieben [59, 60] und mittlerweile im Anbetracht zahlreicher, nur auf der Histologie beruhender Fehldiagnosen, als

wichtigster molekularer Marker hervorgehoben [61]. Im Rahmen von Array-basierten Methylierungsanalysen wurden mehr als die Hälfte der histologisch diagnostizierten PGNTs anderen Entitäten wie DNT oder PA zugeordnet. Bei den Fusionsanalysen wurde bei eben diesen Tumoren, die kein PGNT Methylierungsprofil hatten, auch keine SLC44A1-PRKCA Fusion nachgewiesen. Diese Arbeit zeigt, dass molekulare Analysen für die korrekte Diagnose dieser seltenen Hirntumorentität notwendig sind [61].

#### **1.5.4 Rosettenformender glioneuronaler Tumor**

Der rosettenformende glioneuronale Tumor (RGNT) ist ein seltener, langsam wachsender Tumor der hinteren Schädelgrube mit Bezug zum 4. Ventrikel und betrifft häufig junge Erwachsene. Aktuell gibt es aufgrund der Seltenheit dieser Entität noch keine epidemiologischen Daten [1]. Lange Zeit wurden RGNT nicht als eigenständige Entität, sondern als DNT oder PA des Kleinhirns wahrgenommen bis 1995 erstmals histologische Unterschiede beobachtet wurden [62]. Der RGNT wurde schließlich im Jahr 2002 als eigenständige Entität in einem Fallbericht über elf Patienten beschrieben [63] und ist seit 2007 fester Bestandteil der WHO-Klassifikation [64]. Mikroskopisch besitzen RGNT eine teilweise gliale, teilweise neurozytäre Architektur [65, 66]. Der gliale Teil ist meist dominant und ähnelt in den meisten Bereichen dem PA. Der neurozytäre Teil besteht aus Neurozyten, die Rosetten und/oder perivaskuläre Pseudorosetten formen. Selten wurden auch multifokale RGNT oder RGNT in atypischen Regionen (z. B. Thalamus, Chiasma opticum, Rückenmark oder Septum pellucidum) beschrieben [67-69]. Die Prognose des RGNT ist nach Resektion sehr gut, wobei bei einigen Patienten von lokalen Rezidiven berichtet wurde [70]. Molekulargenetisch beherbergen RGNT neben Veränderungen in BRAF auch Veränderungen in PIK3CA [71, 72] oder FGFR1 [70, 73]. Seit der 5. Aktualisierung der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren von 2021 wird eine FGFR1-Mutation in Verbindung mit einer PIK3CA oder NF1-Alteration als eine der charakteristischen Veränderungen von RGNT bewertet [2].

## 1.6 FGFR1

FGFR1 ist Teil der FGFR Familie (FGFR 1-4) der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und besteht aus drei „immunoglobulin-like“ Domänen in der extrazellulären Region, einem hydrophoben Transmembranprotein sowie einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase [74-76]. Der extrazelluläre Teil des Proteins interagiert mit Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, was die down-stream Signalkaskade in Bewegung setzt und in der Beeinflussung von Mitogenese und Differenzierung fußt. FGF1 bindet für parakrine Signaltransduktion durch FGFR an Heparin-Sulfat-Proteoglycanen. Deshalb wurden die Wachstumsfaktoren der FGF-Familie früher auch als „heparin-binding growth factors“ (HBGF) bezeichnet [77]. FGFR stehen in Verbindung mit Proliferation, Differenzierung und Motilität der Zellen während der Embryogenese, im erwachsenen Gewebe sind sie involviert in Homöostase, aber auch Karzinogene [78-80]. Generell wird FGFR1 auf Proteinebene zytoplasmatisch, nukleär sowie membranös exprimiert. FGFR1 codiert für den FGFR1, der Teil des MAPK und PI3K Signalweges ist.

FGFR1 ist oft in Mamma- und Lungenkarzinomen amplifiziert und überexprimiert, ist aber auch häufiger Fusionspartner in soliden Tumoren [81]. FGFR1 spielt bei der häufigsten Krebstodesursache, dem Lungenkarzinom, eine Rolle [82]. Histologisch werden Lungenkarzinome in Adenokarzinome, großzellige und kleinzellige Karzinome sowie Plattenepithelkarzinome unterteilt. Vor allem in letzteren tritt gehäuft eine FGFR1-Amplifikation auf [83]. Abweichendes FGFR-Signaling kann die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen in den frühen Stadien sowie die Invasion und Metastasierung in späteren Stadien fördern. FGFR1 spielt auch beim Mammakarzinom eine Rolle in der Tumorprogression [84]. Die Klassifizierung und Behandlung des Mammakarzinoms basiert auf dem Hormonrezeptorstatus (Estrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR), HER2/neu) der Tumorzellen. Für eine Subgruppe von Patientinnen mit Veränderungen in FGFR1 könnten FGFR-Inhibitoren von Nutzen sein. Dovitinib (TKI258), das als FGFR1/2/3-Inhibitor wirkt, zeigte bei Brustkrebspatientinnen mit FGFR-amplifiziertem Tumorzellen antitumoröse Aktivität [85]. Mutationen in FGFR1 werden zudem mit dem

Pfeiffer-Syndrom in Verbindung gebracht, zudem mit der osteoglophonische Dysplasie und dem autosomal-dominant vererbten Kallmann Syndrom 2 [86-88]. Single-Nucleotide-Variationen, TRK-Domäne Duplikationen und Genfusionen sind zusammenfassend die drei größten Gruppen der FGFR-Alterationen in Bezug auf Malignome [41, 89-93].

In der Neuropathologie sind genetische Veränderungen im FGFR Signalweg häufig bei LGG und MNGT nachgewiesen worden, wobei hier Missense-Mutationen in FGFR1 und Tyrosinkinase(TRK)-Domäne-Duplikationen die häufigsten Veränderungen darstellen [14, 17, 41, 94], diese insbesondere bei Entitäten wie PA [14], DNT [94], RGNT [73] und extraventrikulären Neurozytomen. Zusätzlich sind FGFR1-Veränderungen auch in Glioblastomen entdeckt worden [95].

### **1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Niedriggradige Gliome (LGG) und gemischte glioneuronale Tumore (MNGT) zeigen häufig Veränderungen im MAPK Signalweg und eine überlappende Morphologie. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der immunhistochemischen und molekulargenetischen Analyse von möglichen FGFR1-Hotspot-Mutationen an den Lokalisationen c.546 und c.656 des Chromosom 8 in LGG und MNGT, die in molekularen Analysen keine ihrer häufigsten Treibermutationen zeigten (s. Tabelle 1). Hierbei soll die Inzidenz von FGFR1-Hotspot-Mutationen innerhalb der Kohorte und getrennt nach Tumordiagnose analysiert werden. Weitere Fragestellungen sind die Evaluation des FGFR1-Hotspotmutationsstatus als potenziellen Diskriminator histopathologisch uneindeutiger Fälle und die Nutzung der FGFR1-Immunhistochemie als potenzielles Werkzeug zur Identifikation FGFR1 mutierter Tumore.

## **2. Patientenauswahl, Material, Methoden und Statistik**

### **2.1 Patientenkollektiv**

#### **2.1.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs**

Die Auswahl der Patienten, bei denen ein operativer Eingriff aufgrund eines LGG oder MNGT zwischen 2000 und 2019 durchgeführt wurde, erfolgte unter Zuhilfenahme des digitalen Befundarchivs pas.net (Nexus AG, Villingen-Schwenningen) des Tübinger Instituts für Pathologie und Neuropathologie sowie der Software SAP (SAP SE, Walldorf). Hierbei wurden die Patienten anhand Diagnose, Alter und genetischem Profil der Tumore ausgewählt und anschließend pseudonymisiert. Die Proben wurden für diese Arbeit aus dem Tumorbank-Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie, Abteilung Neuropathologie, des Universitätsklinikums Tübingen zusammengetragen. Drei Tumorgewebsproben der Pyrosequenzierkohorte stammen aus dem Klinikum Stuttgart, die ihre Proben zur Referenzbegutachtung an die Neuropathologie Tübingen gesandt hatten. Die für die Arbeit ausgewählten Gewebeproben lagen als formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Blöcke vor. Die Verwendung des Materials im Rahmen dieser Arbeit wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Nr. 708/2017BO2) und es liegen für alle verwendeten Tumorbankproben Einwilligungen für die wissenschaftliche Verwendung des Restgewebes vor. Die histologische Beurteilung, molekulare Typisierung und Gradierung für jedes Sample wurden nach der 4. WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren durchgeführt [4]. Tumorlokalisierung, Geschlecht, Überlebensdauer, Tumorstatus (Primärtumor/Rezidiv) und Patientenalter wurden anhand der klinischen Akten erhoben. Aus einem Gesamtkollektiv von 681 Fällen mit LGG oder MNGT fanden sich 476 Fälle mit Einwilligung zur Forschung und wissenschaftlichen Nutzung des Restgewebes.

## 2.2 Material und Methoden

Für die Arbeit wurden folgende Materialien aus Tabelle 2 bis Tabelle 8 verwendet.

### 2.2.1 Materialien

Material	Hersteller
Antibody Diluent ZUC025-500- CE/IVD	2B Scientific, Oxfordshire, UK
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DPXnew	Merck, Darmstadt
DPXnew Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ep. T.I.P.S Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Erythrosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
EZ Prep	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
GelRed	Biotinum Fremont, CA, USA
Hämatoxylin Gill 3	Thermo-Fisher Waltham, MA, USA
Histowax	SAV, Flintsbach a. Inn
Längenstandards 50 bp	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Liquid Coverslip (LCS)	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
LoadingBuffer 5x	AL-Diagnostik, Amstetten, Österreich
Mayers Häkalaun	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Optiview CC1	Ventana Medical Systems, Grenzach-Whylen
Optiview CC2	Ventana Medical Systems, Grenzach-Whylen
PCR SingleCap 8er SoftStrips 0,2ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Phospho-FGFR1 (Tyr653, Tyr654) Antikörper	Thermo-Fisher Waltham, MA, USA
SeaKem LE Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
SuperFrost weiß ohne Druck	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
TitriplexIII	Merck, Darmstadt
TOMO IHC Adhesive Glass Slides	Matsunami, Bellingham, WA, USA
TRIS Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

*Tabelle 2: Verwendete Materialien.*

## 2.2.2 Puffer und Lösungen

Reagenz	Hersteller
TRISbase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TitriplexIII	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt

Tabelle 3: Reagenzien für 10xTBE Buffer.

Arbeitsschritt	Reagenz	Menge	Bemerkungen
1.	TitriplexIII	37,2 g	unter Erhitzen in
2.	A.dest	200 ml	lösen
3.	NaOH	4 g	dazugeben
4.	pH Wert mit 40 % NaOH auf 8,0 einstellen		

Tabelle 4: Herstellung 0,5 m EDTA pH 8,0.

Arbeitsschritt	Reagenz	Menge	Bemerkungen
1.	TRIS base	108 g	
2.	Borsäure	55 g	
3.	A.dest	800 ml	lösen
4.	0,5 m EDTA pH 8,0	20 ml	dazugeben
5.	auf 1000 ml mit A. dest auffüllen		

Tabelle 5: Herstellung 10x TBE-Buffer.

Reagenz	Hersteller
Agarose Seakem Le	Biozym, Hessisch Oldendorf
50 bp Ladder	ThermoScientific, Waltham, MA, USA
GelRed	Biotinum, Fremont, CA, USA
5x Loading Buffer	AL-Diagnostik, Amstetten, Österreich
10x TBE Buffer	siehe Tabelle 5

Tabelle 6: Reagenzien zur Herstellung eines Agarosegels.

### 2.2.3 Kits

Kit	Hersteller
blackPREP FFPE DNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
HotStarTaq Plus Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
OptiView DAB IHC Detection Kit	Roche, Grenzach-Whylen
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden
PyroMark Q24 Gold Q24 Reagents	Qiagen, Hilden
RNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden

*Tabelle 7: im Rahmen der Arbeit genutzte Kits.*

## 2.2.4 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
E-Box VX5 Transilluminator	TLT Technical equipment, Hanoi, Vietnam
Eppendorf Zentrifuge 5415 D	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
flexcycler PCR-Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena
JMP Software v15.2	SAS Institute, Cary, North Carolina, USA
Mikrotom HM 355 S	Fisher-Scientific, Schwerte
MiniPro 300V Power Supply, Gelelektrophoresesystem	major science, Saragota, Kalifornien, USA
Nanodrop	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCB 1000-1 Präzisionswaage	Kern&Sohn, Balingen-Frommern
peqstar 2x Universal VWR	peqlab, Darmstadt
Pyromark Q24 Sequencing instrument	Qiagen, Hilden
PyroMark Q24 Software	Qiagen, Hilden
PyroMark Vacuum-Workstation Workstation	Qiagen, Hilden
Techne® Dri-Block-Heizer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ventana BenchMark IHC	Roche, Grenzach-Whylen
VisionCapt	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Bruchsal
Image Access	Imagic, Glattbrugg, Schweiz

*Tabelle 8: im Rahmen der Arbeit genutzte Geräte und Software.*

### 2.2.5 Primer

In Tabelle 9 bis Tabelle 14 werden alle in dieser Arbeit genutzten Primer alphabetisch aufgelistet.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
BRAFv600E M13 F	TGTAAAACGACGGCCAGTA CTGTTTTCCTTTACTTACTA CACCTC (45)	9,28	267	19,5	72,2	42,2 %
Q24 BRAFreVBIO	CTAGTAACTCAGCAGCATCT CAGG (24)	1,8	54	6,8	62,7	50 %
Q24 BRAF for	TAGGTGATTTTGGTCTAGCT ACAG (24)	5,4	152	20,4	59,3	41,7 %
Q24 SeqBRAF	TGATTTTGGTCTAGCTACA (19)	3,0	85	14,7	50,2	36,8 %

Tabelle 9: BRAFV600E Primer.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
Q24IDH1for- BIO	[BIO]GGTCTTCAGAG AAGCCATT (19)	5,22	154	24,7	54,5	47,4 %
Q24- IDH1rev	GCAAAATCACATTATTGCCA AC (22)	6,4	169	25,3	54,7	36,4 %
Q24- SeqIDH1	TGATCCCCATAAGCAT (16)	4,0	110	22,9	46,6	42,8 %
Q24-IDH2for	TGTCCTCACAGAGTTCAAGC (20)	3,5	99	16,3	57,3	50 %
Q24- IDH2revBIO	[BIO]CTAGGCGAG GAGCTCCAGT (19)	6,56	197	31,4	61,0	63,2 %
Q24- SeqIDH2	AGCCCATCACCATTG (15)	3,6	103	22,8	47,8	53,3 %

Tabelle 10: IDH 1/2 Primer.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
BRAFFusTK WT fw	TTGTGACTTTTGTGCGAAAGC TGC (23)	14,0 2	405	57,3	58,9	43,5 %
BRAFFusTK WT rv	AAGGGGATGATCCAGATGTT AGG (23)	11,7 8	309	43,0	60,6	47,8 %
BRAFFusTK A fw	AAACAGCACCCCTTCCCAG G (20)	9,05	255	42,4	61,4	60 %
BRAFFusTK A rv	CTCCATCACCCAGAAATCCT TG (22)	12,9 7	373	56,6	60,3	50 %
BRAFFusTK B fw	AAACAGCACCCCTTCCCAG G (20)	8,87	250	41,6	61,4	60 %
BRAFFusTK B rv	GTTCCAAATGATCCAGATCC AATTC (25)	7,78	214	28,3	59,7	40 %
BRAFFusTK C fw	CGGAAACACCAGGTCAACG G (20)	6,25	165	26,9	61,4	60 %
BRAFFusTK C rv	CTCCATCACCCAGAAATCCT TG (22)	12,3	354	53,6	60,3	50 %

*Tabelle 11: 1549 BRAF-KIAA-Fusionstranskript Primer.*

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
D19s718 fw	CTGAGGGAACAGCAAGGTA A (20)	6,92	175	28,1	57,3	50 %

*Tabelle 12: 1p/19q Codeletion Primer.*

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
TERT M13 forw	TGTA AACGACGGCCAGTC AgCgCTgCCTgAAACTC (36)	8,9	247	22,4	74,0	55,6 %
TERT M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACgTC CTgCCCCTTCACCTT (35)	7,2	210	19,8	73,0	54,3 %
Q24TERTSe qshor	GCCCCGTCCCGACCC (15)	3,3	109	24,5	61,5	86,7 %
Q24- TERTrevBIO	GCGCTGCCTGAAACTCGC (18)	3,5	111	18,9	60,5	66,7 %
Q24-TERT for	CGTCCTGCCCTTCACCT (18)	2,1	70	13,1	60,5	66,7 %
Q24 SeqTERT	CCCGCCCCGTCCCGA (15)	1,5	49	11,1	61,5	86,7 %

Tabelle 13: TERT Primer.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
Q24FGFR1(c .546) fw	CGGACGCAACAGAG AAAGACTT (22)	2,71	69	10,2	60,3	50 %
Q24FGFR1(c .546) rev BIO	[BIO]CCCAGATCCCGAG ATAACACA (21)	4,04	115	17,1	59,8	52,4 %
Q24-Seq- FGFR1(c.54 6)	AAFCATAAGAATATCATCAA (20)	2,34	57	9,3	47,0	25 %
Q24- FGFR1(c.65 6) fw	ACGGGACATTCACCACATC (19)	2,14	59	10,3	56,7	52,6 %
Q24FGFR1(c .656) rev-BIO	[BIO]CACCCCACTCCTTGCT TC (18)	5,41	189	33,1	58,2	61,1 %
Q24-Seq- FGFR1 (c.656)	CATTCACCACATCGACT(17)	1,13	32	6,3	50,4	47,1 %
FGFR1	Dispensation Order	Sequence to analyse				
c.546	GACTGCTGGC	1.G/CCTGCTGGGGGCCTGGCA 2.A/CCTGCTGGGGGCCTGGCA				
c.656	ACTAGTAAGAGACT	ACTATAAAG/AAGACAACCAACGTGAGTGC CGACAA				

Tabelle 14: FGFR1 Primer.

### **2.2.6 Herstellung der Paraffinblöcke und -schnitte**

Das Tumorgewebe wurde nach Entnahme und Fixation über zwölf Stunden in Formalinlösung (4 %) in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 %) entwässert. Anschließend wurde das Gewebe in Histowax-Paraffin positioniert und eingebettet. Im nächsten Schritt wurden mit dem Mikrotom HM 355 S (Fisher-Scientific, Schwerte) Paraffinschnitte (Dicke für IHC: 3 µm; Dicke für DNA/RNA-Isolation: 10 µm) angefertigt. Die Schnitte wurden daraufhin im Wasserbad auf leere Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, für HE, TOMO IHC Adhesive Glass Slides, Art. Nr. TOM-1190, Bellingham, WA, USA für FGFR1) aufgezogen und im Wärmeschrank bei 55°C getrocknet. Um die Leerschnitte nun für histologische und immunhistochemische Färbungen nutzen zu können, folgten weitere Arbeitsschritte (s. 2.2.7), für welche eine stufenweise Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol notwendig war.

### **2.2.7 Histologiefärbung und Immunhistochemie**

#### 2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist ein weit verbreitetes Färbeverfahren in der Histologie, die gerne als Übersichtsfärbung zur Erstbeurteilung genutzt wird. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau, wobei man insbesondere die Zellkerne mit enthaltener Desoxyribonukleinsäure und das raue Endoplasmatische Retikulum zur Darstellung bringen kann. Eosin hingegen färbt acidophile Strukturen rot, hierbei handelt es sich vor allem um Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte Endoplasmatische Retikulum, Kollagen sowie Keratin. Im ersten Arbeitsschritt der Herstellung einer HE-Färbung findet die oben erwähnte Entparaffinierung der Schnitte in drei unterschiedlich stark konzentrierten Xylollösungen für je zehn Minuten statt, danach werden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe mit zweimalig 100 %iger, einmalig 96 %iger und 70 %iger Ethanollösung für je fünf Minuten belassen. Im Anschluss werden die Objektträger mit A. dest. gespült und dann

zur Anfärbung eine Minute in Hämatoxylin-Lösung gegeben. Nach dem Färbeschritt wird der Schnitt erneut zweimalig mit A. dest. gespült und zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser durch den pH-Wechsel gebläut. Bevor der Schnitt in die Gegenfärbung mit 0,1 %iger Erythrosin B Lösung getaucht wird, wird er erneut mit A. dest. abgespült. Der vorletzte Schritt, die Entwässerung des Objektträgers, wird mittels aufsteigender Ethanol- (70 %, 96 %, 2x 100 %) und Xylolreihe durchgeführt. Zuletzt erfolgt die Eindeckung des gefärbten Schnittes mit dem DPXnew Mounting Medium und der Auflage des Deckglases. In der vorliegenden Arbeit wurden neue HE-Schnitte ausschließlich für Blöcke mit im Vergleich zum ursprünglich angefertigten HE-Schnitt abweichender Schnittfläche hergestellt, um die zu untersuchenden Bereiche auf dem neuen HE-Schnitt nach histologischer Beurteilung hinsichtlich repräsentativen Tumoranteil durch den Betreuer exakt zu kennzeichnen und Gewebe für die anschließende Weiterverwendung in Tissue-Micro-Arrays (TMA) gezielt entnehmen zu können.

#### 2.2.7.2 FGFR1-Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Standardmethode der Pathologie, die den Nachweis von Antigenen (Ag) in Gewebsschnitten ermöglicht. Das zugrundeliegende Prinzip der IHC ist die Detektierung von Ag in Gewebeschnitten mittels spezifischer Primärantikörper. Die herbeigeführte Antikörper (AK)-Ag-Bindung wird anschließend durch eine Farbreaktion für die lichtmikroskopische Beurteilung sichtbar. Die Paraffinschnitte werden mit AK behandelt, die an spezifischen Epitope im Gewebe binden. An die AK ist ein Marker gekoppelt, sodass die gebundenen Epitope darstellbar werden. Als Marker dienen Enzyme, Radionuklide aber auch Edelmetalle. Es besteht auch die Möglichkeit Fluoreszenzmarker zu nutzen (Fluoreszenz-IHC). In dieser Arbeit wurde die FGFR1-Proteinexpression immunhistochemisch unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Phospho-FGFR1 (Tyr653, Tyr654) menschlichen Ursprungs nachgewiesen (RRID: AB\_1500112, #44-1140G, Thermo-Fisher Waltham, MA, USA). Immunhistochemisch wird phospho-FGFR1 im Tumorgewebe zytoplasmatisch sowie membranös

exprimiert [15]. Zur Etablierung der IHC wurden zu Beginn an Brustkrebsgewebe (her2/neu+), welches als Positivkontrolle diente, zwei verschiedene Vorbehandlungen getestet, zum einen Optiview Cell Conditioning 1 (CC1) einem EDTA-basierten Puffer, zum anderen Optiview Cell Conditioning 2 (CC2), einem Citrat-basierten Puffer (beide von Roche, Grenzach-Whylen), wobei die Vorbehandlung mit CC2 kein auswertbares Färbeergebnis erbrachte. Die CC1 vorbehandelte Probe zeigte hingegen eine spezifische Anfärbung der Tumorzellen, weshalb alle nachfolgenden Proben mit CC1 vorbehandelt wurden. Anschließend wurden Färbungen in abnehmender Konzentration (1:50, 1:100, 1:200, 1:400) angefertigt und zur Kontrolle an Prostataadenokarzinomgewebe, das ebenfalls FGFR1 exprimiert, hier in aufsteigender Konzentration (1:400, 1:200) getestet (s. Tabelle 15). Abschließend wurden acht Leerschnitte von zufällig ausgewählten Fällen der Kohorte mit einer Verdünnung von 1:200 sowie 1:100 gefärbt. Die Konzentration des AK von 1:100 erbrachte die am besten zu diskriminierende Anfärbung von gesundem Gewebe zu Tumorzellen, weshalb diese gewählte Konzentration final für alle Proben des Kollektivs genutzt wurde. Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit alle Schnitte mit dem OptiView CC1 (Roche, Grenzach-Whylen) 32 Minuten vorbehandelt und für 32 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 1:100 Verdünnung des FGFR-Phospho-Antikörpers (Y653/Y654) inkubiert. Alle Objektträger wurden anschließend für zwei Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Versuch	Gewebe	Vorbehandlung/Dauer	AK-Dauer/Temp.	Verdünnung
1	Mamma	CC1/32'	32'/RT	1:50
2	Mamma	CC2/32'	32'/RT	1:50
3	Mamma	CC1/32'	32'/RT	1:100
4	Mamma	CC1/32'	32'/RT	1:200
5	Mamma	CC1/32'	32'/RT	1:400
6	Prostata	CC1/32'	32'/RT	1:400
7	Prostata	CC1/32'	32'/RT	1:200
8	Proben Kollektiv	CC1/32'	32'/RT	1:200
9	Proben Kollektiv	CC1/32'	32'/RT	1:100

*Tabelle 15: Etablierung der IHC mit dem phospho-FGFR1 (Y653, Y654) Antikörper, wobei die Behandlung aller Proben des Kollektivs gemäß Versuch 9 (grau hinterlegt) durchgeführt wurde.*

Die Proben wurden mithilfe eines Olympus VANOX AHB3 Mikroskop begutachtet und in zwei- und zehnfacher Vergrößerung quantitativ und qualitativ ausgewertet. Die in dieser Arbeit abgebildeten Aufnahmen wurden mit einem Mirax Scanner und Mirax Viewer (Firma Zeiss, Göttingen) gemacht.

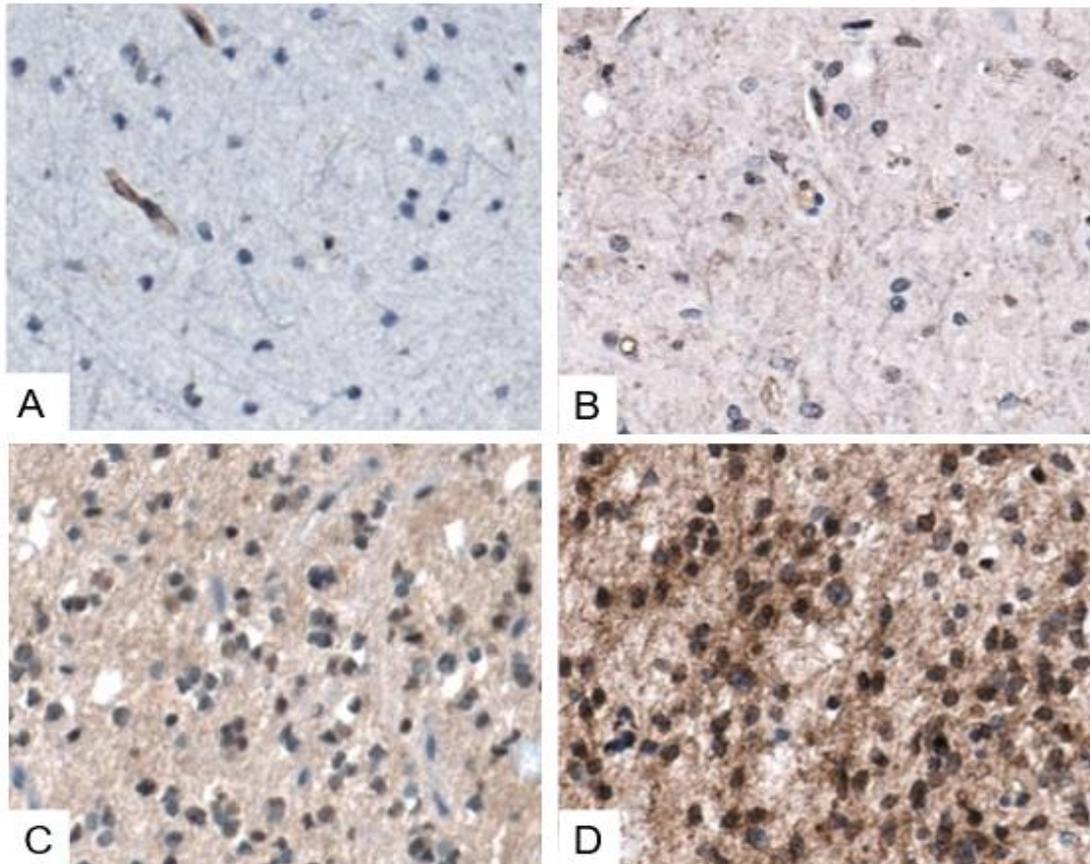


Abbildung 1: FGFR1 Immunhistochemische Färbebeispiele (AK #44-1140G, Verdünnung 1:100) in LGG/MNGT-Tumorgewebe in 10facher Vergrößerung A Score 0=keine Anfärbung B Score 1=schwache Anfärbung C Score 2=mittlere Anfärbung D Score 3=starke Anfärbung.

Diese wurden anschließend mit dem Programm Image Access Enterprise (Glattbrugg, Schweiz) bearbeitet. Zur Beurteilung der Proben wurde ein Immune Reactivity Score (IRS) angewandt. Die FGFR1-Färbeintensitäten wurden wie in Abbildung 1 als 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung), 2 (moderate Färbung) und 3 (starke Färbung) bewertet. Als Positivkontrollen dienten Mamma- und Prostatakarzinomstanzen mit einem IRS von 12. Als Negativkontrolle wurde gesundes Kleinhirngewebe auf jeden TMA aufgebracht, welches einen IRS von 0 zeigte. Zusätzlich wurde die positive Färbung bei

Tumoren wie folgt quantifiziert: 1 (bis zu 24 % der Tumorzellen positiv), 2 (25–50 % der Tumorzellen positiv), 3 (51–75 % der Tumorzellen positiv) und 4 (mehr als 75 % der Tumorzellen positiv). Der Score der Färbeintensitäten wurden mit dem Score der Färbequantifizierung zu einem kombinierten Immune Reactivity Score (IRS) von 0 bis 12 multipliziert. Extrazelluläre Anfärbungen, Endothelien, Meningen, Nekrosen sowie verkalkte Areale, die nicht eindeutig dem Zytoplasma sowie dem Zellkern des Tumors zuzuordnen waren, wurden nicht bewertet. Gefärbte Areale, die weniger als ein Prozent des Tumorgewebes der Stanze oder des Objektträgers ausmachten, wurden als nicht-immunreaktiv (IRS 0) gewertet.

### **2.2.8 Tissue- Microarray**

Bei Tissue-Microarrays (TMA) werden ausgestanzte Gewebezyylinder geeigneter, in Paraffin eingebetteter Proben (Donor) auf einem neuen Paraffinblock (Akzeptor) zusammengetragen. Je nach Größe der Stanze können zwischen 50 und 400 Proben auf einem Block gleichzeitig untersucht werden. Für die TMA-Herstellung wurde der Manual Tissue Microarrayer (Model MTA-1, Serial No: MA-1777, Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA) (s. Abbildung 2) und Paraffinleerblöcke verwendet.

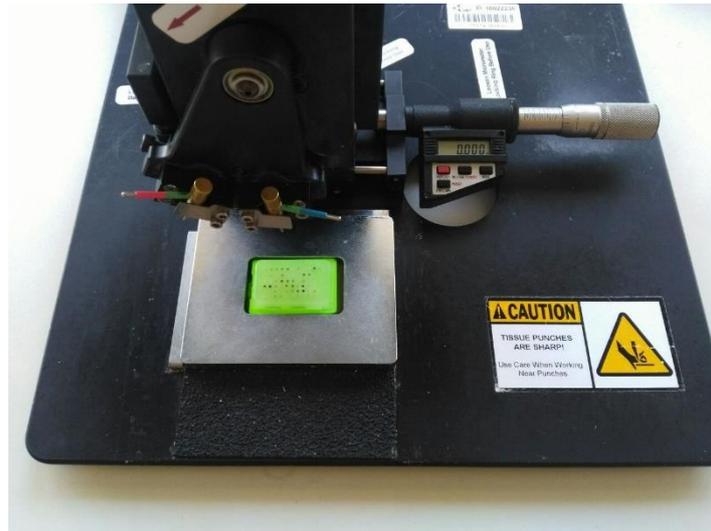


Abbildung 2: Mikrotom MTA-1 zur Herstellung eines TMA mit eingespanntem Akzeptorblock.

Zuerst wurde im nur aus Paraffin bestehenden Akzeptorblock ein Loch mit 1,0 mm Durchmesser gestanzt. Im Anschluss erfolgte die mit dem vorher markierten HE-Schnitt abgegliche Gewebeentnahme an der entsprechenden Stelle aus einem Tumor-Donorblock. Die nun entstandene Stanze wurde dann vorsichtig in die vorher angefertigte Lücke im Paraffinblock eingebracht. Somit entstanden, im Abstand von 2,5 mm zur nächsten Gewebestanze, durch Wiederholung der einzelnen Arbeitsschritte die TMA (s. Abbildung 3). Insgesamt wurden 112 Tumorgewebsblöcke aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Tübingen genutzt.

Bei 106 Proben stand ausreichend Gewebe für die FGFR1-Färbung zur Verfügung. Sofern reichlich Material vorhanden war, wurden von jedem Tumor zwei Proben entnommen. Falls nicht ausreichend Material vorhanden war, wurde entweder nur eine Stanze genommen oder im Falle sehr geringer Mengen ein Flächenschnitt angefertigt und auf die Stanze verzichtet. Insgesamt standen so 134 Gewebestanden zur immunhistochemischen Auswertung bereit.



Abbildung 3: von l. nach r.: HE-Schnitt mit Markierung - bereits an Markierung gestanzter Paraffinblock (Donorblock)- TMA, der die so gewonnenen Stenzen aufnimmt (Akzeptorblock).

Es wurden 45 Objektträger (4 TMA/ 41 Flächenschnitte) gefärbt und ausgewertet. Auf TMA 1 befanden sich 19 PA (15P/4R), auf TMA 2 15 DNT (12P/3R), auf TMA 3 25 Tumoren, die sich aus 10 GG (10P/0R), 6 DA (6P/0R), 3 RGNT (3P/0R), 3 PXA (2P/1R) und drei Tumoren mit jeweils deskriptiver Diagnose (3P/0R). Auf TMA 4 befanden sich 6 Tumorstanzen, davon 2 GG (2P/0R) und 4 DA (4P/0R). Auf jedem TMA befanden sich zusätzlich eine Negativkontrolle aus der Molekularzellschicht eines gesunden Kleinhirns sowie ein Sample aus einem her2/neu positiven Mammakarzinom, welches als Positivkontrolle für die IHC mit dem phospho-FGFR1-Antikörper verwendet wurde. Zur Vorbereitung der TMA für die HE-Färbung sowie IHC wurde mit dem Mikrotom eine 10 µm dicke Schicht abgetragen, um alle Stenzen auf die identische Höhe zu bringen. Abschließend wurden 3 µm dicke Leerschnitte angefertigt, die für IHC genutzt wurden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 45 Objektträger (4 TMA/ 41 Flächenschnitte) gefärbt und anschließend ausgewertet.

### **2.2.9 DNA-Isolierung**

Die DNA-Isolierung dient dazu, DNA aus biologischem Material zu separieren, sie in möglichst reiner Form vorliegen zu haben und für molekulargenetische Analysen nutzen zu können. Für die Isolation kann man entweder gezielt

Material von 10 µm dicken Leerschnitten der formalinfixierten und in Paraffin- eingebetteten Gewebeproben (FFPE) entnehmen (Makrodissektion) oder den gesamten Leerschnitt nutzen. Der gesamte Schnitt wurde genutzt, wenn wenig Tumorgewebe vorhanden war. Je nach Ausgangsmenge der Probe wurden zwischen drei und zehn Leerschnitten für die DNA-Isolation angefertigt. Dann wurde die DNA lysiert, gebunden, gewaschen, von letzten Reagenzien befreit und zuletzt eluiert. Für die DNA-Isolation wurde das blackPREP FFPE DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena) gemäß Herstellerhandbuch verwendet. Das Kit ist für formalinfixierte Paraffinpräparate konzipiert. Anfangs wird das vorbereitete Material mit 400 µl Lyse-Puffer und 40 µl Proteinase-K gemischt und lysiert. Danach werden die Proben für jeweils 60 Minuten bei 65°C und 90°C im Thermomixer kontinuierlich geschüttelt und erhitzt. Nach dem Erwärmen kühlt das Material für fünf Minuten bei Raumtemperatur aus. Anschließend wird die Probe bei Maximalgeschwindigkeit (13,2 Tausend (k) rounds per minute (rpm)) für zwei Minuten zentrifugiert. Der Schritt dient der groben Trennung des Paraffins von der im Lysepuffer gelösten DNA, sodass nach dem Zentrifugieren mit dem flüssigen Teil der Probe weitergearbeitet werden kann. Der flüssige Teil wird abpipettiert, mit 400 µl Ethanol absolut (abs.) gemischt und in den Spin Filter, der in einem Receiver Tube steckt, gegeben. Der Spin Filter dient zum Binden der DNA, das Receiver Tube fängt den Überstand in den folgenden Schritten auf. Nach dem Binden der DNA an den Spin Filter wird die Probe in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit Washing Buffer C (500 µl), Washing Buffer BS (650 µl) und Ethanol abs. (650 µl) gewaschen. Zwischen jedem Waschgang wird die Probe für eine Minute bei 12k rpm zentrifugiert und der Überstand im Receiver Tube verworfen. Für jeden Waschgang setzt man ein neues Receiver Tube ein. Zuletzt wird die Probe für drei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um eventuelle Reste des Ethanol abs. zu entfernen. Der nächste Schritt ist die Elution der DNA vom Spin Filter durch den Elution Buffer. Dafür wird der Spin Filter in ein Elution Tube gesteckt, welches gleichzeitig für die dauerhafte Aufbewahrung der isolierten DNA dient. Beim Lösen der DNA vom Spin Filter wird die Menge des Elution Buffers je nach Ausgangsmaterial individuell bestimmt und lag bei den in dieser Arbeit isolierten

Proben zwischen 25 und 40 µl. Der Elution Buffer wird auf den Spin Filter pipettiert und für zwei Minuten inkubiert. Danach wird die Probe erneut für eine Minute bei 12k rpm zentrifugiert und somit die isolierte DNA vom Spin Filter gelöst und im Elution Tube asserviert. Der Spin Filter wird nach diesem Schritt verworfen. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde anschließend mit dem NanoDrop Microvolume Spectrophotometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) gemessen und evaluiert. Hierfür setzt man nach Tarieren des Gerätes mit 1 µl Elution Buffer 1 µl der isolierten DNA-Probe ein und erhält die gewünschten Parameter (Konzentration, Ratio 260:280 (Richtwert 1,8=rein), Ratio 260:230 (2.0-2.2)). Hieraus lässt sich dann sowohl die Qualität der isolierten DNA als auch die benötigte Menge an DNA für die PCR ableiten. DNA-Proben, die in dieser Arbeit genutzt wurden, waren zum Großteil vorher für Routineuntersuchungen bekannter Treibermutationen isoliert und die restliche DNA bei 4°C aufbewahrt worden, zum Teil wurde DNA aber auch für die Arbeit neu isoliert (n=27).

### **2.2.10 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden) genutzt. Die Durchführung fand gemäß des Herstellerhandbuchs statt. Die isolierte RNA wurde anschließend für die Vervollständigung des molekularen Profils der Tumore bezüglich des BRAF1549K1AA Fusionstranskriptstatus verwendet. Zunächst muss das Paraffin aus frisch geschnittenen FFPE Gewebeschnitten durch Behandlung mit einer Deparaffinisierungslösung entfernt werden. Anschließend wurde das Gewebe in einem Lysepuffer, der 10 µl Proteinase K enthält, für 15 Minuten bei 56°C und anschließend für 15 Minuten bei 80°C inkubiert, um die RNA aus den Schnitten zu lösen. Es folgt eine DNase-Behandlung (10 µl DNase-I Stocklösung), wodurch alle genomische DNA zersetzt werden soll. Als nächstes wird das Lysat mit 320 µl RBC Buffer gemischt. 720 µl Ethanol abs. werden zugesetzt, um geeignete Bindungsbedingungen zu schaffen. Die Probe wird dann auf eine RNeasy MinElute Spinsäule aufgetragen, an dessen Membran die Gesamt-RNA bindet

und hier mehrfach mit 500 µl Buffer RPE gewaschen wird. Der Überstand wird nach jeder Zentrifugation verworfen. Der vorletzte Schritt ist die Trocknung der RNA durch Zentrifugation für fünf Minuten bei Maximalgeschwindigkeit, sodass sich weder Buffer- noch Ethanolreste an der Säule befinden. Zuletzt wird die RNA durch Zugabe von 14-30 µl RNase-freiem Wasser und durch Zentrifugation von der Membran eluiert (s. Abbildung 4).

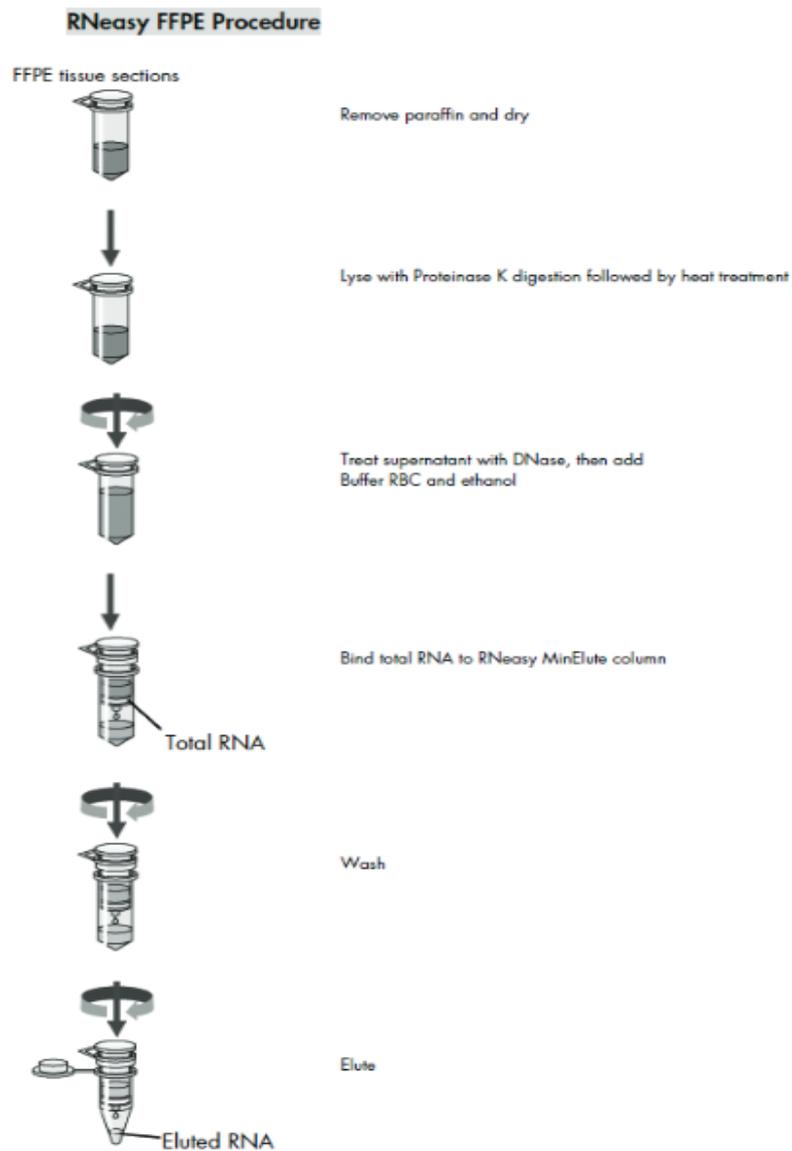


Abbildung 4: Schematische Darstellung der RNA-Isolation mittels des FFPEasy Kits (Qiagen, Hilden) aus dem zugehörigen Handbook 07/21 S.10 [www.qiagen.com/HB-0375](http://www.qiagen.com/HB-0375).

### **2.2.11 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, um DNA in vitro zu amplifizieren und zählt zu den wichtigsten Methoden in der Molekularpathologie. Die Methode wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen [96]. Der zu vervielfältigende Bereich der DNA wird auch als Amplikon bezeichnet, die bei der PCR entstehenden Produkte als Amplifikate. Die PCR läuft in drei Schritten ab: der Denaturierung, der Primerhybridisierung (Annealing) und der Elongation. Zuerst wird die isolierte Doppelstrang-DNA (dsDNA) erhitzt, um die Stränge, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden, aufzuspalten. Danach wird die Temperatur für einen definierten Zeitraum auf einen bestimmten und auf die Primer abgestimmten Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt. Die Temperatur wird hierbei durch die Länge und die Sequenz der Primer kalkuliert und kann während der Etablierung des Verfahrens optimiert werden. Bei zu niedriger Temperatur könnten sich die Primer anderweitig an teilweise komplementäre Sequenzen anlagern und so zu unspezifischen Produkten führen. Bei zu hoher Temperatur ist die thermische Bewegung der Primer womöglich so groß, dass sie nicht richtig binden können, sodass es zu gar keiner oder ineffizienter Produktbildung kommt. Die optimale Temperatur für die Primer liegt im Durchschnitt 5–10°C unter dem gemeinsamen Schmelzpunkt der Primersequenzen. Nachdem die Primer gebunden wurden (Annealing), folgt als nächster Schritt die Elongationsphase. Hierbei werden die fehlenden Stränge von der DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer bildet hierbei den Anfang des neuen Einzelstrangs. Anschließend werden die Schritte wiederholt, was zu einer exponentiellen Steigerung der PCR-Produkte führt. Als Ausgangsmaterial wurde in dieser Arbeit zuvor isolierte DNA aus dem zu untersuchenden Probenkollektiv verwendet. Für die PCR wurde das PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden) genutzt, das für Pyrosequenzierungsanalysen optimiert ist, die im Anschluss an die PCR durchgeführt wurde. Für die PCR von c.546 wurde unter der Sterilbank ein

Mastermix nach dem Schema in Tabelle 16, für die PCR von c.656 gemäß Tabelle 17 angesetzt. Die angegebene Menge gilt jeweils pro Probe.

Komponente	Volumen pro Probe [ $\mu$ l]
PyroMasterMix	12,5
Q24-FGFR1 c.546 forward (10pmol/ $\mu$ l)	0,5
Q24-FGFR1 c.546 reverse (10pmol/ $\mu$ l)	0,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
RNase-freies Wasser	variabel

*Tabelle 16: Schema des Mastermixes für die PCR ohne template-DNA von c.546.*

Komponente	Volumen pro Probe [ $\mu$ l]
PyroMasterMix	12,5
Q24-FGFR1 c.656 forward (10pmol/ $\mu$ l)	0,5
Q24-FGFR1 c.656 reverse (10pmol/ $\mu$ l)	0,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
RNase-freies Wasser	variabel

*Tabelle 17: Schema des Mastermixes für die PCR ohne template-DNA von c.656.*

Die Menge an Mastermix wurde anhand der Anzahl der verwendeten Proben berechnet, wobei immer das Volumen für eine zusätzliche Probe angesetzt wurde, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Menge an Mastermix vorhanden ist. Die folgenden Schritte fanden unter der Sterilbank statt. Nach Pipettieren des Mastermixes wurden pro Reaktionstube 16  $\mu$ l Mastermix vorgelegt, in die danach RNase-freies Wasser zugegeben wurde. Für die Proben wurde zuvor anhand der gemessenen DNA-Konzentration berechnet, wieviel Volumen benötigt wird, um 150 ng template-DNA in die PCR einsetzen zu können. In Abhängigkeit davon wurde RNase-freies Wasser unter der Sterilbank vorgelegt, um in Summe ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l pro Reaktionstube zu erhalten. Falls die Konzentration der DNA theoretisch ein größeres Volumen als 9  $\mu$ l verlangte, wurden unabhängig davon maximal 9  $\mu$ l DNA eingesetzt, um das maximale Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l für die PCR nicht zu überschreiten. Für die No-Template-Kontrolle (NTC), die Negativkontrolle für

die PCR, wurden zu 16 µl Mastermix ausschließlich 9 µl RNase-freies Wasser zugegeben, sodass man auch hier ein Gesamtvolumen von 25 µl erhielt.

Die Temperatur ( $T_M$ ) für FGFR1 (c.546) beträgt 60,05°C, weshalb die PCR für FGFR1 c.546 erfolgreich analog des IDH2 Routine-Protokolls (s. Tabelle 18) etabliert werden konnte, bei dem die Annealing-Temperatur bei 59°C liegt.

PCR-Protokoll FGFR1 c.546			
Schritte	Dauer ('=min, ''=s)	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Initialisation	2'	95	} 45x
Denaturation	30''	95	
Annealing	40''	59	
Elongation	50''	72	
Finalisation	5'	72	

Tabelle 18: PCR-Protokoll FGFR1 (c.546) analog zur IDH2 Routine PCR.

Für FGFR1 (c.656) liegt die  $T_M$  bei 57,1°C, weshalb hier das IDH1 Routine-Protokoll (s. Tabelle 19), bei dem die Annealing-Temperatur bei 56°C liegt, getestet wurde und Erfolg zeigte.

PCR-Protokoll FGFR1 c.656			
Schritte	Dauer ('=min, ''=s)	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Initialisation	2'	95	} 45
Denaturation	30''	95	
Annealing	40''	56	
Elongation	50''	72	
Finalisation	5'	72	

Tabelle 19: PCR-Protokoll FGFR1 (c.656) analog zur IDH1 Routine PCR.

Für alle PCR-Durchläufe wurde der Thermocycler peqSTAR 2X Universal Gradient (VWR, Darmstadt) verwendet. Der Cycler erhitzt und kühlt die in ihm befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstung zu verhindern, wurde ein dicht

schließendes Reaktionsgefäß verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Taq-Polymerase aus dem PyroMark PCR Kit eingesetzt.

### **2.2.12 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um verschiedene Arten von Molekülen zu trennen, häufig genutzt für Auftrennung von Gemischen aus Proteinen, RNA oder DNA. In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation der DNA-Proben in der vorangegangenen PCR genutzt. Aufgrund der negativen geladenen Phosphatgruppen der DNA kann diese in einem elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt werden. Eine häufig genutzte Variante ist die Agarosegelelektrophorese, bei der die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode von der Größe der Nukleinsäurefragmente und der Dichte der Agarosegelmatrix abhängig ist. Die Längenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt durch Längenmarker, welche eine standardisierte DNA-Fragment-Menge beinhalten und somit auch eine ungefähre Quantifizierung der DNA-Proben ermöglichen. Ein Agarosegel wird durch Erhitzen von 1 g Agarose in 50 ml 1x TBE-Buffer hergestellt. Die Lösung wird nach Zugabe von 2 µl GelRed (Biotinum Fremont, CA, USA) in eine Gelkammer gegossen (s. Tabelle 6). Nach 30 Minuten Abkühlen bildet sich in der Gelgießvorrichtung eine feste Agarosematrix, in der nach Entfernen der zu Beginn eingesteckten Plastikämme 5 mm große Probenaschen freiliegen. In die erste Geltasche werden 3 µl 50 bp Längenmarker (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) als Orientierung eingegeben. Nach Verdichten von jeweils 4 µl einer DNA-Probe mithilfe von 2 µl 5x Loading Buffer werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Für 30 Minuten wurde in der mit 1x TBE-Buffer gefüllten Wanne eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Fragmente wurde GelRed als DNA-interkalierender Farbstoff zugesetzt und unter UV-Licht auf einem abgeschirmten E-Box VX5 Transilluminator (TLT Technical equipment, Hanoi, Vietnam) sichtbar gemacht und fotografiert. Bildbearbeitung und -

dokumentation erfolgte mittels der Software VisionCapt (Vilber, Collégien, Frankreich).

Die PCR-Produkte für c.546 und c.656 haben eine Größe von 264 bp und 226 bp. In Abbildung 5 ist ein exemplarisches Gelelektrophoresebild mit PCR-Produkten von c.546 Proben dargestellt.

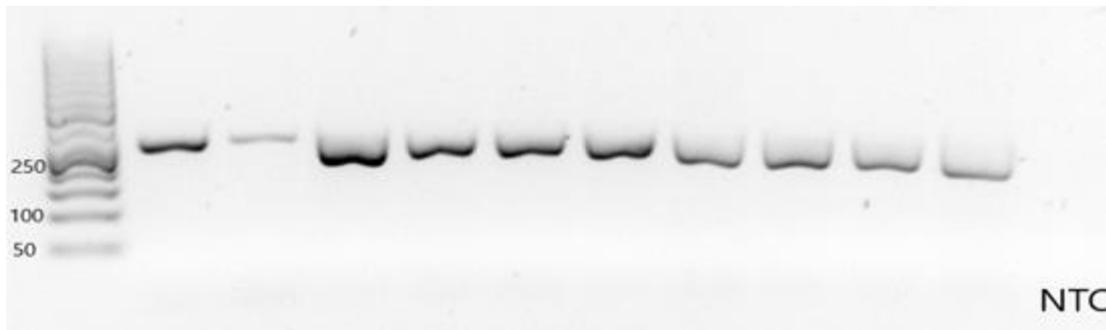


Abbildung 5: Exemplarisches Gelelektrophoresebild zur Erfolgskontrolle der c.546 Hotspot PCR Produkte mit zusätzlicher NTC (von links nach rechts).

Bei sehr schwachen Banden wurden für die anschließende Pyrosequenzierung 20 µl PCR-Produkt eingesetzt, bei schwachen Banden wurden 15 µl PCR Produkt eingesetzt, bei normalen bis kräftigen Banden 10 µl PCR Produkt. Proben, die mehrfach keine Bande zeigten, wurden von der Pyrosequenzierung ausgeschlossen. Innerhalb des Kollektivs aus 108 Proben ohne Entität-definierende molekulare Veränderungen entsprachen 105 Proben den Qualitätsansprüchen (Ausschluss n=3).

### **2.2.13 Komplettierung des molekularen Profils**

BRAF-, IDH1/2-, H3F3A-, ATRX-, MGMT-, KIAA1549-BRAF FusTK- und LOH1p/19q-Analysen wurden wie zuvor beschrieben [97] gemäß den etablierten Routine-Protokollen des Instituts für Pathologie und Neuropathologie durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 2.2.5 zusammengefasst. Der IDH R132H und H3F3A K27M Mutationsstatus wurde mittels Immunhistochemie bestimmt. Proben ohne R132H-Mutation und im Alter unter 55 Jahren wurden weiter durch direktes Pyrosequenzieren der relevanten Exons auf IDH1 und IDH2 Hotspot-Mutationen untersucht. Fälle mit ATRX-

Verlust und IDH1/2-Wildtypstatus oder Fälle mit Midline-Position wurden zusätzlich für H3F3A K27- und G34-Mutationen sequenziert. Diffuse Gliome ohne IDH1/2-Mutation wurden für TERT-Promotor-Mutationen sequenziert. Der loss of heterozygosity (LOH 1p/19q) wurde bei IDH1/2-mutierten Tumoren mit ATRX-Retention unter Verwendung von fünf Tetranukleotidmarkern für jede Chromosomenregion untersucht. Die Allelsignalintensität jeder Tumorseite wurde immer mit der entsprechenden Allelsignalintensität der Blutkontrollprobe derselben Patientin verglichen. Die Methylierungsklassifizierungsanalyse wurde wie zuvor beschrieben in fünf Fällen (Illumina, Carlsbad, Kalifornien, USA) mittels EPIC-Analyse durchgeführt [98]. Tumore wurden anschließend mit einem etablierten Hirntumorklassifikator ([www.moleculareuropathology.org](http://www.moleculareuropathology.org)) V11b4 unter Verwendung der IDAT-Dateien klassifiziert. Klassifikatorwerte mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 0,9 wurden als Anhaltspunkt für die jeweilige Methylierungsklasse gewertet. Für den molekulargenetischen Nachweis der drei am häufigsten auftretender KIAA1549/BRAF-Fusionstranskripte wurde in dieser Arbeit mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden) gearbeitet. Hierfür wurden die RNA infrage kommender Tumoren nach vorheriger RNA-Extraktion in cDNA umgeschrieben. An dieser wurden insgesamt vier BRAF-PCR (A: Ex16/Ex9, B Ex16/Ex11, C: Ex15/Ex9, WT: Wildtyp) mit entsprechenden Kontrollen, die das jeweilige FusTK tragen, gemäß Hasselblatt et al. durchgeführt [13].

#### **2.2.14 Pyrosequenzierung**

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode zur DNA-Sequenzierung, die auf dem „Sequencing-by-Synthesis“ Prinzip basiert. Hierbei besteht der grundlegende Mechanismus aus einer kontrollierten, sequenziellen Zugabe von jeweils einem der vier Nukleotide zur zu sequenzierenden DNA, die nach Bindung des komplementären Nukleotids an die Matrize durch eine Reaktionskette zu einer Lichtreaktion führt [99]. Die Lichtreaktion, die in Echtzeit an den Einbau der Nukleotid-Dispensation (dNTPs) während der DNA-Synthese gekoppelt ist, lässt so auf die zugrundeliegende DNA-Sequenz schließen. Die Lichtreaktion

korreliert zugleich mit der Anzahl der eingebauten dNTPs, sodass mit der Pyrosequenzierung nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen getroffen werden können. Um möglichst starke Lichtsignale zu erhalten, wurde die zu untersuchende DNA-Sequenz jeder Probe vorher mithilfe einer PCR amplifiziert. Das Amplikon wird für die Pyrosequenzierung an magnetische streptavidinbeschichtete Sepharose-Beads gebunden, sodass jedem Bead zahlreiche Kopien des Amplikons anhaften. Im ersten Schritt der Pyrosequenzierung wird das DNA-Segment amplifiziert, wobei der Strang, der als Pyrosequencing-Template dient, biotinyliert ist. Nach der Denaturierung liegt das biotinylierte PCR-Amplikon einsträngig vor und kann an den Sequenzierungsprimer binden. Der hybridisierte Primer und das einsträngige Template werden mit den Enzymen DNA-Polymerase, Adenosintriphosphat-Sulfurylase (ATP-Sulfurylase), Luziferase und Apyrase sowie den Substraten Adenosin 5' Phosphosulfat (APS) und Luciferin inkubiert. Im zweiten Schritt der Reaktion wird das erste Desoxiribonukleotidtriphosphat (dNTP) zugesetzt. Die DNA-Polymerase katalysiert die Zugabe des dNTP zum Sequenzierungsprimer, wenn das dNTP komplementär zur Base im Templatestrang ist. Jede Addition wird von der Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in einer Menge äquimolar zur Menge des eingebauten Nukleotids begleitet. Anschließend wandelt die ATP-Sulfurylase das PPi in ATP um. Das so entstandene ATP initiiert die Luziferase-vermittelte Umwandlung von Luciferin zu Oxyluziferin. Diese Reaktion erzeugt Licht im sichtbaren Bereich, dessen Quantität proportional zur Menge des erzeugten ATP ist. Das in der Luziferase-katalysierten Reaktion erzeugte Licht wird von CCD-Sensoren erkannt und als Peak in der Rohdatenausgabe (Pyrogramm) angezeigt. Die Höhe jedes Peaks ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Damit es im Verlauf nicht zur Anhäufung und eventuell fehlerhaftem Einbau der dNTP kommt, ist das Enzym Apyrase im Reaktionsgemisch enthalten. Apyrase ist ein Nukleotid-abbauendes Enzym, welches während der Sequenzierung nach jedem Teilschritt kontinuierlich nicht eingebaute Nukleotide und ATP abbaut. Nach Abschluss der Degradation durch die Apyrase wird das nächste Nukleotid hinzugefügt, wobei statt des Desoxyadenosintriphosphats (dATP) Deoxyadenosinalpha-Thiotriphosphat

(dATP-S) als Ersatz verwendet wird, da es auf der einen Seite von der DNA-Polymerase wie das natürliche Pendant verwendet werden kann, auf der anderen Seite aber nicht von der Luziferase als Substrat erkannt wird und es so zu keinen Störungen der Kettenreaktion oder fehlerhaften Peaks kommt [100]. Im Verlauf der Pyrosequenzierung wird durch die sequenzielle Zugabe der dNTP der komplementäre DNA-Strang ergänzt und die Nukleotidsequenz aus den Peaks in der Pyrogrammspur bestimmt.

#### 2.2.14.1 FGFR1 c.546 und c.656 Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierung adaptierten wir die in der Arbeit von Gessi et al. [70] genutzten Primer (s. Tabelle 20) mit einer Modifikation bei c.546 und einem in Absprache mit QIAGEN-Kundensupport (Hilden) neu entworfenen Primer für c.656, da Samples mit den anfänglich genutzten Primern für c.656 keine auswertbaren Signale zeigten.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	OD	µg	nmol	Tm [°C]	GC-Gehalt
Q24FGFR1 (c.546) fw	CGGACGCAACAGAG AAAGACTT (22)	2,71	69	10,2	60,3	50 %
Q24FGFR1 (c.546) rev BIO	[BIO]CCCAGATCCCGAG ATAACACA (21)	4,04	115	17,1	59,8	52,4 %
Q24-Seq- FGFR1 (c.546)	AAFCCATAAGAATATCATCAA (20)	2,34	57	9,3	47,0	25 %
Q24-FGFR1 (c.656) fw	ACGGGACATTCACCACATC (19)	2,14	59	10,3	56,7	52,6 %
Q24FGFR1 (c.656) rev- BIO	[BIO]CACCCCACTCCTTGCT TC (18)	5,41	189	33,1	58,2	61,1 %
Q24-Seq- FGFR1 (c.656)	CATTCACCACATCGACT(17)	1,13	32	6,3	50,4	47,1 %

Tabelle 20: FGFR1 c.546 und c.656 PCR und Pyrosequenzierprimer.

Zu Beginn der Pyrosequenzierung wird der Binding Mix nach dem Schema aus Tabelle 21 pipettiert. Es wurde das Volumen für eine zusätzliche Probe verwendet, um Pipettierungsungenauigkeiten auszugleichen. Anschließend wurden pro Well einer 24-Well PyroMark Q24 Platte (Qiagen, Hilden) 70 µl Binding Mix sowie 10 µl PCR-Produkt gemischt. Somit können gleichzeitig 23 Proben sequenziert werden, ein Well wurde für die NTC genutzt, in die nur 70 µl Binding Mix ohne PCR-Produkt pipettiert werden. Bei Proben mit schwachen Banden in der Gelelektrophorese wurden 15 µl beziehungsweise mit sehr schwachen Banden 20 µl PCR-Produkt eingesetzt. Damit das Gesamtvolumen 80 µl nicht überschreitet, wurde dementsprechend der A. dest. Anteil im Binding Mix für diese Proben verringert. Anschließend wurde die Platte abgedichtet und für zehn Minuten auf der Schüttelplatte geschüttelt.

Binding Mix	
Reagenz	Volumen pro Sample
S-Beads	1 µl
Binding Buffer	40 µl
A. dest.	29 µl

Tabelle 21: Schema des Binding Mix für die Pyrosequenzierung von FGFR1 c.546 und c.656.

Parallel wurde der Annealing Mix, der aus dem Annealing Buffer und dem Sequenzierprimer besteht (s. Tabelle 22), pipettiert, je 25 µl pro Well auf die 24-Well PyroMark Q24 Platte gegeben und in der PyroMark Vacuum-Workstation (Qiagen, Hilden) platziert.

Annealing Mix	
Reagenz	Volumen pro Sample
Sequenzierprimer c.546 / c.656	0,75 µl
Annealing Buffer	24,25 µl

Tabelle 22: Schema für den Annealing Mix für FGFR1 c.546 und c.656.

Nachdem die 24-Well-Platte mit den PCR-Produkten von der Schüttelplatte entfernt wurde, wurde auch diese in die Workstation gesetzt. Anschließend

saugte der vorher mit destilliertem Wasser gespülte Vakuumtool die an die Sepharose-Beads gekoppelten Proben vollständig an. Anschließend wurden die Proben für je fünf Sekunden in Ethanol (70 %) und PyroMark Denaturation Solution, danach für zehn Sekunden im PyroMark Wash Buffer gewaschen. Die Denaturation Solution spaltet das an die Sepharose-Beads gebundene PCR-Produkt in die später für die Sequenzierung benötigte einsträngige template-DNA. Der Wash Buffer wäscht und neutralisiert die gebundene DNA. Nachdem die Proben die drei Waschschritte durchlaufen haben, wurden sie über der PyroMark Q24 24-Well-Platte abgegeben, indem man das Vakuum des Vakuumtools auflöst. Dann wurden die Beads mit gebundener DNA mit dem Annealing Mix durch leichtes Schütteln des Tools in der 24-Well-Platte gemischt. Diese Platte wurde für fünf Minuten auf einer Metallplatte auf 80°C erwärmt und anschließend in den PyroMark Q24 Pyrosequenzierer gegeben. Im PyroMark Q24 befindet sich neben der Platte die Cartridge. Die Cartridge gibt Nukleotide sowie Enzym und Substrat für die Reaktion ab. Das benötigte Volumen der Reagenzien wurde zuvor basierend auf der Probenanzahl auf der Platte mit der PyroMark Q24 Software berechnet. Die PyroMark Q24 Software wurde anschließend auch zur Auswertung der Pyrogramme genutzt. In Tabelle 23 sind die Dispensation Orders sowie die Sequences to analyse für c.546 und c.656 aufgeführt.

FGFR1	Dispensation Order	Sequence to analyse
c.546	GACTGCTGGC	1.G/CCTGCTGGGGGCCTGGCA 2.A/CCTGCTGGGGGCCTGGCA
c.656	ACTAGTAAGAGACA CT	ACTATAAAG/AAGACAACCAACGTGAGTGCCGAC AA

Tabelle 23: FGFR1 c.546 und c.656 Dispensation Order und Sequence to analyse.

### 2.3 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mithilfe des Programms JMP 15.1 (SAS Institute INC, Cary, NC, USA) ausgewertet. Eine univariante Varianzanalyse wurde bei allen Korrelationen des IRS mit ordinalen Datensätzen der klinischen Parameter verwendet. Die Vergleiche der arithmetischen Mittel wurden mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von t-Tests ausgewertet. Bei

Korrelationsanalysen des IRS mit dem Patientenalter wurde eine einfache logistische Regressionsanalyse herangezogen. Die Kreisdiagramme zur Darstellung der Verteilung der jeweiligen Mutationen wurden mit Excel (Microsoft, Redmond WA) erstellt. Die Signifikanzwerte wurden folgendermaßen festgelegt:  $p$ -Werte  $<0,0001$  wurden als hochsignifikant,  $p$ -Werte  $<0,05$  als signifikant gewertet. Das Konfidenzintervall wurde bei 95 % festgelegt.

### **3. Ergebnisse**

Ein Teil der nachfolgenden Daten wurden im Artikel „Frequent FGFR1-hotspot-alterations in driver-unknown low-grade glioma and mixed neuronal-glioma tumors“ veröffentlicht [101]. Hierfür wurde das identische Patientenkollektiv verwendet und identische Methoden zur retrospektiven Datenerhebung angewandt. Zusätzlich wurde in dem Artikel eine TCGA dataset Analyse durchgeführt.

#### **3.1 FGFR1-Immunhistochemie**

Die Expression von FGFR1 wurde sowohl nukleär, im Zytoplasma sowie der Membran der Tumorzellen beobachtet. Die Färbeintensität war im gesamten Tumorgewebe homogen. Insgesamt konnten 110 Stenzen und 41 Flächenschnitte lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Eine immunhistochemische Expression wurde in 90 von 106 (85 %) Tumorproben beobachtet.

#### **FGFR1-Intensität**

Die Bewertung der zytoplasmatischen Färbeintensität wurde in vier Gruppen (0=negativ, 1=geringe, 2=mittlere, 3=starke Expression) geteilt. In 16 Fällen (15 %) wurde das Fehlen einer Färbung (Score 0) beobachtet. Eine schwache FGFR1-Expression wurde in 42 Fällen (40 %), eine moderate Färbeintensität in 30 Fällen (28 %) und eine starke Expression in 18 Fällen (17 %) beobachtet.

#### **FGFR1-Menge**

Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen variierte zwischen den Tumoren. Ein Färbeverteilungswert 1 (weniger als 25 % positive Tumorzellen) wurde in drei Fällen (3 %), Verteilungswert 2 in 14 Fällen (13 %), Verteilungswert 3 in 22 Fälle (21 %) und Verteilungswert 4 (mehr als 75 % Tumorzellen positiv) in 51 Fällen (48 %) beobachtet.

## FGFR1-Immune Reactivity Score (IRS)

Die Kombination von Färbeintensität und Anzahl der positiven Zellen zu einem immunreaktiven Score zeigte niedrige IRS (1-4) in 41 Fällen (39 %), mittlere IRS (5-8) in 36 Fällen (34 %) und hohe IRS (9-12) in 13 Fällen (12 %). Der IRS-Mittelwert aller Tumorproben betrug 5.

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit der Tumorentität

Der FGFR1-IRS in PA (Mittelwert 6,4,  $p=0,0002$ ), PXA (Mittelwert 7,8,  $p=0,0101$ ) und DNT (Mittelwert 4,8,  $p=0,0255$ ) zeigte sich im Vergleich zu DA (Mittelwert 2,3) signifikant höher (s. Abbildung 6).

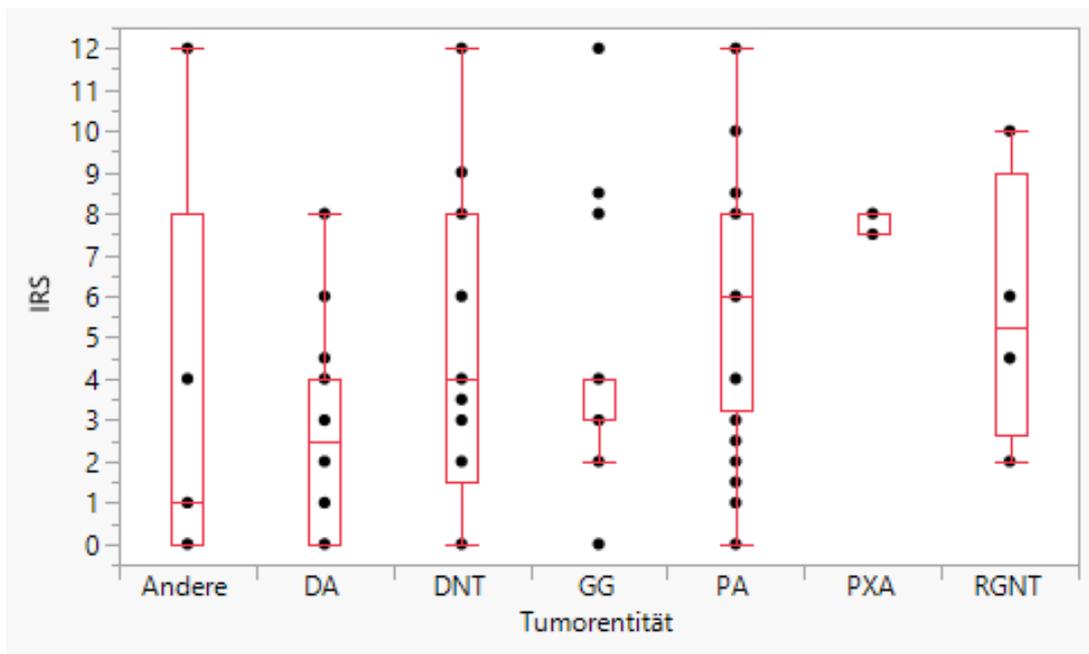


Abbildung 6: FGFR1-IRS in Abhängigkeit der Tumorentität.

In Tabelle 24 findet sich eine Aufschlüsselung zur FGFR1-Immunhistochemie über die histologische Diagnosen hinweg.

Diagnose	<i>n</i>	Mittel IRS	SD IRS
DA	16	2,3	2,52
DNT	26	4,8	3,70
GG	15	4.5	2.89
PA	37	6.4	3.52
PXA	3	7.8	0.28
RGNT	4	5.6	3.35
Andere	7	3.5	4.17

Tabelle 24: FGFR1-Immunhistochemie über histologische Diagnosen mit *n*=Anzahl, Mittel IRS=Mittelwert des Immune-Reactivity-Scores sowie SD IRS= Standardabweichung des Immune-Reactivity-Scores.

### FGFR1 Expression in Abhängigkeit zum ZNS WHO-Grad

Die FGFR1-IRS waren bei WHO Grad 1 Tumoren signifikant höher (Mittelwert 5,4,  $p=0,0053$ ) im Vergleich zu WHO Grad 2 Tumoren (Mittelwert 2,8) (s. Abbildung 7).

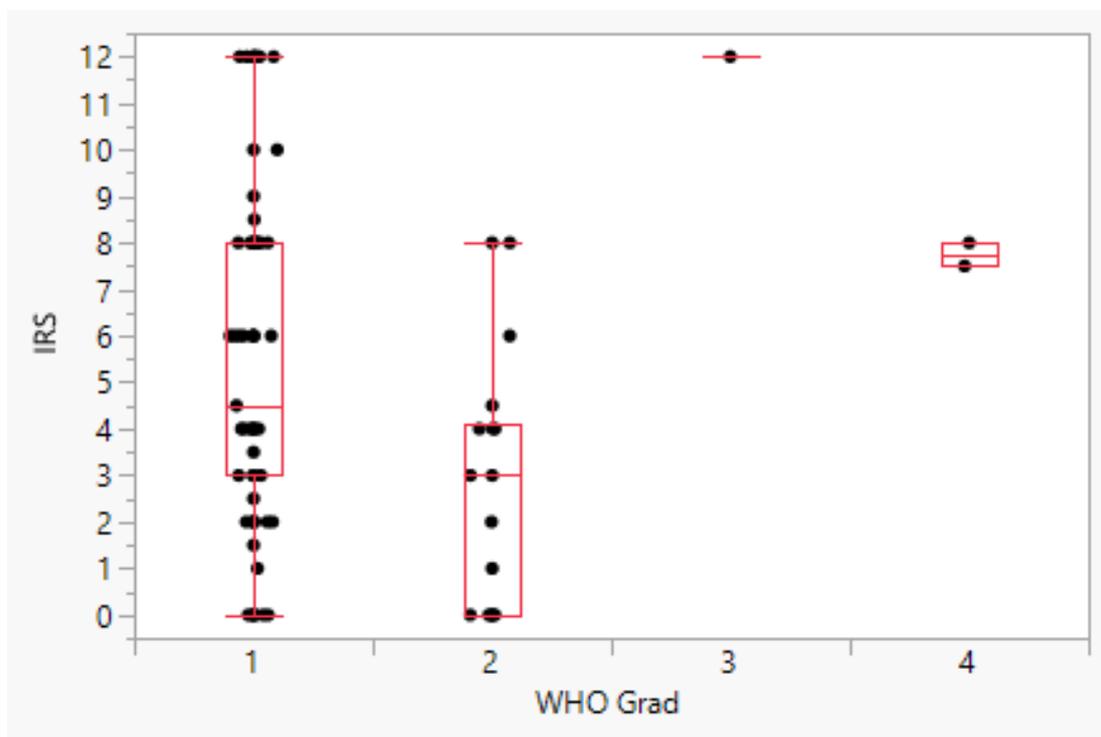


Abbildung 7: FGFR-1 IRS in Abhängigkeit zum ZNS WHO-Grad.

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit zum Geschlecht

44 der gefärbten Proben waren von Patientinnen (FGFR1-IRS Mittelwert 4,8), 62 der gefärbten Proben waren von Patienten (FGFR1-IRS Mittelwert 5,2). Die FGFR1-IRS waren unabhängig von Geschlecht ( $p=0,554$ , s. Abbildung 8).

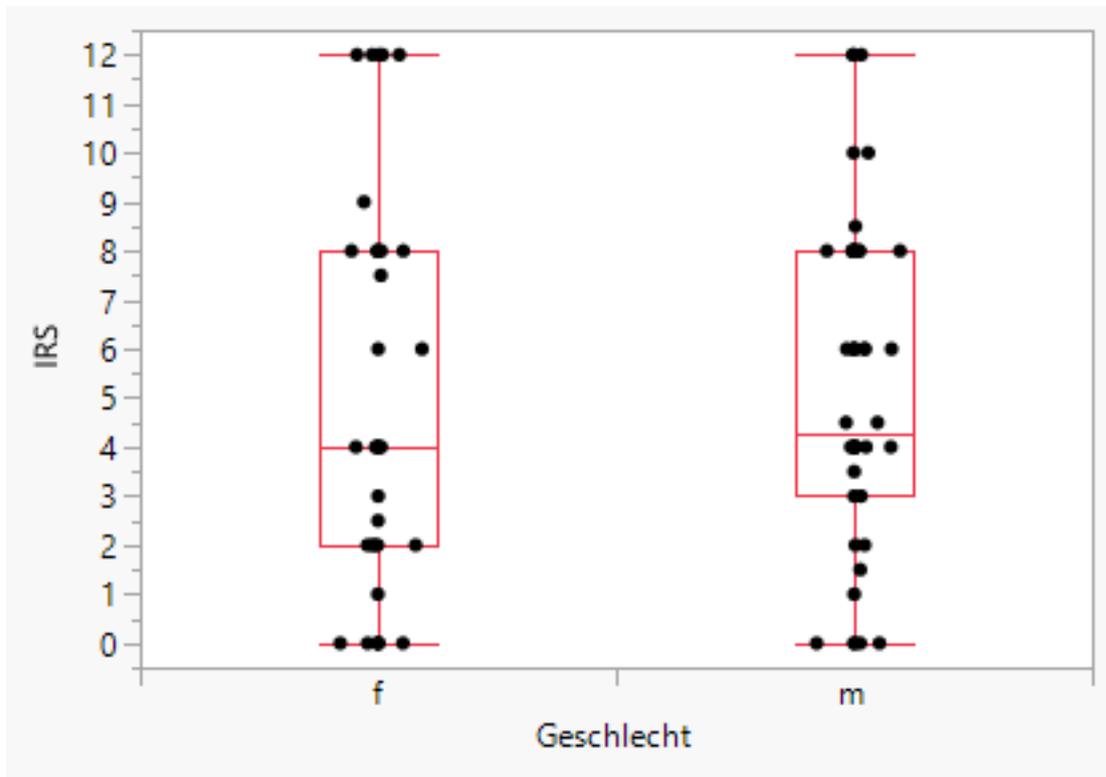


Abbildung 8: FGFR-1 IRS in Abhängigkeit zum Geschlecht.

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit zum Alter

Die FGFR1-IRS waren unabhängig von Alter ( $p=0,8725$ , s. Abbildung 9).

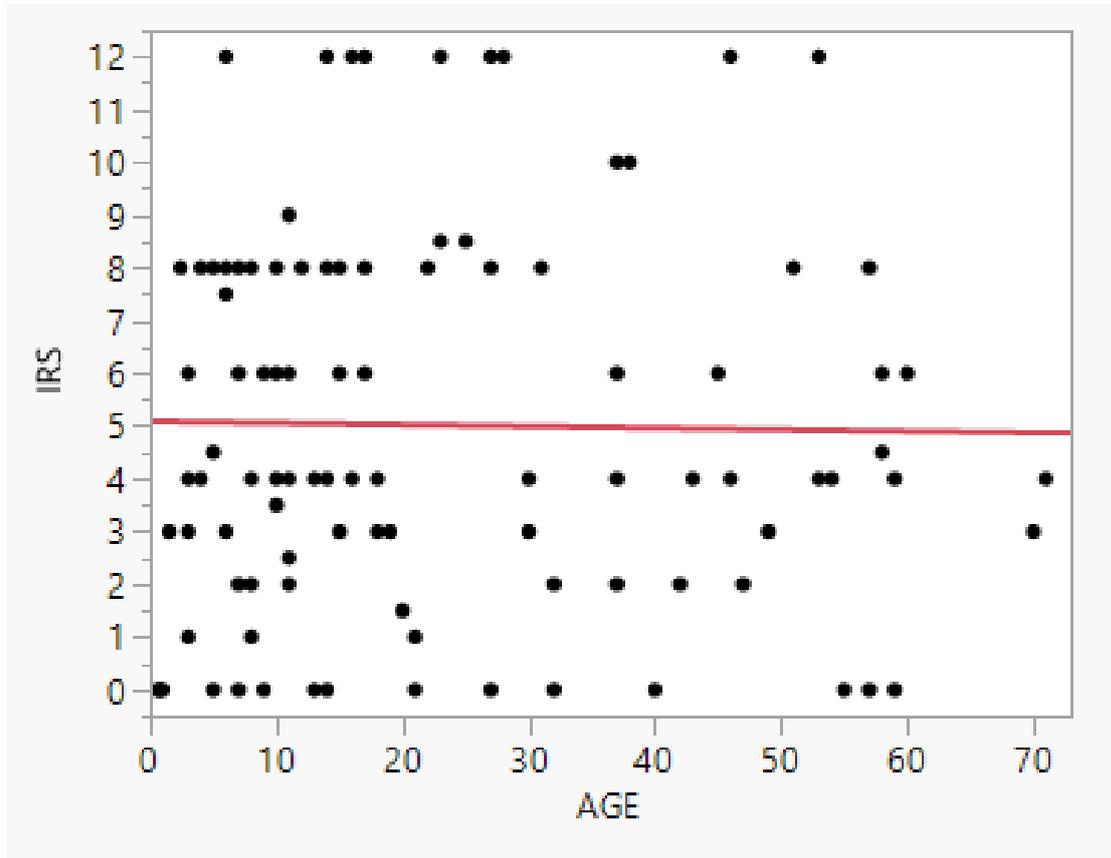


Abbildung 9: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zum Alter.

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit zum FGFR1-Mutationsstatus

Der FGFR1-IRS der 13 p.N546K oder p.K656E mutierten Tumoren war höher (Mittelwert 6,4) als bei den restlichen 88 auf FGFR1-Hotspotmutationen untersuchten Tumoren, die keine FGFR1-Hotspot-Veränderungen zeigten (Mittelwert 4,9,  $p=0,0370$ ).

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit zum Primär-/Rezidivstatus

Die Primärtumoren in dieser Arbeit hatten nicht signifikant niedrigere FGFR1-IRS (IRS Mittelwert 4,8) im Vergleich zu Tumorrezidiven (Mittelwert 5,7,  $p=0,326$ , s. Abbildung 10).

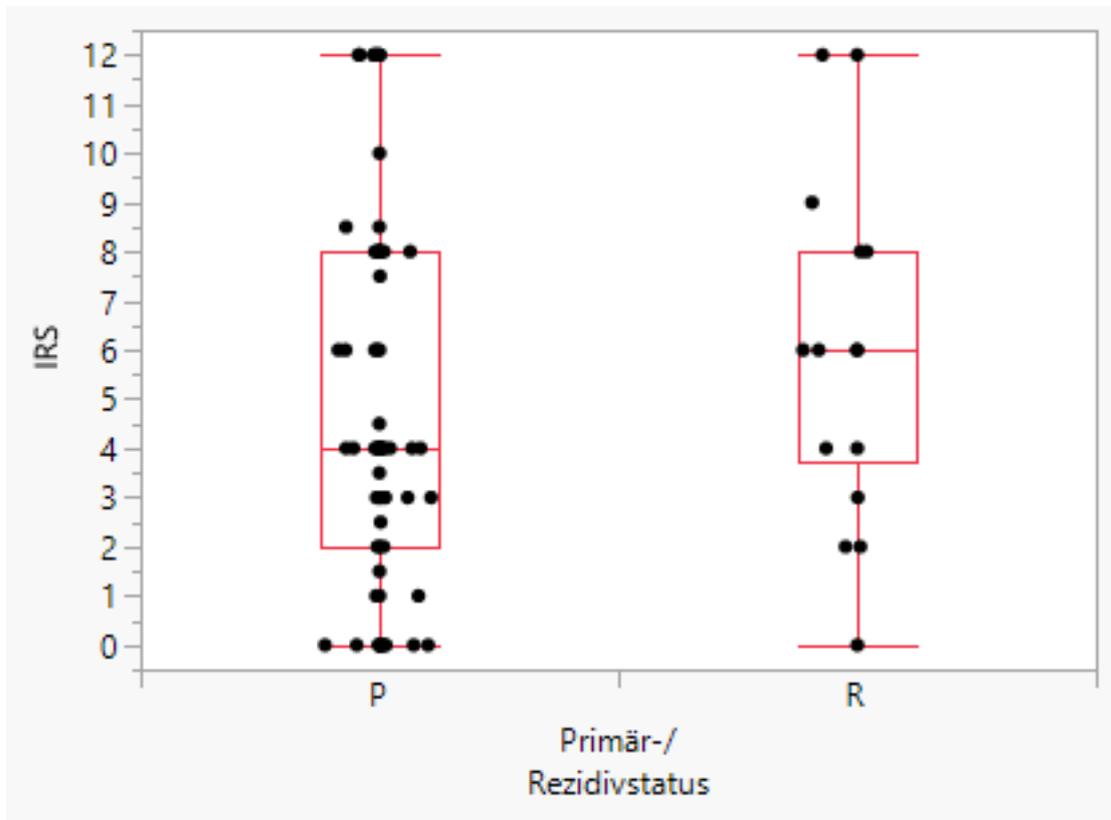


Abbildung 10: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zum Primär(P)-/Rezidivstatus(R).

## FGFR1-Expression in Abhängigkeit zur Lokalisation

Die Lokalisation stand in keinem Zusammenhang mit der FGFR1-Expression (s. Abbildung 11).

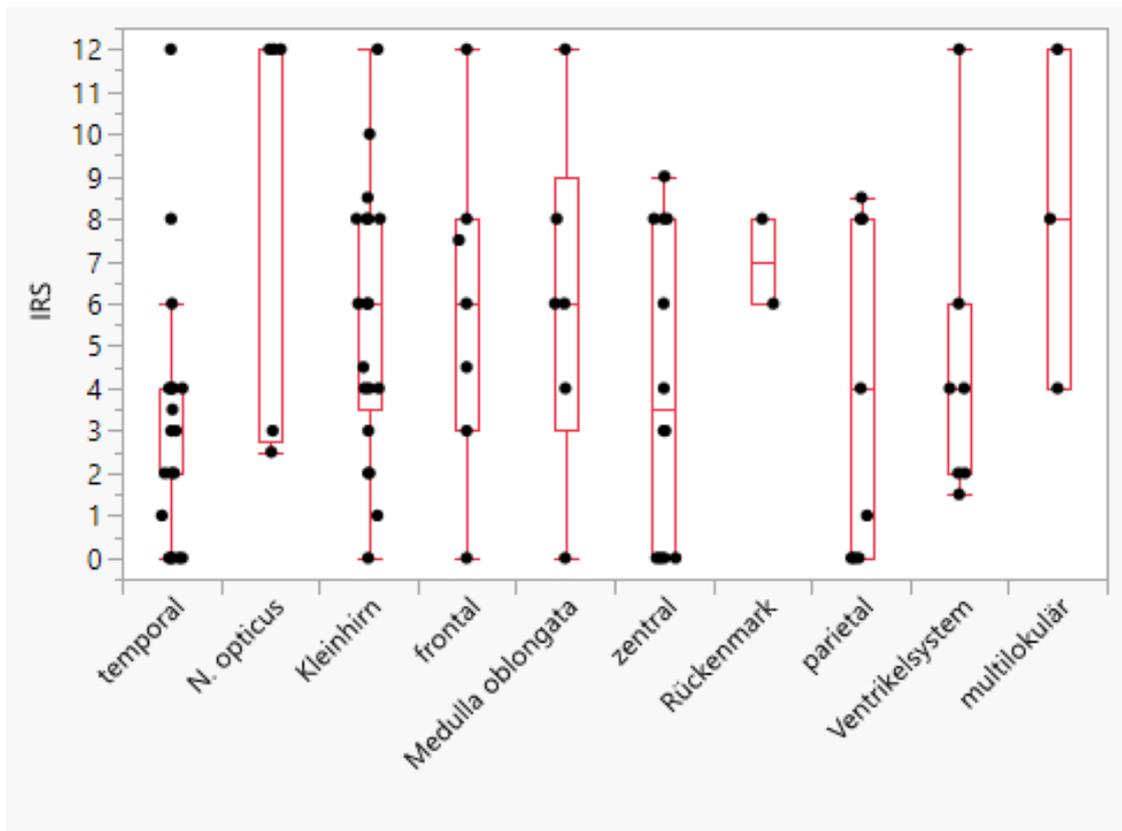


Abbildung 11: FGFR1-IRS in Abhängigkeit zur Tumorlokalisation.

### 3.2 Molekulare Stratifizierung und Pyrosequenzierung FGFR1 c.546 und c.656

Aus einem Gesamtkollektiv von 681 Fällen mit LGG oder MNGT fanden sich 476 Fälle mit Einwilligung zu Forschung und wissenschaftlicher Nutzung des Restgewebes (s. Abbildung 12).

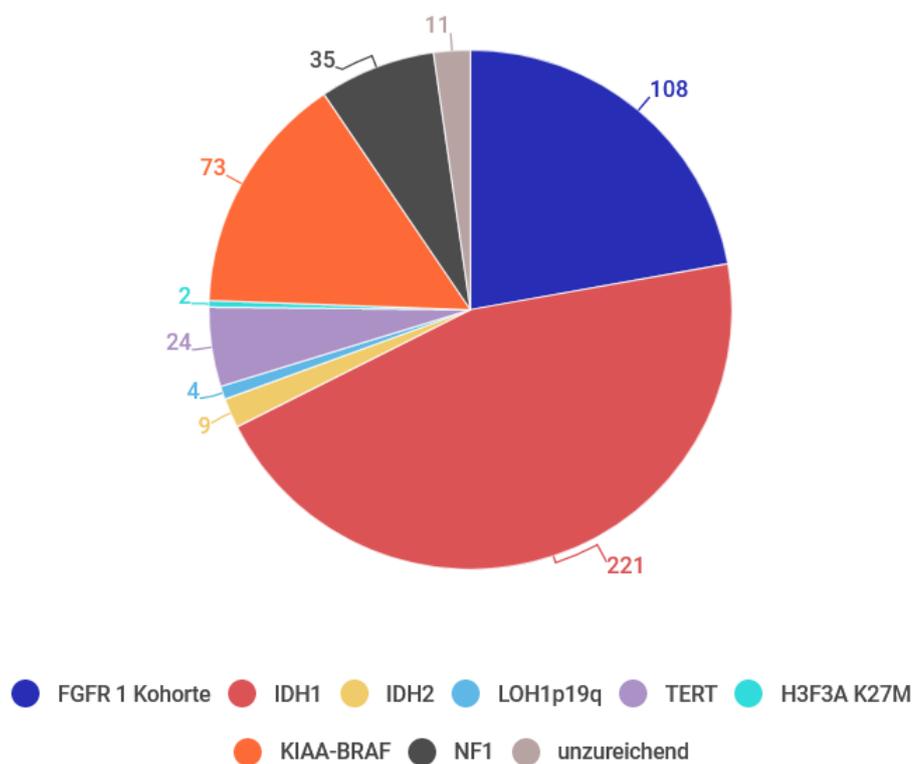


Abbildung 12: Verteilung der Non-FGFR1-Mutationen in 476 Tumoren (rot IDH1, gelb IDH2, hellblau LOH1p19q, lila TERT, türkis H3F3AK27M, orange KIAA-BRAF, dunkelgrau NF1, hellgrau unzureichendes Material). Die FGFR1 Pyrosequenzierkohorte (dunkelblau) zeigte keine bekannten Treibermutationen und wurde daraufhin auf FGFR1 c.546 und c.656 Hotspotmutationen analysiert.

Basierend auf bereits vorliegenden Daten oder zusätzlich durchgeführten molekularen Analysen wie im Folgenden beschrieben, wurden folgende 368 Fälle identifiziert: Bestätigte NF 1 in 35 Fällen, IDH1-Mutation in 221 Fällen, IDH2-Mutation in neun Fällen, IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion in 4 Fällen, TERT-Promotor-Hotspot-Mutation in 24 Fällen, H3F3A K27M-Mutation in zwei Fällen und KIAA1549-BRAF-Fusion in 73 Fällen. 368 von 476 LGG/MNGT-Tumoren zeigten non-FGFR1-Veränderungen (s. Tabelle 25). In elf von 119 der übrigen Fälle war das archivierte Tumorgewebe zu klein für Immunhistochemie oder molekulare Analysen.

Diagnose	Fälle	IDH1		IDH2		TERT		BRAF-Fusion		LOH1p/19q		NF1		K27M		FGFR1	
DA	153	110	71.9 %	3	1.96 %	23	15.03 %	1	0.65 %			1	0.65 %				
DESKRIPTIV	10					2	20 %	1	10 %	1	10 %	2	20 %	2	20 %	1	10 %
DIA/DIG	2																
DNT	27							1	3.7 %			1	3.70 %			4	14.81 %
GG	16																
ODG	104	94	90.38 %	5	4.81 %	17	16.35 %			102	98.08 %						
GEMISCHTE GLIOME	18	17	94.44 %	1	5,56%	3	16.67 %			13	72.22 %						
PA	138							70	50.72 %			3	22.46 %			5	3.62 %
PXA	4																
RGNT	4															3	75 %
GESAMT	476	221	46.43 %	9	1.89%	45	9.45 %	73	15.34 %	116	24.37 %	35	7.35 %		0.42 %	13	2.73 %

Tabelle 25: Molekulargenetische Parameter der Gesamtkohorte aufgelistet nach Diagnose und Probenzahl sowie nachgewiesener Mutationen in IDH1/IDH2/TERT/BRAF-Fusion/LOH1p19q/NF1/K27M/FGFR1.

Die endgültige Kohorte für die FGFR1 Pyrosequenzierung ohne bekannte Treiber Mutationen bestand abschließend aus 108 Proben (45 weiblich und 63 männlich, mittleres Alter 22,8 Jahre, Bereich 0,6-71 Jahre). In Tabelle 26 sind alle untersuchten Fälle nach Entität, Anzahl, durchschnittlichem Alter, niedrigstem sowie höchstem Alter, Geschlecht und Rezidivstatus aufgeschlüsselt. 16 Fälle wurden histologisch als DA diagnostiziert, zwei Fälle als desmoplastisches infantiles Astrozytom/Gangliogliom (DIA/DIG), 26 als DNT, 15 als GG, zwei als ODG, 37 als PA, vier als PXA, vier als RGNT. Zwei Fälle hatten ausschließlich deskriptive Diagnosen. In 90 Fällen wurde der Primärtumor und in 18 Fällen der Rezidivtumor zur Analyse herangezogen, da entweder der Primärtumor nicht vorhanden war oder nicht ausreichend DNA aus dem Primärtumor extrahiert werden konnte. Das Verhältnis von Primär- zu Rezidivtumoren im untersuchten Patientenkollektiv betrug 4,4:1.

Diagnose	Anzahl der Fälle	Mittleres Alter [Jahre]	min. Alter [Jahre]	max. Alter [Jahre]	F/M	Primär/Rezidiv
DA	16	35.3	4	71	6/10	15/1
DIA/DIG	2	0.7	0.6	0.75	1/1	2/0
DNT	26	15.2	1	43	13/13	19/7
GG	15	27.9	3	59	5/10	14/1
ODG	2	4.5	4	5	0/2	2/0
PA	37	21.4	1.5	60	14/23	30/7
PXA	4	20.5	6	51	3/1	3/1
RGNT	4	37	11	58	1/3	3/1
DESKRIPTIV	2	24.5	3	46	2/0	0/2

*Tabelle 26: Diagnosen, Anzahl, Epidemiologische Daten (niedrigstes Alter, Durchschnittsalter, höchstes Alter, Geschlecht) sowie Primär-/Rezidivstatus der Samples für FGFR1 Pyrosequenzierung und Immunhistochemie.*

Die entitätsübergreifende Lokalisationsverteilung der Tumore innerhalb der Pyrosequenzierkohorte ist in Abbildung 13 dargestellt. Die meisten Tumore befanden sich mit etwa einem Viertel (26,9 %) im Temporallappen, etwa einem Fünftel der Tumore waren im Kleinhirn lokalisiert (Temporallappen n=29, Kleinhirn n=21 zentral n=13, Frontallappen n=11, Parietallappen n=9,

Ventrikelsystem n=8, Medulla oblongata n=6, N.opticus n=5, multilokulär n=3, Rückenmark n=2, ohne Angabe n=1).

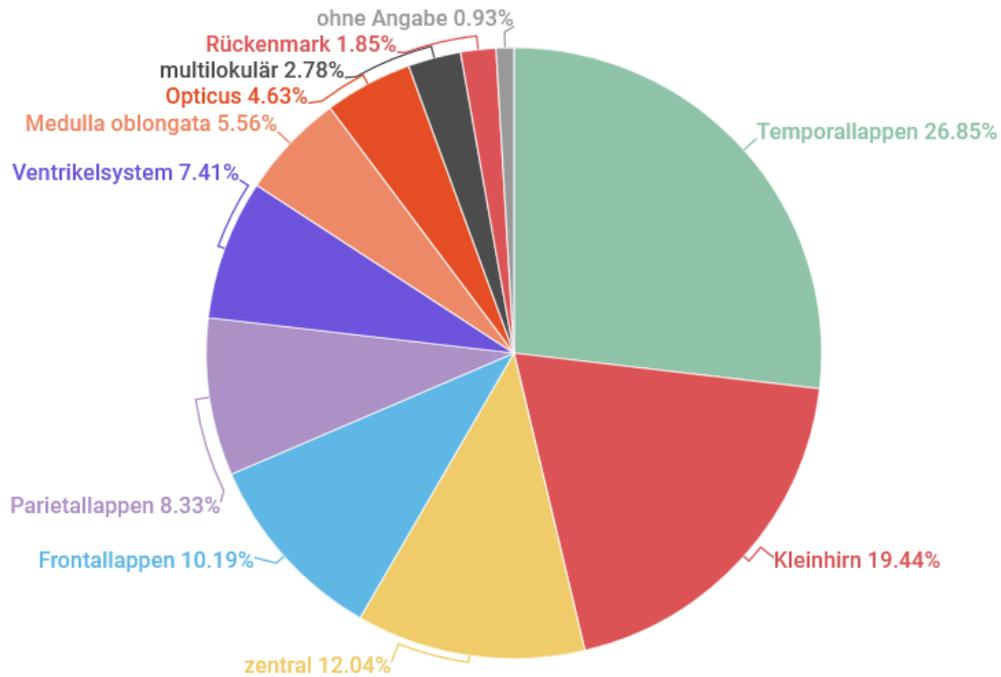


Abbildung 13: Entitätsübergreifende Verteilung der Tumorlokalisationen in der Pyrosequenzierkohorte (n=108), grün Temporallappen, rot Kleinhirn, gelb zentral, hellblau Frontallappen, helllila Parietallappen, violett Ventrikelsystem, hellorange Medulla oblongata, orange N. opticus, dunkelgrau multilokulär, hellrot Rückenmark, hellgrau ohne Angabe.

## Allgemeine Daten der Pyrosequenzierkohorte

Das mittlere Alter der Pyrosequenzierkohorte betrug 22,8 Jahre (0,6-71 Jahre). Die Kohorte bestand aus 63 männlichen und 45 weiblichen Personen. 84 Fälle wurden gemäß der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren dem WHO Grad 1 zugeordnet, 19 Fälle dem WHO Grad 2, ein Fall dem WHO Grad 3, drei Fälle dem WHO Grad 4. Ein Fall wurde ohne Grading als histologisch uneindeutig, molekulargenetisch als PXA eingestuft (s. Abbildung 14).

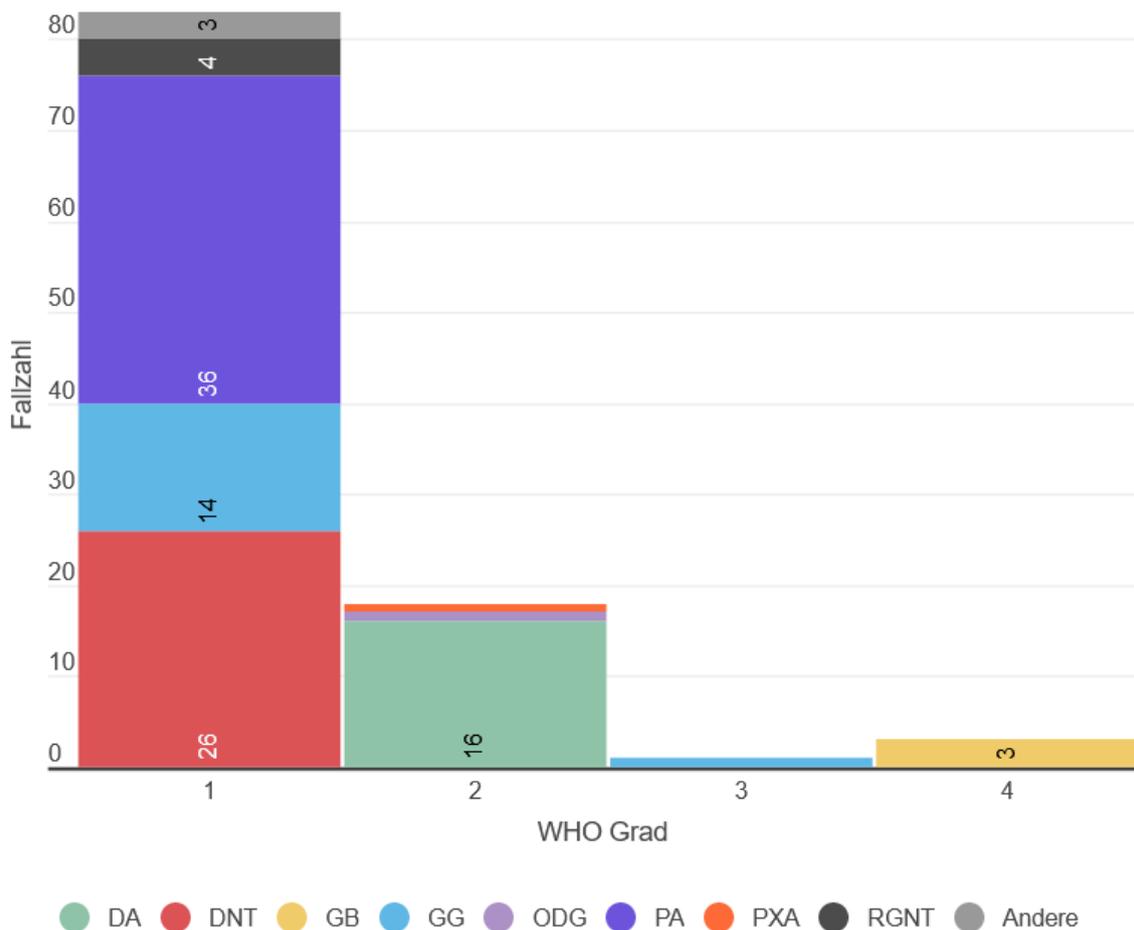


Abbildung 14: Diagnosen und WHO Grad der Pyrosequenzierkohorte (grün DA, rot DNT, gelb PXA, hellblau GG, lila ODG, violett PA, orange PXA, dunkelgrau RGNT, hellgrau Andere).

Es zeigten sich nach Auswertung der Pyrogramme unter diesen Proben insgesamt 13 (12 %) FGFR1-Hotspot-Mutationen, hiervon 9/105 FGFR1 p.N546K (8 %, hiervon fünf Fälle mit c.1638C>A Mutation (s. Abbildung 16) und

vier Fälle mit c.1638 C>G Mutation (s. Abbildung 17)). Zum Vergleich findet sich in Abbildung 15 ein Pyrogramm eines FGFR1 c.546 Wildtyp-Falles.

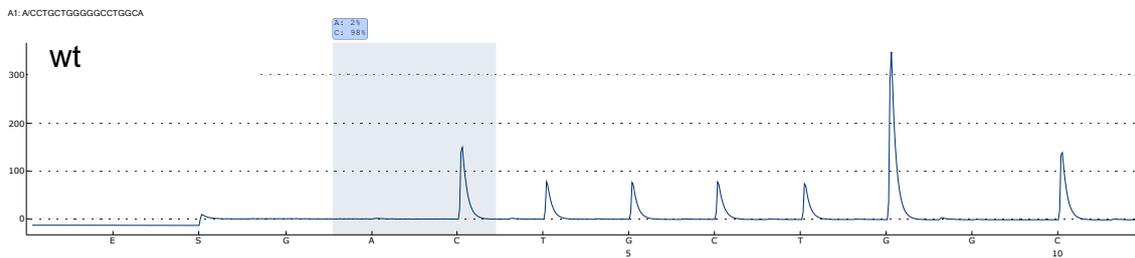


Abbildung 15: Exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K Wildtypfalles (wt).

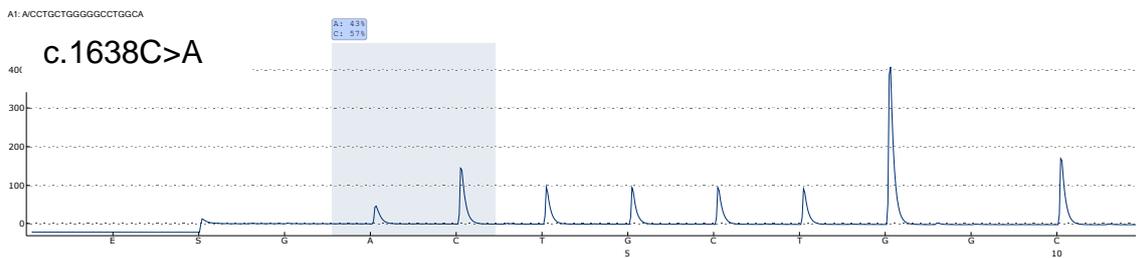


Abbildung 16: Exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K c.1638 C>A mutierten Falles.

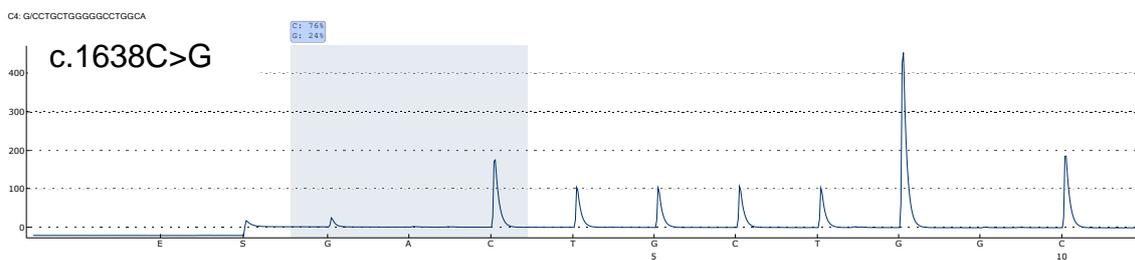


Abbildung 17: exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 N546K c.1638 C>G mutierten Falls.

An der Position der zweiten untersuchten Hotspotmutation fanden sich 4/103 p.K656E Mutationsfälle (3 %, c.1966 A>G). In der Abbildung 18 ist ein hierfür exemplarisches Pyrogramm dargestellt.

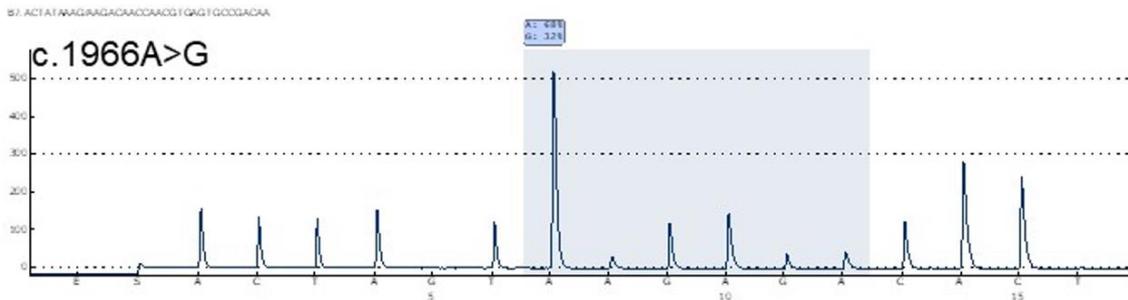


Abbildung 18: exemplarisches Pyrogramm eines FGFR1 K656E c.1966 A>G mutierten Falls.

Die p.N546K Fälle waren als DNT (3/9), PA (4/9) und ein Fall als RGNT klassifiziert, der fünfte hatte nur eine deskriptive Diagnose eines low-grade neuroepithelialen Tumors. Die p.K656E Fälle waren in zwei Fällen einem RGNT, 1 PA sowie 1 DNT. Sieben der FGFR1-mutierten Fälle waren männlich, sechs weiblich. Sechs Fälle waren pädiatrisch (3-16 Jahre) und sieben Fälle waren Erwachsene im Alter zwischen 23-58 Jahren. Die FGFR1-Mutation war statistisch nicht mit einer bestimmten Tumorlokalisation assoziiert. Sieben mutierte Fälle waren supratentorial lokalisiert, sechs Fälle befanden sich im Kleinhirn. Eine vollständige Resektion konnte in sieben und eine subtotale Resektion in drei Fällen erreicht werden. In der begrenzten Nachbeobachtungszeit (2-13 Monate) zeigten drei Tumoren eine Progression. In einem Fall stand Gewebe des Rezidivtumors zur Verfügung und es wurde im Rezidiv die identische FGFR1-Hotspot-Mutation nachgewiesen. Zu den Symptomen der Patienten gehörten epileptische Anfälle (n=4), Kopfschmerzen (n=5), Schwindel (n=2), Sehstörungen (n=3) und Fazialispareesen (n=2).

## Hotspot-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom Alter

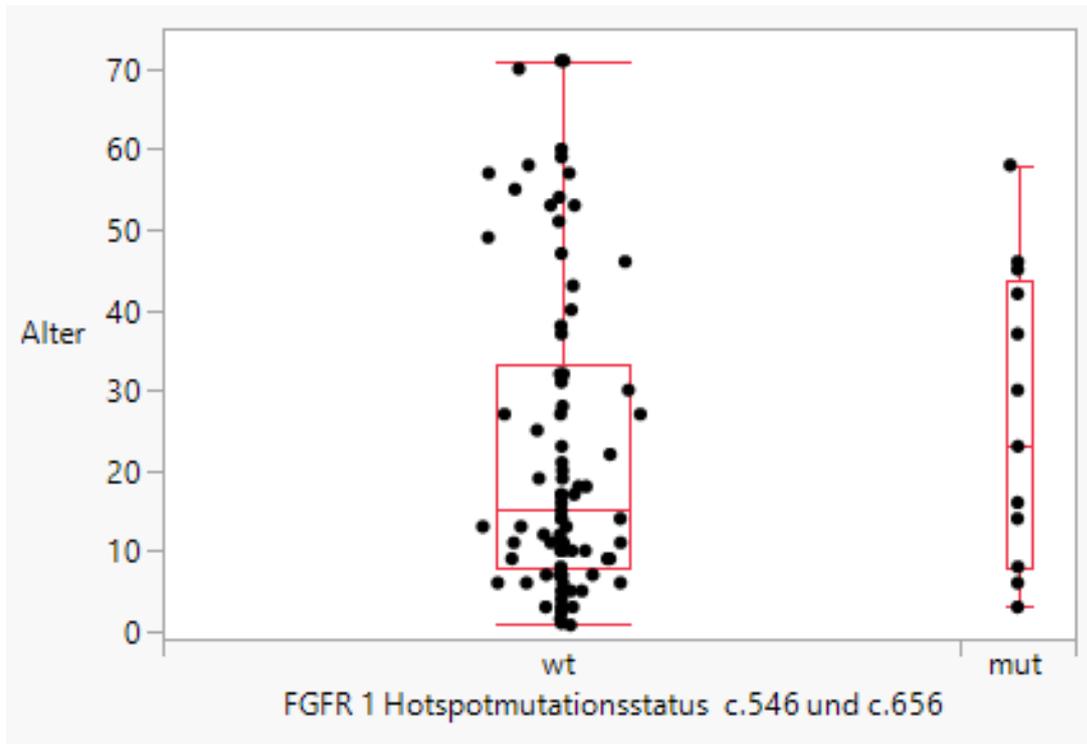


Abbildung 19: FGFR-1 Hotspotmutationsstatus c.546/c.656 in Abhängigkeit vom Alter.

Es gab keinen signifikanten Altersunterschied zwischen den 13 FGFR1-Mutationsfällen (N546K/K656E zusammen, Durchschnittsalter 25,8 Jahre) im Vergleich zu 92 Fällen ohne FGFR1-Hotspot-Mutation (Durchschnittsalter 22,8 Jahre,  $p=0,564$ ) (s. Abbildung 19). Patienten mit einer FGFR1 p.N546K-Mutation waren etwas, aber nicht signifikant jünger (Durchschnittsalter 19,6 Jahre) und die FGFR1 p.K656E-mutierten Tumoren waren bei der Diagnose signifikant älter (Durchschnittsalter 39,7 Jahre) im Vergleich zu Wildtypfällen. In der histologischen Subanalyse waren FGFR1-mutierte RGNT-Fälle älter (Durchschnittsalter 45,6 Jahre) als der FGFR1-Wildtyp-RGNT-Fall (11 Jahre), während PA (Mittelwert 22,1 vs. 19,6 Jahre) und DNT (Mittelwert 14,7 vs. 13,7 Jahre) FGFR1-mutierte Fälle in einem ähnlichen Alter wie FGFR1-Wildtyp-Tumoren beobachtet wurden.

## Hotspot-Mutationsstatus in Abhängigkeit zur histologischen Diagnose

In der vorliegenden Arbeit war eine der beiden untersuchten FGFR1-Hotspot-Mutationen bei 5/37 PA (13 %), 4/26 (15 %) DNT und 3/4 (75 %) RGNT. Keiner der Tumoren, die histologisch als DA (n=16), GG (n=15), PXA (n=4) oder DIA/DIG (n=2) diagnostiziert wurden, zeigten eine FGFR1 p.N546K oder p.K656E Mutation.

## Korrelation IHC in Abhängigkeit mit dem Hotspot-Mutationsstatus von FGFR1

14/106 der sequenzierten Fälle waren immunreaktiv auf FGFR1. Die Expression war insgesamt bei PA und DNT höher als bei DA, es wurde aber keine Korrelation zwischen FGFR1-mutierten LGG/MNGT und der FGFR1-Expression beobachtet. Histologisch waren FGFR1-Mutationen mit oligodendrogliaartigen Zellen assoziiert, jedoch weder mit Alter noch Tumorlokalisation (s. Tabelle 27).

Diagnose	IRS	Geschlecht	Alter [Jahre]	Primär-/Rezidivstatus	Lokalisation
Andere	12	f	46	P	Kleinhirn
DNT	2	m	8	R	temporal
DNT	3	m	3	P	temporal
DNT	3	f	30	P	frontal
DNT	4	f	14	R	temporal
PA	4	m	8	P	Kleinhirn
PA	12	f	6	P	N. opticus
PA	6	m	45	R	frontal
PA	12	f	16	P	N. opticus
PA	8,5	m	23	P	Kleinhirn
RGNT	2	f	42	P	Kleinhirn
RGNT	4,5	m	58	P	Kleinhirn
RGNT	10	m	37	P	Kleinhirn

Tabelle 27: IRS und epidemiologische Daten (Geschlecht, Alter), Primär-/Rezidivstatus sowie Lokalisation der 13 Fälle mit c.546 oder c.656 FGFR1-Hotspot-Mutation, ANDERE=niedriggradiger neuroepithelialer Tumor.

## 4. Diskussion

Eine signifikante Untergruppe von LGG und MNGT zeigt uneindeutige oder überlappende morphologische Merkmale. Die diagnostische Genauigkeit von Hirntumoren kann durch die Nutzung histologischer sowie molekularer Daten verbessert werden [102]. Mit der vorliegenden Arbeit soll die Häufigkeit FGFR1 Hotspot-mutierter Tumoren in einer histologischen diagnoseunabhängigen Subkohorte von LGG/MNGT ohne andere bekannte Treibermutationen bestimmt werden. Unter 476 Tumoren mit molekularen Daten identifizierten wir 13 Fälle mit FGFR1 p.N546 oder p.K656 Mutationen, während 368 Tumoren andere Veränderungen aufwiesen. Dies deutet auf eine Gesamthäufigkeit von 2,7 % FGFR1 Hotspot-Mutationen in unselektierten LGG/MNGT-Kohorten hin. Die häufigsten Veränderungen abseits von FGFR1-Veränderungen waren IDH1/2-Mutationen (234 Fälle), KIAA1549-BRAF-Fusion (73 Fälle), 24 TERT C228/C250-mutierte Gliome und 35 Fälle mit NF1. In unserer Kohorte sind FGFR1-Hotspot-Mutationen die fünfthäufigste genetische Veränderung in LGG/MNGT-Tumoren. Eine systematische FGFR1-Analyse dieser Proben nach Ausschluss der vier häufigeren Mutationen würde zu 12 % FGFR1 N546/K656-Mutantenfällen führen. Die FGFR1-Mutationen wurden nur bei Tumoren beobachtet, die als PA, DNT und RGNT diagnostiziert wurden. Eine weitere Eingrenzung der FGFR1-Sequenzierungsanalyse auf nicht-diffus wachsende Gliome/MNGT-Tumore würde bis zu 15 % FGFR1 N546/K656-Mutationsfälle nach Ausschluss von Fällen mit BRAF-Fusion, IDH1/2, NF1 oder TERT Mutation ergeben. Wir haben in unserer Kohorte keine FGFR1-Hotspot-Mutationen in DA oder PXA gefunden. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass PA, DNT und RGNT zwar häufige FGFR1-Hotspot-Veränderungen teilen, aber epigenetisch unterschiedliche Tumorentitäten mit getrennten Methylierungsclustern darstellen [98]. In Übereinstimmung mit unseren Daten berichteten Qaddoumi et al. über FGFR1-Hotspot-Mutationen ausschließlich in DNT und diffusen oligodendroglialen Tumoren, während DA stattdessen eine FGFR1-Fusion und zwei FGFR1-TKD Duplikationen zeigten [103]. Eine Studie, die das molekulare Profil von adulten Hirnstammgliomen analysierte, berichtete über eine überraschend hohe FGFR1-

Mutationshäufigkeit bei 18 % der Patienten (13/73 Fälle) [104]. Diese Mutationen wurden auch bei thalamischen und zerebellären Tumoren sowohl bei H3F3A K27M mutierten als auch bei K27-Wildtypumoren berichtet. Die meisten dieser Fälle hatten eine high-grade Histologie, während unsere Kohorte absichtlich auf LGG- und MNGT-Tumoren beschränkt war. Eine weitere integrierte molekulare Analyse von 70 low-grade Gliomfällen mit NF1-Tumoren ergab 3 FGFR1-Hotspot-Mutationen. Solche Tumoren wurden auf der Grundlage von DNA-Methylierungsanalysen als nicht-pilozytisches Astrozytome klassifiziert [105]. Mit Ausnahme eines einzigen DA-Falls bestanden alle NF1-Tumoren in unserer anfänglichen Selektionskohorte aus klassischen PA, bei der keine FGFR1-Mutationen zu erwarten sind. Drei Viertel unserer RGNT-Samples waren FGFR1-mutiert, in Einklang mit einer früheren Publikation, die FGFR1-Hotspot-Mutationen in 10/10 RGNTs identifizierte [102]. Eine frühere Studie berichtete über p.N546K (n=22) oder p.K656E (n=8) Veränderungen in allen 30 RGNT und zusätzlichen PIK3CA-Mutationen in 63 % und NF1-Mutationen in 23 % dieser Tumoren [73]. Wie erwartet, zeigte die Mehrheit (44 %) der PA KIAA1549-BRAF Fusionen, gefolgt von 12 % NF1 Mutationen und 3 % FGFR1-Mutationen. Auch diese Daten stimmen mit der vorgeschlagenen Häufigkeit von 5 % FGFR1-Mutationen bei pilozytären Astrozytomen überein [106]. Während der Nachweis einer FGFR1-Veränderung in einem LGG/MNGT Tumor mit unklarem Subtyp bei der Differentialdiagnose zwischen PA, DNT und RGNT möglicherweise nicht hilfreich ist, kann er dazu beitragen, die Differentialdiagnose weiter einzugrenzen und bestimmte Tumorentitäten wie DA und PXA auszuschließen. Die Ergebnisse unterstützen weiterhin den Nutzen von FGFR-Molekulartests als Teil der diagnostischen Bewertung von pädiatrischen niedriggradigen glialen oder glioneuronalen Tumoren und identifizieren eine Tumoruntergruppe mit einem potenziellen therapeutischen Ziel, das für eine Teilmenge von Patienten mit subtotal resezierten, progressiven und/oder disseminierten Erkrankungen von Interesse sein kann. Eine Studie berichtete über fünf LGG-Fälle mit DNA-Methylierungsprofilen, die mit keiner Referenzmethylierungsklasse übereinstimmten, aber FGFR1-Veränderungen aufwiesen. In diesen Fällen

wurden oligodendrogliale Zellen ohne klar definierte Noduli, „floating neurons“, neurozytäre Rosetten, piloide Fortsätze, Rosenthal-Fasern oder andere spezifische histologische Befunde beschrieben [102]. Da in zwei Fällen eine FGFR1-Veränderung in Kombination mit PIK3CA oder PIK3R1 Mutation vorlag, stellten die Autoren in Frage, ob solche Fälle eine noch zu definierende Tumorklasse von RGNT außerhalb der stereotypen Lokalisation im vierten Ventrikel darstellen könnten. Darüber hinaus können die FGFR1-Hotspots eine Begründung für eine gezielte FGFR1-Behandlung liefern [107].

Einschränkungen der Arbeit können die Größe der Neuropathologie Tübingen als großes Zentrum mit Expertise in der pädiatrischen Neuroonkologie sein, da die hier analysierten Fälle eine inhärente Stichprobenverzerrung für herausfordernde neurochirurgische Fälle darstellen könnte, was sich wiederum auf die Häufigkeit von FGFR1-Veränderungen auswirken könnte. Weitere Einschränkungen unserer Arbeit sind die retrospektive Natur und die Nutzung archivierter Proben, Unterschiede in den klinischen Indikationen für die Biopsie und Einschränkungen der Menge und Art des für die molekulare Charakterisierung verfügbaren Materials sowie die Beschränkung der Proben auf LGG / MNGT ohne bekannte Treibermutation. Da das Methylierungsarray Tumor Clustering in einer so großen Kohorte nicht durchführbar ist, schließt unser Ansatz zur Auswahl von Fällen durch histologische Diagnosen Fälle mit potenziellen FGFR1-TACC1 Fusionen und FGFR1-TKD Tandemduplikationen nicht vollständig aus [103]. Da diese Studie zusätzliche molekulare FGFR1-Tests für eine Untergruppe mit unbekannter Treibermutation vorschlägt, haben wir unsere Kohorte absichtlich auf zuvor nicht informative Fälle beschränkt, nachdem sich gegenseitig ausschließende entitätsdefinierende Mutationen nicht miteinbezogen wurden [104]. In seltenen Fällen wurden jedoch drei sekundäre FGFR1-Hotspot-Mutationen unter 364 IDH-mutierten Gliomen berichtet, und solche Fälle wurden möglicherweise durch den Aufbau dieser Arbeit nicht entdeckt [108]. Zusammenfassend zeigt unsere Analyse, dass FGFR1-Hotspot-Mutationen ein häufiges Ereignis bei nicht diffus wachsenden Gliomen sind, insbesondere in PA-, DNT- und RGNT-Kohorten, und nicht mit einem ausgeprägten histologischen Muster assoziiert sind, was darauf

hindeutet, dass MAPK-veränderte Tumoren in pädiatrischen und erwachsenen Proben ein breites Spektrum von Tumoren umfassen. Die routinemäßige Durchführung einer FGFR1-Sequenzierungsanalyse in nicht diffus wachsenden niedriggradigen Hirntumoren könnte bis zu 15 % FGFR1 N546/K656-Mutationsfälle ergeben. Darüber hinaus werden derzeit zielgerichtete Therapien auf die wichtigsten genetischen Veränderungen von LGG getestet. Wichtig ist, dass das Vorhandensein spezifischer FGFR1-Mutationen den Weg zu bestehenden zielgerichteten Therapien für Kinder und Erwachsene mit wiederkehrenden oder schwer zu entfernenden Tumoren weist [85, 109, 110].

### **TMA**

Durch die Zusammenfassung verschiedener Proben auf einem TMA kann die Effektivität der Arbeit zum Beispiel bei einer immunhistochemischen Färbung gesteigert und gleichzeitig Arbeitsmaterial und Gewebe gespart werden. Zudem sind die Färbebedingungen für die Samples eines TMAs identisch, was die Auswertung der IHC vergleichbarer macht. Nachteilig kann sein, dass der ausgestanzte Gewebeausschnitt eventuell nicht repräsentativ ist, wobei diesem Nachteil in der Arbeit entgegengewirkt wurde, indem die Markierungen auf den HE-Schnitten, die als Referenz für die Lokalisation der Probeentnahme von den Paraffinblöcken dienten, durch einen Facharzt für Neuropathologie überprüft und so aussagekräftige Bereiche ausgewählt wurden. Zudem ist die geringe Probengröße der Stenzen ein Kritikpunkt, der insbesondere bei heterogenen Tumoren einen Flächenschnitt nicht ersetzen kann. In Studien wurde jedoch gezeigt, dass bei doppelter Stanzung desselben Tumorgewebes das Resultat des TMA mit einem Flächenschnitt nahezu übereinstimmt [111]. Daher wurden in dieser Arbeit, sofern möglich, immer zwei Stenzen pro Fall beurteilt. Ein weiterer Nachteil kann die unterschiedliche Höhe der Stenzen in Abhängigkeit vom Ausgangsgewebe sein, sodass auf einem Flächenschnitt des TMA möglicherweise nicht alle Proben abgebildet werden. Deshalb wurden von jedem TMA mehrere Flächenschnitte angefertigt, gefärbt und der Flächenschnitt mit den meisten dargestellten Samples schließlich ausgewertet.

## **Pyrosequenzierung**

Im Gegensatz zum heutzutage häufig genutzten NGS liegt der Vorteil der Pyrosequenzierung zum einen in der kürzeren Sequenzierdauer, zum anderen in der einfachen Anwendbarkeit. Besonders nützlich ist die Pyrosequenzierung hierbei für die Analyse von Single Nucleotide Polymorphismen (SNP), da man anstelle langer DNA-Abschnitte oder des gesamten Genoms nur kurze Sequenzen im Bereich des SNP (zwischen 10-30 bp) abbilden muss. Deshalb wurde diese Art der Sequenzierung auch in der vorliegenden Arbeit für die Analyse der zwei Hotspots c.546 und c.656 genutzt. Natürlich stellt dieser Aspekt zugleich auch die Limitierung der Pyrosequenzierung dar, da die Länge der analysierbaren Sequenz begrenzt ist [112] und somit nur für bestimmte Fragestellungen wie in der vorliegenden Arbeit eine nützliche Methode ist.

## 5. Zusammenfassung

Lowgrade-Gliome (LGG) und gemischte glioneuronale Tumore (MNGT) stellen eine heterogene Gruppe primärer Hirntumore dar und zeigen häufig Veränderungen im MAPK Signalweg. Nicht immer gelingt eine sichere Differenzierung allein durch die Histologie. Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung eines möglichen molekularen Diskriminators, in diesem Fall den zwei FGFR1-Hotspot-Mutationen c.546 (N546K) und c.656 (K656E). Über Mutationen der Tyrosinasekinase-Domäne des onkogenen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (FGFR1) wurde in Gehirntumoren verschiedener histologischer Muster berichtet. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Häufigkeit der FGFR1-Hotspot-Mutationen N546 und K656 in einer Gruppe LGG/MNGT ohne bekannte Treibermutation zu bestimmen. Dazu wurde die FGFR1-Immunhistochemie als potenzielles Instrument zum Nachweis dieser Veränderungen sowie die anschließende Pyrosequenzierung genutzt. Insgesamt wurden 476 LGG/MNGT-Tumoren auf die molekularen Veränderungen in BRAFV600E, IDH1/2, TERT-Promotor, NF1, H3F3A sowie auf eine KIAA-1549-BRAF Fusion untersucht. Die verbleibenden Fälle ohne bekannte Treibermutation wurden sodann auf ihre FGFR1-Immunoreaktivität und die FGFR1-Mutationshäufigkeit mittels Pyrosequenzierung untersucht. Hier wurden unter den 108 verbleibenden Fällen neun FGFR1 p.N546K- und 4 FGFR1 p.K656E Mutationen identifiziert. Fünf Tumore wurden als dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor (DNT), vier als pilozytisches Astrozytom (PA) und drei als rosettenbildender glioneuronaler Tumor (RGNT) klassifiziert. FGFR1-Mutationen waren mit einer Oligodendroglia-ähnlichen Histologie assoziiert, aber weder mit Alter noch Tumorlokalisierung. Eine immunhistochemische Expression von FGFR1 wurde in 92/106 Fällen beobachtet. Der FGFR1-Immune Reactivity Score war insgesamt bei PA und DNT höher als bei diffusen Astrozytomen, aber es wurde keine Korrelation zwischen der FGFR1-Mutation in Tumoren und dem FGFR1-Expressionsniveau beobachtet. Als Resultat dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass FGFR1-Hotspot-Mutationen die fünfthäufigste Veränderung bei LGG/MNGT ausmachen. Übertragen auf die Praxis kann die Durchführung einer FGFR1-

Sequenzanalyse bei treiberunbekannten niedriggradigen Hirntumoren (LGG/MNGT) in bis zu 12 % der Fälle eine Veränderung in FGFR1 N546/K656 aufdecken. Für die nahe Zukunft könnte hieraus neben einer akkurateren Diagnosestellung ein Fundament für eine Therapie basierend auf den molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors abgeleitet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Louis, D.N.O., Hiroko; Wiestler, Otmar D.; Cavenee, Webster K. , *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System ( Revised 4th Edition)*. 2016.
2. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Neuro Oncol*, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
3. Reuss, D.E., et al., *ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma*. *Acta Neuropathol*, 2015. **129**(1): p. 133-46.DOI: 10.1007/s00401-014-1370-3.
4. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
5. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016*. *Neuro Oncol*, 2019. **21**(Supplement\_5): p. v1-v100.DOI: 10.1093/neuonc/noz150.
6. Reinhardt, A., et al., *Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations*. *Acta Neuropathol*, 2018. **136**(2): p. 273-291.DOI: 10.1007/s00401-018-1837-8.
7. Elvidge, A., W. Penfield, and W. Cone, *Gliomas of the central nervous system: study of 210 verified cases*. *Assoc Res Nerv Ment Dis Proc*, 1937. **16**: p. 107-181.
8. Bucy, P.C. and W.A. Gustafson, *Structure, Nature and Classification of the Cerebellar Astrocytomas*. *The American Journal of Cancer*, 1939. **35**(3): p. 327-353.DOI: 10.1158/ajc.1939.327.
9. Korshunov, A., et al., *Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma*. *Acta Neuropathologica*, 2009. **118**(3): p. 401-405.DOI: 10.1007/s00401-009-0550-z.
10. Burkhard, C., et al., *A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma*. *Journal of Neurosurgery*, 2003. **98**(6): p. 1170-1174.DOI: DOI 10.3171/jns.2003.98.6.1170.
11. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 415-421.DOI: 10.1038/nature12477.
12. Mobark, N.A., et al., *Clinical management and genomic profiling of pediatric low-grade gliomas in Saudi Arabia*. *PLoS One*, 2020. **15**(1): p. e0228356.DOI: 10.1371/journal.pone.0228356.
13. Hasselblatt, M., et al., *BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011. **37**(7): p. 803-6.DOI: 10.1111/j.1365-2990.2011.01193.x.

14. Jones, D.T., et al., *Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 927-32.DOI: 10.1038/ng.2682.
15. Sievers, P., et al., *Posterior fossa pilocytic astrocytomas with oligodendroglial features show frequent FGFR1 activation via fusion or mutation*. Acta Neuropathol, 2019.DOI: 10.1007/s00401-019-02097-7.
16. Tihan, T., et al., *Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(10): p. 1061-8.DOI: 10.1097/00005072-199910000-00004.
17. Zhang, J., et al., *Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 602-12.DOI: 10.1038/ng.2611.
18. Horbinski, C., *To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore?* J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(1): p. 2-7.DOI: 10.1097/NEN.0b013e318279f3db.
19. Colin, C., et al., *Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2013. **39**(6): p. 693-705.DOI: 10.1111/nan.12013.
20. Giannini, C., et al., *Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it?* Cancer, 1999. **85**(9): p. 2033-45.
21. Giannini, C., et al., *Immunophenotype of pleomorphic xanthoastrocytoma*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(4): p. 479-85.DOI: 10.1097/00000478-200204000-00010.
22. Hirose, T., C. Giannini, and B.W. Scheithauer, *Ultrastructural features of pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative study with glioblastoma multiforme*. Ultrastruct Pathol, 2001. **25**(6): p. 469-78.DOI: 10.1080/019131201753343502.
23. Kepes, J.J., L.J. Rubinstein, and L.F. Eng, *Pleomorphic xanthoastrocytoma: a distinctive meningocerebral glioma of young subjects with relatively favorable prognosis. A study of 12 cases*. Cancer, 1979. **44**(5): p. 1839-52.DOI: 10.1002/1097-0142(197911)44:5<1839::aid-cnrcr2820440543>3.0.co;2-0.
24. Ida, C.M., et al., *Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Natural History and Long-Term Follow-Up*. Brain Pathol, 2015. **25**(5): p. 575-86.DOI: 10.1111/bpa.12217.
25. She, D., et al., *MR Imaging Features of Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma Mimicking High-Grade Astrocytoma*. AJNR Am J Neuroradiol, 2018. **39**(8): p. 1446-1452.DOI: 10.3174/ajnr.A5701.
26. Kepes, J.J., *Glioblastoma multiforme masquerading as a pleomorphic xanthoastrocytoma*. Childs Nerv Syst, 1989. **5**(3): p. 127.DOI: 10.1007/bf00272110.
27. Furuta, T., et al., *Clinicopathological and genetic association between epithelioid glioblastoma and pleomorphic xanthoastrocytoma*. Neuropathology, 2018. **38**(3): p. 218-227.DOI: 10.1111/neup.12459.
28. Thompson, E.M., et al., *Bevacizumab, irinotecan, temozolomide, tyrosine kinase inhibition, and MEK inhibition are effective against pleomorphic xanthoastrocytoma regardless of V600E status*. J Neurooncol, 2018. **140**(2): p. 261-268.DOI: 10.1007/s11060-018-2975-5.

29. Schindler, G., et al., *Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma.* Acta Neuropathol, 2011. **121**(3): p. 397-405.DOI: 10.1007/s00401-011-0802-6.
30. Ma, C., et al., *BRAF V600E, TERT, and IDH2 Mutations in Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Observations from a Large Case-Series Study.* World Neurosurg, 2018. **120**: p. e1225-e1233.DOI: 10.1016/j.wneu.2018.09.050.
31. Zou, H., et al., *Molecular features of pleomorphic xanthoastrocytoma.* Hum Pathol, 2019. **86**: p. 38-48.DOI: 10.1016/j.humpath.2018.08.038.
32. Ebrahimi, A., et al., *Pleomorphic xanthoastrocytoma is a heterogeneous entity with pTERT mutations prognosticating shorter survival.* Acta Neuropathologica Communications, 2022. **10**(1): p. 5.DOI: 10.1186/s40478-021-01308-1.
33. Daoud, E.V., et al., *Spinal Pleomorphic Xanthoastrocytoma With a QKI-RAF1 Fusion.* J Neuropathol Exp Neurol, 2019. **78**(1): p. 10-14.DOI: 10.1093/jnen/nly112.
34. Louis, D.N., E.C. Holland, and J.G. Cairncross, *Glioma classification: a molecular reappraisal.* Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 779-86.DOI: 10.1016/s0002-9440(10)61750-6.
35. Weller, M., et al., *Gliome: Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie.* Dtsch Arztebl International, 2016. **113**(6): p. -18-.DOI: 10.3238/PersOnko/2016.02.12.04.
36. Broniscer, A., et al., *Clinical and molecular characteristics of malignant transformation of low-grade glioma in children.* J Clin Oncol, 2007. **25**(6): p. 682-9.DOI: 10.1200/JCO.2006.06.8213.
37. Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors.* Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.DOI: 10.1007/s00401-008-0455-2.
38. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas.* Acta Neuropathol, 2010. **120**(6): p. 707-18.DOI: 10.1007/s00401-010-0781-z.
39. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.* N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.DOI: 10.1056/NEJMoa0808710.
40. Sturm, D., et al., *Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge.* Nat Rev Cancer, 2014. **14**(2): p. 92-107.DOI: 10.1038/nrc3655.
41. Qaddoumi, I., et al., *Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology.* Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 833-45.DOI: 10.1007/s00401-016-1539-z.
42. Suzuki, H., et al., *Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas.* Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 458-68.DOI: 10.1038/ng.3273.

43. Bettgowda, C., et al., *Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1453-5.DOI: 10.1126/science.1210557.
44. Keser, H., et al., *Well-differentiated pediatric glial neoplasms with features of oligodendroglioma, angiocentric glioma and dysembryoplastic neuroepithelial tumors: a morphological diagnostic challenge*. Turk Patoloji Derg, 2014. **30**(1): p. 23-9.DOI: 10.5146/tjpath.2013.01204.
45. Lee, J., et al., *Oligodendrogliomas, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, arising during teenage years often lack TERT promoter mutation that is typical of their adult counterparts*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 95.DOI: 10.1186/s40478-018-0598-x.
46. Huse, J.T., et al., *Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young (PLNTY): an epileptogenic neoplasm with oligodendroglioma-like components, aberrant CD34 expression, and genetic alterations involving the MAP kinase pathway*. Acta Neuropathol, 2017. **133**(3): p. 417-429.DOI: 10.1007/s00401-016-1639-9.
47. Ramkissoon, L.A., et al., *Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8188-93.DOI: 10.1073/pnas.1300252110.
48. Reiche, W., et al., *[Dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNT). Pattern of neuroradiologic findings]*. Radiologe, 1996. **36**(11): p. 884-9.DOI: 10.1007/s001170050155.
49. Dumas-Duport, C., et al., *Dysembryoplastic neuroepithelial tumors: nonspecific histological forms -- a study of 40 cases*. J Neurooncol, 1999. **41**(3): p. 267-80.DOI: 10.1023/a:1006193018140.
50. Chappé, C., et al., *Dysembryoplastic neuroepithelial tumors share with pleomorphic xanthoastrocytomas and gangliogliomas BRAF(V600E) mutation and expression*. Brain Pathol, 2013. **23**(5): p. 574-83.DOI: 10.1111/bpa.12048.
51. Pekmezci, M., et al., *The genetic landscape of ganglioglioma*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 47.DOI: 10.1186/s40478-018-0551-z.
52. Chappe, C., et al., *Dysembryoplastic neuroepithelial tumors share with pleomorphic xanthoastrocytomas and gangliogliomas BRAF(V600E) mutation and expression*. Brain Pathol, 2013. **23**(5): p. 574-83.DOI: 10.1111/bpa.12048.
53. Dougherty, M.J., et al., *Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas*. Neuro Oncol, 2010. **12**(7): p. 621-30.DOI: 10.1093/neuonc/noq007.
54. Prabowo, A.S., et al., *BRAF V600E mutation is associated with mTOR signaling activation in glioneuronal tumors*. Brain Pathol, 2014. **24**(1): p. 52-66.DOI: 10.1111/bpa.12081.
55. Agarwal, S., et al., *Papillary glioneuronal tumor--a rare entity: report of four cases and brief review of literature*. Childs Nerv Syst, 2012. **28**(11): p. 1897-904.DOI: 10.1007/s00381-012-1860-3.

56. Kim, D.H. and Y.L. Suh, *Pseudopapillary neurocytoma of temporal lobe with glial differentiation*. Acta Neuropathol, 1997. **94**(2): p. 187-91.DOI: 10.1007/s004010050692.
57. Komori, T., et al., *Papillary glioneuronal tumor: a new variant of mixed neuronal-glial neoplasm*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(10): p. 1171-83.DOI: 10.1097/00000478-199810000-00002.
58. Li, D., et al., *Clinical, radiological, and pathological features of 16 papillary glioneuronal tumors*. Acta Neurochir (Wien), 2014. **156**(4): p. 627-39.DOI: 10.1007/s00701-014-2023-y.
59. Bridge, J.A., et al., *Identification of a novel, recurrent SLC44A1-PRKCA fusion in papillary glioneuronal tumor*. Brain Pathol, 2013. **23**(2): p. 121-8.DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00612.x.
60. Pages, M., et al., *Papillary glioneuronal tumors: histological and molecular characteristics and diagnostic value of SLC44A1-PRKCA fusion*. Acta Neuropathol Commun, 2015. **3**: p. 85.DOI: 10.1186/s40478-015-0264-5.
61. Hou, Y., et al., *Papillary glioneuronal tumor (PGNT) exhibits a characteristic methylation profile and fusions involving PRKCA*. Acta Neuropathol, 2019. **137**(5): p. 837-846.DOI: 10.1007/s00401-019-01969-2.
62. Kuchelmeister, K., et al., *Dysembryoplastic neuroepithelial tumour of the cerebellum*. Acta Neuropathol, 1995. **89**(4): p. 385-90.DOI: 10.1007/bf00309634.
63. Komori, T., B.W. Scheithauer, and T. Hirose, *A rosette-forming glioneuronal tumor of the fourth ventricle: infratentorial form of dysembryoplastic neuroepithelial tumor? Am J Surg Pathol, 2002. 26(5): p. 582-91.DOI: 10.1097/00000478-200205000-00004.*
64. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system (vol 114, pg 97, 2007)*. Acta Neuropathologica, 2007. **114**(5): p. 547-547.DOI: 10.1007/s00401-007-0278-6.
65. Jacques, T.S., et al., *Mixed glioneuronal tumour of the fourth ventricle with prominent rosette formation*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(2): p. 217-20.DOI: 10.1111/j.1365-2990.2005.00692.x.
66. Preusser, M., et al., *Rosette-forming glioneuronal tumor of the fourth ventricle*. Acta Neuropathol, 2003. **106**(5): p. 506-8.DOI: 10.1007/s00401-003-0758-2.
67. Allinson, K.S., et al., *Rosette-forming glioneuronal tumor with dissemination throughout the ventricular system: a case report*. Clin Neuropathol, 2015. **34**(2): p. 64-9.DOI: 10.5414/NP300682.
68. Anan, M., et al., *A rosette-forming glioneuronal tumor of the spinal cord: the first case of a rosette-forming glioneuronal tumor originating from the spinal cord*. Hum Pathol, 2009. **40**(6): p. 898-901.DOI: 10.1016/j.humpath.2008.11.010.
69. Schlamann, A., et al., *An individual patient data meta-analysis on characteristics and outcome of patients with papillary glioneuronal tumor, rosette glioneuronal tumor with neuropil-like islands and rosette forming glioneuronal tumor of the fourth ventricle*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101211.DOI: 10.1371/journal.pone.0101211.

70. Gessi, M., et al., *FGFR1 mutations in Rosette-forming glioneuronal tumors of the fourth ventricle*. J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(6): p. 580-4.DOI: 10.1097/NEN.0000000000000080.
71. Ellezam, B., et al., *Recurrent PIK3CA mutations in rosette-forming glioneuronal tumor*. Acta Neuropathol, 2012. **123**(2): p. 285-7.DOI: 10.1007/s00401-011-0886-z.
72. Cachia, D., et al., *Synchronous rosette-forming glioneuronal tumor and diffuse astrocytoma with molecular characterization: a case report*. Clin Neuropathol, 2014. **33**(6): p. 407-11.DOI: 10.5414/NP300767.
73. Sievers, P., et al., *Rosette-forming glioneuronal tumors share a distinct DNA methylation profile and mutations in FGFR1, with recurrent co-mutation of PIK3CA and NF1*. Acta Neuropathol, 2019. **138**(3): p. 497-504.DOI: 10.1007/s00401-019-02038-4.
74. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
75. Coleman, S.J., et al., *The ins and outs of fibroblast growth factor receptor signalling*. Clin Sci (Lond), 2014. **127**(4): p. 217-31.DOI: 10.1042/CS20140100.
76. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *The Fibroblast Growth Factor signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2015. **4**(3): p. 215-66.DOI: 10.1002/wdev.176.
77. Chiu, I.M., W.P. Wang, and K. Lehtoma, *Alternative splicing generates two forms of mRNA coding for human heparin-binding growth factor 1*. Oncogene, 1990. **5**(5): p. 755-62.
78. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(2): p. 116-29.DOI: 10.1038/nrc2780.
79. Kelleher, F.C., et al., *Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease*. Carcinogenesis, 2013. **34**(10): p. 2198-205.DOI: 10.1093/carcin/bgt254.
80. Helsten, T., M. Schwaederle, and R. Kurzrock, *Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications*. Cancer Metastasis Rev, 2015. **34**(3): p. 479-96.DOI: 10.1007/s10555-015-9579-8.
81. Katoh, M., *FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review)*. Int J Mol Med, 2016. **38**(1): p. 3-15.DOI: 10.3892/ijmm.2016.2620.
82. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.DOI: 10.3322/caac.21262.
83. Cihoric, N., et al., *Prognostic role of FGFR1 amplification in early-stage non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2014. **110**(12): p. 2914-22.DOI: 10.1038/bjc.2014.229.
84. Andre, F., et al., *Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER)*. Lancet Oncol, 2014. **15**(3): p. 267-74.DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70611-9.

85. Andre, F., et al., *Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3693-702.DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0190.
86. Farrow, E.G., et al., *Extended mutational analyses of FGFR1 in osteoglophonic dysplasia*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(5): p. 537-9.DOI: 10.1002/ajmg.a.31106.
87. Marzin, P., et al., *Heterozygous FGFR1 mutation may be responsible for an incomplete form of osteoglophonic dysplasia, characterized only by radiolucent bone lesions and teeth retentions*. Eur J Med Genet, 2020. **63**(2): p. 103729.DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.103729.
88. Courage, C., et al., *Novel synonymous and missense variants in FGFR1 causing Hartsfield syndrome*. Am J Med Genet A, 2019. **179**(12): p. 2447-2453.DOI: 10.1002/ajmg.a.61354.
89. Katoh, M. and H. Nakagama, *FGF receptors: cancer biology and therapeutics*. Med Res Rev, 2014. **34**(2): p. 280-300.DOI: 10.1002/med.21288.
90. Brooks, A.N., E. Kilgour, and P.D. Smith, *Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(7): p. 1855-62.DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0699.
91. Chang, J., et al., *Prognostic value of FGFR gene amplification in patients with different types of cancer: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105524.DOI: 10.1371/journal.pone.0105524.
92. Parker, B.C. and W. Zhang, *Fusion genes in solid tumors: an emerging target for cancer diagnosis and treatment*. Chin J Cancer, 2013. **32**(11): p. 594-603.DOI: 10.5732/cjc.013.10178.
93. Feng, S., et al., *Fibroblast growth factor receptors: multifactorial-contributors to tumor initiation and progression*. Histol Histopathol, 2015. **30**(1): p. 13-31.DOI: 10.14670/HH-30.13.
94. Rivera, B., et al., *Germline and somatic FGFR1 abnormalities in dysembryoplastic neuroepithelial tumors*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 847-63.DOI: 10.1007/s00401-016-1549-x.
95. Singh, D., et al., *Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma*. Science, 2012. **337**(6099): p. 1231-5.DOI: 10.1126/science.1220834.
96. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.DOI: 10.1126/science.2448875.
97. Ebrahimi, A., et al., *ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas*. Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**(1): p. 60.DOI: 10.1186/s40478-016-0331-6.
98. Capper, D., et al., *DNA methylation-based classification of central nervous system tumours*. Nature, 2018. **555**(7697): p. 469-474.DOI: 10.1038/nature26000.
99. Ronaghi, M., M. Uhlen, and P. Nyren, *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science, 1998. **281**(5375): p. 363, 365.DOI: 10.1126/science.281.5375.363.

100. Eriksson, J., et al., *7-Deaza-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate as an alternative nucleotide for the pyrosequencing technology*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2004. **23**(10): p. 1583-94.DOI: 10.1081/ncn-200031402.
101. Engelhardt, S., et al., *Frequent FGFR1 hotspot alterations in driver-unknown low-grade glioma and mixed neuronal-glia tumors*. J Cancer Res Clin Oncol, 2022.DOI: 10.1007/s00432-021-03906-x.
102. Lucas, C.G., et al., *Comprehensive analysis of diverse low-grade neuroepithelial tumors with FGFR1 alterations reveals a distinct molecular signature of rosette-forming glioneuronal tumor*. Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 151.DOI: 10.1186/s40478-020-01027-z.
103. Qaddoumi, I., et al., *Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology*. Acta Neuropathologica, 2016. **131**(6): p. 833-845.DOI: 10.1007/s00401-016-1539-z.
104. Picca, A., et al., *FGFR1 actionable mutations, molecular specificities, and outcome of adult midline gliomas*. Neurology, 2018. **90**(23): p. e2086-e2094.DOI: 10.1212/wnl.0000000000005658.
105. Fisher, M.J., et al., *Integrated molecular and clinical analysis of low-grade gliomas in children with neurofibromatosis type 1 (NF1)*. Acta Neuropathol, 2021. **141**(4): p. 605-617.DOI: 10.1007/s00401-021-02276-5.
106. Collins, V.P., D.T. Jones, and C. Giannini, *Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 775-88.DOI: 10.1007/s00401-015-1410-7.
107. Porta, R., et al., *FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **113**: p. 256-267.DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.02.018.
108. Ahrendsen, J.T., et al., *IDH-mutant gliomas with additional class-defining molecular events*. Mod Pathol, 2021.DOI: 10.1038/s41379-021-00795-w.
109. Touat, M., et al., *Targeting FGFR Signaling in Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(12): p. 2684-94.DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-14-2329.
110. Katoh, M., *Therapeutics Targeting FGF Signaling Network in Human Diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(12): p. 1081-1096.DOI: 10.1016/j.tips.2016.10.003.
111. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, *Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma*. Laboratory Investigation, 2000. **80**(12): p. 1943-1949.DOI: 10.1038/labinvest.3780204.
112. Mashayekhi, F. and M. Ronaghi, *Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry*. Anal Biochem, 2007. **363**(2): p. 275-87.DOI: 10.1016/j.ab.2007.02.002.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift „Analyse von ZNS-Tumoren bezüglich ihres FGFR1-Mutationsstatus“ ohne unzulässige Hilfe Dritter erstellt wurde. Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte ebenfalls durch Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm. Die Probenakquise, Auswertung der klinischen Daten und bereits durchgeführter molekulargenetischer Analysen, die Beschaffung der FFPE-Proben, Erstellung der TMA und die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorproben erfolgten durch mich. Folgende Methoden wurden nach Einarbeitung durch Katrin Trautmann und Nadin Kreschker von mir eigenständig geplant, durchgeführt und ausgewertet: DNA-Isolation, Gelelektrophorese, PCR, Vorbereitung und Planung der Pyrosequenzierung. Das Anfertigen der Leerschnitte für DNA- sowie RNA-Isolation und HE- und Flächenschnitte für die Immunhistochemie wurde vom gesamten Laborpersonal durchgeführt. Die Vervollständigung des molekularen Profils wurde von Nadin Kreschker für die BRAF1549KIAA Fusionstranskripte, sowie TERT-Promotoranalyse durchgeführt, die BRAFV600E und IDH1/2 Analysen wurden durch mich geplant und sowohl von Nadin Kreschker als auch von mir durchgeführt. Die FGFR1 Pyrosequenzierungsläufe wurde von Nadin Kreschker ausgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung erfolgte durch Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm und mich. Die Auswahl des IHC-Antikörpers, des endgültigen IHC-Protokolls und der genutzten PCR- sowie Pyrosequenzierprimer für die FGFR1-Hotspots c.546 sowie c.656 wurde in Absprache mit Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm durch mich getroffen. Die statistische Auswertung wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm von mir vorgenommen. Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst zu haben. Alle wörtlich oder inhaltlich aus anderen Publikationen übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet und keine weiteren als die hier angegebenen Quellen verwendet. Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits unter dem Titel „Frequent FGFR1-hotspot-alterations in driver-unknown low-grade glioma and

mixed neuronal-gliial tumors“ im „Journal of Cancer Research and Clinical Oncology“ von mir als Erstautorin veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit beruht auf den Daten, die von mir auch für die Publikation bereitgestellt wurden. Es wurden keine fremden Daten verwendet und Bezüge auf die Publikation als solche kenntlich gemacht.

## 8. Liste der Veröffentlichungen

Teile der Dissertationsschrift wurden bereits in folgendem Journal veröffentlicht:

Engelhardt S, Behling F, Beschorner R, et al. Frequent FGFR1 hotspot alterations in driver-unknown low-grade glioma and mixed neuronal-glial tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022;148(4):857-866. doi:10.1007/s00432-021-03906-x

### **Interessenkonflikt**

Die Autorin erklärt, dass sie keinen Interessenkonflikt hat.

### **Ethische Anerkennung**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Verfahren entsprechen den ethischen Standards des institutionellen Forschungsausschusses und der Helsinki-Erklärung von 1964 und ihren späteren Änderungen oder vergleichbaren ethischen Standards. Dieser Artikel enthält keine Tierversuche, die von einem der Autoren durchgeführt wurden.

### **Einwilligung nach Aufklärung**

Die Einwilligung nach Aufklärung wurde von allen einzelnen Teilnehmenden der Arbeit eingeholt.

## **Danksagung**

Für die kontinuierliche Unterstützung während der Ausarbeitung des Themas und der beispiellosen Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. med. J. Schittenhelm von ganzem Herzen.

Besonders möchte ich mich zudem darüber hinaus bei allen Mitarbeitenden der Neuropathologie Tübingen für die hervorragende technische Unterstützung und die herzliche Zusammenarbeit bedanken, die mir für immer in schöner Erinnerung bleiben wird.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freund:innen bedanken, die mich immer unterstützen und mich auch in diesem Vorhaben unterstützt haben. Ganz besonderer Dank gilt meiner Mama, nicht nur für die hilfreichen Anregungen, sondern auch dafür, dass sie immer für mich da ist und mich mit aller Kraft unterstützt.

Danke!