

Aus der Neurologische Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Interdisziplinärem Schwerpunkt
Neuroonkologie

**Analyse zellfreier DNA (cfDNA) in liquid biopsies von
neuroonkologischen Tumoren**

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

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

vorgelegt von

Fachner, Ines

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. Dr. G. Tabatabai
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Beschorner

Tag der Disputation: 14.10.2021

Für meine Familie

Anmerkung: Um der besseren Lesbarkeit willen steht im Folgenden die männliche Sprachform für beide Geschlechter.

2.4 Methodik der Ergebnis-Auswertung von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung	32
2.5 Methodik der Auswertung der klinischen Patientendaten	33
2.6 Programme und Literaturrecherche	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs	36
3.1.1 Allgemeine klinische Charakteristika des Patientenkollektivs	37
3.1.2 Liquor-spezifische Charakteristika des Patientenkollektivs	42
3.2 Quantifizierung von cfDNA in Liquorproben	51
3.2.1 Analyse der Liquor-cfDNA-Menge in Bezug auf klinische und probenbezogene Charakteristika	52
3.3 Auswertung der Gewebeprobe(n)en	56
3.3.1 Eigenschaften der berücksichtigten Gewebeprobe(n)en	57
3.3.2 Ergebnisse der Gewebeprobe(n)en-Sequenzierung	59
3.3.2.1 Punktmutationen (SNVs) in Gewebeprobe(n)en	59
3.3.2.2 Geschätzte Mutationslast der Gewebeprobe(n)en	61
3.3.2.3 Struktur- und Kopienzahlvarianten (CNVs) in Gewebeprobe(n)en	62
3.4 Ergebnisse der Liquor-cfDNA-Sequenzierung	62
3.5 Vergleich der Ergebnisse von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung	66
3.5.1 Analyse des potentiellen und tatsächlichen Nachweises von Tumorgewebe-Mutationen in Liquor-cfDNA	66
3.5.2 Analyse der am häufigsten in Liquor-cfDNA potentiell nachweisbaren Tumorgewebe-Mutationen bezüglich klinischer Charakteristika	69
4. Diskussion	76
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	76
4.2 Diskussion der Ergebnisse	78
4.2.1 Diskussion der in dieser Studie untersuchten klinischen Aspekte als potentielle Einflussfaktoren der Liquor-cfDNA	78

4.2.2 Diskussion weiterer potentieller Einflussfaktoren der Liquor- cfDNA	86
4.3 Limitationen der Arbeit.....	89
4.4 Fazit und Ausblick.....	92
5. Zusammenfassung.....	94
6. Literaturverzeichnis	95
7. Anhang	116
7.1 Anhang Material und Methoden.....	116
7.1.1 Auflistung der untersuchten Gene der Panel-Sequen- zierung	116
7.1.2 Personenbezogene und klinische Merkmale.....	121
7.2 Anhang Ergebnisse	122
8. Erklärung zum Eigenanteil	135
9. Danksagung.....	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu allgemeinen klinischen Charakteristika des Kollektivs	43
Tabelle 2: Übersicht zu Liquor-spezifischen Charakteristika des Kollektivs ...	46
Tabelle 3: Übersicht Vortherapie der ZNS-Beteiligung vor Liquorentnahme, N = 30 Patienten	47
Tabelle 4: Ergebnisübersicht von Liquor-Untersuchung und -Zytologie, N = 30 Patienten	50
Tabelle 5: Übersicht der hinsichtlich der cfDNA-Menge im Liquor analysierten Charakteristika	55
Tabelle 6: Übersicht der berücksichtigten Gewebeproben von N = 17 Patienten	58
Tabelle 7: Übersicht der nachgewiesenen Liquor-cfDNA-Mutationen (N = 17 Patienten).....	64
Tabelle 8: Aufgliederung der Patientenzahl mit und ohne Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen hinsichtlich klinischer Eigenschaften (N = 17 Patienten).....	65
Tabelle 9: Übersicht der in Liquor-cfDNA mutierten Gene geordnet nach Diagnosegruppe der Patienten	66
Tabelle 10: Gewebemutationen mit und ohne Nachweis in Liquor-cfDNA.....	75
Anhang-Tabelle X 1: Übersicht aller im Gewebe nachgewiesenen Mutationen, sortiert nach Gen-Namen (N = 17 Patienten).....	122
Anhang-Tabelle X 2: Übersicht der im Gewebe mutierten Gene sortiert nach Gewebeart.....	128
Anhang-Tabelle X 3: Übersicht der im Gewebe mutierten Gene sortiert nach Diagnosegruppe	129
Anhang-Tabelle X 4: Amplifikationen in Gewebeproben, sortiert nach Gen-Namen (von N = 17 Patienten).....	130

Anhang-Tabelle X 5: Deletionen in Gewebeproben, sortiert nach Gen-Namen (von N =17 Patienten)	131
Anhang-Tabelle X 6: Strukturvarianten in Gewebeproben, sortiert nach Gen- Namen (von N =17 Patienten).....	132
Anhang-Tabelle X 7: Übersicht der potentiell in Liquor-cfDNA nachweisbaren Tumorgewebe-Mutationen, sortiert nach Gruppen (N =17 Patienten)	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: cfDNA im Liquor für liquid biopsy	18
Abbildung 2: Morphologie einer Hirnkapillare	22
Abbildung 3: Äußere und innere Liquorräume	24
Abbildung 4: Übersicht der Tumorgrunderkrankungen des Patientenkollektivs, Anzahl (%), N = 30.....	38
Abbildung 5: CONSORT-Diagramm mit Gesamtkollektiv (N = 30) und Patientenkollektiv mit Liquor-cfDNA-Quantifizierung (N = 25) ...	51
Abbildung 6: Übersicht des medianen cfDNA-Gehalts hinsichtlich klinischer Charakteristika (N = 25 Patienten).....	52
Abbildung 7: Übersicht über cfDNA-Menge und Volumen der Liquorproben (N = 25 Patienten).....	53
Abbildung 8: CONSORT-Diagramm mit Gesamtkollektiv (N = 30) und Patien- tenkollektiv mit berücksichtigter Gewebe- und Liquor-cfDNA- Sequenzierung (N = 17).....	57
Abbildung 9: Anzahl der mutierten Gene bei Gewebesequenzierung pro Probe (N = 17 Patienten).....	60
Abbildung 10: Geschätzte Mutationslast der Gewebeproben (N = 17 Patienten).....	61
Abbildung 11: Übersicht der Patienten mit potentiell und tatsächlichem Nachweis von Tumorgewebe-Mutationen in Liquor-cfDNA (N = 17 Patienten).....	67
Abbildung 12: Übersicht der potentiell in Liquor-cfDNA nachweisbaren Tumor- gewebe-Mutationen, sortiert nach Gruppen 1a)-2d) (N = 17 Patienten).....	69
Abbildung 13: Übersicht der Gene mit der häufigsten potentiellen Nachweis- barkeit als Liquor-cfDNA-Mutation (N = 17 Patienten).....	70
Abbildung 14: Allel-Frequenzen der Gewebemutationen mit und ohne Nachweis als Liquor-cfDNA-Mutation.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Astro	Astrozytom
AUC	Area under the curve
BEV	Bevacizumab
bds	beidseits
bp	Basenpaare
BWK	Brustwirbelkörper
Ca	Karzinom
CCNU	Lomustin
cfDNA	cell-free/zellfreie DNA
cfRNA	cell-free/zellfreie RNA
cMRT	Schädel-MRT
CNV	Kopienzahlvariante
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computerresonanztomographie
CTC	zirkulierende Tumorzellen
ctDNA	circulating tumor DNA/zirkulierende Tumor-DNA
CTx	Chemo-/Systemtherapie
d	Tag
ddPCR	digital droplet PCR
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DOI	Digital Object Identifier
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EV	extrazellulärer Vesikel
EVD	externe Ventrikeldrainage
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GBM	Glioblastom WHO Grad IV
ggf.	gegebenenfalls

hg19	humanes Referenzgenom
HGVS	Human Genom Variation Society
ID	Identifikationsnummer
IDH1-I	IDH1-Inhibitor BAY1436032
Indel	Insertion/Deletion
Ipi	Ipilimumab
JJJJ	Jahr
k. A.	keine Angabe
KB	Keimbahnmutation
KH	Katharinenhospital Stuttgart
KM	Kontrastmittel
KOF	Körperoberfläche
LDT	Laboratory Developed Test
li	links
LK	Lymphknoten
M	männlich
Max	Maximum
Mb	Megabase
MED/Med	Median
Medullo	Medulloblastom
Min	Minimum
MM	Monate
Mon	Monat
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	mitochondriale DNA
MTX	Methotrexat
Mut	Mutationslast
Mut/Mb	Mutationen pro Megabase
N	(Patienten-)Anzahl
NAF	Novel Allelfrequenz
NC	Neurochirurgie
neg	negativ

NET	neutrophile extrazelluläre Falle
NGS	Next-Generation Sequencing
Nivo	Nivolumab
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
O	ONC.1-Panel
Oligo	Oligodendrogliom
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben
Pat	Patient(en)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCV	Procarbazin, Lomustin, Vincristin
PFS	Progressionsfreies Überleben
pos	positiv
re	rechts
Rez	Rezidiv/Progress
RF	Raumforderung
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RTx	Strahlentherapie
SAM	Sequence Alignment/Map
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SNV	single nucleotide variant/Punktmutation
T	TUM.4-Panel
TMZ	Temozolomid
Tx	Therapie
U	Untersuchung
u. a.	unter anderem
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UR	underrepresented, Regionen mit Coverage <30
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VP	ventrikulo-peritonealer Shunt

vs.	versus
W	weiblich
WHO	World Health Organization
Wo	Woche
Z. n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil
ZYTO	Zytologie

1. Einleitung

1.1 Molekulargenetische Analysen im Kontext mit Neoplasien

Krebs entsteht durch die Veränderung von Genen (Vogelstein und Kinzler 2004). Die Tumorgenese beginnt dabei in einer einzelnen Körperzelle, in der eine Serie verschiedener nicht-synonymer (d. h. zu einer Veränderung der Basensequenz des Genoms führender) Genmutationen auftritt (Nowell 1976, Zschocke 2018b). Dies kann sowohl die Modifikation einzelner Basenpaare (Punktmutationen (SNVs)) als auch größere strukturelle Chromosomenaberrationen (wie Fusionen und Translokationen) und Kopienzahlvarianten (CNVs) (wie Amplifikationen und Deletionen) umfassen (Vogelstein und Kinzler 2004).

Im Kontext mit Neoplasien sind insbesondere Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen von Bedeutung: Proto-Onkogene (z. B. KRAS, BRAF) codieren für Proteine, die Zellüberleben und Zellproliferation stimulieren, während die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen (z. B. TP53, PTEN) das Zellwachstum und den Ablauf des Zellzyklus bremsen (Zschocke 2018b). Durch aktivierende Mutationen in einem Allel eines Proto-Onkogens (dann „Onkogen“ genannt) und inaktivierende Mutationen in beiden Tumorsuppressorgen-Allelen verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zellsterben hin zu unkontrollierter Proliferation, vermindertem Zelltod und längerem Zellüberleben.

Zusätzlich führen inaktivierende Mutationen in DNA-Reparaturgenen (z. B. die Mismatch-Repair-Gene MSH2 und MLH1) zu einer bis zu 1000-fach erhöhten Mutationsrate des Genoms der betreffenden Zelle, die wiederum das Auftreten von Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen und damit die Tumorgenese beschleunigt (Vogelstein und Kinzler 2004, Zschocke 2018b).

Die Varianten werden als „Keimbahnmutationen“ bezeichnet, wenn sie bereits in der befruchteten Eizelle (und damit in allen entstehenden Körperzellen) vorliegen und so ggf. eine Prädisposition für bestimmte Krebserkrankungen schaffen (Vogelstein und Kinzler 2004, Zschocke 2018a, Zschocke 2018b). Somatische Mutationen hingegen treten erst im Laufe des Lebens auf und sind daher nicht in allen Körperzellen vorhanden (Zschocke 2018a).

1.2 Neuroonkologische Tumore im Überblick

Neuroonkologische Tumore lassen sich in zwei große Gruppen einteilen:

Primäre ZNS-Tumore stammen von Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) ab (z. B. von Zellen der Hirnhäute oder von Gliazellen) und werden ihrerseits gemäß der Art der Ursprungszelle unterteilt in Meningeome, Astrozytome, Oligodendrogliome etc. (Wick et al. 2016). Die World Health Organisation (WHO) ordnet den Tumoren vier Malignitätsgrade zu (WHO Grad I - IV), welche das Ausmaß der Anaplasie und die mittlere prognostizierte Überlebenszeit widerspiegeln (Reifenberger et al. 2017, Wick et al. 2016). Bis 2016 wurden für diese Einteilung vorrangig histologische Kriterien genutzt (Louis et al. 2007). Inzwischen ist für die (Sub-)Klassifikation auch das Vorliegen bestimmter Genveränderungen definierend: Gemäß der neuesten WHO Klassifikation 2016 wird z. B. das Vorliegen einer IDH1-Mutation vs. eines IDH1-Wildtyps bei Glioblastomen oder einer C11ORF95-RELA-Genfusion bei Ependymomen berücksichtigt, da sie unter anderem mit Unterschieden in Therapieansprechen und Prognose einhergehen (Louis et al. 2016, Reifenberger et al. 2017).

Sekundäre ZNS-Tumore entstehen, wenn sich Zellen von Tumoren anderen Gewebsursprungs im ZNS ansiedeln (Wick et al. 2016). Sie entwickeln sich bei 20-40 % der Krebspatienten im Verlauf ihrer Erkrankung (Achrol et al. 2019, Barnholtz-Sloan et al. 2012, Gould 2018) und sind daher die häufigsten malignen Hirntumore (Gould 2018, Lin et al. 2015). Meist stammen sie von Brust-, Lungen- und Dickdarmkrebs sowie von Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen ab (Berghoff et al. 2014, Gould 2018).

Eine Meningeosis neoplastica liegt vor, wenn sich Tumorzellen im Liquorsystem ausstreuen und leptomeningeale Metastasen bilden (Achrol et al. 2019, Wick et al. 2016). Dies kann sowohl bei primären (Noh et al. 2015, Awad et al. 1986) als auch bei sekundären ZNS-Tumoren auftreten und entspricht meist einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (Achrol et al. 2019, Le Rhun und Galanis 2016).

Noch immer gehen Tumore des ZNS mit einer schlechten Prognose einher: Während die relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Krebserkrankungen in Deutschland 2015-2016 etwa 60 % betrug, belief sie sich bei primären ZNS-Tumoren auf nur ca. 20 % der Patienten (Robert Koch-Institut 2019). Patienten mit ZNS-Metastasen wiesen in einigen Studien sogar lediglich eine 2-Jahres-Überlebensrate von ca. 4-8 % auf (Hall et al. 2000, Lagerwaard et al. 1999).

Aus diesem Grund wird viel an der Optimierung der Therapiemöglichkeiten geforscht: Neben operativer Therapie, Chemo- und Radiotherapie (Ackermann et al. 2012, Stupp et al. 2009) untersuchen Studien zunehmend auch verschiedene Medikamente zur zielgerichteten Therapie (Han und Brastianos 2017, Le Rhun und Galanis 2016, Dagogo-Jack et al. 2017, Touat et al. 2017). Die „targeted therapy“ greift beispielsweise in die durch Mutationen veränderten Signalwege und Stoffwechselprozesse der Krebszellen ein, um diese zu regulieren und zu blockieren (Joo et al. 2013).

Daher ist die Kenntnis über den molekularen Status einer Tumorerkrankung zur korrekten Diagnosestellung und individualisierten Krebstherapie von essentieller Bedeutung (Schwarzenbach et al. 2011, Tan und Lynch 2013, Olar und Aldape 2014, Jackson und Chester 2015).

1.3 Diagnostische Analysemedien bei neuroonkologischen Tumoren

1.3.1 Gewebebiopsie

Um molekulargenetische Informationen über eine Neoplasie zu erhalten, z. B. zur korrekten Diagnose oder Abwägung des Einsatzes einer „targeted therapy“, ist aktuell in der Regel die Durchführung einer Gewebebiopsie der Goldstandard (Diaz und Bardelli 2014, Ackermann et al. 2012). Besonders im ZNS ist der Zugang zu Gewebe in einigen Fällen risikoreich, z. B. wenn der Tumor im Bereich des Rückenmarks oder in der Nähe von eloquenten Hirnarealen liegt (Connolly et al. 2016, Shankar et al. 2017). Zu den möglichen Komplikationen einer stereotaktischen ZNS-Biopsie gehören u. a. Gesichtslähmung, Hemiparese, Hydrozephalus, Blutung und Tod (McGirt et al. 2005, Quick-Weller et al. 2016). Zudem zeigt eine Gewebebiopsie nur Mutationen eines kleinen Tumorausschnitts, die nicht zwangsläufig dem kompletten Tumor entsprechen

(Gerlinger et al. 2012). Diese räumliche intratumorale Heterogenität kann für das Therapieversagen von targeted therapies verantwortlich sein, die aufgrund des Mutationsnachweises aus einzelnen Gewebebiopsien initiiert wurden (Bedard et al. 2013).

Überdies können durch die Formalin-Fixierung der Gewebeproben Basenveränderungen in der DNA entstehen, die eventuell zu falsch-positiven Sequenzierungsergebnissen führen (Quach et al. 2004).

Außerdem werden im Fall von soliden Tumoren mit ZNS-Metastasierung durch alleinige Untersuchung des Primärtumors gegebenenfalls nicht alle Mutationen erfasst, da manche Mutationen der ZNS-Metastasen nicht im Primärtumorgewebe vorliegen (Brastianos et al. 2015, De Mattos-Arruda et al. 2015). Beispielsweise beobachteten Duchnowska et al. (2012), dass ZNS-Metastasen eines Mamma-Karzinoms (selbst bei einigen Patientinnen ohne vorherige endokrine Therapie) teilweise eine andere Zellrezeptorausstattung aufwiesen als der Primärtumor. Dies kann erklären, warum ZNS-Metastasen und ihr Primarius zum Teil unterschiedlich auf systemische Therapien reagieren (Brastianos et al. 2015, Dagogo-Jack et al. 2017). Gleichzeitig kann die Kenntnis der ZNS-Metastasen-spezifischen Mutationen deren gezieltere Therapie ermöglichen (Brastianos et al. 2015, Dagogo-Jack et al. 2017).

1.3.2 Liquid biopsy

Als Alternative zu Gewebebiopsien wird an der weniger invasiven „liquid biopsy“ geforscht: der molekulargenetischen Analyse von Tumor-Nukleinsäuren aus Körperflüssigkeiten (Connolly et al. 2017, Nevel et al. 2018, Boire et al. 2019, Peng et al. 2017). Tumor-Nukleinsäuren liegen u. a. in zirkulierenden Tumorzellen, in extrazellulären Vesikeln oder zellfrei als DNA und RNA vor (Schwarzenbach et al. 2009, Bertero et al. 2019, Fontanilles et al. 2018).

Die liquid biopsy mit zellfreier DNA (cfDNA) (schematisch dargestellt in Abb. 1) steht im Fokus dieser Arbeit.

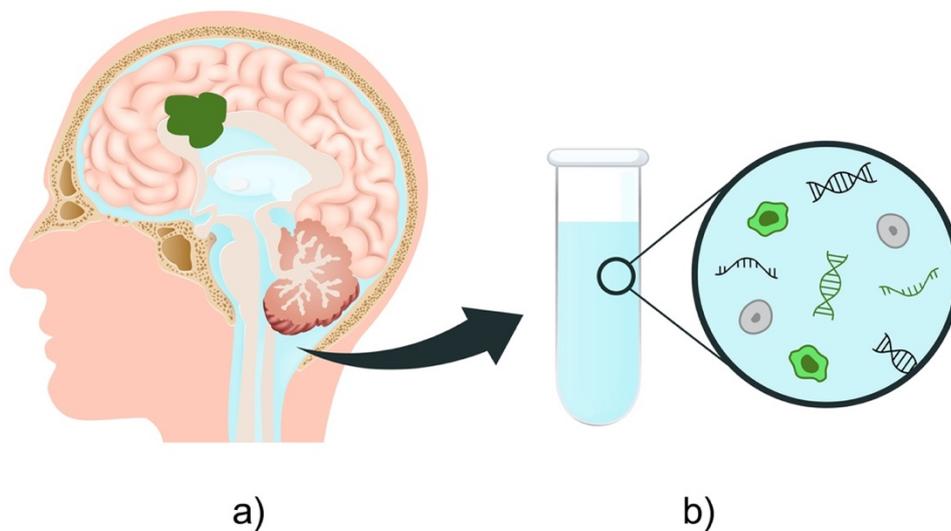


Abbildung 1: cfDNA im Liquor für liquid biopsy

- a) Schematische Darstellung eines beispielhaften ZNS-Tumors (grün), der von Liquor cerebrospinalis (hellblau) umspült wird.
- b) Schematische Darstellung einer Liquorprobe (hellblau), die beispielhaft neben benignen Zellen wie Leukozyten (grau) und nicht-maligner cfDNA (schwarz) auch zirkulierende Tumorzellen (grün) und zellfreie Tumor-DNA (grün) enthält. Letztere ist ausschlaggebend für die in dieser Arbeit untersuchte liquid biopsy.

1.4 Liquid biopsy mit zellfreier DNA (cfDNA)

1.4.1 Ursprung, Eigenschaften und Abbau von cfDNA

cfDNA stammt von schnell proliferierenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen (Schwarzenbach et al. 2011, Jahr et al. 2001, Stroun et al. 2001, Stroun et al. 2000, Nevel et al. 2018). Makrophagen können am Freisetzungsprozess von extrazellulärer DNA aus nekrotischen und apoptotischen Zellen beteiligt sein (Pisetsky und Fairhurst 2007). Neben Apoptose und Nekrose kann cfDNA auch aktiv sezerniert werden (Anker et al. 1999, Diaz und Bardelli 2014, van der Vaart und Pretorius 2008a). Beispielsweise wird cfDNA von neutrophilen Granulozyten abgesondert, wenn sie z. B. durch Interleukine und reaktive Sauerstoffverbindungen zur Freisetzung von aus ihrer DNA bestehenden Fasern aktiviert werden (Pokrywka et al. 2015). Diese Fasern fungieren als neutrophile extrazelluläre Fallen (NET), weshalb der Vorgang auch unter dem Begriff der „NETose“ bekannt ist (Yipp und Kubes 2013).

cfDNA besteht aus Doppelsträngen (Jahr et al. 2001, van der Vaart und Pretorius 2008a) bzw. Einzel- und Doppelsträngen (Nevel et al. 2018). Die Größe der cfDNA-Fragmente im Blut beträgt meist ~180 Basenpaare (bp) (Jahr et al. 2001, Suzuki et al. 2008), teilweise erreichen sie auch Längen von >10 Kilobasen (Jahr et al. 2001). Im Blut von gesunden Personen befinden sich meist niedrige Mengen cfDNA: Die Mittelwerte schwanken zwischen 3,6-5 ng/ml (Suzuki et al. 2008), 3,7 ng/ml (Jahr et al. 2001), 13 ng/ml (Leon et al. 1977), 14 ng/ml (Shapiro et al. 1983) und 21 ng/ml (Schwarzenbach et al. 2009).

Wie cfDNA abgebaut wird, ist nicht endgültig bekannt. Als mögliche Abbaumechanismen gelten die Beteiligung des Plasma-Enzyms Desoxyribonuclease (DNase) Typ I und Zellen mit DNA-bindenden Oberflächen-Rezeptoren (einige Lymphozyten und Monozyten) (van der Vaart und Pretorius 2008a). Ein schneller Abbau scheint wahrscheinlich aufgrund verschiedener Studienergebnisse: In einer Studie von Emlen und Mannik (1984) wurde Mäusen xenogene (von Kälbern stammende) zellfreie DNA injiziert, welche unabhängig von Fragmentgröße und Ein- bzw. Doppelsträngigkeit nicht länger als 40 Minuten im Blut nachweisbar war. Darüber hinaus beobachteten Lo et al. (1999), dass die Halbwertszeit von fetaler zellfreier DNA im Blut von Müttern nach der Entbindung etwa 16 Minuten betrug.

Die kurze Persistenz der cfDNA in Körperflüssigkeiten geht mit einer Dynamik der cfDNA-Menge einher: Beispielsweise konnten Madsen et al. (2019) bei wiederholten Blutkontrollen von 33 gesunden Personen signifikante Unterschiede der cfDNA-Menge im Blut im Tagesverlauf messen.

1.4.2 Überblick: cfDNA im Blut bei verschiedenen Neoplasien

Der Großteil der bisherigen cfDNA-Studien konzentriert sich auf die Untersuchung von cfDNA im Blut. Mehrfach wurde nachgewiesen, dass bei Tumorpatienten mit Mittelwerten von ≥ 180 ng/ml meist deutlich erhöhte Mengen an cfDNA im Blut vorliegen (Leon et al. 1977, Shapiro et al. 1983, Schwarzenbach et al. 2011).

Ein Teil der cfDNA im Blut stammt bei Krebspatienten von Tumorzellen ab und wird als circulating tumor DNA (ctDNA) bezeichnet (Stroun et al. 1989). In der ctDNA aus dem Blut können zum Tumorgewebe übereinstimmende Mutationen festgestellt werden (Sorenson et al. 1994). Der Anteil von ctDNA an der Gesamt-cfDNA im Blut ist jedoch mit ca. 0,01 %-10 % gering (Diehl et al. 2005, Diehl et al. 2008), bzw. bei Tumor-Patienten mit ähnlicher klinischer Situation sehr variabel (3 %-93 %) (Jahr et al. 2001).

Bezüglich der Quelle der ctDNA im Blut existieren unterschiedliche Überlegungen und Forschungsergebnisse, beispielsweise ob bzw. zu welchem Anteil sie von zirkulierenden Tumorzellen abstammt (Schwarzenbach et al. 2009, Anker et al. 1999).

Als möglichen Faktor, der die cfDNA-Konzentration im Blut bei Tumorpatienten zusätzlich steigert, haben Tamkovich et al. (2006) die Inhibition bzw. Reduktion der Aktivität des DNA-abbauenden Plasma-Enzyms DNase Typ I identifiziert: Bei 18 Patienten mit malignen gastrointestinalen Tumoren konnten sie eine Minderung der DNase-I-Aktivität im Blut im Vergleich zu 20 gesunden Kontrollprobanden messen, die mit verbesserter Integrität und erhöhter Konzentration der zirkulierenden DNA einherging.

Einige Studien konnten Zusammenhänge zwischen klinischen Aspekten und dem cfDNA- bzw. ctDNA-Gehalt des Blutes bei Tumorpatienten beobachten: Beispielsweise stellten Schwarzenbach et al. (2009) fest, dass die cfDNA-Menge im Blut bei Patienten mit Prostata-Karzinom mit dem Tumorstadium korreliert und im Fall einer Metastasierung erhöht ist. Auch bei Diehl et al. (2008) zeigte sich bei Patienten mit malignen kolorektalen Tumoren eine Korrelation zwischen der ctDNA-Menge im Blut und der Tumorlast. Darüber hinaus wurde die cfDNA-Konzentration im Blut als Biomarker für Brustkrebs von einer Metaanalyse mit einer Sensitivität und Spezifität von je 87 % eingeschätzt (Yu et al. 2019).

1.4.3 cfDNA im Blut bei neuroonkologischen Tumoren

Hinsichtlich Tumorerkrankungen mit ZNS-Affektion führen Untersuchungen der cfDNA im Blut zu unterschiedlichen Ergebnissen.

In manchen Studien zu Patienten mit primären Hirntumoren konnten Tumormutationen in der cfDNA im Blut festgestellt werden: Zum Beispiel gelang Salkeni et al. (2013) bei allen 3 untersuchten Glioblastom-Patienten (100 %) mit EGFRvIII-Deletion der Nachweis ebendieser Mutation in der ctDNA im Blut. Auch Boisselier et al. (2012) konnten bei 60 % (15 von 25) der Gliom-Patienten die bekannte IDH1-Mutation in der Plasma-ctDNA nachweisen.

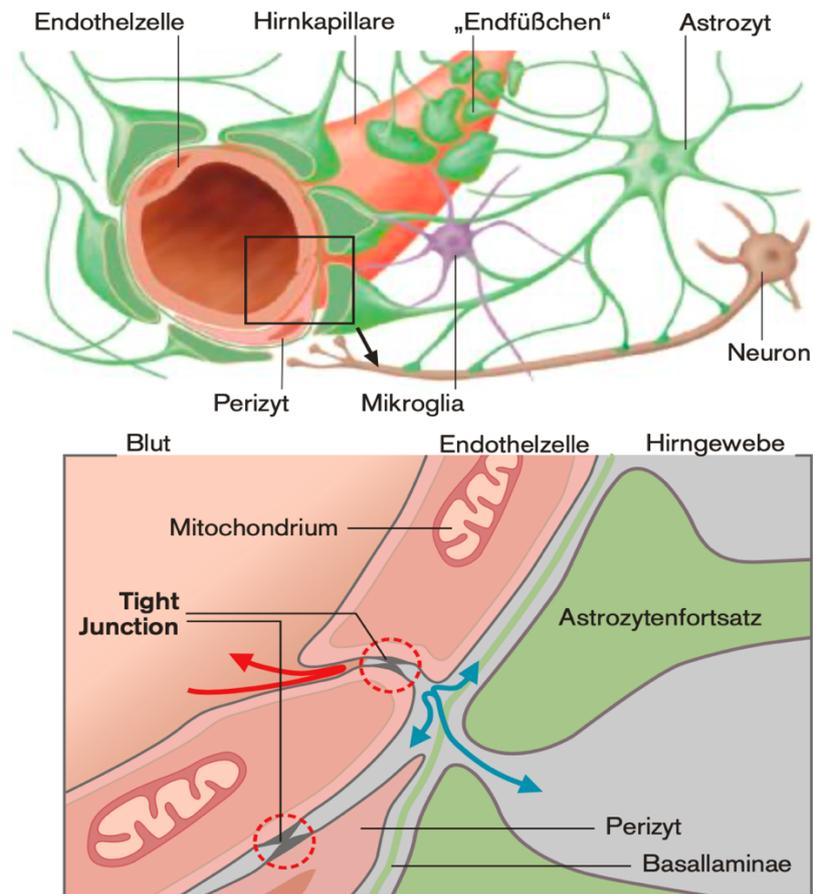
Gleichzeitig deuten viele andere Studien daraufhin, dass die Analyse von cfDNA im Blut bei neuroonkologischen Tumoren im Vergleich zu anderen malignen Neoplasien unterlegen ist:

In einer großen Studie von Bettgowda et al. (2014) mit einem Patientenkollektiv verschiedener Tumorerkrankungen lag bei primären ZNS-Tumoren (N = 41) selten und wenn, dann lediglich eine geringe Menge ctDNA im Blutplasma vor (lediglich bei <50% der Medulloblastome und bei <10% der Gliome, im Schnitt ca. 10 Fragmente mit mutierter DNA pro 5 ml). Im Gegensatz dazu konnte bei 82 % (112/136) der Patienten mit anderen soliden Krebserkrankungen (Brustkrebs, Darmkrebs, Blasenkrebs, maligne Melanome u. v. m.) im metastasierten Stadium ctDNA in größeren Mengen im Blut nachgewiesen werden. Eine ähnliche Tendenz beobachteten Schwaederle et al. (2017), die bei 72 % (374/518) der Krebspatienten mit extra-ZNS-Primärtumoren mindestens eine Basensequenz-verändernde Mutation in der Plasma-ctDNA vorfanden, jedoch lediglich bei 32 % (49/152) der ZNS-Tumorpatienten.

Bei Patienten mit ZNS-Metastasierung einer anderen Tumorerkrankung beobachteten De Mattos-Arruda et al. (2015) außerdem noch ein anderes Problem: „ZNS-spezifische“ Mutationen, die im Gewebe der ZNS-Metastasen, aber nicht im Primärtumorgewebe vorlagen, wurden durch die Plasma-ctDNA nicht adäquat abgebildet (De Mattos-Arruda et al. 2015).

Als Ursache für die geringe ctDNA-Nachweisbarkeit im Blut bei neuroonkologischen Tumoren gilt vor allem die Blut-Hirn-Schranke der Blutgefäße (siehe Abb. 2) in Gehirn und Rückenmark (Bertero et al. 2019). Sie besteht aus

Endothelzellen, einer Basalmembran, Perizyten und Astrozyten-Fortsätzen und wird in der aktuellen Literatur auch als „neurovaskuläre Einheit“ bezeichnet (Kolter 2018, Saunders et al. 2012, Brinker et al. 2014).



© Georg Thieme Verlag KG

Abbildung 2: Morphologie einer Hirnkapillare

Erläuterungen: Die Gesamtheit aus Endothelzellen, der Basalmembran, Perizyten und Astrozyten-Fortsätzen wird auch als „neurovaskuläre Einheit“ bezeichnet.

Die tight junctions zwischen den Endothelzellen beschränken den parazellulären Transport von Molekülen und Zellen aus dem Blut ins ZNS. Die Permeabilität der Schranke wird außerdem von den umgebenden Zellen wie Perizyten, Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen beeinflusst (Kolter 2018, Saunders et al. 2012, Brinker et al. 2014). Bei malignen neuroonkologischen Tumoren ist die Integrität der Blut-Hirn-Schranke meist gestört, beispielsweise durch pathologisch veränderte Angiogenese-Signalwege im Fall von Gliomen oder durch

penetrierende Tumorzellen im Fall einer ZNS-Metastasierung solider Tumore (Liebner et al. 2018).

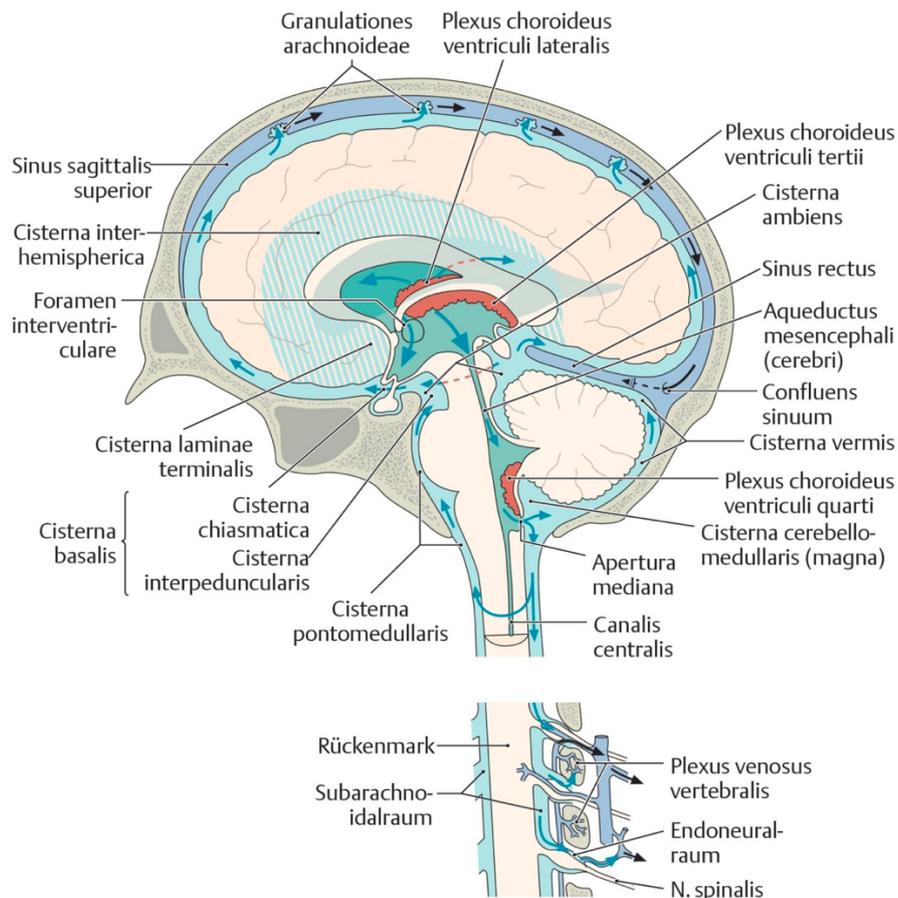
Trotz der Barrierestörung zeigt sich hinsichtlich der Analyse von cfDNA bei neuroonkologischen Tumoren in vielen Studien ein anderes Medium dem Blut überlegen: der Liquor cerebrospinalis (De Mattos-Arruda et al. 2015, Li et al. 2018, Miller et al. 2019).

1.4.4 cfDNA im Liquor bei neuroonkologischen Tumoren

Unter physiologischen Bedingungen ist der Liquor cerebrospinalis eine klare, zellarme Flüssigkeit (bis zu 5 Zellen/ μ l, i. d. R. Lymphozyten und Monozyten) mit einem auf die inneren und äußeren Liquorräume (siehe Abb. 3) verteilten Volumen von etwa 100-160 ml (Mense 2020, Wildemann und Storch-Hagenlocher 2016). Gemäß dem traditionellen Verständnis wird der Liquor durch Ultrafiltration des Blutes und aktive Sekretion des Plexus choroideus der Hirnventrikel mehrfach täglich neu gebildet und zirkuliert unidirektional durch das Liquorsystem vor allem zu den arachnoidalen Granulationen (Pacchioni), wo er entlang eines hydrostatischen Gradienten in den venösen Abfluss des Gehirns absorbiert wird (Mense 2020, Orešković und Klarica 2010).

In Abweichung dazu gehen einige aktuelle Studien davon aus, dass der Liquor permanent im gesamten Liquorsystem durch Flüssigkeitsverschiebungen entlang osmotischer und hydrostatischer Gradienten zwischen zerebralen Kapillaren auf der einen und den mit interstitieller Flüssigkeit oder Liquor gefüllten Räumen des ZNS auf der anderen Seite produziert und drainiert wird (Brinker et al. 2014, Orešković und Klarica 2010).

Die Zusammensetzung des Liquors kann sich in pathologischen Zuständen wie bei Entzündung, Neurodegeneration und Neoplasien verändern (Mattox et al. 2019, Liebner et al. 2018, Molinuevo et al. 2018, Romme Christensen et al. 2012, Wildemann und Storch-Hagenlocher 2016). Neben Ionen und Abbauprodukten des Stoffwechsels der ZNS-Zellen (Orešković und Klarica 2010) kann der Liquor beispielsweise auch cfDNA enthalten (De Mattos-Arruda et al. 2015, Fontanilles et al. 2018, Mattox et al. 2019, Miller et al. 2019, Nevel et al. 2018).



© Georg Thieme Verlag KG

Abbildung 3: Äußere und innere Liquorräume

Erläuterungen: Die inneren Liquorräume bestehen aus den vier Hirnventrikeln (Ventriculi laterales, Ventriculus tertius, Ventriculus quartus), dem Aquaeductus mesencephali und dem Canalis centralis im Rückenmark.

Die cfDNA-Gesamtmenge im Liquor ist niedriger als im Blutplasma, enthält aber einen höheren Anteil an ctDNA (Pentsova et al. 2016). Einige Studien konnten zeigen, dass Liquor-ctDNA die Tumormutationen von Patienten mit primärem ZNS-Tumor bzw. mit solidem Tumor und auf das ZNS beschränkter Metastasierung (De Mattos-Arruda et al. 2015, Pan et al. 2015, Li et al. 2016) sowie bei Patienten mit Meningeosis carcinomatosa bei nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (Li et al. 2018) besser abbildet als Plasma-ctDNA.

Darüber hinaus beobachteten Yang et al. (2014) in der Liquor-cfDNA von Patienten mit ZNS-Metastasen unter anderem Mutationen, die nicht im Gewebe der Primärtumore (hier Bronchial-Adenokarzinome) vorlagen (Yang et al. 2014).

Insgesamt kommt die Forschung zur liquid biopsy bei Patienten mit neuroonkologischen Tumoren teilweise zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Nachweisbarkeit von Tumormutationen in Liquor-cfDNA: Der Anteil an Patienten mit Mutationsnachweis in Liquor-cfDNA schwankt zwischen Werten unter 50 % (Connolly et al. 2017, Miller et al. 2019) bis hin zu 100 % (De Mattos-Arruda et al. 2015, Li et al. 2018).

Einige Studien konnten bereits Hinweise auf Zusammenhänge zwischen klinischen Aspekten und der Nachweisbarkeit von Tumormutationen in Liquor-cfDNA bei neuroonkologischen Tumoren beobachten:

- Diagnoseentität und Tumorgrad:

In einem Kollektiv aus 27 Patienten mit primären und sekundären ZNS-Tumoren gelang von Baumgarten et al. (2020) der Liquor-Mutationsnachweis in cfDNA/ cfRNA bei insgesamt 74 % (20/27), davon jedoch bei keinem der zwei eingeschlossenen Gliom-Patienten (Glioblastom WHO Grad IV).

Im Fall primärer Hirntumore identifizierten manche Forscher außerdem den WHO-Tumorgrad als möglichen Einflussfaktor auf die Nachweisbarkeit von Tumormutationen im Liquor: Bei Wang et al. (2015) lag bei Tumoren des WHO-Grads III und IV (N = 19) statistisch signifikant öfter ctDNA im Liquor vor als bei Tumoren des WHO Grads I und II (N = 15) (95 % vs. 47 %). Eine ähnliche Tendenz beobachteten auch Martinez-Ricarte et al. (2018): Bei 85 % (17/20) ihrer Patienten mit diffusen Gliomen WHO Grad II-IV konnten sie Tumormutationen in Liquor-ctDNA messen, alle Patienten ohne Liquor-ctDNA-Mutationen (3/20) hatten weniger aggressive WHO Grad II Tumore.

- Meningeosis neoplastica:

Bei Patienten mit solidem Tumor mit ZNS-Metastasen und Meningeosis neoplastica stellten Pentsova et al. (2016) höhere Gesamt-cfDNA-Mengen im Liquor fest als bei solchen ohne Meningeosis neoplastica. Außerdem lag die Nachweisrate von Tumormutationen in Liquor-cfDNA bei verschiedenen Tumorerkrankungen mit bekannter Meningeosis neoplastica in vielen Studien mit 75 %-100 % der Patienten sehr hoch. Beispielsweise betraf dies

75 % (3/4) der Patienten mit unterschiedlicher Tumorgrunderkrankung (Pentsova et al. 2016), 93 % (26/28) der Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Li et al. 2018) bzw. 100 % (3/3) der Patienten mit malignem Melanom (Momtaz et al. 2016).

○ Angrenzung des Tumors an die innere Liquorräume:

Die ctDNA-Menge im Liquor von Patienten mit primärem ZNS-Tumor korrelierte bei Wang et al. (2015) mit der direkten Angrenzung an Liquorräume. In dieser Studie konnte bei keinem Patienten ctDNA im Liquor nachgewiesen werden, wenn dessen Tumor nicht an Liquorräume angrenzte (0/5), wohl aber bei 86 % der Patienten mit angrenzendem Tumor (24/28) (Wang et al. 2015).

1.5 Ziele der Dissertations-Schrift

Aufgrund der hohen Variabilität der Nachweisrate von Tumormutationen in Liquor-cfDNA in bisherigen Studien ist es von besonderer Relevanz, klinische Faktoren zu identifizieren, die den Erfolg der Liquor-cfDNA-Analyse beeinflussen (Boire et al. 2019, Zorofchian et al. 2019). Das Ziel dieser Dissertationschrift ist daher die Überprüfung der oben genannten und die Identifikation weiterer klinischer Aspekte, die bei neuroonkologischen Tumoren potentiell Einfluss auf die cfDNA-Menge im Liquor und die Nachweisbarkeit von Tumormutationen darin ausüben. Dazu erfolgen:

- die Analyse und der Vergleich der Ergebnisse einer Panel-Sequenzierung von bis zu 710 tumorrelevanten Genen von routinemäßig entnommenen Gewebe- und Liquorproben bei einem Patientenkollektiv mit verschiedenen malignen ZNS-Neoplasien,
- die Auswertung der cfDNA-Mengen dieser Liquor-Proben und
- die Analyse klinischer Charakteristika des Patientenkollektivs im Zusammenhang mit der cfDNA-Menge im Liquor und der Nachweisbarkeit von Tumormutationen darin.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Von Mai 2017 bis Januar 2018 wurden Gewebe- und Liquorproben von volljährigen Patienten gesammelt, die sich in diesem Zeitraum zur Abklärung oder Behandlung einer ZNS-Beteiligung ihrer Krebserkrankung in Betreuung durch die Interdisziplinäre Sektion Neuroonkologie des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) befanden.

Es wurden nur Daten von Patienten ausgewertet, die der Teilnahme an diesem Forschungsprojekt nach Aufklärung mit Unterschrift zustimmten. Die Aufklärungsbögen umfassten die Versionen 03.2016, 05.2015, 7 und 9 des zentralen Standardaufklärungsbogens des Universitätsklinikums Tübingen sowie den Aufklärungsbogen der neurochirurgischen Biobank des UKT.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen genehmigt (Ethikvotum Nummer 484/2016BO1).

2.2 Probenmaterial Gewebe

Die untersuchten Gewebeproben stammten von Biopsien oder Resektions-Operationen während des Erhebungszeitraums sowie von solchen Eingriffen vor dem Erhebungszeitraum. Sie umfassten ZNS-Primär-Tumorgewebe, ZNS-Rezidiv-Tumorgewebe, ZNS-Metastasengewebe, Gewebe von Primärtumoren anderer Organe, extrazerebrales Metastasengewebe von nicht-hirneigenen Tumorerkrankungen sowie Tumorgewebe, welches nicht zur Primärerkrankung der ZNS-Beteiligung zugehörig war.

2.2.1 Verarbeitung und Analyse der Gewebeproben

Die folgenden Verarbeitungsschritte der Proben sowie die molekulargenetischen Analysen wurden von CeGaT GmbH durchgeführt. Die Beschreibung der Methodik orientiert sich daher an den Angaben, die durch CeGaT GmbH zur Verfügung gestellt wurden.

Bei der molekulargenetischen Analyse der Gewebeproben wurden in Panels zusammengefasst tumorassoziierte Gene betrachtet. Insgesamt wurden für die

Gewebeproben dieser Fallserie das TUM.3-Panel mit 649 Genen und das TUM.4-Panel mit 710 Genen genutzt. Eine genaue Auflistung der jeweiligen Gene der Panels findet sich im Anhang 1. Wenn zwei Gewebeproben eines Patienten verfügbar waren, wurden beide Proben sequenziert und analysiert.

2.2.1.1 DNA-Isolierung, Sequenzierung und Bioinformatik

Bei den Gewebeproben erfolgte die Isolierung der Tumor-DNA aus Schnellschnitt- oder FFPE-Material (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe) im Anschluss an eine Makrodissektion durch die Pathologie oder die Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Es wurde eine Sequenzierung der DNA aus Normal- und Tumorgewebe durchgeführt. Zur Anreicherung der kodierenden Bereiche mit angrenzenden Intronbereichen wurde die Agilent in Solution Technologie (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) genutzt. Die Analyse dieser Bereiche erfolgte mithilfe von Hochdurchsatz-Sequenzierung durch das HiSeq2500/400 System oder das NovaSeq-System (Illumina, Inc., San Diego, USA).

Die Aufbereitung der Sequenzierdaten erfolgte mit der bcl2fastq Conversion Software (Version 2.19 von Illumina, Inc., San Diego, USA). Zur Entfernung mitsequenzierter Adaptersequenzen wurden Skewer (Jiang et al. 2014) genutzt. Dann erfolgte der Abgleich gegen das humane Referenzgenom hg19 mithilfe des Burrows-Wheeler Alignment Tools (Li und Durbin 2009, Li und Durbin 2010). Eliminiert wurden positionell nicht eindeutig zuzuordnende Sequenzen und wahrscheinlich auf Amplifikation zurückführbare Sequenzduplikate. Die Bestimmung von Varianten wurde mit SAMtools (Li et al. 2009) und VarScan durchgeführt (Koboldt et al. 2009). Zur Annotation der Varianten wurde auf verschiedene interne und externe Datenbanken von CeGaT GmbH zurückgegriffen.

2.2.1.2 Genetische Datenauswertung von Punktmutationen (SNVs) und Small Indels

In der Bewertung wurden alle innerhalb der Exons und deren angrenzenden nicht-codierenden Regionen (+/- 8 Basenpaare (bp)) auftretenden somatischen

und Keimbahn-Varianten (SNVs und Small Indels) mit einer Novel Allelfrequenz (NAF) von >5 % in der Tumorprobe berücksichtigt. In Abhängigkeit von der Probenqualität wurde die Nachweisgrenze im Einzelfall auf 15 % erhöht. Die klinische Interpretation wurde auf der Basis von Literaturrecherche und verschiedenen externen und internen Datenbanken von CeGaT GmbH durchgeführt. Hinsichtlich der Testsensitivität bestand eine Abhängigkeit von der Sequenziertiefe sowie von der Qualität und dem Tumorgehalt der untersuchten Proben. Für eine Sequenziertiefe von 120 Reads pro Base wurde eine theoretische Testsensitivität von >99 % für das Erkennen von Varianten mit NAF ≥ 10 % erzielt. Bei den Gewebeproben konnte durch Hochdurchsatz-Sequenzierung im Median eine Sequenziertiefe von mindestens 120x (Range 120x - 280x) für 97,08 % (Range 46,36 % - 99,73 %) der Exons erzielt werden. Detektierte Varianten wurden gemäß der standardisierten Nomenklatur nach Richtlinien der HGVS (Human Genom Variation Society) notiert (Version 15.11).

2.2.1.3 Kopienzahlvarianten (CNVs) und strukturelle Varianten

Bei den Gewebeproben wurden mithilfe einer von CeGaT GmbH intern entwickelten Methode auf Basis der Sequenziertiefe zusätzlich Kopienzahlveränderungen wie Deletionen und Amplifikationen berechnet. Die jeweiligen Sequenzen mussten eindeutig einer genomischen Position zugeschrieben werden können. Die Generierung eines Modells der erwarteten Abdeckung erfolgte mittels Referenzproben. Das Modell bildete mögliche Abweichungen im Laborprozess und Unterschiede zwischen Proben ab. Im Rahmen des CNV-Callings wurde die normalisierte Abdeckung jeder Probe sowie ihr Abweichen von der erwarteten Abdeckung kalkuliert. Als Varianten galten genomische Bereiche, deren Abdeckung sich signifikant vom erwarteten Wert unterschieden.

Bei den angegebenen Kopienzahlen und Bruchpunkten handelte es sich um abgeleitete Näherungswerte aus den Next Generation Sequencing (NGS)-Daten. Die Einstufung als therapeutisch relevant erfolgte basierend auf den Kriterien:

1) Vorliegen als fokale Amplifikation/Cluster Amplifikation von mindestens 4 Kopien oder als homozygote Deletion eines Gens, dessen Aktivität die

Zielstruktur verfügbarer spezifischer (immun-)therapeutischer Verfahren darstellte.

2) Der Pathomechanismus ebendieses Gens musste gegeben sein (Amplifikation bei Onkogenen und Deletion bei Tumorsuppressorgenen).

Die genomischen Regionen, in denen bekanntermaßen häufig Translokationen, Gen-Fusionen, Insertionen oder Deletionen auftreten bzw. deren Bruchpunkte liegen, wurden mithilfe der Agilent in Solution Technologie (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) angereichert. Nicht übereinstimmende Read-Paare und gesplittete Reads wurden bioinformatisch aus dem Alignment der möglichen Regionen festgestellt und als potentielle strukturelle Variante überprüft (Chen et al. 2016). Die entsprechenden Regionen wurden visuell untersucht und bei Vorhandensein von strukturellen Varianten manuell analysiert.

2.2.1.4 Mutationslast

Aus der Anzahl aller somatischen SNV-, Indel- und essentiellen Spleißveränderungen pro kodierende Megabase DNA ergab sich die Mutationslast. Den Veränderungen in der untersuchten Region entsprechend wurde eine Hochrechnung der Mutationslast auf Ebene der kodierenden Bereiche vollzogen.

Nicht eingeschlossen waren somatische Varianten mit einer inhouse-Frequenz $\geq 1\%$ sowie Tumorsuppressorgen-Mutationen, die zur Verkürzung des Genproduktes führten. Die berechnete Mutationslast pro kodierende Megabase DNA wurde den Klassen „gering“ (bis 3,3 Mut/Mb), „intermediär“ (3,3-23,1 Mut/Mb), und „hoch“ ($\geq 23,1$ Mut/Mb) zugeordnet (Chalmers et al. 2017, Johnson et al. 2016). Das umschriebene Verfahren stellt einen von CeGaT GmbH inhouse entwickelten und validierten Test dar (Laboratory Developed Test (LDT)), bei dem ein Tumorgehalt von mindestens 20 % vorausgesetzt wurde. Im Median betrug der Tumorgehalt der Gewebeproben 75 % (Range 10 % -95 %).

2.3 Probenmaterial Liquor

Die Liquor-Entnahme erfolgte am Universitätsklinikum Tübingen oder im Katharinenhospital Stuttgart. Der Liquor wurde dort durch stationäre

Lumbalpunktion, perioperativ oder über einen ventrikulo-peritonealen Shunt entnommen.

2.3.1 Verarbeitung und Analyse der Liquorproben

Die am Universitätsklinikum Tübingen entnommenen Liquorproben wurden innerhalb von 2 h nach Abnahme bei 4°C zentrifugiert (4000rpm, 10 min). Der Überstand wurde auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße in gleicher Menge verteilt. Nach erneuter Zentrifugation in der Microfuge bei 4°C (15000rpm, 10 min) erfolgte die Übertragung der Überstände in pseudonymisierte Kryoröhrchen und die Lagerung bei -80°C.

Herstellerangaben:

Eppendorf-Gefäße: Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg,
Deutschland; Order No.: 0030 120.86

Kryoröhrchen: CRYO.S; Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster,
Österreich; Cat.No. 122263

Zentrifuge: Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Microfuge: Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2.3.1.1 Klinische Liquoruntersuchung

Die am Universitätsklinikum Tübingen entnommenen Liquorproben wurden im Zentrallabor auf Zellzahl, Protein- und Laktatkonzentration untersucht. Als Liquor-Pleozytose wurde das Vorhandensein von >4 Zellen/ μ l gewertet. Eine Liquor-Proteinerhöhung bestand bei einem Gehalt von >45 mg/dl, eine Liquor-Laktaterhöhung bei >2,2 mmol/l.

Die Ergebnisse gegebenenfalls durchgeführter zytologischer Liquoruntersuchungen durch die Neuropathologie des UKT wurden ebenfalls miteinbezogen.

2.3.1.2 cfDNA-Isolation und -Sequenzierung aus Liquorproben

Die folgenden Verarbeitungsschritte der Proben sowie die molekulargenetischen Analysen wurden von CeGat GmbH durchgeführt: Vor Beginn der DNA-Isolation

wurden die Proben zentrifugiert (16000xg 10 min, 4°C). Der Überstand wurde jeweils in ein neues Kryoröhrchen übertragen. Isoliert wurde die cfDNA mithilfe des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des gesamten Liquorvolumens. Zur Bestimmung der cfDNA-Konzentration wurde das Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) verwendet. Die Fragmentlängenbestimmung erfolgte mit dem Bioanalyzer, High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA).

Die cfDNA aus dem Liquor wurde molekulargenetisch mit einem Gen-Panel untersucht (TUM.4-Panel mit 710 Genen oder ONC.1-Panel mit 81 Genen). Eine genaue Auflistung der jeweiligen Gene der Panels findet sich im Anhang 1.

2.3.1.3 Genetische Datenauswertung von Punktmutationen (SNVs) und Small Indels in Liquor-cfDNA-Proben

Die Identifikation der Varianten in Liquor-cfDNA erfolgte im Vergleich zu Normalgewebe. Die Bewertung der Varianten als echt oder Artefakt wurde manuell durch wissenschaftliche Mitarbeiter aus der Diagnostik von CeGaT GmbH vorgenommen.

Bei diesem Abgleich wurden alle als echt bewerteten SNVs und Small Indels mit NAF >5 % in der Gewebeprobe (inklusive Keimbahnmutationen) berücksichtigt. Strukturelle Varianten und Kopienzahlvarianten konnten aufgrund der Probenqualität der Liquorproben nicht miteingeschlossen werden.

Wenn zwei sequenzierte Gewebeproben eines Patienten vorlagen, wurden dabei separate Abgleiche durchgeführt (1. Probe mit Liquor-cfDNA; 2. Probe mit Liquor-cfDNA).

2.4 Methodik der Ergebnis-Auswertung von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung

In die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse von Gewebe- und Liquor-cfDNA wurden alle Patienten mit ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung eingeschlossen, von denen Ergebnisse aus Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung vorlagen. Berücksichtigt wurden alle Mutationen, die in den

jeweiligen Befundberichten tabellarisch als potentiell therapierelevante Veränderungen aufgeführt und/oder im Anhang des Befundberichts bzw. in Rücksprache mit Mitarbeitern von CeGaT GmbH genannt wurden. Für alle als mutiert aufgeführten Gene in Gewebe- und Liquorproben wurde eine tabellarische Übersicht erstellt. Gegebenenfalls wurden fehlende Chromosomenangaben zu den befundeten Genen mithilfe von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [Zugriff 07.11.2019] ergänzt. Kodiert wurde die Art der strukturellen Variante/ Kopienzahlvariante (Amplifikation/Deletion) bzw. die Art der Punktmutation (missense; stop_gained; frameshift; inframe; essential_splice_site; splice-region; kozak_sequence; 3_prime_UTR; stop_retained) und das Vorliegen als somatische und/oder Keimbahnvariante. Bei den Punktmutationen wurde der konkrete Basen- und Aminosäureaustausch sowie die NAF festgehalten, bei Kopienzahlvarianten die Unterscheidung in fokal/nicht fokal sowie gegebenenfalls die Kopienanzahl bzw. die Zygotie. Nicht berücksichtigt wurden synonymous-Punktmutationen.

2.5 Methodik der Auswertung der klinischen Patientendaten

Alle in diese Fallserie aufgenommenen Patienten wurden in einer elektronischen Tabelle festgehalten und geordnet. Die Daten wurden mithilfe der personenbezogenen digitalen Krankenakten bezüglich der in Anhang 2 aufgeführten Merkmale ergänzt und kodiert. Dazu wurden den Patienten die pseudonymisierten Projekt-IDs „cf001-cf031“ zugeordnet.

Falls in der personenbezogenen digitalen Krankenakte eine Zeitangabe lediglich im Monatsformat (MM/JJJJ) vorlag, wurde als Datum der erste Tag des Monats festgelegt (beispielsweise 01/MM/JJJJ). War als Zeitangabe lediglich eine Jahreszahl genannt, wurde als Datum der erste Tag des Monats Juli festgelegt (beispielsweise 01/07/JJJJ).

Primäre Hirntumore mit WHO Grad I-II wurden als „niedriggradig“ kodiert, solche mit WHO Grad III-IV als „höhergradig“.

Als eine Störung der Blut-Hirn-Schranke galt eine Kontrastmittelaufnahme des ZNS-Tumors bzw. der ZNS-Beteiligung einer Tumorgrunderkrankung in der MRT-/CT-Bildgebung. Bei der Angrenzung an die inneren Liquorräume war eine

Angrenzung an die Hirnventrikel, den Aquaeductus mesencephali und/oder den Zentralkanal im Rückenmark gemeint.

Ein Rezidiv bzw. Progress der ZNS-Beteiligung wurde als solcher kodiert, wenn er in der MRT-/CT-Bildgebung befundet und im klinischen Kontext (z. B. durch das Tumorboard des Universitätsklinikums Tübingen) als solcher beurteilt wurde.

Eine Meningeosis neoplastica bestand dann, wenn in der Liquorzytologie atypische Zellen vorlagen und/oder sich CT-/MRT-morphologisch ein typisches Kontrastmittelenhancement entlang der Meningen zeigte. Es bestand keine Meningeosis neoplastica, wenn sich für diese in der Bildgebung kein Anhalt zeigte und keine Ergebnisse einer Liquorzytologie-Untersuchung vorlagen.

Falls bei perioperativer Liquorentnahme der genaue Entnahmezeitpunkt (vor oder nach der Operation) in der personenbezogenen digitalen Krankenakte nicht ersichtlich war, wurde er als vor Operations-Beginn kodiert.

Patienten wurden als „therapienaiv“ bezeichnet, wenn sie vor der Entnahme der Liquorprobe keine speziell für die ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung durchgeführte Therapie erhalten hatten (ZNS-Operation/ ZNS-Bestrahlung/ ZNS-gängige und -wirksame Systemtherapie). Eine Gewebebiopsie-Entnahme ohne therapeutische Tumorresektion wurde hierbei nicht als therapeutischer Eingriff gewertet. Als „Komplettresektion“ wurde eine ZNS-Operation bezeichnet, bei der in der postoperativen Bildgebung keine Tumorreste vorlagen.

Bei Patienten, die keine Therapie speziell für ihre ZNS-Beteiligung erhalten hatten, aber für ihre Tumorerkrankung in einem Zeitraum von 6 Wochen vor Liquor-Entnahme mit einer ZNS-gängigen und -wirksamen Systemtherapie in Behandlung waren, wurde dies gesondert kodiert. Als ZNS-gängige und (potentiell) -wirksame Systemtherapien galten beispielsweise Erlotinib (Togashi et al. 2010, Togashi et al. 2012) und Nivolumab (van Bussel et al. 2019).

Hinsichtlich stattgehabter Bluttransfusionen und allogener Organ-Transplantationen vor Liquor-Entnahme wurden Patienten dann als naiv codiert, wenn in den Patientenakten entweder keine Hinweise auf solche vorlagen oder solche laut Eigenauskunft (z. B. in Anästhesie-Aufklärungsbögen) verneint wurden.

Zur Berechnung des Gesamtüberlebens (OS) und des Progressionsfreien Überlebens (PFS) wurde als Stichtag der 29.10.2019 festgelegt. Für Patienten ohne Progression bzw. am 29.10.2019 lebende Patienten wurde die Differenz des Datums der Erstdiagnose ihrer ZNS-Beteiligung und dem 29.10.2019 als Wert für die Berechnung des medianen OS/PFS verwendet. Falls in den personenbezogenen digitalen Krankenakten keine genauen Verlaufsinformationen zum Vorliegen oder Fehlen eines Rezidivs/Progresses von Patienten vorlagen, wurden diese Patienten für die Berechnung des medianen Progressionsfreien Überlebens nicht miteinbezogen.

2.6 Programme und Literaturrecherche

Zur Datenverarbeitung und Erstellung dieser Dissertationsschrift wurden Microsoft Word und Excel 2010, 2011, 2016, 2019 und 2020 (Microsoft, Redmond, USA) sowie EndNote X9 (Clarivate Analytics, Philadelphia, USA) verwendet. Aktuell bestehende englisch- und deutschsprachige Literatur zur Einordnung und Diskussion der Ergebnisse wurde über Pubmed recherchiert.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Studie war die Identifikation und Überprüfung klinischer Aspekte, die bei neuroonkologischen Tumoren potentiell Einfluss auf die cfDNA-Menge im Liquor und die Nachweisbarkeit von Tumormutationen darin ausüben.

Hierzu wurden 31 Personen gescreent, 30 Personen stimmten der Teilnahme an diesem Forschungsprojekt nach Aufklärung mit Unterschrift zu und bildeten das Gesamtkollektiv, dessen Charakteristika in Kapitel 3.1 detailliert beschrieben werden.

Kapitel 3.2 thematisiert die Analyse der cfDNA-Mengen der Liquorproben im Zusammenhang mit relevanten klinischen Eigenschaften.

Danach erfolgt die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse: Kapitel 3.3 beleuchtet die Ergebnisse der Gewebeproben-Sequenzierung, Kapitel 3.4 die der Liquor-cfDNA-Sequenzierung. Zuletzt erfolgt in Kapitel 3.5 der Vergleich der Sequenzierungsergebnisse und die Analyse klinischer Charakteristika hinsichtlich der Nachweisbarkeit von Tumormutationen in Liquor-cfDNA.

Zur detaillierten Nachvollziehbarkeit sind z. T. einzelne Patienten-IDs aufgeführt, die um der besseren Lesbarkeit willen grau hinterlegt sind.

3.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Die unter den Punkten 3.1.1 und 3.1.2 folgende detaillierte Beschreibung der klinischen Charakteristika bezieht sich auf das gesamte Kollektiv (N = 30 Patienten). Tabellen 1 und 2 am Ende des Kapitels 3.1 geben einen Überblick über die allgemeinen klinischen sowie speziell für die Liquor-Analysen relevanten Charakteristika des Kollektivs. Alle Angaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der Liquorentnahme des jeweiligen Patienten. In diesen Tabellen ist sowohl das Gesamtkollektiv aufgeführt als auch das Patientenkollektiv, welches in der späteren Auswertung von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung berücksichtigt wurde (N = 17, in Tabellen 1 und 2 in der Spalte „Patienten mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich“).

3.1.1 Allgemeine klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

Die folgenden Punkte beziehen sich auf Tabelle 1, die am Ende des Kapitels 3.1 aufgeführt ist.

Geschlecht und Alter

Das Gesamtkollektiv bestand aus 30 Personen mit einem medianen Alter von 56 Jahren (Range 30-77 Jahre). 16 Patienten waren männlich, 14 Patienten weiblich.

Diagnose

Insgesamt lag bei 13 Patienten ein histologisch gesicherter hirneigener Tumor vor (9 Glioblastome (GBM) WHO Grad IV, 1 Medulloblastom WHO Grad IV, 1 anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III, 1 Astrozytom WHO Grad II, 1 Meningeom WHO Grad I). Bei 15 Patienten bestand eine ZNS-Beteiligung einer anderen Tumorerkrankung: 14 Patienten mit ZNS-Beteiligung eines soliden Primärtumors (7 histologisch gesichert (cf002, cf004, cf005, cf006, cf015, cf016, cf018)), 1 Patient mit primärem ZNS-Lymphom (cf010, histologisch nicht gesichert). Zwei Patienten mit Tumorgrunderkrankung wiesen keine ZNS-Beteiligung auf (1 ossäre Schädelmetastase bei Mamma-Karzinom (cf021), 1 Autoimmun-Hypophysitis unter Melanomtherapie mit Nivolumab und Ipilimumab (cf024)). Eine genaue Aufschlüsselung der Diagnosen des Patientenkollektivs ist in Abbildung 4 dargestellt.

Meningeosis neoplastica

Eine Meningeosis neoplastica wurde bei 4 Patienten mittels MRT-Bildgebung und/oder Liquorzytologie diagnostiziert (cf010, cf019, cf029, cf031), bei 26 Patienten nicht.

Tumorlokalisation

Bei 9 Patienten befand sich der hirneigene Tumor/die ZNS-Tumormanifestation einer anderen Tumorgrunderkrankung multifokal, multilobulär oder bihemisphärisch (cf002, cf005, cf007, cf009, cf010, cf014, cf016, cf022, cf026).

Weitere häufige Tumorlokalisationen waren frontal (6 Patienten: cf003, cf006, cf013, cf018, cf020, cf023) und parietal (4 Patienten: cf001, cf012, cf015, cf017). Bei je 2 Patienten war der Tumor temporal (cf011, cf028), cerebellär (cf025, cf027) oder im Hirnstamm lokalisiert (cf029, cf030), bei je einem Patient occipital (cf019) bzw. spinal/epidural (cf004). Ein Patient wies eine Meningeosis neoplastica ohne solide ZNS-Metastase auf (cf031). Bei zwei Patienten lag keine ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung vor (cf021, cf024).

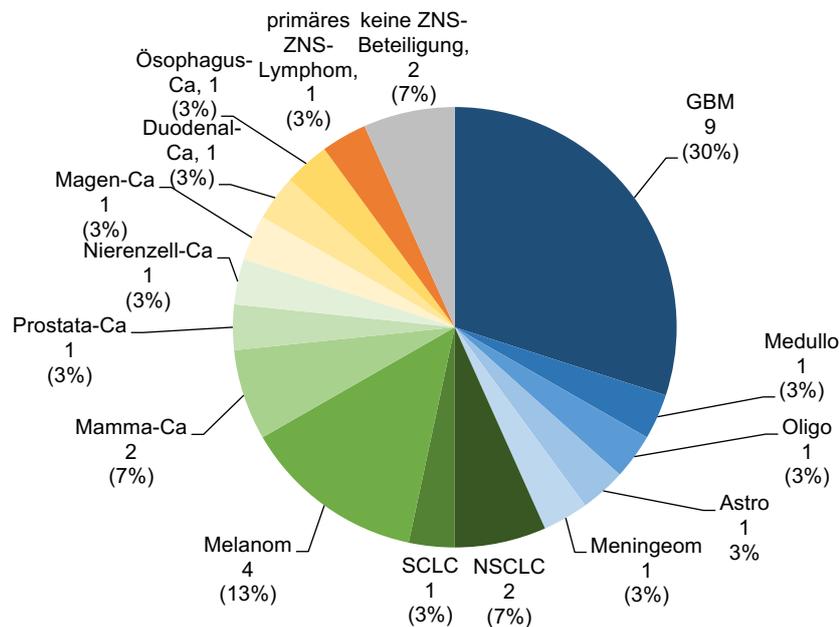


Abbildung 4: Übersicht der Tumorerkrankungen des Patientenkollektivs, Anzahl (%), N = 30

Abkürzungen: Astro = Astrozytom, Ca = Karzinom, GBM = Glioblastom, Medullo = Medulloblastom, NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Oligo = Oligodendrogliom, SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, ZNS = zentrales Nervensystem.

Status der ZNS-Affektion

Von 28 Patienten mit ZNS-Beteiligung lag diese bei 15 Patienten als Erstdiagnose (ED) vor: 5 Patienten mit hirneigenem Tumor (cf003, cf020, cf022, cf027, cf028), 9 Patienten mit ZNS-Beteiligung eines anderen Primärtumors (cf001, cf002, cf004, cf005, cf007, cf009, cf016, cf018, cf025), 1 primäres ZNS-Lymphom (cf010). Bei 13 Patienten war die ZNS-Beteiligung vorbekannt bzw. lag als Rezidiv/Progress vor (8 Patienten mit hirneigenem Tumor (cf011, cf012,

cf013, cf017, cf023, cf026, cf029, cf030), 5 Patienten mit ZNS-Beteiligung eines anderen Primärtumors (cf006, cf014, cf015, cf019, cf031)).

Vortherapie

Eine detaillierte Übersicht der Vortherapie aller Patienten findet sich in Tabelle 3 am Ende des Kapitels 3.1.

Insgesamt waren 12 Patienten mit ZNS-Beteiligung bezüglich dieser therapienaiv: 4 hirneigene Tumore (3 Glioblastome WHO Grad IV (cf003, cf020, cf022), 1 Medulloblastom WHO Grad IV (cf027)), 7 ZNS-Metastasen bei extrazerebraler Tumorerkrankung (4 vorbehandelt wegen Tumorerkrankung (cf004, cf005, cf009, cf025), 3 komplett therapienaiv, da die Erstdiagnose der Tumorerkrankung und die Erstdiagnose der ZNS-Beteiligung in zeitlich engem Abstand erfolgten (cf001, cf002, cf007)) sowie ein primäres ZNS-Lymphom (cf010). Die ZNS-Beteiligung lag bei diesen 12 Patienten als Erstdiagnose vor und vor Liquorentnahme erfolgte speziell wegen der ZNS-Beteiligung weder ZNS-Bestrahlung noch Chemo-/Systemtherapie oder eine operative Therapie des ZNS.

8 Patienten wurden mit einer Kombination aus Operation, Radiotherapie und Chemo-/Systemtherapie vorbehandelt (cf011, cf012, cf017, cf023, cf026, cf029, cf030, cf031). Ein Patient erhielt sowohl Radio- als auch Chemo-/Systemtherapie ohne Operation (cf014).

Bei 3 Patienten wurde eine rein operative Therapie durchgeführt (cf006, cf018, cf028), bei 2 Patienten eine reine Radiotherapie (cf019, cf016) und bei 2 Patienten wurden Operation und Radiotherapie kombiniert (cf013, cf015).

Bei den 2 Patienten ohne ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung wurde während des Zeitraums der Verdachtsabklärung keine Therapie diesbezüglich vorgenommen (cf021, cf024).

Im Folgenden sind die Vortherapien der Patienten nach operativer Therapie, Radiotherapie und Chemo-/Systemtherapie aufgeteilt detaillierter beschrieben.

Vortherapie: Operative Therapie der ZNS-Beteiligung

8 Patienten erhielten mindestens eine Operation, die als Kompletresektion bezeichnet wurde (cf006, cf012, cf015, cf017, cf018, cf023, cf026, cf029) und 3 Patienten mindestens eine Teilresektion (cf011, cf013, cf028). Bei 16 Patienten wurde kein operativer Eingriff im ZNS vorgenommen.

Ein Patient wurde an seiner ZNS-Beteiligung biopsiert ohne weitere Resektion (cf027) und bei 2 Patienten wurden andere operative ZNS-Eingriffe durchgeführt (1 Anlage einer externen Ventrikeldrainage und eines ventrikulo-peritonealen Shunts (cf031), 1 Biopsie mit Implantation von ¹²⁵Jod-Seeds zur Brachytherapie (cf030)).

Vortherapie: Bestrahlung der ZNS-Beteiligung

Insgesamt 13 Patienten wurden vor Liquorentnahme im ZNS bestrahlt, bei 3 Patienten davon fand die ZNS-Bestrahlung bis weniger als 6 Wochen vor Liquorentnahme statt (cf016, cf029, cf031).

Im Folgenden werden die 13 Patienten mit ZNS-Bestrahlung vor Liquorentnahme genauer beschrieben: 8 Patienten mit primärem ZNS-Tumor wurden an ihrem Tumor bestrahlt (kumulative Gesamtdosis aller ZNS-Radiotherapien bei drei Patienten 60 Gy (cf011, cf012, cf026), je einmal 64,4 Gy (cf013), 119,4 Gy (cf017), 79,4 Gy (cf023), 54 Gy (cf029), 65 Gy (cf030)). Insgesamt 5 Patienten mit ZNS-Metastasen bei extrazerebraler Tumorerkrankung wurden im ZNS bestrahlt (cf014, cf015, cf016, cf019, cf031; kumulative Gesamtdosis aller ZNS-Radiotherapien je einmal 30 Gy, 39 Gy, 40 Gy, 43 Gy, 20 Gy), 3 davon erhielten zusätzlich zuvor auch Radiotherapie für ihren extrazerebralen Primärtumor und/oder dessen extrazerebrale Metastasen (cf015, cf016, cf019).

17 Patienten erhielten keine ZNS-Radiotherapie: Zwei Patienten wurden ausschließlich für ihren extrazerebralen Primärtumor und/oder dessen extrazerebrale Metastasen mit Radiotherapie behandelt (cf004, cf005). 3 Patienten wurden in ihrer Vorgeschichte wegen einer anderen extrazerebralen Tumorerkrankung, die nicht Grunderkrankung der jetzigen ZNS-Beteiligung war, extrazerebral bestrahlt (cf002, cf006, cf024). Bei 12 Patienten wurde weder im ZNS noch peripher eine Bestrahlung durchgeführt.

Vortherapie: Chemotherapie/Systemtherapie

15 Patienten wurden im Zeitraum von 6 Wochen vor Liquorentnahme mit Chemotherapie/Systemtherapie behandelt. Davon erhielten 9 Patienten die Therapie speziell aufgrund ihrer ZNS-Beteiligung (1x Methotrexat intrathekal (cf031), 4x Temozolomid (cf012, cf026, cf029, cf030), 1x Temozolomid + Lomustin (cf023), 1x Nivolumab (cf011), 1x IDH1-Inhibitor BAY1436032 (im Rahmen einer Studie, cf017), 1x Polychemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel (cf014)). Von 6 Patienten mit Chemo-/Systemtherapie für ihre Tumorerkrankung bestand bei 3 eine ZNS-Wirksamkeit der Wirkstoffe (cf005 mit Erlotinib, cf009 und cf024 mit Ipilimumab und Nivolumab).

15 Patienten erhielten keine Chemo-/Systemtherapie im Zeitraum von 6 Wochen vor Liquorentnahme.

Steroidbehandlung

12 von 30 Patienten haben innerhalb von 4 Wochen bis zum Zeitpunkt der Liquorentnahme eine Steroidtherapie mit Dexamethason/Methylprednisolon und/oder Hydrocortison erhalten (cf002, cf007, cf009, cf014, cf018, cf023, cf024, cf025, cf026, cf028, cf030, cf031). Bei 10 davon umfasste die Einnahme auch den Abnahmetag (cf002, cf007, cf009, cf014, cf018, cf023, cf024, cf026, cf028, cf031).

Überleben

23 Patienten sind im Zeitraum zwischen der Liquorentnahme und dem Zeitpunkt der Datenauswertung verstorben, 7 Patienten waren am Stichtag der Datenauswertung noch am Leben (cf004, cf013, cf018, cf021, cf024, cf025, cf027; darunter auch die zwei Patienten ohne ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung (cf021, cf024)). Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung betrug 18 Monate (Range 2-183 Monate), das mediane progressionsfreie Überleben betrug 5 Monate (Range 0-47 Monate).

3.1.2 Liquor-spezifische Charakteristika des Patientenkollektivs

Tabelle 2 am Ende des Kapitels 3.1 gibt einen Überblick über speziell für die Liquor-Analysen relevante Charakteristika des Kollektivs.

Schrankenstörung und Angrenzung an die inneren Liquorräume

Insgesamt konnte bei 28 Patienten mittels Kontrastmittelaufnahme in kranialer oder spinaler Bildgebung (MRT/CT) eine Schrankenstörung festgestellt werden. Zwei Patienten zeigten keine Kontrastmittelaufnahme (cf027, cf021). Bei 18 Patienten grenzten die schrankengestörten Anteile des Tumors/der Metastasen an die inneren Liquorräume an. Zusätzlich konnte bei einem Patienten mit nicht-schrankengestörtem Medulloblastom WHO Grad IV (cf027) in der cMRT-Bildgebung trotz fehlender Kontrastmittelaufnahme eine direkte Angrenzung an die inneren Liquorräume festgestellt werden.

Bei 11 Patienten bestand keine direkte Angrenzung der Tumormanifestation an die inneren Liquorräume (cf001, cf003, cf005, cf006, cf012, cf014, cf015, cf018, cf020, sowie cf021 und cf024 ohne ZNS-Beteiligung ihrer Tumorgrund-erkrankung).

Die aufgeführten Angaben sind für jeden Patienten in Tabelle 4 am Ende des Kapitels 3.1 dargestellt.

Liquor-Untersuchung und Liquor-Zytologie

22 Patienten zeigten Auffälligkeiten in der Liquoruntersuchung: 12 davon eine Pleozytose (>12/3 Zellen bzw. >4 Zellen/ μ l Liquor), 20 eine Proteinerhöhung (>45 mg/dl) und 7 eine Laktaterhöhung (>2,2 mmol/l).

Der Liquor von 7 Patienten war diesbezüglich unauffällig (cf003, cf005, cf015, cf016, cf018, cf020, cf021). Bei einem Patienten lagen keine Untersuchungsergebnisse vor (cf028).

Bei 27 Patienten wurde zusätzlich mindestens eine zytologische Liquoruntersuchung durch die Neuropathologie im Zeitraum vor bzw. inklusive der hier untersuchten Liquorentnahme durchgeführt (22x eine Untersuchung, 2x 2 Untersuchungen, 3x 3 Untersuchungen). Dabei fielen atypische Zellen bei 3 Patienten auf (cf019, cf029, cf031).

Eine Übersicht zu den Ergebnissen von Liquor-Untersuchung und Zytologie gibt Tabelle 4 am Ende des Kapitels 3.1.

Bluttransfusionen und Transplantation vor Liquorentnahme

5 Patienten haben vor dem Zeitpunkt der Liquorentnahme mindestens einmal ein Blutprodukt intravenös erhalten: Ein Patient (cf007) erhielt 13 Monate zuvor leukozytenarmes Erythrozytenkonzentrat, ein anderer Patient (cf031) erhielt 3,5 Monate zuvor ein Erythrozytenkonzentrat, drei Patienten (cf007, cf015, cf019) erhielten ein Blutprodukt zu einem unbekanntem Zeitpunkt vor Liquorentnahme. Bei einem Patienten (cf004) bestand keine Angabe dazu, ob vor dem Zeitpunkt der Liquorentnahme bereits einmal ein Blutprodukt intravenös zugeführt wurde. 24 Patienten haben laut Eigenauskunft vor dem Zeitpunkt der Liquorentnahme nie ein Blutprodukt intravenös erhalten.

Kein Patient hat vor dem Zeitpunkt der Liquorentnahme eine Transplantation von Knochenmark oder Organen erhalten.

Tabelle 1: Übersicht zu allgemeinen klinischen Charakteristika des Kollektivs

Erläuterungen: *Berechnung aus allen N = 28 Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung. **Berechnung aus N = 15 Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung und vorhandenen Verlaufsinformationen bezüglich des Vorliegens eines Progresses/Rezidivs. ***Berechnung aus N = 24 Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung und vorhandenen Verlaufsinformationen bezüglich des Vorliegens eines Progresses/Rezidivs.

Abkürzungen: BEV = Bevacizumab, Ca = Karzinom, CCNU = Lomustin, CTx = Chemo-/Systemtherapie, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom WHO Grad IV, MTX = Methotrexat, NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, OP = Operation, OS = Gesamt-Überleben, Pat = Patienten, PCV = Procarbazine, Lomustin, Vincristin, PFS = Progressionsfreies Überleben, RTx = Radiotherapie, SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, TMZ = Temozolomid, WHO = World Health Organization, Wo = Woche, ZNS = Zentrales Nervensystem.

	Pat. mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich	Gesamtkollektiv
Patientenanzahl	17	30
Klinische Daten		
Geschlecht – Anzahl (%)		
männlich	12 (70,6 %)	16 (53,3 %)
weiblich	5 (29,4 %)	14 (46,7 %)
Medianes Alter (Range)	50 (30-77)	56 (30-77)
Diagnose – Anzahl (%)		
Hirneigener Tumor	11 (64,7 %)	13 (43,3 %)
GBM WHO Grad IV	7 (41,2 %)	9 (30 %)

	Pat. mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich	Gesamtkollektiv
Medulloblastom WHO Grad IV	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Diffuses Astrozytom WHO Grad II	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Meningeom WHO Grad I	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Solide Tumore mit ZNS-Beteiligung	6 (35,3 %)	14 (46,7 %)
Melanom	1 (5,9 %)	4 (13,3 %)
Mamma-Ca	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
NSCLC	0 (0 %)	2 (6,7 %)
SCLC	0 (0 %)	1 (3,3 %)
Duodenal-Ca	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Magen-Ca	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Nierenzell-Ca	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Ösophagus-Ca	0 (0 %)	1 (3,3 %)
Prostata-Ca	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Solide Tumore ohne ZNS-Beteiligung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Maligne ZNS-Lymphome	0 (0 %)	1 (3,3 %)
Meningeosis – Anzahl (%)		
Ja	1 (5,9 %)	4 (13,3 %)
Nein	16 (94,1 %)	26 (86,7 %)
Status der ZNS-Beteiligung zum Zeitpunkt der Liquorentnahme – Anzahl (%)		
ED	9 (52,9 %)	15 (50 %)
Rezidiv /Progress	8 (47,1 %)	13 (43,3 %)
keine ZNS-Beteiligung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Tumorlokalisation – Anzahl (%)		
frontal	6 (35,3 %)	6 (20 %)
temporal	2 (11,8 %)	2 (6,7 %)
parietal	1 (5,9 %)	4 (13,3 %)
occipital	0 (0 %)	1 (3,3 %)
cerebellär	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
Hirnstamm	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
spinal/epidural	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
multifokal/multilobulär/bihemisphärisch	4 (23,5 %)	9 (30 %)
Meningeosis neoplastica ohne solide ZNS-Metastase	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
keine ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Eingriffe und Vortherapien der ZNS-Beteiligung vor Liquorentnahme – Anzahl (%)		
kein therapeutischer Eingriff (über Biopsie-Entnahme hinaus)/keine Vortherapie	6 (35,3 %)	12 (40 %)
OP + RTx + CTx	6 (35,3 %)	8 (26,7 %)
nur therapeutische OP (reine Biopsie-Entnahme nicht eingeschlossen)	3 (17,6 %)	3 (10 %)
OP + RTx	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
nur RTx	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
RTx + CTx	0 (0 %)	1 (3,3 %)
keine ZNS-Beteiligung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Operative Eingriffe im ZNS – Anzahl (%)		
kein Eingriff	6 (35,3 %)	16 (53,3 %)
nur Biopsie	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
mindestens eine Teilresektion	3 (17,6 %)	3 (10 %)

	Pat. mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich	Gesamtkollektiv
mindestens eine Komplettresektion	5 (29,4 %)	8 (26,7 %)
andere operative ZNS-Eingriffe (Shunt, Seed-Implantation etc.)	2 (11,8 %)	2 (6,7 %)
<u>Radiotherapie der ZNS-Beteiligung – Anzahl (%)</u>		
keine ZNS-RTx	9 (52,9 %)	17 (56,7 %)
RTx für Extra-ZNS-Primärtumor und/oder dessen Extra-ZNS- Metastasen		2 (6,7 %)
periphere RTx für andere Tumorerkrankung		3 (10 %)
keine ZNS-RTx, keine Extra-ZNS-RTx		12 (40 %)
ZNS-RTx	8 (47,1 %)	13 (43,3 %)
RTx während Zeitraum 6 Wo vor Liquorentnahme	2 (11,8 %)	3 (10 %)
RTx vor Zeitraum 6 Wo vor Liquorentnahme	6 (35,3 %)	10 (33,3 %)
<u>Chemo-/Systemtherapie innerhalb von 6 Wochen vor Liquorentnahme – Anzahl (%)</u>		
keine	10 (58,8 %)	15 (50 %)
Chemo-/Systemtherapie nicht speziell für ZNS-Beteiligung	1 (5,9 %)	6 (20 %)
Chemo-/Systemtherapie wirksam auf ZNS-Beteiligung	0 (0 %)	3 (10 %)
Chemo-/Systemtherapie nicht wirksam auf ZNS-Beteiligung	1 (5,9 %)	3 (10 %)
Chemo-/Systemtherapie speziell für ZNS-Beteiligung	6 (35,3 %)	9 (30 %)
TMZ	2 (11,8 %)	4 (13,3 %)
TMZ + CCNU	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
PCV+ TMZ + CCNU + BEV + IDH1-Inhibitor	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Nivolumab	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Carboplatin + Paclitaxel	0 (0 %)	1 (3,3 %)
MTX intrathekal	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
<u>Steroidtherapie innerhalb von 4 Wochen vor Liquorentnahme – Anzahl (%)</u>		
Ja	7 (41,2 %)	12 (40 %)
Nein	10 (58,8 %)	18 (60 %)
<u>6-Monate-Gesamt-Überleben (OS) nach ED der ZNS-Beteiligung (Stichtag 29.10.19) – Anzahl (%)</u>		
keine ZNS-Beteiligung-Beteiligung der Tumorerkrankung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
<u>6-Monate-Progressionsfreies Überleben (PFS) nach ED der ZNS-Beteiligung (Stichtag 29.10.19) – Anzahl (%)</u>		
keine ZNS-Beteiligung-Beteiligung der Tumorerkrankung	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Median OS in Monaten (Range) (Stichtag 29.10.19)	25 (2-183)	18 (2-183)*
Median PFS in Monaten (Range) (Stichtag 29.10.19)	9 (0-47)**	5 (0-47)***

Tabelle 2: Übersicht zu Liquor-spezifischen Charakteristika des Kollektivs

Abkürzungen: CT = Computertomographie, KH = Katharinenhospital, MRT = Magnetresonanztomographie, Pat = Patienten, UKT = Universitätsklinikum Tübingen, ZNS = Zentrales Nervensystem.

	Pat. mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich	Gesamtkollektiv
Patientenanzahl	17	30
Schrankenstörung in Bildgebung (bei 29 Patienten MRT, 1 CT (cf021)) – Anzahl (%)		
Ja	16 (94,1 %)	28 (93,3 %)
Nein	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
Angrenzung schrankengestörter Anteile an innere Liquorräume – Anzahl (%)		
Ja	12 (70,6 %)	18 (60 %)
Nein	5 (29,4 %)	12 (40 %)
Angrenzung an innere Liquorräume – Anzahl (%)		
Ja	13 (76,5 %)	19 (63,3 %)
Nein	4 (23,5 %)	11 (36,7 %)
Liquorentnahme		
Modus der Liquorentnahme – Anzahl (%)		
lumbal, stationär	12 (70,6 %)	24 (80 %)
über ventrikulo-peritonealen Shunt, stationär	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
lumbal, intraoperativ	2 (11,8 %)	3 (10 %)
unklar, intraoperativ	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Ort der Liquorentnahme – Anzahl (%)		
UKT	16 (94,1 %)	29 (96,7 %)
KH Stuttgart	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Liquor-Zytologie (atypische Zellen) – Anzahl (%)		
negativ (1 Untersuchung)	12 (70,6 %)	19 (63,3 %)
negativ (2 Untersuchungen)	0 (0 %)	2 (6,7 %)
negativ (3 Untersuchungen)	1 (5,9 %)	3 (10 %)
positiv (1 Untersuchung)	1 (5,9 %)	3 (10 %)
nicht durchgeführt/k. A.	3 (17,6 %)	3 (10 %)
Weitere Liquor-Untersuchungen		
Liquor-Auffälligkeiten in Zellzahl, Protein- oder Laktatgehalt – Anzahl (%)		
Ja	12 (70,6 %)	22 (73,3 %)
Nein	4 (23,5 %)	7 (23,3 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
- Liquor-Pleozytose (>4 Zellen/ μ l) – Anzahl (%)		
Ja	5 (29,4 %)	12 (40 %)
Nein	11 (64,7 %)	17 (56,7 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
- Liquor-Proteinerhöhung (>45 mg/dl) – Anzahl (%)		
Ja	10 (58,8 %)	20 (66,7 %)
Nein	6 (35,3 %)	9 (30 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
- Liquor-Laktaterhöhung (>2,2 mmol/l) – Anzahl (%)		
Ja	1 (5,9 %)	7 (23,3 %)

	Pat. mit ZNS-Beteiligung und Liquor-Abgleich	Gesamtkollektiv
Nein	15 (88,2 %)	22 (73,3 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Bluttransfusionen vor Liquorentnahme – Anzahl (%)		
Ja	3 (17,6 %)	5 (16,7 %)
Nein	13 (76,5 %)	24 (80 %)
k. A.	1 (5,9 %)	1 (3,3 %)
Transplantationen vor Liquorentnahme – Anzahl (%)		
Ja	0 (0 %)	0 (0 %)
Nein	17 (100 %)	30 (100 %)

Tabelle 3: Übersicht Vortherapie der ZNS-Beteiligung vor Liquorentnahme, N = 30 Patienten

Erläuterungen: + = ja/vorliegend, – = nein/nicht vorliegend, *keine Therapie speziell für die ZNS-Beteiligung, aber zum Zeitpunkt der Liquorentnahme Behandlung mit ZNS-gängiger und -wirksamer Systemtherapie im Rahmen der Therapie der Tumorerkrankung (Erlotinib 100 mg/Tag (cf005) bzw. Ipilimumab 235 mg und Nivolumab 80 mg (cf009), Ipilimumab 240-245 mg und Nivolumab 80 mg (cf024)).

Abkürzungen: Astro = Astrozytom, AUC = Area under the curve, bds = beidseits, Bet = Beteiligung, BEV = Bevacizumab, Ca = Karzinom, CCNU = Lomustin, cfDNA = zellfreie DNA, CTx = Chemo-/Systemtherapie, d = Tag, ED = Erstdiagnose, EVD = externe Ventrikel drainage, GBM = Glioblastom, ID = Identifikationsnummer, IDH1-I = IDH1-Inhibitor, KOF = Körperoberfläche, li = links, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, Mon = Monat, MTX = Methotrexat, neg = negativ, NSCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, OP = Operation, pos = positiv, re = rechts, Rez = Rezidiv/Progress, RTx = Radiotherapie, SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, SNV = Single nucleotide variant/Punktmutation, TMZ = Temozolomid, U = Untersuchung, Tx = Therapie, VP = ventrikulo-peritoneal, WHO = World Health Organization, Wo = Wochen, ZNS = Zentrales Nervensystem, Zyto = Zytologie.

Patenten-ID	Primärtumor + ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastica	Status der ZNS-Bet bei (ED vs. Rez)	Schrankenstörung	Angranzung an innere Liquorräume	Operative Therapie/Diagnostik der ZNS-Beteiligung oder andere OP im ZNS-Bereich	RTx der ZNS-Beteiligung	CTx der ZNS-Beteiligung	Atypische Zellen in der Liquor-Zytoplogie (U-Anzahl)	cDNA-Menge im Liquor (ng)	Abgleich der Sequenzierungsergebnisse Gewebe vs. Liquor	SNV in Liquor-cfDNA
cf001	NSCLC+ Met	-	ED	+	-	keine	keine	keine	neg (1)	5,0	-	-
cf002	Melanom+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (3)	k. A.	-	-
cf003	GBM	-	ED	+	-	keine	keine	keine	neg (1)	8,4	+	-
cf004	Prostata-Ca+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (1)	10,6	+	-
cf005	NSCLC+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine*	neg (1)	8,4	-	-
cf006	Duodenal-Ca+ Met	-	Rez	+	-	3,5 Mon zuvor: Komplettresektion	keine	keine	neg (1)	7,7	+	+
cf007	Nierenzell-Ca+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (1)	9,5	+	-
cf009	Melanom+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine*	neg (1)	16,8	-	-
cf010	Primär. ZNS-Lymphom	+	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (1)	12,7	-	-
cf011	GBM	-	Rez	+	+	1 Jahr zuvor: Teilresektion am Abnahmetag (nach Liquorentnahme); Rezidiv-Komplettresektion	8 Mon zuvor: RTx Tumorregion, 60Gy in 30 Fraktionen	9,5 Mon zuvor bis einschließlich Liquorentnahmetag: Nivolumab i.v. (erst 4,5 Mon: 240mg 14-tägig, dann 5 Mon: 480mg 4-wöchig)	neg (1)	7,7	+	+
cf012	GBM	-	Rez	+	-	7 Mon zuvor: Komplettresektion am Liquorentnahmetag; Rezidiv-Teilresektion (vorzeitiger Abbruch)	5 Mon zuvor: RTx Tumorregion 60Gy	bis 5 Mon zuvor: TMZ bei RTx nach STUPP-Schema 75mg/m ² KOF bis 1 Mon zuvor: 2 Zyklen TMZ (erst 150 mg/m ² KOF, dann 200 mg/m ² KOF) während Zeitpunkt der Liquorentnahme: 3. Zyklus TMZ 200 mg/m ² KOF	neg (1)	9,8	-	-
cf013	Meningeom WHO I	-	Rez	+	+	2004: Teilresektion 2011: Teilresektion 2012: Teilresektion 2015: erweiterte Biopsie am Liquorentnahmetag; Teilresektion	2006: Einzeit-RTx Tumorregion 14Gy 2012: RTx Tumorregion 50,4Gy in 30 Fraktionen 2016: 3 Zyklen Radiopeptid-Tx mit 7,3GBQ DOTATATE	keine	k. A. (0)	9,1	+	-
cf014	Melanom+ Met	-	Rez	+	-	keine	bis 7 Wo zuvor: RTx Ganzhirn 30Gy	bis 4 Tage zuvor: 3 Zyklen CTx mit Carboplatin (AUC 6) und Paclitaxel (225 mg/m ² KOF) (bis 9 Wo zuvor: 3 Zyklen Ipilimumab (3mg/kgKG) und Nivolumab (1mg/kgKG) für Grunderkrankung vor ED der ZNS-Met)	neg (2)	19,4	-	-
cf015	Ösophagus-Ca+ Met	-	Rez	+	-	1 Jahr zuvor: Komplettresektion	9 Mon zuvor: RTx Ganzhirn 30Gy, bis 39Gy bei Tumorregionen	keine	neg (1)	k. A.	-	-
cf016	Mamma-Ca+ Met	-	ED	+	+	keine	1 Mon zuvor: RTx Tumorregionen 40Gy in 10 Fraktionen	keine	neg (3)	20,0	+	+
cf017	Oligo WHO III	-	Rez	+	+	2007: Komplettresektion 2011: Komplettresektion Rezidiv 2013: Teilresektion Rezidiv	2012: RTx Tumorregion 60Gy 2013: Re-RTx Tumorregion 59,4Gy	2007-2008: 4 Zyklen PCV (CCNU 110 mg/m ² KOF Tag 1, Procarbazin 60 mg/m ² (später 45 mg/m ²) KOF Tag 8-21, Vincristin 1,4mg/m ² KOF Tag 8 und 29; Wiederholungstag 4,3-5,7)	k. A. (0)	29,3	+	+

Patienten-ID	Primärtumor + ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastica	Status der ZNS-Bet bei (ED vs. Rez)	Schrankenstörung	Angrenzung an innere Liquorräume	Operative Therapie/Diagnostik der ZNS-Beteiligung oder andere OP im ZNS-Bereich	RTx der ZNS-Beteiligung	CTx der ZNS-Beteiligung	Atypische Zellen in der Liquor-Zytologie (U-Anzahl)	cfDNA-Menge im Liquor (ng)	Abgleich der Sequenzierungsergebnisse Gewebe vs. Liquor	SNV in Liquor-ctDNA
cf018	Melanom+ Met	-	ED	+	-	am Liquorentnahmetag : Komplettresektion	keine	keine	neg (1)	0,0	+	-
cf019	SCLC+ Met	+	Rez	+	+	keine	15 Mon zuvor: RTx Ganzhirn (prophylaktisch) 25Gy in 10 Fraktionen 10 Mon zuvor: Einzeit-RTx Tumorrregion 18Gy	keine	pos (1)	532,0	-	-
cf020	GBM	-	ED	+	-	keine	keine	keine	neg (1)	14,8	+	+
cf021	Mamma-Ca	-	keine	-	-	keine	keine	keine	neg (2)	18,2	+	-
cf022	GBM	-	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (1)	12,9	+	-
cf023	GBM	-	Rez	+	+	13 Mon zuvor: Biopsie und Komplettresektion	bis 10 Mon zuvor: RTx Tumorrregion 59,4Gy 4.5 Mon zuvor: Cyberknife 1x 20Gy	10 Mon zuvor: TMZ bei RTx nach STUPP-Schema 75mg/m ² bis 4.5 Mon zuvor: 6 Zyklen TMZ-CTx, ab 3. Zyklus 150mg/m ² , 6. Zyklus mit 175mg/m ² abgebrochen 2. Mon zuvor: 1. Zyklus TMZ+ CCNU (Tag 1: CCNU 100 mg/m ² , Tag 2-6: TMZ 100 mg/m ²) während Zeitpunkt der Liquorentnahme: 2. Zyklus TMZ+ CCNU	neg (1)	14,9	+	+
cf024	Melanom	-	keine	+	-	keine	keine	keine*	neg (3)	9,9	+	-
cf025	Mamma-Ca+ Met	-	ED	+	+	keine	keine	keine	neg (1)	261,8	-	-
cf026	GBM	-	Rez	+	+	14.5 Mon zuvor: Komplettresektion	1 Jahr zuvor: RTx Tumorrregion 60Gy	1 Jahr zuvor: TMZ bei RTx nach STUPP-Schema 75mg/m ² KOF 1 Jahr bis 1 Wo zuvor: 11 Zyklen TMZ-Erhaltungs-CTx 200mg/m ² KOF	neg (1)	20,4	+	-
cf027	Medullo WHO IV	-	ED	-	+	2 Wo zuvor: Biopsie ohne weitere operative Therapie	keine	keine	neg (1)	19,5	+	-
cf028	GBM	-	ED	+	+	1 Wo zuvor: Teilresektion	keine	keine	k. A.	204,5	+	+
cf029	GBM	+	Rez	+	+	3 Mon zuvor: Biopsie und Komplettresektion	bis 6 Wo zuvor: fraktionierte RTx Tumorrregion 54Gy, erweiterte Tumorrregion 45Gy	bis 6 Wo zuvor: TMZ bei RTx 75mg/m ² KOF	pos (1)	k. A.	-	-
cf030	Astro WHO II	-	Rez	+	+	2012: Biopsie und Implantation von 125Iod-Seeds zur Brachytherapie	2012: Brachytherapie 65Gy	während Liquorentnahmetag: 1. Zyklus TMZ 150 mg/m ² KOF	neg (1)	10,0	+	+
cf031	Magen-Ca	+	Rez	+	+	keine operative Resektion/Biopsie, 1 Mon zuvor: EVD-Anlage, VP-Shunt-Anlage	bis 2. Wo zuvor: fraktionierte RTx Ganzhirn 20Gy	1 Mon zuvor: 2x 10mg MTX intrathekal	pos (1)	207,5	+	+

Tabelle 4: Ergebnisübersicht von Liquor-Untersuchung und -Zytologie, N = 30 Patienten

Erläuterungen: + = ja/vorliegend, – = nein/nicht vorliegend. Liquor-Pleozytose entspricht >12/3 Zellen bzw. >4 Zellen/ μ l Liquor, Liquor-Proteinerhöhung entspricht >45 mg/dl, Liquor-Laktaterhöhung entspricht >2,2 mmol/l.

Abkürzungen: Bet = Beteiligung, Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom, ID = Identifikationsnummer, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, neg = negativ, NSCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, Oligo = Oligodendrogliom, pos = positiv, Rez = Rezidiv/Progress, SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, U = Untersuchung, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Patienten-ID	Primärtumor + ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastic	Status der ZNS-Bet. bei Liquor-entnahme	Schrankenstörung	Angrenzung an innere Liquorräume	Atypische Zellen in Liquor-Zytologie (U-Anzahl)	Liquor Pleozytose	Liquor Protein erhöht	Liquor Laktat erhöht
cf001	NSCLC+ Met	–	ED	+	–	neg (1)	–	+	–
cf002	Melanom+ Met	–	ED	+	+	neg (3)	–	+	+
cf003	GBM	–	ED	+	–	neg (1)	–	–	–
cf004	Prostata-Ca+ Met	–	ED	+	+	neg (1)	–	+	–
cf005	NSCLC+ Met	–	ED	+	–	neg (1)	–	–	–
cf006	Duodenal-Ca+ Met	–	Rez	+	–	neg (1)	–	+	–
cf007	Nierenzell-Ca+ Met	–	ED	+	+	neg (1)	+	+	–
cf009	Melanom+ Met	–	ED	+	+	neg (1)	+	+	–
cf010	Primäres ZNS-Lymphom	+	ED	+	+	neg (1)	+	+	+
cf011	GBM	–	Rez	+	+	neg (1)	+	–	–
cf012	GBM	–	Rez	+	–	neg (1)	+	+	–
cf013	Meningeom WHO I	–	Rez	+	+	k. A. (0)	–	+	–
cf014	Melanom+ Met	–	Rez	+	–	neg (2)	+	+	+
cf015	Ösophagus-Ca+ Met	–	Rez	+	–	neg (1)	–	–	–
cf016	Mamma-Ca+ Met	–	ED	+	+	neg (3)	–	–	–
cf017	Oligo WHO III	–	Rez	+	+	k. A. (0)	+	+	–
cf018	Melanom+ Met	–	ED	+	–	neg (1)	–	–	–
cf019	SCLC+ Met	+	Rez	+	+	pos (1)	–	+	+
cf020	GBM	–	ED	+	–	neg (1)	–	–	–
cf021	Mamma-Ca ohne ZNS-Bet.	–	–	–	–	neg (2)	–	–	–
cf022	GBM	–	ED	+	+	neg (1)	–	+	–
cf023	GBM	–	Rez	+	+	neg (1)	–	+	–
cf024	Melanom ohne ZNS-Bet.	–	–	+	–	neg (3)	+	+	+
cf025	Mamma-Ca+ Met	–	ED	+	+	neg (1)	+	+	–
cf026	GBM	–	Rez	+	+	neg (1)	–	+	–
cf027	Medullo WHO IV	–	ED	–	+	neg (1)	+	–	–
cf028	GBM	–	ED	+	+	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
cf029	GBM	+	Rez	+	+	pos (1)	+	+	+
cf030	Astrozytom WHO II	–	Rez	+	+	neg (1)	–	+	–
cf031	Magen-Ca	+	Rez	+	+	pos (1)	+	+	+

3.2 Quantifizierung von cfDNA in Liquorproben

Bei 25 Patienten mit ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung wurde eine Quantifizierung der cfDNA im Liquor durchgeführt. Die restlichen 5 Patienten konnten in die Analyse der Liquor-cfDNA-Menge nicht eingeschlossen werden, da bei ihnen entweder keine ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung bestand (cf021, cf024) oder keine Ergebnisse der Liquor-cfDNA-Quantifizierung vorlagen (cf002, cf015, cf029). Abbildung 5 stellt diese Zuordnung als CONSORT-Diagramm dar.

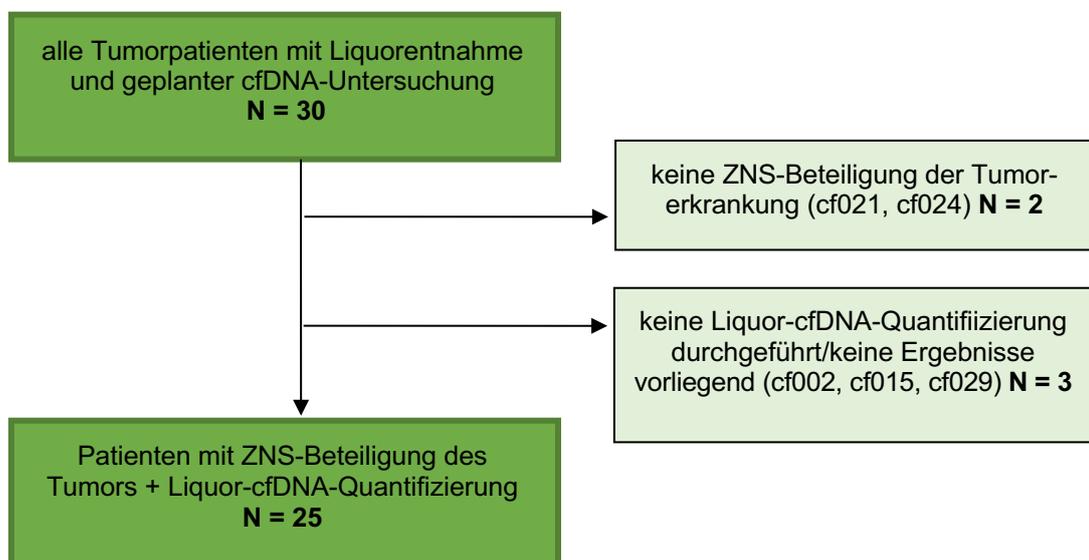


Abbildung 5: CONSORT-Diagramm mit Gesamtkollektiv (N = 30) und Patientenkollektiv mit Liquor-cfDNA-Quantifizierung (N = 25)

Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA, ZNS = zentrales Nervensystem.

Im Median betrug das Volumen der 25 Liquorproben 3,5 ml (Range 1,65 ml – 15,00 ml). In den Proben von 24 Patienten konnte cfDNA festgestellt werden (96 %), bei einem Patienten lag keine cfDNA vor (4 %). Die mediane cfDNA-Menge der Liquorproben betrug 12,9 ng (Range 0,0 ng-532,0 ng) mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 176 bp (Range 128 bp-261 bp).

In Tabelle 5 am Ende des Kapitels 3.2 sind die jeweiligen cfDNA-Mengen der 25 Liquorproben mit den in Kapitel 3.2.1 analysierten Eigenschaften aufgeführt.

3.2.1 Analyse der Liquor-cfDNA-Menge in Bezug auf klinische und probenbezogene Charakteristika

Die Menge an cfDNA wurde im Kontext der folgenden probenbezogenen und klinischen Eigenschaften genauer betrachtet. Abbildung 6 gibt einen Überblick über den medianen cfDNA-Gehalt hinsichtlich einiger im Folgenden untersuchten klinischen Charakteristika.

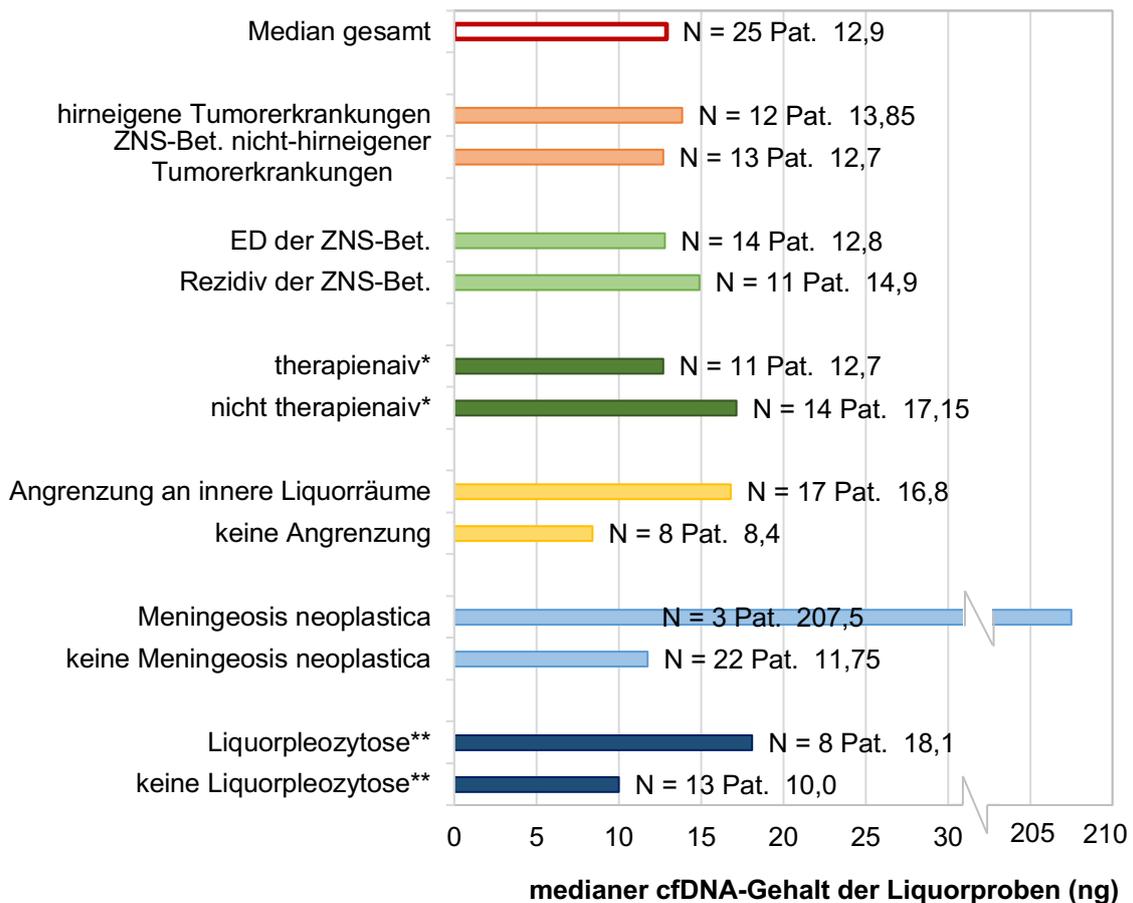


Abbildung 6: Übersicht des medianen cfDNA-Gehalts hinsichtlich klinischer Charakteristika (N = 25 Patienten)

Erläuterungen: *Vor Liquorentnahme keine Therapie speziell für die ZNS-Beteiligung durchgeführt. Bei zwei Patienten wurde allerdings zum Zeitpunkt der Liquorentnahme im Rahmen der Therapie der Tumorerkrankung eine Behandlung mit ZNS-gängiger und -wirksamer Systemtherapie durchgeführt. **Liquorpleozytose ohne Vorliegen einer Meningeosis neoplastica. Abkürzungen: ED = Erstdiagnose, Bet. = Beteiligung, cfDNA = zellfreie DNA, Pat = Patienten, Rez = Rezidiv, ZNS = zentrales Nervensystem.

Liquor-cfDNA-Menge und Volumen der Liquorproben

Die Liquorproben mit dem größten Volumen (cf009 und cf014 mit je 15 ml) enthielten nicht gleichzeitig die höchsten cfDNA-Mengen. Die kleinstvolumige Liquorprobe dieser Fallserie beinhaltete die dritthöchste cfDNA-Menge (cf031 mit 1,65 ml und 207,5 ng cfDNA). Bei allen Proben ≥ 10 ml lag auch ≥ 10 ng cfDNA vor (cf009, cf014, cf017, cf026, cf027, cf030), bei 2 davon ≥ 20 ng (cf017, cf026), und viele der Proben ≤ 10 ml enthielten ≤ 10 ng cfDNA (cf001, cf003, cf005, cf006, cf007, cf011, cf012, cf013, cf018). Bei einigen Proben ≤ 10 ml konnten höhere cfDNA-Mengen von ≥ 20 ng gemessen werden (Range 20,0 ng-532,0 ng) (cf016, cf019, cf025, cf028, cf031).

In Abbildung 7 ist der cfDNA-Gehalt im Verhältnis zum Volumen der Liquorproben dargestellt.

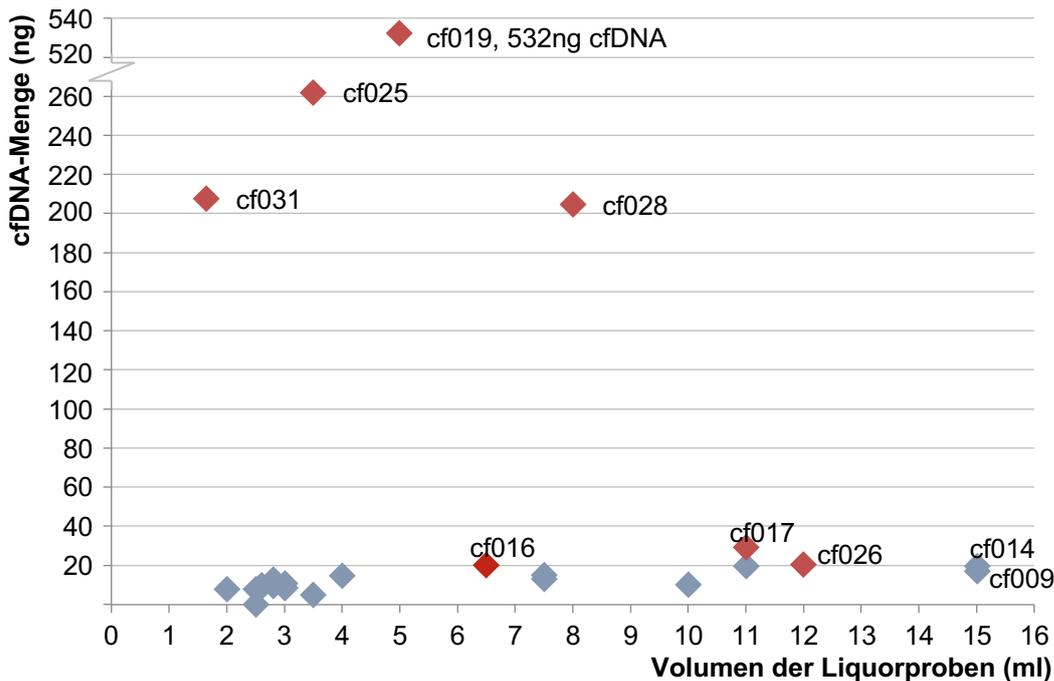


Abbildung 7: Übersicht über cfDNA-Menge und Volumen der Liquorproben (N = 25 Patienten)

Erläuterungen: grau = cfDNA-Menge < 20 ng, rot = cfDNA-Menge ≥ 20 ng.
Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA.

Liquor-cfDNA-Menge und Diagnose

Bei hirneigenen Tumoren war im Median eine cfDNA-Menge von 13,85 ng messbar (N = 12, Range 7,7 ng-204,5 ng) (cf003, cf011, cf012, cf013, cf017, cf020, cf022, cf023, cf026, cf027, cf028, cf030). Dabei lag bei niedriggradigen hirneigenen Tumoren eine mittlere cfDNA-Menge von 9,55 ng vor (N = 2, Range 9,1 ng-10,0 ng), bei höhergradigen waren es im Median 14,85 ng cfDNA (N = 10, Range 7,7 ng-204,5 ng).

Bei den ZNS-Beteiligungen solider Tumoren und dem ZNS-Lymphom betrug die cfDNA-Menge im Median 12,7 ng pro Liquorprobe (N = 13, Range 0,0 ng – 532,0 ng) (cf001, cf004, cf005, cf006, cf007, cf009, cf010, cf014, cf016, cf018, cf019, cf025, cf031).

Liquor-cfDNA-Menge und Mutationslast des Tumorgewebes

Patienten mit geringer Mutationslast des sequenzierten Tumorgewebes wiesen eine höhere mediane cfDNA-Menge im Liquor auf als Patienten mit intermediärer oder hoher Mutationslast (N = 11, Median 14,8 ng (Range 7,7 ng-207,5 ng) vs. N = 6, Median 8,6 ng (Range 0,0 ng-204,5 ng)). Bei 8 Patienten bestand keine Angabe zur Mutationslast.

Liquor-cfDNA-Menge und (Therapie-)Status der ZNS-Affektion

Bei Liquorproben, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der ZNS-Beteiligung entnommen wurden, lag die cfDNA-Menge im Median bei 12,8 ng (N = 14, Range 0,0 ng-261,8 ng). Im Fall der bei Rezidiv-Diagnose der ZNS-Beteiligung entnommenen Liquorproben betrug die cfDNA-Menge im Median 14,9 ng (N = 11, Range 7,7 ng-532 ng).

Unter Berücksichtigung des Therapiestatus der ZNS-Beteiligung zum Zeitpunkt der Liquor-Entnahme (therapienaiv vs. vortherapiert) konnte bei therapienaiven Patienten eine mediane cfDNA-Menge von 12,7 ng (N = 11, Range 5,0 ng-261,8 ng) gemessen werden. Patienten mit bereits speziell für die ZNS-Beteiligung durchgeführten Therapien wiesen im Median 17,15 ng cfDNA in den Liquorproben auf (N = 14, Range 0 ng-532 ng). (Eine genaue Übersicht der Vortherapien findet sich in Tabelle 3 am Ende von Kapitel 3.1.)

Liquor-cfDNA-Menge und Schrankenstörung/Angrenzung der ZNS-Affektion an die inneren Liquorräume

Bei Raumforderungen mit Schrankenstörung lag im Median 12,8 ng cfDNA pro Liquorprobe vor (N = 24, Range 0,0 ng-532,0 ng). Ein Patient ohne Schrankenstörung (cf027) wies 19,5 ng cfDNA in seiner Liquorprobe auf. Wenn der Tumor bzw. die ZNS-Beteiligung an die inneren Liquorräume angrenzte, war im Median eine doppelt so hohe cfDNA-Menge im Liquor messbar als ohne Angrenzung (N = 17, Median 16,8 ng (Range 7,7 ng-532 ng) vs. N = 8, Median 8,4 ng (Range (0,0 ng-19,4 ng))).

Liquor-cfDNA-Menge bei Meningeosis neoplastica und Liquorpleozytose

Bei Vorliegen einer Meningeosis neoplastica war eine deutlich erhöhte cfDNA-Menge in der Liquorprobe zu beobachten (N = 3, Median 207,5 ng (Range 12,7 ng-532,0 ng) vs. N = 22, Median 11,75 ng (Range 0,0 ng-261,8 ng)), selbst wenn das Volumen der Probe gering war (≤ 5 ml bei cf010, cf019, cf031). Zwei der drei höchsten cfDNA-Mengen dieser Fallserie stammten von Liquorproben von Patienten mit Meningeosis carcinomatosa (cf019 mit 532,0 ng; cf031 mit 207,5 ng).

Auch Patienten ohne Meningeosis neoplastica, bei denen zum Zeitpunkt der Liquor-Entnahme eine Liquorpleozytose bestand, wiesen im Median eine höhere cfDNA-Menge auf als solche Patienten ohne Liquorpleozytose (N = 8, Median 18,1 ng (Range 7,7 ng-261,8 ng) vs. N = 13, Median 10,0 ng (Range 0 ng-20,4 ng)).

Tabelle 5: Übersicht der hinsichtlich der cfDNA-Menge im Liquor analysierten Charakteristika

Erläuterungen: + = ja/vorliegend, – = nein/nicht vorliegend, fettgedruckt = Minimal-/Maximalwerte. Zur Übersichtlichkeit sind die einzelnen Gliom-Diagnosen und Tumorgrunderkrankungen bei ZNS-Beteiligung nicht individuell genannt.

* Keine Therapie speziell für die ZNS-Beteiligung, aber zum Zeitpunkt der Liquorentnahme Behandlung mit ZNS-gängiger und -wirksamer Systemtherapie im Rahmen der Therapie der Tumorgrunderkrankung (Erlotinib 100 mg/Tag (cf005) bzw. Ipilimumab 235 mg und Nivolumab 80 mg (cf009)).

** Ergebnisse der Liquor-Zytologie und der klinischen Liquor-Untersuchung nicht bekannt, daher eingeschränkt beurteilbar.

*** Schätzung der Mutationslast des sequenzierten Tumorgewebes: hoch ($\geq 23,1$ Mut/Mb), intermediär (3,3-23,1 Mut/Mb), gering ($< 3,3$ Mut/Mb).

Abkürzungen: Bet = Beteiligung, cfDNA = zellfreie DNA, ED = Erstdiagnose, ID = Identifikationsnummer, k. A. = keine Angabe, MED = Median, Medullo = Medulloblastom, Rez = Rezidiv/Progress, WHO = World Health Organisation (Tumorgrad), ZNS = zentrales Nervensystem.

Patienten-ID	cfDNA-Menge der Liquorprobe (ng)	Volumen der Liquorprobe (ml)	Meningeosis neoplastica	Liquorpleozytose	Diagnose (vereinfacht),	Mutationslast des sequenzierten Gewebes***	Status der ZNS-Bet. bei Liquorentnahme (ED vs. Rez)	Therapienaivität bezüglich der ZNS-Bet.	Angrenzung an die inneren Liquorräume	Schrankenstörung
cf001	5,0	3,5	-	-	ZNS-Bet,	hoch	ED	+	-	+
cf003	8,4	3,00	-	-	Gliom WHO IV,	gering	ED	+	-	+
cf004	10,6	3,00	-	-	ZNS-Bet,	gering	ED	+	+	+
cf005	8,4	3,00	-	-	ZNS-Bet,	k. A.	ED	+	-	+
cf006	7,7	2,00	-	-	ZNS-Bet,	intermediär	Rez	-	-	+
cf007	9,5	2,80	-	+	ZNS-Bet,	intermediär	ED	+	+	+
cf009	16,8	15,00	-	+	ZNS-Bet,	k. A.	ED	+	+	+
cf010	12,7	2,80	+	+	ZNS-Lymphom,	k. A.	ED	+	+	+
cf011	7,7	2,50	-	+	Gliom WHO IV,	gering	Rez	-	+	+
cf012	9,8	2,60	-	+	Gliom WHO IV,	k. A.	Rez	-	-	+
cf013	9,1	2,60	-	-	Meningeom WHO I,	gering	Rez	-	+	+
cf014	19,4	15,00	-	+	ZNS-Bet,	k. A.	Rez	-	-	+
cf016	20,0	6,50	-	-	ZNS-Bet,	gering	ED	-	+	+
cf017	29,3	11,00	-	+	Gliom WHO III,	gering	Rez	-	+	+
cf018	0,0	2,50	-	-	ZNS-Bet,	hoch	ED	-	-	+
cf019	532,0	5,00	+	-	ZNS-Bet,	k. A.	Rez	-	+	+
cf020	14,8	4,00	-	-	Gliom WHO IV,	gering	ED	+	-	+
cf022	12,9	7,50	-	-	Gliom WHO IV,	gering	ED	+	+	+
cf023	14,9	7,50	-	-	Gliom WHO IV,	gering	Rez	-	+	+
cf025	261,8	3,50	-	+	ZNS-Bet,	k. A.	ED	+	+	+
cf026	20,4	12,00	-	-	Gliom WHO IV,	intermediär	Rez	-	+	+
cf027	19,5	11,00	-	+	Medullo WHO IV,	gering	ED	+	+	-
cf028	204,5	8,00	**	**	Gliom WHO IV,	intermediär	ED	-	+	+
cf030	10,0	10,00	-	-	Gliom WHO II,	k. A.	Rez	-	+	+
cf031	207,5	1,65	+	+	ZNS-Bet,	gering	Rez	-	+	+
MED	12,9	3,5								

3.3 Auswertung der Gewebeproben

Insgesamt wurden die Sequenzierungs-Ergebnisse der Gewebeproben von 17 Patienten für den späteren Abgleich von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung berücksichtigt (cf003, cf004, cf006, cf007, cf011, cf013, cf016, cf017, cf018, cf020, cf022, cf023, cf026, cf027, cf028, cf030, cf031).

Die restlichen 13 Patienten konnten nicht eingeschlossen werden, da sie die Einschlusskriterien nicht erfüllten (kein sequenzierbares Gewebe verfügbar (cf010, cf014), am vorliegenden Gewebe keine Sequenzierung durchgeführt

(cf005, cf009, cf012, cf019, cf025), keine Liquor-Sequenzierung durchgeführt (cf001, cf002, cf015, cf029), keine ZNS-Beteiligung der Tumorerkrankung vorliegend (cf021, cf024)). Abbildung 8 stellt diese Zuordnung als CONSORT-Diagramm dar. In Tabelle 6 (auf der nächsten Seite) sind die berücksichtigten sequenzierten Gewebeproben detailliert aufgeführt.

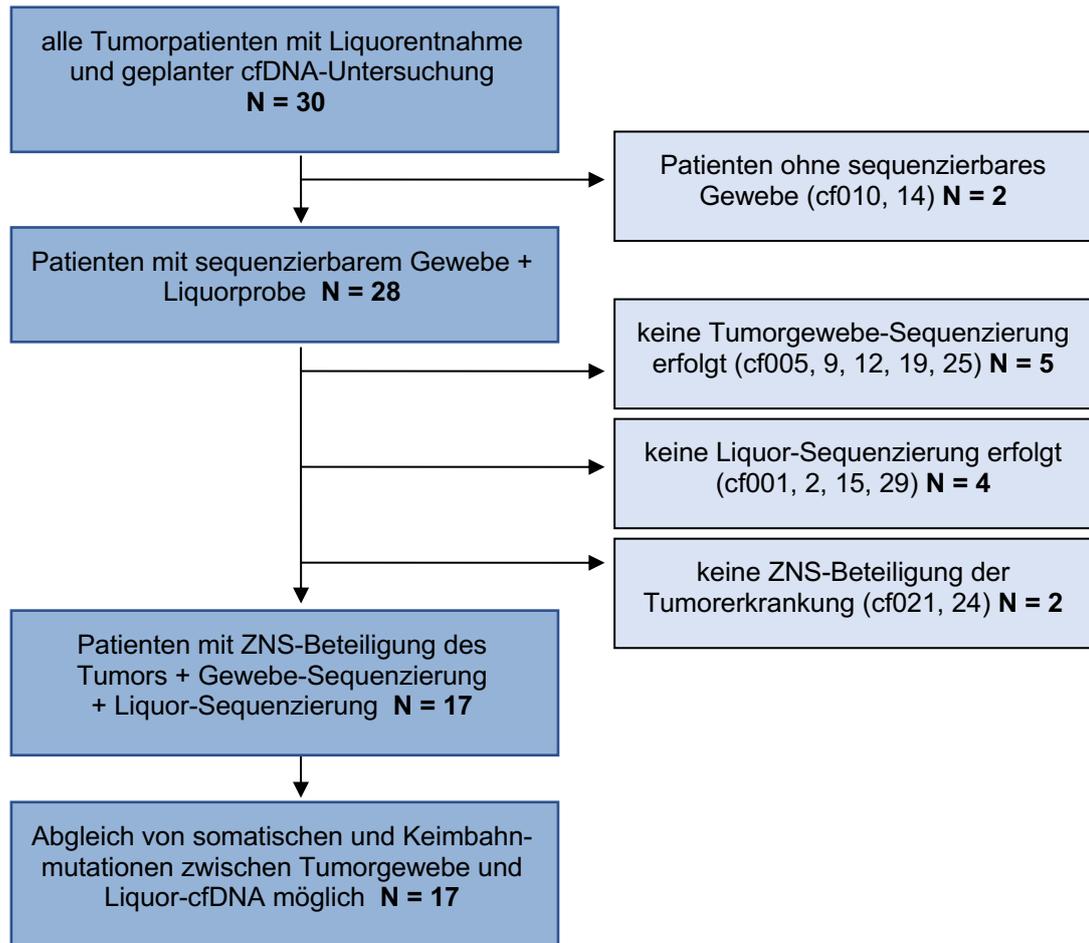


Abbildung 8: CONSORT-Diagramm mit Gesamtkollektiv (N = 30) und Patientenkollektiv mit berücksichtigter Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung (N = 17)

Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA, ZNS = zentrales Nervensystem.

3.3.1 Eigenschaften der berücksichtigten Gewebeproben

Bei 14 Patienten stammte das sequenzierte Gewebe aus dem ZNS:

11 Patienten mit hirneigenen Tumoren (7 GBM WHO IV (cf003, cf011, cf020, cf022, cf023, cf026, cf028), 1 Meningeom WHO I (cf013), 1 Astrozytom WHO II

(cf030), 1 Oligodendrogliom WHO III (cf017), 1 Medulloblastom WHO IV (cf027)) sowie 3 Patienten mit ZNS-Metastasen (cf004, cf006, cf018). Bei 11/14 Patienten erfolgte die Gewebeentnahme bei Erstdiagnose und von 2/14 Patienten bei Rezidiv-Diagnose (cf013, cf017). Bei einem Patienten wurde sowohl bei Erstdiagnose als auch von dem Rezidivtumor je eine Gewebeprobe sequenziert (cf011).

Bei 3 Patienten stammte die sequenzierte Gewebeprobe nicht aus dem ZNS: In zwei Fällen wurden vor Erstdiagnose der ZNS-Beteiligung entnommene Proben der Extra-ZNS-Primärtumore sequenziert (cf031, cf016). Bei einem Patienten wurde eine Extra-ZNS-Metastase sequenziert, die synchron zu der Erstdiagnose der ZNS-Beteiligung entfernt wurde (cf007).

Die Informationen dieses Abschnitts sind in Tabelle 6 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der berücksichtigten Gewebeproben von N = 17 Patienten

Abkürzungen: Bet = Beteiligung, BWK = Brustwirbelkörper, Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, ID = Identifikationsnummer, GBM = Glioblastom WHO IV, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, Oligo = Oligodendrogliom, Rez = Rezidiv/Progress, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Patienten-ID	Primärtumor + ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastica	Status der ZNS-Bet. bei Liquorentnahme	Art der Gewebeprobe und Status der ZNS-Bet. bei Gewebeentnahme
cf003	GBM	–	ED	Primärtumor ZNS bei ED
cf004	Prostata-Ca+ Met	–	ED	epidurale Met Höhe BWK 12 bei ED
cf006	Duodenal-Ca+ Met	–	Rez	ZNS-Met bei ED
cf007	Nierenzell-Ca+ Met	–	ED	Met der aryepiglottischen Falte (synchron zu ED der ZNS-Met entnommen)
cf011	GBM	–	Rez	1. Probe: Primärtumor ZNS bei ED 2. Probe: Rezidivtumor ZNS
cf013	Meningeom WHO I	–	Rez	Rezidivtumor ZNS
cf016	Mamma-Ca+ Met	–	ED	Mammastanze bei ED des Ca (vor ED der ZNS-Met entnommen)
cf017	Oligo WHO III	–	Rez	Rezidivtumor ZNS
cf018	Melanom+ Met	–	ED	ZNS-Met bei ED
cf020	GBM	–	ED	Primärtumor ZNS bei ED
cf022	GBM	–	ED	Primärtumor ZNS bei ED
cf023	GBM	–	Rez	Primärtumor ZNS bei ED
cf026	GBM	–	Rez	Primärtumor ZNS bei ED

Patienten-ID	Primärtumor + ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastica	Status der ZNS-Bet. bei Liquorentnahme	Art der Gewebeprobe und Status der ZNS-Bet. bei Gewebeentnahme
cf027	Medullo WHO IV	-	ED	Primärtumor ZNS bei ED
cf028	GBM	-	ED	Primärtumor ZNS bei ED
cf030	Astrozytom WHO II	-	Rez	Primärtumor ZNS bei ED
cf031	Magen-Ca	+	Rez	Magen-Ca bei dessen ED (vor ED der ZNS-Beteiligung entnommen)

3.3.2 Ergebnisse der Gewebeprobe-Sequenzierung

3.3.2.1 Punktmutationen (SNVs) in Gewebeprobe

Im Median wiesen die berücksichtigten Gewebeprobe 6 Punktmutationen (SNVs) (Range 1-70) von 6 Genen (Range 1-50) pro Probe auf. Bei 3 Proben waren einzelne Gene mehrfach punktmultiert (cf006, cf007, cf018). Eine detaillierte Auflistung aller Punktmutationen in Gewebeprobe befindet sich im Anhang in Tabelle X1. Abbildung 9 zeigt die Anzahl der punktmultierten Gene pro Gewebeprobe unter Berücksichtigung der Art des jeweiligen Gewebes (ZNS-Gewebe/Extra-ZNS-Gewebe).

Zu den am häufigsten bei verschiedenen Patienten im Gewebe punktmultierten Genen zählen TP53 (bei 7 Patienten), IDH1 und RYR1 (jeweils bei 4 Patienten) sowie LRP1B, NF1, PIK3R1, PKHD1 und PTEN (jeweils bei 3 Patienten). Zu einem Teil unterschieden sich die punktmultierten Gene nach Gewebeart (ZNS-Gewebe vs. Extra-ZNS-Gewebe) und Diagnosegruppe (hirneigene Tumore vs. solide Tumorerkrankungen mit ZNS-Beteiligung). Beispielsweise waren PTEN, RYR1 und TP53 die einzigen Gene, die sowohl in ZNS-Gewebeprobe als auch in Extra-ZNS-Gewebeprobe mindestens einmal punktmultiert vorlagen. Im Anhang sind in Tabellen X2 und X3 alle punktmultierten Gene der Gewebeprobe nach Gewebeart und Diagnosegruppe sortiert aufgeführt.

Einige Besonderheiten der SNVs in Gewebeprobe sind im Folgenden genauer beschrieben: Bei 3 Patienten konnte dieselbe IDH1-R132H-Mutation im Gewebe festgestellt werden (cf017, cf020, cf023). Ein Patient (cf030) wies eine IDH1-

R132C-Mutation auf. Außer bei dem IDH1-Gen traten keine identischen Punktmutationen bei ≥ 2 Patienten auf.

Bei dem Patienten mit je einer Tumorgewebeprobe von Erstdiagnose und Rezidiv seines Glioblastoms WHO Grad IV (cf011) stimmten 3 SNVs zwischen beiden Proben überein: eine RYR1-missense-Mutation, SSTR3-stop_gained-Mutation und BRCA2-missense-Keimbahnmutation. Die Allelfrequenzen der Mutationen des RYR1-Gens und SSTR3-Gens lagen im Rezidivtumor minimal höher als in der Tumورprobe bei Erstdiagnose (31,12 % vs. 27,96 % bzw. 42,61 % vs. 41,79 %). Die Allelfrequenz der BRCA2-Keimbahnmutation war in beiden Proben ähnlich hoch (46,20 % vs. 48,40 %).

Eine Gewebevariante (C11ORF30-frameshift-Mutation, Allelfrequenz: 36,98 %) konnte nur in der Probe des Rezidivtumors nachgewiesen werden.

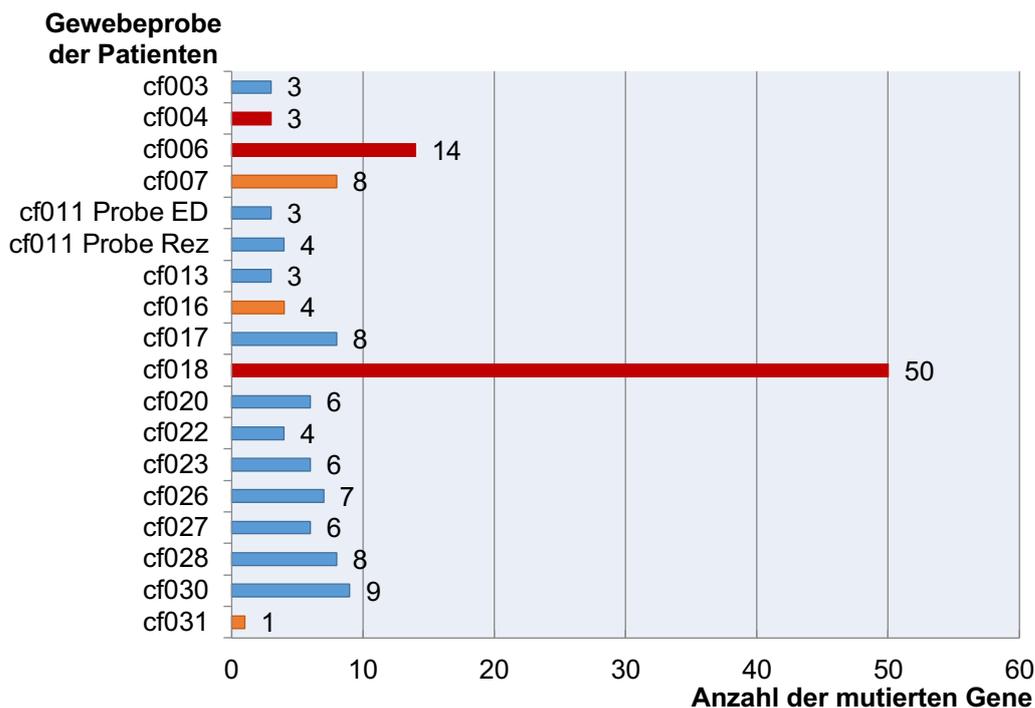


Abbildung 9: Anzahl der mutierten Gene bei Gewebesequenzierung pro Probe (N = 17 Patienten)

Erläuterungen: in blau = ZNS-Gewebe von hirneigenem Tumor, in rot = ZNS-Metastasengewebe eines soliden Extra-ZNS-Primärtumors, in orange = anderes Tumorgewebe bei Extra-ZNS-Primärtumor. Abkürzungen: ED = Erstdiagnose, Rez = Rezidiv, ZNS-Zentrales Nervensystem.

3.3.2.2 Geschätzte Mutationslast der Gewebeproben

Im Median lag die geschätzte Mutationslast der Gewebeproben bei 2,6 Mutationen pro Megabase (Mut/Mb) (Range 0,1-46,1 Mut/Mb). Insgesamt 12 Gewebeproben wiesen eine geringe Mutationslast auf (<3,3 Mut/Mb), bei 4 Proben wurde sie als intermediär eingestuft (3,3-23,1 Mut/Mb). Bei einer Probe (cf018) wurde eine hohe Mutationslast nachgewiesen ($\geq 23,1$ Mut/Mb) und bei einer anderen Gewebeprobe (cf030) konnte keine Mutationslast geschätzt werden. Bei dem Patienten mit je einer Tumorgewebeprobe von Erstdiagnose und Rezidiv seines Glioblastoms WHO Grad IV (cf011) wurde die Mutationslast des Rezidivtumors höher geschätzt als die der Tumorprobe bei Erstdiagnose (1,6 Mut/Mb vs. 0,5 Mut/Mb). Sie wurde bei beiden Tumorproben als gering eingestuft (<3,3 Mut/Mb).

Abbildung 10 gibt eine Übersicht über die geschätzte Mutationslast der Gewebeproben.

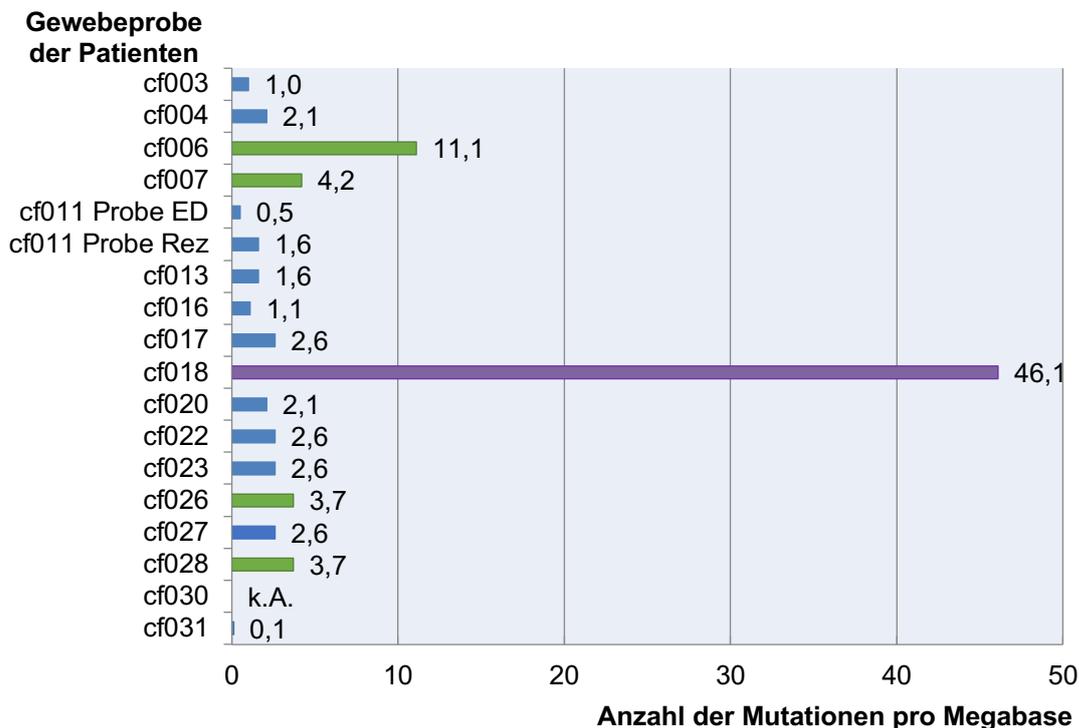


Abbildung 10: Geschätzte Mutationslast der Gewebeproben (N =17 Patienten)

Erläuterungen: lila = hoch ($\geq 23,1$ Mut/Mb), grün = intermediär (3,3–23,1 Mut/Mb), blau = gering (<3,3 Mut/Mb). Abkürzungen: ED = Erstdiagnose, Rez = Rezidiv, Mut/Mb = Mutationen pro Megabase.

3.3.2.3 Struktur- und Kopienzahlvarianten (CNVs) in Gewebeproben

Die Gewebeproben von 14 Patienten konnten auf Kopienzahlvarianten (CNVs, d.h. Amplifikationen und Deletionen) untersucht werden. In den Proben von 13 (92,9 %) Patienten wurden CNVs festgestellt:

Bei 9 Patienten lagen Amplifikationen vor (6 Patienten mit hirneigenem Tumor und 3 Patienten mit ZNS-Beteiligung einer anderen Tumorerkrankung). Die mediane Kopienanzahl betrug 4 (Range 3 bis >10 Kopien). Am häufigsten betroffen war das Gen EGFR (bei 4 Patienten).

Die Proben von 10 Patienten wiesen Deletionen auf (6 Patienten mit hirneigenem Tumor und 4 Patienten mit ZNS-Beteiligung einer anderen Tumorerkrankung). Bei 6 Patienten entstand entweder durch homozygote Deletion oder durch die Kombination aus heterozygoter Deletion des einen und Punktmutation des anderen Allels ein homozygoter Verlust des jeweiligen Gens. Von Deletionen betroffen waren zumeist die Gene CDKN2A und CDKN2B (bei je 5 Patienten) sowie PTEN (bei 4 Patienten) und PIK3R1 (bei 3 Patienten).

Die Gewebeproben von 4 Patienten wurden auf das Vorhandensein von Translokationen untersucht (cf004, cf011, cf023, cf031). Eine Gewebeprobe von cf004 (Patient mit epiduraler Metastase bei Prostata-Karzinom) wies eine Translokation im Gen TMPRSS2 auf.

Alle Struktur- und Kopienzahlvarianten der Gewebeproben sind im Anhang in den Tabellen X4-X6 aufgelistet.

3.4 Ergebnisse der Liquor-cfDNA-Sequenzierung

Analog zur Auswertung der Gewebeproben (siehe Kapitel 3.3) wurden die Liquor-cfDNA-Sequenzierungs-Ergebnisse von insgesamt 17 Patienten für den späteren Abgleich berücksichtigt.

Die Sequenzierung der Liquor-cfDNA erfolgte bei 14 Patienten auf Basis des ONC.1-Panels (O, 81 Gene) und bei 3 Patienten auf Basis des TUM.4-Panels (T, 710 Gene). Es konnten lediglich Punktmutationen (SNVs) berücksichtigt werden. Eine Übersicht über die Zuordnung des jeweils verwendeten Liquor-Panels sowie über alle nachgewiesenen Liquor-cfDNA-Mutationen befindet sich in Tabelle 7.

Die durchschnittliche Coverage der Liquor-Panel-Sequenzierung belief sich im Median auf 547,36 (3,64-9431,48) mit einer medianen UR-Rate von 0,27 % (0,00 %-98,19 %).

Insgesamt lag bei 16 von 17 Patienten cfDNA im Liquor vor (94 %), die mediane Menge betrug 12,9 ng (Range 0,0 ng-207,5 ng). Bei 9 von 17 Patienten (52,9 %) konnte in der Liquor-cfDNA jeweils mindestens eine Punktmutation festgestellt werden. Die mediane cfDNA-Menge im Liquor dieser 9 Patienten betrug 14,9 ng (Range 7,7 ng-207,5 ng), bei den 8 Patienten ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis waren es im Median 10 ng (Range 0,0-20,4 ng).

Der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen gelang insgesamt bei 6 von 11 (54,5 %) untersuchten Patienten mit primärem Hirntumor (darunter 55,6 % (5/9) der WHO Grad III-IV Tumore, 50 % (1/2) der WHO Grad II Tumore), bei 5 der 11 Patienten nicht (Tumore mit WHO Grad I/IV). Darüber hinaus konnten bei 3 von 6 (50 %) untersuchten Patienten mit ZNS-Beteiligung eines soliden Tumors Mutationen in der Liquor-cfDNA nachgewiesen werden. Weitere Ergebnisse sind hinsichtlich verschiedener klinischer Eigenschaften gegliedert in Tabelle 8 aufgeführt.

Die mediane Allel-Frequenz der Liquor-cfDNA-Mutationen lag bei 31,08 % (Range 4,56 %-80,92 %). Die häufigsten Liquor-cfDNA-Punktmutationen betrafen die Gene TP53 (bei 4 Patienten: cf006, cf016, cf020, cf023) und IDH1 (bei 2 Patienten: cf023, cf030), wobei es sich in allen Fällen um unterschiedliche Mutationssequenzen handelte. Die Gene NF1, PIK3R1, PTEN, BRAF, BRCA2, MET, APC, ATM, ATRX, KIAA1549, KRAS, MED12, PIK3CA und XPC lagen bei jeweils einem Patienten als Liquor-cfDNA-Mutation vor.

Zum Großteil unterschieden sich die in der Liquor-cfDNA mutierten Gene nach Diagnose des Patienten: 9 Gene lagen ausschließlich bei Patienten mit hirneigenem Tumor als Liquor-Variante vor, 6 ausschließlich bei Patienten mit solider Tumorerkrankung und ZNS-Beteiligung. TP53 war als einziges Gen bei beiden Diagnosegruppen in Liquor-cfDNA mutiert nachweisbar. In Tabelle 9 sind die Gene nach diesen Gruppen getrennt aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der nachgewiesenen Liquor-cfDNA-Mutationen (N =17 Patienten)

Erläuterungen: in blau = alle Patienten mit nachgewiesenen Liquor-cfDNA-Mutationen; in weiß = alle Patienten ohne nachgewiesene Liquor-cfDNA-Mutationen, – = nicht vorliegend.

Abkürzungen: Bet. = Beteiligung, Ca = Karzinom, cfDNA = zellfreie DNA, ED = Erstdiagnose, ID = Identifikationsnummer, GBM = Glioblastom WHO-Grad IV, KB = Keimbahnmutation, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, O = ONC.1-Panel, Rez = Rezidiv/Progress, T = TUM.4-Panel, UR = underrepresented (Regionen mit Coverage <30), WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Patienten-ID	Tumorgrund- erkrankung, Art der sequenzierten Gewebeprobe + Status der ZNS-Bet. bei Gewebeentnahme	Status der ZNS-Bet. bei Liquorentnahme	Liquor Panel	Gen (ggfs. Keimbahn- mutation)	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäuren- austausch	Basenaustausch	Allelfrequenz in Liquor-cfDNA (%)	Coverage Liquor- cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
cf003	GBM ED	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf004	Prostata-Ca, epidurale Met bei ED	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	APC	5	frameshift	p.E1550Kfs* 14	c.4648_4651d elGAGA	46,46	254	0,27
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	BRAF	7	missense	p.D594N	c.1780G>A	72,58	372	0,27
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	KRAS	12	missense	p.V14I	c.40G>A	14,69	497	0,27
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	NF1	17	frameshift	p.S2096Pfs* 29	c.6285_6297d el	75,21	476	0,27
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	PIK3CA	3	missense	p.E542K	c.1624G>A	80,92	283	0,27
cf006	Duodenal-Ca, ZNS-Met bei ED	Rez	O	TP53	17	frameshift	p.K292Efs*1 4	c.872dupA	66,48	349	0,27
cf007	Nierenzell-Ca, extra- ZNS-Met (synchron zu ED ZNS-Met)	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf011	GBM, 1. Probe: ED, 2. Probe Rez	Rez	O	BRCA2 (KB)	13	missense	p.N277K	c.831T>G	57,70	440	0,11
cf013	Meningeom WHO I Rez	Rez	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf016	Mamma-Ca bei ED (vor ED ZNS-Met)	ED	O	TP53	17	missense	p.R110P	c.329G>C	72,16	589	0,21
cf017	Oligodendrogliom WHO III Rez	Rez	T	XPC (KB)	3	missense	p.E755K	c.2263G>A	44,90	1137	0,16
cf018	Melanom, ZNS-Met bei ED	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf020	GBM ED	ED	O	TP53	17	inframe	p.H179_E18 0del	c.536_541del ATGAGC	4,56	548	0,67
cf022	GBM ED	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf023	GBM ED	Rez	T	ATM	11	missense	p.K2302T	c.6905A>C	28,83	111	2,37
cf023	GBM ED	Rez	T	ATRX	X	frameshift	p.D1940Vfs* 14	c.5819_5822d elATAG	24,49	98	2,37
cf023	GBM ED	Rez	T	IDH1	2	missense	p.R132H	c.395G>A	24,30	107	2,37
cf023	GBM ED	Rez	T	MED12	X	splice_reg ion	p.?	c.100-8_100- 7insAGGA	9,21	76	2,37
cf023	GBM ED	Rez	T	PIK3R1	5	inframe	p.F456_Q45 7del	c.1365_1370d elGTTTCA	10,00	50	2,37
cf023	GBM ED	Rez	T	TP53	17	missense	p.Y234D	c.700T>G	33,33	63	2,37
cf026	GBM ED	Rez	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf027	Medullo WHO IV bei ED	ED	O	–	–	–	–	–	–	–	–
cf028	GBM ED	ED	O	MET	7	missense	p.A5T	c.13G>A	7,90	13288	0,00
cf028	GBM ED	ED	O	PTEN	10	splice_reg ion	p.G165E	c.494G>A	10,64	7809	0,00
cf030	Astrozytom WHO II ED	Rez	O	IDH1	2	missense	p.R132C	c.394C>T	17,76	1458	0,00
cf031	Magen-Ca bei ED (vor ED ZNS-Beteiligung)	Rez	T	KIAA1549	7	missense	p.D1693G	c.5078A>G	69,23	39	36,02

Tabelle 8: Aufgliederung der Patientenanzahl mit und ohne Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen hinsichtlich klinischer Eigenschaften (N = 17 Patienten)

Erläuterungen: *Davon 12 Patienten mit Schrankenstörung, ein Patient ohne Schrankenstörung. Abkürzungen: cfDNA = cell-free DNA, k. A. = keine Angabe, Mb = Megabase, Met = Metastasen, Mut = Mutationen, ZNS = zentrales Nervensystem.

	gesamte Patientenanzahl	Patienten mit Nachweis von Mutationen in Liquor-cfDNA (N = 9)	Patienten ohne Nachweis von Mutationen in Liquor-cfDNA (N = 8)
Diagnosegruppe			
Primärer Hirntumor	N = 11	6 (54,5 %)	5 (45,5 %)
ZNS-Met eines soliden Primärtumors	N = 6	3 (50 %)	3 (50 %)
Mutationslast im Tumorgewebe			
gering (< 3,3 Mut/Mb)	N = 11	6 (54,5 %)	5 (45,5 %)
intermediär (3,3 - 23,1 Mut/Mb) oder hoch (\geq 23,1 Mut/Mb)	N = 5	2 (40 %)	3 (60 %)
k. A.	N = 1	1 (100 %)	0 (0 %)
Status der ZNS-Affektion			
Erstdiagnose	N = 9	3 (33,3 %)	6 (66,6 %)
Rezidiv	N = 8	6 (75 %)	2 (25 %)
Therapiestatus der ZNS-Affektion			
Therapienaiv	N = 6	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)
Vorthera­piert	N = 11	8 (72,7 %)	3 (27,3 %)
Schrankenstörung der ZNS-Beteiligung			
Ja	N = 16	9 (56,2 %)	7 (43,8 %)
Nein	N = 1	0 (0 %)	1 (100 %)
Angrenzung der ZNS-Beteiligung an innere Liquorräume			
Ja*	N = 13	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)
Nein	N = 4	2 (50 %)	2 (50 %)
Meningeosis neoplastica			
Ja	N = 1	1 (100 %)	0 (0 %)
Nein	N = 16	8 (50 %)	8 (50 %)
Liquorpleozytose			
Ja (ohne Meningeosis neoplastica)	N = 4	2 (50 %)	2 (50 %)
Ja (mit Meningeosis neoplastica)	N = 1	1 (100 %)	0 (0 %)
Nein	N = 11	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)
k. A.	N = 1	1 (100 %)	0 (0 %)

Tabelle 9: Übersicht der in Liquor-cfDNA mutierten Gene geordnet nach Diagnosegruppe der Patienten

Abkürzungen: ZNS = Zentrales Nervensystem

Gene, die ausschließlich bei Patienten mit hirneigenem Tumor als Liquor-Variante nachgewiesen wurden	Gene, die ausschließlich bei bei Patienten mit solidem Tumor + ZNS-Beteiligung als Liquor-Variante nachgewiesen wurden	Gene, die bei beiden Diagnosegruppen als Liquor-Variante nachgewiesen wurden
ATM	APC	TP53
ATRX	BRAF	
BRCA2	KIAA1549	
IDH1	KRAS	
MED12	NF1	
MET	PIK3CA	
PIK3R1		
PTEN		
XPC		

3.5 Vergleich der Ergebnisse von Gewebe- und Liquor-cfDNA-Sequenzierung

Als letzter Schritt wurden die Ergebnisse von Gewebe- und Liquor-Sequenzierung zusammengefügt.

Unter Kapitel 3.4 wurde bereits aufgeführt, bei wie vielen Patienten mindestens eine Mutation in der Liquor-cfDNA nachgewiesen werden konnte.

In dem folgenden Abschnitt 3.5.1 wird nun detaillierter beschrieben, bei wie vielen Patienten der Nachweis keiner, einiger oder aller Mutationen des Tumorgewebes in der Liquor-cfDNA potentiell möglich und tatsächlich vorliegend war.

Danach werden in 3.5.2 die am häufigsten in Liquor-cfDNA nachgewiesenen Tumormutationen analysiert und bezüglich klinischer Patientencharakteristika betrachtet.

3.5.1 Analyse des potentiellen und tatsächlichen Nachweises von Tumorgewebe-Mutationen in Liquor-cfDNA

Die folgende Gliederung der Sequenzierungs-Ergebnisse ist in einem CONSORT-Diagramm (Abb. 11) grafisch dargestellt.

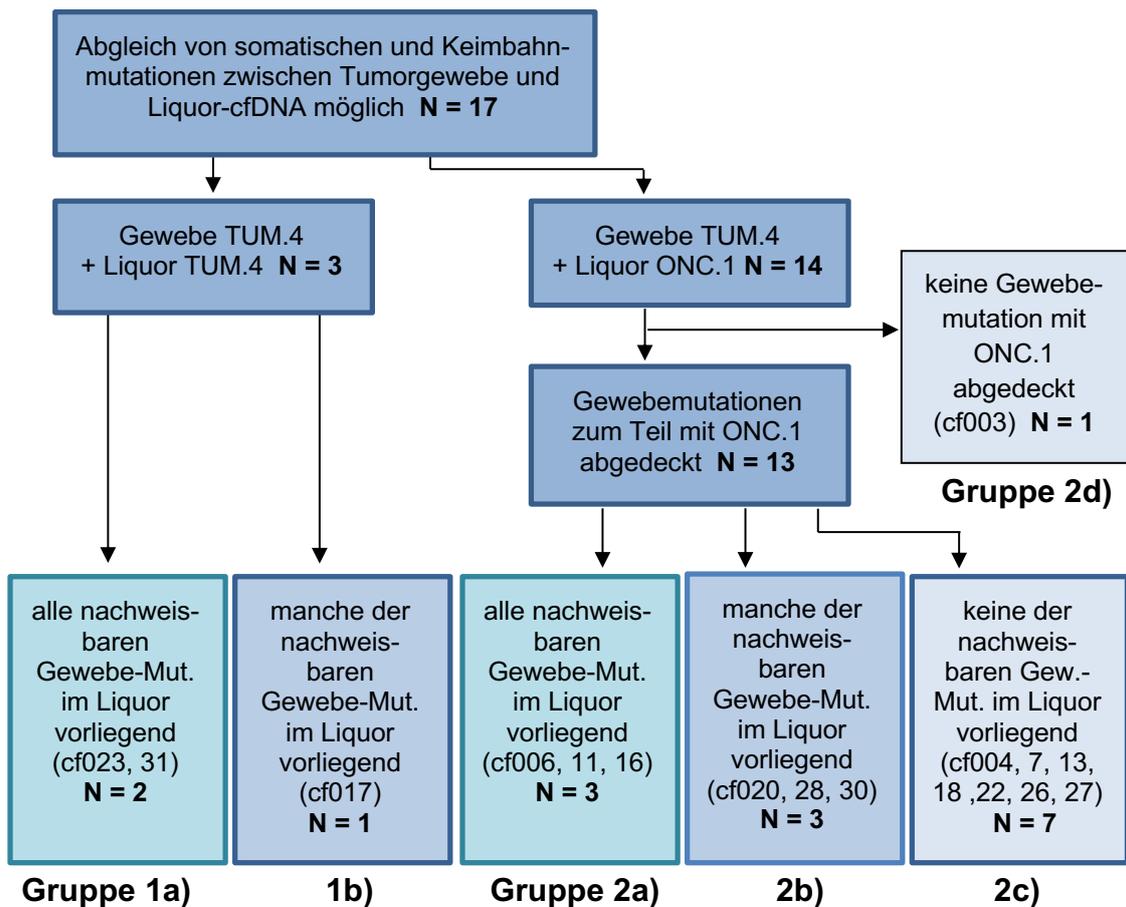


Abbildung 11: Übersicht der Patienten mit potentiell und tatsächlichem Nachweis von Tumorgewebe-Mutationen in Liquor-cfDNA (N = 17 Patienten)

Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA, Gew = Gewebe, Mut = Mutationen.

Da für die Liquor-cfDNA-Sequenzierung zwei verschiedene Panels verwendet wurden (siehe Kapitel 3.4), ergaben sich zwei Patientengruppen: In Gruppe 1 wurde dafür das TUM.4-Panel genutzt (cf017, cf023, cf031) in Gruppe 2 das ONC.1-Panel (cf003, cf004, cf006, cf007, cf011, cf013, cf016, cf018, cf020, cf022, cf026, cf027, cf028, cf030).

Die potentielle Nachweismöglichkeit einer Tumorgewebe-Punktmutation als Liquor-cfDNA-Mutation bestand dann, wenn das entsprechende Gen durch das Liquor-Panel des jeweiligen Patienten untersucht wurde. Insgesamt war auf diese Weise bei 16 Patienten die potentielle Möglichkeit eines Nachweises mindestens einer Tumorgewebe-Punktmutation in der Liquor-cfDNA gegeben:

Bei 2 Patienten der TUM.4-Gruppe (cf023, cf031) und 3 Patienten der ONC.1-Gruppe (cf006, cf011, cf016) konnten alle Tumorgewebe-Punktmutationen mit potentieller Nachweismöglichkeit im Liquor tatsächlich als Liquor-cfDNA-Mutationen nachgewiesen werden. In Abb. 11 entsprechen diese Patienten der Untergruppe a).

Bei einem Patienten der TUM.4-Gruppe (cf017) und 3 Patienten der ONC.1-Gruppe (cf020, cf028, cf030) konnten lediglich manche der Tumorgewebe-Punktmutationen mit potentieller Nachweismöglichkeit im Liquor tatsächlich als Liquor-cfDNA-Mutationen nachgewiesen werden. In Abb. 11 entsprechen diese Patienten der Untergruppe b).

Auffällig war, dass teilweise bei demselben Patienten eine Gewebe-Mutation mit geringer Novel Allelfrequenz (NAF) in der Liquor-cfDNA als Mutation nachgewiesen wurde, während zugleich eine andere Gewebe-Mutation mit höherer NAF nicht als Liquor-cfDNA-Mutation vorlag. So verhielt es sich beispielsweise bei dem Patienten cf030: Die IDH1-Mutation (Gewebe-NAF 17,86 %) konnte in der Liquor-cfDNA festgestellt werden, nicht aber die TP53-Mutation (Gewebe-NAF 91,30 %).

Bei 7 Patienten der ONC.1-Gruppe konnte keine der Tumorgewebe-Punktmutationen mit potentieller Nachweismöglichkeit im Liquor tatsächlich als Liquor-cfDNA-Mutationen nachgewiesen werden (cf004, cf007, cf013, cf018, cf022, cf026, cf027). In Abb. 11 entsprechen diese Patienten der Untergruppe c).

Bei einem Patienten der ONC.1-Gruppe bestand für keine Tumorgewebe-Punktmutation die potentielle Nachweismöglichkeit in der Liquor-cfDNA (cf003). In Abb. 11 entspricht dieser Patient der Untergruppe d).

In Tabelle X7 im Anhang sind alle potentiell und tatsächlich in Liquor-cfDNA nachweisbaren Tumorgewebe-Punktmutationen nach obiger Gruppierung aufgelistet. Abbildung 12 (auf der nächsten Seite) stellt die Mutationen unter Angabe des Mutationstyps und der Diagnosegruppe des jeweiligen Patienten zur Übersicht grafisch da.

nachweisbar. Dies waren (in absteigender Häufigkeit) TP53, IDH1, NF1, PIK3R1, PTEN, BRAF, BRCA2 und MET. Jedes dieser Gene konnte bei mindestens einem Patienten als Liquor-cfDNA-Mutation nachgewiesen werden, bei mindestens einem anderen Patienten nicht (siehe Abb. 13). Daher waren diese 8 Gene besonders geeignet, um klinische Charakteristika der Patienten mit und ohne Mutationsnachweis in der Liquor-cfDNA gegenüberzustellen.

Zum Überblick sind die Genmutationen mit und ohne Nachweis in der Liquor-cfDNA unter Angabe klinischer Patienteneigenschaften in Tabelle 10 am Ende des Kapitels 3.5 getrennt und farblich markiert aufgeführt.

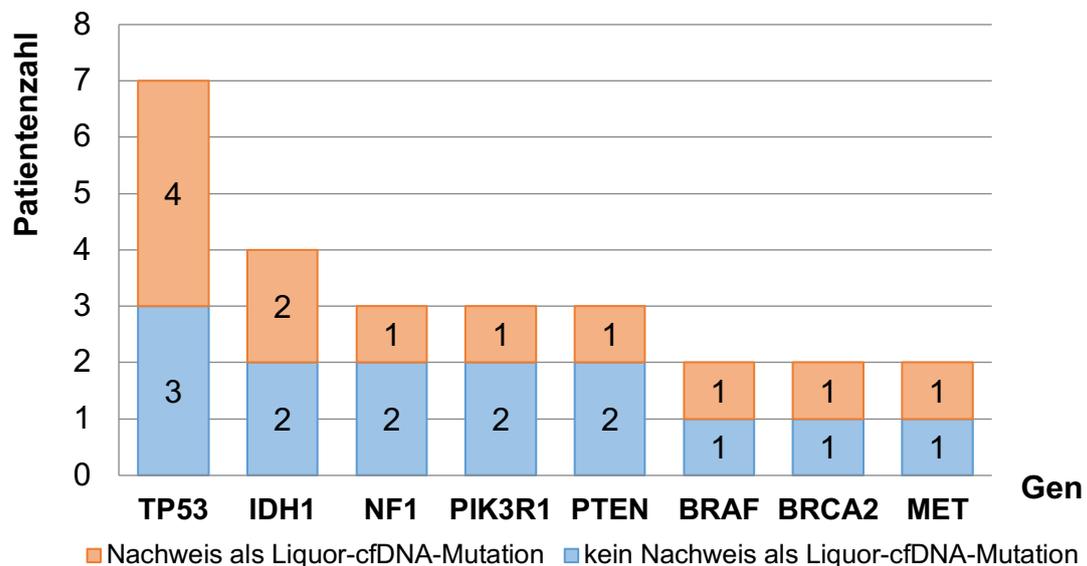


Abbildung 13: Übersicht der Gene mit der häufigsten potentiellen Nachweisbarkeit als Liquor-cfDNA-Mutation (N = 17 Patienten)

Erläuterungen: Aufgeführt ist die Patientenzahl mit Gewebe-Mutation des Gens und Untersuchung des Gens in der Liquor-cfDNA-Sequenzierung.

Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA.

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und cfDNA-Gehalt

Anhand dieser Fallserie zeigte sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe des cfDNA-Gehalts einer Liquorprobe und der Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen. In der Gruppe ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis war die cfDNA-Menge öfter höher (≥ 20 ng) als in der Gruppe mit Liquor-cfDNA-

Mutationsnachweis (6 von 15 Fällen vs. 3 von 12 Fällen, rot markiert in Tab. 10). Beispielsweise konnte eine BRAF-Mutation bei einem Patienten mit 7,7 ng cfDNA-Menge als Liquor-cfDNA-Mutation festgestellt werden (cf006), während sie bei einem Patienten mit 204,5 ng cfDNA nicht vorlag (cf028). Ebenso konnte eine IDH1-Mutation in einer Liquor-cfDNA Probe mit 10,0 ng cfDNA-Gehalt nachgewiesen werden (cf030), in einer anderen Liquor-cfDNA-Probe mit 29,3 ng cfDNA-Gehalt nicht (cf017).

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und Diagnose

Sowohl in der Gruppe ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis als auch in der Gruppe mit Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis befanden sich Liquorproben von Gliom-Patienten (WHO Grad II-IV) und von Patienten mit ZNS-Metastasierung eines soliden Primärtumors.

Mutationen der Gene TP53, NF1, PTEN, BRAF und MET, die in Gewebeproben beider Diagnosegruppen vorlagen (siehe Anhang-Tabelle X3), ergaben ein gemischtes Bild:

PTEN und MET konnten nur bei einem Gliom-Patienten im Liquor als Mutation nachgewiesen werden (cf028), nicht aber bei den Patienten mit ZNS-Metastasen (PTEN bei cf007 und cf018, MET bei cf018). Bei BRAF verhielt es sich anders herum: Bei einem Patienten mit ZNS-Metastase gelang der Liquor-Nachweis (cf006), bei einem Gliom-Patienten nicht (cf028). TP53 konnte als Liquor-cfDNA-Mutation bei zwei ZNS-Metastasen-Patienten (cf006, cf016) und 2 Gliom-Patienten nachgewiesen werden (cf020, cf023), bei 3 anderen Gliom-Patienten nicht (cf022, cf026, cf030). NF1 lag bei einem ZNS-Metastasen-Patienten in der Liquor-cfDNA als Mutation vor (cf006), bei einem anderen ZNS-Metastasen-Patienten und einem Gliom-Patienten nicht (cf018, cf026).

Bei Mutationen, die ausschließlich in den Gewebeproben von Gliom-Patienten auftraten (IDH1, PIK3R1 und BRCA2 (siehe Kapitel 3.3.2/Anhang-Tabelle X3)), gelang der Nachweis in Liquor-cfDNA bei etwa der Hälfte der Patienten (IDH1 bei cf023 und cf030, PIK3R1 bei cf023, BRCA2 bei cf011), bei der anderen Hälfte nicht (IDH1 bei cf017 und cf020, PIK3R1 bei cf020 und cf026, BRCA2 bei cf017).

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und Mutationslast des Tumorgewebes

Von den 12 Gewebemutationen mit Nachweis in der Liquor-cfDNA (orange markiert in Tabelle 10) handelte es sich in 5 Fällen um Tumorgewebe mit intermediärer Mutationslast, in 6 Fällen mit geringer Mutationslast. In einem Fall bestand keine Angabe zur Mutationslast.

Von den 15 hier betrachteten Gewebemutationen ohne Nachweis in der Liquor-cfDNA (blau markiert in Tabelle 10) lag in 9 Fällen eine intermediäre oder hohe Mutationslast im sequenzierten Tumorgewebe vor, in 5 Fällen eine geringe Mutationslast. In einem Fall bestand keine Angabe zur Mutationslast.

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und (Therapie-) Status der ZNS-Affektion

Von den 12 hier betrachteten Gewebemutationen mit Nachweis in der Liquor-cfDNA (orange markiert in Tabelle 10) lag in 8 Fällen eine Rezidiv-Diagnose der ZNS-Beteiligung vor. In allen 8 Fällen waren die Patienten bereits speziell für die ZNS-Affektion vortherapiert. Bei den 4 anderen Mutationen handelte es sich um Patienten mit Erstdiagnose der ZNS-Beteiligung (3 von 4 bei Patienten mit bereits begonnener Therapie speziell für die ZNS-Affektion, 1 von 4 bei einem therapienaiven Patienten (cf020)).

Analog dazu lag von den 15 hier betrachteten Gewebemutationen ohne Nachweis in der Liquor-cfDNA (blau markiert in Tabelle 10) in 6 Fällen eine Rezidiv-Diagnose der ZNS-Beteiligung vor (alle 6 vortherapiert), in 9 Fällen eine Erstdiagnose. Dabei handelte es sich bei 5 der Erstdiagnose-Fälle um therapienaive Patienten, bei 4 Fällen um bereits therapierte Patienten.

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und Schrankenstörung/ Angrenzung der ZNS-Affektion an die inneren Liquorräume

Alle Patienten mit Gewebe-Mutationen der 8 untersuchten Gene (mit und ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis) wiesen zum Zeitpunkt der Liquor-Entnahme eine Schrankenstörung auf.

Der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen gelang sowohl bei Patienten mit also auch ohne Angrenzung der ZNS-Affektion an die inneren Liquorräume.

Bei den Genen NF1, BRAF und TP53 wurde jeweils bei mindestens einem Patienten ohne Angrenzung eine Liquor-cfDNA-Mutation nachgewiesen (NF1 und BRAF: cf006, TP53: cf006 + cf020). In einigen anderen Fällen (z. B. TP53: cf016) war eine Liquor-cfDNA-Mutation bei Patienten mit Angrenzung festzustellen.

Gleichzeitig blieb sowohl bei Patienten mit als auch ohne Angrenzung der ZNS-Affektion an die inneren Liquorräume in einigen Fällen der Nachweis einer Liquor-cfDNA-Mutation aus: Bei den Genen IDH1, PIK3R1, PTEN und BRCA2 konnte in der Liquor-cfDNA von mindestens einem Patienten mit Angrenzung keine Mutation nachgewiesen werden (IDH1 und BRCA2: cf017, PIK3R1: cf026, PTEN: cf007), ebenso wie bei einigen Patienten ohne Angrenzung (IDH1 und PIK3R1: cf020, PTEN: cf018).

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweises bei Meningeosis neoplastica und Liquorpleozytose

Keiner der in diesem Teil betrachteten Patienten wies zum Zeitpunkt der Liquor-Entnahme eine Meningeosis neoplastica auf.

Von den 15 hier betrachteten Gewebemutationen ohne Nachweis in der Liquor-cfDNA (blau markiert in Tab. 10) lag in 4 Fällen eine Liquorpleozytose vor, von den 12 Gewebemutationen mit Nachweis in der Liquor-cfDNA (orange markiert in Tab. 10) lediglich in einem Fall (BRCA2-Keimbahnmutation bei cf011).

Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis und Allel-Frequenz der Gewebemutationen

Tumormutationen mit bzw. ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis wiesen unterschiedlich hohe Allel-Frequenzen im Gewebe auf (siehe Abb. 14): Die Hälfte der Mutationen mit Nachweis in Liquor-cfDNA kam im Tumorgewebe mit einer Allel-Frequenz >50 % vor (6 von 12 Mutationen, grüne Schrift in Tabelle 10). Bei Mutationen ohne Nachweis in Liquor-cfDNA war dies bei 20 % der Fall (3 von 15 Mutationen, grüne Schrift in Tabelle 10).

Die mediane Allel-Frequenz der Gewebe-Mutationen der analysierten Gene lag bei Patienten mit Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis bei 54,53 % (Range 7,58 %-

94,00 %), bei den Gewebe-Mutationen ohne Liquor-cfDNA-Mutations-Nachweis bei 33,99 % (Range 5,11 %-91,30 %).

Gleichzeitig konnten in Einzelfällen Mutationen mit geringer Gewebe-Allelfrequenz in Liquor-cfDNA als Mutation nachgewiesen werden (z. B. cf028: MET-Mutation mit Gewebe-Allelfrequenz 7,58 %) und solche mit hoher Gewebe-Allelfrequenz nicht (z. B. cf030: TP53-Mutation mit Gewebe-Allelfrequenz 91,30 %).

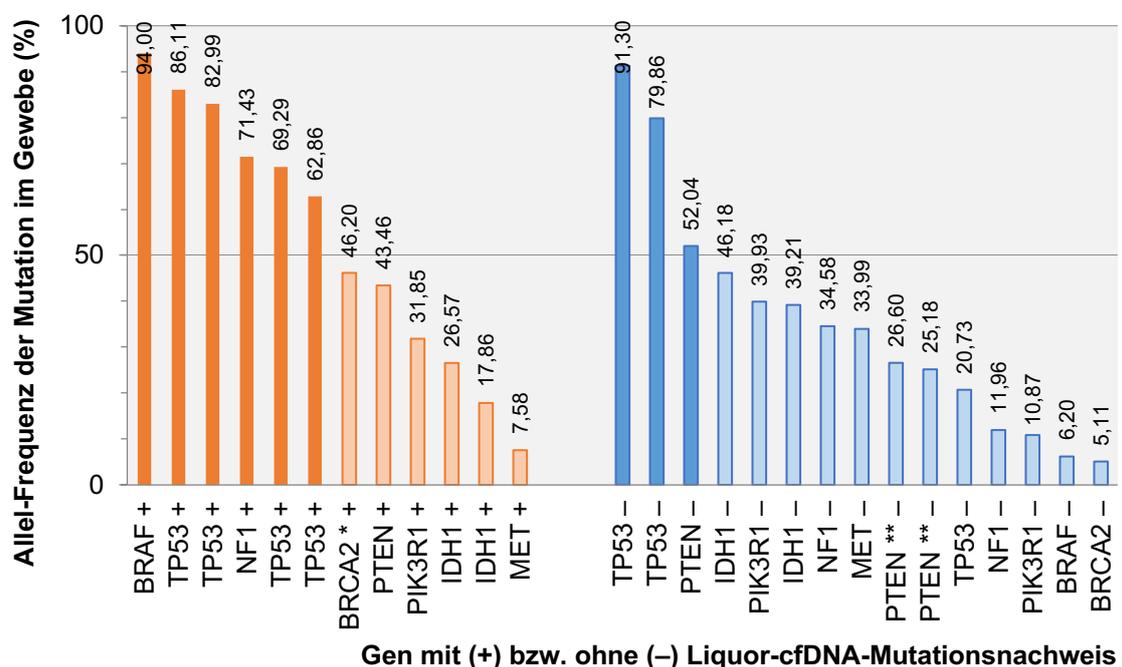


Abbildung 14: Allel-Frequenzen der Gewebemutationen¹ mit und ohne Nachweis als Liquor-cfDNA-Mutation

Erläuterungen: ¹Aufgelistet sind die am häufigsten in Liquor-cfDNA potentiell nachweisbaren Tumorgewebemutationen des untersuchten Kollektivs. * Keimbahnmutation bei cf011. Von Patient cf011 wird hier nur die Rezidiv-Gewebeprobe aufgeführt, da nur zum Zeitpunkt der Rezidiv-Diagnose eine Liquor-Entnahme erfolgte. ** zwei Mutationen in diesem Gen bei cf007.

Legende: in orange = alle Mutationen mit Nachweis in Liquor-cfDNA, in blau = alle Mutationen ohne Nachweis in Liquor-cfDNA; kräftig gefärbt = Allel-Frequenzen >50 %, blass gefärbt = Allel-Frequenzen <50 %.

Abkürzungen: cfDNA = zellfreie DNA.

Tabelle 10: Gewebemutationen* mit und ohne Nachweis in Liquor-cfDNA

Erläuterungen: * Aufgelistet sind die am häufigsten in Liquor-cfDNA potentiell nachweisbaren Tumormutationen des untersuchten Kollektivs. ** Von cf011 wird hier nur die Rezidiv-Gewebeprobe aufgeführt, da nur zum Zeitpunkt der Rezidiv-Diagnose eine Liquorentnahme erfolgte. *** Zur Berechnung wurden von cf007 beide aufgeführten Mutationen (frameshift/missense) einbezogen. ¹innere Liquorräume. Legende: + = ja/vorliegend, - = nein/nicht vorliegend, rot = cfDNA-Mengen ≥ 20 ng. grün = Gewebe-Allelfrequenz > 50 %. \uparrow = hohe Mutationslast ($\geq 23,1$ Mut/Mb), \leftrightarrow = intermediäre Mutationslast (3,3-23,1 Mut/Mb), \downarrow = geringe Mutationslast ($< 3,3$ Mut/Mb).

Abkürzungen: cfDNA = cell-free DNA, ED = Erstdiagnose, ID = Identifikationsnummer, k. A. = keine Angabe, KB = Keimbahnmutation, Med = Median, Met = Metastase, Mut = Mutation, Rez = Rezidiv/Progress, ZNS = zentrales Nervensystem.

Gen	Patienten-ID	Diagnosegruppe (Gliome (WHO-Grad) / ZNS-Metastase(n))	Status der ZNS-Beteili- gung bei Liquorentnahme	Therapinaivität bezüglich der ZNS-Beteiligung	Meningeosis neoplastica	Liquorpleozytose	Schrankenstörung	Angrenzung Liquorräume ¹	cfDNA-Menge in Liquorprobe (ng)	Allelfrequenz im Tumorgewebe (%)	Mutationslast im Tumorgewebe
1) Gewebemutationen* mit Nachweis in Liquor-cfDNA											
TP53	cf006	ZNS-Met	Rez	-	-	-	+	-	7,7	86,11	\leftrightarrow
	cf016	ZNS-Met	ED	-	-	-	+	+	20,0	62,86	\downarrow
	cf020	Gliom (IV)	ED	+	-	-	+	-	14,8	69,29	\downarrow
	cf023	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	14,9	82,99	\downarrow
IDH1	cf023	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	14,9	26,57	\downarrow
	cf030	Gliom (II)	Rez	-	-	-	+	+	10,0	17,86	k. A.
NF1	cf006	ZNS-Met	Rez	-	-	-	+	-	7,7	71,43	\leftrightarrow
PIK3R1	cf023	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	14,9	31,85	\downarrow
PTEN	cf028	Gliom (IV)	ED	-	k. A.	k. A.	+	+	204,5	43,46	\leftrightarrow
BRAF	cf006	ZNS-Met	Rez	-	-	-	+	-	7,7	94,00	\leftrightarrow
BRCA2 KB	cf011	Gliom (IV)	Rez	-	-	+	+	+	7,7	46,20**	\downarrow
MET	cf028	Gliom (IV)	ED	-	k. A.	k. A.	+	+	204,5	7,58	\leftrightarrow
Med									14,9	54,53	
2) Gewebemutationen* ohne Nachweis in Liquor-cfDNA											
TP53	cf022	Gliom (IV)	ED	+	-	-	+	+	12,9	79,86	\downarrow
	cf026	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	20,4	20,73	\leftrightarrow
	cf030	Gliom (II)	Rez	-	-	-	+	+	10,0	91,30	k. A.
IDH1	cf017	Gliom (III)	Rez	-	-	+	+	+	29,3	46,18	\downarrow
	cf020	Gliom (IV)	ED	+	-	-	+	-	14,8	39,21	\downarrow
NF1	cf018	ZNS-Met	ED	-	-	-	+	-	0,0	34,58	\uparrow
	cf026	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	20,4	11,96	\leftrightarrow
PIK3R1	cf020	Gliom (IV)	ED	+	-	-	+	-	14,8	39,93	\downarrow
	cf026	Gliom (IV)	Rez	-	-	-	+	+	20,4	10,87	\leftrightarrow
PTEN	cf007	ZNS-Met	ED	+	-	+	+	+	9,5	frameshift: 25,18	\leftrightarrow
	cf007	ZNS-Met	ED	+	-	+	+	+	9,5	missense: 26,60	\leftrightarrow
	cf018	ZNS-Met	ED	-	-	-	+	-	0,0	52,04	\uparrow
BRAF	cf028	Gliom (IV)	ED	-	k. A.	k. A.	+	+	204,5	6,20	\leftrightarrow
BRCA2	cf017	Gliom (III)	Rez	-	-	+	+	+	29,3	5,11	\downarrow
MET	cf018	ZNS-Met	ED	-	-	-	+	-	0,0	33,99	\uparrow
Med***									14,8	33,99	

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Krebs im ZNS hat noch immer eine infauste Prognose (Robert Koch-Institut 2019, Noone 2018). Zur genauen Diagnose und bestmöglichen individuellen Therapie bedarf es der Kenntnis von molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors/ der Metastase (Schwarzenbach et al. 2011, Tan und Lynch 2013, Olar und Aldape 2014). Die Durchführung einer Gewebebiopsie des ZNS ist jedoch teilweise mit erheblichen Risiken verbunden (McGirt et al. 2005, Shankar et al. 2017). Die „liquid biopsy“, d.h. die Analyse von Tumor-Nukleinsäuren aus Körperflüssigkeiten, bietet in diesem Kontext eine weniger invasive Alternative. Ein mögliches Medium der liquid biopsy ist die zellfreie DNA (cfDNA). Sie stammt von schnell proliferierenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen (Stroun et al. 2000). Bei Krebspatienten entspricht die circulating tumor DNA (ctDNA) dem Teil der cfDNA, der aus Tumorzellen hervorgeht (Nevel et al. 2018).

In dieser Studie wurde cfDNA aus Liquor bei Patienten mit verschiedenen ZNS-Neoplasien quantifiziert, sequenziert und mit den Ergebnissen der Gewebesequenzierung verglichen.

Über 90 % der gemessenen Liquorproben enthielten cfDNA, bei 9 von 17 Patienten (52,9 %) konnten Mutationen des Tumorgewebes in der Liquor-cfDNA nachgewiesen werden.

Anhand der Patienten dieser Fallserie wurden einige bedeutsame klinische Merkmale mit Blick auf den cfDNA-Gehalt im Liquor und die Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen untersucht.

Der cfDNA-Gehalt der Liquorproben lag im Median bei 12,9 ng (N = 25, Range 0,0 ng – 532,0 ng / N = 17, Range 0,0 ng – 207,5 ng) und unterschied sich nicht wesentlich zwischen primären (hirneigenen) Tumoren und ZNS-Metastasen/ ZNS-Lymphom (N = 12, Median 13,85 ng vs. N = 13, Median 12,7 ng). Eine deutlich höhere cfDNA-Menge wiesen Patienten mit Meningeosis neoplastica auf (N = 3, Median 207,5 ng). Der cfDNA-Gehalt war bei höhergradigen hirneigenen Tumoren etwas höher als bei niedriggradigen (N = 10, Median 14,85 ng vs. N =

2, Median 9,55 ng) und insgesamt bei Rezidiv-Patienten etwas höher als bei Patienten mit Erstdiagnose ihrer ZNS-Beteiligung (N = 11, Median 14,9 ng vs. N = 14, Median 12,8 ng). Patienten, die bereits eine Therapie speziell für die ZNS-Beteiligung erhalten hatten (alle Rezidiv-Patienten sowie drei Erstdiagnose-Patienten), wiesen eine höhere cfDNA-Menge auf als therapienaive Patienten (N = 14, Median 17,15 ng vs. N = 11, Median 12,7 ng). Ebenfalls erhöht war die cfDNA-Menge bei Tumoren und Metastasen mit direkter Angrenzung an die inneren Liquorräume (N = 17, Median 16,8 ng vs. N = 8, Median 8,4 ng) sowie bei Vorliegen einer Liquorpleozytose (N = 8, Median 18,1 ng vs. N = 13, Median 10,0 ng).

Bei 9 von 17 (52,9 %) untersuchten Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung konnten Punktmutationen (SNVs) des sequenzierten Tumorgewebes in der Liquor-cfDNA nachgewiesen werden. Darunter befanden sich 54,5 % der Patienten mit primärem Hirntumor (6/11, niedrig- und hochgradige Tumore) und 50 % der Patienten mit ZNS-Metastasen eines soliden Tumors (3/6, darunter ein Patient mit Meningeosis carcinomatosa). Der mediane cfDNA-Gehalt dieser 9/17 Patienten lag mit 14,9 ng (Range 7,7 – 207,5 ng) etwas höher als bei den 8/17 Patienten ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis (Median 10 ng, Range 0,0 – 20,4 ng). Der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen gelang bei einem kleineren Anteil der erstdiagnostizierten Patienten (33,3 %) bzw. der therapienaiven Patienten (16,7 %) und bei einem größeren Anteil der Rezidive (75 %) bzw. ZNS-spezifisch vortheraipierten Patienten (72,7 %). Es konnten etwa gleich häufig Liquor-cfDNA-Mutationen festgestellt werden bei Patienten mit an die inneren Liquorräume angrenzender bzw. nicht angrenzender ZNS-Beteiligung (7 von 13 (53,8 %), 2 von 4 (50 %)) sowie bei Patienten mit bzw. ohne Liquorpleozytose (2 von 4 (50 %), 5 von 11 (45,5 %)). Bei Tumoren/Metastasen mit intermediärer oder hoher Gewebe-Mutationslast gelang der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen nicht öfter als bei solchen mit geringer Gewebe-Mutationslast (2 von 5 (40 %) vs. 6 von 11 (54,5 %)).

Diese Tendenzen spiegelten sich ebenfalls im letzten Teil bei der Analyse der 8 Gene mit der häufigsten potentiellen Nachweisbarkeit als Liquor-cfDNA-Mutation

wider (TP53, IDH1, NF1, PIK3R1, PTEN, BRAF, BRCA2 und MET). Zusätzlich fiel dabei auf, dass die Tumormutationen mit positivem Liquor-cfDNA-Nachweis öfter eine Novel Allelfrequenz (NAF) >50 % im Gewebe aufwiesen als die ohne Liquor-cfDNA-Nachweis (6 von 12 vs. 3 von 15).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die bisher durchgeführten Studien zu „liquid biopsy“ aus Liquor-cfDNA bei Patienten mit ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung unterscheiden sich oft in ihren Methoden und gehen daher mit Ergebnisdifferenzen hinsichtlich des durchschnittlichen cfDNA-Gehalts, des ctDNA-Anteils der cfDNA und der Nachweisbarkeit von Tumormutationen darin einher (Bertero et al. 2019). Der Anteil an Patienten mit Mutationsnachweis in der Liquor-cfDNA schwankt zwischen 0 % bzw. 33 % (0/3 bzw. 1/3) (Connolly et al. 2017), 49 % (42/85) (Miller et al. 2019), 55 % (6/11) (Momtaz et al. 2016), 59 % (26/44) (Pentsova et al. 2016), 74 % (26/35) (Wang et al. 2015), 74 % (20/27) (von Baumgarten et al. 2020), 83 % (47/57) (Pan et al. 2019a), 86 % (6/7) (Pan et al. 2015), 100 % (12/12) (De Mattos-Arruda et al. 2015) und 100 % (26/26) (Li et al. 2018), sodass sich unsere Ergebnisse (52,9 % (9/17) Patienten mit Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis) etwa im unteren Mittelfeld einordnen lassen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse hinsichtlich einiger klinischer Aspekte diskutiert und in die aktuelle Literatur eingeordnet.

4.2.1 Diskussion der in dieser Studie untersuchten klinischen Aspekte als potentielle Einflussfaktoren der Liquor-cfDNA

Diagnoseentität: primärer Hirntumor vs. ZNS-Metastasen solider Tumore

Die Anteile an Patienten mit Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis lagen bei uns bei primären Hirntumoren (6/11, 54,5 %) vergleichbar hoch wie bei Patienten mit ZNS-Metastasen eines soliden Tumors (3/6, 50 %, vgl. Abschnitt 3.4).

Ähnliche Anteile fanden sich bei Pentsova et al. (2016), die bei 50 % (6/12) der Patienten mit primären Hirntumoren und bei 63 % (20/32) der Patienten mit ZNS-Metastasen Mutationen in der Liquor-cfDNA nachweisen konnten. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen von zellfreier Tumor-DNA

im Liquor zu Alter, Geschlecht, Histologie des Primärtumors, Präsenz peripherer Metastasen, Vortherapie und Tumorlokalisierung im ZNS.

Einer aktuellen Studie von von Baumgarten et al. (2020) gelang der Liquor-Mutationsnachweis in cfDNA/ cfRNA bei insgesamt 74 % (20/27) der Patienten mit primären und sekundären ZNS-Tumoren, davon jedoch bei keinem der zwei eingeschlossenen Gliom-Patienten (Glioblastom WHO Grad IV).

Im Gegensatz dazu konnten De Mattos-Arruda et al. (2015) bei 100 % der Patienten mit primärem Hirntumor (N = 4) bzw. ZNS-Metastasen bei Lungen- oder Brustkrebs (N = 8) Tumormutationen in der Liquor-cfDNA messen, wobei die Anzahl der pro Liquorprobe festgestellten Mutationen bei den ZNS-Metastasen höher war als bei den primären Hirntumoren. Im Unterschied zu unserer Studie wurde die Hälfte der Liquorproben erst bei Autopsien kurz nach Todeseintritt gewonnen. Eine mögliche Hypothese ist, dass die Liquor-Entnahme bei weit fortgeschrittener Krankheit einen Einfluss auf die Menge an zellfreier Tumor-DNA im Liquor hat, sodass der Nachweis von Mutationen in der Liquor-cfDNA wahrscheinlicher ist.

Bei primären Hirntumoren: WHO Tumorgrad als Einflussfaktor

In einigen Studien ergaben sich Hinweise darauf, dass innerhalb der primären Hirntumore bei solchen mit höherem WHO Grad öfter Liquor-cfDNA-Mutationen vorliegen als bei niedriggradigen: Beispielsweise konnten Martinez-Ricarte et al. (2018) bei 85 % (17 von 20) der Patienten mit diffusen Gliomen Tumormutationen in Liquor-ctDNA feststellen, davon bei 100 % (15 von 15) der hochgradigen Gliome und nur bei 40 % (2 von 5) der niedriggradigen Gliome. Alle Patienten ohne Liquor-ctDNA-Mutationen (N = 3) hatten WHO Grad II Tumore.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Wang et al. (2015): Bei Tumoren des WHO-Grads III und IV (N = 19) lag statistisch signifikant öfter ctDNA im Liquor vor als bei Tumoren des WHO Grads I und II (N = 15) (95 % vs. 47 %). Da cfDNA zum Teil aus nekrotischen Zellen stammt (Schwarzenbach et al. 2011) und hochgradige primäre Hirntumore sich durch eine hohe Mitoserate, Gefäßendothelproliferation und Nekrosen auszeichnen (Ferris et al. 2017, Wesseling und Capper 2018, Ostrom et al. 2014), könnte dies eine mögliche

Erklärung für einen höheren ctDNA-Gehalt im Liquor hochgradiger Tumore darstellen.

Gegensätzliche Beobachtungen machten jedoch Miller et al. (2019), die bei 49,4 % von 85 vortherapierten Gliom-Patienten (WHO Grad II-IV) Tumormutationen in der Liquor-cfDNA nachwiesen und dabei keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von ctDNA im Liquor und dem Gliom-Grad feststellten.

Auch in unserem Kollektiv waren bei etwa dem gleichen Anteil an Patienten mit hoch- bzw. niedriggradigem primärem Hirntumor Liquor-cfDNA-Mutationen messbar (55,6 % (5/9) der hochgradigen Tumore vs. 50 % (1/2) der niedriggradigen Tumoren, vgl. Abschnitt 3.4). Leider liegt aufgrund der geringen Anzahl von N = 2 Patienten mit niedriggradigem primärem Hirntumor eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des WHO-Grads als Einflussfaktor auf die Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen vor.

(Therapie-)Status der ZNS-Beteiligung bei Liquorentnahme:

Erstdiagnose/Therapienaivität vs. Rezidiv-Diagnose/Z. n. Therapie(-beginn)

Liquorproben von Rezidiv-Patienten enthielten in unserer Studie im Median nur eine minimal höhere cfDNA-Menge als Proben von Patienten mit Erstdiagnose ihrer ZNS-Beteiligung (N = 11, Median 14,9 ng vs. N = 14, Median 12,8 ng, vgl. Abschnitt 3.2.1). Der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen gelang jedoch bei Rezidiven häufiger als bei erstdiagnostizierten Patienten (75 % (6/8) vs. 33,3 % (3/9), vgl. Abschnitte 3.4 und 3.5.2).

Unter Berücksichtigung des Therapiestatus fiel der Unterschied noch stärker aus: Patienten, die bereits eine Therapie speziell für die ZNS-Beteiligung ihrer Tumorerkrankung erhalten hatten (alle Rezidiv-Patienten sowie einige Erstdiagnose-Patienten), wiesen höhere cfDNA-Mengen (N = 14, Median 17,15 ng vs. N = 11 Median 12,7 ng, vgl. Abschnitt 3.2.1) und deutlich öfter Liquor-cfDNA-Mutationen auf als therapienaive Patienten (72,7 % (8/11) vs. 16,7 % (1/6), vgl. Abschnitte 3.4 und 3.5.2).

Weder bei Pentsova et al. (2016) (N = 32 Patienten mit ZNS-Metastasen, N = 12 primäre Hirntumore) noch bei Miller et al. (2019) (N = 85 Gliome) bestand eine

signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen von ctDNA im Liquor und der Vortherapie der Patienten. Im Unterschied zu unserem Kollektiv waren in der Studie von Miller et al. (2019) allerdings alle Patienten vortherapiert (OP ± Bestrahlung ± Systemtherapie).

Eine Veränderung der ctDNA-Verhältnisse im Liquor durch Progression und Therapie scheint vor allem deshalb wahrscheinlich, weil sich ein Tumor in seiner molekularen Struktur zwischen Erstdiagnose- und Rezidiv-Stadium nachweislich verändert: Bei sequentiellen Tumorbiopsien von niedrig- und hochgradigen Gliomen teilten Erstdiagnose und Rezidiv desselben Tumors im Mittel nur 11 %-54 % gemeinsame Mutationen (Aihara et al. 2017, Johnson et al. 2014, Kim et al. 2015b, Wang et al. 2016).

Tumorspezifische Therapien beeinflussen diese Veränderungen maßgeblich mit: Sie führen das Absterben von Tumorzellen, die für die jeweilige Therapie sensibel sind, herbei und selektieren so „resistente“ Zellpopulationen (Nowell 1976). Ein Beispiel ist die Temozolomid-Therapie, die zum standardmäßigen Therapieregime bei Glioblastomen zählt (Choi et al. 2018, Stupp et al. 2009): In einigen Temozolomid-therapierten Glioblastomen konnten Mutationen in Genen des DNA-Mismatch-Reparatursystems festgestellt werden (Yip et al. 2009, Cahill et al. 2007), die mit einer Hypermutation des Tumors und der Resistenz gegenüber dem Wirkmechanismus von Temozolomid einhergingen (Wang et al. 2016, Hunter et al. 2006, Fink et al. 1998). Diese Mutationen bestanden nicht bei unbehandelten Glioblastomen, sondern ausschließlich nach Temozolomid-Therapie.

Analog zu den molekularen Veränderungen der Tumore wäre es hinsichtlich der cfDNA-Verhältnisse im Liquor denkbar, dass die cfDNA-Gesamtmenge und/ oder der Anteil der ctDNA daran im Verlauf von Erstdiagnose/Therapienaivität bis hin zum vortherapierten Rezidiv steigen. Beispielsweise konnte bei Patienten mit fortgeschrittenem Stadium eines kolorektalen Karzinoms ein höherer Anteil der Tumor-DNA an der Gesamt-cfDNA im Blut nachgewiesen werden als in früheren Stadien, was Diehl et al. (2005) auf eine größere Anzahl nekrotischer

Tumorzellen zurückführte. Übertragen auf das ZNS wäre es daher als wahrscheinlich anzusehen, dass auch bei ZNS-Tumoren durch bereits stattgefundene Therapie und aggressiveres Wachstum eines therapierefraktären Tumors die Anzahl zerfallender Tumorzellen steigt, die ihre Tumor-DNA in den Liquor absondern. Dies könnte eine höhere Nachweisrate an Liquor-cfDNA-Mutationen bei vortherapierten gegenüber therapienaiven Patienten erklären.

Meningeosis neoplastica

Bei Patienten mit Meningeosis neoplastica erbrachte die Sequenzierung von Liquor-cfDNA in einigen Studien vielversprechende Ergebnisse (Boire et al. 2019). Zum einen lag bei Patienten mit Meningeosis neoplastica bei ZNS-Metastasen eines soliden Tumors eine höhere cfDNA-Menge im Liquor vor (Pentsova et al. 2016). Zum anderen gelang auch der Mutationsnachweis in Liquor-cfDNA öfter, und zwar bei 75 % (3/4 bei Pentsova et al. (2016)) - 100 % der Meningeosis-Patienten (26/26 bei Li et al. (2018), 3/3 bei Momtaz et al. (2016)).

Wenn auch mit kleiner Fallzahl, so stimmen unsere Ergebnisse mit diesen Beobachtungen überein: Auch bei uns wiesen Patienten mit Meningeosis neoplastica eine deutlich höhere cfDNA-Menge auf (N = 3, Median 207,5 ng, vgl. Abschnitt 3.2.1) und in der bei einem Meningeosis-Patienten durchgeführten Liquor-cfDNA-Sequenzierung waren alle Mutationen des Tumorgewebes nachweisbar (vgl. Abschnitt 3.4).

Liquorpleozytose und Keimbahnmutationen

Unter den Patienten ohne Meningeosis neoplastica lag bei solchen mit Liquorpleozytose im Median mehr cfDNA vor als bei solchen ohne Liquorpleozytose (N = 8, Median 18,1 ng vs. N = 13, Median 10,0 ng, vgl. Abschnitt 3.2.1).

Nicht-maligne Zellen im Liquor spielen eine Rolle beim Nachweis von Keimbahnmutation in der Liquor-cfDNA, da die betreffenden cfDNA-Fragmente anstatt von einer Tumorzelle auch von einem Leukozyten oder einer anderen „Nicht-Tumor-Zelle“ im Liquor stammen können (Arnemann 2019).

Hinsichtlich der zirkulierenden Tumor-DNA beobachteten Pentsova et al. (2016), dass in einem Medium mit vielen nicht-malignen Zellen (wie z. B. Blut) eher eine große Menge an Nicht-Tumor-cfDNA vorlag und die zirkulierende Tumor-DNA nur einen geringen Anteil der Gesamt-cfDNA ausmachte. Dieser Annahme zufolge wäre die Menge an Tumor-DNA bei einer Liquorpleozytose nicht wesentlich erhöht.

Theoretisch könnte eine Liquorpleozytose dann mit einer höheren Menge an circulating tumor DNA einhergehen, wenn davon auszugehen wäre, dass die nicht-malignen Zellen im Liquor durch Abbau nekrotischer/apoptotischer Tumorzellen relevante Mengen an Tumor-DNA in den Liquor freisetzen. Pisetsky und Fairhurst (2007) demonstrierten, dass beispielsweise Makrophagen am Freisetzungsprozess von extrazellulärer DNA aus nekrotischen und apoptotischen Zellen ins Blut beteiligt sein können.

In unserer Studie wurden in der Liquor-cfDNA bei Patienten mit (2 von 4 (50 %)) und ohne Pleozytose (5 von 11 (45,5 %)) etwa gleich häufig Mutationen festgestellt (vgl. Abschnitt 3.4). Bei den zwei Patienten mit Liquorpleozytose und Mutationsnachweis war allerdings lediglich eine Keimbahnmutation in der Liquor-cfDNA nachweisbar, sodass nicht zwangsläufig ein Tumor-DNA-Anteil an der Liquor-cfDNA vorgelegen haben muss.

Schrankenstörung und Angrenzung an innere Liquorräume

Eine Schrankenstörung im Sinne einer Kontrastmittelaufnahme in der Bildgebung lag insgesamt bei 94 % (16/17) der Patienten vor, wovon etwa bei der Hälfte (56,2 %, 9/16) Mutationen in der Liquor-cfDNA nachweisbar waren (vgl. Abschnitt 3.4). Bei einem Patienten ohne Schrankenstörung konnten keine Liquor-cfDNA-Mutationen festgestellt werden (5,9 %, 1/17). Aufgrund der ungleichen Verteilung von Patienten mit und ohne Kontrastmittel-aufnehmenden ZNS-Tumor ist die Beurteilung der Schrankenstörung als Einflussfaktor auf die Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen anhand unseres Kollektivs nicht sinnvoll.

Allerdings konnten Wang et al. (2015) in ihrer Studie bei 35 Patienten mit primären Hirntumoren (WHO Grad I-IV) keinen signifikanten Zusammenhang

zwischen einer Kontrastmittelanreicherung in der Bildgebung und dem Vorliegen von Tumor-DNA im Liquor feststellen. Anders verhielt es sich hinsichtlich der Lokalisation des Tumors: Bei 0 von 5 Patienten mit Tumor ohne Angrenzung an die Liquorräume konnte ctDNA im Liquor nachgewiesen werden, wohl aber bei 86 % der Patienten mit angrenzendem Tumor (24/28). Als Liquorräume galten dabei die Hirnventrikel, die Zisternen und die Oberflächen des Kortex.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Miller et al. (2019), in deren Studie mit 85 Gliom-Patienten (WHO Grad II-IV) signifikant häufiger Liquor-ctDNA vorlag, wenn ein Tumor an das Ventrikelsystem bzw. den Subarachnoidalraum angeschlossen war.

Entgegen dieser Beobachtung konnten Connolly et al. (2017) nur bei einem von drei Patienten mit spinalem Ependyom WHO Grad II eine geringe Menge ctDNA messen (und dies auch nur in 1 von 5 Liquorproben des Patienten). Da das spinale Ependyom den Spinalkanal auskleidet und dem Liquorsystem somit besonders nah ist, wäre eine hohe Menge an ctDNA im Liquor denkbar gewesen. Andererseits können durch das raumfordernde Ependyom Engstellen im Spinalkanal entstehen, die die Liquorzirkulation behindern und dadurch niedrige ctDNA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze bedingen (Connolly et al. 2017).

In unserer Studie wurden etwa gleich häufig Liquor-ctDNA-Mutationen festgestellt bei Patienten mit an die inneren Liquorräume angrenzender bzw. nicht angrenzender ZNS-Beteiligung (7 von 13 (53,8 %), 2 von 4 (50 %), vgl. Abschnitte 3.4 und 3.5.2).

Einige Studien der letzten Jahre unterstützen die Annahme, dass auch tieferliegendes Hirnparenchym (bzw. dort lokalisierte Tumore und Metastasen) ohne direkten Oberflächenkontakt zu größeren Liquorräumen einen Austausch von gelösten Substanzen und ggf. Zellen mit dem Liquorsystem betreiben kann, z. B. über die Virchow-Robin-Räume (Brinker et al. 2014). Diese mit interstitieller Flüssigkeit gefüllten Räume umgeben intrazerebrale Blutgefäße an ihrem Übergang vom Subarachnoidalraum in das Hirnparenchym. Sie enthalten Makrophagen, reichen weit in das Parenchym hinein und enden erst im Bereich

der Kapillaren (Zhang et al. 1990, Brinker et al. 2014). Es wäre daher durchaus möglich, dass auch cfDNA aus tiefer liegendem Hirngewebe über die interstitielle Flüssigkeit der Virchow-Robin-Räume in den Liquor gelangen könnte. Diese Hypothese bedarf allerdings weiterer Abklärung, nicht zuletzt, da aktuell unterschiedliche Auffassungen und Studienergebnisse zur Uni- bzw. Bidirektionalität des Austausches zwischen dem Subarachnoidalraum und den Virchow-Robin-Räumen bestehen (Brinker et al. 2014, Iliff et al. 2012).

Novel Allelfrequenzen (NAF)

Bei der Analyse der 8 Gene mit der häufigsten potentiellen Nachweisbarkeit als Liquor-cfDNA-Mutation fiel auf, dass die Tumormutationen mit positivem Liquor-cfDNA-Nachweis öfter eine Novel Allelfrequenz (NAF) >50 % im Gewebe aufwiesen als die ohne Liquor-cfDNA-Nachweis (6 von 12 vs. 3 von 15, vgl. Abschnitt 3.5.2).

Gleichzeitig war es eine unerwartete Beobachtung unserer Studie, dass teilweise bei demselben Patienten eine Gewebe-Mutation mit geringerer NAF in der Liquor-cfDNA als Mutation nachgewiesen wurde, während zugleich eine andere Gewebe-Mutation mit höherer NAF nicht als Liquor-cfDNA-Mutation vorlag (vgl. Abschnitt 3.5.2).

Die Rolle der NAF von Tumormutationen hinsichtlich der „liquid biopsy“ ist zurzeit nicht vollständig geklärt: Im Kontext der Tumorsequenzierung bezeichnet die NAF den Anteil der Reads einer Sequenz, der die jeweilige Mutation aufweist. Eine NAF von 50 % bzw. 100 % wird beispielsweise mit einer heterozygoten bzw. homozygoten (Keimbahn-)Mutation in Verbindung gebracht (Wang et al. 2018). Jedoch ist die NAF nicht generell mit der Frequenz der Mutation im Tumorgewebe gleichzusetzen, sondern wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst (z. B. Tumorgehalt der untersuchten Probe, Kopienzahlveränderungen (CNVs), Coverage) (<https://www.cegat.de/en/diagnostics/tumor-diagnostics/> [Zugriff 19.04.2020], Ma et al. 2018). Über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der NAF im Tumorgewebe und der

Interpretation einer Tumormutation als klonal oder subklonal existieren unterschiedliche Meinungen (Caravagna et al. 2019, Bozic et al. 2019).

Aktuell bestehen jedoch Hinweise darauf, dass die NAF eventuell mehr Beachtung verdient: Sallman et al. (2016) untersuchten in einem Patientenkollektiv mit Myelodysplastischem Syndrom in Blutproben u.a. die NAF von TP53-Mutationen und fanden einen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten. In einer Studie mit 28 Kindern mit diffusem intrinsischem Pongliom beobachteten Panditharatna et al. (2018), dass eine für diese Tumore charakteristische Mutation in der Liquor-cfDNA von Patienten in späteren Stadien der Erkrankung eine höhere NAF aufwies. Andere Studien stellten ein Zusammenhang zwischen den NAF von Liquor-ctDNA-Mutationen und der ZNS-Tumorlast bzw. dem Therapieansprechen fest (De Mattos-Arruda et al. 2015, Li et al. 2018).

Ob die NAF einer Gewebemutation für deren Nachweisbarkeit in der Liquor-cfDNA mitverantwortlich sein könnte, ist aktuell nicht klar. Weitere Studien sind nötig, um die Rolle der NAF von Tumormutationen hinsichtlich der „liquid biopsy“ in Liquor einordnen zu können.

4.2.2 Diskussion weiterer potentieller Einflussfaktoren der Liquor-cfDNA

Einige weitere Faktoren beeinflussen (potentiell) die Menge an cfDNA. Dabei ist jedoch zu beachten, dass derzeit die meisten Studien zu cfDNA lediglich auf Blutproben basieren. Weitere Studien sind nötig, um zu eruieren, ob die Ergebnisse auch für cfDNA im Liquor gelten.

Physiologische und nicht-tumorspezifische pathologische Prozesse

Neben Krebserkrankungen konnte auch für viele weitere nicht-tumorspezifische Prozesse ein Einfluss auf die Menge der cfDNA beobachtet werden. Darunter befinden sich andere pathologische Zustände wie Trauma (Lo et al. 2000), Myokardinfarkt (Chang et al. 2003), Schlaganfall (O'Connell et al. 2017), fokale Epilepsie (Liimatainen et al. 2013) und Entzündungszustände wie bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Avriel et al. 2016). Ebenso lag auch bei physiologischen Prozessen wie z. B. nach höhergradiger

körperlicher Aktivität und temporären psychosozialen Stresssituationen (Hummel et al. 2018) oder in höherem Alter (Jylhävä 2013) eine erhöhte cfDNA-Menge vor.

All diese Beobachtungen wurden mithilfe von Blutproben gewonnen, eine Übertragbarkeit auf das Liquorsystem ist daher fraglich. Da Traumata, entzündliche und degenerative Prozesse des ZNS die Höhe von anderen Liquor-Biomarkern wie z. B. Proteinen (Molinuevo et al. 2018, Agoston et al. 2017, Romme Christensen et al. 2012) oder mitochondrialer DNA (mtDNA) (Pyle et al. 2015, Peng et al. 2019) verändern, scheint auch eine Beeinflussung des Liquor-cfDNA-Gehalts durch nicht-tumorspezifische pathologische und physiologische Prozesse wahrscheinlich. Am Tiermodell konnten Manueldas et al. (2018) beispielsweise erhöhte cfDNA-Mengen im Liquor nach einer Asphyxie-Episode messen, die jedoch statistisch nicht-signifikant blieben (N = 12, Mittelwert 98 ng/ml vs. N = 5, Mittelwert 89 ng/ml).

Analog zu den Beobachtungen bei Plasma-cfDNA sind weitere Studien zu Liquor-cfDNA nötig, um herauszufinden, inwieweit oben genannte nicht-tumorspezifische Prozesse den cfDNA-Gehalt im Liquor beeinflussen und ggf. als Störfaktoren der Liquor-basierten „liquid biopsy“ fungieren.

Steroidbehandlung

Da viele Patienten mit ZNS-Tumoren standardmäßig Kortikosteroide (u.a. perioperativ) zur anti-ödematösen Therapie erhalten (Alan et al. 2015, Kaal und Vecht 2004), ist deren potentieller Einfluss auf den cfDNA-Gehalt hinsichtlich einer „liquid biopsy“ von großer Relevanz.

In unserer Studie hatten 12 von 30 Patienten innerhalb von 4 Wochen vor Liquorentnahme eine Steroidtherapie mit Dexamethason, Methylprednisolon und/oder Hydrocortison erhalten, 10 davon einschließlich am Entnahmetag (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Eine Beeinflussung der gemessenen cfDNA-Mengen in den Liquorproben dieser Probanden ist nicht auszuschließen: In einem Maus-Experiment senkte eine Glucocorticoid-Behandlung die Freisetzung von DNA aus apoptotischen und nekrotischen Zellen (Jiang und Pisetsky 2004). Pisetsky und Fairhurst (2007) führten dies auf die Hemmung der Phagozytosefunktion von Makrophagen

zurück, welche am Freisetzungsprozess von extrazellulärer DNA aus nekrotischen und apoptotischen Zellen beteiligt sein können. Da besagte Experimente stets lediglich mit Blutproben durchgeführt wurden, sind weitere Studien nötig, um auch den Glucocorticoid-Einfluss auf cfDNA im Liquor beurteilen zu können (Fontanilles et al. 2018).

Bluttransfusionen und allogene Transplantationen

Keinem Patienten unseres Kollektivs wurde vor der Liquorentnahme ein allogenes Transplantat eingesetzt. 5 Patienten (davon 2 mit Mutationen in der Liquor-cfDNA) hatten laut Eigenauskunft im Zeitraum vor der Liquor-Entnahme mindestens einmal Blutprodukte erhalten (vgl. Abschnitt 3.1.2).

Dass Bluttransfusionen und Transplantationen dazu führen können, dass allogene DNA im Blut eines Patienten auftritt, ist in der Literatur beschrieben (Waldvogel Abramowski et al. 2018, Beck et al. 2015). Bisher existieren keine Publikationen, die einen solchen Zusammenhang im Liquor untersucht haben, eine Auswirkung auf molekulargenetische cfDNA-Analysen wäre jedoch theoretisch denkbar.

Liquor-Entnahmeort

In unserem Patientenkollektiv erfolgte die Liquor-Entnahme fast ausschließlich per Lumbalpunktion (vgl. Tabelle 2 am Ende des Kapitels 3.1.2), sodass die cfDNA bezüglich des Entnahmeorts nicht weitergehend analysiert wurde. Allerdings existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass der Entnahmeort des Liquors die Parameter von cfDNA/ ctDNA beeinflussen kann: Beispielsweise konnten Panditharatna et al. (2018) in ihrer Studie mit 28 Kindern mit diffusem intrinsischem Ponsgliom eine höhere Novel Allelfrequenz (NAF) der Liquor-cfDNA-Mutation messen, wenn der Liquor nahe der Tumorkalisation abgenommen wurde. Als tumornah galten dabei der 4. Hirnventrikel und der Subduralraum nahe dem Hirnstamm, als tumorfern galten die Liquorräume der Hals- und Lendenwirbelsäule sowie die Seitenventrikel (inklusive ventrikuloperitonealem Shunt). Bei ca. 75 % der Patienten erfolgte die Liquorentnahme

allerdings erst post mortem, sodass nicht klar ist, ob diese Beobachtung auch für lebende Patienten zutrifft.

4.3 Limitationen der Arbeit

Verschiedene Aspekte schränken die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Studie ein. Dazu gehören die geringe Fallzahl in Verbindung mit der Heterogenität des Patientenkollektivs sowie einige weitere methodische Inhomogenitäten, die im Folgenden aufgeführt sind.

Geringe Fallzahl und Heterogenität des Patientenkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste lediglich eine geringe Anzahl an Patienten bei ausgeprägter interindividueller Heterogenität (z. B. bezüglich konkreter Diagnose, Status der ZNS-Beteiligung (Erstdiagnose vs. Rezidiv), Vortherapien). Dies ist ein häufiges Problem in Studien zu Liquor-Biomarkern für ZNS-Tumore (Mattox et al. 2019) und in unserem Fall u. a. einer besonderen Tatsache geschuldet: Aufgrund der Doppelfunktion des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) als regionalem Kreiskrankenhaus und überregionalem Fachzentrum (siehe <https://www.medizin.uni-tuebingen.de/de/das-klinikum/daten-und-fakten> [Zugriff 23.02.2020]) werden durch die interdisziplinäre Sektion Neuroonkologie sehr unterschiedliche Patientengruppen betreut. Einige Patienten wurden vorher bereits in zahlreichen anderen Krankenhäusern vorbehandelt und überwiesen, bei anderen erfolgte am UKT die initiale Vorstellung und Diagnose. Durch diese Heterogenität bei geringer Fallzahl ergab sich eine eingeschränkte interindividuelle Vergleichbarkeit, sodass inferenzstatistische Analysen nicht sinnvoll durchführbar waren.

Unterschiede in der Erhebung der Gewebe- und Liquorproben

Es wurden ausschließlich routinemäßig entnommene Gewebe- und Liquorproben analysiert, die sich in ihrem Entnahmezeitpunkt und -modus teilweise unterschieden.

Im Fall der Gewebeproben konnte bei 3 Patienten mit ZNS-Metastasierung eines soliden Tumors kein ZNS-Gewebe sequenziert werden, da weder vor noch

während des Erhebungszeitraums eine Biopsie oder Resektion der ZNS-Metastase durchgeführt wurde. Das von ihnen sequenzierte Gewebe stammte daher von dem Extra-ZNS-Primärtumor oder einer Extra-ZNS-Metastase. Da ZNS- und Extra-ZNS-Tumorgewebe von demselben Patienten zum Teil unterschiedliche Genmutationen aufweisen können (Brastianos et al. 2015, De Mattos-Arruda et al. 2015), besteht die Möglichkeit, dass bei diesen 3 Patienten ZNS-spezifische Mutationen in Gewebe und Liquor-cfDNA nicht gemessen wurden. Analog dazu lag bei manchen Patienten, deren Liquor zum Zeitpunkt eines Rezidivs abgenommen wurde, lediglich eine Gewebeprobe vom Zeitpunkt der Erstdiagnose vor. Aufgrund der molekulargenetischen Veränderung des Tumors über die Zeit und den Therapieverlauf hinweg (Aihara et al. 2017, Wang et al. 2016) ist es wahrscheinlich, dass im Verlauf neue Tumormutationen aufgetreten sind, die nicht gemessen wurden.

Im Fall der Liquorproben unterschied sich unter anderem der Entnahmezeitpunkt hinsichtlich einer bei vielen Patienten durchgeführten ZNS-Operation (prä-/postoperativ). Falls die Konzentration von Liquor-Biomarkern (wie cfDNA) wie von Mattox et al. (2019) beschrieben vor Tumorresektion auf ihrem Höchststand sein sollte, würde der Entnahmezeitpunkt ggf. die Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen beeinflussen. Bei manchen Patienten unseres Kollektivs erfolgte die Liquorentnahme kurz nach einer ZNS-Tumorresektion, sodass dieser Annahme zufolge dann ggf. nur eine geringe cfDNA-Menge vorläge und deswegen manche Mutationen unterhalb der Nachweisgrenze blieben.

Geringe cfDNA-Menge im Liquor

Auch wenn in dieser Studie eine hohe cfDNA-Menge in der Liquorprobe nicht in jedem Fall mit der Nachweismöglichkeit von Tumormutationen darin einherging, so ist die Höhe des cfDNA-Gehalts doch für die methodische Durchführbarkeit und Ergebnisqualität des in dieser Studie genutzten Next Generation Sequencing (NGS) von Bedeutung. Größe und Anzahl der zu sequenzierenden Gene beeinflussen, wie viel cfDNA zur Sequenzierung mindestens benötigt wird (Fontanilles et al. 2018). Lediglich 4 der in der Auswertung berücksichtigten

Liquorproben erfüllten die als Mindestanforderungen für die Sequenzierung anvisierten ≥ 20 ng cfDNA-Menge, UR-Rate $< 5\%$ (UR= underrepresented, Regionen mit Coverage < 30) und durchschnittliche Coverage > 120 .

Probleme bei der Liquor-cfDNA-Sequenzierung

Aufgrund der geringen cfDNA-Mengen konnte lediglich bei 3/17 Patienten zur Sequenzierung der Liquor-cfDNA das 710-Gen-Panel TUM.4 genutzt werden, mit dem zuvor die Gewebeproben sequenziert wurden (cf017, cf023, cf031). Außerdem konnten die Liquor-cfDNA-Sequenzierungsergebnisse wegen der unzureichenden Qualität der Liquorproben lediglich auf die aus der Gewebe-Sequenzierung vorbekannten Mutationen hin abgeglichen werden. Für Mutationen, die möglicherweise nur in der Liquor-cfDNA und nicht in der sequenzierten Probe des Tumors vorlagen, bestand somit keine Nachweismöglichkeit.

Des Weiteren war die Messung von Kopienzahlvarianten (CNVs) in der Liquor-cfDNA methodisch nicht möglich. Im Kontext der „liquid biopsy“ können diese allerdings sehr relevant sein, da ihr Vorliegen im Tumor (z. B. einer EGFR-Amplifikation) den Einsatz gezielter Kinase-Inhibitor-Therapien indizieren (Yamaoka et al. 2018) und möglicherweise auch prognostische Aussagekraft haben kann (Houillier et al. 2006, Korshunov et al. 2005).

Bei den 14/17 Patienten, deren Liquor-cfDNA-Sequenzierung mit dem 81-Gen-Panel (ONC.1) durchgeführt wurde, ergab sich beim Abgleich z. T. die Situation, dass in der Gewebe-Sequenzierung (710 untersuchte Gene) Mutationen in Genen festgestellt wurden, die durch das 81-Gen-Panel bei der Liquor-cfDNA-Sequenzierung nicht untersucht wurden. Möglicherweise hätten in der Liquor-cfDNA mehr Genmutationen festgestellt werden können, wenn für alle Proben eine Sequenzierung mit dem 710-Gen-Panel durchführbar gewesen wäre.

Eine daraus hervorgehende Veränderung der Anteile an Patienten mit bzw. ohne Mutationsnachweis in Liquor-cfDNA sowie deren Auswertung hinsichtlich klinischer Aspekte ist als wahrscheinlich anzusehen.

4.4 Fazit und Ausblick

Die Methoden der Sequenzierung von cfDNA sowie die diagnostischen und therapiebezogenen Anwendungen der „liquid biopsy“ sind in ihrer Vielfalt Inhalt vieler aktueller Studien.

Derzeit existiert kein Konsens dazu, welche Methode zur Quantifizierung und Sequenzierung von cfDNA am geeignetsten ist. Die beiden häufigsten derzeit angewandten Methoden sind das in dieser Studie genutzte Next Generation Sequencing (NGS) und die digital droplet PCR (ddPCR) (Shankar et al. 2017, Bertero et al. 2019, Fontanilles et al. 2018). Aufgrund der oft kleinen Patientenkollektive, der unterschiedlichen Methoden und teils diskrepanten Ergebnisse von Studien zur cfDNA im Liquor sind einige Reviews bis dato zurückhaltend hinsichtlich einer Bewertung des diagnostischen Nutzens der Liquor-basierten „liquid biopsy“ (Sindeeva et al. 2019).

Als vielversprechendes Anwendungsgebiet gilt besonders das Monitoring von ZNS-Tumoren und deren Therapieansprechen (Bertero et al. 2019), analog zur Plasma-cfDNA bei Neoplasien außerhalb des ZNS (Newman et al. 2014, Dawson et al. 2013). Denn aufgrund der geringen Invasivität der Liquorentnahme im Vergleich zu einer Gewebebiopsie eignet sich die „liquid biopsy“ gut für serielle Messungen (Boire et al. 2019). Besonders bei Patienten nach Radiotherapie im ZNS, bei denen radiologisch teilweise nur schwierig zwischen Pseudoprogression, Strahlennekrose und echter Progression unterschieden werden kann, wäre die ergänzende Liquor-cfDNA-Analyse von großem Nutzen (Boire et al. 2019). Einige Studien konnten bereits eine Dynamik der cfDNA-Parameter im Zusammenhang mit der klinischen Präsentation der Patienten beobachten: Konstanz oder Zunahme der ctDNA-Menge im Liquor bei klinischer Verschlechterung und ausbleibendem Therapieerfolg, Abnahme bis zu Werten unterhalb der Messgrenze bei klinischem Therapieansprechen und Symptombefreiheit (Li et al. 2016, Momtaz et al. 2016).

Darüber hinaus gelang mithilfe der Liquor-cfDNA auch der Nachweis von Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber „targeted therapies“:

Beispielsweise stellten Pentsova et al. (2016) bei einigen Patienten, die wegen ihrer Tumorerkrankung vorab erfolgreich mit Kinase-Inhibitoren (z.B. Erlotinib) behandelt worden waren, dann aber ZNS-Metastasen entwickelten, Resistenz verursachende Mutationen in der Liquor cfDNA fest, die im prätherapeutisch entnommenen Primärtumorgewebe nicht vorlagen.

Auch zur Plasma-basierten cfDNA-Sequenzierung existieren inzwischen weitere Ansätze: Beispielsweise diskutierte Banks (2016), dass die Steigerung der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, welche aktuell primär zur Verbesserung der ZNS-Gängigkeit von Medikamenten erforscht werde, auch zur Maximierung der Sensitivität einer liquid biopsy genutzt werden könnte.

Neben cfDNA werden auch Exosomen und Mikrovesikel aus Blut und Liquor – zusammengefasst unter dem Begriff „extrazelluläre Vesikel“ (EVs) – als Medien zur Sequenzierung erforscht (Bertero et al. 2019, Fontanilles et al. 2018). EVs sind von Membranen unterschiedlichen Ursprungs umgeben, enthalten Lipide, Proteine und Nukleinsäuren (DNA sowie kodierende und nicht-kodierende RNA) und können sowohl von gesunden als auch von Krebszellen abstammen (van Niel et al. 2018, Bertero et al. 2019). Anders als cfDNA sind die Nukleinsäuren in den EVs durch die umgebenden Membranen besser vor Degradation geschützt, weshalb sich Forscher verlässlichere Ergebnisse der Sequenzierung erhoffen (Hur et al. 2018).

Weitere Studien mit technisch verfeinerten (Sequenzier-)Methoden werden zeigen, ob bzw. für welche Patientengruppen und mit welchem Medium (Blut vs. Liquor) sich die „liquid biopsy“ in Zukunft bei ZNS-Neoplasien etablieren kann.

5. Zusammenfassung

Die Kenntnis von molekulargenetischen Eigenschaften eines Tumors ist für Diagnostik und Therapie von essentieller Bedeutung. Für Krebs im ZNS bietet die „liquid biopsy“ aus zellfreier DNA (cfDNA) im Liquor eine weniger invasive Alternative zur Gewebebiopsie. Die cfDNA-Menge ist bei Krebspatienten oft erhöht und enthält einen Anteil an circulating tumor DNA (ctDNA). Durch die Sequenzierung der Liquor-cfDNA besteht somit die Möglichkeit Tumormutationen nachzuweisen. Die Nachweisraten von Tumormutationen in Liquor-cfDNA schwanken in bisherigen Studien jedoch zwischen Werten unter 50 % bis hin zu 100 %.

Das Ziel dieser Dissertationsschrift war die Überprüfung und Identifikation von (klinischen) Eigenschaften, die bei neuroonkologischen Tumoren potentiell Einfluss auf die cfDNA-Menge im Liquor und die Nachweisbarkeit von Tumormutationen darin ausüben. Dazu wurde in dieser Studie cfDNA aus routinemäßig entnommenen Liquorproben von Patienten mit verschiedenen ZNS-Neoplasien quantifiziert, mit einem Panel aus bis zu 710 tumorrelevanten Genen sequenziert und mit den Ergebnissen der Gewebesequenzierung verglichen. Anhand dieser Ergebnisse wurden dann einige bedeutsame klinische Merkmale mit Blick auf den cfDNA-Gehalt im Liquor und die Nachweisbarkeit von Liquor-cfDNA-Mutationen untersucht.

Über 90 % der gemessenen Liquorproben enthielten cfDNA, bei 9 von 17 Patienten (52,9 %) konnten Mutationen des Tumorgewebes in der Liquor-cfDNA nachgewiesen werden. Darunter befanden sich 54,5 % der Patienten mit primärem Hirntumor und 50 % der Patienten mit ZNS-Metastasen eines soliden Tumors. Der mediane cfDNA-Gehalt dieser 9/17 Patienten lag mit 14,9 ng etwas höher als bei den 8/17 Patienten ohne Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis (Median 10 ng). Wie in bisherigen Studienergebnissen stellten auch wir bei Patienten mit Meningeosis neoplastica eine deutlich höhere cfDNA-Menge fest (N = 3, Median 207,5 ng). Die in einigen Studien beobachtete Tendenz, dass bei primären Hirntumoren mit höherem WHO-Grad öfter Liquor-cfDNA-Mutationen

nachweisbar waren als bei niedriggradigen Hirntumoren, konnte anhand unseres Kollektivs nicht bestätigt werden.

Der Nachweis von Liquor-cfDNA-Mutationen gelang bei einem kleineren Anteil der erstdiagnostizierten (33,3 %) bzw. der therapienaiven Patienten (16,7 %) und bei einem größeren Anteil der Rezidive (75 %) bzw. ZNS-spezifisch vortherapierten Patienten (72,7 %). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch bereits stattgefundene Therapie und aggressiveres Wachstum eines therapierefraktären Tumors die Anzahl zerfallender Tumorzellen steigt, die ihre Tumor-DNA in den Liquor absondern.

Entgegen bisheriger Studienergebnisse konnte anhand unseres Kollektivs kein Einfluss der direkten Angrenzung des Tumors/der Metastase an die inneren Liquorräume auf die Nachweisbarkeit von Tumormutationen in der Liquor-cfDNA festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für den Liquor-cfDNA-Mutationsnachweis bei Patienten mit nicht an die inneren Liquorräume angrenzenden Tumoren ist, dass über die interstitielle Flüssigkeit der Virchow-Robin-Räume auch cfDNA aus tiefer liegendem Hirngewebe in den Liquor gelangt.

Insgesamt stellen die geringe Fallzahl, die geringen cfDNA-Mengen in den Liquorproben und methodische Inhomogenitäten bei der Panel-Sequenzierung die Limitationen dieser Studie dar.

Da derzeit die meisten Studien zu cfDNA lediglich auf Blutproben basieren, ist für viele potentielle Einflussfaktoren noch unklar, ob bzw. inwieweit die Ergebnisse auf cfDNA im Liquor übertragbar sind. Dies betrifft physiologische und nicht-tumorspezifische pathologische Prozesse (z. B. Altern, Entzündungszustände, Schlaganfall) oder die Auswirkungen der bei ZNS-Tumoren meist standardmäßig durchgeführten Steroidbehandlung.

Anhand unseres Patientenkollektivs konnte die prinzipielle Machbarkeit der liquid biopsy aus cfDNA im Liquor demonstriert werden. Für eine abschließende Bewertung des Nutzens der Liquor-basierten liquid biopsy sollten sich prospektive Studien oder translationale Begleitstudien in klinischen Therapie-Studien anschließen.

6. Literaturverzeichnis

- Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, Peters S, Arvold ND, Harsh GR, Steeg PS und Chang SD (2019) Brain metastases. *Nature Reviews Disease Primers* 5: 5.
- Ackermann H, Arendt G, Baron R, Steinmetz H, Berlit P-D, Bien C, Birklein F, Curt A, Deschauer M, Deuschl G, Diehl RR, Diener H-C, Dieterich M, Eggert K, Elger CE, Endres M, Förderreuther S, Gerloff C, Glocker FX, Gold R, Hamann GF, Heckmann JG, Hennerici MG, Hermann W, Hesse S, Heuß D, Jost W, Jéttler E, Kaiser R, Karnath H-O, Kastrup O, Klockgether T, Kornblum C, Lehmann-Horn F, Reichmann H, Leypoldt F, Liepert J, Lindemuth R, Ludolph AC, Maschke M, May A, Mayer G, Meinck H-M, Meyding-Lamadü U, Méller SV, Méller-Vahl K, Nau R, Nelles G, Oertel WH, Paulus W, Pfister H-W, Pohl M, Prosiegel M, Rauer S, Reichmann H, Ringelstein EB, Rosenow F, Saft C, Sander D, Scheglmann K, Schlegel U, Schmutzhard E, Schneider-Gold C, Schöls L, Schönle PW, Schulz JB, Sommer C, Steiner T, Steinmetz H, Straubev A, Straumann D, Strupp M, Sturm W, Meinck H-M, Tegenthoff M, Thiel E, Hamann GF, Thöne-Otto A, Trenkwalder C, Ziegler W, Veltkamp R, Volkmann J, Wasner G, Weber JR, Weimar C, Weller M, Wiendl H, Woitalla D, Wéllner U, Zerr I, Ziegler W und Zihl J (2012) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Herausgegeben von der Kommission „Leitlinien“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). 5., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Agoston DV, Shutes-David A und Peskind ER (2017) Biofluid biomarkers of traumatic brain injury. *Brain Injury* 31: 1195-1203.
- Aihara K, Mukasa A, Nagae G, Nomura M, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Shibahara J, Takahashi M, Momose T, Tanaka S, Takayanagi S, Yanagisawa S, Nejo T, Takahashi S, Omata M, Otani R, Saito K, Narita Y, Nagane M, Nishikawa R, Ueki K, Aburatani H und Saito N (2017) Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. *Acta neuropathologica communications* 5: 18-18.
- Alan N, Seicean A, Seicean S, Neuhauser D, Benzel EC und Weil RJ (2015) Preoperative steroid use and the incidence of perioperative complications in patients undergoing craniotomy for definitive resection of a malignant brain tumor. *Journal of Clinical Neuroscience* 22: 1413-1419.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ und Stroun M (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 18: 65-73.
- Arnemann J (2019) Keimbahnmutation, S. 1330-1330. Gressner AM & Arndt T, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Avriel A, Rozenberg D, Raviv Y, Heimer D, Bar-Shai A, Gavish R, Sheynin J und Douvdevani A (2016) Prognostic utility of admission cell-free DNA levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 11: 3153-3161.
- Awad I, Bay JW und Rogers L (1986) Leptomeningeal Metastasis from Supratentorial Malignant Gliomas. *Neurosurgery* 19: 247-251.
- Ballester LY, Glitza Oliva IC, Douse DY, Chen MM, Lan C, Haydu LE, Huse JT, Roy-Chowdhuri S, Luthra R, Wistuba II und Davies MA (2018) Evaluating Circulating Tumor DNA From the Cerebrospinal Fluid of Patients With Melanoma and Leptomeningeal Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 77: 628-635.
- Banks WA (2016) From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 15: 275-292.
- Barnholtz-Sloan JS, Yu C, Sloan AE, Vengoechea J, Wang M, Dignam JJ, Vogelbaum MA, Sperduto PW, Mehta MP, Machtay M und Kattan MW (2012) A nomogram for individualized estimation of survival among patients with brain metastasis. *Neuro-Oncology* 14: 910-918.
- Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, Knabbe C, Zittermann A, Olbricht C, Gummert JF, Shipkova M, Birschmann I, Wieland E und Schütz E (2015) Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings* 47: 2400-2403.
- Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ und Siu LL (2013) Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 501: 355-364.
- Berghoff AS, Bartsch R, Wöhrer A, Streubel B, Birner P, Kros JM, Brastianos PK, Von Deimling A und Preusser M (2014) Predictive molecular markers in metastases to the central nervous system: recent advances and future avenues. *Acta Neuropathologica* 128: 879-891.
- Bertero L, Siravegna G, Rudà R, Soffietti R, Bardelli A und Cassoni P (2019) Review: Peering through a keyhole: liquid biopsy in primary and metastatic central nervous system tumours. *Neuropathology and applied neurobiology* 45: 655-670.
- Best MG, Sol N, Zijl S, Reijneveld JC, Wesseling P und Wurdinger T (2015) Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathol* 129: 849-65.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK,

- Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih L M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N und Diaz LA, Jr. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6: 224ra24.
- Boire A, Brandsma D, Brastianos PK, Le Rhun E, Ahluwalia M, Junck L, Glantz M, Groves MD, Lee EQ, Lin N, Raizer J, Ruda R, Weller M, Van Den Bent MJ, Vogelbaum MA, Chang S, Wen PY und Soffietti R (2019) Liquid biopsy in central nervous system metastases: a RANO review and proposals for clinical applications. *Neuro Oncol* 21: 571-584.
- Boisselier B, Gállego Pérez-Larraya J, Rossetto M, Labussière M, Ciccarino P, Marie Y, Delattre J-Y und Sanson M (2012) Detection of *IDH1* mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology* 79: 1693.
- Boon JM, Abrahams PH, Meiring JH und Welch T (2004) Lumbar puncture: Anatomical review of a clinical skill. *Clinical Anatomy* 17: 544-553.
- Bozic I, Paterson C und Waclaw B (2019) On measuring selection in cancer from subclonal mutation frequencies. *PLoS computational biology* 15: e1007368-e1007368.
- Brandner S und Jaunmuktane Z (2018) Neurological update: gliomas and other primary brain tumours in adults. *Journal of neurology* 265: 717-727.
- Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, Van Allen EM, Lawrence MS, Horowitz PM, Cibulskis K, Ligon KL, Taberner J, Seoane J, Martinez-Saez E, Curry WT, Dunn IF, Paek SH, Park S-H, Mckenna A, Chevalier A, Rosenberg M, Barker FG, 2nd, Gill CM, Van Hummelen P, Thorner AR, Johnson BE, Hoang MP, Choueiri TK, Signoretti S, Sougnez C, Rabin MS, Lin NU, Winer EP, Stemmer-Rachamimov A, Meyerson M, Garraway L, Gabriel S, Lander ES, Beroukhim R, Batchelor TT, Baselga J, Louis DN, Getz G und Hahn WC (2015) Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer discovery* 5: 1164-1177.
- Brennan Cameron W, Verhaak Roel GW, Mckenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama Sofie R, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman Samuel H, Beroukhim R, Bernard B, Wu C-J, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla Sachet A, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner Darell D, Van Meir Erwin G, Prados M, Sloan A, Black Keith I, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews David W, Guha A, Iacocca M, O'Neill Brian P, Foltz G, Myers J, Weisenberger Daniel J, Penny R, Kucherlapati R, Perou Charles M, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills Gordon B, Lander E, Spellman P,

Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird Peter W, Haussler D, Getz G, Chin L, Benz C, Barnholtz-Sloan J, Barrett W, Ostrom Q, Wolinsky Y, Black Keith I, Bose B, Boulos Paul T, Boulos M, Brown J, Czerinski C, Eppley M, Iacocca M, Kempista T, Kitko T, Koymfman Y, Rabeno B, Rastogi P, Sugarman M, Swanson P, Yalamanchii K, Otey Ilana P, Liu Yingchun S, Xiao Y, Auman JT, Chen P-C, Hadjipanayis A, Lee E, Lee S, Park Peter J, Seidman J, Yang L, Kucherlapati R, Kalkanis S, Mikkelsen T, Poisson Laila M, Raghunathan A, Scarpace L, Bernard B, Bressler R, Eakin A, Iype L et al. (2013) The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155: 462-477.

Brinker T, Stopa E, Morrison J und Klinge P (2014) A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids and barriers of the CNS* 11: 10-10.

Bulat M und Klarica M (2011) Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Research Reviews* 65: 99-112.

Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafraite AJ und Louis DN (2007) Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13: 2038-2045.

Caravagna G, Heide T, Williams M, Zapata L, Nichol D, Chkhaidze K, Cross W, Cresswell GD, Werner B, Acar A, Barnes CP, Sanguinetti G, Graham TA und Sottoriva A (2019) Model-based tumor subclonal reconstruction. *bioRxiv*: 586560.

Cervera-Carles L, Alcolea D, Estanga A, Ecay-Torres M, Izagirre A, Clerigué M, García-Sebastián M, Villanúa J, Escalas C, Blesa R, Martínez-Lage P, Lleó A, Fortea J und Clarimón J (2017) Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA in the Alzheimer's disease continuum. *Neurobiology of Aging* 53: 192.e1-192.e4.

Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, Huang F, He Y, Sun J, Tabori U, Kennedy M, Lieber DS, Roels S, White J, Otto GA, Ross JS, Garraway L, Miller VA, Stephens PJ und Frampton GM (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9: 34.

Chamberlain MC (2008) Neoplastic Meningitis. *The Oncologist* 13: 967-977.

Champiat S, Ferté C, Lebel-Binay S, Eggermont A und Soria JC (2014) Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology* 3: e27817-e27817.

- Chang CPY, Chia R-H, Wu T-L, Tsao K-C, Sun C-F und Wu JT (2003) Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 327: 95-101.
- Chen X, Schulz-Trieglaff O, Shaw R, Barnes B, Schlesinger F, Kallberg M, Cox AJ, Kruglyak S und Saunders CT (2016) Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics* 32: 1220-2.
- Cheng AP, Burnham P und De Vlaminck I (2018) Biopsy-free screening for glioma. *EMBO molecular medicine* 10: e9484.
- Choi S, Yu Y, Grimmer MR, Wahl M, Chang SM und Costello JF (2018) Temozolomide-associated hypermutation in gliomas. *Neuro-oncology* 20: 1300-1309.
- Connolly ID, Li Y, Gephart MH und Nagpal S (2016) The "Liquid Biopsy": the Role of Circulating DNA and RNA in Central Nervous System Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16: 25.
- Connolly ID, Li Y, Pan W, Johnson E, You L, Vogel H, Ratliff J und Hayden Gephart M (2017) A pilot study on the use of cerebrospinal fluid cell-free DNA in intramedullary spinal ependymoma. *J Neurooncol* 135: 29-36.
- Dagogo-Jack I, Gill CM, Cahill DP, Santagata S und Brastianos PK (2017) Treatment of brain metastases in the modern genomic era. *Pharmacology & Therapeutics* 170: 64-72.
- Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C und Rosenfeld N (2013) Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 368: 1199-1209.
- De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, Arias A, Raventos C, Tang J, Guerini-Rocco E, Martinez-Saez E, Lois S, Marin O, De La Cruz X, Piscuoglio S, Towers R, Vivancos A, Peg V, Cajal SRY, Carles J, Rodon J, Gonzalez-Cao M, Tabernero J, Felip E, Sahuquillo J, Berger MF, Cortes J, Reis-Filho JS und Seoane J (2015) Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun* 6: 8839.
- Diaz LA, Jr. und Bardelli A (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32: 579-86.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW und Vogelstein B (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16368-73.

- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B und Diaz LA, Jr. (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14: 985-90.
- Duchnowska R, Dziadziuszko R, Trojanowski T, Mandat T, Och W, Czaratoryska-Arłukowicz B, Radecka B, Olszewski W, Szubstarski F, Kozłowski W, Jarosz B, Rogowski W, Kowalczyk A, Limon J, Biernat W, Jassem J und The Polish Brain Metastasis C (2012) Conversion of epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor expression in breast cancer metastases to the brain. *Breast Cancer Research* 14: R119.
- Emlen W und Mannik M (1984) Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clinical and experimental immunology* 56: 185-192.
- Euskirchen P, Bielle F, Labreche K, Kloosterman WP, Rosenberg S, Daniau M, Schmitt C, Masliah-Planchon J, Bourdeaut F, Dehais C, Marie Y, Delattre J-Y und Idbaih A (2017) Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta neuropathologica* 134: 691-703.
- Feldhaus BVT (2019) Klinische Charakterisierung von Patienten mit Mutationen in LCA-assoziierten Genen. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA und Perry A (2017) Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Archiv* 471: 257-269.
- Fink D, Aebi S und Howell SB (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical Cancer Research* 4: 1.
- Fontanilles M, Duran-Peña A und Idbaih A (2018) Liquid Biopsy in Primary Brain Tumors: Looking for Stardust! *Current Neurology and Neuroscience Reports* 18: 13.
- Frank MO (2016) Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. *Biological Research For Nursing* 18: 477-488.
- Ge M, Zhan Q, Zhang Z und Ji X (2019) Different next-generation sequencing pipelines based detection of tumor DNA in cerebrospinal fluid of lung adenocarcinoma cancer patients with leptomeningeal metastases. 19: 143.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA und Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* 366: 883-892.

- Gould J (2018) Breaking down the epidemiology of brain cancer. *Nature* 561: 40-41.
- Hall WA, Djalilian HR, Nussbaum ES und Cho KH (2000) Long-term survival with metastatic cancer to the brain. *Medical Oncology* 17: 279-286.
- Han CH und Brastianos PK (2017) Genetic Characterization of Brain Metastases in the Era of Targeted Therapy. *Frontiers in oncology* 7: 230-230.
- Harker Rhodes C, Honsinger C und Sorenson GD (1995) PCR-Detection of Tumor-Derived p53 DNA in Cerebrospinal Fluid. *American Journal of Clinical Pathology* 103: 404-408.
- Hickmann A-K, Frick M, Hadaschik D, Battke F, Bittl M, Ganslandt O, Biskup S und Döcker D (2019) Molecular tumor analysis and liquid biopsy: a feasibility investigation analyzing circulating tumor DNA in patients with central nervous system lymphomas. *BMC cancer* 19: 192-192.
- Hiemcke-Jiwa LS, Minnema MC, Radersma-Van Loon JH, Jiwa NM, De Boer M, Leguit RJ, De Weger RA und Huibers MMH (2018) The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: A highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematol Oncol* 36: 429-435.
- Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre J-Y, Hoang-Xuan K und Sanson M (2006) Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* 106: 2218-2223.
- Huang J, Liu F, Liu Z, Tang H, Wu H, Gong Q und Chen J (2017) Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Frontiers in pharmacology* 8: 242-242.
- Huang S-W, Ali N-D, Zhong L und Shi J (2018) MicroRNAs as biomarkers for human glioblastoma: progress and potential. *Acta Pharmacologica Sinica* 39: 1405-1413.
- Hummel EM, Hesses E, Müller S, Beiter T, Fisch M, Eibl A, Wolf OT, Giebel B, Platen P, Kumsta R und Moser DA (2018) Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational psychiatry* 8: 236-236.
- Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, Greenman C, Edkins S, Bignell G, Davies H, Meara S, Parker A, Avis T, Barthorpe S, Brackenbury L, Buck G, Butler A, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gorton M, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Kosmidou V, Laman R, Lugg R, Menzies A, Perry J, Petty R, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Solomon H, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Easton DF, Riggins G, Roy JE, Levine KK, Mueller W, Batchelor TT, Louis DN, Stratton MR, Futreal PA und Wooster R (2006) A Hypermutation Phenotype and Somatic MSH6 Mutations in

- Recurrent Human Malignant Gliomas after Alkylator Chemotherapy. *Cancer Research* 66: 3987.
- Hur JY, Kim HJ, Lee JS, Choi C-M, Lee JC, Jung MK, Pack CG und Lee KY (2018) Extracellular vesicle-derived DNA for performing EGFR genotyping of NSCLC patients. *Molecular cancer* 17: 15-15.
- Iloff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA und Nedergaard M (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 4: 147ra111.
- Jackson SE und Chester JD (2015) Personalised cancer medicine. *International Journal of Cancer* 137: 262-266.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD und Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61: 1659-65.
- Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV und Nikiforova MN (2017) Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 19: 341-365.
- Jiang H, Lei R, Ding SW und Zhu S (2014) Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics* 15: 182.
- Jiang N und Pisetsky DS (2004) The effect of dexamethasone on the generation of plasma DNA from dead and dying cells. *The American journal of pathology* 164: 1751-1759.
- Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, Mclean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJM, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS und Costello JF (2014) Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science (New York, N.Y.)* 343: 189-193.
- Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X, Ennis RC, Fabrizio D, Chalmers ZR, Greenbowe J, Ali SM, Balasubramanian S, Sun JX, He Y, Frederick DT, Puzanov I, Balko JM, Cates JM, Ross JS, Sanders C, Robins H, Shyr Y, Miller VA, Stephens PJ, Sullivan RJ, Sosman JA und

- Lovly CM (2016) Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res* 4: 959-967.
- Joo WD, Visintin I und Mor G (2013) Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas* 76: 308-314.
- Jung A und Kirchner T (2018) Liquid Biopsy in der tumorgenetischen Diagnostik. *Dtsch Arztebl International* 115: 169-74.
- Jylhävä J (2013) Cell-free DNA as a Novel Biomarker of Aging – Characterization and genetic regulation. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tampere (Finnland)*.
- Jylhävä J, Kotipelto T, Raitala A, Jylhä M, Hervonen A und Hurme M (2011) Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: The Vitality 90+ study. *Mechanisms of Ageing and Development* 132: 20-26.
- Kaal ECA und Vecht CJ (2004) The management of brain edema in brain tumors. *Current Opinion in Oncology* 16.
- Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J, Sougnez C, Muller F, Hu J, Sloan AE, Cohen ML, Van Meir EG, Scarpace L, Laird PW, Weinstein JN, Lander ES, Gabriel S, Getz G, Meyerson M, Chin L, Barnholtz-Sloan JS und Verhaak RGW (2015a) Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome research* 25: 316-327.
- Kim J, Lee I-H, Cho Hee J, Park C-K, Jung Y-S, Kim Y, Nam So H, Kim Byung S, Johnson Mark D, Kong D-S, Seol Ho J, Lee J-I, Joo Kyeung M, Yoon Y, Park W-Y, Lee J, Park Peter J und Nam D-H (2015b) Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell* 28: 318-328.
- Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson RK und Ding L (2009) VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 25: 2283-5.
- Kolter T: Blut-Hirn-Schranke, RD-02-02051 (2018) in Böckler F, Dill B, Dingerdissen U, Eisenbrand G, Faupel F, Fugmann B, Gamse T, Matissek R, Pohnert G, Sprenger G, RÖMPP [online], Stuttgart, Georg Thieme Verlag
 URL: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-02-02051>
 [Zugriff 29.03.2020]
- Korshunov A, Sycheva R und Golanov A (2005) The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer* 104: 825-832.
- Lagerwaard F, Levendag P, Nowak PCM, Eijkenboom WH, Hanssens PJ und Schmitz PM (1999) Identification of prognostic factors in patients with brain

- metastases: a review of 1292 patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 43: 795-803.
- Lauko A, Thapa B, Venur VA und Ahluwalia MS (2018) Management of Brain Metastases in the New Era of Checkpoint Inhibition. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 18: 70.
- Le Rhun E und Galanis E (2016) Leptomeningeal metastases of solid cancer. *Curr Opin Neurol* 29: 797-805.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM und Yaros MJ (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37: 646-50.
- Li H und Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754-60.
- Li H und Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26: 589-95.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R und Genome Project Data Processing S (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-9.
- Li Y, Pan W, Connolly ID, Reddy S, Nagpal S, Quake S und Gephart MH (2016) Tumor DNA in cerebral spinal fluid reflects clinical course in a patient with melanoma leptomeningeal brain metastases. *J Neurooncol* 128: 93-100.
- Li YS, Jiang BY, Yang JJ, Zhang XC, Zhang Z, Ye JY, Zhong WZ, Tu HY, Chen HJ, Wang Z, Xu CR, Wang BC, Du HJ, Chuai S, Han-Zhang H, Su J, Zhou Q, Yang XN, Guo WB, Yan HH, Liu YH, Yan LX, Huang B, Zheng MM und Wu YL (2018) Unique genetic profiles from cerebrospinal fluid cell-free DNA in leptomeningeal metastases of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: a new medium of liquid biopsy. *Ann Oncol* 29: 945-952.
- Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D und Constantin G (2018) Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta neuropathologica* 135: 311-336.
- Lien EA, Wester K, Lonning PE, Solheim E und Ueland PM (1991) Distribution of tamoxifen and metabolites into brain tissue and brain metastases in breast cancer patients. *Br J Cancer* 63: 641-5.
- Liimatainen SP, Jylhävä J, Raitanen J, Peltola JT und Hurme MA (2013) The concentration of cell-free DNA in focal epilepsy. *Epilepsy Research* 105: 292-298.
- Lin NU, Lee EQ, Aoyama H, Barani IJ, Barboriak DP, Baumert BG, Bendszus M, Brown PD, Camidge DR, Chang SM, Dancey J, De Vries EGE, Gaspar LE, Harris GJ, Hodi FS, Kalkanis SN, Linskey ME, Macdonald DR, Margolin K, Mehta MP, Schiff D, Soffietti R, Suh JH, Van Den Bent MJ,

- Vogelbaum MA und Wen PY (2015) Response assessment criteria for brain metastases: proposal from the RANO group. *The Lancet Oncology* 16: e270-e278.
- Lo YD, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM und Cocks RA (2000) Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical chemistry* 46: 319-323.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM und Hjelm NM (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American journal of human genetics* 64: 218-224.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW und Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114: 97-109.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P und Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131: 803-820.
- Lu VM, Power EA, Zhang L und Daniels DJ (2019) Liquid biopsy for diffuse intrinsic pontine glioma: an update. *J Neurosurg Pediatr.* 2019: 1-8.
- Ma J, Fu Y, Tu Y-Y, Liu Y, Tan Y-R, Ju W-T, Pickering CR, Myers JN, Zhang Z-Y und Zhong L-P (2018) Mutation allele frequency threshold does not affect prognostic analysis using next-generation sequencing in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 18: 758.
- Madsen AT, Hojbjerg JA, Sorensen BS und Winther-Larsen A (2019) Day-to-day and within-day biological variation of cell-free DNA. *EBioMedicine* 49: 284-290.
- Manueldas S, Benterud T, Rueegg CS, Garberg HT, Huun MU, Pankratov L, Åsegg-Atneosen M, Solberg R, Escobar J, Saugstad OD und Baumbusch LO (2018) Temporal patterns of circulating cell-free DNA (cfDNA) in a newborn piglet model of perinatal asphyxia. *PloS one* 13: e0206601-e0206601.
- Martinez-Ricarte F, Mayor R, Martinez-Saez E, Rubio-Perez C, Pineda E, Cordero E, Cicuendez M, Poca MA, Lopez-Bigas N, Ramon YCS, Vieito M, Carles J, Tabernero J, Vivancos A, Gallego S, Graus F, Sahuquillo J und Seoane J (2018) Molecular Diagnosis of Diffuse Gliomas through Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clin Cancer Res* 24: 2812-2819.
- Mattox AK, Yan H und Bettgowda C (2019) The potential of cerebrospinal fluid-based liquid biopsy approaches in CNS tumors. *Neuro-Oncology* 21: 1509-1518.

- McGirt MJ, Woodworth GF, Coon AL, Frazier JM, Amundson E, Garonzik I, Olivi A und Weingart JD (2005) Independent predictors of morbidity after image-guided stereotactic brain biopsy: a risk assessment of 270 cases. *J Neurosurg* 102: 897.
- Melms JC, Ho KW, Thummalapalli R, Tyler J, Brinker TJ, Singh V, Sengupta S, Mier J und Izar B (2018) Implementation of cell-free tumor DNA sequencing from the cerebrospinal fluid to guide treatment in a patient with primary leptomeningeal melanoma: A case report. *Mol Clin Oncol* 9: 58-61.
- Mense S (2020) ZNS, S. 1152-1157. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W & Wurzinger LJ, *Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage ed.:* Georg Thieme Verlag.
- Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, Pourmaleki M, Briggs S, Distefano N, Zheng Y, Skakodub A, Mehta SA, Campos C, Hsieh WY, Selcuklu SD, Ling L, Meng F, Jing X, Samoila A, Bale TA, Tsui DWY, Grommes C, Viale A, Souweidane MM, Tabar V, Brennan CW, Reiner AS, Rosenblum M, Panageas KS, Deangelis LM, Young RJ, Berger MF und Mellinghoff IK (2019) Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature* 565: 654-658.
- Molinuevo JL, Ayton S, Batrla R, Bednar MM, Bittner T, Cummings J, Fagan AM, Hampel H, Mielke MM, Mikulskis A, O'bryant S, Scheltens P, Sevigny J, Shaw LM, Soares HD, Tong G, Trojanowski JQ, Zetterberg H und Blennow K (2018) Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta neuropathologica* 136: 821-853.
- Momtaz P, Pentsova E, Abdel-Wahab O, Diamond E, Hyman D, Merghoub T, You D, Gasmi B, Viale A und Chapman PB (2016) Quantification of tumor-derived cell free DNA (cfDNA) by digital PCR (DigPCR) in cerebrospinal fluid of patients with BRAFV600 mutated malignancies. *Oncotarget* 7: 85430-85436.
- Mouliere F, Mair R, Chandrananda D, Marass F, Smith CG, Su J, Morris J, Watts C, Brindle KM und Rosenfeld N (2018) Detection of cell-free DNA fragmentation and copy number alterations in cerebrospinal fluid from glioma patients. *EMBO molecular medicine* 10: e9323.
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS, Marass F, Humphray S, Hadfield J, Bentley D, Chin TM, Brenton JD, Caldas C und Rosenfeld N (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497: 108-12.
- Nevel KS, Wilcox JA, Robell LJ und Umemura Y (2018) The Utility of Liquid Biopsy in Central Nervous System Malignancies. *Curr Oncol Rep* 20: 60.

- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW, Alizadeh AA und Diehn M (2014) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine* 20: 548-554.
- Noh J-H, Lee MH, Kim WS, Lim DH, Kim ST, Kong D-S, Nam D-H, Lee J-I und Seol HJ (2015) Optimal treatment of leptomeningeal spread in glioblastoma: analysis of risk factors and outcome. *Acta Neurochirurgica* 157: 569-576.
- Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (2018) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23.
- O'Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, Chantler PD und Barr TL (2017) Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Injury* 31: 1369-1375.
- Olar A und Aldape KD (2014) Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* 232: 165-77.
- Orešković D und Klarica M (2010) The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews* 64: 241-262.
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR und Barnholtz-Sloan JS (2014) The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-oncology* 16: 896-913.
- Paik PK, Shen R, Won H, Rekhtman N, Wang L, Sima CS, Arora A, Seshan V, Ladanyi M, Berger MF und Kris MG (2015) Next-Generation Sequencing of Stage IV Squamous Cell Lung Cancers Reveals an Association of PI3K Aberrations and Evidence of Clonal Heterogeneity in Patients with Brain Metastases. *Cancer discovery* 5: 610-621.
- Pan C, Diplas BH, Chen X, Wu Y, Xiao X, Jiang L, Geng Y, Xu C, Sun Y, Zhang P, Wu W, Wang Y, Wu Z, Zhang J, Jiao Y, Yan H und Zhang L (2019a) Molecular profiling of tumors of the brainstem by sequencing of CSF-derived circulating tumor DNA. *Acta Neuropathol* 137: 297-306.
- Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH und Quake SR (2015) Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem* 61: 514-22.
- Pan Y, Long W und Liu Q (2019b) Current Advances and Future Perspectives of Cerebrospinal Fluid Biopsy in Midline Brain Malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 20: 88.

- Panditharatna E, Kilburn LB, Aboian MS, Kambhampati M, Gordish-Dressman H, Magge SN, Gupta N, Myseros JS, Hwang EI, Kline C, Crawford JR, Warren KE, Cha S, Liang WS, Berens ME, Packer RJ, Resnick AC, Prados M, Mueller S und Nazarian J (2018) Clinically Relevant and Minimally Invasive Tumor Surveillance of Pediatric Diffuse Midline Gliomas Using Patient-Derived Liquid Biopsy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 24: 5850-5859.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE und Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)* 321: 1807-1812.
- Peng M, Chen C, Hulbert A, Brock MV und Yu F (2017) Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* 8: 69162-69173.
- Peng Y, Zheng D, Zhang X, Pan S, Ji T, Zhang J, Shen H-Y und Wang H-H (2019) Cell-Free Mitochondrial DNA in the CSF: A Potential Prognostic Biomarker of Anti-NMDAR Encephalitis. *Frontiers in immunology* 10: 103-103.
- Pentsova EI, Shah RH, Tang J, Boire A, You D, Briggs S, Omuro A, Lin X, Fleisher M, Grommes C, Panageas KS, Meng F, Selcuklu SD, Ogilvie S, Distefano N, Shagabayeva L, Rosenblum M, Deangelis LM, Viale A, Mellinghoff IK und Berger MF (2016) Evaluating Cancer of the Central Nervous System Through Next-Generation Sequencing of Cerebrospinal Fluid. *J Clin Oncol* 34: 2404-15.
- Pestalozzi BC und Brignoli S (2000) Trastuzumab in CSF. *Journal of Clinical Oncology* 18: 2349-2351.
- Pisetsky DS und Fairhurst A-M (2007) The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 40: 281-284.
- Pokrywka A, Zembron-Lacny A, Baldy-Chudzik K, Orysiak J, Sitkowski D und Banach M (2015) The influence of hypoxic physical activity on cfDNA as a new marker of vascular inflammation. *Archives of medical science: AMS* 11: 1156-1163.
- Pyle A, Brennan R, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Thouin A, Mollenhauer B, Burn D, Chinnery PF und Hudson G (2015) Reduced cerebrospinal fluid mitochondrial DNA is a biomarker for early-stage Parkinson's disease. *Annals of neurology* 78: 1000-1004.

- Quach N, Goodman MF und Shibata D (2004) In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC clinical pathology* 4: 1-1.
- Quick-Weller J, Lescher S, Bruder M, Dinc N, Behmanesh B, Seifert V, Weise L und Marquardt G (2016) Stereotactic biopsy of brainstem lesions: 21 years experiences of a single center. *Journal of Neuro-Oncology* 129: 243-250.
- Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB und Weller M (2017) Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 434-452.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland 2015/2016 [online]. - Berlin, 2019
URL: <http://dx.doi.org/10.25646/5977>
URN: urn:nbn:de:kobv:0257-176904/6012-7
[Zugriff 29.03.2020]
- Romme Christensen J, Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Jensen PE, Sørensen PS und Sellebjerg F (2012) CSF inflammation and axonal damage are increased and correlate in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 19: 877-884.
- Salkeni MA, Zarzour A, Ansay TY, Mcpherson CM, Warnick RE, Rixe O und Bahassi EM (2013) Detection of EGFRvIII mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients. *Journal of Neuro-Oncology* 115: 27-35.
- Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, Cluzeau T, Geyer SM, Mcgraw KL, Al Ali NH, Lancet J, Mcginniss MJ, Nahas S, Smith AE, Kulasekararaj A, Mufti G, List A, Hall J und Padron E (2016) Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 30: 666-673.
- Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, Barron DA, Zehir A, Jordan EJ, Omuro A, Kaley TJ, Kendall SM, Motzer RJ, Hakimi AA, Voss MH, Russo P, Rosenberg J, Iyer G, Bochner BH, Bajorin DF, Al-Ahmadie HA, Chaft JE, Rudin CM, Riely GJ, Baxi S, Ho AL, Wong RJ, Pfister DG, Wolchok JD, Barker CA, Gutin PH, Brennan CW, Tabar V, Mellinghoff IK, Deangelis LM, Ariyan CE, Lee N, Tap WD, Gounder MM, D'angelo SP, Saltz L, Stadler ZK, Scher HI, Baselga J, Razavi P, Klebanoff CA, Yaeger R, Segal NH, Ku GY, Dematteo RP, Ladanyi M, Rizvi NA, Berger MF, Riaz N, Solit DB, Chan TA und Morris LGT (2019) Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics* 51: 202-206.
- Saunders NR, Liddelow SA und Dziegielewska KM (2012) Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in pharmacology* 3: 46-46.

- Schwaederle M, Chattopadhyay R, Kato S, Fanta PT, Banks KC, Choi IS, Piccioni DE, Ikeda S, Talasz A, Lanman RB, Bazhenova L und Kurzrock R (2017) Genomic Alterations in Circulating Tumor DNA from Diverse Cancer Patients Identified by Next-Generation Sequencing. *Cancer research* 77: 5419-5427.
- Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X und Pantel K (2009) Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15: 1032-8.
- Schwarzenbach H, Hoon DS und Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11: 426-37.
- Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B und Carter BS (2017) Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn* 17: 943-947.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM und Leon SA (1983) Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51: 2116-20.
- Sindeeva OA, Verkhovskii RA, Sarimollaoglu M, Afanaseva GA, Fedonnikov AS, Osintsev EY, Kurochkina EN, Gorin DA, Deyev SM, Zharov VP und Galanzha EI (2019) New Frontiers in Diagnosis and Therapy of Circulating Tumor Markers in Cerebrospinal Fluid In Vitro and In Vivo. *Cells* 8: 1195.
- Siravegna G, Geuna E, Mussolin B, Crisafulli G, Bartolini A, Galizia D, Casorzo L, Sarotto I, Scaltriti M, Sapino A, Bardelli A und Montemurro F (2017) Genotyping tumour DNA in cerebrospinal fluid and plasma of a HER2-positive breast cancer patient with brain metastases. *ESMO Open* 2: e000253.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ und Yao SL (1994) Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 67-71.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C und Beljanski M (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318-22.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ und Anker P (2000) The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 906: 161-8.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A und Anker P (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 313: 139-42.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Van Den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG und

- Mirimanoff R-O (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10: 459-466.
- Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A und Ogawa S (2015) Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genetics* 47: 458-468.
- Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J und Homma Y (2008) Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica Chimica Acta* 387: 55-58.
- Swaminathan R und Butt AN (2006) Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075: 1-9.
- Swinkels DW, De Kok JB, Hanselaar A, Lamers K und Boerman RH (2000) Early Detection of Leptomeningeal Metastasis by PCR Examination of Tumor-derived K-ras DNA in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry* 46: 132.
- Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV und Laktionov PP (2006) Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075: 191-196.
- Tan D und Lynch HT (2013) Principles of molecular diagnostics and personalized cancer medicine, Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins.
- Togashi Y, Masago K, Fukudo M, Terada T, Fujita S, Iriya K, Sakamori Y, Kim YH, Mio T, Inui K-I und Mishima M (2010) Cerebrospinal Fluid Concentration of Erlotinib and its Active Metabolite OSI-420 in Patients with Central Nervous System Metastases of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 5: 950-955.
- Togashi Y, Masago K, Masuda S, Mizuno T, Fukudo M, Ikemi Y, Sakamori Y, Nagai H, Kim YH, Katsura T und Mishima M (2012) Cerebrospinal fluid concentration of gefitinib and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 70: 399-405.
- Touat M, Idbaih A, Sanson M und Ligon KL (2017) Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 28: 1457-1472.
- Van Bussel MTJ, Beijnen JH und Brandsma D (2019) Intracranial antitumor responses of nivolumab and ipilimumab: a pharmacodynamic and

- pharmacokinetic perspective, a scoping systematic review. *BMC cancer* 19: 519-519.
- Van Der Vaart M und Pretorius PJ (2008a) Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci* 1137: 18-26.
- Van Der Vaart M und Pretorius PJ (2008b) Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta* 395: 186.
- Van Niel G, D'angelo G und Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 213-228.
- Varhaug KN, Vedeler CA, Myhr K-M, Aarseth JH, Tzoulis C und Bindoff LA (2017) Increased levels of cell-free mitochondrial DNA in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mitochondrion* 34: 32-35.
- Vogelstein B und Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-99.
- Von Baumgarten L, Kumbrink J, Jung A, Reischer A, Flach M, Liebmann S, Metzeler KH, Holch JW, Niyazi M, Thon N, Straube A, Von Bergwelt-Baildon M, Heinemann V, Kirchner T und Westphalen CB (2020) Therapeutic management of neuro-oncologic patients - potential relevance of CSF liquid biopsy. *Theranostics* 10: 856-866.
- Waldvogel Abramowski S, Tirefort D, Lau P, Guichebaron A, Taleb S, Modoux C, Lemoine Chaduc C, Bruyere Cerdan P, Roux Lombard P, Lecompte T und Preynat-Seauve O (2018) Cell-free nucleic acids are present in blood products and regulate genes of innate immune response. *Transfusion* 58: 1671-1681.
- Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DIS, Zairis S, Abate F, Liu Z, Elliott O, Shin Y-J, Lee J-K, Lee I-H, Park W-Y, Eoli M, Blumberg AJ, Lasorella A, Nam D-H, Finocchiaro G, Iavarone A und Rabadan R (2016) Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nature genetics* 48: 768-776.
- Wang JF, Pu X, Zhang X, Chen K, Xi Y, Wang J, Mao X, Zhang J, Heymach JV, Antonoff MB, Hofstetter WL, Mehran RJ, Rice DC, Roth JA, Sepesi B, Swisher SG, Vaporciyan AA, Walsh GL, Meng QH, Shaw KR, Eterovic AK und Fang B (2018) Variants with a low allele frequency detected in genomic DNA affect the accuracy of mutation detection in cell-free DNA by next-generation sequencing. *Cancer* 124: 1061-1069.
- Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, Ptak J, Brem H, Chaichana K, Gallia GL, Gokaslan ZL, Groves ML, Jallo GI, Lim M, Olivi A, Quinones-Hinojosa A, Rigamonti D, Riggins GJ, Sciubba DM, Weingart JD, Wolinsky JP, Ye X, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Holdhoff M, Agrawal N, Diaz LA, Jr., Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B und Bettegowda C (2015) Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients

- with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 9704-9.
- Wesseling P und Capper D (2018) WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 44: 139-150.
- Wick W, Unterberg A und Debus J (2016) Hirntumoren, S. 313-364. Hacke W, Neurologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wildemann B und Storch-Hagenlocher B (2016) Liquordiagnostik, S. 121-124. Hacke W, Neurologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M und Ohmori T (2018) Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences* 19: 3491.
- Yang H, Cai L, Zhang Y, Tan H, Deng Q, Zhao M und Xu X (2014) Sensitive Detection of EGFR Mutations in Cerebrospinal Fluid from Lung Adenocarcinoma Patients with Brain Metastases. *The Journal of Molecular Diagnostics* 16: 558-563.
- Yarchoan M, Hopkins A und Jaffee EM (2017) Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *The New England journal of medicine* 377: 2500-2501.
- Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL und Louis DN (2009) MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15: 4622-4629.
- Yipp BG und Kubes P (2013) NETosis: how vital is it? *Blood* 122: 2784-2794.
- Yu D, Tong Y, Guo X, Feng L, Jiang Z, Ying S, Jia J, Fang Y, Yu M, Xia H, Shi L und Lou J (2019) Diagnostic Value of Concentration of Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology* 9.
- Zhang ET, Inman CB und Weller RO (1990) Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *Journal of anatomy* 170: 111-123.
- Zhu L, Cheng G, Ye D, Nazeri A, Yue Y, Liu W, Wang X, Dunn GP, Petti AA, Leuthardt EC und Chen H (2018) Focused Ultrasound-enabled Brain Tumor Liquid Biopsy. *Scientific reports* 8: 6553-6553.
- Zorofchian S, Iqbal F, Rao M, Aung PP, Esquenazi Y und Ballester LY (2019) Circulating tumour DNA, microRNA and metabolites in cerebrospinal fluid as biomarkers for central nervous system malignancies. *J Clin Pathol* 72: 271-280.

Zschocke J (2018a) Mutationen und genetische Variabilität, S. 39-65. Schaaf C & Zschocke J, Basiswissen Humangenetik. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Zschocke J (2018b) Tumorgenetik, S. 115-121. Schaaf C & Zschocke J, Basiswissen Humangenetik. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Dynamische Internetseiten:

<https://www.cegat.de/en/diagnostics/tumor-diagnostics/> [Zugriff 19.04.2020]

<https://www.medizin.uni-tuebingen.de/de/das-klinikum/daten-und-fakten>
[Zugriff 23.02.2020]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [Zugriff 07.11.2019]

7. Anhang

7.1 Anhang Material und Methoden

7.1.1 Auflistung der untersuchten Gene der Panel-Sequenzierung

ONC.1 Panel (81 Gene):

AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ARID1A, ATM, B2M, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2B, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KDM6A, KDR, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MED12, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NOTCH1, NRAS, PALB2, PBRM1, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3R1, POLE, PTEN, RAF1, RET, RPTOR, SETD2, SMAD4, SMARCB1, SMO, SPOP, SRC, SRY, STAG2, TERT, TP53, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WT1

TUM.3 Panel (649 Gene):

ABCB1, ABCC2, ABCG2, ABL1, ABL2, ACD, ACVR1, ACVR1B, AJUBA, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AMER1, APC, AR, ARAF, ARFRP1, ARHGAP35, ARID1A, ARID1B, ARID2, ARID5B, ARNT, ASXL1, ATF1, ATM, ATP1A1, ATP5B, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AURKC, AXIN1, AXIN2, AXL, AZGP1, B2M, BAP1, BARD1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL2L1, BCL2L2, BCL3, BCL6, BCL9, BCOR, BCORL1, BCR, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD4, BRE, BRIP1, BTK, BTNL2, BUB1B, C11ORF30, CARD11, CASP8, CBF3, CBL, CCDC6, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD1D, CD274, CD70, CD79A, CD79B, CD82, CDC27, CDC73, CDH1, CDH2, CDK12, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDX2, CEBPA, CEP57, CHD2, CHD4, CHEK1, CHEK2, CIC, CKS1B, COL1A1, CREB1, CREBBP, CRKL, CRTCL1, CSF1R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, CUL3, CUL4B, CUX1, CYLD, CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, DAXX, DCC, DDB2, DDIT3, DDR2, DDX3X, DEK, DIAPH1, DICER1, DIS3, DNMT1, DNMT3A, DOT1L, DPYD, DST, EGFR, EGR3, ELAC2, ELF3, EML4, ENG, EP300,

PRF1, PRKACA, PRKAR1A, PRKCI, PRKD1, PRKDC, PRSS1, PRSS8, PRX, PSIP1, PSPH, PTCH1, PTEN, PTGS2, PTPN11, PTPRC, PTPRD, PTPRT, QKI, RAC1, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAF1, RALGDS, RARA, RASA1, RASAL1, RB1, RBM10, RBM15, RECQL, RECQL4, REL, RET, RHEB, RHOA, RHOH, RICTOR, RINT1, RNASEL, RNF2, RNF43, ROS1, RPL22, RPL5, RPTOR, RRM1, RUNX1, RUNX1T1, RXRA, RYR1, SACS, SAV1, SBDS, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SELP, SEMA4A, SEPT9, SETBP1, SETD2, SETDB1, SF3B1, SGK1, SH2D1A, SIN3A, SKP2, SLC15A2, SLC1A3, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A6, SLC26A3, SLCO1B1, SLCO1B3, SLIT2, SLX4, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMC1A, SMC3, SMO, SMUG1, SNCAIP, SOCS1, SOS1, SOX10, SOX11, SOX17, SOX2, SOX9, SPEN, SPINK1, SPOP, SPRED1, SPTA1, SRC, SRD5A2, SRSF2, SSX1, STAG2, STAT3, STAT4, STAT5B, STK11, STK3, STK4, SUFU, SULT1A1, SUZ12, SYK, TAF1, TAF15, TAL1, TAP1, TBL1XR1, TBX3, TCF3, TCF7L1, TCF7L2, TCL1A, TERC, TERF2IP, TERT, TET1, TET2, TFE3, TGFBR2, THBS1, TIMP3, TLR4, TLX1, TLX3, TMEM127, TMPRSS2, TNF, TNFAIP3, TNFRSF14, TNK2, TOP1, TOP2A, TP53, TP53BP1, TPMT, TPX2, TRAF3, TRAF7, TRIM24, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, TYMS, U2AF1, UBR5, UGT1A1, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B7, UIMC1, USP9X, VEGFA, VHL, VKORC1, WASF3, WHSC1, WISP3, WRN, WT1, WWTR1, XPA, XPC, XPO1, XRCC1, XRCC2, YAP1, ZBTB2, ZFH3, ZNF217, ZNF703

TUM.4 Panel (710 Gene):

ABL1, ABL2, ACD, AIP, AJUBA, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AMER1, ANKRD26, APC, AR, ARAF, ARHGAP35, ARID1A, ARID1B, ARID2, ARID5B, ASXL1, ASXL2, ATG2B, ATM, ATP1A1, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AURKC, AXIN1, AXIN2, AXL, B2M, BAP1, BARD1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL6, BCL9, BCOR, BCORL1, BCR, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTK, BTNL2, BUB1B, C11ORF30, CALR, CAMK2G, CARD11, CASP8, CBF3, CBL, CBLB, CBLC, CCDC6, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD274, CD38, CD52, CD58, CD79A, CD79B, CD82, CDC73, CDH1, CDH11, CDH2, CDK12, CDK4, CDK6,

CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CEP57, CHD1, CHD2, CHD4, CHEK1, CHEK2, CIC, CIITA, CKS1B, CNOT3, COL1A1, COMMD1, CREB1, CREBBP, CRKL, CRTC1, CRTC2, CSF1R, CSF2, CSF3R, CSMD1, CSNK1A1, CTCF, CTLA4, CTNNA1, CTNNB1, CUL4B, CUX1, CXCR4, CYLD, CYP2A7, DAXX, DCC, DDB2, DDR1, DDR2, DDX11, DDX3X, DDX41, DEK, DHFR, DICER1, DIS3, DIS3L2, DKC1, DNMT1, DNMT3A, DOT1L, DPYD, EBP, EGFR, EGLN1, EGR2, EGR3, ELAC2, ELANE, ELF3, EML4, EP300, EPAS1, EPCAM, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHB4, EPHB6, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ERRFI1, ESR1, ESR2, ETNK1, ETS1, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, EXO1, EXT1, EXT2, EZH1, EZH2, FAM175A, FAM46C, FAN1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAS, FAT1, FBXW7, FES, FGF10, FGF14, FGF19, FGF2, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGFBP1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FH, FKBP1A, FLCN, FLI1, FLT1, FLT4, FOXA1, FOXA2, FOXE1, FOXL2, FOXO1, FOXO3, FOXP1, FOXQ1, FRK, FRS2, FUBP1, FUS, FYN, G6PD, GABRA6, GALNT12, GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA6, GLDN, GLI1, GLI2, GNA11, GNA13, GNAQ, GNAS, GPC3, GPER1, GPR124, GREM1, GRIN2A, GRM3, GSK3A, H3F3A, HCK, HGF, HIF1A, HIST1H3B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLF, HMGA2, HMGN1, HMOX2, HNF1A, HNF1B, HOXB13, HOXD8, HRAS, HSD3B1, HSP90AA1, HSP90AB1, ID3, IDH1, IDH2, IFNGR1, IFNGR2, IGF1R, IGF2, IGF2R, IKBKB, IKBKE, IKZF1, IKZF3, IL1B, IL1RN, IL2, IL21R, IL6, IL6ST, IL7R, ING4, INPP4B, INPPL1, IRF1, IRS2, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KAT6A, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KEAP1, KIAA1549, KIT, KLF2, KLF4, KLHDC8B, KLHL6, KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, KRAS, LATS1, LATS2, LCK, LIG4, LIMK2, LMO1, LRP1B, LRRK2, LTK, LYN, LZTR1, MAD2L2, MAFB, MAGEA1, MAGI1, MAGI2, MAML1, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3, MAP2K4, MAP2K5, MAP2K6, MAP2K7, MAP3K1, MAP3K14, MAP3K3, MAP3K4, MAP3K6, MAPK1, MAPK11, MAPK12, MAPK3, MAPK8IP1, MAX, MBD1, MC1R, MCL1, MDC1, MDM2, MDM4, MECOM, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MGA, MGMT, MITF, MLH1, MLH3, MLLT10, MLLT3, MN1, MPL, MRE11A, MS4A1, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5,

MSH6, MSR1, MST1R, MTHFR, MTOR, MTRR, MUC1, MUC16, MUTYH, MXI1, MYB, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, NBN, NCOA1, NCOA3, NCOR1, NF1, NF2, NFE2L2, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, NIN, NLRC5, NOP10, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1I3, NRAS, NRG2, NSD1, NT5C2, NTHL1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUMA1, NUP98, PAK3, PALB2, PALLD, PARK2, PARP1, PARP2, PARP4, PAX3, PAX5, PAX7, PBK, PBRM1, PBX1, PDCD1, PDCD1LG2, PDF, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PDGFRA, PDGFRB, PDK1, PGR, PHF6, PHOX2B, PIAS4, PIGA, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2G, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIM1, PKHD1, PLCG1, PLCG2, PML, PMS1, PMS2, POLD1, POLE, POLH, POLQ, POT1, PPM1D, PRDM1, PRDM16, PREX2, PRF1, PRKAR1A, PRKCA, PRKD1, PRKDC, PROM2, PRSS1, PRX, PSIP1, PSMB1, PSMB10, PSMB2, PSMB5, PSMB8, PSMB9, PSMC3IP, PSPH, PTCH1, PTCH2, PTEN, PTGS2, PTK2, PTK7, PTPN11, PTPRC, PTPRD, PTPRT, RAC1, RAC2, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54B, RAD54L, RAF1, RALGDS, RARA, RARB, RARG, RASA1, RASAL1, RB1, RBM10, RECQL4, REL, RET, RFC2, RFX5, RHBDF2, RHEB, RHOA, RICTOR, RINT1, RIPK1, RIT1, RNASEL, RNF2, RNF43, ROS1, RPL22, RPS20, RPS6KB1, RPTOR, RSF1, RUNX1, RYR1, SACS, SAMHD1, SAV1, SBDS, SCG5, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SEC23B, SEMA4A, SETBP1, SETD2, SETDB1, SF3B1, SGK1, SH2B1, SH2B3, SH2D1A, SHFM1, SHH, SIK2, SIN3A, SIRT1, SKP2, SLC26A3, SLIT2, SLX4, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMC1A, SMC3, SMO, SOCS1, SOX11, SOX2, SOX9, SPEN, SPINK1, SPOP, SPRED1, SPTA1, SRC, SRD5A2, SRGAP1, SRP72, SRSF2, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, SSX1, STAG1, STAG2, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, STK11, SUFU, SUZ12, SYK, TAF1, TAF15, TAP1, TAP2, TBK1, TBL1XR1, TBX3, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TEK, TERC, TERF2IP, TERT, TET1, TET2, TFE3, TGFB2, TLR4, TLX1, TMEM127, TNF, TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF25, TNFRSF8, TNFSF11, TNK2, TOP1, TOP2A, TP53, TP53BP1, TPX2, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6, TRAF7, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, TUBA4A, TUBB, TYMS, U2AF1, UBE2T, UBR5, UGT2B15, UGT2B7, UIMC1, UNG, USP34,

USP9X, VEGFA, VEGFB, VHL, VKORC1, WAS, WASF3, WHSC1, WISP3, WRN, WT1, XIAP, XPA, XPC, XPO1, XRCC1, XRCC2, XRCC3, XRCC5, XRCC6, YAP1, ZFH3, ZHX3, ZNF217, ZNRF3, ZRSR2

7.1.2 Personenbezogene und klinische Merkmale

- Geschlecht, Geburtsdatum und Alter zum Zeitpunkt der Liquorentnahme
- Diagnose
- Lokalisation des abzuklärenden Tumors/der abzuklärenden ZNS-Beteiligung einer Tumorerkrankung
- Vorliegen einer histologischen Sicherung des ZNS-Tumors/der ZNS-Beteiligung einer Tumorerkrankung
- in Bildgebung festgestellte Schrankenstörung und deren Angrenzung an die inneren Liquorräume
- Vorliegen der/des abzuklärenden Tumors /ZNS-Beteiligung einer Tumorerkrankung als Rezidiv/Progress oder Erstdiagnose zum Zeitpunkt der Liquorentnahme
- Vorliegen einer Meningeosis neoplastica
- Datum der Erstdiagnose von Tumorerkrankung und von ZNS-Beteiligung
- gegebenenfalls Datum des 1. Rezidivs
- Datum, Ort und Art der Liquorentnahme (lumbal oder über Shunt, intraoperativ oder stationär)
- Auswertung der Liquorproben
 - Proteinerhöhung (>45 mg/dl)
 - Pleozytose (>12/3 Zellen bzw. > 4 Zellen/µl Liquor)
 - Laktaterhöhung (>2,2 mmol/l)
 - Liquorzytologie (Ergebnis und Anzahl der durchgeführten Untersuchungen vor/inklusive der Entnahme des in dieser Fallserie untersuchten Liquors)
- Vortherapie vor Liquorentnahme
 - Operation der ZNS-Beteiligung vor Zeitpunkt der Liquorentnahme
 - Radiotherapie (RTx) und -dosis in Krankenvorgeschichte sowie explizit ZNS-RTx im Zeitraum von 6 Wochen vor Liquorentnahme

- Chemo-/Systemtherapie (für die Tumorerkrankung/ spezifisch für die ZNS-Beteiligung) in Krankenvorgeschichte sowie explizit im Zeitraum von 6 Wochen vor Liquorentnahme
- Steroidbehandlung innerhalb von 4 Wochen bis Tag der Liquorentnahme
- Bluttransfusionen und Transplantation vor Liquorentnahme
- Begleitmedikation am Tag und/oder Vortag der Liquorentnahme
- Datum und Durchführungsort der Operation(en), bei der/denen die untersuchten Gewebeproben gewonnen wurden
- Ursprung der Gewebeproben
- Überleben (Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben bis zum Stichtag 29.10.2019) und ggf. Erfassung der Todesdaten der Patienten

7.2 Anhang Ergebnisse

Anhang-Tabelle X 1: Übersicht aller im Gewebe nachgewiesenen Mutationen, sortiert nach Gen-Namen (N = 17 Patienten)

Legende: **hellrosa** = Gen durch Liquor-Panel abgedeckt, aber nicht als Variante in Liquor-cfDNA vorliegend, **dunkelrosa** = Gen durch Liquor-Panel abgedeckt und als Variante in Liquor-cfDNA vorliegend, + = ja/vorliegend, – = nein/nicht vorliegend.

Abkürzungen: Astro = Astrozytom, Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom WHO-Grad IV, ID = Identifikationsnummer, LK = Lymphknoten, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, O = ONC.1-Panel, Oligo = Oligodendrogliom, Pat = Patient(en), Rez = Rezidiv/Progress, SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom, T = TUM.4-Panel, UR = underrepresented, Regionen mit Coverage <30, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe	(Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
ANKRD26	10	missense	p.P430S	c.1288C>T	33,43	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED		O	–	–	0,00	0	98,19
APC	5	frameshift	p.E1550Kfs*14	c.4648_4651delGAGA	85,03	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED		O	+	+	46,46	254	0,27
ARID1A	1	missense	p.P690R	c.2069C>G	6,59	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez		T	+	–	0,06	1779	0,16
ATG2B	14	missense	p.R107C	c.319C>T	16,67	cf030	Rez	Astro WHO II ED		O	–	–	0,00	6	0,00
ATM	11	missense	p.K2302T	c.6905A>C	38,63	cf023	Rez	GBM ED		T	+	+	28,83	111	2,37
ATRX	X	frameshift	p.E1314Gfs*9	c.3941_3942delAG	76,99	cf020	ED	GBM ED		O	–	–	0,00	2	0,67
ATRX	X	frameshift	p.D1940Vfs*14	c.5819_5822delATAG	25,95	cf023	Rez	GBM ED		T	+	+	24,49	98	2,37
AURKC	19	frameshift	p.S32Qfs*11	c.93dupC	6,41	cf030	Rez	Astro WHO II ED		O	–	–	0,00	8	0,00
AXL	19	splice_region	p.G482E	c.1445G>A	31,89	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED		O	–	–	0,00	0	98,19
BCL9	1	missense	p.G1422V	c.4265G>T	19,45	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED		O	–	–	0,00	1	98,19

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
BCORL1	X	stop_gain ed	p.R1196*	c.3586C>T	12,40	cf016	ED	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	0,21
BRAF	7	missense	p.V600E	c.1799T>A	6,20	cf028	ED	GBM ED	O	+	-	0,07	11546	0,00
BRAF	7	missense	p.D594N	c.1780G>A	94,00	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	+	+	72,58	372	0,27
BRCA2	13	essential_splice_site	p.?	c.9502-9_9502-2del	5,11	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	0,00	1472	0,16
BRCA2 (Keimbahn)	13	missense	p.N277K	c.831T>G	48,40	cf011	Rez	GBM ED	O	+	+	57,70	440	0,11
BRCA2 (Keimbahn)	13	missense	p.N277K	c.831T>G	46,20	cf011	Rez	GBM Rez	O	+	+	57,70	440	0,11
C11orf30	11	frameshift	p.T968Lfs*68	c.2902delA	36,98	cf011	Rez	GBM Rez	O	-	-	0,00	0	0,11
CDKN2A	9	missense	p.V82E	c.245T>A	37,02	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	2	98,19
CDKN2A	9	splice_region	p.?	c.150+5G>C	37,94	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	0	98,19
CEP57	11	missense	p.E359G	c.1076A>G	33,33	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
CHD2	15	missense	p.A877D	c.2630C>A	38,10	cf022	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	15,33
CIC	19	missense	p.R201W	c.601C>T	79,31	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	1,89	951	0,16
CSMD1	8	missense	p.S3000L	c.8999C>T	36,49	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
CSMD1	8	missense	p.S2626F	c.7877C>T	28,34	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
CSMD1	8	missense	p.D547N	c.1639G>A	30,09	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
CSMD1	8	missense	p.P352S	c.1054C>T	31,78	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
CTNNB1	3	missense	p.S33F	c.98C>T	33,83	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	+	-	0,15	1943	0,00
DAXX	6	splice_region	p.?	c.1252-5C>T	26,55	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
DCC	18	missense	p.R961H	c.2882G>A	28,00	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	1	3,56
DDX3X	X	missense	p.D347G	c.1040A>G	68,11	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	3	98,19
DICER1	14	missense	p.I900L	c.2698A>C	18,92	cf003	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,68
DIS3	13	missense	p.R780T	c.2339G>C	39,36	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	3,56
DNMT1	19	missense	p.P1115S	c.3343C>T	33,00	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
DNMT1	19	splice_region	p.?	c.118-7C>T	31,06	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	4	98,19
EPHA4	2	splice_region	p.=	c.2136G>A	32,48	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
EPHB6	7	missense	p.P493S	c.1477C>T	53,12	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
ERCC4	16	splice_region	p.E636K	c.1906G>A	16,84	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	3,56
ESR1	6	missense	p.A67T	c.199G>A	19,02	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	+	-	0,07	1385	0,00
ESR2	14	missense	p.D303N	c.907G>A	41,67	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	1	0,27
EXO1	1	missense	p.E89D	c.267G>C	22,22	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,27
EXT2	11	stop_gain ed	p.W586*	c.1757G>A	13,89	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	-	-	0,00	5	0,00
EZH2	7	missense	p.T465I	c.1394C>T	22,53	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
EZH2	7	missense	p.R358G	c.1072C>G	23,88	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
FANCD2	3	essential_splice_site	p.?	c.2715+1G>A	16,89	cf020	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,67
FGFR1	8	missense	p.V295M	c.883G>A	14,30	cf026	Rez	GBM ED	O	+	-	0,26	391	0,43

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
FUBP1	1	missense	p.G461E	c.1382G>A	33,73	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
FUBP1	1	missense	p.P175S	c.523C>T	31,20	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
GLI1	12	missense	p.L221F	c.661C>T	36,63	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
GPC3	X	missense	p.D204H	c.610G>C	8,38	cf016	ED	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	0,21
GPR124	8	missense	p.P871L	c.2612C>T	10,97	cf013	Rez	Meningeom WHO I Rez	O	-	-	0,00	0	0,24
GRIN2A	16	missense	p.D1293N	c.3877G>A	24,15	cf026	Rez	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,43
GRIN2A	16	stop_gain	p.W837*	c.2511G>A	31,58	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
GRM3	7	missense	p.D63N	c.187G>A	35,15	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
HNF1A	12	missense	p.G323E	c.968G>A	30,73	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
IDH1	2	missense	p.R132H	c.395G>A	39,21	cf020	ED	GBM ED	O	+	-	0,00	375	0,67
IDH1	2	missense	p.R132H	c.395G>A	46,18	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	1,23	1296	0,16
IDH1	2	missense	p.R132C	c.394C>T	17,86	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	+	+	17,76	1458	0,00
IDH1	2	missense	p.R132H	c.395G>A	26,57	cf023	Rez	GBM ED	T	+	+	24,30	107	2,37
IFNGR1 (Keimbahn)	6	frameshift	p.W248Dfs*14	c.742_743deITG	31,25	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	-	-	0,00	3	0,00
IGF2R	6	splice_region	p.Q743P	c.2228A>C	7,19	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	3,56
JAK1	1	frameshift	p.K795Efs*7	c.2379dupC	33,27	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	2	98,19
KAT6A	8	missense	p.E1478K	c.4432G>A	35,56	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
KDM5A	12	stop_gain	p.R264*	c.790C>T	32,25	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
KIAA1549	7	missense	p.D1693G	c.5078A>G	6,56	cf031	Rez	Magen-Ca bei ED (vor ED ZNS-Beteiligung)	T	+	+	69,23	39	36,02
KLF2	19	missense	p.K285N	c.855G>C	29,46	cf016	ED	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	0,21
KLHDC8B	3	missense	p.G38D	c.113G>A	12,50	cf003	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,68
KMT2D	12	missense	p.S582F	c.1745C>T	33,07	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
KRAS	12	missense	p.V14I	c.40G>A	18,58	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	+	+	14,69	497	0,27
LIG4	3	missense	p.P493L	c.1478C>T	32,78	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
LRP1B	2	missense	p.P2872H	c.8615C>A	48,51	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	1	0,27
LRP1B	2	missense	p.R2443C	c.7327C>T	44,64	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,27
LRP1B	2	missense	p.G2790E	c.8369G>A	30,40	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
LRP1B	2	missense	p.S2508F	c.7523C>T	34,80	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
LRP1B	2	splice_region	p.?	c.3964+4C>T	14,74	cf026	Rez	GBM ED	O	-	-	0,00	2	0,43
MED12	X	splice_region	p.?	c.100-8_100-7insAGGA	33,82	cf023	Rez	GBM ED	T	+	+	9,21	76	2,37
MET	7	missense	p.L185F	c.553C>T	33,99	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	28	98,19
MET	7	missense	p.A5T	c.13G>A	7,58	cf028	ED	GBM ED	O	+	+	7,90	13288	0,00
MGA	15	stop_gain	p.R618*	c.1852C>T	22,66	cf004	ED	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,09
MITF	3	stop_gain	p.K43*	c.127A>T	36,02	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
MUC16	19	missense	p.M10965T	c.32894T>C	24,19	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,27
MUC16	19	missense	p.E11176K	c.33526G>A	37,14	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MUC16	19	missense	p.P9404S	c.28210C>T	31,41	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
MUC16	19	missense	p.P6146S	c.18436C>T	34,18	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MUC16	19	missense	p.E4605K	c.13813G>A	36,43	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MUC16	19	missense	p.A1063T	c.3187G>A	31,28	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MUC16	19	missense	p.P664L	c.1991C>T	32,51	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MUC16	19	missense	p.D292N	c.874G>A	30,34	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
MYH11	16	missense	p.H282Q	c.846C>G	21,43	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	-	-	0,00	4	0,00
NF1	17	frameshift	p.T2175R fs*5	c.6522_6523dupGA	11,96	cf026	Rez	GBM ED	O	+	-	0,10	981	0,43
NF1	17	frameshift	p.S2096P fs*29	c.6285_6297del	71,43	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	+	+	75,21	476	0,27
NF1	17	splice_region	p.?	c.1528-8C>T	34,58	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	0	98,19
NF2	22	inframe	p.F119del	c.357_359delCTT	58,12	cf013	Rez	Meningeom WHO I Rez	O	+	-	0,00	462	0,24
NFKB1	4	missense	p.P648S	c.1942C>T	32,23	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
NFKBIE	6	missense	p.G34E	c.101G>A	26,06	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
NRAS	1	missense	p.Q61R	c.182A>G	34,35	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	5	98,19
PBRM1	3	stop_gain	p.Q841*	c.2521C>T	58,41	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	+	-	0,35	2278	3,56
PIK3C2G	12	missense	p.V605I	c.1813G>A	67,07	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	1	0,27
PIK3C2G	12	missense	p.G923R	c.2767G>A	33,48	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
PIK3CA	3	missense	p.E542K	c.1624G>A	92,79	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	+	+	80,92	283	0,27
PIK3CB	3	missense	p.M73I	c.219G>C	8,00	cf003	ED	GBM ED	O	-	-	0,0	0	0,68
PIK3CB	3	missense	p.R668W	c.2002C>T	33,81	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
PIK3R1	5	inframe	p.M563_S565del	c.1689_1697del	10,87	cf026	Rez	GBM ED	O	+	-	0,00	407	0,43
PIK3R1	5	inframe	p.F456_Q457del	c.1365_1370delGTTTCA	31,85	cf023	Rez	GBM ED	T	+	+	10,00	50	2,37
PIK3R1	5	missense	p.L570P	c.1709T>C	39,93	cf020	ED	GBM ED	O	+	-	0,38	260	0,67
PIK3R3 (Keimbahn)	1	frameshift	p.K293I fs*4	c.876_877dupTA	33,79	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	-	-	0,00	1	0,00
PIK3R3	1	stop_retained	p.=	c.1386_*25del	13,02	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
PKHD1	6	missense	p.P1547S	c.4639C>T	41,74	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,27
PKHD1	6	missense	p.E550K	c.1648G>A	23,76	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
PKHD1	6	missense	p.S523I	c.1568G>T	35,91	cf022	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	15,33
PLCG2	16	missense	p.S225L	c.674C>T	17,86	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	-	-	0,00	0	0,00
POLQ	3	frameshift	p.V380A fs*4	c.1129_1136dup	5,74	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	2	0,27
POLQ	3	missense	p.A1098T	c.3292G>A	16,35	cf004	ED	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,09
PREX2	8	missense	p.S658L	c.1973C>T	31,68	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
PREX2	8	missense	p.S1293N	c.3878G>A	35,91	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
PREX2	8	splice_region	p.G705E	c.2114G>A	34,10	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
PTEN	10	essential_splice_site	p.?	c.634+2T>C	52,04	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	+	-	0,00	0	98,19

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
PTEN	10	frameshift	p.Q298Kfs*9	c.892delC	25,18	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	+	-	0,00	1437	3,56
PTEN	10	missense	p.K128N	c.384G>C	26,60	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	+	-	0,20	489	3,56
PTEN	10	splice_region	p.G165E	c.494G>A	43,46	cf028	ED	GBM ED	O	+	+	10,64	7809	0,00
PTPN11	12	missense	p.F71L	c.211T>C	7,69	cf028	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,00
PTPRT	20	missense	p.T1118I	c.3353C>T	34,15	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
PTPRT	20	missense	p.D924G	c.2771A>G	31,05	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
PTPRT	20	missense	p.W923G	c.2767T>G	31,22	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
RAD50	5	missense	p.H530Y	c.1588C>T	33,07	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
RAD54B	8	missense	p.E533D	c.1599A>C	37,98	cf013	Rez	Meningeom WHO I Rez	O	-	-	0,00	1	0,24
RINT1	7	missense	p.L209I	c.625C>A	6,28	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	0,08	1249	0,16
RNF2	1	frameshift	p.P324Wfs*30	c.970_973delCCCA	6,21	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	0,00	1639	0,16
ROS1	6	missense	p.D2249N	c.6745G>A	31,05	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
ROS1	6	missense	p.A2081V	c.6242C>T	43,69	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	-	2,13	937	0,16
RYR1	19	missense	p.G1704C	c.5110G>T	40,82	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	-	-	0,00	0	3,56
RYR1	19	missense	p.E4868K	c.14602G>A	27,96	cf011	Rez	GBM ED	O	-	-	0,00	2	0,11
RYR1	19	missense	p.E4868K	c.14602G>A	31,12	cf011	Rez	GBM Rez	O	-	-	0,00	2	0,11
RYR1	19	missense	p.G2160S	c.6478G>A	30,43	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	-	-	0,00	0	0,00
RYR1	19	splice_region	p.?	c.10627-4C>T	34,36	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
SLC26A3	7	missense	p.G739E	c.2216G>A	34,11	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
SLC26A3	7	missense	p.V340I	c.1018G>A	20,55	cf028	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,00
SMARCA4	19	frameshift	p.D1086Wfs*27	c.3236_3257insGGGTA AATTTGAG CTTCTTT	6,25	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
SMARCA4	19	missense	p.H884L	c.2651A>T	31,71	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
SPRED1	15	stop_gained	p.R16*	c.46C>T	48,89	cf028	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,00
SPTA1	1	missense	p.R557G	c.1669C>G	36,64	cf020	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,67
SRC	20	missense	p.R208L	c.623G>T	19,88	cf004	ED	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	O	+	-	0,53	374	0,09
SSTR1	14	missense	p.G5D	c.14G>A	33,63	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
SSTR2	17	missense	p.N276H	c.826A>C	37,70	cf022	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	15,33
SSTR3	22	stop_gained	p.R203*	c.607C>T	41,79	cf011	Rez	GBM ED	O	-	-	0,00	2	0,11
SSTR3	22	stop_gained	p.R203*	c.607C>T	42,61	cf011	Rez	GBM Rez	O	-	-	0,00	2	0,11
SUZ12	17	essential_splice_site	p.?	c.1294-1G>C	6,85	cf028	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	3	0,00
TAP1	6	missense	p.L114M	c.340C>A	21,05	cf027	ED	Medullo WHO IV bei ED	O	-	-	0,00	1	0,00
TBX3	12	stop_gained	p.Q229*	c.685C>T	69,29	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	-	-	0,00	0	0,27
TCL1A	14	missense	p.D113H	c.337G>C	33,90	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
TET1	10	missense	p.H2035Y	c.6103C>T	17,65	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	-	-	0,00	9	0,00
TLR4	9	missense	p.L18F	c.52C>T	34,78	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
TNFSF11	13	missense	p.P301L	c.902C>T	14,75	cf026	Rez	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,43
TOP2A	17	missense	p.R878H	c.2633G>A	45,51	cf028	ED	GBM ED	O	-	-	0,00	0	0,00

Gen	Chromosom	Konsequenz der Punktmutation	Aminosäureaustausch	Basenaustausch	Allelfrequenz im Gewebe (%)	Patienten-ID	Status der ZNS.-Bet. bei Liquorentnahme	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Liquor-cfDNA-Panel	Gen im cfDNA-Panel	Variante in Liquor-cfDNA	Allelfrequenz im Liquor (%)	Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA (%)
TP53	17	frameshift	p.K292Efs*14	c.872dupA	86,11	cf006	Rez	ZNS-Met Duodenal-Ca bei ED	O	+	+	66,48	349	0,27
TP53	17	inframe	p.H179_E180del	c.536_541delATGAGC	69,29	cf020	ED	GBM ED	O	+	+	4,56	548	0,67
TP53	17	missense	p.E11K	c.31G>A	20,73	cf026	Rez	GBM ED	O	+	-	0,00	190	0,43
TP53	17	missense	p.C275Y	c.824G>A	79,86	cf022	ED	GBM ED	O	+	-	6,06	33	15,33
TP53	17	missense	p.R273C	c.817C>T	91,30	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	+	-	27,49	1375	0,00
TP53	17	missense	p.Y234D	c.700T>G	82,99	cf023	Rez	GBM ED	T	+	+	33,33	63	2,37
TP53	17	missense	p.R110P	c.329G>C	62,86	cf016	ED	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	O	+	+	72,16	589	0,21
TP53BP1	15	missense	p.P420L	c.1259C>T	32,99	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
TRAF7	16	missense	p.T460I	c.1379C>T	35,84	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19
VEGFB	11	splice_region	p.P126L	c.377C>T	12,50	cf030	Rez	Astro WHO II ED	O	-	-	0,00	7	0,00
VHL	3	missense	p.R79P	c.236G>C	61,90	cf007	ED	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	O	+	-	1,54	65	3,56
VKORC1	16	missense	p.R90C	c.268C>T	34,48	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	4	98,19
XIAP	X	3_prime_UTR	k. A.	c.*6C>T	68,39	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	2	98,19
XPC (Keimbahn)	3	missense	p.E755K	c.2263G>A	52,10	cf017	Rez	Oligo WHO III Rez	T	+	+	44,90	1137	0,16
ZFHX3	16	missense	p.P211L	c.632C>T	35,95	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	1	98,19
ZFHX3	16	stop_gain ed	p.R1439*	c.4315C>T	29,30	cf018	ED	ZNS-Met Melanom bei ED	O	-	-	0,00	0	98,19

Anhang-Tabelle X 2: Übersicht der im Gewebe mutierten Gene sortiert nach Gewebeart

Abkürzungen: ZNS = Zentrales Nervensystem.

Gene, die ausschließlich in ZNS-Gewebeproben mutiert vorlagen			Gene, die ausschließlich in Extra-ZNS-Gewebeproben mutiert vorlagen	Gene, die in beiden Arten von Gewebeproben mutiert vorlagen
ANKRD26	HNF1A	RNF2	BCORL1	PTEN
APC	IDH1	ROS1	DCC	RYR1
ARID1A	IFNGR1	SLC26A3	DIS3	TP53
ATG2B	JAK1	SMARCA4	ERCC4	
ATM	KAT6A	SPRED1	GPC3	
ATRX	KDM5A	SPTA1	IGF2R	
AURKC	KLHDC8B	SRC	KIAA1549	
AXL	KMT2D	SSTR1	KLF2	
BCL9	KRAS	SSTR2	PBRM1	
BRAF	LIG4	SSTR3	VHL	
BRCA2	LRP1B	SUZ12		
C11ORF30	MED12	TAP1		
CDKN2A	MET	TBX3		
CEP57	MGA	TCL1A		
CHD2	MITF	TET1		
CIC	MUC16	TLR4		
CSMD1	MYH11	TNFSF11		
CTNNB1	NF1	TOP2A		
DAXX	NF2	TP53BP1		
DDX3X	NFKB1	TRAF7		
DICER1	NFKBIE	VEGFB		
DNMT1	NRAS	VKORC1		
EPHA4	PIK3C2G	XIAP		
EPHB6	PIK3CA	XPC		
ESR1	PIK3CB	ZFHX3		
ESR2	PIK3R1			
EXO1	PIK3R3			
EXT2	PKHD1			
EZH2	PLCG2			
FANCD2	POLQ			
FGFR1	PREX2			
FUBP1	PTPN11			
GLI1	PTPRT			
GPR124	RAD50			
GRIN2A	RAD54B			
GRM3	RINT1			

Anhang-Tabelle X 3: Übersicht der im Gewebe mutierten Gene sortiert nach Diagnosegruppe

Abkürzungen: ZNS = Zentrales Nervensystem.

Gene, die ausschließlich in Gewebeproben von hirneigenen Tumoren mutiert vorlagen		Gene, die ausschließlich in Gewebeproben von Patienten mit solidem Tumor + ZNS-Beteiligung mutiert vorlagen		Gene, die in Gewebeproben beider Diagnosegruppen mutiert vorlagen
ARID1A	TNFSF11	ANKRD26	MUC16	BRAF
ATG2B	TOP2A	APC	NFKB1	GRIN2A
ATM	VEGFB	AXL	NFKBIE	LRP1B
ATRX	XPC	BCL9	NRAS	MET
AURKC		BCORL1	PBRM1	NF1
BRCA2		CDKN2A	PIK3C2G	PIK3CB
C11ORF30		CEP57	PIK3CA	PIK3R3
CHD2		CSMD1	POLQ	PKHD1
CIC		DAXX	PREX2	PTEN
CTNNB1		DCC	PTPRT	ROS1
DICER1		DDX3X	RAD50	RYR1
ESR1		DIS3	SMARCA4	SLC26A3
EXT2		DNMT1	SRC	TP53
FANCD2		EPHA4	SSTR1	
FGFR1		EPHB6	TBX3	
GPR124		ERCC4	TCL1A	
IDH1		ESR2	TLR4	
IFNGR1		EXO1	TP53BP1	
KLHDC8B		EZH2	TRAF7	
MED12		FUBP1	VHL	
MYH11		GLI1	VKORC1	
NF2		GPC3	XIAP	
PIK3R1		GRM3	ZFHX3	
PLCG2		HNF1A		
PTPN11		IGF2R		
RAD54B		JAK1		
RINT1		KAT6A		
RNF2		KDM5A		
SPRED1		KIAA1549		
SPTA1		KLF2		
SSTR2		KMT2D		
SSTR3		KRAS		
SUZ12		LIG4		
TAP1		MGA		
TET1		MITF		

Anhang-Tabellen X 4-6: Übersicht aller im Gewebe nachgewiesenen Struktur- und Kopienzahlvarianten (CNVs), sortiert nach Gen-Namen (N = 17 Patienten)

Anhang-Tabelle X 4: Amplifikationen in Gewebeproben, sortiert nach Gen-Namen (von N = 17 Patienten)

Abkürzungen: Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom WHO-Grad IV, ID = Identifikationsnummer, Medullo = Medulloblastom, Met = Metastase, Pat = Patient(en), Rez = Rezidiv/Progress, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Gen	Chromosom	Art der Amplifikation	Kopienanzahl	Patienten- ID	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Panel Gewebe-Sequenzierung
AR	X	nicht fokal	3	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4
BCL9	1	nicht fokal	3	cf027	Medullo WHO IV bei ED	TUM.4
CDK4	12	nicht fokal	>10	cf022	GBM ED	TUM.4
CDK6	7	nicht fokal	3	cf028	GBM ED	TUM.4
EGFR	7	nicht fokal	10	cf011	GBM ED und GBM Rez	TUM.4
EGFR	7	nicht fokal	3	cf022	GBM ED	TUM.4
EGFR	7	nicht fokal	3	cf023	GBM ED	TUM.4
EGFR	7	nicht fokal	3	cf028	GBM ED	TUM.4
GATA3	10	fokal	4	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4
GLI1	12	nicht fokal	>10	cf022	GBM ED	TUM.4
KDR	4	fokal	4	cf020	GBM ED	TUM.4
KIT	4	fokal	4	cf020	GBM ED	TUM.4
MET	7	fokal	5	cf028	GBM ED	TUM.4
MTOR	1	fokal	3-4	cf031	Magen-Ca bei ED (vor ED ZNS-Beteiligung)	TUM.4
MUC1	1	nicht fokal	4	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4
NOTCH1	9	nicht fokal	3	cf023	GBM ED	TUM.4
PIK3CD	1	fokal	3-4	cf031	Magen-Ca bei ED (vor ED ZNS-Beteiligung)	TUM.4

Anhang-Tabelle X 5: Deletionen in Gewebeproben, sortiert nach Gen-Namen (von N =17 Patienten)

Abkürzungen: Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom WHO-Grad IV, ID = Identifikationsnummer, Met = Metastase, Oligo = Oligodendrogliom, Rez = Rezidiv/Progress, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Gen	Chromosom	Art der Deletion	Zygotie	Homozygoter Verlust durch SNVs und CNVs des Gens	Patienten-ID	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Panel Gewebe-Sequenzierung
B2M	15	nicht fokal	heterozygot	nein	cf028	GBM ED	TUM.4
BRCA1	17	nicht fokal	heterozygot	nein	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4
BRCA1	17	nicht fokal	heterozygot	nein	cf028	GBM ED	TUM.4
BRCA2	13	nicht fokal	heterozygot	nein	cf020	GBM ED	TUM.4
CDKN2A	9	fokal	homozygot	ja	cf007	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	TUM.4
CDKN2A	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf017	Oligo WHO III Rez	TUM.4
CDKN2A	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf020	GBM ED	TUM.4
CDKN2A	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf023	GBM ED	TUM.4
CDKN2A	9	fokal	homozygot	ja	cf028	GBM ED	TUM.4
CDKN2B	9	fokal	homozygot	ja	cf007	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	TUM.4
CDKN2B	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf017	Oligo WHO III Rez	TUM.4
CDKN2B	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf020	GBM ED	TUM.4
CDKN2B	9	nicht fokal	heterozygot	nein	cf023	GBM ED	TUM.4
CDKN2B	9	fokal	homozygot	ja	cf028	GBM ED	TUM.4
CDKN2C	1	fokal	homozygot	ja	cf028	GBM ED	TUM.4
CIC	19	nicht fokal	heterozygot	ja	cf017	Oligo WHO III Rez	TUM.4
MSH4	1	nicht fokal	heterozygot	nein	cf007	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	TUM.4
NF2	22	nicht fokal	heterozygot	ja	cf013	Meningeom WHO I Rez	TUM.4
PBRM1	3	nicht fokal	heterozygot	ja	cf007	periphere Met Nierenzell-Ca (synchron zu ED ZNS-Met)	TUM.4
PIK3R1	5	nicht fokal	heterozygot	nein	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4
PIK3R1	5	nicht fokal	heterozygot	nein	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4
PIK3R1	5	nicht fokal	heterozygot	nein	cf022	GBM ED	TUM.4
POLH	6	nicht fokal	heterozygot	nein	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4
PTEN	10	nicht fokal	heterozygot	nein	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4
PTEN	10	nicht fokal	heterozygot	ja	cf018	ZNS-Met Melanom bei ED	TUM.4
PTEN	10	nicht fokal	heterozygot	nein	cf022	GBM ED	TUM.4
PTEN	10	nicht fokal	heterozygot	ja	cf028	GBM ED	TUM.4

Gen	Chromosom	Art der Deletion	Zygotie	Homozygoter Verlust durch SNVs und CNVs des Gens	Patienten-ID	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Panel Gewebe-Sequenzierung
RB1	13	fokal	homozygot	ja	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4
TP53	17	nicht fokal	heterozygot	nein	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4
TP53	17	nicht fokal	heterozygot	ja	cf016	Stanze Mamma-Ca ED (vor ED ZNS-Met)	TUM.4

Anhang-Tabelle X 6: Strukturvarianten in Gewebeproben, sortiert nach Gen-Namen (von N =17 Patienten)

Abkürzungen: Ca = Karzinom, ED = Erstdiagnose, ID = Identifikationsnummer, Met = Metastase.

Gen	Chromosom	Art der Strukturvariante	Variante	Patienten-ID	Art der sequenzierten Gewebeprobe (Diagnose und Zeitpunkt)	Panel Gewebe-Sequenzierung
TMPRSS2-ETV1	21 7	Translokation	TMPRSS2 Intron 2 ETV1 Intron 7	cf004	epidurale Met Prostata-Ca bei ED	TUM.4

Anhang-Tabelle X 7: Übersicht der potentiell in Liquor-cfDNA nachweisbaren Tumorgewebe-Mutationen, sortiert nach Gruppen (N =17 Patienten)

Erläuterungen: + = ja/vorliegend, – = nein/nicht vorliegend.

Abkürzungen: Astro = Astrozytom, Bet = Beteiligung, BWK = Brustwirbelkörper, Ca = Karzinom, cfDNA = cell-free DNA, ED = Erstdiagnose, GBM = Glioblastom WHO-Grad IV, ID = Identifikationsnummer, LK = Lymphknoten, M = männlich, Mb = Megabase, Medullo = Medulloblastom, Mut = Mutationen, neg = negativ, O = ONC.1-Panel (81 Gene), Oligo = Oligodendrogliom, Pat = Patient(en), pos = positiv, Rez = Rezidiv/Progress, T = TUM.4-Panel (710 Gene), UR = underrepresented, Regionen mit Coverage <30, W = weiblich, WHO = World Health Organization, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Patienten-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	Status der ZNS-Bet. bei Liquorentnahme	Schrankenstörung	Angrenzung an innere Liquorräume	Atyp. Zellen in Liquor-Zytologie (U-Anzahl)	Pleozytose	Protein erhöht	Laktat erhöht	Art der sequenz. Gewebeprobe	(Diagnose und Zeitpunkt) und deren geschätzte Mutationslast	Chromosom	Gen	Keimbahnmutation	Konsequenz der Punktmutation	Allel-Frequenz im Gewebe	Allel-Frequenz im Liquor	Liquor-cfDNA Variante	Durchschnitt Coverage Liquor-cfDNA	UR-Rate Liquor-cfDNA	cfDNA-Menge Liquor (ng)	Liquor-Volumen (ml)	Fragmentlänge (bp)
--------------	------------	---------------	----------	--	------------------	----------------------------------	---	------------	----------------	---------------	------------------------------	---	-----------	-----	------------------	------------------------------	--------------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------------------	----------------------	-------------------------	---------------------	--------------------

Gruppe 1: Gewebe mit TUM.4, Liquor mit TUM.4 (N = 3)

a) alle Gewebemutationen in Liquor vorliegend (N = 2)

cf023	W, 32	GBM	Rez	+	+	neg(1)	-	+	-	+	Primärtumor ZNS bei ED gering (2,6 Mut/Mb)	ATM	11	missense	-	missense	38,63%	28,83%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
											gering (2,6 Mut/Mb)	ATRX	X	frameshift	-	frameshift	25,95%	24,49%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
												IDH1	2	missense	-	missense	26,57%	24,30%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
												MED12	X	splice_region	-	splice_region	33,82%	9,21%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
												PIK3R1	5	inframe	-	inframe	31,85%	10,00%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
												TP53	17	missense	-	missense	82,99%	33,33%	+	97	2,37%	14,9	7,5	128	T
cf031	M, 38	Magen-Ca + Meningeosis	Rez	+	+	pos(1)	+	+	+	+	Magen-Ca bei dessen ED (vor ED ZNS-Beteiligung) gering (0,1 Mut/Mb)	KIAA1549	7	missense	-	missense	6,56%	69,23%	+	46	36,02%	207,5	1,65	181	T

b) nur 1 von 8 Gewebemutationen in Liquor vorliegend (N = 1)

cf017	M, 37	Oligo WHO III	Rez	+	+	k.A.(0)	+	+	-	-	Rezidivtumor ZNS gering (2,6 Mut/Mb)	ARID1A	1	missense	-	missense	6,59%	0,06%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
											gering (2,6 Mut/Mb)	BRCA2	13	essential_splice site	-	essential_splice site	5,11%	0,00%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												CIC	19	missense	-	missense	79,31%	1,89%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												IDH1	2	missense	-	missense	46,18%	1,23%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												RINT1	7	missense	-	missense	6,28%	0,08%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												RNF2	1	missense	-	missense	6,21%	0,00%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												ROS1	6	missense	-	missense	43,69%	2,13%	-	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T
												XPC	3	missense	+	missense	52,10%	44,90%	+	1269	0,16%	29,3	11,0	188	T

Gruppe 2: Gewebe mit TUM.4, Liquor mit ONC.1 (N = 13)

a) alle im Liquor potentiell nachweisbaren Gewebemutationen in Liquor vorliegend (N = 3)

cf006	W, 76	Duodenal-Ca + Met	Rez	+	-	neg(1)	-	+	-	-	ZNS-Met bei ED intermediär (11,1 Mut/Mb)	APC	5	frameshift	-	frameshift	85,03%	46,46%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
												BRAF	7	missense	-	missense	94,00%	72,58%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
												KRAS	12	missense	-	missense	18,58%	14,69%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
												NF1	17	frameshift	-	frameshift	71,43%	75,21%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
												PIK3CA	3	missense	-	missense	92,79%	80,92%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
												TP53	17	frameshift	-	frameshift	86,11%	66,48%	+	485	0,27%	7,7	2,0	179	O
cf011	M, 48	GBM	Rez	+	+	neg(1)	+	-	-	-	1.PE: Primärtumor ZNS bei ED gering (0,5 Mut/Mb) 2.PE: Rezidivtumor ZNS gering (1,6 Mut/Mb)	BRCA2	13	missense	+	missense	48,40%	57,70%	+	554	0,11%	7,7	2,5	227	O
												BRCA2	13	missense	+	missense	46,20%	57,70%	+	554	0,11%	7,7	2,5	227	O
cf016	W, 53	Mamma-Ca + Met	ED	+	-	neg(3)	-	-	-	-	Mammastanze bei ED des Ca (vor ED ZNS-Met) gering (1,1 Mut/Mb)	TP53	17	missense	-	missense	62,86%	72,16%	+	1504	0,21%	20,0	6,5	176	O

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Interdisziplinären Sektion Neuroonkologie der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai. Die Studie wurde von Dr. med. Irina Gepfner-Tuma (Assistenzärztin in der Interdisziplinären Sektion Neuroonkologie der Klinik für Neurologie) und Dr. rer. nat. Susanne C. Beck (Wissenschaftliche Koordinatorin in der Interdisziplinären Sektion Neuroonkologie der Klinik für Neurologie), auch als Mitbetreuende der medizinischen Dissertation, koordiniert.

Die Patientenidentifikation und organisatorische Vorbereitung der Proben-sammlung wurden nach Einarbeitung durch Dr. med. Irina Gepfner-Tuma von mir in Zusammenarbeit mit Mona Hirt (medizinische Doktorandin in der Interdisziplinären Sektion Neuroonkologie der Klinik für Neurologie) zu gleichen Teilen durchgeführt. Die Patientenaufklärung und Liquor-/Blutprobenentnahme erfolgte durch die jeweiligen Stationsärzte der neurologischen Stationen des UKT/der internistischen Stationen der Medizinischen Klinik Tübingen. Die Verarbeitung und Lagerung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Yeliz Donat (Medizinisch-technische Assistentin in der Neurochirurgischen Biobank des UKT) und den Mitarbeitern der Biobank des Hertie Instituts für Hirnforschung.

Die anschließende Sequenzierung der Gewebeproben sowie die Quantifizierung und Sequenzierung der cfDNA der Liquorproben erfolgte durch CeGaT GmbH (Leitung: Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup). Die Erläuterung dieser hauseigenen Methoden im Methodenteil dieser Arbeit ist angelehnt an methodische Beschreibungen, die durch CeGaT GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Die genetischen Daten wurden wiederholt von Dr. rer. nat. Magdalena Feldhahn (Mitarbeiterin von CeGaT GmbH), mir und Dr. med. Irina Gepfner-Tuma diskutiert und im Rahmen der weiteren Auswertung präzisiert, ergänzt oder korrigiert.

Die Erfassung aller klinischer Daten des Kollektivs in Form einer Datenbank erfolgte durch mich. Die Datenbankstruktur wurde von Dr. med. Irina Gepfner-Tuma entwickelt und von mir unter Supervision durch Dr. med. Irina Gepfner-Tuma weiterentwickelt. Die deskriptive statistische Auswertung sowie alle Tabellen, Diagramme und Abbildungen (außer Abbildungen 1 - 3) wurden von mir erstellt und nach Kontrolle durch Dr. med. Irina Gepfner-Tuma/Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai/Dr. rer. nat. Susanne C. Beck falls notwendig angepasst.

Abbildung 1 wurde von mir konzipiert und von Andreas Fachner unter Verwendung folgender Grafikelemente erstellt:

1. Kopf-Grafik von Tigatelu

(https://www.istockphoto.com/de/vektor/comic-abbildung-eines-menschlichen-inneren-gehirn-anatomie-gm514115130-87936621?asid=Eezy%2C%20LLC&cid=IS&clickid=SqxxT-yBfyOWnGOM-0V7wD0Uki0%3AnWFkUT11Q0&esource=AFF_IS_IR_Eezy%2C%20LLC_38919_&irgwc=1&utm_content=38919&utm_medium=affiliate&utm_source=Eezy%2C%20LLC [Zugriff 13.04.2020])

2. Reagenzglas-Grafik von GraphicsRF

(<https://www.vecteezy.com/vector-art/607701-set-of-blood-collection-tubes> [Zugriff 13.04.2020])

3. DNA-Icon von Icongeek26

(https://www.flaticon.com/free-icon/dna_2261112 [Zugriff 13.04.2020])

Die Abbildungen 2 und 3 sind Eigentum des Georg Thieme Verlags KG und durften mit dessen freundlicher Genehmigung in dieser Arbeit verwendet werden. Sie wurden nicht von mir erstellt oder modifiziert.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10.12.2020

9. Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Interdisziplinären Sektion Neuroonkologie am Universitätsklinikum Tübingen durchführen zu können.

Außerdem danke ich dem Team von CeGaT GmbH, insbesondere Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup und Dr. rer. nat. Magdalena Feldhahn, für die gute Zusammenarbeit, die diese Promotionsarbeit möglich gemacht hat.

Meinen Ansprechpartnerinnen Dr. med. Irina Gepfner-Tuma und Dr. rer. nat. Susanne Beck danke ich herzlichst für die engagierte und geduldige Begleitung in allen Phasen der Promotion.

Auch dem gesamten Team der Neuroonkologischen Ambulanz am Universitätsklinikum Tübingen danke ich für seine Hilfe bei Fragen und organisatorischen Problemen.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihr offenes Ohr, ihren Rückhalt und ihre Unterstützung von der ersten bis zur letzten Seite.