

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie (SIP)  
Direktor: Prof. Dr. Peter Wild

**Molekulare Tumorprofile einer retrospektiven Kohorte von  
Patient:innen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom im OncoNet  
Rhein Main**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Anne Jeute

Master of Science

aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Peter Wild  
Korreferent/in: Prof. Dr. Hans Tesch  
Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2023

## **Kurzfassung**

Das Verständnis von Tumorerkrankungen wurde durch neue technologische und ökonomische Verbesserungen für die Next-Generation-Sequencing Analyse (NGS) gefördert. Die Komplexität der Interpretation genomischer Daten erschwert jedoch die Anwendung von NGS-Analysen im klinischen Kontext. Die Herausforderung besteht darin bei stetig wachsendem medizinischem Wissen dieses im klinischen Kontext zu interpretieren und eine personalisierte Therapieempfehlung abzugeben. Einen ressourcensparenden Ansatz können KI-unterstützte Software-Programme bieten, welche die genomischen Varianten mit der aktuellen Literatur vergleichen, eine Bewertung der Therapieoptionen geben und klinische Studien empfehlen können. In dieser retrospektiven Arbeit wurden Patient:innen mit metastasiertem Brustkrebs (n=77) mittels gezielter NGS-Analyse anhand von sogenannten Genpanels mit 126 bzw. 540 krebsrelevanten Genen im Zeitraum von 01/2019-02/2022 untersucht. Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden wurden patientenspezifische genomische Veränderungen mit Behandlungsoptionen abgeglichen. Diese Methoden stützen sich vollständig auf öffentliche Datenbanken über somatische Varianten mit prädiktiver Evidenz für das Ansprechen auf bestimmte Medikamente. Diese Versorgungsforschung einer repräsentativen Kohorte des Universitätsklinikums Frankfurt in Kooperation mit Regionalverbund OncoNet Rhein-Main wurden systematisch ausgewertet inklusive der Bedeutung genomischer Varianten. Das OncoNet Rhein-Main ist eine Kooperation aus führenden onkologischen Zentren und Praxen im Rhein-Main-Gebiet, welche sich als Netzwerk der Aufgabe angenommen haben Patient:innen optimal therapeutisch zu versorgen. Für 51% (39/77) der Patient:innen konnte mindestens eine gezielte Therapieoption mit einem effektivem Biomarker im gleichen Tumortyp gemäß Zulassung der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) gefunden werden. Bei 12/77 (16%) wurde mindestens eine Alteration mit einem effektivem Biomarker und einer OFF-Label Therapieoption gefunden. Bei 30% der Patient:innen wurden Veränderungen in optionalen Biomarkern gefunden, welche Resistenzmechanismen erklären. Die umfassende molekulare Analyse von Patient:innen mit fortgeschrittenem Brustkrebs erlaubt die Behandlungsoption zu verbessern und ermöglicht durch die Analyse von bekannten Resistenzmarkern auch den klinischen Verlauf besser zu verstehen. Die interdisziplinäre Besprechung der Befunde im molekularem Tumorboard ist im Hinblick auf kontinuierliches Lernen aller Beteiligten sowie zur Qualitätssicherung eine entscheidende obligate Maßnahme.

# Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
Anhangsverzeichnis .....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.2 Next-Generation-Sequencing basierte Technologie als Wegweiser für eine zielgerichtete Therapie .....	4
1.3 Molekulare Stratifizierung und deren Prognosefaktoren.....	5
1.4 Die Bedeutung des molekularen Tumorboards in der Präzisionsonkologie.....	7
1.5 Ziel der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Patientenkollektiv.....	14
2.1.2 Panels .....	14
2.1.3 Kits .....	14
2.1.4 Chemikalien .....	16
2.1.5 Laborequipment .....	16
2.1.6 Software .....	17
2.1.7 Datenbanken.....	17
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 NGS-Workflow .....	17
2.2.1.1 Extraktion der Tumorzellen aus FFPE-Material.....	20
2.2.1.2 Erstellung der NGS-Bibliothek.....	20
2.2.1.3 Qualitätskontrolle.....	20

2.2.1.4	Klonale Amplifikation und Sequenzierung.....	20
2.2.1.5	NGS-Datenanalyse.....	21
2.2.2	Datenauswertung und Visualisierung.....	21
3	Ergebnisse .....	23
3.1	Eigenschaften der Kohorte .....	23
3.2	Häufigkeiten der Alterationen .....	24
3.3	Oncoplot und Lollipopplots.....	26
3.4	Varianten genomischer Alterationen beim metastasierten Mammakarzinom und deren therapeutische Implikationen .....	28
3.5	Behandlungsoptionen .....	29
4	Diskussion .....	32
4.1	<i>PIK3CA</i> -Gen.....	35
4.2	<i>BRCA1/2</i> -Gene .....	36
4.3	Resistenzmechanismen.....	37
4.4	Klinische und strukturelle Herausforderungen von NGS-basierten Analysen und deren Bewertung .....	40
5	Fazit.....	42
6	Zusammenfassung.....	44
7	Summary .....	45
8	Literaturverzeichnis.....	46
9	Anhang .....	57
10	Schriftliche Erklärung .....	65
	Danksagung.....	66

## Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°	Grad
µg	Mikrogramm
A	Adenin
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AMP	Association for Molecular Pathology
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BAM file	Binary Alignment Map File
<i>BRCA 1/2</i> Gen	Breast Cancer 1, Breast Cancer 2 Gen
C	Cytosin
CAP	College of American Pathologists
CNV	Copy Number Variation
CVI	Clinical Variant Interpretation (eigener Score von Molecular Health)
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNPM	Deutsches Netzwerk für Personalisierte Medizin
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
e.V.	Eingetragener Verein
EMA	European Medicine Agency
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, offizieller Name von Her2
ESCAT	ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular targets
ESMO	European Society of Medical Oncology
FastQ file	Dateiformat, welches Information zu der Basensequenz der Nukleotide trägt
FBREK	Familiärer Brust- und Eierstockkrebs

FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin eingebettet
G	Guanin
<i>gBRCA 1/2</i> Gen	Keimbahn (germline) Mutation im <i>BRCA</i> -Gen
Her2	Her2 Wachstumsfaktor
Hg19	Human Reference Genome 19
IVDR	In Vitro Diagnostics Regulation
Ki-67	Proliferationsmarker
LoE	Level of Evidence
LP	Likely pathogenic
<i>MMR</i> Gene	Missmatch Repair Gene
MTB	Molekulares Tumorboard
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation Sequencing
nNGM	Nationales Netzwerk genomische Medizin
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
<i>NTRK 1-3</i>	Neurotrope Tyrosinkinasen 1-3
Omics	Der Begriff Omics dient als Oberbegriff für molekularbiologische Methoden, wie Genomik, Proteomik, Metabolomik u.a.
ONRM	OncoNet Rhein-Main
OCA V3	Oncomine Comprehensive Assay Version 3
OS	Overall Survival
P	pathogenic
PFS	Progressionsfreies Überleben
pH	Potential of Hydrogen
<i>PIK3CA</i> Gen	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha Gen
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure

S3-Leitlinien	Leitlinien basierend auf international akzeptierte Qualitätskriterien und methodische Standards
SAM file	Sequence Alignment Map File
SBS	Sequencing by Synthesis
<i>sBRCA</i>	Somatische Mutation im <i>BRCA</i> -Gen
SNV	Single Nucleotide Variation
T	Thymin
TNBC	Triple-negativer Brustkrebs
TSO500	TruSight Oncology Assay 500
Vcf file	Variant call format File
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
z.B.	zum Beispiel
ZPM	Zentren für Personalisierte Medizin (Baden-Württemberg)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der weiblichen Brust mit invasivem Mammakarzinom .....	2
Abbildung 2: Häufig betroffene Organe beim metastasierten Mammakarzinom .....	2
Abbildung 3: Therapieoptionen bei Brustkrebs .....	4
Abbildung 4: Erhebung obligatorischer und optionaler Biomarker beim Brustkrebs <sup>23,28,31,34,39,41,43-45,49,50</sup> . (Quelle: Wild, PJ et al. Prädiktive molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom, Pathologie (2022) <sup>51</sup> ).....	7
Abbildung 5: Schematischer Ablauf der NGS-Analyse bis zur Empfehlung des Molekularen Tumorboards .....	8
Abbildung 6: Workflow einer NGS-Analyse an Tumorgewebe .....	19
Abbildung 7: Einsender Statistik.....	24
Abbildung 8: Ergebnisse der NGS-Analyse von Proben metastasierter Mammakarzinome (mBC) mittels OCA v3 Assay und TSO500 Assay. ....	25
Abbildung 9: Oncoplot der Kohorte und Lollipop vom <i>PIK3CA</i> Gen .....	27
Abbildung 10: Targetable Alterationen.....	29
Abbildung 11: Verteilung der Biomarker mit effektivem Drug Target nach CVI Score.....	30
Abbildung 12: Alterationen optionaler Biomarker .....	31

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms <sup>23,30-33</sup> .....	3
Tabelle 3: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß AMP-Kriterien <sup>58,60</sup> .....	9
Tabelle 4: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß ESMO (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Target, ESCAT). <sup>54,55,57-59</sup> .....	10
Tabelle 5: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß CVI <sup>61</sup> .....	11
Tabelle 6: Panels .....	14
Tabelle 7: Kits .....	14
Tabelle 8: Chemikalien .....	16
Tabelle 9: Laborequipment .....	16
Tabelle 10: Software .....	17
Tabelle 11: Datenbanken.....	17
Tabelle 12: Eigenschaften der Patientenkohorte .....	23
Tabelle 13: Obligatorische und optionale Biomarker beim metastasierten Mammakarzinom <sup>50,95,96</sup> .....	32

## **Anhangsverzeichnis**

Anhang 1: Ethikvotum (Aktenzeichen: 2022-671) .....	57
Anhang 2: Oncoplot aller gefundener Alterationen (pathogenic oder likely pathogenic) mit mehr als 3 gefundenen Varianten.....	58
Anhang 3: Lollipop Diagramm der gefundenen <i>ESR1</i> -Mutationen.....	59
Anhang 4: Lollipop Darstellung des <i>ERBB2</i> Gens. ....	60
Anhang 5: Alterationen mit effektivem Clinical Interpretation (CVI) Score .....	61
Anhang 6: Die Scoreverteilung der Clinical Variant Interpretation (CVI).....	62
Anhang 7: Top 20 mutierte Gene mit effektiven CVI-Scores .....	63
Anhang 8: Top 20 Behandlungsoptionen.....	64

# 1 Einleitung

## 1.1 Mammakarzinom

Brustkrebs bezeichnet einen bösartigen Tumor, welcher in der Brust entsteht und invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen kann. Diese maligne Neoplasie kann aus dem Brustdrüsengewebe oder den Milchgängen entstehen. Wenn Brustkrebs spät erkannt wird oder die Erkrankung fortschreitet können sich Tumorabsiedlungen, sogenannte Metastasen, im Körper ausbreiten<sup>1-3</sup>.

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau und das zweithäufigste Karzinom insgesamt nach dem Bronchialkarzinom<sup>4-8</sup>. Das Lebenszeitrisko einer Frau an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei 12%<sup>4-7</sup>. Das mittlere Erkrankungsalter der Frau liegt bei 64 Jahren<sup>4,5</sup>. Männer können auch an Brustkrebs erkranken. Mit einem Lebenszeitrisko von 0,1% erkranken diese aber deutlich seltener<sup>9-13</sup>. Risiken an Brustkrebs zu erkranken sind genetische Faktoren bei hereditärem Brustkrebs, der Zeitraum zwischen Menarche und Menopause, Alter, Anzahl an Geburten, Einnahme oraler Kontrazeptiva, aber auch Übergewicht, hoher Alkoholkonsum und Nikotinabusus, um nur einige zu nennen<sup>2,3,10,11,14-23</sup>.

Morphologisch gesehen entsteht Brustkrebs entweder in den Epithelzellen der Milchgänge (duktal ca. 85%) oder der Brustdrüsenläppchen (lobulär ca. 15%)<sup>24,25</sup>. Zunächst ist das Krebswachstum auf den Milchgang oder das Brustdrüsenläppchen beschränkt, sogenanntes in situ Wachstum, wo es in der Regel keine Symptome verursacht und nur ein geringes Potenzial für eine Ausbreitung hat. Im Laufe der Zeit kann dieses Carcinoma in situ fortschreiten und in das umliegende Brustgewebe eindringen, sogenannter invasiver Brustkrebs (Abb. 1). Invasiver Brustkrebs kann sich auf die nah gelegenen Lymphknoten (regionale Metastasen) oder auf andere Organe im Körper, sogenannte Fernmetastasen, ausbreiten (Abb. 2). Eine Einteilung der Brust in Quadranten zeigte, dass die häufigsten Tumoren im oberen äußeren Quadranten entstehen<sup>1,15,16,23-25</sup>. Die Weltgesundheitsorganisation unterscheidet in Ihrer aktuellen Klassifikation vier Subtypen maligner Neoplasien der Brust<sup>24</sup>.

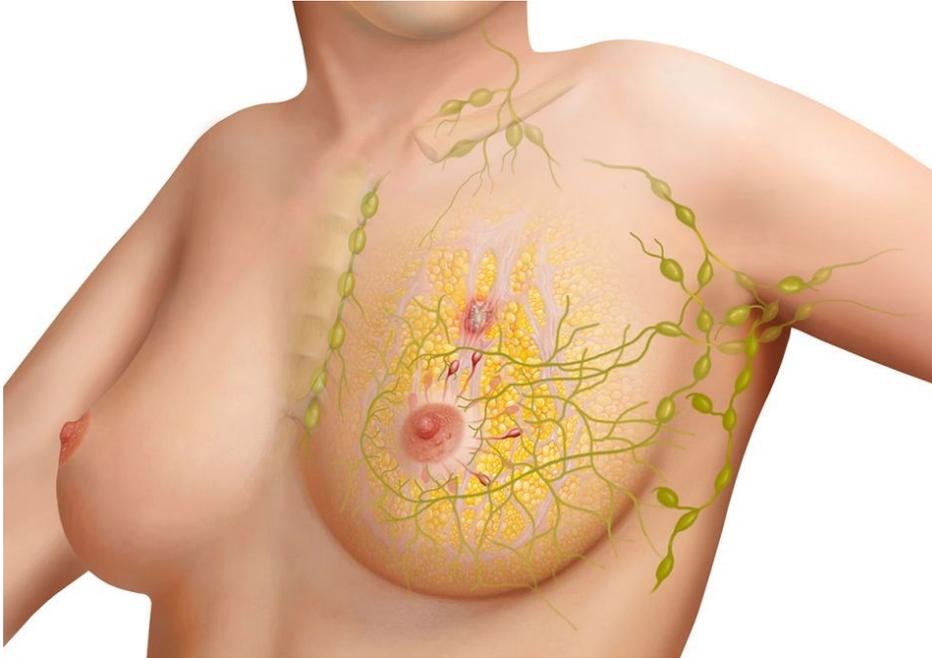


Abbildung 1: Anatomie der weiblichen Brust mit invasivem Mammakarzinom

In Gelb sieht man das Brustdrüsengewebe und in Grün die angrenzenden Lymphabflusswege. Im äußeren oberen Quadranten befindet sich ein Tumor. Bildquelle <sup>26</sup>

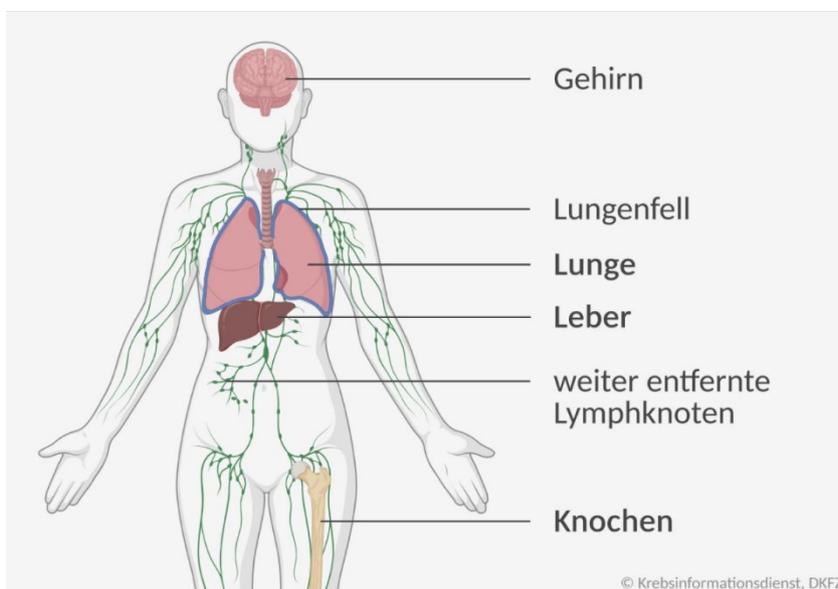


Abbildung 2: Häufig betroffene Organe beim metastasierten Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom sind Metastasen häufig in Leber, Lunge, Lungenfell (Pleura), Knochen, Lymphknoten und Gehirn zu finden. Bildquelle<sup>26</sup>

Wenn Brustkrebs auch die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland ist, so ist es nicht die tödlichste Krebserkrankung. Rechtzeitig erkannt und leitliniengerecht behandelt sind die meisten Brustkrebserkrankungen kurativ behandelbar<sup>23</sup>. Allerdings entwickeln noch ca. ¼ der Mammakarzinom-Patient:innen im Laufe der Erkrankung Metastasen<sup>27,28</sup>. Metastasen können sich lymphogen und hämatogen verbreiten, man findet diese häufig in Leber, Knochen, Lunge und Lungenfell, Lymphknoten, aber auch das Gehirn kann betroffen sein<sup>1,10,29</sup>.

Bei der Behandlung ist Brustkrebs nicht gleich Brustkrebs, denn welches Gewebe oder Zellarten den Ursprung bilden, die Dignität, Hormonempfindlichkeit, Her2-Status, und die Wachstumsgeschwindigkeit (Ki-67) steuern die Therapieauswahl. Eine Stratifizierung der Tumorbiologie ist bei der heterogenen Erkrankung essenziell. Auf Grundlage der vier wichtigsten Surrogat-Parameter dem Östrogenrezeptor (ER), dem Progesteronrezeptor (PR), dem Her2 Wachstumsfaktor und dem Proliferationsmarker Ki-67 kann man das Mammakarzinom bei Primärdiagnose in vier prognostisch und therapeutisch relevante Subtypen einteilen. Diese sogenannten intrinsischen Subtypen werden als Luminal A, Luminal B, Her2-positiv und Basal-like (Triple-negativer Brustkrebs) bezeichnet (Tab.: 2)<sup>30</sup>.

Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms<sup>23,30-33</sup>

Subtyp		ER/PR-Status	Her2-Status	Ki-67	Grading	Inzidenz <sup>32</sup>
<b>Luminal A</b>		Positiv	Negativ	≤ 10 %	G1-2	66%
<b>Luminal B</b>	Her2-negativ	Positiv	Negativ	≥ 25 %	G2-3	
	Her2-positiv	Positiv	Positiv	Jeder Wert		
<b>Her2-positiv</b>		Negativ	Positiv	Jeder Wert		4%
<b>Triple-negativ</b>		Negativ	Negativ	Jeder Wert		10%

Legende: ER= Östrogenrezeptor; PR= Progesteronrezeptor; Her2= human epidermal growth factor receptor 2, Name des Gens: *ERBB2*; Ki-67= Proliferationsmarker (% proliferierender Tumorzellen)

Die Therapie wird häufig in fünf Therapieoptionen zusammengefasst: Operation, Strahlentherapie, anti-hormonelle Therapie, Chemotherapie und zielgerichtete Therapie<sup>23,31,34</sup> (Abb.: 3). Jedoch hängt die Therapie individuell vom molekularen Subtyp, Staging, Grading, Alter und Vortherapien ab<sup>23</sup>.

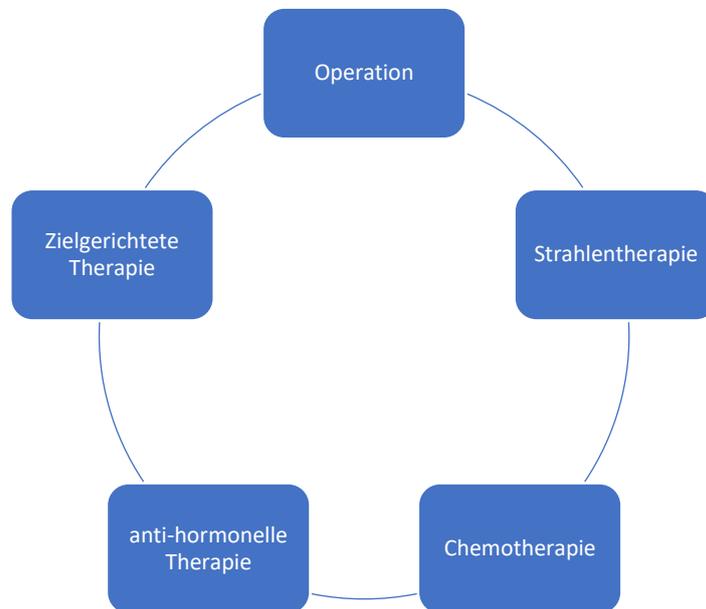


Abbildung 3: Therapieoptionen bei Brustkrebs

Mit der Entwicklung des Human Genome Project im Jahr 2001 und der Technologie des Next-Generation-Sequencing (NGS) sind neue Wege mit Behandlungsmöglichkeiten entstanden<sup>35,36</sup>. NGS ist eine Technologie zur parallelen Analyse der DNA- oder RNA-Sequenz, um genetische Variationen im Zusammenhang mit Krankheiten oder anderen biologischen Phänomenen zu untersuchen. Bei einer Krebserkrankung ermöglicht die NGS-Technologie eine Detektion von Veränderungen der Tumorzellen, welche Hinweise bezüglich des Malignitätsgrades, der Prognose sowie der Therapieoptionen geben kann.

## **1.2 Next-Generation-Sequencing basierte Technologie als Wegweiser für eine zielgerichtete Therapie**

Next-Generation-Sequencing (NGS) ist ein paralleles Sequenzierungsverfahren, welches originale Stücke der DNA, Base für Base nachbauen kann. Durch die Sequenzierung klonal amplifizierter DNA-Vorlagen, sogenannte ‚Templates‘, können Genabschnitte in massivem Umfang multipliziert werden. Die Geschwindigkeit, der Durchsatz und die Genauigkeit, die mit NGS erreicht wird, haben die Genforschung, aber auch die molekulare Diagnostik revolutioniert<sup>37</sup>.

Zu den allgemeinen NGS-Methoden gehören die Ganzgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS) und gezielte Sequenzierungen oder auch ‚Targeted-Sequencing‘ genannt. Unter den Targeted-Sequencing Methoden werden noch weitere Sequenzierungsmethoden, wie die Exom-Sequenzierung (Whole Exome Sequencing, WES) und größere Genpanels oder auch Einzelgenanalysen unterschieden<sup>37</sup>.

Für viele Forschungsanwendungen ist die WGS aufgrund hoher Kosten derzeit nicht abbildbar, da für die Analyse des gesamten Genoms eine enorme Rechenleistung, Bioinformatik und Datenspeicherung erforderlich ist<sup>38</sup>. Aufgrund dessen, wird bisher in der Diagnostik mit Genpanels und Einzelgensequenzierungen gearbeitet, wodurch sich therapeutische Konsequenzen und Maßnahmen ergeben.

Größere Genpanels mit krebsrelevanten Genen und Signalwegen sind in unterschiedlicher Anzahl verfügbar und geben Hinweise auf zielgerichtete Therapieansätze. Darüber hinaus können in therapieresistenten Tumoren bereits jetzt Resistenzmechanismen detektiert werden, welche ebenfalls therapierbar sind oder einen Wechsel des Therapieregimes indizieren<sup>39</sup>.

### **1.3 Molekulare Stratifizierung und deren Prognosefaktoren**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Genveränderungen bekannt, die als prognostische oder prädiktive Marker genutzt werden können, um Hinweise für eine zielgerichtete Therapie zu gewinnen. In der Behandlung von Krebspatienten nimmt die molekulare Stratifizierung immer mehr Einfluss. So konnten beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (non-small lung cancer, NSCLC) und dem bösartigem, schwarzem Hautkrebs (Melanom) schon bedeutsame Therapieerfolge mit einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) mit Hilfe molekular-zielgerichteter Wirkstoffe erzielt werden<sup>40</sup>. Auch beim Mammakarzinom wächst der Anteil an molekular stratifizierten Therapieansätzen<sup>33</sup>. Die molekulare Diagnostik ergänzt zunehmend die klassische Pathologie mithilfe genomischer und immunhistochemischer Analysen, um Einblicke in die Tumorbiologie zu erlangen. So sind beim frühen Mammakarzinom prognostische Genexpressionstests, welche das individuelle Rückfallrisiko berechnen in den S3-Leitlinien und der Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) vollkommen etabliert. Diese Tests erfassen die Expression von krebsrelevanten Genen und ermöglichen die quantitative Abschätzung des Rückfallrisikos bzw. den Nutzen einer Chemotherapie. Die AGO empfiehlt Multigen-Tests bei pN0-1 Tumoren, wie z.B. MammaPrint®, EndoPredict®, Oncotype DX®, Prosigna® und Breast Cancer Index®<sup>23,34,41</sup>. Anders als beim metastasierten Mammakarzinom ist die Bestimmung weiterer molekularer Biomarker beim frühen Mammakarzinom für die zielgerichtete

Therapieplanung nicht gefordert, da zielgerichtete Therapieoptionen in diesem Krankheitsstadium (noch) nicht zur Verfügung stehen. Eine Ausnahme stellt die Keimbahnanalyse des *BRCA1/2* Gens (*gBRCA1/2*) beim Her2-negativem frühen Mammakarzinom (HR+/Her2- und triple-negativ) dar. Die Ergebnisse der OlympiA Studie (NCT02032823) haben belegt, dass Patient:innen mit frühem Her2-negativem Mammakarzinom und einer *gBRCA 1/2* Mutation von einer einjährigen adjuvanten Therapie mit dem PARP-Inhibitor mit einem verbessertem Krankheits- und Fernmetastasen-freien Überleben profitieren<sup>42</sup>. Im Juni 2022 erteilte die EMA eine Zulassungserweiterung von Olaparib für die adjuvante Behandlung von Patient:innen mit einem frühen Her2-negativen Mammakarzinom und *gBRCA 1/2* Mutation nach vorhergehender adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie und hohem Rezidivrisiko (Abb.: 4). Bisher beruhen die Therapieempfehlungen der S3-Leitlinien auf dem intrinsischen Subtyp. Alterationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2*, *PIK3CA* und optional *NTRK 1-3* haben bereits therapeutische Implikationen beim metastasiertem Mammakarzinom<sup>43-48</sup>; weitere sind in klinischer Prüfung.

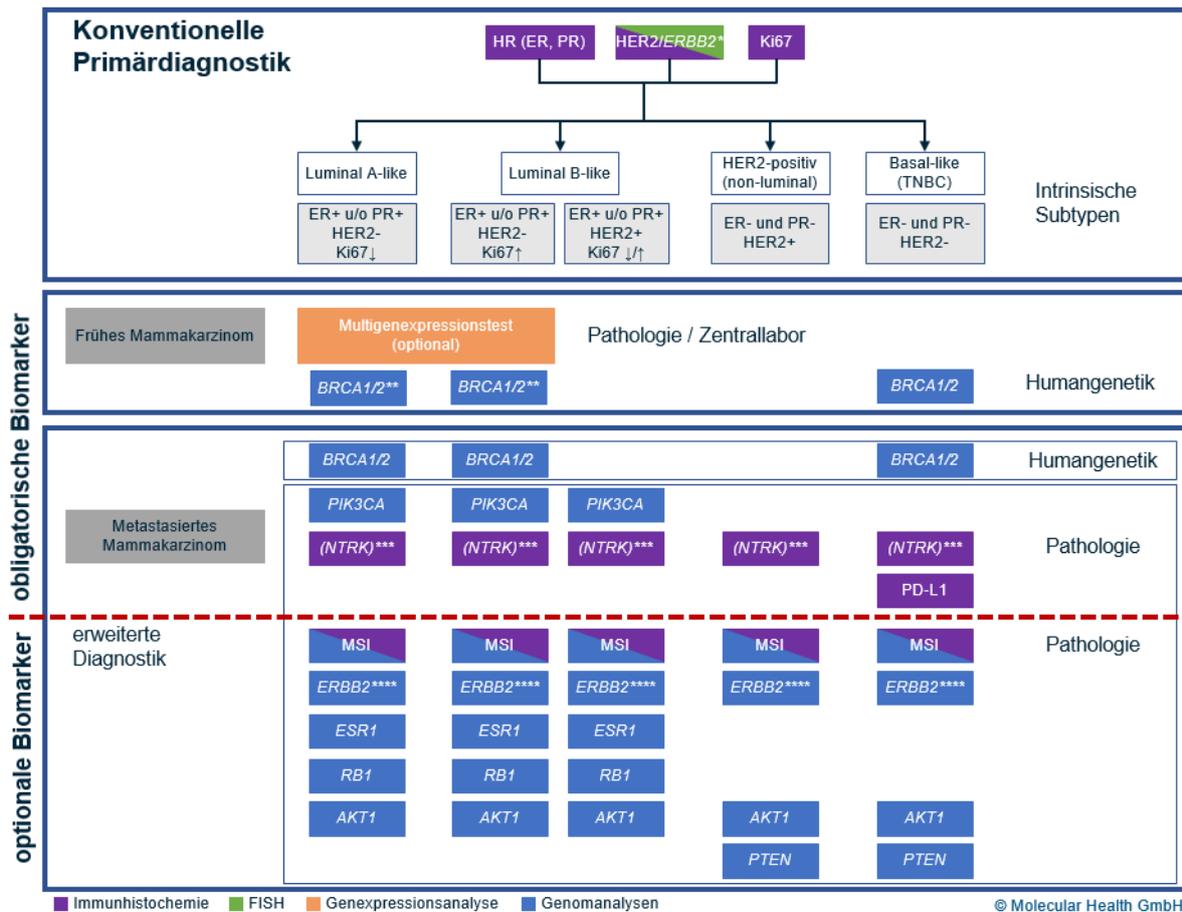


Abbildung 4: Erhebung obligatorischer und optionaler Biomarker beim Brustkrebs<sup>23,28,31,34,39,41,43-45,49,50</sup>. (Quelle: Wild, PJ et al. Prädiktive molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom, Pathologie (2022)<sup>51</sup>)

#### 1.4 Die Bedeutung des molekularen Tumorboards in der Präzisionsonkologie

Die klinische Entscheidungsfindung erfordert eine rasche Integration mehrerer Datenströme wie z. B. Histologie, Bildgebung, Symptome, Nebenerkrankungen und mögliche Vortherapien, um die Wahl einer geeigneten Therapie zu finden. Hierzu werden die S3-Leitlinien zur Hilfe gezogen. Obwohl sich dieser Prozess im Laufe der Zeit nicht wesentlich verändert hat, haben sich die Datenströme weiterentwickelt und umfassen nun unter anderem auch genomische Tumorprofile. Darüber hinaus hat die rasche Entwicklung der NGS-Technologien und Computersystemen die klinische Forschung und molekulare Therapieansätze enorm beschleunigt. Diese Entwicklung wurde insbesondere ermöglicht aufgrund des besseren Verständnisses der zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen von Krankheiten und die Identifizierung der wichtigsten veränderten Signalwege für molekular-adressierbare oder immunologische Therapien.<sup>33,40,41,49,52,53</sup>

Die Ergebnisse der Histologie, Immunhistochemie, Zytologie, und Molekularpathologie fließen in den Pathologiebericht ein<sup>23</sup>. Auf Grundlage dieser Ergebnisse erarbeiten die behandelnden

Ärzt:innen einen Therapievorschlagn. Allerdings ist diese Ansammlung an Daten inklusiver deren klinische Interpretation und Evidenz für die Ärzt:innen im Alltag kaum mehr umsetzbar. Somit nimmt die Pathologie eine immer wichtigere Rolle beim klinischen Entscheidungsprozess zum Wohl der einzelnen Patient:innen ein. Zusätzliche Hilfe leisten ständige Weiterbildungen und KI-unterstützte Softwareprogramme, um mit den wachsenden Datenmengen Schritt zu halten.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Behandlung von onkologischen Patient:innen sind Tumorboards, welche aus Expert:innen verschiedener Fachrichtungen bestehen und gemeinsam Therapieempfehlungen aussprechen. Meist werden in den organbezogenen Tumorboards rein indikationsbezogene Empfehlungen ausgesprochen. Im molekularem Tumorboard werden hingegen Therapievorschläge über Entitätsgrenzen hinweg erarbeitet und bewertet<sup>23</sup>. Das Konsortium des molekularem Tumorboards, besteht aus Patholog:innen, Onkolog:innen, behandelnden Ärzt:innen der jeweiligen Fachrichtung, Humangenetiker:innen, Bioinformatiker:innen und medizinischen Wissenschaftler:innen. Auf Basis von NGS-Analysen, zielt das molekulare Tumorboard (MTB) darauf ab, komplexe onkologische Fälle zu diskutieren und individualisierte Therapieempfehlungen zu geben. Aufgrund der enormen Datenmengen, die bei einer NGS-Analyse generiert werden, stützt sich das MTB auf Ressourcen für die genomische Interpretation, um die genaue und rechtzeitige klinische Interpretation komplexer genomischer Ergebnisse mit molekularen Therapieansätzen und evidenzbasierter Forschung abzubilden<sup>33,39,50,54-59</sup>. Somit baut das MTB eine Brücke zwischen Forschung und Klinik.

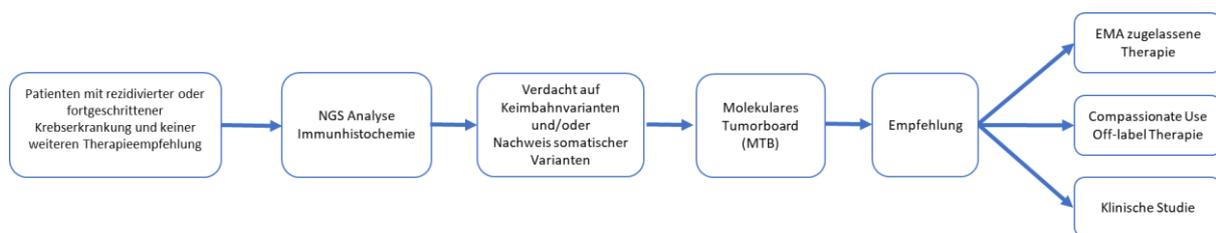


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der NGS-Analyse bis zur Empfehlung des Molekularen Tumorboards

Mit der zunehmenden Entdeckung genetischer Veränderungen beim Tumorprofiling ist die Interpretation jedoch komplexer und fehleranfälliger geworden, was zu Verzerrungen führen und den Nutzen in der klinischen Praxis verringern kann<sup>56-59</sup>. Die Herausforderung ist die gefundenen Varianten zu klassifizieren, in wirksame Behandlungsstrategien zu übersetzen und

einen integrativen Bericht daraus abzuleiten. Für eine strukturierte Befundung gibt es eine Vielzahl genomischer Interpretationswerkzeuge, Wissenschaftsdatenbanken und internationaler Richtlinien zur klinischen Interpretation<sup>54-59</sup>. Fachgesellschaften wie die European Society of Medical Oncology (ESMO), die Association for Molecular Pathology (AMP), die American Society of Clinical Oncology (ASCO) und das College of American Pathologists (CAP) haben internationale Richtlinien für die Varianteninterpretation erstellt, um aus diesen stetig wachsenden Datensätzen Leitlinien zu bestimmen. Die ESMO hat im Jahr 2018 die ‚ESMO Scale of Clinical Actionability for Molecular Targets‘ (ESCAT) für die klinische Interpretation und Evidenz von Biomarkern entwickelt<sup>54,55</sup>. Alle Richtlinien beruhen auf einem ‚evidence tier‘ von eins (zugelassene Medikation in der Indikation) bis vier (ohne klinische Evidenz) (Tab.: 3, 4, 5).

Diese Richtlinien bilden die Basis der Diskussion des MTB bei der Klassifizierung von Varianten und der daraus abgeleiteten Therapie.

Tabelle 3: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß AMP-Kriterien<sup>58,60</sup>

<b>AMP Classification</b>	
Tier IA	Variants of strong clinical significance. FDA-approved therapy or biomarkers included in professional guidelines.
Tier IB	Variants of strong clinical significance. Well-powered studies with consensus from experts
Tier IIC	Variants of potential clinical significance. FDA-approved therapies for different cancer types or investigational therapies. Multiple small published studies with some consensus.
Tier IID	Variants of potential clinical significance. Preclinical trials or a few case reports without consensus.
Tier III	Variants of unknown clinical significance.
Tier IV	Benign or likely benign variants.

*Note:* From ‘Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists’ by Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. J Mol Diagn. 2017;19(1):4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002

Tabelle 4: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß ESMO (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Target, ESCAT).<sup>54,55,57–59</sup>

ESCAT	LoE	Explanation	
<b>I</b>	I-A	Prospective, randomized clinical trial(s) show the alteration-drug match in a specific tumor type results in clinically meaningful improvement of a survival endpoint	Drug match is associated with improved outcome in clinical trials
	I-B	Prospective, nonrandomized clinical trial(s) show that the alteration-drug match in a specific tumor type results in clinically meaningful benefit as defined by ESMO MCBS 1.1	
	I-C	Clinical trials across tumor types or basket clinical trials show clinical benefit associated with the alteration-drug match, with similar benefit observed across tumor types	
<b>II</b>	II-A	Retrospective studies show that patients with the specific alteration in a specific tumor type experience clinically meaningful benefit with matched drug compared to alteration-negative patients	Drug match is associated with antitumor activity, but magnitude of benefit is unknown
	II-B	Prospective clinical trial(s) show that the alteration-drug match in a specific tumor type results in increased responsiveness when treated with a matched drug, however, no data currently available on survival endpoints	
<b>III</b>	III-A	Clinical benefit demonstrated in patients with the specific alteration (as ESCAT I and II above) but in a different tumor type. Limited/absence of clinical evidence available for the patient-specific cancer type or broadly across cancer types	Drug match suspected to improve outcome based on clinical trial data in other tumor type(s) or with similar molecular alteration
	III-B	An alteration that has a similar predicted functional impact as an already studied ESCAT	

		I abnormality in the same gene or pathway, but does not have associated supportive clinical data	
<b>IV</b>	IV-A	Evidence that the alteration or a functionally similar alteration influences drug sensitivity in preclinical <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> models	Preclinical evidence of actionability
	IV-B	Actionability predicted <i>in silico</i>	
<b>V</b>		Prospective studies show that targeted therapy is associated with objective responses, but this does not lead to improved outcome	Drug match is associated with objective response, but without clinically meaningful benefit
<b>X</b>		No evidence that genomic alteration is therapeutically actionable	Lack of evidence for actionability

Note: From 'Variant classification in precision oncology' by Leichsenring J, Horak P, Kreutzfeldt S, et al.. Int J Cancer. 2019;145(11):2996-3010. doi:10.1002/IJC.32358

Tabelle 5: Einteilung der klinischen Evidenzlevel gemäß CVI<sup>61</sup>

<b>CVI-Score</b>	<b>LoE</b>	<b>Explanation</b>
7	Clinically approved	Approved by the FDA and/or EMA for this patient's disease or cancer type.
6	clinical	Observed and reported at least in one well-powered clinical trial with large patient numbers, or approved by FDA and/or EMA for a different cancer entity.
5	clinical	Observed in clinical trials with limited patient numbers (typically Phase 1 & Phase 2 trials) for this and other cancer entities.
4	clinical	Observed in individual patient cases reports for this and other cancer entities.
3	preclinical	Observed in preclinical experiments (e.g. cell lines or animal models)
2	preclinical	Inferred from the gene, or a similar variant or pathway, by a computational method and/or expert-level analysis

1	preclinical	Inferred from the gene or a similar variant by a computational method and/or expert-level analysis
---	-------------	--

Unterstützend bei dieser Arbeit agieren KI-basierte bioinformatische Software-Tools, wie z.B. die Software MH Guide von Molecular Health. Hier vergleicht die Analyse Software dazu die Daten der Patientenprobe mit aktuellem publiziertem biomedizinischem Wissen, den oben beschriebenen Richtlinien und Arzneimittelinformationen. Dabei stützt sich die Software auf mehrere freizugängliche und kommerzielle Datenbanken z.B. ClinVar, COSMIC, BRCA Exchange, UTAH BRCA, GnomAD, dbSNP etc.<sup>62-65</sup> für die Varianteninterpretation. Weitere benutzerdefinierte Algorithmen helfen bei dem Abgleich von Patientenmerkmalen mit Behandlungs- und klinischen Studienempfehlungen. Zukünftig ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich weitere ‚omics‘ Methoden, wie z.B. das Proteom und Epigenom die Daten erweitern. Hierzu ist die Implementierung der omics Daten in solche Softwareprogramme notwendig, um daraus personalisierte Therapieempfehlungen ableiten zu können.

Zusammenfassend sind Molekulare Tumorboards ein wichtiges Glied in der Kette der personalisierten Tumortherapie.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die traditionelle Risiko- und Therapieeinschätzung bei Patient:innen mit Brustkrebs berücksichtigt den Lymphknotenstatus, das Grading, den Ki-67 Proliferationsindex, den Hormonrezeptor Status, sowie die Expression von Her2 Wachstumsfaktorrezeptor. Das progressionsfreie Überleben und die Therapieplanung hat sich seit der Implementierung von Multigen-Expression-Tests in selektiven Patientenkohorten, wie z.B. Multigen-Prognosetests wie MammaPrint®, EndoPredict®, Oncotype DX®, Prosigna® und Breast Cancer Index®<sup>34</sup> verbessert. In der metastasierten Situation ist die molekulare Testung noch nicht vollends in der Routine angekommen. Allerdings gibt es mittlerweile einzelne Medikamente, welche eine zielgerichtete Therapie von bestimmten Subtypen ermöglichen<sup>50</sup>. Weitere Medikamente sind in klinischen Studien in der Testung und müssen noch evaluiert werden<sup>66-73</sup>. Die Präzisionsonkologie hat weiterhin großes Potential und es besteht die Hoffnung mit besserem molekularem Verständnis maligner Erkrankungen diese Entwicklung auch zum Wohle der Mehrzahl von onkologischen Patient:innen abzubilden. Die Umsetzung der Präzisionsonkologie in die Versorgungsrealität begegnet allerdings noch erheblichen klinischen

und strukturellen Herausforderungen. Beispielsweise erlauben Evidenzlücken oftmals nur individuelle Heilversuche und es fehlen Konzepte, Patient:innen auch außerhalb großer akademischer Zentren adäquat zu versorgen. Der Regionalverbund OncoNet Rhein Main e.V. (ONRM) hat sich dieser Aufgaben und Fragestellungen mit einem interdisziplinären Konzept angenommen. Das Netzwerk zwischen führenden onkologischen Zentren und Praxis (n=20) in der Rhein-Main Region hat sich das Ziel genommen eine optimale Versorgung von Patient:innen mit einer Krebserkrankung zu bieten. Hierzu sollen ONRM Patient:innen mit einem Krebsleiden die bestmögliche Behandlungsmöglichkeiten insbesondere auch im Rahmen von Studien Klinikums- und Praxis-übergreifend angeboten werden. Durch die enge Zusammenarbeit von Fachärzt:innen aus verschiedenen Disziplinen aus Klinik und Praxis können die Behandlungsmöglichkeiten durch direkten Zugang und Anwendung neuer Wirkstoffe verbessert werden. Als Netzwerk von kooperierenden Standorten können Patient:innen eine größere Breite an klinischen Studien angeboten werden. Zudem ermöglicht der Ansatz des ONRM auch Patient:innen außerhalb von akademischen Zentren zu erreichen und wohnortnähere Studien anbieten zu können. Nach dem Ansatz vom ONRM können Patient:innen eine zentrale Testung ermöglicht werden und eine dezentrale, wohnortnahe Weiterbehandlung.<sup>74</sup> Vor diesem Hintergrund spielen molekulare Tumorboards als Wegbereiter für einen harmonisierten und flächendeckenden Einsatz dieses patientenzentrierten Behandlungsansatzes eine wichtige Rolle.

Gegenstand dieser Arbeit ist (i) die Analyse der Häufigkeit von individuellen genetischen Alterationen in einer Kohorte metastasierter Mammakarzinom-Patient:innen (n=77) des ONRM und (ii) die Abschätzung der klinischen Auswirkungen der Ergebnisse, für eine personalisierte Therapie.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

In der Datenbank des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie wurden im Zeitraum von Januar 2019 bis Februar 2022 nach Patient:innen mit metastasiertem Mammakarzinom gesucht, welche eine NGS-Analyse innerhalb der Routinediagnostik erhalten hatten. Bei dem Screening wurden 120 mögliche Patient:innen gefunden. Von den 120 Patient:innen erfüllten 43 nicht die erforderlichen Einschlusskriterien und somit wurde die Analyse mit einer Kohorte von 77 Patient:innen durchgeführt. Ausschlusskriterien waren Tumorzellgehalt < 20% und schlechte Sequenzierungsqualität mit einer Coverage < 500x. Die Coverage ist definiert als die Anzahl der Nukleotidbasen der Probe, welche sich an bestimmte Loci in dem Referenzgenom zuordnet. Die molekularen Daten der NGS Analytik der Patient:innen mit den erfüllten Einschlusskriterien wurden anschließend in die Software von Molecular Health Guide geladen für den anschließenden Datenexport. Das Ethikvotum für diese retrospektive statistische Arbeit wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikum Frankfurt positiv bewertet (Anhang 1). Die Durchführung der NGS-Analyse dieses Patientenkollektivs wurde im Rahmen der Routine Diagnostik im molekularpathologischen Zentrum des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie durchgeführt. Das Screening, die Datenverwertung und -auswertung in der Software MH Guide für diese Arbeit habe ich in Eigenarbeit erstellt.

#### 2.1.2 Panels

Tabelle 6: Panels

Name	Hersteller	Artikelnummer
OncoPrint™ Comprehensive Assay v3	Thermo Fisher Scientific	A35805, A36111
TruSight Oncology 500 Assay	Illumina	20045504

#### 2.1.3 Kits

Tabelle 7: Kits

Name	Hersteller	Artikelnummer
AmpliSeq™ Library PLUS for Illumina® Kit	Illumina®	20019101

AmpliSeq™ CD Indexes A for Illumina® Kit (96 Indexes, 96 Samples)	Illumina®	20019105
MiSeq™ V2 Reagent Kit (300 cycles)	Illumina®	MS-102-2002
PhiX Control V3	Illumina®	FC-110-3001
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)	Q32851
Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit	Promega Corporation	AS1720
Maxwell® RSC FFPE Plus RNA Kit	Promega Corporation	AS1440
GeneRead™ Clonal Amp Q Kit	QIAGEN N.V.	185001
GeneRead™ UMI Advanced Sequencing Q Kit	QIAGEN N.V.	185251
QIAxcel DNA High Resolution Kit	QIAGEN N.V.	9290002
KAPA Library Quantification Kit for Illumina®	Roche Diagnostics	079600140001
IonCode™ Barcode Adapters 1-384 Kit oder Ion Xpress™ Barcode Adapter Kit	Thermo Fisher Scientific	A29751 oder 4474517
Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus	Thermo Fisher Scientific	4488990
Ion Library Equalizer™ Kit	Thermo Fisher Scientific	4482298
Ion TaqMan® Quantification Kit	Thermo Fisher Scientific	4468802

## 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 8: Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnummer
Nuclease-free Water	Fisher Chemicals	AM9932
Ethanol	Sigma UK	BP2818500
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)	Sigma UK	25952-53-8
NaOH, 1 M	AppliChem	181691.1211
N-Hydroxysuccinimide (NSH)	Sigma UK	6066-82-6

## 2.1.5 Laborequipment

Tabelle 9: Laborequipment

Name	Hersteller
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.
DynaMag™-2 Magnetic Rack	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
DynaMag™-96 Side Magnet	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Ion S5™ Instrument	Thermo Fisher Scientific
LightCycler® 480 II Instrument	Roche Diagnostics
Maxwell® RSC Instrument	Promega Corporation
MiSeq™ Instrument	Illumina®
NextSeq550	Illumina®
ProFlex™ 96-well PCR System	Thermo Fisher Scientific
Qubit 4 Fluorometer	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Reference® Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG
Sprout Microcentrifuge	Biozym Scientific GmbH
ThermoMixer™	Eppendorf AG
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein GmbH

## 2.1.6 Software

Tabelle 10: Software

Name	Hersteller
Ion Reporter™ 5.2 Software	Thermo Fisher Scientific
IonTorrent™ Software 5.2	Thermo Fisher Scientific
Ion Torrent – Ion Gene Studio S5	Thermo Fisher Scientific
Torrent Suite™ Software	Thermo Fisher Scientific
Genexus™ Software	Illumina
MH Guide 5.3	Molecular Health
BaseSpace 2.9.1.15	Illumina®
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation
R Version 4.0.5	<a href="https://www.R-project.org/">https://www.R-project.org/</a>
Bioconductor Version 3.12	<a href="https://www.bioconductor.org/">https://www.bioconductor.org/</a>

## 2.1.7 Datenbanken

Tabelle 11: Datenbanken

Name	Verfügbarkeit
cBioPortal	cBioportal.org
ClinVar	<a href="https://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
Cosmic	<a href="https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a>
gnomAD	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org">gnomad.broadinstitute.org</a>
OncoKB	<a href="https://oncokb.org">oncokb.org</a>
dbSNP	<a href="https://ncbi.nlm.nih.gov/snp/">ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 NGS-Workflow

Die Next-Generation-Sequencing Analyse der Tumor DNA kann man unabhängig von den eingesetzten Geräten in folgende Schritte unterteilen: Probenvorbereitung und Extraktion der DNA und RNA aus dem FFPE-Gewebe, Herstellung der NGS-Bibliothek, klonale Amplifikation mit Sequenzierung, sowie die bioinformatische Datenanalyse (Abb.: 6).

Im ersten Schritt wurde die DNA und RNA aus dem Gewebe isoliert. Zunächst wurde die Probe für die NGS-Bibliothek in kürzere doppelsträngige DNA-Abschnitte fragmentiert. Die

resultierenden DNA-Fragmente wurden dann an spezifische Adaptersequenzen ligiert zur Erstellung einer ‚Fragment-Bibliothek‘. Diese Fragment-Bibliothek wurde anschließend mittels PCR-Amplifikation der Zielregionen, sogenannte ‚Templates‘ potenziert. Dafür wurde die DNA-Bibliothek an eine feste Oberfläche z.B. ‚Beads‘ gebunden und klonal vervielfältigt, um das Signal zu erhöhen, das von jedem ‚Target‘ während der Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Während dieses Prozesses wurde jedes einzelne DNA-Molekül in der Bibliothek an die Oberfläche eines ‚Beads‘ oder einer Durchflusszelle gebunden und mittels PCR-Amplifikation multipliziert, um einen Satz identischer Klone zu erzeugen.

In den unterschiedlichen Genpanels sind die Zielregionen, in unserem Fall tumor-assoziierte Gene, vorgegeben. Die eingesetzten Adaptor-Sequenzen haben einen eindeutigen molekularen ‚Barcode‘, so dass jede Probe mit einer eindeutigen DNA-Sequenz markiert wird. Die Technologie für die Herstellung der DNA-Fragmente beruht auf unterschiedlichen Techniken für das Binden des Barcodes. In dieser Arbeit wurde das System NextSeq550 von Illumina und Ion S5™ von Thermo Fisher angewendet. Obwohl jede NGS-Technologie einzigartig ist, verwenden alle eine Form der ‚Sequencing by Synthesis-Methode‘ (SBS), bei denen einzelne Basen gelesen werden, während diese entlang eines polymerisierten Doppelstranges eingebaut werden. Die Schritte von diesem Kreislauf sind die gleichen – Synthese der DNA-Basenpaare von einzelsträngigen DNA-Sequenzen, gefolgt vom Nachweis der eingebauten Base und anschließender Entfernung der Reaktionspartner, um den Kreislauf wieder zu beginnen. Die ‚Sequencing by Synthesis-Methode‘ von Illumina basiert auf der Zwei-Farben-DNA-Sequenzierung, welches für jeden SBS-Zyklus die DNA-Verlängerung, Signal-Detektion und Spaltung beinhaltet<sup>75</sup>. Bei dieser Methode wird die fragmentierte Template-DNA über spezifische Adaptoren kovalent an einer Durchflusszelle gebunden, auf dem schrittweise die Nukleotide Base für Base angefügt werden. Im Unterschied zum Vorgänger-Modell, welches auf einer Vier-Farben-DNA-Sequenzierung beruht hat, wurden die Nukleotide, welche für den Einbau verwendet wurden, mit einem reversiblen, terminierenden Adaptor modifiziert und jeweils mit einem anderen farbigen Fluorophor markiert. Im neuen Modell, dem NextSeq550, welches auf eine Zweikanal-Sequenzierung verwendet, werden nur zwei Bilder benötigt um die Daten der vier DNA-Basen (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T)) zu codieren. Während der wiederholten Reaktionszyklen kann die Polymerase die komplementären Nukleotide einbauen. Dies ermöglicht die gleichzeitige Zugabe aller vier dNTPs und minimiert das Risiko eines Fehleinbaus. Die weitere Synthese wird durch die Terminatorsequenz blockiert. Nach jedem Zyklus wird die Identität der eingefügten Base durch den Nachweis der Fluoreszenzsignale bestimmt. Anhand der Fluoreszenzsignale kann man somit Rückschlüsse

auf die Basenabfolge nehmen. Im Gegensatz zum NextSeq550 System von Illumina, welches ein optisches Signal detektiert, arbeitet der Ion S5™ mit einer Halbleiter Sequenzierungstechnologie, die pH-Änderungen misst, welche durch die Freisetzung von Wasserstoff-Ionen während der Elongation bei der DNA-Replikation entstehen. Änderungen des pH-Werts werden von einem Sensor erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt, das proportional zur Anzahl der eingebauten Basen ist. Anhand dieser beiden Technologien kann man nun Rückschlüsse auf die Nukleotid-Abfolge der DNA-Sequenzen nehmen. Dabei entsteht eine große Datenmenge an Rohdaten. Die Rohdaten werden im weiteren Schritt bioinformatisch aufgearbeitet, sodass diese in Analyse Tools hochgeladen und ausgewertet werden können.

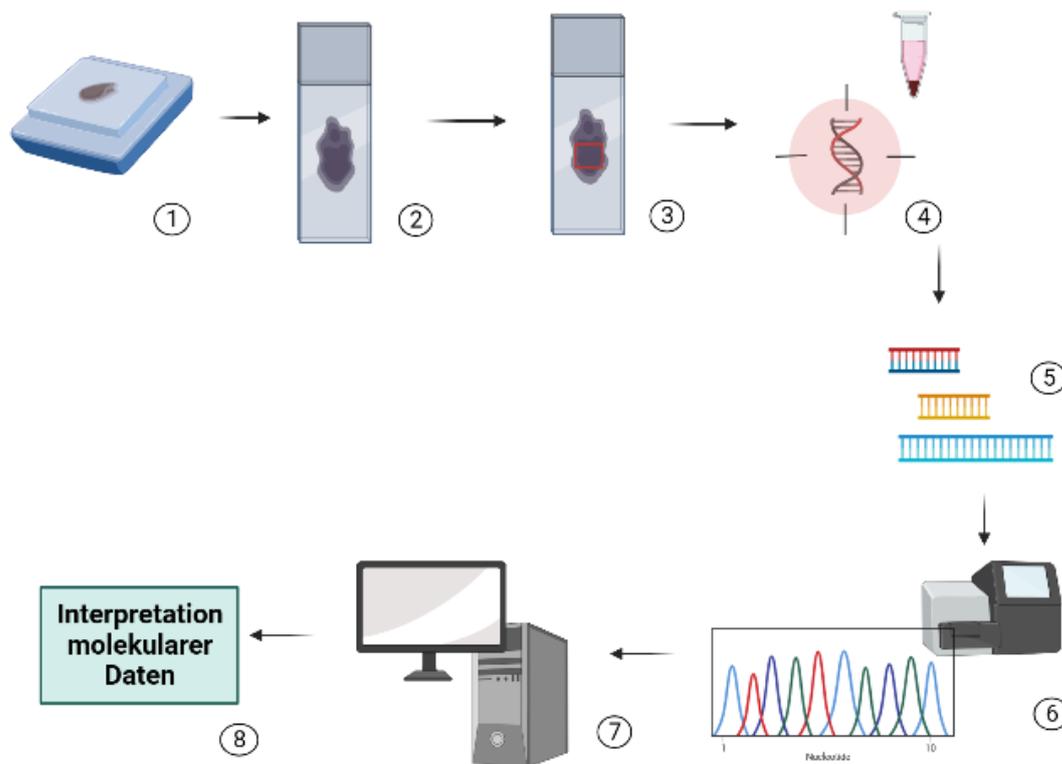


Abbildung 6: Workflow einer NGS-Analyse an Tumorgewebe

Der Ablauf einer NGS-Analyse an Tumorgewebe wird dargestellt. Im ersten Schritt (1) werden aus dem FFPE Tumorblock Schnitte auf einen Objektträger gezogen (2). Nach fachkundiger Beurteilung von einem Pathologen werden die Tumoreale annotiert (3), dies kann entweder manuell erfolgen oder mit der Unterstützung von Softwareprogrammen. Anschließend wird von dem annotiertem Tumorareal das Gewebe abgekratzt (3) und für die DNA/RNA-Isolierung vorbereitet (4). Die DNA-Bibliothek basiert auf der Vorlage von den eingesetzten Genpanels und wird anschließend auf einem NGS-Gerät sequenziert (5,6). Zum Schluss werden die Datensätze in unterschiedliche Dateiformate konvertiert, um diese weiter zu verarbeiten. Komplexe Analyse-Softwaresysteme können diese konvertierten Dateiformate lesen und einen

individuellen strukturierten Befund erstellen auf Basis der Beurteilung genomischer Varianten im klinischen Kontext (7,8). (Das Bild wurde erstellt mit Biorender.com).

### **2.2.1.1 Extraktion der Tumorzellen aus FFPE-Material**

Für die Extraktion von DNA und RNA aus dem in Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorgewebe wurden Objektträger mit 3 µm dicken Schnitten aus dem FFPE-Block gefertigt. Fachpatholog:innen annotieren auf dem Objektträger die Tumorareale mit einer Prozentzahl von Tumorzellen (Abb.: 6). Die annotierten Areale wurden vom Objektträger gekratzt und die Isolation der DNA/RNA aus dem Gewebe erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem Promega Maxwell® FFPE Plus DNA Kit bzw. für die RNA-Isolation mit dem Maxwell RSC RNA FFPE Kit<sup>76-78</sup>. Die Methode der DNA- und RNA-Isolation wurde für beide Assays (OCA v3 und TSO500) identisch verwendet. (Abb.: 6).

### **2.2.1.2 Erstellung der NGS-Bibliothek**

Bei einem NGS-Ansatz mit bestimmten Genpanels wurden molekularbiologische Methoden zur Anreicherung spezifischer genetischer Sequenzen eingesetzt. In dieser Kohorte wurde das Panel OCA v3 von Thermo Fisher mit 161 Genen und das Panel TSO500 von Illumina eingesetzt, welches 523 krebsrelevante Gene abdeckt<sup>79-81</sup>.

Die jeweilige DNA- und RNA-Bibliothek von jedem Panel wurde nach Hersteller Protokoll erstellt<sup>79,80</sup>. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) gemessen. Für die Herstellung der Bibliothek für den OCA v3 Assay wurden 20 ng genomische DNA bzw. cDNA per Probe eingesetzt und beim TSO500 Assay wurden 40ng cDNA per Probe eingesetzt.

### **2.2.1.3 Qualitätskontrolle**

Die DNA- und RNA-Konzentration wurde mittels Qbit gemessen.

### **2.2.1.4 Klonale Amplifikation und Sequenzierung**

Für das OCA v3 Panel wurde die klonale Amplifikation mit dem IonChef System gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt<sup>79-83</sup>. Die hergestellte DNA-Bibliothek wird automatisch auf die Halbleiterchips pipettiert und im Anschluss auf dem Ion S5™ Gerät sequenziert. Im Gegensatz zum Ion S5™ hat Illumina ein Gerät entwickelt bei dem die klonale Amplifikation und Sequenzierung im gleichen Gerät stattfindet. Auch hier erfolgte die Bearbeitung nach dem Handbuch des Herstellers<sup>79-82</sup>. Als Referenzgenom bei beiden Analysen wurde das Human Reference Genome 19 (hg19) verwendet<sup>84</sup>.

### **2.2.1.5 NGS-Datenanalyse**

Jede NGS-Analyse erzeugt große Mengen komplexer Daten, die aus kurzen Leserastern von Nukleotid-Abfolgen bestehen. Obwohl jede Technologieplattform ihre eigenen Algorithmen und Datenanalysetools hat, verfügen sie über einen ähnlichen Ansatz der Datenauswertung. Die Analyse der Datenauswertung und Interpretation kann in folgende Schritte unterteilt werden: Verarbeitung der Rohdaten (Demultiplexing), Erstellung von textbasierten Sequenzen und Qualitätsbeurteilungen (FastQ file), Abgleich mit bekannten Referenzen und unbekanntem Sequenzen der Sequenzierungsdaten in einem binären Speichermedium (BAM oder SAM file), Interpretation der Ergebnisse im Kontext von zugelassenen Medikamenten, Wirksamkeiten, Biomarker -Score und klinischer Gesamtbeurteilung (vcf file).

In dieser Arbeit wurden die Daten des OCA v3 Panels aus der ION Torrent Software und die Daten des TSO500 Panels aus der BaseSpace Software mittels dem MH VCF Adapter in die Software von Molecular Health (MH) Guide geladen<sup>85,86</sup>. MH Guide ist eine in Europa als In-vitro Diagnostikum zugelassene IVDR-konforme Software, die Molekularpathologen bei der Interpretation umfangreicher molekularer Datensätze unterstützt<sup>61</sup>. MH Guide kann unabhängig von der verwendeten Sequenzierungstechnologie komplexe Datensätze interpretieren und automatisiert die Identifikation relevanter genetischer Varianten, die für die Behandlung von Krebspatienten von Bedeutung sind<sup>61</sup>. Bei dieser Analyse vergleicht die Software MH Guide von Molecular Health die Daten der Patientenprobe mit aktuellen publizierten biomedizinischen Datenbanken und Arzneimittelinformationen<sup>62-65</sup>. MH Guide liefert Informationen um relevante Biomarker und ihre klinische Bedeutung in den jeweiligen Tumorentitäten zu identifizieren. Diese Informationen werden in einem übersichtlichen Patientenreport zusammengefasst<sup>61</sup>. Die molekularpathologischen Befunde und die MH Guide Befunde werden mit den klinisch vorhandenen Daten verknüpft und im Rahmen des molekularen Tumorboards im Expertengremium eine individualisierte Therapieempfehlung abgegeben. Die behandelnden Onkolog:innen können dann im Sinne des ‚Shared-Decision-Making‘ eine Therapie gemeinsam mit den Patient:innen vereinbaren. Dieses entlastet die Onkolog:innen bei der Therapieplanung enorm, weil dieser sich auf die hochgradig komplexe, arbeitsteilige und interdisziplinäre Arbeit des Expertengremiums des molekularen Tumorboard verlassen kann.

### **2.2.2 Datenauswertung und Visualisierung**

Die Sequenzierungsdaten der Kohorte von 77 Patient:innen wurden in die Software von MH Guide mittels der MH VCF Adapter Suite geladen. Der Adapter extrahiert relevante

Informationen aus den Ausgabedateien der NGS-Geräte (z.B. VCF, CSV) und kodiert diese Informationen in ein mit MH Guide kompatibles VCF-Format. Die MH VCF Adapter Suite kann einzelne Dateien oder bestimmte Kohorten anpassen und verfügt außerdem über eine integrierte, hochautomatisierte Funktion zum Hochladen in MH Guide.<sup>62,85,86</sup> Nach dem Upload der Kohorte kann die Software die Metadaten des Kollektivs mit der Bewertung von MH Guide mit den Sequenzierungsdaten verknüpfen. Die neue VCF Datei kann man als eine Microsoft Excel Tabelle mit mehreren Reitern von MH erhalten. Die Auswertung erfolgte mit definierten Filterkriterien mit Hilfe von Pivot Tabellen. Folgende Filterkriterien für die weitere Varianteninterpretation mussten erfüllt sein: ‚included by filters‘, ‚ $\geq 95$  Coverage‘ und ‚ $\geq 5\%$  Allelfrequenz‘. Die Pivot Tabellen wurden graphisch mit Microsoft PowerPoint umgesetzt. Die Visualisierung der Oncoplots und Lolliplots wurden von Dr. Claudia Döring umgesetzt. Die statistische Auswertung wurde mit der Software R Version 4.0.5 durchgeführt<sup>87</sup>. Die Software Bioconductor (Version 3.12) wurde dann in R installiert und die Oncoplots und Lolliplots wurden mir folgenden Bibliotheken erstellt<sup>88</sup>:

Oncoplot:  
ComplexHeatmap version 2.6.2

Lolliplots:  
Gviz\_1.34.1  
trackViewer\_1.26.2  
rtracklayer\_1.49.5  
VariantAnnotation\_1.36.0  
TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene\_3.2.2  
org.Hs.eg.db\_3.12.0

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Eigenschaften der Kohorte

Eine Kohorte von 77 Patient:innen mit metastasiertem Mammakarzinom haben im Zeitraum von 01/2019-02/2022 im Rahmen der Routinediagnostik eine molekularpathologische Testung mit dem OCA v3 Panel (n=69) oder dem TSO500 Panel (n=8) erhalten. Diese Kohorte umfasst n=75 weibliche Patientinnen und n=2 männliche Patienten. Der häufigste Subtyp in der Kohorte sind Hormonrezeptor-positive, gefolgt von Her2-positiven und TNBC-Patient:innen. Das mediane Alter bei der Analyse liegt bei 61 Jahren, die Altersspanne ist von 33 bis 97 Jahren (Tab.: 12).

Tabelle 12: Eigenschaften der Patientenkohorte

<b>Eigenschaften</b>	<b>Anzahl</b>	<b>%</b>
<b>Alter</b>		
Medianes Alter	61 Jahre	
Altersspanne	33-97 Jahre	
<b>Geschlecht</b>		
weiblich	75	97,4
männlich	2	2,6
<b>Immunhistologische Stratifizierung der Subtypen</b>		
HR-positiv, Her2-negativ	58	75,3
HR-positiv, Her2-positiv	4	5,2
HR-negativ, Her2-positiv	4	5,2
TNBC	11	14,3
<b>Prozentualer Tumorzellgehalt in der Probe</b>		
20-40	16	20,8
41-60	18	23,3
61-80	27	35,1
81-100	16	20,8

Der Untersuchungsauftrag für die molekularpathologische Diagnostik kam von Einsendern des OncoNet Rhein-Main e.V.

Die drei Einsender mit den meisten Untersuchungsaufträgen waren das Sana Klinikum Offenbach, Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. Dr. med. Christian Jackisch, Universitätsklinikum Frankfurt; Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. Dr. med. Sven Becker/ Prof. Dr. med. Christine Solbach; und die onkologische Gemeinschaftspraxis am Bethanien Krankenhaus, Prof. Dr. med. Hans Tesch (Abb. 7).

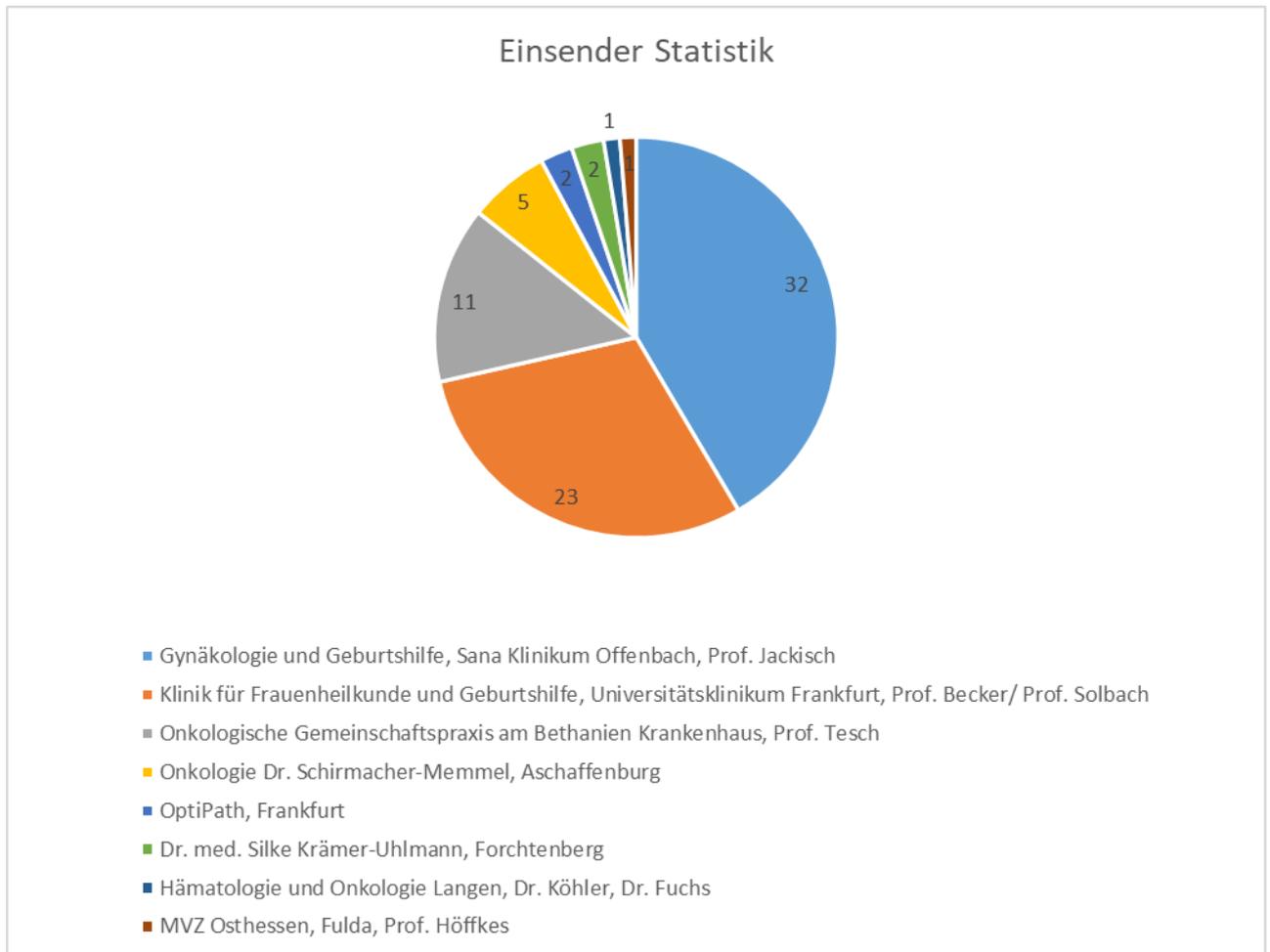


Abbildung 7: Einsender Statistik

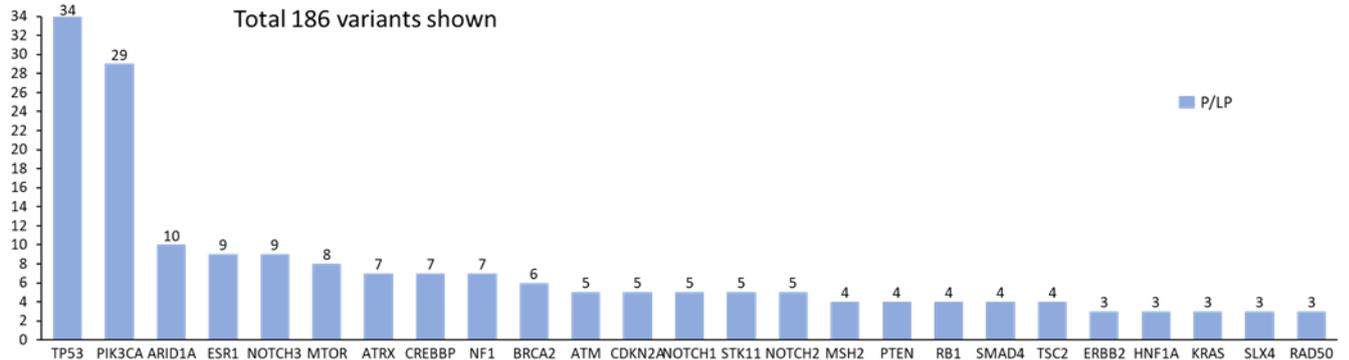
Anzahl der Untersuchungsaufträge für eine molekularpathologische Diagnostik nach den Einsendern.

### 3.2 Häufigkeiten der Alterationen

In einem Balken-Diagramm wurden die am häufigsten veränderten Gene mit pathologischen (P) und wahrscheinlich pathologischen (LP) Varianten der Häufigkeit nach gezeigt. Bei 186 gefundenen Alterationen (P und LP) wurden im Durchschnitt 2,4 pathogene Alterationen pro Patient gefunden (Abb.: 7). In einer weitaus größeren Kohorte wurden im Durchschnitt 3,9 Alterationen gefunden <sup>89</sup>. Die häufigsten Alterationen wurden in den Genen *TP53* (44%), *PIK3CA* (38%), *ESR1* (12%), *BRCA2* (8%), *PTEN* (5%) und *ERBB2* (4%) gefunden. Die

Prävalenz der genetischen Alterationen war somit ähnlich zu den bekannten ESMO ESCAT Guidelines beim metastasierten Brustkrebs (mBC) <sup>50</sup>. In Abbildung 7B sind in Rot die Gene aufgeführt, welche bei den ESMO ESCAT Guidelines <sup>50</sup> beim mBC aufgeführt werden.

(A)



(B)

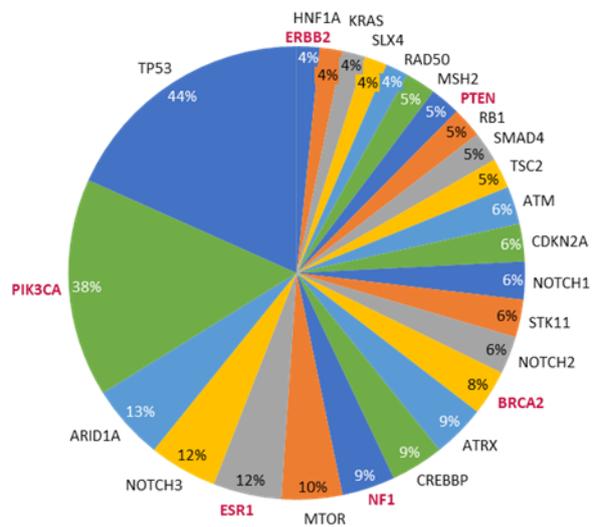


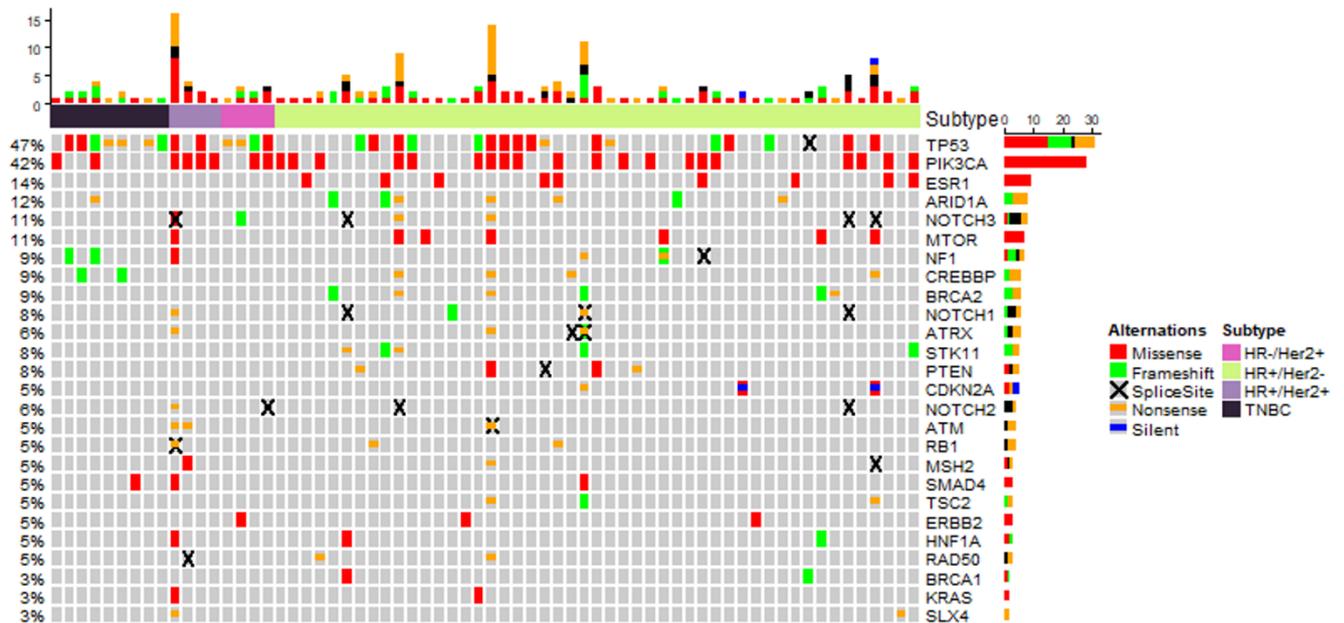
Abbildung 8: Ergebnisse der NGS-Analyse von Proben metastasierter Mammakarzinome (mBC) mittels OCA v3 Assay und TSO500 Assay.

(A) Verteilung der Gen Alterationen von mBC-Patient:innen mit 186 gezeigten Varianten Pathogen (P) und wahrscheinlich pathogen (LP). (B) Prozentuale Verteilung der gefundenen Alterationen mit mehr als 3 gefundenen Varianten klassifiziert als P und LP. In Rot wurden die relevanten Gene laut den ESMO-Guidelines <sup>50</sup> beim mBC dargestellt. Hier wurden nur somatische Varianten mit  $\geq 5\%$  Allelfrequenz berichtet. Varianten, wie VUS, likely benign, benign und no classification wurden herausgefiltert. Die Subtypen wurden nicht unterschieden.

### 3.3 Oncoplot und Lollipopplots

Eine Darstellung in einem Oncoplot zeigt die Verteilung der veränderten Gene bei jedem Patienten. Hier sieht man in jeder Spalte einen einzelnen Fall und in jeder Zeile die betroffenen Gene mit den Varianten. In Clustern sind die Subgruppen dargestellt. Fälle mit mehreren gefundenen pathogenen Varianten haben wahrscheinlich eine höhere Tumormutationslast (‘tumor mutational burden’, TMB). In Abbildung 8 sind alle Gene mit mehr als 3 gefundenen Varianten einer Alteration gezeigt. Eine Auswertung aller gefundenen Gene findet sich im Anhang 2. Eine subgruppenspezifische Auswertung ist aufgrund der kleinen Kohorte nicht möglich. Auffällig ist hier das Auftreten von beim Mammakarzinom bekannten *TP53* und *PIK3CA*-Mutationen<sup>90</sup>.

(A)



(B)

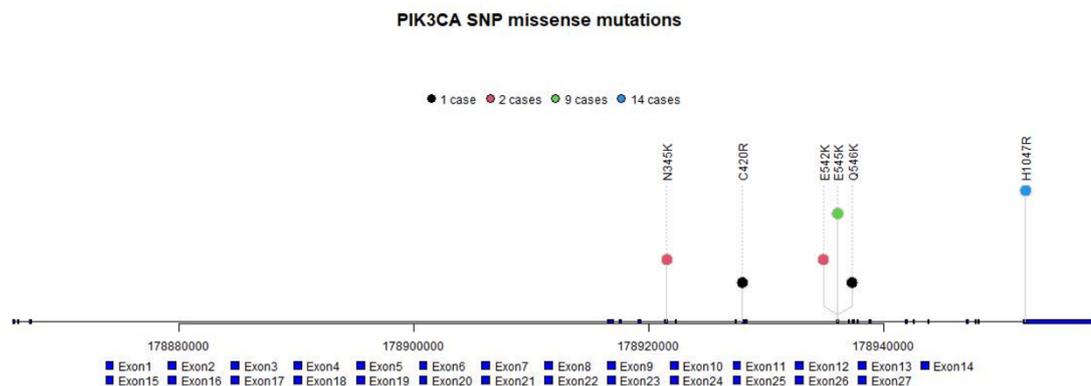


Abbildung 9: Oncoplot der Kohorte und Lollipop vom *PIK3CA* Gen

(A) Der Oncoplot ist eine schematische Darstellung der gefundenen Alterationen. Hier sind die Gene der einzelnen Proben mit der prozentualen Verteilung gezeigt. Die Fälle wurden nach den Subtypen sortiert und die Häufigkeit der Alterationen in der Kohorte wird angezeigt. (B) Lollipop Diagramm des Gens *PIK3CA*. Dieser Lollipop zeigt die genaue Lokalisation der betroffenen Codons innerhalb des gesamten *PIK3CA* Gens.

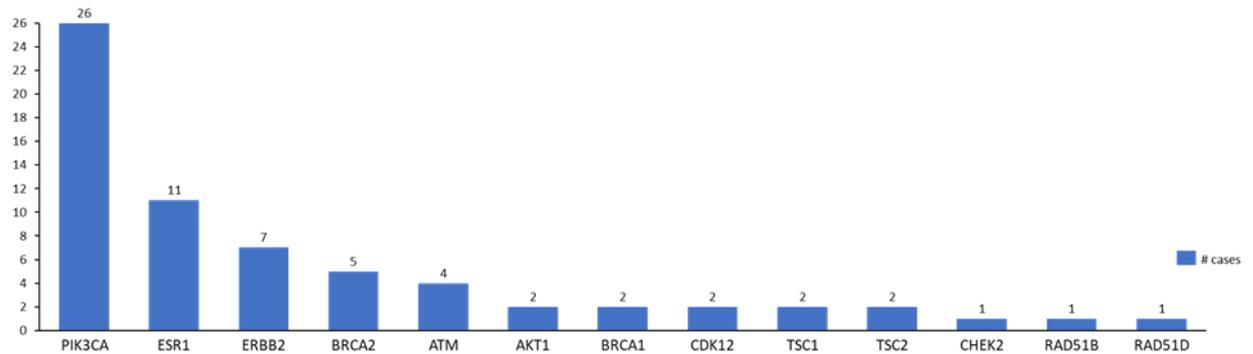
Mit Hilfe von sogenannten Lollipop Diagrammen kann man die genaue Lokalisation der Basensequenz im gesamten Gen darstellen. So waren in der mBC-Kohorte 38% von einer pathogenen Mutation im Gen *PIK3CA* mit therapeutischen Konsequenzen betroffen. Beim *PIK3CA* Gen entfallen allein 23 Varianten (29,9%; P und LP) auf die beiden Hotspot Mutationen p.E545K in Exon 9 und p.H1047R in Exon 20<sup>91,92</sup>. Zwei der drei P/LP Varianten

des *ERBB2* Gens fallen auf die bekannte Mutation p.S310F (Anhang 4)<sup>93,94</sup>. Interessanterweise war bei einem dieser Fälle die Her2-Immunhistochemie negativ (score 0). Beim *ESR1* Gen waren alle neun detektierten Varianten (P und LP) innerhalb von drei Aminosäuresequenzen (p.536, p.537 und p.538) (Anhang 3).

### **3.4 Varianten genomischer Alterationen beim metastasierten Mammakarzinom und deren therapeutische Implikationen**

Im nächsten Schritt wurden die zielgerichteten Therapieoptionen sogenannte targetable Alterationen mit einer Biomarker Therapie ausgewertet. Die Software MH Guide hat für die Varianteninterpretation einen eigenen Score entwickelt, namentlich Clinical Variant Interpretation (CVI)<sup>61,62,65</sup>. Zuerst wurden nur Genveränderungen mit einer zugelassenen Therapie im gleichen Tumortyp dargestellt (Abb.: 9A). Die häufigste Alteration mit zugelassener therapeutischer Implikation war *PIK3CA* mit 26 Fällen (34%). Alterationen für einen OFF-Label-Ansatz, welcher in einem anderen Tumortyp zugelassen ist, wurden ebenfalls ausgewertet (Abb.: 9B). So hatten 39/77 (51 %) der Fälle mindestens eine potenziell zielgerichtete Veränderung mit einem wirksamen Biomarker, einem CVI-Score  $\geq 6$  und IN-Label-Behandlungsoptionen im gleichen Tumortyp. Ergänzend wurde bei 17 von 77 (22%) der Patient:innen mehr als eine potenziell zielgerichtete Veränderung mit einem zugelassenen Biomarker identifiziert. Bei 12 von 77 (16%) Fällen der Kohorte konnte mindestens eine potenziell zielgerichtete Veränderung mit einem wirksamen Biomarker, einem CVI-Score  $\geq 6$  und OFF-Label-Behandlungsoptionen in einem anderen Tumortyp identifiziert werden.

(A)



(B)

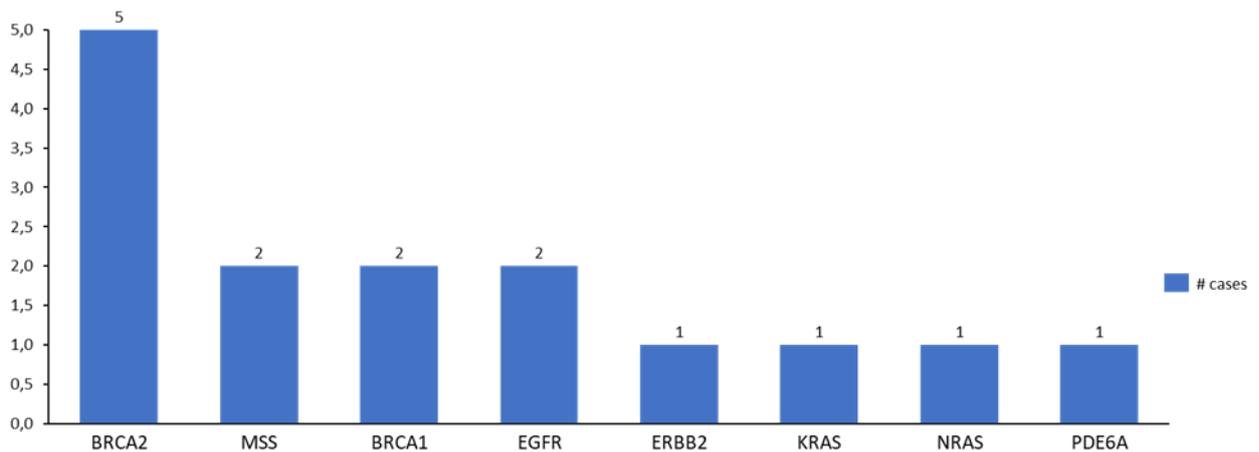


Abbildung 10: Targetable Alterationen

(A) Targetable Alterationen (entweder ein wirksamer oder ein unwirksamer Biomarker) mit entsprechendem CVI-Score  $\geq 6$  und IN-Label-Behandlungsoptionen (im diagnostizierten Tumortyp)

(B) Targetable Alterationen (entweder ein wirksamer oder ein unwirksamer Biomarker) mit entsprechendem CVI-Score  $\geq 6$  und OFF-Label-Behandlungsoptionen (in einem anderen Tumortyp)

### 3.5 Behandlungsoptionen

Des Weiteren wurden die einzelnen wiederkehrenden genomischen Veränderungen des Kollektivs nach der Qualität der Evidenz aus klinischen Studien und dem Zulassungsstatus klassifiziert, entsprechend der Skala der Clinical Variant Interpretation (CVI).

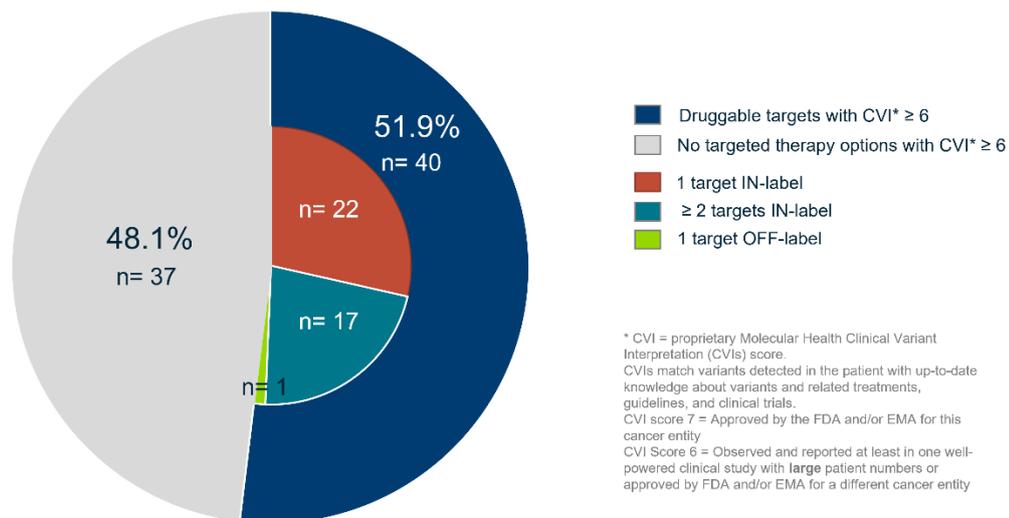


Abbildung 11: Verteilung der Biomarker mit effektivem Drug Target nach CVI Score.

Filtereigenschaften: Relevanz Varianten = „included by filters“ und „included by user“;  
 Varianten mit Impact = effective, insgesamt 1,133 CVIs mit Impact effective (insg. 1,731)

Die ESMO Scale of Clinical Actionability, die Skala der Association for Molecular Pathology sind Leitlinien für die Varianteninterpretation (Tab.: 3,4). Ziel beider Guidelines ist es, eine standardisierte Klassifizierung, Annotation, Interpretation und Berichterstattung von Sequenzvarianten zu ermöglichen. Somatische Varianten werden je nach ihrer klinischen Bedeutung für die Krebsdiagnose, -prognose und/oder -therapie laut Level of Evidence (LoE) in vier bzw. fünf Stufen (evidence tier) eingeteilt. Varianten der Stufe eins (evidence tier I) sind von höchster klinischer Bedeutung, und Varianten der Stufe vier sind gutartige oder wahrscheinlich gutartige Varianten. So haben evidence tier I eine starke klinische Bedeutung und die Übereinstimmung von sogenannten Drug targets wird in klinischen Studien mit besseren Ergebnissen in Verbindung gebracht. Ähnlich wie beim evidence tier I, stimmen bei einem evidence tier II auch die Drug targets überein, allerdings ist der Nutzen noch nicht vollständig belegt. Empfehlungen im molekularem Tumorboard basieren häufig auf LoE I und II der Leitlinien (AMP, ESCAT).

Im nächsten Schritt wurde untersucht wie viele Varianten gefunden wurden, welche als optionale Biomarker beim metastasierten Mammakarzinom eingestuft sind (Tab.: 13). In dieser Kohorte wurden 30 pathogene Varianten gefunden. Resultierend daraus, nach Abzug der Doppelungen in der Kohorte wurden n=23 Varianten gefunden. Somit haben 30% der Patient:innen von einer molekularpathologischen Untersuchung aufgrund von detektierten

Resistenzmechanismen profitiert. Wobei hier anzumerken ist, dass der TMB-Status im größten Teil der Kohorte nicht bestimmt worden ist und die Anzahl noch größer ausfallen würde.

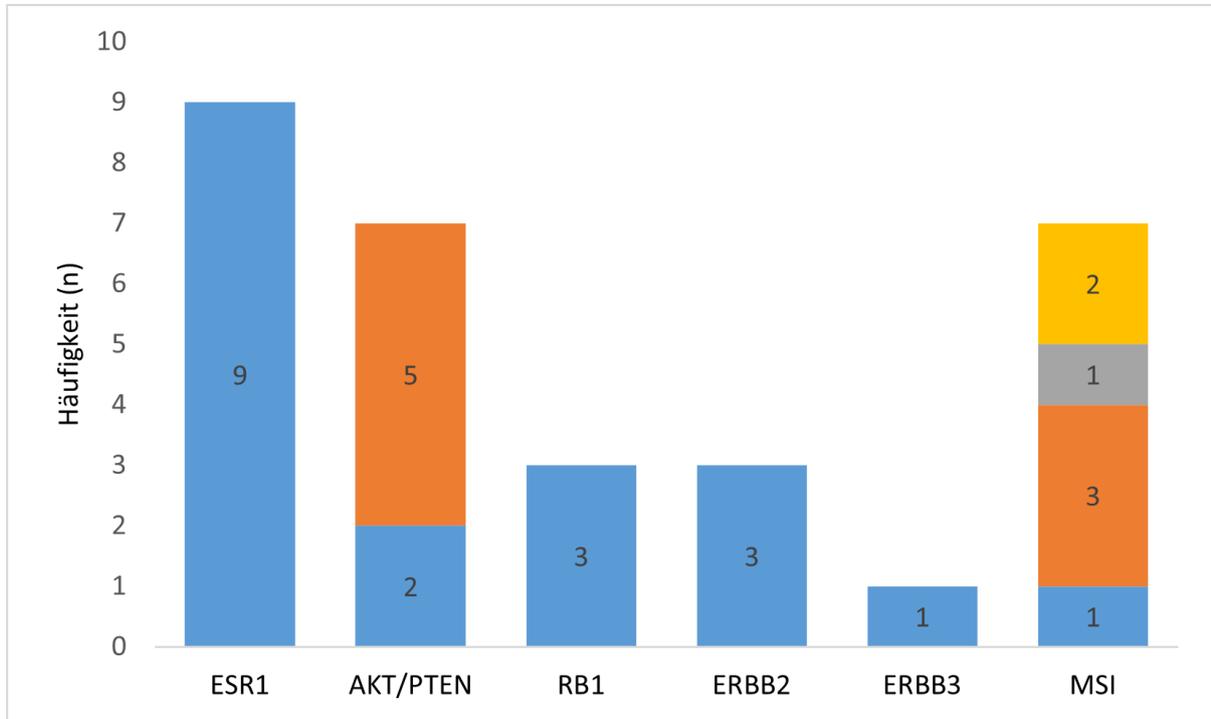


Abbildung 12: Alterationen optionaler Biomarker

Hier sind alle gefundenen Alterationen (P und LP) in optionalen Biomarkern aufgeführt. Insgesamt 30 Alterationen wurden gefunden. Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde gegliedert in die *MMR* Gene *MLH-1* (blau), *MSH-2* (orange), *MSH-6* (grau) und *PMS-2* (Gelb).

Zusammenfassend wurden die molekularen Tumorprofile anhand ihrer Häufigkeit und Therapieoptionen dargestellt. Die Häufigkeit der Veränderungen war ähnlich wie die der ESMO-Guidelines. Bei mehr als der Hälfte der Kohorte konnten personalisierte Therapieoptionen identifiziert werden.

## 4 Diskussion

Mit der wachsenden Verfügbarkeit von Sequenzierungstechnologien können bei jedem Krebspatienten genetische Veränderungen eines Tumors nachgewiesen werden, welche potenzielle Biomarker für eine zielgerichtete Therapie darstellen können. Um die beste Behandlungsentscheidung treffen zu können, müssen sowohl der Nachweis therapierbarer Genveränderungen als auch Informationen zur klinischen Bewertung in einem Bericht zusammengefasst werden. Die molekularpathologischen Befunde werden mit den klinisch vorhandenen Daten verknüpft und im Rahmen des molekularen Tumorboards im Expertengremium eine individualisierte Therapieempfehlung abgegeben. Die behandelnden Onkolog:innen können dann im Sinne des sogenannten Shared-Decision-Making eine Therapie gemeinsam mit den Patient:innen vereinbaren. Dieses entlastet die Onkolog:innen bei der Therapieplanung enorm, weil diese sich auf die hochgradig komplexe, arbeitsteilige und interdisziplinäre Arbeit des Expertengremiums des molekularen Tumorboard verlassen können.

Beim metastasierten Mammakarzinom kann man auf Grundlage der bisher zugelassenen zielgerichteten Therapien in obligatorische und optionale Biomarker bei der Testung unterscheiden (Abb.: 4, Tab.:13).

Tabelle 13: Obligatorische und optionale Biomarker beim metastasierten Mammakarzinom<sup>50,95,96</sup>

<b>Alteration/Biomarker</b>	<b>Ungefähre Häufigkeit</b> *	<b>Bedeutung</b>	<b>LoE</b>	<b>Mögliche therapeutische Relevanz</b> <sup>23,41,49</sup>
<b><i>PIK3CA</i></b>	Ca. 30-40%	Aktivierung des PIK3K-Signalwegs	IA	Gabe von Alpelisib + Fulvestrant (HR+, Her2-, lokal fortgeschritten, metastasiert)
<b><i>BRCA1/2</i> Keimbahnmutation</b>	Ca. 4%	Gestörte DNA-Reparatur, mögliches Ansprechen auf PARP-Inhibition	IA	Gabe von Olaparib/ Talazoparib mono (Her2- und metastasiert oder im frühen Ca bei hohem Rezidivrisiko (St. II/III triple-negativ oder HR+ mit >4

<b><i>BRCA1/2</i> (somatische Mutation)</b>	(ca. 3%)		(IIIA)	befallenen Lymphknoten) adjuvant nach OP/ Standardchemotherapie )
<b><i>NTRK</i></b>	ca. 1%	Liganden-unabhängige Aktivierung der Tyrosinkinase	IC	Gabe von NTRK-Inhibitoren (tumoragnostisch bei soliden Tumoren)
<b>Mikrosatelliteninstabilität (MMR-Proteine: (<i>MLH-1</i>, <i>MLH-2</i>, <i>MLH-6</i>, <i>PMS-2</i>))</b>	ca. 1%	Gestörte DNA-Reparatur, mögliches Ansprechen auf Immuncheck Point Inhibitoren	IC	Gabe von Immuncheck Point Inhibitoren (FDA: Pembrolizumab tumoragnostisch bei soliden Tumoren) 34,49,71,97
<b><i>ESR1</i> Resistenzmutation-/Fusion</b>	ca. 10%	Resistenz gegenüber anti-hormoneller Therapie/ herkömmlicher AI	IIA	Umstellung der antihormonellen Therapie <sup>98-101</sup>
<b><i>PTEN</i> Verlust</b>	ca. 7%	Aktivierung des PI3K-Signalwegs	IIA	Gabe von AKT-Inhibitoren (Ipasertinib) im Rahmen von Studien in Kombinationstherapie 70,99
<b><i>ERBB2</i> Hotspot Mutation</b>	ca. 4%	Resistenz gegenüber antihormonelle	IIB	Gabe von TKI wie Neratinib, Lapatinib (zugelassen bei

		r Therapie, mögliches Ansprechen auf Pan-TKI		gleichzeitiger Her2- Amplifikation in Kombinationstherapie) 34,49,69
<b>AKT1 Mutation (E17K)</b>	ca. 5%	Aktivierung des PI3K- Singalwegs	IIB	Gabe von AKT- Inhibitoren (Pan-AKT- Inhibitor Capivasertinib bei E17K-Mutation) 70,99
<b>MDM2 Amplifikation/ Überexpression</b>	ca. 1%	Verlust der p53-Hemmung (onkogen)	IIIA	Mögliche Gabe von MDM2-Inhibitoren (bisher in Liposarkomen)
<b>ERBB3 Mutation</b>	ca. 2%	TK- Aktivierung durch Homo- dimerisierung oder Hetero- dimerisierung mit Her1 (EGFR) oder Her2, mögliches Ansprechen auf TKI	IIIB	Gabe von TKI (Trastuzumab, Lapatinib, Afatinib) in Kombinationstherapie
<b>Weitere: RB1 Verlust, NF1 Mutation, MYC/FGFR1/CCND1 / EGFR- Amplifikation,...</b>		Endokrine Resistenz bzw. Resistenz gegenüber CDK4/6 Inhibitoren (RB1)	IVA/ X	Optionen in Form von Studien
<b>PD-L1 Überexpression</b>		Ansprechen auf Immunchek		Gabe im metastasierten triple-negativen

		Point Inhibitoren		Mammakarzinom von Pembrolizumab bei CPS $\geq 10$ ; von Atezolizumab/nab-Paclitaxel bei IC $\geq 1$
<b>TMB</b>		Ansprechen auf Immuncheck Point Inhibitoren		Gabe von Immuncheck Point Inhibitoren, z.B. Pembrolizumab <sup>102</sup>

\* Die Häufigkeiten sind abgeglichen mit der aktuellen Literatur. <sup>28,50,55,96</sup>

Da in dieser Arbeit nur molekulare Analysen der DNA untersucht wurden, sind im Folgenden die Biomarker beschrieben, welche mit der Methode detektiert, werden können.

#### 4.1 *PIK3CA*-Gen

Das bekannteste Beispiel für einen molekularen Behandlungsansatz beim Mammakarzinom zeigt das Arzneimittel Alpelisib <sup>48</sup>. So sind Veränderungen im *PIK3CA*-Gen mit etwa 40% die häufigsten Mutationen beim Mammakarzinom<sup>28,50,103</sup>. Patient:innen mit *PIK3CA*-Mutationen sind häufig primär oder sekundär resistent gegen eine endokrine Therapie und haben somit eine schlechtere Prognose. Die Solar-1 Studie zeigte wiederum, dass genau diese Patient:innen von einer Kombination aus Alpelisib und Fulvestrant profitieren<sup>103</sup>. Therapierelevant ist der Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation seit Zulassung des *PIK3CA*-Inhibitors Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant beim Hormonrezeptor-positiven, endokrin vortherapierten, metastasierten Mammakarzinom<sup>48</sup>. Patient:innen mit *PIK3CA* Wildtyp profitieren nicht von einer Therapie. Obwohl Alpelisib im Rahmen des AMNOG Prozesses vom deutschen Markt zurückgezogen wurde, besteht die Möglichkeit einen Kostenübernahmeantrag zu beantragen und das Medikament über die internationale Apotheke anzufordern. Die Testung auf eine *PIK3CA*-Mutation kann anhand von Gewebe oder Blut durchgeführt werden. Die Auswertung der SOLAR-1 Studie zeigte mehrere Hotspots in den Exonen 7, 9 und 11 <sup>103</sup>. Mittlerweile sind weitere Hotspot Regionen des *PIK3CA* Gens bekannt. So wurden in dieser Kohorte mit 38% *PIK3CA*-Mutationen eine ähnliche Häufigkeit entdeckt, wie in der Literatur aus einem Review der ESMO-Guidelines <sup>50</sup>. Darüber hinaus waren 29,9% in den bekannten Hotspot Regionen (p.E545K in Exon 9 und p.H1047R in Exon 20). Die Lokalisation der *PIK3CA* Mutation im Gen kann Einfluss auf das Therapieansprechen und das Overall Survival (OS) haben. So zeigte

eine Studie mit 589 analysierten Proben von chinesischen Mammakarzinom-Patientinnen im Stadium I-III, dass die *PIK3CA* Mutationen in der C2 Domäne mit signifikant kürzerem OS assoziiert war als Patientinnen ohne Mutation<sup>104</sup>. Eine weitere Analyse einer Subklassifikation der *PIK3CA* Mutationen mit dem entsprechenden Therapieansprechen und Outcome erscheint als sinnvoll, auch wenn man den geographischen und ethnischen Einfluss an einer westlichen Population validieren sollte.

## 4.2 *BRCA1/2*-Gene

Ein weiterer Biomarker mit einer therapeutischen Konsequenz beim Mammakarzinom ist die Mutation der Gene *BRCA1* und *BRCA2*. Diese Gene sind involviert bei der Zell Reparatur und können DNA-Schäden auf unterschiedlichen Wegen reparieren und so die genomische Stabilität bewahren<sup>105</sup>. In normalen Körperzellen können Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination repariert werden. Bei Krebszellen, denen Komponenten der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) fehlen (z.B. *BRCA1* oder *BRCA2*, aber auch weitere HRR-Gene, wie *PALP2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD50* etc.), können Doppelstrangbrüche nicht suffizient repariert werden<sup>73,105,106</sup>. Beim Mammakarzinom treten *BRCA*-Mutationen bei Her2-negativen Tumoren auf, so zeigen 26% der TNBC-Patient:innen eine Keimbahnmutation im *BRCA*-Gen (*gBRCA*) und ca. 5% der Hormonrezeptor-positiven Patient:innen. Beim Mammakarzinom gibt es auch somatische Mutationen, hier liegt die Prävalenz insgesamt bei 3% (*sBRCA* in TNBC ca. 6 %, *sBRCA* in HR+ BC ca. 2%)<sup>50,96</sup>. In dieser Kohorte wurden nur somatische Varianten erfasst. Bei 8% der Patient:innen dieser Kohorte wurde eine somatische Veränderung in *BRCA2* entdeckt. Bei diesen konnte eine Empfehlung für einen PARP-Inhibitor gestellt werden. Andere HRR-Gene, welche für das Ansprechen auf PARP-Inhibitoren hinweisen, wie z.B. *PALP2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD50*, können Interpretationsgrundlage im molekularem Tumorboard sein, ob eine PARP-Inhibitor Therapie in Erwägung gezogen werden sollte. Die unterschiedliche Prävalenz in dieser Kohorte lässt sich durch die sehr kleine und heterogene Kohorte mit kleinen Subgruppen begründen. Außerdem wurden keine Keimbahntestungen vorgenommen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem *BRCA*-Status scheint es vor allem beim hereditären Brustkrebs zu geben; so haben Patient:innen mit einer *gBRCA1* Mutation eine höhere Wahrscheinlichkeit ein TNBC zu entwickeln, wo hingegen *gBRCA2* Mutationsträgerinnen dazu neigen, hormonabhängigen Brustkrebs zu entwickeln<sup>73</sup>. Bei Patient:innen mit einer *BRCA1*- oder *BRCA2*- Mutation, detektiert am Tumorgewebe, besteht in erster Linie der Verdacht auf eine Keimbahnmutation. Ein Nachweis von Keimbahnmutationen sollte von einem zertifizierten Labor für Humangenetik oder einem

Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs (FBREK Zentrum) durchgeführt werden. Um eine *gBRCA*-Mutationsanalyse durchzuführen, wird eine Blutprobe benötigt. Therapeutisch relevant für eine PARP-Inhibitor Therapie ist diese Analyse bei Patient:innen mit Her2-negativem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs mit nachweisbarer pathogener Mutation in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* oder *BRCA2*. Der Nutzen der PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib wurde in den Studien OlympiAD und EMBRACA belegt <sup>73,107,108</sup>. Bisher sind PARP-Inhibitoren nur Patient:innen mit metastasiertem oder lokal fortgeschrittenem Her2-negativem Brustkrebs mit einer Keimbahnmutation zugänglich. Weitere PARP-Inhibitoren, wie z.B. Veliparib, Niraparib und Rucaparib sind in klinischer Prüfung <sup>73</sup>. Ein Blick in andere Entitäten zeigt allerdings mittlerweile auch Zulassungen bei somatischen *BRCA1*- oder *BRCA2*- Mutationen. Beim Ovarial- und beim Prostatakarzinom wurde in Studien das Ansprechen auf eine PARP-Inhibitor-Therapie bei *gBRCA*- und *sBRCA*-Mutationen belegt <sup>47</sup>. So gibt es mittlerweile auch klinische Studien beim Mammakarzinom, welche die Wirkung von PARP-Inhibitoren von *sBRCA* Mutationen und anderen HRR-Genen untersuchen, wie z.B. im RUBY-Trial <sup>73</sup>. In der TBCRC 048-Studie wurde gezeigt, dass der PARP-Inhibitor auch im mTNBC mit somatischen *BRCA1/2*- oder *PALP2* Mutationen wirksam ist <sup>109</sup>. Es ist zu vermuten, dass eBC-Patient:innen weniger erworbene Resistenzmechanismen haben und somit früher und von einem längeren Zeitraum einer PARP-Inhibitor Therapie profitieren können. Des Weiteren wecken Kombinationstherapien von PARP-Inhibitoren mit Immuncheckpoint Inhibitoren, wie z.B. Pembrolizumab, Durvalumab, Atezolizumab und Avelumab Hoffnung, neben Monotherapien nun auch mit Kombinationstherapien auf zwei unterschiedlichen Wegen auf den Tumor einzuwirken. Dies wird aktuell in klinischen Studien (TOPACI, MEDIOLA) untersucht <sup>73</sup>.

Bisher wurden nur bei TNBC-Patient:innen mit positiver Familienanamnese eine Reflextestung einer *BRCA*-Mutationsanalyse angeboten. Die Prävalenz von *gBRCA* und *sBRCA* Mutationen zeigt allerdings, dass durch eine frühere und breitere Testung von Her2-negativen Brustkrebspatient:innen noch mehr profitieren würden.

### **4.3 Resistenzmechanismen**

Resistenzmechanismen können aufgrund des durch die Therapie ausgelösten Selektionsdrucks entstehen und führen dazu, dass bei Patient:innen die Therapie nach einer gewissen Zeit nicht mehr anspricht. Hier können umfangreiche molekulare Analysen Resistenzen aufdecken und neue Therapieempfehlungen indizieren. Auch bei primären Resistenzen sind

Mutationsanalysen sinnvoll, um direkt mit einer zielführenden Therapie zu beginnen. Beim endokrin vorbehandelten Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs entwickelt sich vermehrt eine *ESR1*-Mutation, wie sich in der PADA-1 Studie zeigte<sup>100,110</sup>. So ist als Folgetherapie einer *ESR1*-Mutation Fulvestrant bzw. Fulvestrant plus Everolimus aufgrund des Wirkmechanismus der selektive Östrogen-Down-Regulator (SERD) indiziert. Neue orale selektive ER-degrader (SERDs), welche bei einer *ESR1*-Mutation eingesetzt werden können, befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung<sup>101</sup>. In unserer Studie wiesen 12% (9/77) der Tumoren *ESR1* Alterationen aus, ähnlich wie in der Literatur mit ca. 10%<sup>50,95,96</sup>.

Auch konnte gezeigt werden, dass Alterationen in *ESR1* und im MAPK-Signalweg wie z.B. *PTEN* eine Resistenz von Alpelisib zeigen können<sup>111</sup>. Genveränderungen im MAPK-Signalweg, wie zum Beispiel *AKT* und *PTEN* sind im PIK3CA-Signalweg involviert. So wird in der Literatur angegeben, dass ca. 7% der Mammakarzinome einen *PTEN* Verlust und ca. 5% *AKT1* Alterationen entwickeln. In unserer Kohorte wurden 6% *PTEN* und 3% *AKT1* Alterationen in den Tumoren detektiert. Substanzen der Proteinkinase-B(AKT)-Inhibitoren wie Capivasertib oder Ipatasertib können hier eingesetzt werden<sup>112</sup>.

*RB-1* Genverluste genauso wie *BRC A2*-Alterationen können auf eine Resistenz von CDK4/6 Inhibitoren hinweisen<sup>113,114</sup>. So wurde in dieser Kohorte in drei von 77 Fällen (4%) *RB-1* Verluste detektiert.

Beim Einsatz einer CDK4/6 Therapie konnten gehäuft *PIK3CA*-Mutationen festgestellt werden. Diese könnten dann wiederum mit Alpelisib/ Fulvestrant therapiert werden<sup>114</sup>.

Beim Her2-positiven Subtyp kann es aufgrund des Selektionsdrucks zu Alteration in *ERBB2* kommen. In unserer Studie wurde in 3 von 77 (4%) Tumoren Veränderungen in *ERBB2* nachgewiesen, ähnlich wie in der Literatur beschrieben<sup>50,95,96</sup>. *ERBB2* Alterationen können auf eine mögliche Wirksamkeit der Tyrosinkinase-Inhibitoren Neratinib bzw. Lapatinib hinweisen<sup>34,115</sup>. *ERBB3* Alterationen treten ebenfalls mit ca. 2% beim Mammakarzinom auf<sup>50,116</sup>. In unserer Kohorte wurde ein Fall (1%) mit einer pathogenen *ERBB3* Alteration gefunden. Die Wirksamkeit von Neratinib wird aktuell noch in einer klinischen Studie untersucht<sup>116</sup>. Eine interessant aktuell laufende Studie, welche als zielgerichtete Therapie vorgeschlagen werden könnte, ist ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC) Patritumab-Deruxtecan (HER3-DXd) (NCT02980341).

Alterationen in Mismatch repair (*MMR*) Genen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS-2*) deuten auf eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) hin. In unserer Studie zeigten 12% der Tumore eine

Mikrosatelliteninstabilität auf. Hierzu wurden die Alterationen in den *MMR* Genen zusammengezählt. In der Literatur wird einer Häufigkeit von 1% berichtet<sup>50,95,96</sup>. Der Nachweis einer MSI weist auf eine potenzielle Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren hin<sup>34,117</sup>. Für Pembrolizumab besteht bereits eine Zulassung beim TNBC. Eine Pan-Tumor-Zulassung bei der FDA als Therapie der letzten Wahl für solide Tumoren mit MSI ermöglicht, dass weitere Subgruppen profitieren könnten<sup>97</sup>.

Des Weiteren kann die Tumormutationslast als prognostischer Faktor Auskunft geben, ob eine Therapie mit einem Checkpoint Inhibitor zielführend ist. Der TMB zeigt die Anzahl der erworbenen Mutationen im Erbgut an, in denen sich Tumorzellen von gesunden Körperzellen unterscheiden.<sup>118,119</sup> Je mehr erworbene Mutationen sich im Tumor finden, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass die körpereigene Immunabwehr aktiviert wird. So hat die Auswertung der Keynote-158 Studie in den USA bei der FDA zu einer Zulassung von Pembrolizumab geführt<sup>102</sup>.

Der Nachweis von beim Mammakarzinom häufigen *TP53* Mutationen dient bisher als ein prognostischer Faktor. So haben *TP53* mutierte Tumoren oft eine schlechtere Prognose<sup>51,90,120</sup>. Auch können diese beim luminalen Brustkrebs eine endokrine Resistenz auslösen. Hoffnung gibt es durch zahlreiche klinische Studien, in welchen verschiedene Substanzen die Funktion des Tumorsuppressorgens direkt oder indirekt wieder herstellen<sup>68</sup>. Eine NGS-Analyse vor allem eine Flüssigbiopsie (im englischen auch liquid biopsy genannt) mit einer guten Coverage von *TP53*, deutet darauf hin, dass ausreichend Tumorzellen in den analysierten Proben waren und so Qualitätsstandards erfüllt worden sind.

In der plasmaMatch Studie wurden Resistenzmechanismen mit einer zielgerichteten Therapie analysiert<sup>99</sup>. In 5 unterschiedlichen Kohorten war das primäre Ziel die Ansprechraten von zielgerichteten Therapien gegen in ctDNA nachgewiesene Mutationen zu untersuchen. Die Patient:innen wurden in folgende Gruppen unterteilt: *ESR1*, *ERBB2*, *AKT1* bei HR+ BC, *AKT1* oder *PTEN* bei HR- BC und TNBC bei keiner Mutation. Daraufhin wurden die Patient:innen in Therapiearme eingeteilt. So konnten in diesem Studiendesign direkt mehrere Resistenzmechanismen und das Ansprechen auf eine zielgerichtete Therapie untersucht werden.

Zusammenfassend ist ein umfassendes molekulares Profil sinnvoll, um primäre oder sekundär erworbene Resistenzmechanismen aufzudecken. Hier gibt gegebenenfalls weitere zugelassene Therapieoptionen oder solche in klinischer Prüfung, die bei den genannten Resistenzmustern

eingesetzt werden können. Durch den Einsatz von NGS-Assays an dieser Kohorte konnten auch Resistenzmechanismen einzelner Patient:innen aufgedeckt werden und Änderungen des Therapieregimes indiziert werden. Ein früherer Einsatz auch in der Primärsituation kann in Betracht gezogen werden, auch wenn es bisher noch kaum zugelassene Medikamente in diesen Stadien gibt. Denn es wurde gezeigt, dass bei den meisten soliden Tumoren die pathogenen Treibermutationen, die für die klinische Behandlung ausschlaggebend sind, bei primären und metastasierten Tumoren identisch sind <sup>121,122</sup>.

#### **4.4 Klinische und strukturelle Herausforderungen von NGS-basierten Analysen und deren Bewertung**

Die zentrale Frage in der Molekularpathologie ist welchen Nutzen eine Panelsequenzierung tatsächlich hat. Warum hunderte von krebsrelevanten Genen analysieren, wenn es bisher nur eine Handvoll zugelassene biomarker-basierte Arzneimittel beim Mammakarzinom gibt? Als erster Punkt ist hier der Kostenfaktor zu nennen. Einzelgenanalysen sind kostengünstiger als die NGS-basierten Panelsequenzierungen. Allerdings detektieren Einzelgen-Assays nur bekannte Varianten. Dies kann dazu führen, dass andere Varianten, welche nicht vom Assay abgedeckt sind, unentdeckt bleiben. So sind auf kommerziellen Kits von Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Einzelgentests mutationspezifische Sonden mit Sequenzen von bestimmten Hotspot-Varianten hinterlegt, woran die fragmentierten DNA-Stücke der Tumorzellen binden können. Die Sequenzierung des gesamten Gens bringt die Sicherheit alle Veränderungen zu erfassen und diese mit den öffentlich zugänglichen Wissenschaftsdatenbanken auf Ihre Bedeutung und korrekte Klassifizierung überprüfen zu können. Die Gefahr von Einzelgentestungen wie z.B. für *PIK3CA* besteht darin, dass Varianten nicht detektiert werden. Ein negativer PCR-Einzelgentest könnte somit in der NGS-Analyse positiv ausfallen. In solchen Fällen kann eine Mutation unerkant bleiben und Patient:innen können nicht von einer Therapie profitieren. Darüber hinaus geben breit angelegte Genpanels auch Auskunft über potenzielle Resistenzmechanismen und können somit frühzeitig den Therapieplan voraussagen oder Auskunft geben das Therapieregime bei Resistenzen zu wechseln. Das wachsende Wissen über die Tumorbiologie unter anderem durch die wachsende Verfügbarkeit von NGS-Modalitäten ermöglicht dadurch auch, dass das Wissen schneller von der klinischen Forschung zur Zulassung von biomarker-basierten Arzneimitteln führt und somit mehr Patient:innen profitieren können. Eine Vielzahl von Biomarkern ist bereits in klinischer Prüfung <sup>66-73</sup>. Neben der Testung auf Biomarker mit bereits zugelassenen Medikamenten

erlauben NGS-Assays, dass auch Biomarker gefunden werden können, welche sich noch in klinischer Prüfung befinden. Patient:innen können dann frühzeitig die Teilnahme an einer klinischen Studie angeboten werden. Darüber hinaus können NGS-Assays Biomarker identifizieren auf welchem Nachweis eine Off-Label Therapie beantragt werden kann.

Zukünftig ist absehbar, dass neben der NGS-Analyse von DNA und RNA weitere "omics"-Ansätze Einzug in die Praxis halten werden, um das gesamte Spektrum der epigenetischen, proteomischen und metabolischen Veränderungen zu erfassen, die Krebszellen nutzen, um ihr Wachstum und ihre Metastasierung zu fördern. Die Verdopplungszeit an medizinischem Wissen wurde einmal untersucht und so ergaben Schätzungen, dass im Jahre 1950 das medizinische Wissen sich innerhalb von 50 Jahren verdoppelt, für das Jahr 2020 ergaben die Schätzungen schon eine Verdopplungszeit von 73 Tagen<sup>123</sup>. Die Interpretation und Recherche einzelner Varianten von jedem einzelnen Patienten ist bei der steigenden Anzahl an Tumorpatienten nicht zu leisten. So wird zukünftig zunehmend mehr Hilfe von KI-basierten Softwareprogrammen benötigt. Um diese Ansammlung Daten und deren Interpretation flächenübergreifend zu harmonisieren, wurden verschiedene regionale Ansätze, wie z.B. das Zentrum für Personalisierte Medizin (ZPM), das Deutsche Netzwerk für Personalisierte Medizin (DNPM), das Nationale Netzwerk Genomische Medizin (nNGM) gegründet. In diesen Netzwerken bzw. Registerstudien wurden und werden NGS-Analysen von größeren Patientenkollektiven dezentral zusammengeführt. Bisher wurden die Datensätze der teilnehmenden Zentren lokal gespeichert. Eine kumulative Auswertung der Datensätze aller beteiligten Zentren ist noch ausstehend. Dennoch fehlen diesen redundanten Bemühungen bisher eine Harmonisierung von Datentypen aus verschiedenen NGS-Modalitäten, um die Interpretation in die klinische Versorgungsprozesse zu integrieren. Eine Lösung könnte eine Auswertung und Standardisierung mittels MH Guide sein; über verschiedene VCF Adaptoren können NGS-Daten von unterschiedlichen Tests zusammengeführt werden. Eine Zusammenführung der Daten aus unterschiedlichen Zentren bereits sequenzierter Kohorten würde wohlmöglich einen großen wissenschaftlichen Mehrwert ergeben. Bisher fehlen Konzepte Patient:innen auch außerhalb großer akademischer Zentren adäquat zu versorgen. Der Regionalverbund OncoNet Rhein Main e.V. hat sich dieser Aufgaben und Fragestellungen mit einem interdisziplinären Konzept angenommen. Ihr Auftrag ist die Umsetzung der Versorgung in den Alltag der onkologischen Praxen und Zentren zu integrieren, welches bisher nur von universitären Zusammenschlüssen umgesetzt wurde. Dieser Ansatz ist enorm wichtig, um die Versorgung auch in der Breite anbieten zu können, nach der Devise zentral testen und dezentral behandeln. Vor diesem Hintergrund spielen molekulare Tumorboards als Wegbereiter für einen

harmonisierten und flächendeckenden Einsatz dieses patientenzentrierten Behandlungsansatzes eine wichtige Rolle.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit den Mehrwert und die Auswirkung von umfassenden NGS-Analysen in der klinischen Routine beim metastasierten Mammakarzinom. Im frühen Stadium spielen Genomanalysen aufgrund von mangelnden Zulassungen von zielgerichteten Substanzen mit entsprechenden Targets noch eine sehr kleine Rolle. Dieses könnte sich zukünftig ändern, da sich zahlreiche zielgerichtete Substanzen in der klinischen Prüfung befinden. Dieser Ansatz der Genomanalysen zusammen mit der Bewertung im molekularen Tumorboard hilft bei der klinischen Entscheidungsfindung auf der Grundlage des molekularen Tumorprofils jedes einzelnen Patienten. Das breitere Wissen und neue Zulassungen von Biomarkern erweitern die Therapieoptionen in der Präzisionsonkologie. Eine Auswertung größerer Patientenkollektive ist mit einem Download der Daten der Kohorte aus der Software MH Guide möglich.

Diese Arbeit hat mehrere Einschränkungen. Zum ersten ist das Patientenkollektiv eine sehr kleine heterogene Gruppe. Aufgrund des geringen Probenumfangs konnten die Daten nicht innerhalb verschiedener Subtypen von unterschiedlichen Therapielinien analysiert werden. Zweitens waren keine klinischen Daten zum histologischen Subtyp, zum Therapieverlauf und der Wirksamkeit der zielgerichteten Therapien verfügbar. Des Weiteren wurden nur DNA-Analysen an der Kohorte durchgeführt. Eine Analyse auf RNA-Ebene und Immunhistochemie wurde nicht durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde aus einem Datenexport aus MH Guide gemacht. Die Auswertung dieser Patientenkohorte beachtet die Ergebnisse zum Zeitpunkt des Uploads der NGS-Daten in MH Guide. Die Varianteninterpretation, der Zulassungsstatus der vorgeschlagenen Behandlungen und Empfehlungen von klinischen Studien können aufgrund neuer Erkenntnisse innerhalb der Datensets variieren.

## **5 Fazit**

In dieser Zwischenanalyse einer Kohorte metastasierter Mammakarzinom Patient:innen in Kooperation mit dem OncoNet Rhein-Main wurden zahlreiche Zielstrukturen im Einklang mit den ESMO-Guidelines gefunden. In dieser Arbeit wurden Vor- und Nachteile für Einzelgentestungen und Paneltestungen bei zielgerichteten Therapieoptionen mit Biomarkern aufgeführt. Weiterhin wurde eine Big Data Analyse von NGS-Daten des molekularen Tumorboards des OncoNet Rhein-Main strukturiert zusammengefasst. Eine Auswertung

größerer Patientenkollektiven ist mit einem Download aus der Software MH Guide möglich. Im nächsten Schritt sollte eine Studie die Effektivität der NGS-basierten Analyse und das Ansprechen der zielgerichteten Therapie nach Empfehlung des molekularen Tumorboards untersuchen. Aufgrund der kurzen Follow-up Phase nach Datenerhebung ist eine klinische Nachbeobachtung nach einer molekular-basierten Behandlungsentscheidung zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt. Dieses sollte allerdings Gegenstand einer weiteren Studie sein.

## 6 Zusammenfassung

Die Fortschritte der genomischen Medizin entwickeln sich weiterhin rasant. Das wachsende Wissen über Tumorerkrankungen ist grundlegend für die Entwicklung von Biomarkern und neuen gezielten Therapieoptionen. Dieses Verständnis zeigt sich in der Präzisionsonkologie, bei der die molekulare Diagnostik neben den klassischen histologischen und immunhistochemischen Methoden, die für eine qualifizierte Diagnose erforderlich sind, eine immer wichtigere Rolle im Portfolio der Patholog:innen einnimmt. Patient:innen profitieren von einer zielgerichteten Analyse der Tumorprofile, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, da immer mehr zielgerichtete Therapieoptionen zur Verfügung stehen. In dieser retrospektiven Analyse von 77 metastasierten Brustkrebspatient:innen wurde das genomische Krebsprofil mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) analysiert. In dieser Arbeit wurden die häufigsten genomischen Veränderungen z.B. *PIK3CA*, *BRCA*, *ESR1* etc. und die entsprechenden Behandlungsoptionen in Übereinstimmung mit den ESMO-Guidelines identifiziert. Darüber hinaus wurden Resistenzmechanismen, z.B. gegen endokrine Therapien oder CDK4/6-Inhibitoren, erfasst. Die großen Datensätze, die durch NGS-Panels generiert werden, sollten qualitätsgesichert nach internationalen Standards wie AMP- und ESCAT-Scores interpretiert werden. Diese Kohorte wurde anhand der AMP-Kriterien analysiert. Die Ergebnisse unterstützen den Ansatz zur Erstellung von umfassenden, evidenzbasierten Befunden als Hilfsmittel für die Diskussion von Therapieoptionen in einem molekularen Tumorboard. Software-Tools können dabei helfen, aus den großen Datensätzen standardisierte Berichte, Varianteninterpretationen und Vorschläge für In-Label- und Off-Label- Substanzen oder klinische Studien zu erstellen. Dieser Ansatz erspart viel Zeit, was bei der steigenden Anzahl onkologischer Patient:innen von großem Nutzen sein kann. Es ist zu erwarten, dass Software-Tools, wie z.B. die Software MH Guide, bei der strukturierten Befunderstellung, Varianteninterpretation nach internationalen Richtlinien und evidenzbasierten Bewertung von Therapieoptionen im Bereich der Präzisionsmedizin unverzichtbar werden. Diese retrospektive Analyse wurde mit Hilfe eines Exports der Daten aus der Software MH Guide erstellt. Mit diesem Ansatz wird eine Methode zur Analyse größerer Patientenkohorten mit Sequenzierungsdaten und Metadaten vorgestellt. Redundante Ansätze von akademischen Netzwerken im Bereich der personalisierten Medizin in Deutschland haben bisher keine Lösungen gefunden, um Datensätze aus verschiedenen Laboren und verschiedenen Sequenzierungs-Geräten zu kombinieren, einen Batch-Upload durchzuführen und sie umfassend zu analysieren. Hier wird eine Methode vorgestellt, um dieses Problem zu überwinden.

## 7 Summary

Advances in genomic sequencing and personalized diagnostics evolve rapidly. The growing knowledge about cancer pathways and cancer driver mutations are fundamental in the development of biomarkers and targeted therapy options. This impact is evident in precision oncology, where molecular diagnostics begin to play an increasingly important role in the portfolio of pathologists next to the classical histological and immunohistochemistry methods needed for qualified diagnostics. Individual patients benefit from comprehensive genomic profiling of the tumour especially in the advanced tumour setting due to the growing number of available targeted therapy options. In this retrospective analysis of 77 metastatic breast cancer patients in collaboration with the OncoNet Rhein-Main the genomic cancer profile was analysed using common next-generation-sequencing (NGS) panel diagnostics. The most common genomic alterations (*PIK3CA*, *BRCA*, *ESR1* etc.) and the corresponding treatment options in alignment with the ESMO Guidelines were identified. Furthermore, mechanisms of resistance (e.g., against endocrine therapy or CDK4/6 inhibitors) were identified. The big data sets generated by NGS panels should be interpreted in a quality -assured manner in accordance with international standards, like AMP and ESCAT Scores. The results establish a proof of concept for comprehensive, evidence-based reports as a supporting tool for discussing treatment options in a molecular tumour board and give personalized treatment recommendations. Software tools can aid in the process of generating standardized reports out of large data sets, variant interpretation and suggestions for in-label, off-label or clinical studies in a timely manner. With this work it can be anticipated that software tools, e.g., the software MH Guide, will become essential in summarizing the growing evidence in the field of precision medicine for clinicians, which can be of greater use with the increasing number of oncology patients. This retrospective analysis was generated by using an export of the data from the software MH Guide. With this approach a method is introduced to analyse larger patient cohorts with sequencing data and metadata. Redundant approaches from academic networks in personalized medicine in Germany have not found solutions yet to combine data sets from different laboratories and different sequencers, do a batch upload and analyse them in a comprehensive manner. Here, a method is introduced to overcome this problem.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Krebsinformationsdienst. Brustkrebs: Definition, Ursachen, Prognose & Co. Accessed July 24, 2022. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/was-ist-brustkrebs.php>
2. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. Published online 2019. doi:10.1007/978-3-662-57430-0
3. Johnson MC. Anatomy and physiology of the breast. Management of Breast Diseases. Published online 2010:1-36. doi:10.1007/978-3-540-69743-5\_1
4. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Published online 2017.
5. Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Nofzt MR, Hübner J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer*. 2020;147(3):709-718. doi:10.1002/IJC.32767
6. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Published online 2017. Accessed August 6, 2022. [www.krebsdaten.de/brustkrebs](http://www.krebsdaten.de/brustkrebs)
7. Krebs - Startseite Zentrum für Krebsregisterdaten. Accessed August 6, 2022. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html)
8. Age Standardized (World) Incidence Rates, Breast, All Ages.; 2018. <http://gco.iarc.fr/today>
9. Koch-Institut R. Epidemiologisches Bulletin.
10. Pedersen RN, Esen BÖ, Mellekjær L, et al. The Incidence of Breast Cancer Recurrence 10-32 Years after Primary Diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2022;114(3):391-399. doi:10.1093/JNCI/DJAB202
11. Fischer U, Baum F. Diagnostik Und Therapie Des Mammakarzinoms. Georg Thieme Verlag; 2014.
12. Gesundheitspolitische Schriftenreihe Der DGHO Band 4 KreBSfrüHerKennunG in DeutSchlanD 2014 Evidenz-Aktueller Stand-Perspektiven. Accessed July 18, 2020. [www.dgho.de](http://www.dgho.de)
13. Age Standardized (World) Incidence Rates, Breast, All Ages.; 2018. Accessed July 18, 2020. <http://gco.iarc.fr/today>

14. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4
15. Tulinius H, Sigvaldason H, Ólafsdóttir G. Left and Right Sided Breast Cancer. *Pathol Res Pract.* 1990;186(1):92-94. doi:10.1016/S0344-0338(11)81015-0
16. Rummel S, Hueman MT, Costantino N, Shriver CD, Ellsworth RE. Tumour location within the breast: Does tumour site have prognostic ability? *Ecancermedicalsecience.* 2015;9. doi:10.3332/ECANCER.2015.552
17. Chan S, Chen JH, Li S, et al. Evaluation of the association between quantitative mammographic density and breast cancer occurred in different quadrants. *BMC Cancer.* 2017;17(1). doi:10.1186/S12885-017-3270-0
18. Bloom HJG, Richardson WW, Harries EJ. Natural history of untreated breast cancer (1805-1933). *Br Med J.* 1962;2(5299):213-221. doi:10.1136/BMJ.2.5299.213
19. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(5):378-397. doi:10.3322/caac.21405
20. Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. Published online 2011. doi:10.1016/j.tem.2011.10.003
21. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine.* 2017;377(23):2228-2239. doi:10.1056/NEJMoa1700732
22. Dall M, Mundhenk C. Optionen Der Primären Prävention: Veränderbare Lifestyle-Faktoren. Accessed July 18, 2020. [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)
23. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
24. WHO classification on Breast cancer. Accessed August 6, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
25. Lebeau A, Mitze M. Mammakarzinom Interdisziplinär. Springer; 2010.

26. Brustkrebs: Definition, Ursachen, Prognose & Co. Accessed August 28, 2022. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/was-ist-brustkrebs.php>
27. Janni W, Müller V. Metastasiertes Mammakarzinom, Editorial. *Trillium Krebsmedizin*. 2022;31(4).
28. Gennari A, André F, Barrios CH, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee. *S Loibl*. 2021;27. doi:10.1016/j.annonc.2021.09.019
29. Ignatov A, Eggemann H, Burger E, Ignatov T. Patterns of breast cancer relapse in accordance to biological subtype. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(7):1347-1355. doi:10.1007/S00432-018-2644-2
30. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 406:6797. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
31. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. Incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma. 2019;30:1541-1557. doi:10.1093/annonc/mdz235
32. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(6):438-451. doi:10.3322/CAAC.21583
33. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. doi:10.1038/nature11412
34. Fasching C/, Fersis /, Friedrichs /, et al. Prognostische und prädiktive Faktoren § Versionen 2002-2021. Accessed August 6, 2022. [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)
35. Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* (1979). 2001;291(5507):1304-1351. doi:10.1126/SCIENCE.1058040/SUPPL\_FILE/C18\_SCIENCE.PDF
36. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 409:6822. 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062
37. What is Next-Generation Sequencing? | Thermo Fisher Scientific - DE. Accessed July 24, 2022. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>

38. Targeted Sequencing Approaches for NGS | Thermo Fisher Scientific - DE. Accessed July 24, 2022. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html>
39. Gretser S, Demes M, Schmitt C, et al. Das molekulare Tumorboard - Relevanz beim Mammakarzinom. *Onkologie heute*. Published online May 2021.
40. Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. doi:10.1038/s41571-018-0002-6
41. Ditsch N, Kolberg-Liedtke C, Friedrich M, et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2021. *Breast Care*. 2021;16(3):214-227. doi:10.1159/000516419
42. Tutt A, Garber JE, Kaufman B, et al. OlympiA: A phase III, multicenter, randomized, placebo-controlled trial of adjuvant olaparib after (neo)adjuvant chemotherapy in patients with germline BRCA1/2 mutations and high-risk HER2-negative early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(suppl 15):abstr LBA1. doi:10.1200/jco.2021.39.15\_suppl.lba1
43. Lemery S, Keegan P, Pazdur R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *New England Journal of Medicine*. Published online 2017.
44. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. Alpelisib for PIK3CA -Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(20):1929-1940. doi:10.1056/nejmoa1813904
45. Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. Evidence for an early, on-therapy biomarker of response in patients with advanced melanoma treated with anti-PD-1. 2019;30:558-566. doi:10.1093/annonc/mdz012
46. CHMP. ANHANG I ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS.
47. CHMP. Lynparza, INN-olaparib. Accessed August 7, 2022. [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)

48. Piqray® Filmtabletten.
49. Thill M, Friedrich M, Kolberg-Liedtke C, et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2021. Published online 2021. doi:10.1159/000516420
50. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Published online 2020. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014
51. Wild PJ, Denkert C, Jackisch C. Prädiktive molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom. *Die Pathologie*. 2022;43(5):388-398. doi:10.1007/S00292-022-01096-Y/FIGURES/4
52. Fior R, Zilhão R, eds. *Molecular and Cell Biology of Cancer*. Published online 2019. doi:10.1007/978-3-030-11812-9
53. Kaufmann HL, Wadler S, Antman K. *Molecular Targeting in Oncoogy*. Humana Press; 2008. Accessed August 6, 2022. <https://link-springer-com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/content/pdf/10.1007/978-1-59745-337-0.pdf>
54. Society for Medical Oncology E. ESCAT: ESMO Scale of Clinical Actionability of molecular Targets. Accessed August 15, 2022. <https://www.esmo.org/policy/esmo-scale-for-clinical-actionability-of-molecular-targets-escat>
55. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). Published online 2018. doi:10.1093/annonc/mdy263
56. Rao S, Pitel B, Wagner AH, et al. Collaborative, Multidisciplinary Evaluation of Cancer Variants Through Virtual Molecular Tumor Boards Informs Local Clinical Practices. *JCO Clin Cancer Inform*. 2020;(4):602-613. doi:10.1200/cci.19.00169
57. Leichsenring J, Horak P, Kreutzfeldt S, et al. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer*. 2019;145(11):2996-3010. doi:10.1002/IJC.32358
58. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of

- Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/GIM.2015.30
59. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2017;19(1):4-23. doi:10.1016/J.JMOLDX.2016.10.002
  60. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
  61. MH Guide-Information Für Pathologen Jetzt Entdecken: Die Zukunft Der Automatisierten Variantenannotation MH Guide Interpretiert Schnell Und Qualitätsgesichert Komplexe Genetische Daten Für Die Wachsenden Herausforderungen von Heute Und Morgen.
  62. MH. MH Guide Software Release 5.3 Instructions for Use Revision 33.; 2022. [www.molecularhealth.com](http://www.molecularhealth.com)
  63. Dataome Technology-Fact Sheet.
  64. Pathfinder for Genome-Based Treatment Planning From Patient Genetic Data to Therapy Options-Focus on Dataome & Database Sources.; 2021.
  65. TF Guide\_Cu Rel Notes\_Rel 5.3\_DSV130165519593\_V01.
  66. O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(7):417-430. doi:10.1038/nrclinonc.2016.26
  67. Grote I, Bartels S, Kandt L, et al. TP53 mutations are associated with primary endocrine resistance in luminal early breast cancer. *Cancer Med*. 2021;10(23):8581-8594. doi:10.1002/cam4.4376
  68. Hu J, Cao J, Topatana W, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):157. doi:10.1186/s13045-021-01169-0

69. Deniziaut G, Tille JC, Bidard FC, et al. ERBB2 mutations associated with solid variant of high-grade invasive lobular breast carcinomas. *Oncotarget*. 2016;7(45):73337-73346. doi:10.18632/oncotarget.11819
70. Martorana F, Motta G, Pavone G, et al. AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.662232
71. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*. 2017;8:15180. doi:10.1038/ncomms15180
72. Fasching C/, Fersis /, Friedrichs /, et al. Prognostische und prädiktive Faktoren § Versionen 2002-2020. Accessed September 23, 2022. [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)
73. Cortesi L, Hope ·, Rugo S, Jackisch · Christian. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target Oncol*. 2021;16:255-282. doi:10.1007/s11523-021-00796-4
74. OncoNet Rhein-Main e.V. Accessed January 16, 2023. <https://www.onconetrheinmain.de/>
75. NextSeq 500 System Guide.; 2021. [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).
76. Corporation P. Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit P R O M E G A C O R P O R A T I O N • 2 8 0 0 Preprocessing of FFPE Section Samples. [www.promega.com](http://www.promega.com)
77. Corporation P. Maxwell(R) 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit Technical Manual TM349. [www.promega.com](http://www.promega.com)
78. Corporation P. Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit Technical Manual TM574. [www.promega.com](http://www.promega.com)
79. Fisher Scientific T. Oncomine Comprehensive Assay v3 User Guide (Pub.No. MAN0015885 C.0).
80. TruSight Oncology 500 Reference Guide.; 2020. [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).
81. Illumina. TruSight Oncology 500 v2.1 Local App User Guide (1000000113216).; 2020. [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).
82. Illumina. Infinium HD FFPE QC Assay Protocol (15020981).; 2011.

83. nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-09.
84. NC\_000008.11: Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p14 Primary Assembly. Accessed January 8, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/issues/HG-19>
85. MH. MH VCF Adapter Suite - Instructions for Use.
86. MH. MH VCF Adapter Suite - Technical Specifications. [www.molecularhealth.com](http://www.molecularhealth.com).
87. R: The R Project for Statistical Computing. Accessed January 18, 2023. <https://www.r-project.org/>
88. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* 2015 12:2. 2015;12(2):115-121. doi:10.1038/nmeth.3252
89. Ross JS, Sokol E, Albacker LA, et al. Immunotherapy predictive biomarkers in metastatic breast cancer (MBC). [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15\\_suppl.1023](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.1023). 2019;37(15\_suppl):1023-1023. doi:10.1200/JCO.2019.37.15\_SUPPL.1023
90. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70. doi:10.1038/nature11412
91. PIK3CA E545K - My Cancer Genome. Accessed September 27, 2022. <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/pik3ca-e545k/>
92. PIK3CA H1047R - My Cancer Genome. Accessed September 27, 2022. <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/pik3ca-h1047r/>
93. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, et al. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D777-D783. doi:10.1093/NAR/GKW1121
94. Mutation overview page ERBB2 - p.S310F ( Substitution - Missense). Accessed September 27, 2022. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=97291435>
95. Hanka AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2020;37(4):496. doi:10.1016/J.CCELL.2020.03.009
96. Condorelli R, Mosele F, Verret B, et al. Genomic alterations in breast cancer: Level of evidence for actionability according to ESMO Scale for Clinical Actionability of

- molecular Targets (ESCAT). *Annals of Oncology*. 2019;30(3):365-373. doi:10.1093/annonc/mdz036
97. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication | FDA. Accessed September 23, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-first-tissuesite-agnostic-indication>
  98. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the treatment of estrogen receptor-Positive advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(25):2961-2968. doi:10.1200/jco.2016.67.3061
  99. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(10):1296-1308. doi:10.1016/S1470-2045(20)30444-7
  100. Bidard FC et al. Abstract GS3-05: Fulvestrant-palbociclib vs continuing aromatase inhibitor-palbociclib upon detection of circulating ESR1 mutation in HR+ HER2-metastatic breast cancer patients: Results of PADA-1, a UCBG-GINECO randomized phase 3 trial | Cancer Research | American Association for Cancer Research. Accessed September 23, 2022. [https://aacrjournals.org/cancerres/article/82/4\\_Supplement/GS3-05/680196/Abstract-GS3-05-Fulvestrant-palbociclib-vs](https://aacrjournals.org/cancerres/article/82/4_Supplement/GS3-05/680196/Abstract-GS3-05-Fulvestrant-palbociclib-vs)
  101. Nabieva N, Fasching PA. cancers Endocrine Treatment for Breast Cancer Patients Revisited-History, Standard of Care, and Possibilities of Improvement. Published online 2021. doi:10.3390/cancers13225643
  102. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope FA. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discov*. 2020;10(12):1808-1825. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0522
  103. André F, Ciruelos EM, Juric D, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of Oncology*. 2021;32:208-217. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.011

104. 1# WX, Zhang G, 1# BC, et al. Mutational Landscape of PI3K-AKT-mTOR Pathway in Breast Cancer: Implications for Targeted Therapeutics. *J Cancer*. 2021;12(14):4408-4417. doi:10.7150/jca.52993
105. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015;60(4):547-560. doi:10.1016/J.MOLCEL.2015.10.040
106. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy? *Gynecol Oncol*. 2015;137(2):343-350. doi:10.1016/J.YGYNO.2015.02.017
107. Harbeck N, Rastogi P, Martin M, et al. Adjuvant abemaciclib combined with endocrine therapy for high-risk early breast cancer: updated efficacy and Ki-67 analysis from the monarchE study. *J Cortés*. 2021;17. doi:10.1016/j.annonc.2021.09.015
108. Tutt ANJ. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. *N Engl J Med*. Published online 2021. Accessed September 22, 2022. <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa2105215?articleTools=true>
109. Tung NM, Robson ME, Venz S, et al. TBCRC 048: Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(36):4274-4282. doi:10.1200/JCO.20.02151
110. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the treatment of estrogen receptor-Positive advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(25):2961-2968. doi:10.1200/JCO.2016.67.3061
111. Razavi P, Dickler MN, Shah PD, et al. Alterations in PTEN and ESR1 promote clinical resistance to alpelisib plus aromatase inhibitors. *Nature Cancer* 2020 1:4. 2020;1(4):382-393. doi:10.1038/s43018-020-0047-1
112. Martorana F, Motta G, Pavone G, et al. AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Front Pharmacol*. 2021;12:546. doi:10.3389/FPHAR.2021.662232/BIBTEX
113. Safonov A, Bandlamudi C, de Lara PT, et al. Abstract GS4-08: Comprehensive genomic profiling of patients with breast cancer identifies germline-somatic interactions mediating therapy resistance. *Cancer Res*. 2022;82(4\_Supplement):GS4-08. doi:10.1158/1538-7445.SABCS21-GS4-08

114. O’Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2016 13:7. 2016;13(7):417-430. doi:10.1038/nrclinonc.2016.26
115. Deniziaut G, Tille JC, Bidard FC, et al. ERBB2 mutations associated with solid variant of high-grade invasive lobular breast carcinomas. 7(45). Accessed September 23, 2022. [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
116. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature*. 2018;554(7691):189-194. doi:10.1038/NATURE25475
117. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nature Communications* 2017 8:1. 2017;8(1):1-12. doi:10.1038/ncomms15180
118. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 2019;51(2):202-206. doi:10.1038/S41588-018-0312-8
119. Tumormutationslast als Biomarker: Je mehr, umso besser. Accessed January 16, 2023. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/209369/Tumormutationslast-als-Biomarker-Je-mehr-umso-besser>
120. Angus L, Smid M, Wilting SM, et al. Genomic landscape of metastatic breast cancer and its clinical implications Europe PMC Funders Group. *Nat Genet*. 2019;51(10):1450-1458. doi:10.1038/s41588-019-0507-7
121. Liu G, Zhan X, Dong C, Liu L. Genomics alterations of metastatic and primary tissues across 15 cancer types. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-13650-3
122. Manca A, Paliogiannis P, Colombino M, et al. Mutational concordance between primary and metastatic melanoma: a next-generation sequencing approach. *J Transl Med*. 2019;17(1). doi:10.1186/S12967-019-2039-4
123. Densen P. CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FACING MEDICAL EDUCATION. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2011;122.

## 9 Anhang



Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität  
c/o Universitätsklinikum Theodor-Stern-Kai 7 60590 Frankfurt am Main

Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie  
Herrn Prof. Dr. Peter Johannes Wild  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt  
Deutschland

**Geschäftsnummer: 2022-671-Retrospektive Datenauswertung  
erstberatend**

**Studientitel:** Molecular Portraits of Advanced Breast Cancer: Zusammenstellung  
einer retrospektiven Kohorte von Patienten mit fortgeschrittenem Mammakarzinom  
mittels Next-Generation-Sequencing

### VOTUM

Sehr geehrter Herr Prof. Wild,

vielen Dank für die Zusendung der Studienunterlagen vom 07.03.2022.

Es bestehen keine berufsrechtlichen und berufsethischen Bedenken.  
Die Ethikkommission erteilt eine zustimmende Bewertung.

Die Ethikkommission geht davon aus, dass die Studienleitung und die ggf.  
beteiligten Doktorandinnen und Doktoranden die einschlägigen  
datenschutzrechtlichen Vorgaben kennen und beachten.

Seit dem 25.05.2018 gilt die europäische Datenschutzgrundverordnung  
(DSGVO). Bei der Einsichtnahme der Unterlagen muss darüber hinaus  
insbesondere § 12 Hessisches Krankenhausgesetz in Verbindung mit § 24  
Hessisches Datenschutzgesetz beachtet werden. Wir weisen darauf hin, dass  
der Studienleiter für die Einhaltung der Datenschutzerfordernungen  
verantwortlich ist. Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben  
werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur cursorisch geprüft. Diese  
Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen  
Datenschutzbeauftragten.

Eine Information über den Abschluss der Studie wird erbeten.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Sebastian Harder  
Vorsitzender der Ethikkommission

*Aus Wissen wird Gesundheit.*

Goethe-Universität Frankfurt, Theodor-W.-Adorno-Platz 1, 60323 Frankfurt am Main  
Steuernummer: 045 226 58002 Ust-ID Nr.: DE 114 110 511

### Ethikkommission

**Vorsitz:**  
Prof. Dr. Sebastian Harder

**Geschäftsführung:**  
Dr. Johannes Hätscher

**Bearbeitung des Vorgangs:**  
Mamie Kopp

17.03.2022

### Geschäftsstelle

**Sekretariat:**  
Ruth Schmidt  
Tel.: 069 / 6301-3758  
Fax: 069 / 6301-83434

E-Mail: [ethikkommission@kqu.de](mailto:ethikkommission@kqu.de)

### MitarbeiterInnen:

Durchwahl	
Dorothea Bittner	Tel.: 3889
Sabrina Böttger	Tel.: 80435
Myriam Freund	Tel.: 7239
Angela Heuser	Tel.: 4552
Ina Klinge	Tel.: 3884
Dr. Mamie Kopp	Tel.: 80436
	Fax: 83434

E-Mail: [ethikkommission@kqu.de](mailto:ethikkommission@kqu.de)

[http://www.kqu.de/ueber-uns/vorstand-  
des-universitaetsklinikums/dekan/home/](http://www.kqu.de/ueber-uns/vorstand-des-universitaetsklinikums/dekan/home/)

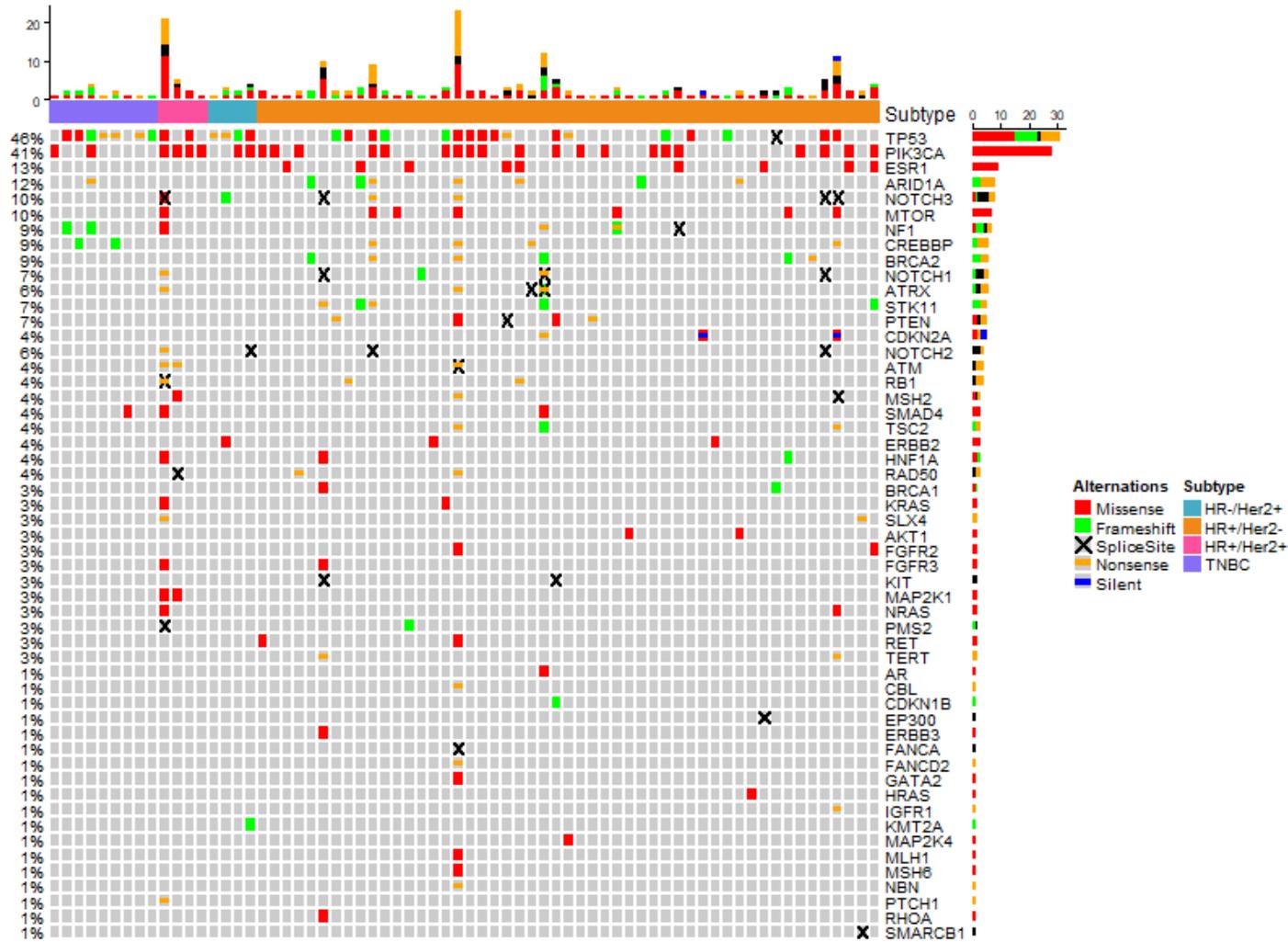
**Lieferadresse:**  
Ethikkommission des  
Fachbereichs Medizin  
der Goethe-Universität  
c/o Universitätsklinikum  
Theodor-Stern-Kai 7  
Haus 1, 2. OG, Zi. 207  
60590 Frankfurt am Main

**Örtungszeiten f. Anlieferungen:**  
Montag bis Donnerstag:  
09:00 bis 15:30 Uhr  
Freitag:  
09:00 bis 12:30 Uhr

Seite 1 von 2

Geschäftsnummer: 2022-671-Retrospektive Datenauswertung erstberatend

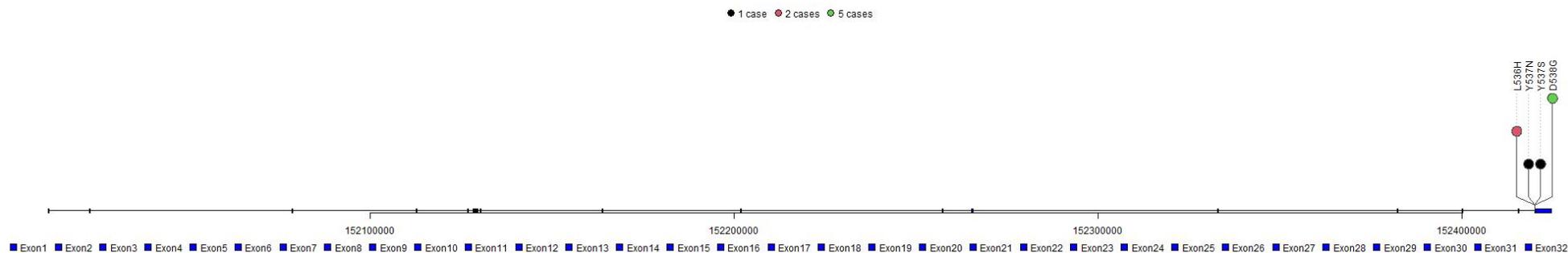
Anhang 1: Ethikvotum (Aktenzeichen: 2022-671)



Anhang 2: Oncoplot aller gefundener Alterationen (pathogenic oder likely pathogenic) mit mehr als 3 gefundenen Varianten.

Die Alterationen wurden nach Genen mit den zugehörigen Häufigkeiten und Subtypen dargestellt.

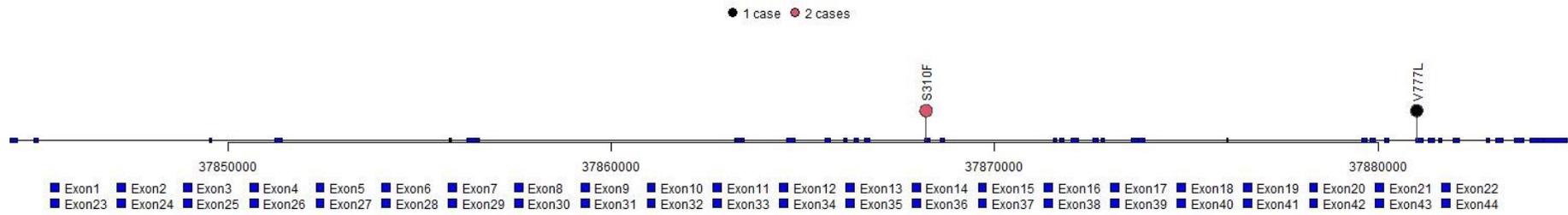
### ESR1 SNP missense mutations



Anhang 3: Lollipop Diagramm der gefundenen *ESR1*-Mutationen.

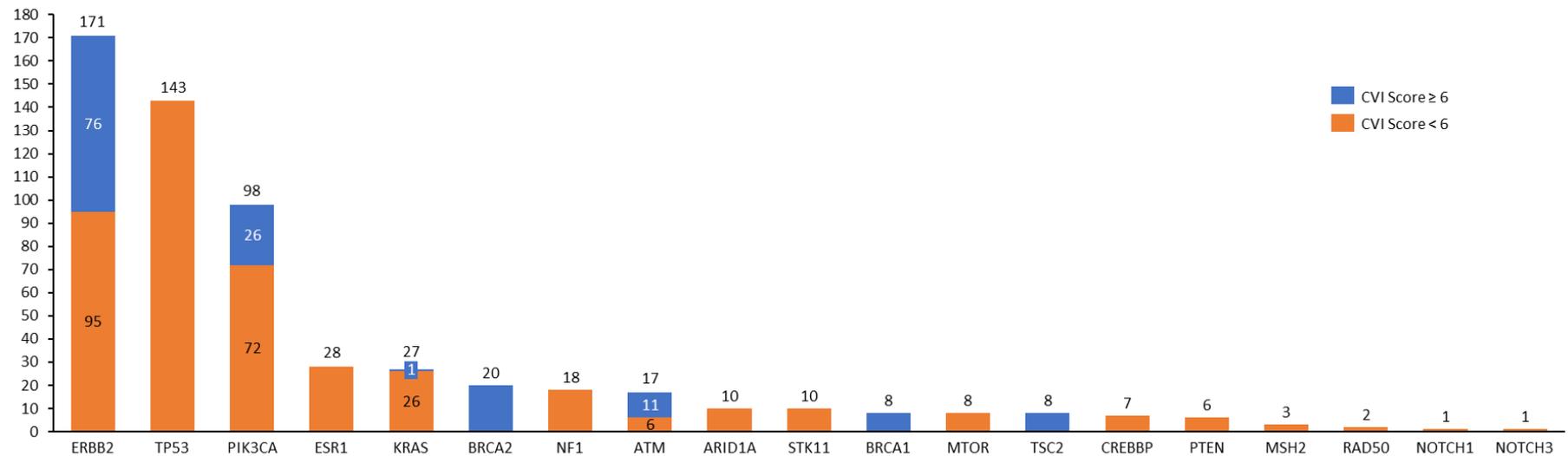
Hier sind alle gefundenen Alterationen dargestellt, die im gleichen Kodon gefunden wurden.

### ERBB2 SNP missense mutations



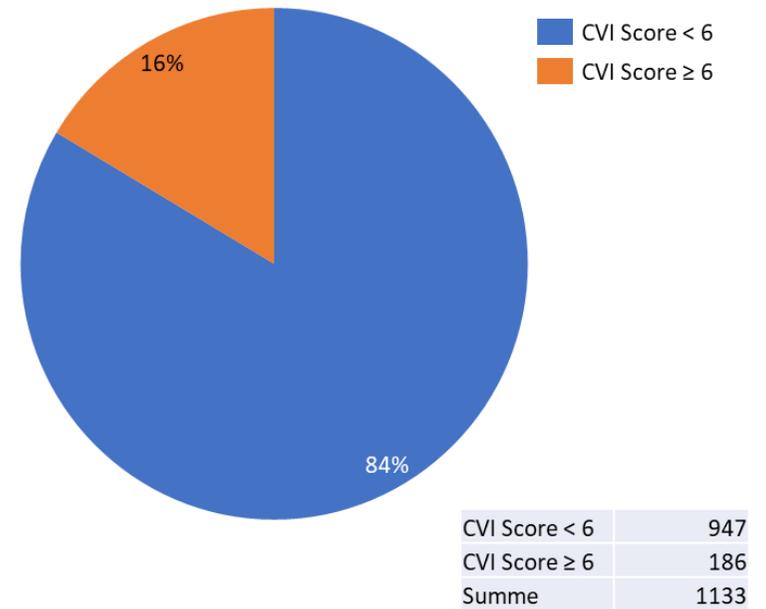
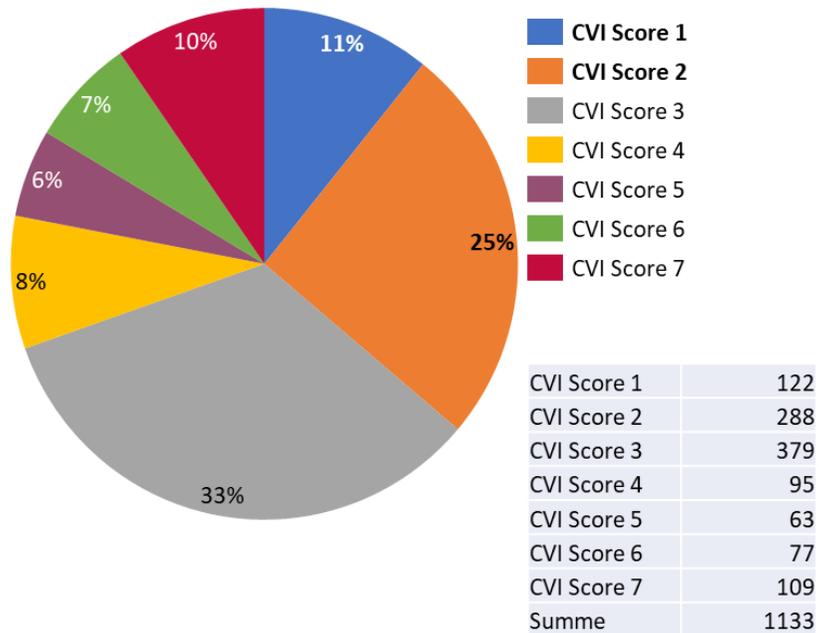
Anhang 4: Lollipop Darstellung des *ERBB2* Gens.

Hier wurden alle gefundenen Alterationen (pathogenic und likely pathogenic) im Gen dargestellt. Bei zwei Patient:innen wurde die gleiche Position gefunden.



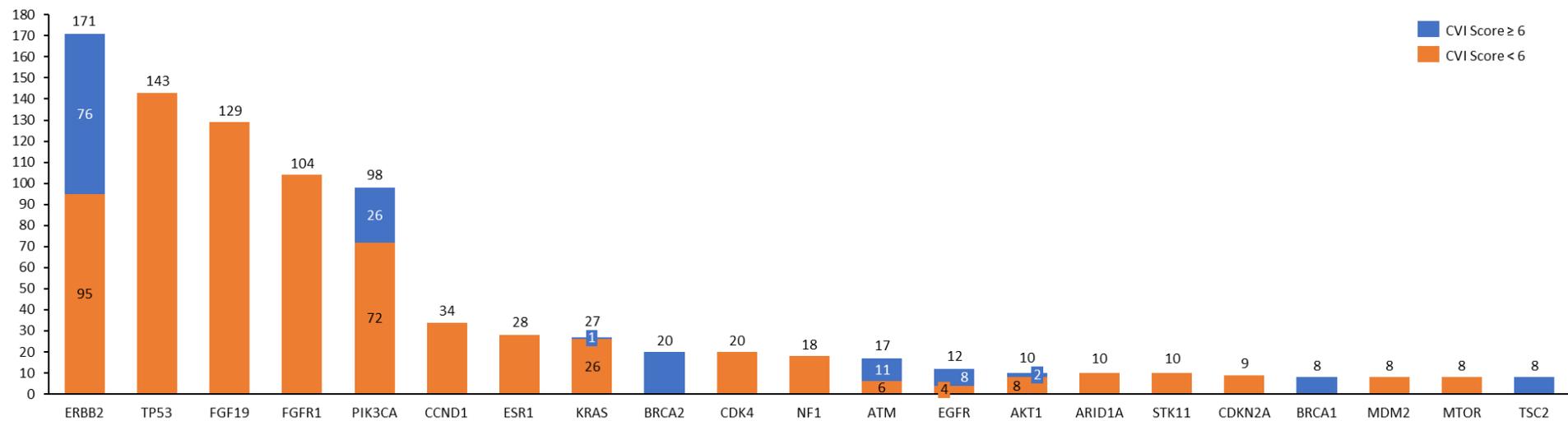
#### Anhang 5: Alterationen mit effektivem Clinical Interpretation (CVI) Score

Filtreigenschaften: Relevanz Varianten = „included by filters“ und „included by user“; Varianten mit Impact = effective; Hier keine Unterscheidung nach Varianten-Klassifikation, keine Unterscheidung nach Lineage, IN- und OFF-Label



Anhang 6: Die Scoreverteilung der Clinical Variant Interpretation (CVI)

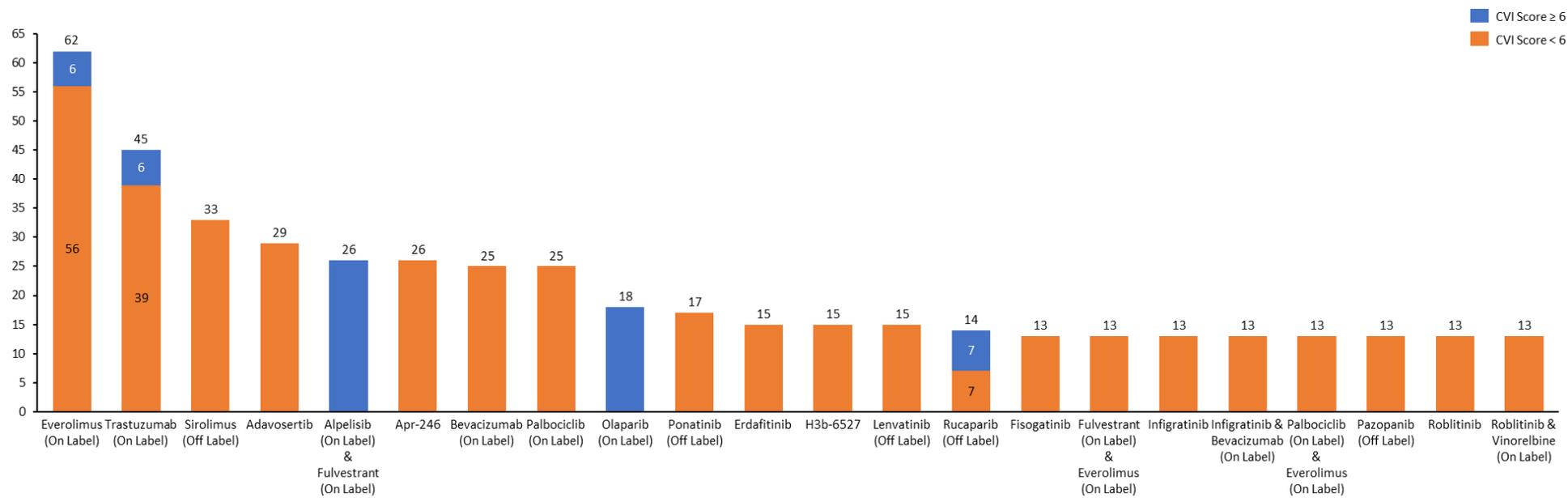
Filtereigenschaften: Relevanz Varianten = „included by filters“ und „included by user“; Varianten mit Impact = effective, insgesamt 1,133 CVIs mit Impact effective (insg. 1,731)



### Anhang 7: Top 20 mutierte Gene mit effektiven CVI-Scores

Filtereigenschaften: Relevanz Varianten = „included by filters“ und „included by user“; Varianten mit Impact = effective;

Hier keine Unterscheidung nach Varianten-Klassifikation, keine Unterscheidung nach Lineage



## Anhang 8: Top 20 Behandlungsoptionen

Filteroptionen: Relevanz Varianten = „included by filters“ und „included by user“; Varianten mit Impact = effective

## 10 Schriftliche Erklärung

### Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Zusammenstellung der molekularen Tumorprofile einer retrospektiven Kohorte von Patient:innen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom

im Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Peter Wild mit Unterstützung durch Dr. Claudia Döring (Oncoplot, Lolliplots) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

**Danksagung**

[Redacted]

[Redacted]