

Universität Ulm

Bundeswehrkrankenhaus Ulm
Akademisches Krankenhaus der Universität Ulm
Institut für Pathologie und Molekularpathologie

Klinischer Direktor: OTA Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Konrad Steinestel

Analyse der molekularen Heterogenität solider Tumoren unter Verwendung der Lasermikrodissektion am Beispiel des kolorektalen Karzinoms

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Nathalie Gabriele Maag, M.Sc.
Pforzheim
2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Konrad Steinestel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. med. Alexander Kleger
Tag der Promotion: 15. Juni 2023

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Maag N, Arndt A, Steinestel K.

Lasermikrodissektion zur Analyse molekularer Heterogenität im kolorektalen Karzinom [Laser microdissection for the analysis of molecular heterogeneity in colorectal cancer]. Pathologie (Heidelb). 2022 Aug;43(Suppl 1):36-41. German.

doi: 10.1007/s00292-022-01131-y

Für meine Eltern

In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1 Die Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.1.2 Die Risikofaktoren und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2. Pathogenese und Molekularpathologie des CRC	5
1.2.1 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	5
1.2.2 CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP)	6
1.2.3 Chromosomale Instabilität (CIN).....	7
1.3 Histologische Klassifikation und Tumor-Stadieneinteilung	8
1.4 Die Heterogenität solider Tumoren	11
1.4.1 Inter- und intratumorale Tumorheterogenität	12
1.4.2 Auswirkungen der Tumorheterogenität auf Therapie und Überleben	14
1.5 Lasermikrodissektionsmikroskopie und Zielsetzung dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	19
2a Material	19
2.1 Patientenkollektiv und Ethikvotum.....	19
2.2 Allgemeine Chemikalien	30
2.3 Puffer, Lösungen und Primer.....	32
2.4 Kits	33
2.5 Geräte	34
2.6 Datenbanken.....	36
2.7 Software.....	37
2b Methoden.....	38
2.8 Übersicht zum Arbeiten mit histologischen Proben	38
2.9 Schneiden am Wasserrutschenmikrotom.....	39
2.10 HE-Handfärbung	40
2.11 Gewebepräparation zur DNA-Isolierung	42
2.12 Molekularbiologische Methoden	43
3 Ergebnisse	56
3.1 Ergebnisse der Routineuntersuchungen	56
3.1.1 Routineergebnisse Fall 1	57

3.1.2	Routineergebnisse Fall 2	59
3.1.3	Routineergebnisse Fall 3	60
3.1.4	Routineergebnisse Fall 4	61
3.1.5	Routineergebnisse Fall 5	62
3.1.6	Routineergebnisse Fall 6	63
3.1.7	Zusammenfassende und fallübergreifende Darstellung der Routineergebnisse Fall 1-6	65
3.2	Etablierung der Lasermikrodissektion für Mutationsanalysen des kolorektalen Karzinoms	70
3.2.1	Etablierung Gewebeparbeitung und Schnittherstellung	70
3.2.2	PCR und Pyrosequenzierung der LMD-Proben	76
3.3	Untersuchung der Proben über Lasermikrodissektion	77
3.3.1	Patientenfall 1: 6880	78
3.3.2	Patientenfall 1: Vergleichende Übersichtsdarstellung	88
3.3.3	Patientenfall 3: 6978	91
3.3.4	Patientenfall 3: Vergleichende Übersichtsdarstellung	103
4	Diskussion	107
4.1	Etablierung des Lasermikrodissektions-Mikroskops für Routineanalysen beim kolorektalen Karzinom	108
4.2	Routineergebnisse	113
4.2.1	Die Routinemethode bildet alle hochfrequenten Hauptmutationen ab	113
4.2.2	Die Routinemethode bildet mögliche niedrigfrequente Minor-Mutationen ab	115
4.3	LMD-PCR-Pyrosequenzierung	116
4.3.1	LMD-Analysen führen zur Potenzierung von Mutationsfrequenzen	117
4.4	Heterogenität im kolorektalen Karzinom	120
4.4.1	Existenz von intra- und intertumoraler Heterogenität im kolorektalen Karzinom	120
4.4.2	Räumliche Verteilung von Heterogenität mit morphologischer Clusterung im kolorektalen Karzinom	123
4.4.3	Heterogene Subklone mit potenziellen niedrigfrequenten Mutationen im kolorektalen Karzinom	124
5	Zusammenfassung	126
6	Literaturverzeichnis	128
7	Anhang	145
8	Danksagung	147
9	Lebenslauf	148

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
%	Prozent	CDX2	Caudal Type Homeobox 2
°C	Grad Celsius	CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
®	Registered Trade Mark	CIMP	CpG-Insel Methylierungsphänotyp
#	Nummer	CIN	chromosomale Instabilität
a.A.	auf Anfrage	CK	Zytokeratin
A. bidest	doppelt destilliertes Wasser	CRC	Kolorektales Karzinom
Abb.	Abbildung	c-Myc	zelluläres Myc; Protoonkogen
AK	Antikörper	conc.	konzentriert
APC	Adenomatöse Polyposis-coli	CT	Computertomographie
AS	Aminosäuren	ddH₂O	Bidestilliertes H ₂ O
ATP	Adenosintriphosphat	d.h.	das heißt
BMI	Body mass index	DNA	Desoxyribonukleinsäure
bp	Basenpaare	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
BRAF	„proto-oncogene B-Raf“/„v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“	EGFR	epidermal growth factor receptor
bspw.	beispielsweise	ERK	extracellular signal-regulated kinases
BwKrhs	Bundeswehrkrankenhaus	et al.	et alii
bzgl.	bezüglich	EtOH	Ethanol
bzw.	beziehungsweise	Fa.	Firma
C.	Colon	FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
ca.	circa	FFPE-Gewebe	Formalin fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
CA	Carzinoma/ Karzinom	G	Grading
CACNA1G	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G	GDP	Guanosindiphosphat
		ggf.	gegebenenfalls

GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	MSH-2	mutS homolog 2
GTP	Guanosintriphosphat	MSH-6	mutS homolog 6
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoffsäure	MSI	Mikrosatteliteninstabilität
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	MLH-1	mutL homolog 1
HepPar1	Hepaticyte Paraffin 1	n	Anzahl
HLM	High-level Mutation	N	Lymphknotenbefall (TNM)
HNPCC	hereditäres nicht-Polyposis-assoziertes kolorektales Karzinom / „Lynch-Syndrom“	N/A	<i>not available</i> (nicht verfügbar)
humKtr	Humane Kontroll-DNA	Na²⁺	Natriumion
i.d.R.	In der Regel	NaCl	Natriumchlorid
IGF2	Insulin-like growth factor 2	neg	negativ
i.v.F.	in verschiedenen Farben	NEUROG1	Neurogenin 1
Kap.	Kapitel	ng	Nanogramm
Ki67	Kiel-Antigen 67	NGS	Next-generation-sequencing
KRAS	„Kirsten Rat Sarcoma“	N/R	no result (kein Ergebnis)
LMD	Lasermikrodissektion	Nr.	Nummer
M	Fernmetastasen (TNM)	NRAS	„Neuroblastoma RAS“
MAP2K	mitogen-activated protein 2 kinase	ntc	No Template Control
max	maximal	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
mCRC	Metastasiertes kolorektal Karzinom	PEN	Polyethylen-Naphthalat
MEK	Mitosen-activated protein kinase	pH	-Logarithmus ₁₀ [H ⁺]
min	Minuten	Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea/ Europäisches Arzneibuch
ml	Milliliter	PLLM	Potenzielle low-level Mutation
mm	Millimeter	PMS-2	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component
MMR	mismatch repair	pos	positiv

Pyro	Pyrosequenzierung
R	Resektion (R-Klassifikation)
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RUNX3	RUNX family transcription factor 3
s.	siehe
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
sog.	sogenannt
SOS	Son of sevenless
T	Primärtumor (TNM)
Tab.	Tabelle
TP53	Tumorprotein p53
U	Unit
u.a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control
ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
WRCF	World Cancer Research Fund
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Die Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Trotz neuer Therapiemöglichkeiten, stellt das kolorektale Karzinom (CRC) eines der am häufigsten diagnostizierten Krebsarten dar. Mit mehr als 147.950 neudiagnostizierten Tumoren und 53.200 Todesfällen in den Vereinigten Staaten im Jahr 2020, ist das CRC die dritthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen (Siegel et al. 2020). Weltweit ist das CRC mit 10,2% von insgesamt 18,1 Millionen neu registrierter Krebserkrankungen nach Lungenkrebs (11,6%) und weiblichem Brustkrebs (11,6%) die dritthäufigste Krebserkrankung (Bray et al. 2018). Bei Betrachtung der Mortalitätsrate kommt das CRC mit 8,2% bei 9,6 Millionen Todesfällen hinter dem Lungenkrebs an zweiter Stelle. Im geschlechterspezifischen Vergleich der Neuerkrankungen, ist das CRC bei Männern hinter dem Lungenkrebs und dem Prostatakarzinom am dritthäufigsten. Bei Frauen ist es hinter dem Mammakarzinom sogar die zweithäufigste Karzinomerkrankung (Bray et al. 2018). Dennoch zeigt sich ab den 2000er Jahren eine abnehmende Tendenz von Inzidenz und Mortalität, insbesondere bei Patienten in der Altersgruppe über 50 Jahren. Bei den unter 50-Jährigen lässt sich bezogen auf die Inzidenz, weder bei Frauen noch bei Männern eine Reduktion feststellen (Siegel et al. 2020). Ergänzend zu den altersspezifischen Unterschieden zeigt sich regionale Variabilität. Während in Entwicklungsländern die Mortalitätsraten unverändert hoch sind, lässt sich in den Industrienationen ein Rückgang feststellen (Arnold et al. 2017). Dies liegt zum einen am Zugang zur medizinischen Diagnostik und Therapie, zum anderen an der kulturellen Lebensführung der jeweiligen Bevölkerung (Baena u. Salinas 2015; Keum u. Giovannucci 2019).

1.1.2 Die Risikofaktoren und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Risikofaktoren, die sich in veränderliche bzw. vermeidbare und unveränderliche bzw. unvermeidbare Faktoren unterteilen lassen (Weitz et al. 2005; Mármol et al. 2017).

Zu den modifizierbaren Faktoren zählen Bereiche der persönlichen und kulturellen Lebensführung wie das Konsumverhalten, Bewegung und Ernährung (Islami et al. 2018). Das World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF, wcrf.org) konnte 2017 zeigen, dass bis zu 47% aller CRC-Erkrankungen durch Veränderungen in der Lebensführung vermeidbar wären. Studien konnten zeigen, dass körperliche Betätigung das Erkrankungsrisiko vermindert, während ein erhöhter BMI (body mass index) und Konsum industriell verarbeiteter Lebensmittel sowie Genussmittel wie bspw. Alkohol (EtOH) und Nikotin das Risiko einer Erkrankung signifikant erhöhen (Hughes et al. 2017). Ebenso konnte sowohl für toxisches Acetaldehyd in alkoholischen Getränken (Seitz und Becker 2007; Cho et al. 2012; Watson et al. 2004) als auch bei Tabakkonsum (Watson et al. 2004; Botteri et al. 2008; Cross et al. 2014; Botteri et al. 2020) jeweils ein negativer Zusammenhang sowohl in Bezug auf Konsumintensität und Konsumdauer nachgewiesen werden. Auch der Lebensmittelkonsum spielt bei der Entstehung des CRC eine Rolle. So postuliert das WCRF, dass der Konsum von verarbeiteten Lebensmitteln und rotem Fleisch durch darin enthaltene Häm-Komplexe des Hämoglobins, zyklische Amine und Nitrosamine beim Adenom-Karzinom-Signalweg eine Rolle spielen (Bastide et al. 2011; Bastide et al. 2015; Gamage et al. 2018).

Die zweite Gruppe stellt die nicht-modifizierbaren Risikofaktoren der Krebsentstehung dar. Hierzu zählen verschiedene Erkrankungen, persönliche unveränderliche Faktoren wie Alter und Geschlecht, sowie Umwelteinflüsse die zu spontanen Mutationsereignissen führen können. Mit steigendem Alter nimmt die Inzidenz der Erkrankung zu (Siegel et al. 2020), jedoch spielen auch andere persönliche Faktoren, wie das Geschlecht eine Rolle. Männer besitzen eine 31% höhere Erkrankungsinzidenz als Frauen. Das Alter und die ethnische Herkunft spielen ebenfalls eine Rolle (Meissner et al. 2006; Murphy et al. 2011). Männer, die das 55. Lebensjahr überschritten haben, zeigen eine bis zu 50% höhere Inzidenz als Frauen. Die Gründe für einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und Alter sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Eine Kumulation von Noxen und ein Einfluss von geschlechterspezifischen und altersbedingten hormonellen Veränderungen werden diskutiert, sind aber teilweise umstritten (White et al. 2018). Weitgehend unumstritten sind die Einflüsse verschiedener Erkrankungen, wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht-polypöse

Kolonkarzinom (HNPCC)/Lynch-Syndrom und der Formenkreis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Alle zuvor genannten Erkrankungen weisen eine erhöhte Inzidenz für die Entstehung des CRC auf.

1.1.2.1 Sporadische CRC-Karzinome

Die sporadischen CRC-Karzinome bilden mit 70% die häufigste Gruppe der CRC-Karzinome (Mármol et al. 2017). Ihre Ätiologie beruht auf zufällig während des Lebens auftretenden somatischen Punktmutationen. Somatische Mutationen können nicht an die nachfolgende Generation vererbt werden und verlaufen heterogen, d.h. dass somatische Mutationen verschiedenste Zielgene betreffen können (Fearon u. Vogelstein 1990). Bei Punktmutationen kommt es zu Veränderungen in einzelnen Basen der Nukleotidsequenz eines Gens. Dies bedeutet, dass Punktmutationen letztendlich die nachfolgende Transkription und Translation innerhalb eines Genabschnitts so verändern können, dass karzinogene Proteine entstehen können (Bos 1989). Nicht jede Punktmutation führt zu Veränderungen in transkribierten mRNAs oder dem translatierten Protein. In diesem Kontext spricht man von stillen oder nichtfunktionalen Mutationen. Entscheidend für die Entstehung von Karzinomen sind funktionale Mutationen. Hier kommt es in Folge einer Punktmutation zu Proteinen mit verstärkter oder verringerter Aktivität innerhalb zellulärer Signalkaskaden, die im Falle des CRC zur Bildung von Adenomen führt. Adenome besitzen das Potential, sich zu Karzinomen weiterdifferenzieren zu können. Man spricht von der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz (Lynch u. Hoops 2002). Dieser Vorgang dauert im Schnitt 10 Jahre und ist durch multiple Mutationsereignisse bedingt. Wird eine kritische Mutationsschwelle überschritten, wird dies als Startpunkt einer malignen Transformation angesehen. Basis der Adenom-Karzinom-Sequenz ist die Akkumulierung von Mutationen in Tumorsuppressorgen und Protoonkogenen (Calvert u. Frucht 2002; Jass 2007).

1.1.2.2 Hereditäre und familiäre CRC

Ein geringer Anteil der CRC werden als hereditäre Karzinome bezeichnet. Sie stellen ungefähr 5% aller CRC dar (Lynch u. La Chapelle 2003; Half u. Bresalier 2004; Mármol et al. 2017). Dabei kommt es aufgrund unterschiedlicher Ätiogenese zu Neumutationen in den Keimbahnen. Keimbahnmutationen bilden die Grundlage für die Entwicklungen weiterer Mutationen, wodurch das Risiko weiterer Zellentartungen stark ansteigt (Mäkinen et al. 2001). Es existieren zwei Hauptformen an hereditären Karzinomen, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) als polypöse Form und das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) als nicht-polypöse Form (Lynch u. La Chapelle 2003). Die FAP wird autosomal-dominant vererbt und entsteht bei ca. 80% aus Keimbahnmutationen des *APC* (Adenomatous-polyposis-coli)-Gens (Bülow et al. 1996; Bülow 2013). Das Resultat einer Mutation im *APC*-Gen mündet in der Entwicklung von multiplen gutartigen Adenomen, den sog. Darmpolypen (Petersen et al. 1991). Ausgehend von weiteren Mutationen in den Onkogenen kommt es nach mehreren Jahren zur malignen Transformation mit Entstehung eines Karzinoms (Parc et al. 2004). Bei der nicht-polypösen Form, dem HNPCC, führen ebenfalls Keimbahnmutationen in Genen, die für Mismatch-Repair (MMR)-Proteine kodieren, zu Entartungsereignissen. Die *MMR*-Gene stellen Reparaturgene dar, die mutiert zu einer Instabilität in repetitiven Genabschnitten führen (siehe Kapitel 1.2.1). Auch das HNPCC wird autosomal-dominant vererbt und mündet mit einer Penetranz von 70-80% in der Entstehung von malignen CRC-Ca (Lynch et al. 1997; Umar et al. 2004).

Eine weitere Gruppe in der CRC-Karzinomentwicklung ist die familiäre Clusterung. Die familiären Karzinome, mit einer Wahrscheinlichkeit von 25%, zeigen wie die hereditären Karzinome ein familiäres Vererbungsmuster. Allerdings unterscheiden sie sich von diesen, da ihnen zumindest bislang keine molekularen Charakteristika der hereditären Karzinome zugeordnet werden können (Bisgaard et al. 2004; Stoffel u. Kastrinos 2014; Mármol et al. 2017).

Sie treten mit einer familiären Häufung auf, oftmals mehrfach im selben Organ, und zeigen eine Entstehung der Krebserkrankung meist bereits vor Erreichen des 50. Lebensjahrs.

1.2. Pathogenese und Molekularpathologie des CRC

In den letzten Jahrzehnten konnte durch intensive Forschung gezeigt werden, dass die Kolorektalkarzinome auf verschiedenen Wegen entstehen können und molekulare Heterogenität aufweisen. Insgesamt kennt man drei unterschiedliche Pathogenesewege, die zur Entstehung von CRC führen. Man unterscheidet die Mikrosatelliteninstabilität, die CpG-Methylierungsphänotypen und die chromosomale Instabilität.

1.2.1 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mutationen im Mismatch-repair (MMR)-System führen zu einer Instabilität von Mikrosatelliten (MSI). Diese sind definiert als kurze repetitive DNA-Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Das MMR-System besteht aus sechs verschiedenen Enzymen (MSH1, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 und PMS2), die während der Replikation als Reparatursystem bei Fehlpaarungen von Basen dienen. Bei Mutationen in einem der *MMR*-Gene spricht man von niedrigfrequenten MSI, den MSI-L. Werden in Tumoren mehr als zwei Mutationen nachgewiesen, spricht man von hochfrequenten MSI, den MSI-H. Bei ca. 15% aller CRC lassen sich MSI nachweisen (Aaltonen et al. 1993). Insgesamt lässt sich feststellen, dass MSI-H unter den CRC eine eher günstige Prognose aufweisen (Popat et al. 2005). Das HNPCC, als hereditäres Karzinom, ist assoziiert mit Mutationen im MMR-System und einem erhöhten Lebenszeitrisiko an CRC zu erkranken (Lynch u. La Chapelle 2003). Aber auch sporadische Karzinome können mit MSI assoziiert auftreten. So lässt sich bei den sporadischen Karzinomen eine Stilllegung des *MLH1*-Gens durch Hypermethylierung im CpG-reichen Promotorabschnitt nachweisen (Weisenberger et al. 2006). Somit existiert in einigen wenigen Fällen eine Überlappung zwischen dem MSI- Signalweg und dem CpG-Insel-Methylierungsphänotyp innerhalb der *MLH1*-Promotorregion.

1.2.2 CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP)

DNA-Methylierungsanalysen zeigen, dass in 17% aller CRC-Fälle der CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) vorliegt (Ogino et al. 2009). CpG-Inseln sind Genabschnitte mit multiplen CpG-Basensequenzmotiven, die meist in nicht-methylierter Form innerhalb eines Promotorbereichs liegen (Deaton u. Bird 2011). Multiple Methylierungen innerhalb der CpG-Inseln führen zur Stilllegung des Genabschnitts, sodass diese Promotorregionen bei der Transkription nicht abgelesen werden können („transcriptional silencing“) (Saxonov et al. 2006). Dieser Mechanismus führt unter anderem zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die den Zellzyklus kontrollieren und bei geschädigten Zellen die Apoptose einleiten (Toyota et al. 1999). Der CIMP-Mutationsweg wird heute den serratierten Neoplasiesignalwegen zugeordnet (Rhee et al. 2017). Viele Jahre umstritten, wurde eine Assoziation der CIMP-Tumoren mit Mutationen im *BRAF*-Protoonkogen postuliert (Nagasaka et al. 2004; Rhee et al. 2017). Es konnte bspw. gezeigt werden, dass in *BRAF*-mutierten CRC ein transkriptionelles Silencing von *MLH1* durch Hypermethylierung zu MSI und einem hypermutablen Phänotyp führen (Fang et al. 2014). Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen *BRAF* und CIMP kann ein Methylierungs-5-Marker-Panel nach Weisenberger et al. 2006 (*CACNA1G*, *NEUROG1*, *IGF2*, *RUNX3*, and *SOCS1*) verwendet werden. Heute werden CIMP-Tumoren, abhängig ihres Methylierungsgrades, in verschiedene Subgruppen unterteilt: CIMP-H (Methylierung in $\geq 3/5$ Marker), CIMP-L ($< 3/5$ Marker) und CIMP-O (kein Marker erfüllt) (Yagi et al. 2010; Weisenberger et al. 2006). Weitere Einteilungen entsprechend der Anzahl an Methylierungen innerhalb der CpG-Inseln und anderer Genmutationen, werden nach Studien von (Hawkins et al. 2002; Ogino et al. 2006a; Ogino et al. 2006b) vorgenommen. Weitere Arbeiten zeigen eine Assoziation mit *KRAS*-Genen, die jedoch weniger ausgeprägt zu sein scheint (Shen et al. 2007). Während CIMP-H-Tumore oft mit *BRAF*-Mutationen assoziiert sind und durch Inaktivierungen des WNT/ β -Catenin-Signalwegs gefördert werden, zeigen CIMP-L-Phänotypen eine Assoziation zur *KRAS* und *TP53*-Mutation. CIMP-H-Tumore weisen im Gegensatz zu CIMP-L-Tumoren insgesamt eine schlechtere Überlebensprognose auf. Hinsichtlich Ätiologie kann festgehalten werden, dass CIMP-Tumore vermehrt beim weiblichen Geschlecht, älteren Patienten und mit einer Häufung im proximalen Kolon auftreten (Rhee et al. 2017).

1.2.3 Chromosomale Instabilität (CIN)

Die chromosomale Instabilität (CIN) liegt in 80-85% der Fälle der Entstehung des CRC zugrunde und stellt den klassischen Mutationsweg der Tumorgenese von Karzinomen des Darmtraktes dar (Grady u. Carethers 2008). Der Mechanismus der Tumorentstehung basiert auf einem Zugewinn oder Verlust von Chromosomen bzw. von bestimmten Abschnitten von Chromosomen (Geigl et al. 2008; Palma et al. 2019). Als Resultat treten karyotypische Veränderungen wie genomische Instabilität, Aneuploidie und Polyploidie auf. Die CIN ist mit verschiedensten Genmutationen assoziiert, wie Mutationen in Tumorsuppressorgenen (*APC* und *TP53*) oder Proto-Onkogenen (wie *KRAS*) (Geigl et al. 2008; Pino u. Chung 2010). Einer der ersten Schritte bei der Tumorentstehung ist die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch biallelische Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC* (Powell et al. 1992; Korinek et al. 1997). Funktionell bindet *APC* zusammen mit weiteren Proteinen an β -Catenin und bildet einen destruktiven Komplex, der letztendlich zum proteosomalen Abbau von β -Catenin führt. Dies inhibiert den Wnt-Signalweg. Fehlt diese Unterdrückung des Wnt-Signalwegs, durch Mutation im *APC*-Gen, kommt es zur erhöhten Bildungsrate von Tumorstwachstumsfaktoren (Mann et al. 1999). *APC*-Gene beeinflussen die Stabilität von Chromosomen und führen bei Mutationsereignissen zu chromosomaler Keimbahninstabilität. Auf klinischer Ebene entstehen multiple Polypen, die aufgrund weiterer Mutationen, wie bspw. in den *Ras*-Genen, zur malignen Tumorentstehung führen. *RAS*-Gene wie *KRAS* und *NRAS* kodieren für wichtige GTP-bindende Proteine, die an Wachstums- und Differenzierungsprozessen von Zellen beteiligt sind. Infolge von Punktmutationen in den *RAS*-Genen kommt es zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit von GDP an die GTPase. Die intrinsische GTPase-Aktivität führt zur Überführung des aktiven Ras-Proteins in einen inaktiven Zustand (Bos 1988). Durch fehlenden Austausch von GTP zu GDP und der dadurch fehlenden Inaktivierung des Protoonkogens, werden *RAS*-Proteine konstitutiv dauerhaft aktiviert, wodurch Zellen über multiple intrazelluläre Signalkaskaden wie dem *RAS-RAF-MEK-ERK* und *PI3K*, einer permanenten Wachstumsstimulation unterliegen (Pruitt u. Der 2001). Innerhalb aller *Ras*-Mutationen lassen sich *KRAS*-Mutationen in 85% aller kolorektalen Karzinome nachweisen. Innerhalb dieser *KRAS*-Mutationen finden sich wiederum 80% in den Codons 12/13 des Exon 2, gefolgt von 5% im Codon 61 (Exon 3) und 2% im Codon 146 (Exon 4) (Scheffzek et al. 1997).

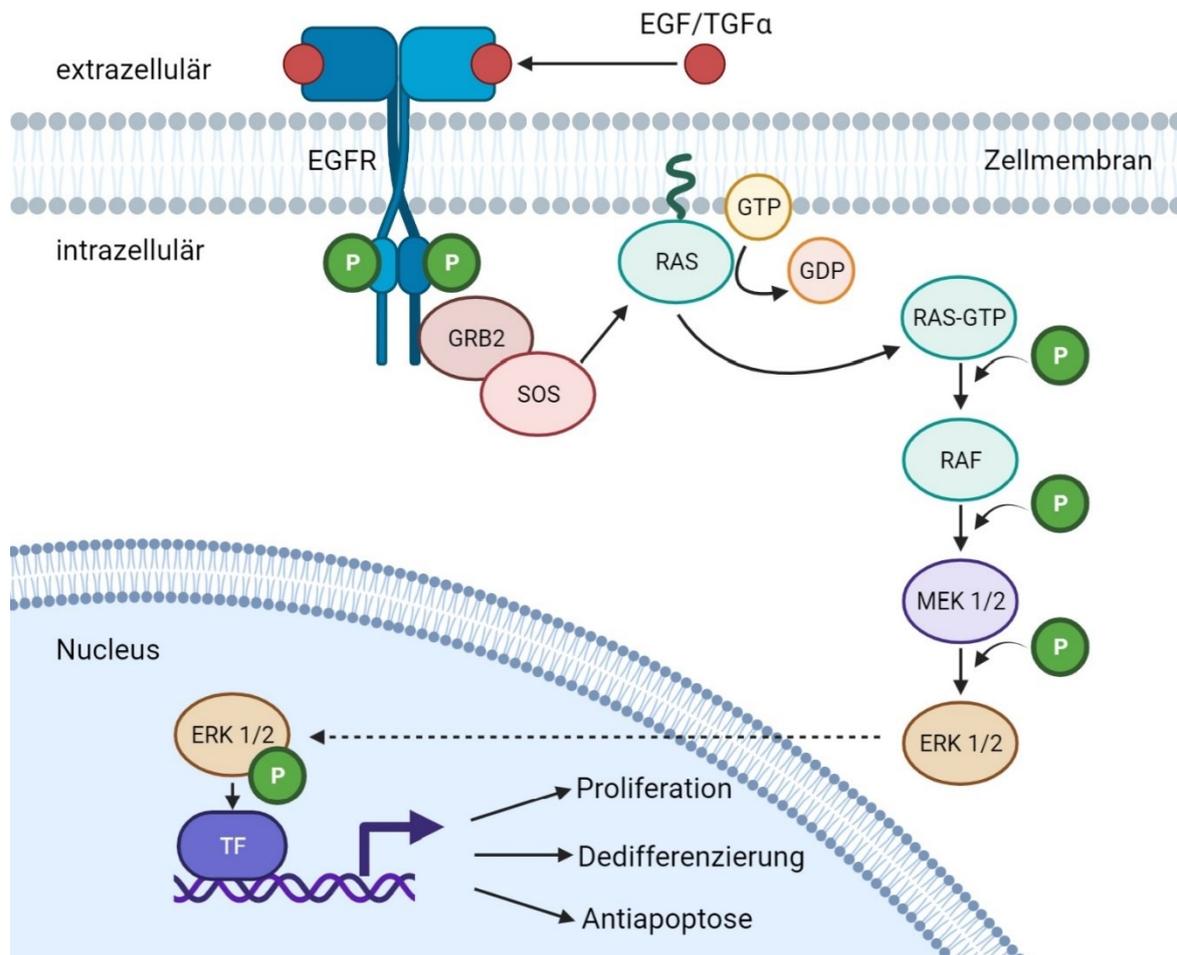


Abbildung 1: Schematische Darstellung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs.

Durch Bindung von EGF oder TGF α an den *epidermal growth factor*-Rezeptor (EGFR), kommt es zur Dimerisierung und Aktivierung. Über verschiedene Zwischenschritte wird durch Austausch von GDP zu GTP das RAS-Protein aktiviert, welches über seine GTPase Aktivität eine Phosphorylierungskaskade von RAF, MEK 1/2 und ERK 1/2 in Gang setzt. Das phosphorylierte ERK diffundiert über die Nucleus-Membran in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren (TK), die wiederum die Transkription der DNA beeinflussen. Letztendlich führt dies zur Modulation von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptosemechanismen. Epidermal growth factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF α) Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), Son of Sevenless (SOS) rat fibrosarcoma (RAF), Mitogen-activated protein kinase (MEK; auch bekannt als MAP2K), extracellular signal-regulated kinases (ERK), Guanosindiphosphat (GDP), Guanosindiphosphat (GTP). **Die Abbildung enthält wissenschaftliche Erkenntnisse nach Pruitt und Der (2001) und wurde selbstständig unter Verwendung von BioRender erstellt: "Created with BioRender.com".**

1.3 Histologische Klassifikation und Tumor-Stadieneinteilung

Durch die histologische Untersuchung von Geweben lassen sich Hinweise auf Entitäten, Stadien und Prognosen von Tumoren erarbeiten. Dazu bedient man sich standardisierter und vereinheitlichter Beurteilungssysteme gemäß WHO-Kriterien (Hamilton u. Aaltonen 2000). Durch die TNM-Klassifikation lässt sich die Tumorausbreitung beurteilen. Sie ist international standardisiert. Die aktuelle 8. Auflage der TNM-Klassifikation wurde 2017 aktualisiert (Schmiegel et al. 2017). Das

TNM-System basiert auf der Beurteilung von drei Kategorien. In der Kategorie T wird die Ausdehnung des Primärtumors hinsichtlich Infiltrationstiefe in das intakte Gewebe der Darmschleimhaut festgelegt. Die kolorektalen Karzinome besitzen das Potential lymphogen und hämatogen zu metastasieren. Die lymphogene Metastasierung (N-Kategorie) beschreibt sowohl das Auftreten als auch die Anzahl der regionalen Lymphknotenmetastasen. Das Auftreten hämatogener Fernmetastasen wird als M-Kategorie klassifiziert (Wittekind 2010).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Stand 2017: 8.Auflage)

Tumorausdehnung (T), lymphogene Metastasierung (N), Fernmetastasen (M)

TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	
Ausdehnung	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa (intraperitoneale Anteile), Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes (sekundär retroperitoneale Anteile)
T4	Perforation des viszeralen Peritoneums (T4a) oder Infiltration anderer Organe/Strukturen (T4b)
Regionäre Lymphknoten	
NX	können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	1–3 regionäre Lymphknoten
N2a	4–6 regionäre Lymphknoten
N2b	≥7 regionäre Lymphknoten
Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen: Nur ein Organ betroffen
M1b	Fernmetastasen: Mehr als ein Organ betroffen
M1c	Fernmetastasen im Peritoneum

Ausgehend von der TNM-Klassifikation lässt sich die 4-Stadieneinteilung (I-IV) der UICC (Union for International Cancer Control) ableiten (Tab. 2). In den Stadien I und II werden die Tumorausdehnungen betrachtet, bei denen keine Lymphknoten- und Fernmetastasen identifiziert werden können. In Stadium III wird eingeteilt, falls eine regionale Lymphknotenmetastase, jedoch keine Fernmetastase festgestellt werden kann. Im Stadium IV liegen Fernmetastasen vor, unabhängig des T- und N-Stadiums.

Weitere Klassifikationen stellen das Grading und die R-Klassifikation dar. Das Grading beschreibt die Differenzierung des Tumorgewebes, ausgehend vom Ursprungsgewebe. Im Grading unterscheidet man 4 Stadien (G1-G4). Das G1-Stadium (gut differenziert) zeigt weitestgehend große Ähnlichkeiten ($\geq 95\%$) zum nicht-neoplastischen Ursprungsgewebe, während G2 (mäßig differenziert) bereits nur noch in 50-95% ursprünglich glanduläre Differenzierungen aufweisen. Bei G3-Tumoren (schlecht differenziert) zeigen nur noch weniger als 50% Drüsenformationen (Fleming et al. 2012). Das G4-Stadium lässt keine Rückschlüsse auf das Ursprungsgewebe zu. G1/2 Tumore ohne Lymphgefäßinfiltration werden als low-risk-Tumore zusammengefasst, während G3/4 Tumore mit/ohne Einbruch in Lymphgefäße den high-risk-Tumoren zugeordnet werden.

Die R-Klassifikation beurteilt die lokale Entfernung der Tumormasse zum gesunden Gewebe, sowohl in der seitlichen als auch in der Tiefenausdehnung (Baretton et al. 2011). Die R-Klassifikation wird oft nach therapeutischer Intervention herangezogen, um Aussagen über einen möglichen Verbleib von Tumorgewebe im Körper des Patienten zu tätigen. Hierzu betrachtet man die Schnittränder eines histologischen Präparats. Zeigt sich mikroskopisch nachweisbar Tumorgewebe im Randschnitt des Gewebepräparats, wird ein R1-Status festgelegt. Zeigen sich die Schnittränder mikroskopisch frei von Tumormasse, wird dies als R0-Status bezeichnet. Ein R2-Status wird dann vergeben, wenn es intraoperativ makroskopisch zu einem Verbleib von Tumorrestgewebe im Patienten kommt.

Tabelle 2: Stadieneinteilung der UICC (Union for International Cancer Control). Carzinoma in situ (Tis), Infiltration Tumor (T1-4), lymphogene Metastasierung (N0-2), Fernmetastasierung (M0-2).

Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms der UICC		
CRC-UICC-Stadium		TNM
0		Tis
I		bis T2, N0, M0
II	IIA	T3, N0, M0
	IIB	T4a, N0, M0
	IIC	T4b, N0, M0
III	IIIA	Bis T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
	IIIB	T3/T4, N1, M0 oder T2/T3, N2a, M0 oder T1/T2, N2b, M0
	IIIC	T4a, N2a, M0 oder T3/T4a, N2b, M0 oder T4b, N1/N2, M0
IV	IVA	Jedes T, jedes N, M1a
	IVB	Jedes T, jedes N, M1b
	IVC	Jedes T, jedes N, M1c

1.4 Die Heterogenität solider Tumoren

Heutzutage weiß man um die Existenz von verschiedenen Tumorsubtypen, bezeichnet als Tumorheterogenität. Dabei unterscheidet man drei verschiedene Arten der Heterogenität: Interpersonelle Heterogenität, intratumorale Heterogenität und intertumorale Heterogenität. Bei der interpersonellen Tumorheterogenität zeigen maligne Tumore einer Entität Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten. Sie stellt die grundlegendste Form der Heterogenität dar. Dies kann histomorphologisch u.a. in unterschiedlicher Gestalt (glandulär vs. papillär vs. schleimbildend „muzinös“) und Wachstumsmuster (solide vs. diffus) begründet liegen, als auch in der Existenz unterschiedlicher Treibermutationen (MSI vs. CIMP vs. CIN), die zur Entstehung und dem Progress von malignen Tumoren führen. Das Wissen um die Diversität von Tumoren, wie sie bereits in zahlreichen Tumortypen festgestellt werden konnte (Katona et al. 2007; Yancovitz et al. 2012; Sousa u. Carvalho 2018; Wu et al. 2020), spielt sowohl bei der Diagnostik als auch bei der Findung einer geeigneten und wirksamen Therapie eine entscheidende Rolle (Burrell u. Swanton 2014). Seit einigen Jahren rückt die Heterogenität des CRC zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung. So konnte bereits gezeigt werden, dass in verschiedenen Patientenkollektiven ein hohe Maß an inter- oder

intratumoraler Heterogenität existieren (Normanno et al. 2015; Jeantet et al. 2016; Blank et al. 2018; Roerink 2018).

1.4.1 Inter- und intratumorale Tumorerogenität

Heutzutage unterscheidet man die intertumorale von der intratumoralen Tumorerogenität (Jeantet et al. 2016) (Abb. 2). Die intertumorale Heterogenität ist definiert durch die gleichzeitige Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen Mutationssubtypen. Dabei können die verschiedenen Subklone sowohl im Primärtumor als auch in metastatischen Absiedelungen, wie den Lymphknotenmetastasen oder den Fernmetastasen zu finden sein. Hiervon zu unterscheiden ist die intratumorale Heterogenität. Bei dieser Form der Heterogenität treten mindestens zwei unterschiedliche Tumorsubklone innerhalb einer einzelnen Tumormasse bspw. innerhalb des Primärtumors auf, während diese in metastatischen Absiedelungen des CRC (mCRC) nicht zu identifizieren sind. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass morphologisch differente Tumorareale aus unterschiedlichen Ursprüngen entstehen. Heute weiß man, dass Tumore mit morphologischen Unterschieden nicht zwingend genetisch different sein müssen und morphologisch identische Areale durch genetische und nicht-genetische Einflüsse verschiedenste Tumorarten hervorbringen können (Navin et al. 2010). Diese Entstehung der Heterogenität kann sowohl von zeitlichen als auch räumlichen Faktoren beeinflusst sein (Blank et al. 2018). Die zeitliche Heterogenität berichtet von einer Weiterentwicklung bestehender Mutationen über einen längeren Zeitraum hinweg, die durch Selektionsdruck verschiedene Subklone hervorbringt. Die räumliche Heterogenität beschreibt die Entwicklung verschiedener Mutationssubklone in einem Tumorareal, unabhängig von der Entstehung des jeweils anderen Subklons. (Sottoriva et al. 2015) postuliert ein „Big Bang-Modell“, bei dem insbesondere „frühe Mutationen“ für die Entstehung von malignen Tumoren wichtig sind. Im Laufe der Jahre kommen weitere Mutationen hinzu. Ein maligner Tumor besteht nach diesem Modell aus mehreren Subklonen, die über das gesamte Tumorareal verteilt liegen. Anfänglich existieren dominante und nicht-dominante Subklone nebeneinander, bis der am besten adaptierte Subklon im Tumorareal überwiegt. Durch weitere Replikationsfehler können weitere Subklone entstehen.

Die sog. Bottleneck-Kondition stellt einen fluiden, darwinistischen Erklärungsansatz dar, bei dem dominante Haupt- und non-dominante Nebenmutationen nebeneinander existieren und die Ausprägung des jeweils anderen Mutationsklons durch Adaption und Selektion beeinflussen können (McGranahan u. Swanton 2017).

Tumorheterogenität des Kolorektalkarzinoms

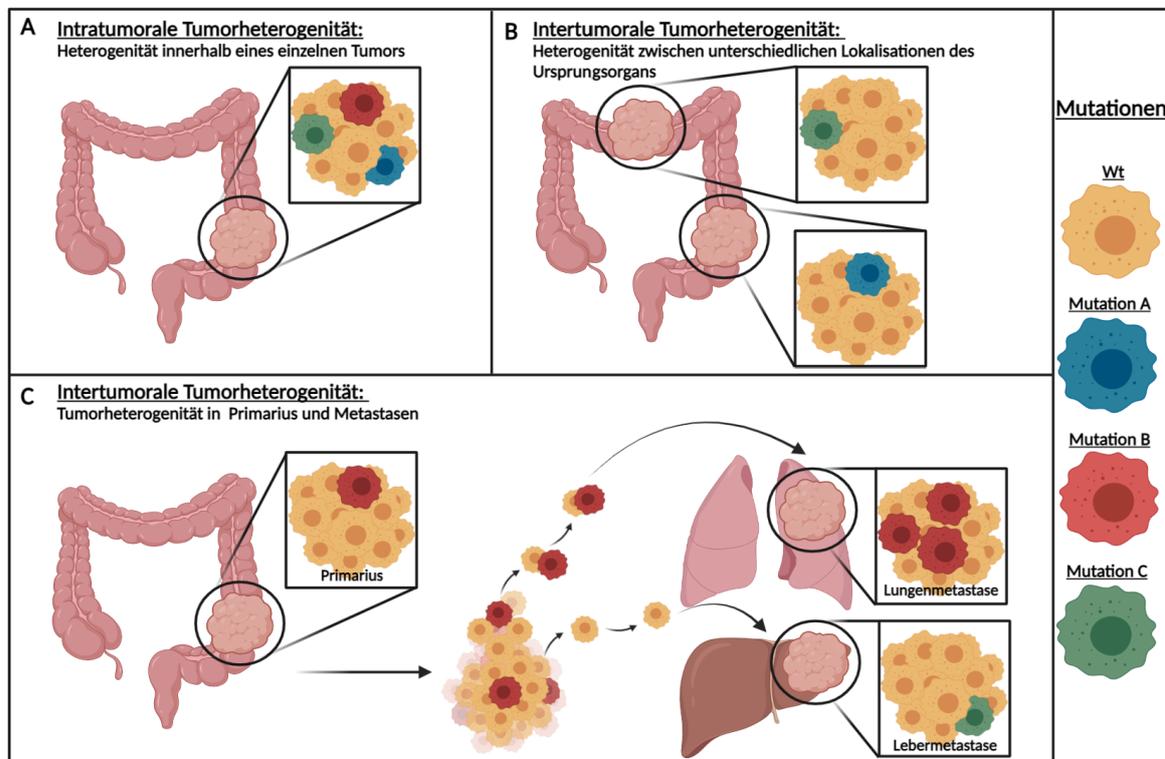


Abbildung 2: Übersicht über intra- und intertumorale Heterogenität des kolorektalen Karzinoms. (A) Schematische Darstellung der intratumoralen Heterogenität in einem einzelnen Tumorbereich des Colonrahmens. Die verschiedenfarbigen Zellen stellen Tumorzellen mit Mutation A-C (rot, blau, grün) und Wildtyp (Wt)- Zellen (braun) dar (siehe Bildlegende: Mutationen).

(B) und (C) Schematische Darstellung der intertumoralen Heterogenität in verschiedenen Tumorbereichen. Die verschiedenfarbigen Zellen (rot, blau, grün, braun) stellen verschiedene Tumorzellen mit Mutation A-C an unterschiedlichen Stellen des Colonrahmens **(B)** oder seiner Metastasen **(C)** (hier beispielhaft Lunge und Leber) dar. Die einzelnen Tumorkonglomerate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer genetischen Tumorausprägungen, gekennzeichnet durch die verschiedenfarbigen Zellen innerhalb der Konglomerate. **(C)** Schematische Darstellung der intertumoralen Heterogenität, innerhalb des Primarius im Colonrahmen und den Metastasen in Lunge und Leber. Aus dem Primarius werden über lymphatische Streuung oder Blutgefäßinfiltration verschiedene Zellen des Primarius in andere Bereiche des Körpers gestreut (Lunge und Leber). Im neuen Zielorgan werden metastatische Absiedelungen gebildet, die hinsichtlich der Mutationen idem oder non idem (ggf. durch Bottleneck-Konditionen entstanden) sind. Unterschiedliche Mutationen in blau (Mutation A), grün (Mutation B) und rot (Mutation C) dargestellt. Zellen mit wildtypischer Gensequenz (Wt) ohne nachweisbare Mutationen sind in braun dargestellt. Die Abbildung enthält wissenschaftliche Erkenntnisse nach (Lim u. Lim 2018a) und wurde selbstständig unter Verwendung von BioRender erstellt: "Created with BioRender.com".

1.4.2 Auswirkungen der Tumorheterogenität auf Therapie und Überleben

Die Tumorheterogenität des kolorektalen Karzinom spielt sowohl bei der Therapieempfehlung, dem Krankheitsverlauf als auch beim Patientenüberleben eine entscheidende Rolle (Sagaert et al. 2018). Für die Findung einer geeigneten Therapie ist es unerlässlich Genmutationen zu identifizieren und diese sowohl innerhalb des Primärtumors als auch seiner metastatischen Absiedelungen zu charakterisieren. Hierfür existieren internationale Guidelines für eine korrekte und repräsentative Auswahl der zu untersuchenden Tumorareale, die für das Auffinden von Mutationen grundlegend sind (van Cutsem et al. 2016). Der Einfluss von verschiedensten Faktoren wie die Tumorzellularität, aber auch bereits vorexistierende adjuvante Chemotherapiezyklen sind zu beachten, da so das Auffinden von falsch negativen Testergebnissen reduziert werden kann (Li et al. 2017).

Verschiedene Proto-Onkogene wie die *RAS*-Genfamilie, insbesondere *KRAS* und *NRAS* (s. Kap. 1.2.3), oder *BRAF* (s. Kap. 1.2.2) spielen als downstream-Regulatoren im epidermal growth factor receptor (EGFR)- Signalwegs eine entscheidende Rolle (Sagaert et al. 2018). Eine Überstimulation dieses Signalwegs führt zu verschiedenen Dysregulationen wie abnormes Zellwachstum, übersteigerte Proliferation sowie fehlende Zelldifferenzierungsprozesse (Dhillon et al. 2007). Das Wissen um die Wichtigkeit des EGFR bei der Tumorentstehung, führte zur Entwicklung von zielgerichteten Antikörpern (AK)- Therapien, die im speziellen den EGFR binden und zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen. Medikamente wie Cetuximab und Pantumumab können über die Bindung des EGF-Rezeptors die intrazellulären Signalwege modulieren und eine Überregulation des nachfolgenden downstream- Signalwegs verhindern. Verschiedenste Studien berichten jedoch bei einigen Patientenpopulationen über eine Insuffizienz dieser Therapieansätze mit zielgerichteten Antikörpern. In den meisten Fällen, bei denen eine Ineffektivität der anti-EGFR-AK festgestellt werden konnte, zeigten sich in den untersuchten Tumorbereichen Mutationen im *KRAS*-Genabschnitt (Lièvre et al. 2006). Mutationen im *KRAS*-Genabschnitt führen zu einer Resistenzbildung der Tumore gegen Cetuximab und anderer anti-EGFR-AK (van Cutsem et al. 2009; Sagaert et al. 2018). Aber auch andere Proto-Onkogene wie *NRAS*- und *BRAF*-Mutationen zeigen ein Therapieversagen der anti-EGFR-AK (Misale et al. 2014). Ein signifikanter Therapieprofit durch eine Therapie mit anti-EGFR konnte

ausschließlich bei Patientenpopulationen mit einem *RAS*-Wildtyp (Wt) festgestellt werden. Therapieansätze mit anti-EGFR dient heute als First-Line-Therapie bei Patienten mit *RAS*-Wt-Mutationen (Lin et al. 2011). Das Wissen um das Faktum eines Therapieversagens bei *RAS*-Mutationssubtypen macht eine vollumfängliche Genmutationsdiagnostik des Primarius, aber auch der Metastasen unumgänglich (van Cutsem et al. 2016). Insbesondere das Wissen, dass 50% aller metastasierten kolorektalen Karzinome (mCRC) eine *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation (Sorich et al. 2015) und 5-10% eine *BRAF*-Mutation (Rowland et al. 2015) aufweisen, zeigt die Wichtigkeit der vollumfänglichen Gendiagnostik beim CRC (Normanno et al. 2009; Roock et al. 2011; Douillard et al. 2013; Heinemann et al. 2014). Erschwerend kommt hinzu, dass nicht nur sog. high-level-Mutationen (HLM) von einem Therapieversagen mit anti-EGFR betroffen sind, sondern auch niedrige Mutationsfrequenzen in einem Tumor, die sog. potential low-level Mutationen (PLLM), zu einer deutlichen Verschlechterung des prognostizierten Therapieoutcomes führen (Morelli et al. 2015; Normanno et al. 2015). Ein weiteres zu beachtendes Faktum ist das heutzutage anerkannte Wissen um inter- und intratumorale Heterogenität des CRC (vgl. Kap. 1.4.1) und deren Auswirkungen auf zielgerichtete Tumortherapieansätze (Burrell u. Swanton 2014). Weniger als 12% aller Patienten mit CRC profitieren von einer Monotherapie mit anti-EGFR (Saltz et al. 2004; Lenz et al. 2006). Das Vorhandensein von verschiedenen Mutationssubklonen innerhalb eines Patienten kann lediglich einen Therapie-Teilerfolg oder gar Misserfolg einzelner Patientengruppen erklären (Burrell et al. 2013; Lin et al. 2011). Viele Wissenschaftler fordern daher explizit für Patienten mit neu aufgetretenem CRC, aber auch Patienten mit einer erneuten Progression nach chirurgischer Intervention oder adjuvanter Chemotherapie ein vollumfängliches, personalisiertes Screening von Primarius und seiner Metastasen.

1.5 Lasermikrodissektionsmikroskopie und Zielsetzung dieser Arbeit

Verschiedene Mutationstypen beeinflussen sowohl die Möglichkeiten als auch die Wirksamkeit verschiedener Therapieoptionen und stehen so in direktem Zusammenhang mit der Überlebensrate. Für Patienten stellt eine korrekte Charakterisierung des Tumorgewebes und die daraus resultierende Einleitung einer

Behandlung einen wichtigen Faktor hinsichtlich der Prognose und dem tatsächlichen Überleben dar. In der Routinediagnostik werden die Gewebeproben im Gesamten in Paraffin eingebettet und das Tumorgewebe als Ganzes hinsichtlich der Mutationsfrequenz über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierung analysiert (Abb. 3; Routine). Heutzutage kommt dem Next-Generation-Sequencing (NGS), aufgrund der Möglichkeit viele hunderte Gene innerhalb eines Gen-Panel parallel zu analysieren, immer größere Bedeutung zu. Somit wird mit dem NGS eine schnellere und umfassendere Diagnose gestellt, verglichen mit einem Gen-zu-Gen-Analyseverfahren. Die Detektionsrate von intra- und intertumoralen Heterogenität ist abhängig von der verwendeten Methode, wobei NGS potenziell dazu beitragen kann eine höhere Anzahl an Doppelmutationen zu identifizieren (Midthun et al. 2019). Nach dem neuesten Stand der Forschung bilden die kolorektalen Karzinome eine heterogene Gruppe, zusammengesetzt aus inter- und intratumoraler Heterogenität (vgl. 1.4.1). Die Detektion dieser inter- und intratumoralen Heterogenität ist für das Patientenüberleben von größter Bedeutung (vgl. 1.4.2) (Kosmidou et al. 2014). Das Ziel dieser Arbeit ist das Etablieren und Optimieren eines Verfahrens, welches es ermöglicht, verschiedene Tumoreale innerhalb eines Patienten hinsichtlich differenter Mutationsmuster zu untersuchen. Bei der Laser-Mikrodissektions-Mikroskopie (LMD) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem einzelne unterschiedliche Bereiche innerhalb eines großen Tumorbereichs, durch die Verwendung eines Resektionslasers im Mikroskop geschnitten und so separiert analysiert werden können (Abb. 3; LMD). Die Auswahl der einzelnen Areale erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle, wodurch sichergestellt werden kann, dass ausschließlich die erwählten Areale in die Analyse eingehen und tumorfreies Stromagewebe ausgespart wird. Zudem kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der Morphologie und dem molekularen Profil innerhalb eines Tumors untersucht werden. Der im LMD installierte Laser schneidet die anhand des Mikroskops ausgewählten Areale. Nach dem Schneiden fallen die Schnitte durch Schwerkraft in ein Tube, welches sich unterhalb des geschnittenen Bereichs befindet. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass innerhalb des erwählten Tumoreals, über mehrere Schnittabfolgen eines Gewebeblocks hinweg, dieselben kleinen Tumoreale in der Analyse betrachtet werden können. So soll eine Aufkonzentrierung von DNA im Analyseansatz erreicht werden. Im Anschluss können die einzelnen Bereiche des Tumors, entsprechend dem Ansatz der

Routinediagnostik, mittels PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung auf Mutationsmuster analysiert und gegeneinander verglichen werden. Dieses Analyseverfahren bietet gegenüber der herkömmlichen Routinediagnostik den Vorteil, dass nicht das gesamte Tumorareal in die Analyse eingeht, sondern nur kleine auserwählte Bereiche. Potenziell vorhandene Tumorerogenität innerhalb der verschiedenen Areale kann einfacher detektiert und mit verschiedenen Arealen verglichen werden. Die potenziellen niedrig-frequenten Mutationen (potential low-level Mutationen, PLLM) stellen Mutationen dar, die im Tumorgewebe eine niedrige Frequenz besitzen. Im Gegensatz dazu stellen hochfrequente Mutationen (HLM) diejenigen Mutationen dar, die innerhalb einer Mutationsanalyse dominieren. Die Gefahr bei einer herkömmlichen Routinediagnostik ist, dass PLLM neben den HLM kaum bis nicht detektierbar sind, da sie beim Verfahren der Pyrosequenzierung von den HLM überlagert werden können. Die separate Betrachtung von einzelnen Tumorableiten mit HLM und PLLM trägt möglicherweise zum Erfolg von Heterogenitätsanalysen bei.

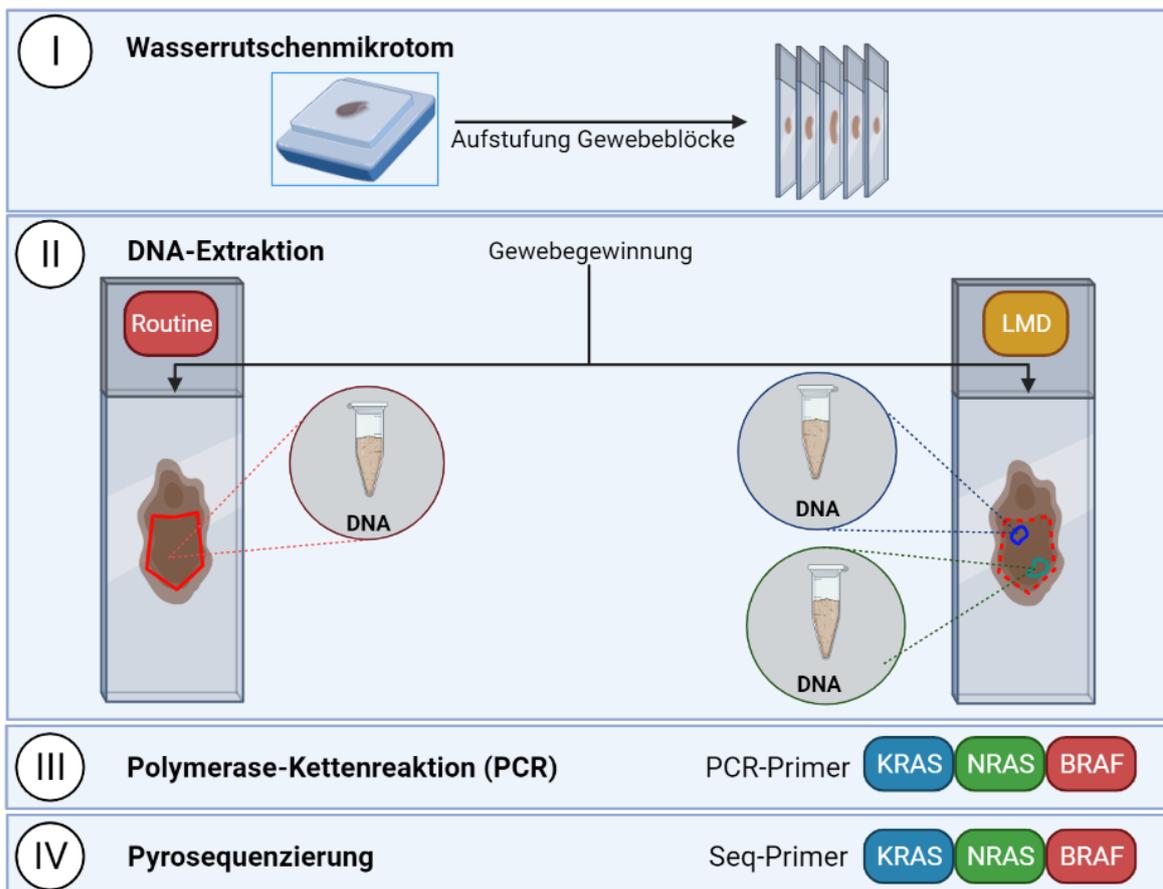


Abbildung 3: Übersichtsdarstellung zum schematischen Vergleich von Routinediagnostik und der LMD-Analyse. Der Versuchsaufbau gliedert sich in vier verschiedene Abschnitte (I-IV mit I: Wasserrutschenmikrotom, II: DNA-Extraktion, III: Polymerase-Kettenreaktion (PCR), IV: Pyrosequenzierung).

(I) In der Routinediagnostik und LMD-Analyse wird Tumorgewebe durch ein Wasserrutschenmikrotom aufgeschnitten und auf Glasslides gezogen. (II) In der Routinediagnostik wird das Tumorgewebeareal im gesamten analysiert (siehe rote Markierung auf dem Gewebe-Slide) indem das gesamte Tumoreal von den Slides abgekratzt wird. In der LMD-Analyse werden nur einzelne Bereiche eines Tumoreals mittels Laser-Mikrodissektionsmikroskop geschnitten (Unterscheidung eines blauen und eines grünen Areals, rote gestrichelte Linie kennzeichnet das gesamte Tumoreal) Aus den gewonnenen jeweiligen Proben wird eine DNA-Extraktion durchgeführt. (III) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Primern für die Mutationen *KRAS* (blau), *NRAS* (grün) und *BRAF* (rot). (IV) Aus PCR-Amplifikat erfolgt Pyrosequenzierung mit Sequenzierprimern auf *KRAS* (blau), *NRAS* (grün) und *BRAF* (rot) (nested zu den PCR-Primern).

Die Abbildung wurde selbstständig unter Verwendung von BioRender erstellt: "Created with BioRender.com".

2 Material und Methoden

2a Material

2.1 Patientenkollektiv und Ethikvotum

Die Gewebeproben (n=14) des für diese Doktorarbeit untersuchten Patientenkollektivs (n=6) (Tab. 3.1-3.6) stammen aus dem Archiv des Bundeswehrkrankenhauses (BwKrhs) Ulm, Institut für Pathologie und Molekularpathologie (Ethikantrag-Nr. 162/13, Ethikkommission der Universität Ulm). Die Gewinnung aller Tumorproben und ihre histopathologische und molekularpathologische Aufarbeitung erfolgte ebenfalls am Bundeswehrkrankenhauses Ulm.

2.1.1 Fall 1

Patient: männlich, 66 Jahre

Tabelle 3a: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 1

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
6407	-	Leberstanzzyylinder
6487	-	Rektumbiopsien
6880	I	Sigmateilstück
	II	Anastomosenring proximal
	III	Anastomosenring distal

Probe 6407:

Klinische Angaben:

Eine Metastasen-suspekte Leberraumforderung, bei bisher unbekanntem Primarius.

Makroskopische Begutachtung:

Ein teils weißlich, teils bräunlicher Leberstanzzyylinder mit einer Gesamtlänge von 3,1 cm. Es wurden insgesamt 10 Leerschnitte angefertigt.

Histologie/Immunhistochemie:

Die Probe zeigte ein pseudogekapseltes Tumorproliferat mit großflächigen Nekrosen mit desmoplastischen Stromareaktionen. Es zeigten sich zahlreiche

tubulopapilläre und mikroazinäre, vitale Tumorreststrukturen. Diese zeigten intestinale Differenzierungen und hyperchromatische polymorphe Zellkerne mit erhöhter Mitoseaktivität. Im Tumorrandbereich fanden sich dissoziativ wachsende, teils einzellige Tumorausläufer in das umgebende Leberparenchym hineinragend.

Die immunhistochemische Färbung mit Zytokeratin (CK)-20, Caudal Type Homeobox 2 (CDX2) und CK-19 zeigte jeweils positive Bereiche. Färbungen mit CK-7 und HepPar-1 waren negativ. Ki-67 als Marker für nukleäre Proliferationskinetik betrug 70-80%.

Begutachtung:

Der begutachtete Leberstanzylinder zeigte eine Fernmetastasierung eines kolorektalen Adenokarzinoms.

Molekularpathologischer Befund:

PCR und anschließende Pyrosequenzierung für Genabschnitte *KRAS* Codon 12/13 und 61 zeigte Wildtypsequenz. Der Tumorgehalt der Gewebeprobe betrug 40 %.

Probe 6487:

Klinische Angaben:

Eine Rektumbiopsie, mit fünf verschiedenen Biopsien zwischen 0,2 bis 0,3 cm messend, aus dem Bereich 20 cm ab ano.

Histologie/Immunhistochemie:

Im Gewebe zeigten sich tubuloazinäre, glandulär differenzierte Tumorproliferate mit atypischen Epithelformationen bei deutlich erhöhter Anisokaryose mit Nukleolenausbildung einzelner Zellkerne.

Die immunhistochemische Färbung zeigte keinen Ausfall der Mismatch-Repair-Proteine MLH-1, MSH-2, MSH-6 und PMS-2.

Begutachtung:

Es zeigte sich ein tubulopapilläres, invasives Adenokarzinom mäßiger bis hoher Differenzierung. Der Übergang zum umgebenden Stomagewebe war scharf demarkiert.

TNM-Klassifikation: pTx, G1-2, R1

Molekularpathologischer Befund:

PCR und anschließende Pyrosequenzierung der Genabschnitte *KRAS* Codon 12/13, 61, 59, 117, 146 und *BRAF* 600 sowie *NRAS* 12/13, 61, 59, 117, 146 zeigte Wildtypsequenz. Der Tumorgehalt der Gewebeprobe betrug 80 %.

Probe 6880:**Klinische Angaben:****I: Sigmaresektat****Makroskopische Begutachtung:**

I: Sigma. Einseitig klammernahtverschlossenes Darmteilstück mit einer Gesamtlänge von 14 cm und einem maximalen Umfang von 5,5 cm. Vom Resektionsrand 1,3 cm entfernt war ein ulceropolypöser Herdbefund mit 6,1x5,5x1,2 cm. Insgesamt zeigte sich ein zirkumferentielles Tumorwachstum. Das Schleimhautrelief stellt sich makroskopisch unauffällig dar.

Histologie/Immunhistochemie:

I: Im Sigmaresektat zeigte sich ein ulceropolypöses, zirkumferentiell wachsendes Adenokarzinom mit mäßiger bis schlechte Differenzierung. Das Adenokarzinom zeigte oberflächliches, pluriglanduläres Wachstumsmuster, mit zur Tiefe hin dominierender muköser Anteile. Die Invasionszone stellt sich plump invasiv dar, mit Tumorausläufern, die in die Serosa hinein reichen. Der Lymphknotenstatus betrug 1/18, glandulär differenzierte Tumorphasien mit atypischen Epithelformationen bei deutlich erhöhter Anisokaryose mit Nukleolenausbildung einzelner Zellkerne. Die immunhistochemische Färbung zeigte keinen Ausfall der Mismatch-Repair-Proteine MLH-1, MSH-2, MSH-6 und PMS-2.

Begutachtung:

Es zeigte sich ein ulceropolypöses invasives Adenokarzinom mit mäßiger bis schlechte Differenzierung.

TNM- Klassifikation: pT4a, pN1a (1/18), pM1a (HEP) L1, V0, Rx

Immunhistochemie:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte des Block I.7 zeigte sich eine *KRAS* Codon 12 Mutation mit G12R- Aminosäureaustausch. *KRAS* Codon 61 und *BRAF* Codon 600 zeigten Wildtypsequenz. Der Tumorgehalt der Gewebeprobe betrug 70 %.

2.1.2 Fall 2

Patient: weiblich, 72 Jahre

Tabelle 3b: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 2

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
5518	I	Metastase Oberlappen rechts
	II	Metastase Unterlappen rechts

Probe 6407:

Klinische Angaben:

Z.n. Coecumkarzinom, welches auswärtig operiert wurde. Patientin stellte sich vor mit der Frage nach Metastasen in der Lunge.

Makroskopische Begutachtung:

I. Metastase Lunge Oberlappen rechts: Im Lungenteilresektat von 2,5x2,3x1 cm zeigte sich ein weißlicher unscharf begrenzter Herdbefund von 1,1cm.

II. Metastase Lunge Unterlappen rechts: Im Lungenteilresektat von 4,2x2,7x1,3 cm zeigte sich ein grau-weißer Herdbefund von 1,3 cm.

Histologie/Immunhistochemie:

I. und II.: Es zeigte sich ein belüftetes Lungenparenchym mit leichter Fibrose innerhalb der Alveolarsepten. Weiter zeigt sich eine atypische glanduläre Formation mit breitflächigen Binnennekrosen, Kern-Pleomorphien und verschobener Kern-Plasmarelationen bei elongierter Kernstruktur. Es zeigte sich ein Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa.

Die immunhistochemische Zusatzfärbung mit CDX2 und Ki-67 als Marker für nukleäre Proliferationskinetik zeigte eine Expression bis 90%. Zusätzlich zeigte sich eine Expression der Mismatch-Repair-Proteine MLH-1, MSH-2, MSH-6 und PMS-2.

Begutachtung:

I. und II.: In beiden Teilresektaten des rechten Lungenlappens zeigten sich in beiden Positionen pulmonale Manifestationen eines intestinal differenzierten Adenokarzinoms. Dieser Befund war gut vereinbar mit dem klinisch vorbehandelten Coecumkarzinom.

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* konnte eine Mutation in *KRAS* Codon 146 festgestellt werden, die

zu einem Aminosäureaustausch A146V führte. Die restlichen Sequenzen zeigten Wildtypsequenzen. Der Tumorgehalt der Gewebeprobe betrug ca. 80 %.

2.1.3 Fall 3

Patient: männlich, 60 Jahre

Tabelle 3c: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 3

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
6978	II	Metastase Oberlappen links

Probe 6978:

Klinische Angaben:

Metastase eines Kolonkarzinom mit Einschmelzung nach Chemotherapie und palliativer Resektion. Nun Frage nach vitalem Tumorgewebe.

Makroskopische Begutachtung:

II. Lungenoberlappenresektat links: Im Lungenlappenresektat von 18,8x12x4,8 cm zeigte sich die Lungenoberfläche in drei Bereichen narbig eingezogen. Auf den Schnittflächen befanden sich insgesamt drei weißlich solide Herdbefunde von maximal 3,9 cm.

Histologie/Immunhistochemie:

II.: Das Lungenparenchym wies drei Metastasen eines schmutzig nekrotischen Adenokarzinoms auf, diese waren zentral des Tumorknotens großflächig nekrotisch zerfallen. In allen drei Tumorknoten befand sich ein vitaler Randsaum. Das umliegende Lungengewebe zeigte sich entzündlich verändert mit emphysematischem Umbau und peribronchialen Rundzellularinfiltraten.

Die immunhistochemische Zusatzfärbung mit CDX2 bei Negativität für Napsin zeigte vitale Tumorzellverbände des Adenokarzinom bei kräftiger Expression.

Begutachtung:

II.: Drei vollständig resezierte großflächig nekrotisch zerfallene Metastasen eines schmutzigen Adenokarzinoms. Der Befund entsprach dem Bild eines mit einer neoadjuvanten Therapie klinisch vorbehandelten Rektumkarzinom mit vitalem Randsaum Grad II nach Dworak. In Zusammenschau aller Befunde bestätigte sich der Verdacht einer metastatischen Absiedelung des klinisch vorbekannten Kolonkarzinoms.

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS* Codon 12/13, *KRAS* Codon 61 und *BRAF* Codon 600 aus dem Block II5 konnte eine Mutation in *KRAS* Codon 12 festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch G12A führte. Die restlichen untersuchten Sequenzen zeigten sich wildtypisch. Der Tumorgehalt der Gewebeareale betrug im Block II5 ca. 60 %.

2.1.4 Fall 4

Patient: weiblich, 71 Jahre

Tabelle 3d: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 4

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
6122	-	Colon ascendens Biopsie
6270	III	CT-gesteuertes Punktat; Lymphknotenmetastase mesenterial/coeliakal
6703		Omentum majus

Probe 6122:**Makroskopische Begutachtung:**

Neun verschiedene Biopsiepartikel des Colon ascendens: zwischen 0,1 und 0,2 cm im Durchmesser.

Histologie/Immunhistochemie:

In den Biopsiepartikeln des Colon ascendens zeigten sich verplumpte, kryptär aufgebaute Schleimhautformationen mit interkryptären Rundzellinfiltraten. Innerhalb des fibrosierten Bindegewebes zeigen sich zahlreiche mikropapilläre teils siegelringzellig imponierende Tumorverbände, welche die Lymphspalten vollständig austamponierten.

Die immunhistochemischen Zusatzfärbungen bezüglich der Mismatch-Repairproteine zeigten keinen Ausfall. Das Tumorproliferat zeigte kräftige Expressionen gegen CK-20 und CDX2. Eine Aussage bezüglich Tumorausdehnung und Tiefeninfiltration konnte anhand einer Biopsie nicht getätigt werden.

Begutachtung:

Unterminierende und infiltrative Verbände eines schlecht differenzierten Adenokarzinoms (G3) mit ausgeprägter Lymphangiosis carcinomatosa des Colon ascendens.

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* 600 und *NRAS* konnte eine Mutation in *BRAF* Codon 600 festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch V600E führte. Die restlichen untersuchten Sequenzen zeigten sich wildtypisch. Der Tumorgehalt der Gewebeareale betrug ca. 90 %.

Probe 6270:**Klinische Angaben:**

Frage nach Lymphknotenmetastase mesenterial/coeliakal/paraaortal und Peritonealkarzinose bei stenosierendem Karzinom des Colon ascendens.

Makroskopische Begutachtung:

Verschieden große Biopsien des Peritoneums zwischen 0,3 und 3 cm.

Histologie/Immunhistochemie:

Histologisch zeigten sich mikropapilläre Tumorformationen in muzinöser Matrix mit ausgeprägten Kernpleomorphien. Die mitotische Aktivität war erhöht.

Die immunhistochemischen Zusatzfärbungen bezüglich der Mismatch-Repairproteine zeigte keinen Ausfall. Das Tumorproliferat zeigte kräftige zytoplasmatische Expressionen gegen CK-20 bei Negativität des CK-7.

Begutachtung:

Subtotal karzinomatös durchsetztes Stanzpunktat eines schlecht differenzierten (G3) und sowohl mikropapillären als auch muzinös durchsetzten Adenokarzinoms. Die Zusammenschau der Ergebnisse entsprach einer Metastase des zuvor diagnostizierten Kolonkarzinoms.

TNM-Klassifikation: pTx, pM1, G3

Probe 6703:**Klinische Angaben:**

Frage nach Peritonealkarzinose bei vorbekanntem Adenokarzinom des Colons.

Makroskopische Begutachtung:

Fettgewebe des Omentum majus mit einer Ausdehnung von 7,3x4,8x2,5 cm. Innerhalb des Fettgewebes zeigten sich weißliche Durchsetzungen.

Histologie/Immunhistochemie:

In den Teilstücken des Omentum majus zeigten sich großflächige, tumoröse Durchsetzungen eines Adenokarzinoms (G3).

Begutachtung:

Die Befunde passten anhand des Wachstumsmusters gut zu den Vorbefunden einer Peritonealkarzinose des bekannten Adenokarzinoms mit Hinweisen auf eine ausgeprägte Lymphangiosis carcinomatosa.

2.1.5 Fall 5

Patient: weiblich, 86 Jahre

Tabelle 3e: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 5

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
6515	1	PE Darm- Coecum

Probe 6515:**Makroskopische Begutachtung:**

Fünf Biopsien des Coecum zwischen 0,2 und 0,3 cm mit erfassten Anteilen eines mäßig bis hochdifferenzierten, pluriglandulären und tubulopapillär wachsenden Adenokarzinoms (G1-2). Zusätzlich zeigten sich entzündliche Reizungen und Induktionen von Stromadysplasien.

Histologie/Immunhistochemie:

Tubuloazinäre, glanduläre Tumorinfiltrate mit atypischen Epithelformationen. Zur Tiefe hin zeigte sich ein dyskohäsives Wachstumsmuster, teils mit desmoplastischer Stromareaktion und mischzelligem Entzündungsinfiltrat in den Invasionsbereichen. Die Kapillaren zeigten sich hyperämisch und teils mit Mikroblutungen.

Die immunhistochemische Zusatzfärbung des Mikrosatellitenstatus ergab keinen Ausfall der Mismatch-Repair-Proteine (MLH-1, MSH-2, MSH-6 und PMS-2).

Begutachtung:

Bioptisch erfasste Anteile eines mäßig bis hochgradig differenzierten Adenokarzinoms. Aufgrund der Biopsie sind keine Aussagen bezüglich Tumorausdehnung und Tiefeninfiltration möglich.

TNM-Klassifikation: pTx, G1-2, R1

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* Codon 600 und *NRAS* konnte eine Mutation in *BRAF* Codon 600 festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch V600E führte. Die restlichen untersuchten Sequenzen zeigten sich wildtypisch. Der Tumorgehalt der Gewebeareale betrug ca. 75 %.

2.1.6 Fall 6

Patient: weiblich, 71 Jahre

Tabelle 3f: Beschreibung der verwendeten Proben im Patientenfall 6

Proben-Nr.	Block	Beschreibung
7919	I	Coecum und Colon ascendens Biopsie
8119	III	Hemicolektomie rechts

Probe 7919:**Makroskopische Begutachtung:**

Biopsiepartikel des Coecum und des Colon ascendens von zusammen 1 cm im Durchmesser.

Histologie/Immunhistochemie:

In den Biopsiepartikeln des Colon ascendens zeigten sich pluriglandulär wachsende, atypische Formationen eines entzündlich durchsetzten Adenokarzinoms mit mäßig bis hochgradiger Differenzierung (G1-2). Zusätzlich zeigten sich punktuelle muzinöse Komponenten und Induktionen von desmoplastischen Stromametaplasien. Die immunhistochemische Zusatzfärbungen bezüglich der Mismatch-Repair-Proteine zeigte einen Färbeausfall für MLH-1 und PMS-2 als korrespondierendes Zwillingspärchen. Eine Aussage bezüglich Tumorausdehnung und Tiefeninfiltration konnte anhand einer Biopsie nicht getätigt werden.

Begutachtung:

Zusammenschau der Befunde ergab pluriglandulär wachsende, atypische Formationen eines Adenokarzinoms (G1-2) mit punktuell muzinösen Komponenten.

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* 600 und *NRAS* konnte eine Mutation in *BRAF* Codon 600 festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch V600E führte. Die restlichen untersuchten Sequenzen zeigten sich wildtypisch. Der Tumorgehalt der Gewebeareale betrug ca. 70 %.

Probe 8119:**Klinische Angaben:**

Frage nach Tumordinfiltration des terminalen Ileums nach bioptisch positivem Vorbefund.

Makroskopische Begutachtung:

Rechtsseitiges Hemikolektomiepräparat, mit 6cm des terminalen Ileums und einem 23 cm langen Anteil des Colon ascendens. Appendix 3,5x0,5 cm. Es zeigte sich 6cm vom oralen Pol und 16 cm vom aboralen Resektionsrand ein max. 7,5 cm longitudinal und 6,5 cm transversal polypoid aufgeworfener semizirkumferentiell wachsender Tumor. Auf lamellierender Schnittführung zeigte sich der Tumor mit zentralen Nekrosezonen und einem 4 cm in die Tiefe wachsenden Tumorknoten, die makroskopisch bis an die Serosanteile heranreichen. Eine beginnende Infiltration des miterfassten terminalen Ileums ist zu erahnen.

Histologie/Immunhistochemie:

Histologisch zeigte sich ein niedrig bis mäßig differenziertes Adenokarzinom (G1-2), subtotal durchsetzt und exophytisch ulzerierend. Zusätzlich zeigten sich fingerförmige Tumorausläufer über die Grenzen der Bauhin'schen Klappe hinweg bis ins terminale Ileum reichend. Ein direkter Durchbruch der Serosa war zu erkennen. Das Wachstumsmuster zeigte sich pluriglandulär, als auch muzinös mit Nekrosebezirken und Abszessherden. Die luminalen Resektionsränder zeigten sich tumorfrei, altersentsprechend und vital.

Begutachtung:

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich ein sowohl pluriglanduläres als auch muköses Wachstumsmuster eines Adenokarzinom des Colon ascendens.

TNM-Klassifikation: pT4b, pN1a (1/48), pM1c (HEP) L1, V0, G2-3, Rx

Molekularpathologischer Befund:

Mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* 600 und *NRAS* konnte im untersuchten Gewebekblock III8 eine Mutation in *BRAF* Codon 600 festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch V600E führte. Die restlichen untersuchten Sequenzen zeigten sich wildtypisch. Der Tumorgehalt der Gewebeareale betrug ca. 80 %.

2.2 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit („pro analysi“).

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, unter Angabe der Bezugsquelle und Katalognummer.

Verbrauchsmaterialien	Katalog Nr.	Bezugsquelle
Schneiden Wasserutschenmikrotom		
Microtome Blades	A-35 "Superior"	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. (Osaka, Japan)
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	10149870	Thermo Scientific™ (Waltham, USA)
AUTOMAT-STAR Deckgläser 24x60mm St.1,5	K12460A1,5	Engelbrecht GmbH (Edermünde (Besse, Deutschland)
Aqua	387875	B. Braun (Melsungen)
Einbettkassetten mit Deckel	i.v.F.	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Einbettkassetten ohne Deckel	i.v.F.	
EUKITT®	a.A.	Orsatec GmbH (Bobingen, Deutschland)
Schneiden am Lasermikrodissektionsmikroskop		
Membrane Slides, PEN, 4 µm	a.A.	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Frame Slides, PEN, 4 µm	a.A.	
Einbettkassetten mit Deckel	i.v.F.	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Einbettkassetten ohne Deckel	i.v.F.	
Handfärbungen		
Färbezylinder nach Hellendahl	4200000	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Färbekästen für Färbegestelle mit Deckel	4200004	
Färbeeinsatz	4200005	
Drahtbügel für Färbeeinsatz	6611000	
SafeSeal Reagiergefäß DNA Low Binding, 1,5 ml	72.706.700	
Corning™ Falcon™, 50 ml	10788561	
Präparatetafeln	51.850033	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Präparatemappen	versch. Sorten	Marburger Signier-Technik-Systeme GmbH & Co KG

Fortsetzung der Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien auf Seite 30

Fortsetzung Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Katalog Nr.	Bezugsquelle
Tubes und Falcons		
Qubit™ Assay Tubes	Q32856	Invitrogen (Waltham, USA)
Maxwell® 16 Elutiontubes, 0.5 ml	AS620A	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	0030120086	Eppendorf (München, Deutschland)
Safe-Lock Tubes, 2,0 ml	0030120094	
SafeSeal Reagiergefäß DNA Low Binding, 1,5 ml	72.706.700	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Corning™ Falcon™, 50 ml	10788561	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
PCR tube caps, 0,5 ml	a.A.	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Maxwell Elution tube	AS7201	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung		
PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs	979206	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe	979010	
Flat PCR Caps, strips of 12	AB0850	Thermo Scientific™ (Waltham, USA)
Flat PCR Caps, strips of 8	AB0784	
twin.tec®-PCR-Platte 96 LoBind, skirted	0030129563	Eppendorf (München, Deutschland)
twin.tec® PCR Plate 96, low profile, unskirted	0030133331	
ep Dualfilter T.I.P.S. SealMax	50–1000 µl (blau)	Eppendorf (München, Deutschland)
	2–200 µl (gelb)	
	2–100 µl (gelb)	
	0,1–10 µl (grau)	
Pipettenspitzen	Verschiedene Modelle	Eppendorf (München, Deutschland)
Maxwell® 16 LEV Plungers	AS610A	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Maxwell® 16 Tissue DNA Cartridge	AS530C	

2.3 Puffer, Lösungen und Primer

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, unter Angabe der Katalognummer und der Bezugsquelle.

Name	Katalog Nr.	Bezugsquelle
Färbelösungen		
Mayer's Hämaunlösung	1.09249.1000	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Eosin	1.15935.0025	
Isopropanol ≥99.0 % Ph. Eur.	20904.470	
Essigsäure ≥99.5 % Ph. Eur.	20102.292	
Ethanol absolut ≥99.8 %	437435L	
Xylol	1.08298.4000P	
Pyrosequenzierung		
PyroMark Wash Puffer (conc., 200 ml)	979008	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
PyroMark Denaturation Sol. (500 ml)	979008	
PyroMark Annealing Puffer	979009	
PyroMark Binding Puffer	979006	
Streptavidin Sepharose™ High Performance Medium	17-5113-01	GE Healthcare (Dornstadt, Deutschland)

2.4 Kits

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete kommerziell erhältliche Kits. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits, unter Angabe der Katalognummer, der Bezugsquelle und der in den Kits enthaltenen Reagenzien.

Kit	Katalog Nr.	Bezugsquelle	Reagenzien
Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit	AS1130	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)	Inkubationspuffer
			Lysepuffer
			Elutionspuffer
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Q32854	Invitrogen (Waltham,USA)	Qubit® dsDNA HS Reagent
			Qubit® dsDNA HS Buffer
			Qubit® dsDNA HS Standard #1
			Qubit® dsDNA HS Standard #2
therascreen KRAS Pyro Kit	971460	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	PCR Primers,
			Sequencing Primers
			Unmethylated Control DNA
			PyroMark PCR Master Mix
			CoralLoad
			<i>therascreen</i> Buffers and Reagents (Tab. 5: Pyrosequenzierung)
therascreen RAS Extension Pyro Kit	971590	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	PCR Primers
			Sequencing Primers
			Unmethylated Control DNA
			PyroMark PCR Master Mix
			CoralLoad Concentrate
			<i>therascreen</i> Buffers and Reagents (Tab. 5: Pyrosequenzierung)
therascreen BRAF Pyro Kit	971470	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	PCR Primers
			Sequencing Primers
			Unmethylated Control DNA
			PyroMark PCR Master Mix
			CoralLoad Concentrate
			<i>therascreen</i> Buffers and Reagents (Tab. 5: Pyrosequenzierung)

2.5 Geräte

2.5.1 Allgemeine Geräte

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Geräte. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, unter Angabe der Modelle und der Bezugsquelle.

Gerät	Modell	Bezugsquelle
Wasseraufbereitungs- gerät	Synergy UV	Millipore, Schwalbach
Eppendorf Reference® 2 (Einkanal, variabel) und Eppendorf Research® plus (Einkanal, variabel)	100–1,000 µl, blau	Eppendorf (München, Deutschland)
	20–200 µl, gelb	
	10–100 µl, gelb	
	2–20 µl, hellgrau	
	0,5–10 µl, mittelgrau	
	0,1–2,5 µl, dunkelgrau	
Eppendorf Research® plus, Einkanal, fix	20 µl, gelb	
Pipettenhaltesystem	Pipettenkarussell 2	
Messzylinder	Verschiedene Modelle	
Tischzentrifuge	FastGene® Mini Centrifuge	Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)
Reagenzglas-Schüttler	Vortex-Schüttler	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kühlplatte	PARA COOLER O	Weinkauf Medizintechnik (Hallerndorf, Deutschland)
Paraffinstreichtisch		MEDAX NAGEL (Neumünster, Deutschland)
Parafineindeckautomat	TISSUE-TEK	Sakura
Wärmeschränke	Verschiedene Modelle	
Gefrierschrank	200847004577	Slimline
Kühlschrank	Profi line 80.232.089.4	Liebherr
Thermoblock	ThermoMixer® C	Eppendorf (München, Deutschland)
Deckel ThermoMixer®	ThermoTop®	Eppendorf (München, Deutschland)
Tubehalter für Thermoblock	SmartBlock™ 1,5 mL	

Fortsetzung der Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendeten Geräte auf Seite 34

Fortsetzung Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Bezugsquelle
Trockenblockerhitzer	Blockthermostat, digital	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Werkbänke	Herasafe™ KS	Thermo Scientific™ (Waltham, USA)
Workstation (Glas) mit UV / Air Cleaner	L020-GC	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, Deutschland)
Vortexer	IKA Vortex 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)

2.5.2 Anfertigung histologischer Schnitte

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Geräte zur Erstellung von histologischen Schnitten. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte zur Anfertigung von histologischen Schnitten, unter Angabe der Modelle und der Bezugsquelle.

Gerät	Modell	Bezugsquelle
Rotationsmikrotom	HM 355S automatisches Mikrotome	Thermo Scientific™ (Waltham, USA)
Mikrotomwasserbad	Section Transfer System™ (STS)	
Färbeautomat	BenchMark Ultra	Ventana (Roche)
Eindeckautomat	RCM 7000	Medite Medizintechnik

2.5.3 DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Geräte für die DNA-Isolierung und anschließende Konzentrationsbestimmung. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte zur DN-Isolierung und Konzentrationsbestimmung, unter Angabe der Katalognummer und der Bezugsquelle.

Gerät/Modell	Katalog Nr.	Bezugsquelle
Maxwell® 16 MDx Instrument	AS3000	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Maxwell® 16 LEV Plungers	AS610A	
Maxwell® 16 Tissue DNA Cartridge	AS530C	
Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack	AS1251	
Qubit® 1.0 Fluorometer	N/A	Invitrogen (Waltham, USA)

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Pyrosequenzierung (PS)

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Pyrosequenzierung (PS). Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte für die PCR und PS, unter Angabe der Katalognummer und der Bezugsquelle.

Gerät	Katalog Nr.	Bezugsquelle
PCR-Cycler Mastercycler nexus	6331000017	Eppendorf (München, Deutschland)
PCR-Cycler Mastercycler X50	6311000010	
PyroMark Q24	9001514	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
PyroMark Workstation	9001518	
PyroMark Vakuumpumpe	9001518	
PyroMark Sequenzierplatte	979201	
PyroMark Kartusche	979202	

2.5.5 Mikroskopie

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Geräte für Mikroskopie. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, unter Angabe der Modelle und der Bezugsquelle.

Gerätetyp	Modell	Bezugsquelle
Kaltlichtquelle	CTR6000/6500	Leica
Mikroskop	DM 6000 B	
LMD	DM 6000B	
Objekträgerhalterung	scanning stage LMT 350 ultra	Leica
Objektiv	2,5x	
	5x	
	6,3x	
	10x	
	20x	
40x		
Laser	2CONBOOSTA	CryLaS
Computer	Z420 Z440	HP
Bildschirm	MultiSync LCD 2970NX DTF-720C	NEC Wacom
Kamera	KY-F75U LMDCC7000	JVC Leica

2.6 Datenbanken

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Datenbanken. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Datenbanken, unter Angabe Internetadresse.

Name der Datenbank	Adresse
PubMed	http://ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
NCBI (National Center for Biotechnology Information), PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed

2.7 Software

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Software-Programme. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Softwareprogramme, unter Angabe des Softwarenamen.

Anwendungsgebiet	Name der Software
Textbearbeitung	Microsoft Office 365 ProPlus
Literaturverwaltung	Citavi 6
Pyrosequenzierung Software	PyroMark Q24 Software version 2.0.8, Qiagen
Plug-ins Pyrosequenzierung	KRAS Pyro Plug-in v. 1.3.0, Qiagen
	RAS Extension Pyro Plug-in v. 1.3.0, Qiagen
	BRAF Pyro Plug-in v. 1.3.0, Qiagen
LMD	Leica LMD Software V7.6
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS2
Abbildungsgenerierung	BioRender.com

2b Methoden

2.8 Übersicht zum Arbeiten mit histologischen Proben

Das im Kapitel 2.1 beschriebene Patientenkollektiv wurde vom Institut für Pathologie und Molekularpathologie am BwKrhs Ulm für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Patientenproben stammen aus dem Archiv des Instituts und wurden für diese Arbeit selbstständig aufgearbeitet. Die Einzelheiten der Aufarbeitung sind den nachfolgenden Kapiteln 2.8.1ff zu entnehmen.

2.8.1 Materialeingang

Die in die Pathologie eingesendeten Fälle wurden mit einer Eingangsnummer versehen. Dabei wurden alle Einzelproben eines Patienten mit einer fortlaufenden Nummerierung entsprechend der Eingangsnummer zugeordnet. Jeder Fall wurde zusammen mit einer Überweisung versendet. Diese enthielt die Patientendaten, die Anschrift des überweisenden Instituts, die die Probenentnahme angeordnet/durchgeführt hat, eine detaillierte Beschreibung der versandten Materialien, die Operations- bzw. die Materialentnahmedetails und den Arbeitsauftrag des Pathologen.

2.8.2 Makroskopische Begutachtung (sog. Zuschnitt)

Die Proben im Zuschnitt mussten für eine bestimmte Zeit in Paraformaldehyd fixiert werden, bevor sie weiterverarbeitet werden können. Dieses Zeitintervall richtete sich nach der Größe der Gewebeproben und der strukturellen Beschaffenheit. Zu den Arbeitsschritten der makroskopischen Begutachtung gehörte die vollständige Beschreibung der makroskopischen Eigenschaften, sowie des Zuschneidens der organischen Proben. Somit ergab sich für jeden Arbeitsauftrag eine individuelle Anzahl an eingebetteten Gewebebereichen, verteilt auf verschiedene Gewebelöcke mit fortlaufender Nummerierung. Die Aufarbeitung erfolgte standardisiert und entsprach den aktuellen Leitlinienempfehlungen. Bei Gewebestänzen wurde das gesamte Präparat in Paraffin eingebettet.

2.8.3 Histologische Aufarbeitung der Proben

Nachfolgend an den Zuschnitt, erfolgte die Einbettung der Gewebeproben in Paraffinblöcke. Zur korrekten Einbettung in sog. Einbettkassetten wurde den einzelnen Proben in absteigender Alkoholreihe kontinuierlich Wasser (H₂O) entzogen, in ein Xylol-Intermedium überführt und dieses zum Abschluss durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms konnten die angefertigten Paraffinblöcke entsprechend ihrer Anforderung in unterschiedliche Schnittdicken aufgeschnitten und auf spezielle Objektträger immobilisiert werden. Abhängig vom Auftrag wurden die Objektträger histologischen Färbungen unterzogen.

2.8.4 Archivierung

Zur Archivierung werden die angefertigten Blöcke für einen Zeitraum von fünfzehn Jahren und die immunhistologisch gefärbten Objektträger für dreißig Jahre aufbewahrt.

2.9 Schneiden am Wasserrutschenmikrotom

2.9.1 Allgemeine Hinweise zum Vorgehen beim Schneiden am Mikrotom

Die angefertigten Paraffin-Blöcke mussten vor dem Schneiden am Wasserrutschenmikrotom rechtzeitig auf eine Kühlplatte gelegt werden. Die Kühlplatte sollte eine Temperatur von mindestens -20°C aufweisen. Für jeden zu schneidenden Block, sollten je nach Größe des Tumorareals ausreichend Objektträger mit der Probennummer beschriftet werden. Für eine entsprechende Probennummer wurde ein 1,5 ml Tube beschriftet, in welches die geschnittenen Gewebeproben transferiert wurden. Alte, noch ins Mikrotom eingespannte Messer wurden verworfen. Das im Wasserbad befindliche H₂O wurde auf eine Betriebstemperatur von 26-35°C erhitzt. Im Schneideprozess wurde darauf geachtet, dass bei jeder neuen Patientenprobe ein neues Messer eingespannt und

die Wasseroberfläche des Wasserbads durch Verwendung eines saugfesten Papiertuchs von schwimmenden Restpartikeln befreit wurde.

2.9.2 Schneiden am Mikrotom für molekulare Routine-Analysen

Zum Schneiden wurde der durchgefrorene Gewebeblock in die entsprechende Halterung des Mikrotoms eingespannt. Auf ein vorsichtiges Anschneiden war zu achten, um den Verlust von Gewebe durch zu tiefes Anschneiden zu verhindern. Beim Anschneiden wurde vorsichtig der Block in Richtung des Messers getrimmt, bis Paraffin durch das Messer angeschnitten wurde. Ein Block ist vollständig getrimmt, wenn dieser in seiner gesamten Ausdehnung angeschnitten ist. Nach dem Anschneiden wurden die gewünschten Schnitte, in einer Schnittdicke von 10 μm , hergestellt. Je nach Größe des abzukratzenden Tumorareals und der Menge an Restgewebe im Block, wurden in der Routinediagnostik durchschnittlich 3 bis 7 Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte gelegt, bis die Flüssigkeit zwischen Objektträger und Gewebe vollständig verdunstet war. Das Vorgehen beim Schneiden von Gewebe für die LMD-Analyse entsprach der Vorgehensweise der Routinediagnostik. Die Schnittdicke betrug 8 μm . Abweichungen der Schnittdicken im Abschnitt 3.2.1.1 sind explizit gekennzeichnet worden. Je nach Größe des abzukratzenden Tumorareals und der Menge an Restgewebe im Block sind durchschnittlich 4 bis 14 Schnitte hergestellt worden. Die Schnitte wurden auf spezielle Polyethylen-Naphthalat (PEN)- Membrane Slides oder PEN-Frame Slides gezogen.

2.10 HE-Handfärbung

Die für die Handfärbung verwendeten Alkohole und Färbelösungen wurden von der Firma VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen (Tab. 5). Die beschrifteten Mikrotomschnitte wurden zur Vorbereitung für die HE-Handfärbung auf eine Präparatetafel überführt und für 35 min in einem Wärmeschrank getrocknet. Die Schnitte wurden aus dem Wärmeschrank entnommen und in Färbegestelle mit Transversaldrahtbügel überführt. Die Färbegestelle sind entsprechend der Tab. 14.1 in eine absteigenden Alkoholreihe überführt worden. Die absteigende

Alkoholreihe diente dem Prozess der Entparaffinierung. Die anschließende Färbereihe bestand aus lipophilen Färbereagenzien. Die Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung in Aqua bidest (A. bidest) gelagert.

Tabelle 14.1: Arbeitsschritte zur Entparaffinierung der Objektträger. Die Tabelle enthält die verwendeten Reagenzien und die Dauer der jeweiligen Inkubationsschritte in Minuten [min].

Arbeitsschritte	Reagenz	Dauer [min]
1	Xylol	15
2	100 % EtOH	2
3	100 % EtOH	2
4	96 % EtOH	2
5	96 % EtOH	2
6	80 % EtOH	2
7	80 % EtOH	2
8	70 % EtOH	2
9	70 % EtOH	2
	→ A. bidest bis zur Weiterverarbeitung	

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte entsprechend der Tab. 14.2 gefärbt. Vor Färbebeginn wurde Hämalaun mit einem Filter abgefiltert und Eosin mit drei Tropfen 96 % Essigsäure versetzt. Die in Tab. 14.2 angegebene Dauer der Einzelschritte ist für die Qualität der Färbungen einzuhalten.

Tabelle 14.2: Arbeitsschritte zur HE-Färbung der Objektträger. Tabelle enthält die verwendeten Färbereagenzien und die Dauer der jeweiligen Färbeschritte in Minuten [min].

Arbeitsschritte	Reagenz	Dauer [min]
1	Hämalaun	5
2	HCl	schwenken
3	H ₂ O	5
4	Eosin	1
5	A. bidest	0,5
6	70 % EtOH	0,5
7	80 % EtOH	0,5
	→ Trocknen lassen	
	→ Lagerung bei RT	

Die an Arbeitsschritt 5 (A. bidest) anschließende Inkubation für je 30 s mit 70 % und 80 %igem EtOH diente einer Verkürzung der Trockenzeit der Schnitte und ist fakultativ durchführbar. Vor Weiterverwendung der gefärbten Schnitte sind die Schnitte zu trocknen. Bis zur weiteren Verwendung sind die getrockneten Schnitte in einer Präparatmappe bei Raumtemperatur (RT) zu lagern.

2.11 Gewebepräparation zur DNA-Isolierung

2.11.1 Gewebepräparation für die Routine-Analysen

Nach der Herstellung geeigneter Schnitte mithilfe des Mikrotoms (Abschnitt 2.9.2) wurden mithilfe eines Deckglases die zu untersuchenden Tumorareale abgekratzt und in das zuvor beschriftete Tube überführt und fest verschlossen. Als Referenz des zu kratzenden Areals wurde ein unter dem Mikroskop angezeichneter HE-Schnitt verwendet. Dabei sind die abgekratzten Schnitte und der Referenz-HE-Schnitt übereinanderzulegen und abzugleichen. Die beschrifteten und abgekratzten Schnitte wurden im Färbeautomat mit HE gefärbt, zur Überprüfung des abgekratzten Areals.

2.11.2 Gewebepräparation für die LMD-Analysen

Nach Herstellen geeigneter Schnitte durch das Mikrotom (Kapitel 2.9.2) wurden die Schnitte entsprechend Kapitel 2.10 HE gefärbt. Die getrockneten HE-Schnitte sind in eine Halterung des LMD-Mikroskops einzuspannen. Die Bedienung des Mikroskops entsprach der Bedienung anderer Mikroskope, so konnten bspw. verschiedene Vergrößerungsobjektive gewählt werden. Nach Wahl eines geeigneten Gewebeareals, konnten durch Hilfenahme eines digitalen Stiftes am Computerbildschirm die zu schneidenden Areale freihändig eingezeichnet werden. Alternativ ließen sich Schablonen entsprechender Größe vorfertigen. Nach vollständigem Einzeichnen der Areale wurden diese über einen Laser, welcher im Mikroskop integriert ist, geschnitten. Die geschnittenen Areale fielen entsprechend der Schwerkraft in ein Tube, welches sich eingespannt in eine Halterung unterhalb der Objektträgerebene befindet.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 DNA-Isolierung im Maxwell 16MDx

Für die Präparation von DNA zur Mutationsanalyse aus histologischen Schnitten der entsprechenden Gewebeproben, wurde ein Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit verwendet. Zur DNA-Isolierung wird laut Hersteller empfohlen ein bis zehn Schnitte von mindestens 5 µm Dicke abzukratzen. Die Durchführung der einzelnen Vorbehandlungen, sowie die Verwendung der einzelnen Lösungen, wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Eine Übersicht der einzelnen Reaktionskomponenten finden sich in Tab. 6.

Zur Vorbereitung des Maxwell 16 MDx wurden die Kartuschen, gemäß Anforderungen des Herstellers, gleichmäßig über dem Maxwell Probenrack verteilt. Beim Abziehen der Folien von den Kartuschen war darauf zu achten, dass keine Lösungen der einzelnen Reaktionskammern auf andere Reaktionskammern übergehen. Mit neuen Handschuhen wurde in jedes Well #8 ein Plunger positioniert. In die vorgesehenen Halterungen des Racks sind die Elutionstubes mit entsprechendem Volumen vorgelegt worden. Anschließend erfolgte die Probenvorbehandlung.

2.12.1.1 Probenvorbereitung erster Tag

Die abgekratzten DNA-Proben der Routineuntersuchungen (Kap. 2.11.1) oder der LMD-Analysen (Kap. 2.11.2) wurden mit den in Tab. 6 aufgeführten Reagenzien als Reaktionsansatz pipettiert (Tab. 15). Nach Zugabe eines neuen Reagenzes in das Reaktionsgefäß wurde gevortext, um eine Durchmischung der Komponenten sicherzustellen. Die Reaktionsansätze der einzelnen Proben sind über Nacht, für mindestens 12 h auf einem bereits vorgeheizten Schüttelinkubator bei 750 rpm, bei 70°C inkubiert worden.

Zum Ansetzen einer neuen Proteinase K-Lösung wurden 500 µl Nuklease-freies H₂O hinzugefügt, gevortext und bei -20°C gelagert.

Tabelle 15: Probenvorbereitung erster Tag für die DNA-Isolierung.

Reaktionskomponenten	Menge [µl]
Abgekratzte DNA-Proben	
Inkubationspuffer	180
Proteinase K	20
→ ü.N. bei 70°C im Schüttelinkubator	

2.12.1.2 Probenvorbereitung zweiter Tag

Am folgenden Morgen sind die Reaktionsansätze aus dem Schüttelinkubator zu entnehmen und mit 500 µl Lysepuffer des FFPE Tissue LEV-Kit aufzufüllen, zu vortexen und bei 12000rpm für 30 s abzuzentrifugieren. Dieser Schritt dient dem Aufplatzen der durch die Proteinase K angehaften Zellen. Das entstandene Gesamtvolumen von 700 µl (Tab. 16) wurde durch eine Pipette aufgenommen und in das entsprechende Well #1 der dazugehörigen Kartusche überführt. Eventuell vorhandene Paraffinreste durften nicht aufgenommen werden. Das entsprechende Laufprotokoll der FFPE-Proben zur Isolierung von DNA aus Zellen entspricht ca. 30 min.

Tabelle 16: Probenvorbehandlung zweiter Tag für die DNA-Isolierung.

Reaktionskomponenten	Menge [μ l]
Reaktionskomponenten erster Tag	200
Lysepuffer	500
→ Gesamtvolumen in Well # 1 der Kartusche	

2.12.1.3 DNA-Isolation im Maxwell

Nach Beendigung des FFPE/Cell-Programm wurde die DNA in ein Elutionstube, in das bei Routine-Proben 75 μ l und bei LMD-Proben 65 μ l Elutionspuffer vorgelegt wurde, überführt. Da das Probenrack während der Isolierung auf hohe Temperaturen aufheizt, war nach Beendigung des Programms ein sofortiger Verschluss und Entnahme der Elutionstubes angezeigt. Die Elutionslösung wurde für 2 min zentrifugiert und anschließend bei Routine-Proben in ein beschriftetes SafeLock- Tube überführt. Bei LMD-Proben wurden 1,5 ml Low-Bind Tubes verwendet, da diese eine Wechselwirkung und dadurch verursachte Bindung der DNA an die Gefäßwände verhindern. Die Lagerung der Isolierten DNA bis zur Verwendung erfolgte bei 4°C.

2.12.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Messung der isolierten DNA zur Mutationsanalyse, wurde das Qubit™ dsDNA HS Assay Kit verwendet. Der quantifizierbare Bereich des Assay Kit liegt zwischen 0,2–100 ng bei einer DNA-Konzentration von 10 pg/ μ l bis 100 ng/ μ l. Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte, sowie die Lagerung der einzelnen Lösungen, sind gemäß Herstellerangaben durchgeführt worden. Entsprechende Abweichungen sind gekennzeichnet. Eine Übersicht der einzelnen Reaktionskomponenten und dessen Pipettierschema finden sich in Tab. 17.

Die isolierte DNA und die Standardlösungen wurden nach Lagerung bei 4°C auf Raumtemperatur gebracht, gevortext und anschließend zentrifugiert (12000 rpm, 30 s min). Die in Tab. 17 beschriebene Arbeitslösung ist entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben herzustellen und in entsprechende Qubit-Tubes zu pipettieren. Gleichsinnig wurde für die Herstellung der Standardlösungen #1 und #2

verfahren. Die Proben wurden nach Zugabe von 1 µl isolierter DNA zu 199 µl Arbeitslösung für 5 min lichtgeschützt inkubiert. Gemäß den Anweisungen des Gerätes sind zuerst die beiden Standardlösungen #1 und #2 gemessen worden, zur Erstellung einer Kalibriergeraden. Im Anschluss an die Kalibrierung wurden die Proben gemessen. Die durch das Fluorometer ermittelten QF-Werte, gemessen in ng, wurden für jede einzelne Probe im Isolierungsprotokoll vermerkt. Zur Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Proben in [ng/µl] sind die gemessenen QF-Werte in eine Formel eingesetzt worden:

$$\left[\frac{ng}{\mu l} \right] = QF - Wert (ng) * \left[\frac{\frac{200}{x}}{1000} \right]$$

Dabei entspricht x dem Probevolumen isolierter DNA (µl), welches in den Test eingesetzt wurde. Bei einer Menge von einem µl isolierter DNA ergaben sich in der Formel:

$$\left[\frac{ng}{\mu l} \right] = QF - \frac{Wert(ng)}{5\mu l}.$$

Die ermittelten DNA-Konzentrationen in [ng/µl] sind auf den Etiketten der SafeLock-Tubes bzw. LowBinding-Tubes vermerkt worden. Bis zur weiteren Verarbeitung der isolierten DNA sind diese bei 4°C zu lagern.

Tabelle 17: Übersicht über das Pipettierschema der DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. In der Tabelle sind die entsprechenden Mengen in μl der einzelnen verwendeten Reaktionskomponenten angegeben, zur Herstellung von Arbeitslösung, Standard # 1 und Standard #2.

	Reaktionskomponente	Menge [μl]
Arbeitslösung	Qubit® dsDNA HS Buffer	199
	Qubit® dsDNA HS Reagent	1
	→ aus der hergestellten Arbeitslösung werden Probenlösung, Standard #1 und #2 hergestellt	
Probe	Arbeitslösung	199
	Probe	1
	→ 200 μl entsprechen einer Probe	
Standard # 1	Arbeitslösung	190
	Standard # 1	10
	→ 200 μl entsprechen Standard #1	
Standard # 2	Arbeitslösung	190
	Standard #2	10
	→ 200 μl entsprechen Standard # 2	

2.12.3 PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung

Für die PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung sind die kommerziell erhältlichen Kits *therascreen* KRAS Pyro Kit, *therascreen* RAS Extension Pyro Kit und *therascreen* BRAF Pyro Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) verwendet worden. Die einzelnen Genabschnitte mit den verwendeten Primerpaaren für die PCR-Analyse und Pyrosequenzierung sind der Tab. 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Darstellung der verwendeten PCR-Primer und SEQ-Primer von Qiagen (Hilden, Deutschland). Die einzelnen Primer Kits wurden zur besseren Übersicht verschiedenen Farben zugeordnet. Blau: *KRAS*, grün: *RAS-Extension* und rot: *BRAF*

	KRAS Kit	RAS-Extension Kit	BRAF Kit
PCR- Primer und SEQ-Primer	<i>KRAS</i> 12/13 <i>KRAS</i> 61	<i>KRAS</i> 59 <i>KRAS</i> 117 <i>KRAS</i> 146 <i>NRAS</i> 12/13 <i>NRAS</i> 61 <i>NRAS</i> 59 <i>NRAS</i> 117 <i>NRAS</i> 146	<i>BRAF</i> 464 <i>BRAF</i> 600

2.12.3.1 PCR-Amplifikation

Die Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes erfolgte in einem Prä-PCR-Arbeitsraum. Die für die PCR-Analyse benötigten Reagenzien (Tab. 6) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, wobei die Reaktionslösungen unter der DNA-freien Werkbank und DNA-haltige Proben und DNA-Lösungen unter der DNA-Werkbank gelagert wurden. Die in der Tabelle 19.1, linke Seite der Tabelle beschriebene Menge an Reaktionslösung entspricht dem Mastermix für eine Probe eines Primerpaars. Unter der DNA-freien Werkbank wurden aus den entsprechenden Berechnungen des Reaktionsansatzes, anhand des Pipettierschemas die Mastermixe (siehe Tabelle 19.1, rechte Seite der Tabelle) erstellt. Für die **No Template Kontrolle** (ntc) wurden 5 µl ddH₂O verwendet. Die humane Kontroll-DANN (humKtr) entsprach der Positivkontrolle und die ntc der Negativkontrolle. Die

hergestellten Mastermixe wurden unter der DNA-freien Werkbank entsprechend des vorgefertigten Protokolls in die entsprechenden 24-Well Platten vorgelegt.

Tabelle 19.1: Anleitung zur Herstellung eines Reaktionsansatzes und des sich daraus ableitenden Mastermixes. Die Volumina der verwendeten Reagenzien sind in Mikroliter (μl) angegeben. n entspricht der Anzahl der Proben, die im Mastermix enthalten sind.

		Reagenzien	Volumen [μl]		
Reaktionsansatz		PyroMark MasterMix (2x)	12,5	Mastermix	n Proben
		CoralLoad (10x)	2,5		$12,5 \mu\text{l} * n + 1$
		Primer	1,0		$2,5 \mu\text{l} * n + 1$
		ddH ₂ O	4,0		$1,0 \mu\text{l} * n + 1$
→ Reaktionsansatz 20,0 μl : entspricht einem Well für ein Primer				→ Reaktionsansatz auf n Proben ergibt Mastermix eines Primerpaars	

Gemäß der Herstellerangaben wurde für jede Probe eine Verdünnung mit ddH₂O angesetzt, sodass sich in jeder Probe, wenn möglich, eine DNA-Konzentration von 10 ng in 5 μl befand. Dementsprechend wurden die hergestellten Proben (10 ng/5 μl) und die Kontrollen (humKtr und ntc) in die entsprechenden Wells zum vorgelegten Mastermix (20 μl) hinzupipettiert (Tab. 19.2). Konnte eine DNA-Menge von 10 ng/5 μl aufgrund der geringen DNA-Konzentration der Probe nicht erreicht werden, wurden 5 μl der entsprechenden Probe unverdünnt eingesetzt. Damit ergab sich ein PCR-Reaktionsvolumen von 25 μl . Die Wells wurden mit Flat PCR Stripes verschlossen.

Tabelle 19.2: Pipettierschema PCR-Ansatz für die Routinediagnostik

		Reagenz	Volumen [μl]
PCR-Ansatz		Mastermix (bereits pipettiert)	20,0
		DNA-Probe (10 ng) / humKtr / ntc / LMD-DNA-Probe (unverdünnt)	5,0
→ Gesamtansatz 25,0 μl			

Zur Weiterverarbeitung der verschlossenen PCR-Platten wurden diese für 2 min bei 12000 rpm bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten in den PCR-Cycler überführt und entsprechend dem PCR-Protokoll der Tabelle 19.3 amplifiziert. Der Amplifikation anschließend wurden die Platten erneut für 2 min bei 12000 rpm bei RT zentrifugiert. Die Weiterverarbeitung der Platten erfolgt entweder unverzüglich oder zu einem späteren Zeitpunkt. Bei einer verzögerten Weiterverarbeitung wurden diese bei -20°C eingefroren.

Tabelle 19.3: PCR Thermocycler Programm für Routinediagnostik mit 42 Zyklen.

Phasen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Vordenaturierung/Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase	95	15:00	1x
Denaturierung	95	0:20	} 42x
Annealing	52	0:30	
Elongation	72	0:20	
Endelongation	72	5:00	1x
Ruhemodus bis zur Weiterverarbeitung	15	∞	

Bei den LMD-Analysen entsprach die Herstellung und die Volumina der Reaktionsansätze- und der Mastermix-Lösungen der Routinediagnostik und sind der Tabelle 19.1 zu entnehmen. Bei der LMD-Diagnostik wurde mit unbekanntem DNA-Konzentrationen gearbeitet. Dies war der Grund weshalb die DNA-Proben nicht mit H₂O verdünnt und in voller Konzentration von je 5 µl Volumen in die Kavität der PCR-Platten pipettiert wurde (Tab. 19.2). Die humane Kontroll-DNA wurde mit ddH₂O verdünnt. Hierfür wurde einmalig eine Stammlösung der humKtr hergestellt, die einer Konzentration von 0,1 ng/5 µl entsprach. Diese Stammlösung wurden für jede in dieser Arbeit hergestellte PCR verwendet. Nach pipettieren des PCR-Ansatzes, durch Hinzufügen der Proben-DNA, der humKtr und der ntc, wurden die Kavitäten durch Flat PCR Stripes verschlossen. Das nachfolgende Procedere entsprach demjenigen der Routinediagnostik.

2.12.4 Pyrosequenzierung

2.12.4.1 Erstellen eines Pyrosequenzierungssetup-Protokoll

Das Erstellen eines Pyrosequenzierungssetup-Protokoll erfolgte über die Verwendung der Software PyroMark Q24 Software Version 2.0.8 von Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland). Dabei konnte im Programm entsprechend einer 24-Well Anordnung ein Sequenzierungsschema erstellt werden, bei dem den verschiedenen Proben eine zu untersuchende Mutationssequenz zugeordnet werden konnte. Entsprechend der Länge der zu analysierenden Sequenzen und der Anzahl der pro Sequenzierungslauf zu analysierenden Proben, berechnete die Software das für die Kartusche benötigte Volumen an Reagenzien (Enzym-Mix, Substrat-Mix und 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphaten). Das erstellte Setup-Protokoll wurde zusätzlich zur Speicherung auf dem Desktop des Laptops, auf einem USB-Stick abgespeichert. Mittels USB-Stick erfolgte die Transferierung des Protokolls auf das Pyrosequenzierungsgerät.

2.12.4.1 Herstellen eines Bindemix

Zu Beginn wurden die verwendeten Reagenzien des Kits (Waschpuffer, Annealing- und Bindepuffer, SEQ Primer, Streptavidin-Sepharose) auf RT gebracht (Tab. 20, linke Tabellenseite). Der konzentrierte PyroMark Waschpuffer musste mit 225ml ddH₂O auf eine einfache Konzentration verdünnt werden. Die Bindepuffer-Mixe wurden entsprechend der Herstellerangaben hergestellt (siehe Tab. 20, rechte Tabellenseite). Es war darauf zu achten, dass die Streptavidin-Sepharose (GE Healthcare) gut aufgeschüttelt wurde, bis sich alle Partikel in Lösung befanden. Auf ein erneutes Aufschütteln der hergestellten Bindemixe vor dem Pipettierschritt der Reaktionslösungen war zu achten, da sich die enthaltenen Beads der Sepharose bei Standzeit erneut am Boden des Tubes absetzten. In jede Kavität der 24-Well-Platte sind je 70 µl entsprechend dem Sequenzierungs-Setup vorgelegt und in die entsprechende Position der Workstation transferiert worden.

Tabelle 20: Anleitung zur Herstellung einer Reaktionslösung. Diese wird entsprechend der Anzahl (n) an DNA-Proben für die Berechnung des Volumens an Bindemix verwendet.

	Reagenzien	Volumen [µl]		n Proben
Reaktionslösung	Streptavidin-Sepharose	1,0	→	$1,0 \mu\text{l} * n + 1$
	ddH ₂ O	29,0		$29,0 \mu\text{l} * n + 1$
	Bindepuffer	40,0		$40,0 \mu\text{l} * n + 1$
→ Reaktionslösung 70,0 µl: entspricht einer Kavität für ein Primer			→ Reaktionslösung auf n Proben ergibt Bindemix	

2.12.4.1 Probenvorbereitung der Pyrosequenzierung für Routineproben

In die vorgelegten 70 µl Bindemix wurden je 10 µl der PCR-Produkte der Routineversuchsansätze in die entsprechenden Kavitäten der 24-Well-Platte pipettiert, wodurch sich ein SEQ-Gesamtansatz von 80 µl ergab (Tab. 21.1). Die 24-Well-Platte wurde anschließend mit Alufolie verschlossen und auf dem Schüttler bei RT für 5 min bei 1300 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde optisch die homogene Durchmischung der Proben kontrolliert und vorsichtig die Alufolie entfernt. Entsprechend der korrekten Ausrichtung wurde die Platte an die Startposition der Workstation positioniert.

Tabelle 21.1: Pipettierschema zur Herstellung eines Bindemix-DNA-Ansatzes für die Routineuntersuchung/LMD-Analyse. Der SEQ-Ansatz ergibt ein Gesamtvolumen von 80 µl, bei Einsatz von 10 µl DNA-Probe in den Routineanalysen und 90 µl, bei Einsatz von 20 µl DNA-Probe in den LMD-Analysen. Die verwendeten Volumina sind in Mikroliter (µl) angegeben.

	Reagenz	Volumen [µl]
SEQ Ansatz	Bindemix (bereits pipettiert)	70,0
	PCR-Probe (bekannter Konzentration)	10,0
	PCR-Robe (unbekannte Konzentration)	20,0
→ Gesamtansatz 80,0 / 90,0 µl		

Zur Herstellung des Annealing-Mixes wurden entsprechend der Anzahl der Proben pro SEQ Primer aus einer vorgefertigten Reaktionslösung der Annealing-Mix hergestellt (Tab. 21.2) und je 25 μl unter Einhaltung des Schemas des Sequenzierungs-Setups in die entsprechenden Wells der PyroMark Q24 Sequenzierplatte pipettiert und in die Elutionspositionen der Workstation positioniert.

Tabelle 21.2: Anleitung zur Herstellung eines Annealingansatzes und der daraus resultierenden Annealingmastermixe. Diese wird entsprechend der Anzahl an DNA-Proben (n) für die Berechnung des Volumens (μl) an Annealing-Mix verwendet.

	Reagenzien	Volumen [μl]		n Proben
Reaktionslösung	SEQ Primer	0,8	➔	$0,8 \mu\text{l} * n + 0,5$
	Annealing Puffer	24,2		$24,2 \mu\text{l} * n + 0,5$
➔ Reaktionslösung 25,0 μl : entspricht SEQ Primer für eine Probe			➔ Reaktionslösung auf n Proben ergibt Annealing- Mix der SEQ Primer für alle Proben	

2.12.4.3 Ablauf an der Workstation für die Pyrosequenzierung

In der Startposition der Workstation wurde unter Sichtkontrolle, durch Hilfenahme einer Vakuumpumpe, die gesamten „DNA/Bindemix-Proben“ aufgenommen. Der Kopf der Vakuumpumpe, welcher die DNA-Proben enthielt, wurde in EtOH überführt. Das EtOH wurde bis zur Mittelkante der Wanne abgesaugt. Anschließend wurde der Vakuumkopf in die Denaturierungssolution überführt und bis knapp über der Mittelkante abgesaugt. Als letzter Schritt war der Vakuumkopf in eine Wanne mit Waschpuffer zu überführen. Der gesamte Inhalt der Waschlösung wurde als Waschschrift komplett aufgenommen. Um ein Verschleppen von Flüssigkeiten zu verhindern, wurde nach Abschluss der einzelnen Schritte der Vakuumkopf und sein Schlauchsystem senkrecht ausgestrichen, bis sich keine Flüssigkeit mehr im Vakuumsystem befand. Zum Herauslösen der gereinigten und denaturierten DNA aus dem Vakuumsystem wurde der Vakuum-Kopf über der Sequenzierplatte, welches den SEQ-Primer-Annealing-Mix enthielt, ausgerichtet und der Schalter für

den Unterdruck ausgestellt. Durch Abstellen des Unterdrucks fiel die DNA aus den Filterspitzen der Vakuumpumpe in die darunterliegende Sequenzierungsplatte. Durch Eintauchen der Filterspitze in den Annealingpuffer und leichtes Schütteln für 20 bis 30 s sind eventuell im Filterkopf verbliebene DNA-Reste abgelöst worden. Die Sequenzierungsplatte mit der gelösten DNA wurde auf einen Plattenhalter überführt und für 2 min bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte inklusive Halter vom Heizblock genommen und erneut für weitere 2 min bei RT inkubiert. Als letzten Inkubationsschritt wurde die Sequenzierungsplatte in das Gerät eingespannt und für 15 min bei RT inkubiert.

2.12.4.4 Präparation der Kartusche für die Pyrosequenzierung

Zeitgleich zum letzten Inkubationsschritt der Sequenzierungsplatte wurde die Kartusche für die Pyrosequenzierung vorbereitet. Dazu wurden die aus dem Setup-Protokoll des Kapitel 2.12.4.1 errechneten Werte an benötigtem Enzym, Substrat und dNTP entsprechend der Nukleotide Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin (Qiagen, Hilden, Deutschland) benötigt. Zum Anlösen einer neuen Enzym- oder Substratlösung, wurden je 620 µl ddH₂O zugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die entsprechenden Mengen wurden in die vorgegebenen Kavitäten der Kartusche pipettiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Kartuschen auf den Boden, wurden potenzielle Luftblasen entfernt. Die Kartusche wurde gemäß Herstellerangaben in das Gerät eingespannt. Die Abdeckung des Pyrosequenzierungsgeräts wurde geschlossen und das Programm gestartet.

2.12.4.4 Auswertung der Pyrosequenzierungs-Datei

Durch Verwendung eines USB-Sticks wurden nach Beendigung des Sequenzierungsprogramms die abgespeicherten Dateien auf den Pyro-Laptop transferiert und als Ergebnis-Datei auf dem Desktop abgespeichert. Die Auswertung der Ergebnis-Datei erfolgte über die Software PyroMark Q24 Software Version 2.0.8., über Pyro® Plug-ins für die verschiedenen *therascreen* Pyro Kits. Diese konnten über den Download von www.qiagen.com erhalten werden. Je nach zu

analysierender Mutationssequenz wurden die entsprechenden Plug-ins (KRAS Pyro Plug-in v.1.3.0, RAS Extension Pyro Plug-in v.1.3.0 oder BRAF Pyro Plug-in v.1.3.0) verwendet. Über die Plug-in Programme erfolgt die Auswertung der Proben anhand ihrer Signal-Peaks. Die Auswertung der einzelnen Peaks erfolgte anhand der zu erwarteten wt-Nukleinsäureabfolge des entsprechenden Codons. Ob und ab welcher detektierten Signalstärke eine Punktmutation als Mutation oder potenzielle low-level Mutation (PLLM) gewertet wurde, ist durch den Hersteller des Kits definiert und kann aus dem entsprechenden Handbuch von Qiagen entnommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Routineuntersuchungen

Die Signalwege der RAS-Proteine und ihrer Interaktionspartner sowie die Auswirkungen der Mutationen der kodierenden *RAS*-Gene sind bereits gut erforscht. Die Erfassung von patientenspezifischen *RAS*-Mutationen bei Tumorerkrankungen respektive dem kolorektalen Karzinom (CRC) spielt für die Therapieentscheidung eine wesentliche Rolle. Daher werden alle neu erfassten Tumore einer molekularpathologischen Untersuchung auf *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* unterzogen. Im Großteil aller durchgeführten Analysen lassen sich entweder keine Mutationen, also wildtypische Gensequenzen, oder homogen im Tumorgewebe verteilte *RAS/RAF*-Mutationen nachweisen. Allerdings zeigt sich bei einem sehr kleinen Anteil von Tumoranalysen des kolorektalen Karzinoms eine inhomogene Mutationspenetranz oder heterogene *RAS*-Mutationsmuster (Kosmidou et al. 2014; Siegel et al. 2020; Jeantet et al. 2016; Deshwar et al. 2018; Canavan et al. 2006; Lim u. Lim 2018b). Um eine derartige Heterogenität des kolorektalen Karzinoms zu identifizieren, wurden die Gewebematerialien von sechs verschiedenen Patienten, die bereits einer Mutationsanalyse zugeführt wurden, erneut analysiert. Hierzu wurden nicht nur die bereits untersuchten Gewebelöcke erneut analysiert, sondern die Analysen um weitere Gewebelöcke des Tumors oder ihrer metastatischen Absiedelungen ergänzt. Dies ermöglichte eine erweiterte Kartierung des Mutationsprofils, sowohl durch Ausdehnung des untersuchten Tumoreals als auch eine interne Kontrolle der Routinediagnostik. Die Analysen umfassten die DNA-Isolierung aus angefertigten Paraffinschnitten, die DNA-Amplifizierung mittels Polymerasen-Kettenreaktion und eine finale Mutationssequenzanalyse auf *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* via Pyrosequenzierung. Dadurch wurden Punktmutationen innerhalb der verschiedenen Codons der *RAS*-Gene detektiert und mit einer Mutationsfrequenz beziffert. Die Mutationsfrequenz in Prozent errechnet sich über limit of detection (LOD). Die Nachweisgrenze LOD wird durch den Hersteller Qiagen über die Verwendung von Plasmid-Gemischen für jede einzelne Mutationssequenz in *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* bestimmt. Dabei ergeben sich wildtypische Sequenzen, wenn eine Mutationsfrequenz kleiner als die LOD gemessen wird. Potenzielle low-level-Mutationen (PLLM) sind definiert als Mutationsfrequenz gleich oder größer der LOD,

aber kleiner als LOD+3 Prozenteinheiten. Signifikante Major-Mutationen sind definiert durch Mutationsfrequenzen, die gleich oder größer einer LOD+3 Prozenteinheiten sind (Informationen des Herstellers Qiagen).

3.1.1 Routineergebnisse Fall 1

Für die Mutationsanalysen wurden bei Patientenfall 1 Gewebeproben aus drei verschiedenen Herkunftsregionen untersucht. Bei der Patientenummer 6487 handelt es sich um eine Rektumbiopsie mit tubulopapillären Tumorstrukturen eines Adenokarzinoms mit guter bis mäßiger Differenzierung (s. Kap. 2.1.1). Eine erneute Analyse des Gewebes wurde durchgeführt und mit der bereits bestehenden Routineanalyse abgeglichen. Die Patientenprobe mit der Fallnummer 6880 I entstammt einem operativ entfernten Resektat des C. sigmoideum und enthielt ein mäßig bis schlecht differenziertes, invasiv wachsendes Adenokarzinom. Es zeigte oberflächlich ein dominierendes pluriglanduläres Wachstumsmuster mit zur Tiefe hin dominierenden muzinösen Anteilen. Hier wurden vergleichend mit dem bereits im Routinelab untersuchten Block 6880 I 17 drei bisher noch nicht untersuchte Gewebeblöcke (I5, I6 und I8) untersucht. Die Patientenprobe 6407 wurde ausschließlich durch das Routinelabor untersucht und wird hier ergänzend erwähnt (Tab. 22: Probe 6407 grau unterlegt). Dabei handelte es sich um eine hepatische Stanzbiopsie mit tubulopapillären Tumorstrukturen, vereinbar mit einer metastatischen Absiedelung des in 6880 I beschriebenen kolorektalen Adenokarzinoms.

Tabelle 22: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfalls 1 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhS Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen (HLM) in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rote Schrift) oder PLLM (grüne Schrift) durch Pyrosequenzierung gemessen wurden. Proben, die nicht auf entsprechende Primerpaare untersucht wurden, sind in der Tabelle mit einem N/A (*not available*) gekennzeichnet.

Probe	KRAS					BRAF		NRAS					
	12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Fall 1	6407	Wt	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6487	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I5	8,9 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I6	40,5 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,9 A146T
													8,6 A146T
	6880 I7	46,5 G12R	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6880 I8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	

Aus den vorliegenden Routineanalysen war bekannt, dass sowohl für 6487 als auch für 6407 in allen untersuchten Mutationssequenzen (*KRAS*, *NRAS* und *BRAF*) eine wildtypische Sequenz vorlag (vgl. Tab. 22: 6407 und 6487 grau unterlegt). Eine erneute Analyse der Probe 6487 konnte, entsprechend der Voranalyse, keine *RAS*- (*KRAS* und *NRAS*) oder *BRAF*-Mutationen nachweisen. In der vorliegenden Routineuntersuchung zeigte sich für die Probe 6880 I7 eine Punktmutation im Codon 12/13 des *KRAS*-Gens (vgl. Kap. 8.2.), bei dem ein Aminosäureaustausch mit einer Mutationsfrequenz von 46,5 % im Codon 12 von Glycin zu Arginin (G12R) stattgefunden hatte (Tab. 22: 6880 I7 grau unterlegt). Durch eine erweiterte Untersuchung der Proben 6880 I5 und I6 konnte eine G12R-Mutation mit Mutationsfrequenzen von 8,9 % für 6880 I5 und 40,5 % für 6880 I6 festgestellt werden. Zusätzlich zur detektierten *KRAS*-Mutation, konnte im neu untersuchten Gewebblock 6880 I6, eine *NRAS*-Mutation festgestellt werden. Bei der *NRAS* A146T-Punktmutation handelte es sich um einen Aminosäureaustausch im *NRAS*-Gen der Stelle 146 von Alanin zu Threonin (vgl. Kap. 8.3.) mit einer Frequenz von 10,9 % (Tab. 22: 6880 I6). Im Wiederholungslauf der Analyse mit der gleichen DNA-Extraktion, wurde eine erneute A146T-Mutation mit einer Mutationsfrequenz von 8,6 % detektiert (Tab. 22: *NRAS* 146, 6880 I6). In allen anderen Gewebblöcken der Fallnummer 6880 und in den metastatischen Absiedelungen (6487 und 6407) war

diese Mutation nicht zu detektieren. Bei der zusätzlich untersuchten Fallnummer 6880 I8 konnte weder eine Mutation im *KRAS* 12/13-Genabschnitt noch im *NRAS* 146-Genabschnitt festgestellt werden und es zeigte sich in allen untersuchten Genabschnitten eine Wildtypsequenz.

3.1.2 Routineergebnisse Fall 2

Für die Mutationsanalysen wurden bei Patientenfall 2 Gewebeproben aus zwei verschiedenen Lokalisationen der Fallnummer 5518 (I1 und II1) untersucht. Bei der Patientenummer 5518 handelte es sich um ein Lungenteilresektat von Ober- (I1) und Unterlappen (II1) mit Nachweis eines Adenokarzinoms (s. Kap. 2.1.2). Die histologische Begutachtung war gut vereinbar mit einer metastasensuspekten Absiedelung eines bereits vortherapierten und operativ entfernten Coekumkarzinoms. Eine Analyse des Gewebes wurde durchgeführt und mit einer bereits bestehenden Routineanalyse 5518 I2 abgeglichen (Tab. 23: 5518 I2 grau unterlegt).

Tabelle 23: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 2 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhs Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rot) oder PLLM (grün) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde. Proben die nicht auf entsprechende Primerpaare untersucht wurden, sind in der Tabelle mit einem N/A (*not available*) gekennzeichnet.

	Probe	KRAS					BRAF		NRAS					
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Fall 2	5518 I1	Wt	Wt	Wt	Wt	71,1 A146V	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	5518 I2	Wt	Wt	Wt	Wt	73,7 A146V	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	5518 II1	Wt	Wt	Wt	Wt	69,8 A146V	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

Die durchgeführten Analysen der Proben 5518 I1 und II2 mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung der Genabschnitte für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* zeigten eine Mutation in *KRAS* Codon 146. Der Aminosäureaustausch A146V, von Alanin zu Valin (Tab. 23) zeigte Mutationsfrequenzen für 5518 I1 von 71,1 % und für II1 von 69,8 %. Der Vergleich mit dem bestehenden Routineergebnis der Probe 5518 I2 (Tab 23.: grau unterlegt) zeigte sowohl eine identische *NRAS*-Punktmutation

(A146V), als auch eine vergleichbare Mutationsfrequenz (73,7 %) (Tab. 23: 5518 I2 grau unterlegt). Alle anderen untersuchten Mutationssequenzen von Fall 2 zeigten Wildtypsequenz.

3.1.3 Routineergebnisse Fall 3

Für die Routineanalysen von Patientenfall 3 wurden Gewebeproben aus drei verschiedenen Arealen eines Tumorverbundes untersucht. Bei der Patientenummer 6978 II handelte es sich um ein linksseitiges Lungenoberlappenresektat mit drei nekrotisch eingeschmolzenen Metastasen mit vitalem Randsaum eines vorbekannten Adenokarzinoms des Kolons (s. Kap. 2.1.3). Der Tumor wurde mittels Chemotherapie und palliativer Resektion vortherapiert. Eine PCR und Pyrosequenzierungsanalyse der Gewebeproben 6978 II3, II5 und II8 wurde durchgeführt und mit einer bereits bestehenden Routineanalyse von 6978 II5 abgeglichen (Tab. 24: 6978 II5 grau unterlegt).

Tabelle 24: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 3 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhS Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rot) oder PLLM (grün) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde. Proben die nicht auf entsprechende Primerpaare untersucht wurden, sind in der Tabelle mit einem N/A (*not available*) gekennzeichnet.

	Probe	KRAS					BRAF		NRAS				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 3	6978 II3	15,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5	18,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		18,3 G12A	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6978 II8	20,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

Die Ergebnisse zeigten für alle drei Ansätze ein homogenes Bild einer *KRAS*-Punktmutation im Codon 12. Zusätzliche Untersuchungen weiterer Sequenzen von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* zeigten Wildtypsequenz. Bei der G12A-Mutation erfolgte ein Austausch der Aminosäure Glycin zu Alanin (vgl. Kap. 8.2). Dieses Ergebnis war übereinstimmend mit der vorausgegangenen Analyse, bei der eine identische Punktmutation im *KRAS* Codon 12 festgestellt werden konnte (Tab. 24: 6978 II5 grau unterlegt). In der neu angefertigten Analyse, wie auch in der bestehenden Analyse,

konnten identische Mutationsfrequenzen von 18,3 % und 18,5 % festgestellt werden (Tab. 24, *KRAS* Codon 12/13). Die Testung auf *KRAS* 61 und *BRAF* 600 zeigten in beiden Analysen von 6978 IIS Wildtypsequenzen. Somit konnte in allen Analysen zum Patientenfall 3 ausschließlich eine G12A-Punktmutation festgestellt werden.

3.1.4 Routineergebnisse Fall 4

Bei den Mutationsanalysen von Patientenfall 4 wurden Gewebeproben aus drei verschiedenen Lokalisationen untersucht (s. Kap. 2.1.4). Bei der Patientennummer 6703 1 handelte es sich um Fettgewebe des Omentum majus mit Durchsetzung eines Adenokarzinoms geringer Differenzierung (G3). Die Patientenprobe 6122 enthielt neun Biopsiepartikel des Colon ascendens mit infiltrativen Verbänden eines gering differenzierten Adenokarzinoms (G3). Die aufgearbeitete Fallnummer 6270 entstammte einem CT-gesteuerten Punktat. Die histologische Begutachtung zeigte einen Stanzzyylinder, welcher von einem mikropapillären und muzinösen Adenokarzinom (G3) durchsetzt war. Die Nummer 6122 stellte die einzige Probe dar, die durch das Routinelabor untersucht wurde (Tab. 25: 6122; grau unterlegt). Eine erneute Analyse des Gewebes wurde durchgeführt und mit der bereits bestehenden Routineanalyse abgeglichen. Für die Fallnummern 6703 1 und 6270 wurden neue PCR- und Pyrosequenzierungsanalysen durchgeführt.

Tabelle 25: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 4 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhs Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen (HLM) in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rot) oder PLLM (grün) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde.

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 4	6703 1	Wt	PLLM 6,1 Q61R	Wt	Wt	Wt	36,0 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
			PLLM 5,1 Q61R										
	6122	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	41,5 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	35,1 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6270	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	29,1 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

Die Zusammenschau der Pyrosequenzierungsergebnisse der Fallnummer 6122 zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bereits bestehenden Routineergebnisse (Tab 25: 6122 grau unterlegt). In beiden Fällen ließen sich eine Punktmutation des *BRAF*-Gens mit Mutationsfrequenzen von 35,1 % (Routine) und 41,5 % und mit einem Aminosäureaustausch von Valin zu Glutamin detektieren (Tab. 25: 6122). Alle anderen untersuchten *RAS*-Sequenzen zeigten ausschließlich Wt-Sequenz. Die identische V600E-Punktmutation ließ sich auch in den beiden anderen Fallnummern 6703 1 und 6270 des Patientenfalls 4 nachweisen. Die Mutationsfrequenzen für 6703 1 entsprachen 36,0 % und 29,1 % für 6270 (Tab. 25). In der Probe 6703 1 zeigte sich zusätzlich zur *BRAF*-Mutation eine PLLM für *KRAS* Q61R. Die Analyse der *KRAS* Codon 61-Mutation wurde insgesamt zweimal durchgeführt und zeigte in beiden Läufen eine PLLM von 6,1 % und 5,1 % für Q61R (Tab. 25: 6703 1 in grüner Schrift). Diese Mutation im *KRAS*-Gen Codon 61 führte zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Arginin.

3.1.5 Routineergebnisse Fall 5

Für die Routineanalysen von Patientenfall 5 wurde eine Gewebeprobe untersucht (s. Kap. 2.1.5). Bei der Patientennummer 6515 handelte es sich um insgesamt fünf Proben verschiedener Biopsien des Coecums, mit erfassten Anteilen eines mäßig bis hochdifferenzierten pluriglandulären und tubulopapillären Adenokarzinoms (G1-2). Eine PCR- und Pyrosequenzierungsanalyse des Gewebeblocks 6515 auf *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* wurde durchgeführt und mit einer bereits bestehenden Routineanalyse (Tab. 26: 6515 grau unterlegt) abgeglichen.

Tabelle 26: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 5 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhS Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rot) oder PLLM (grün) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde. Proben die nicht auf entsprechende Primerpaare untersucht wurden, sind in der Tabelle mit einem N/A (*not available*) gekennzeichnet.

	Probe	KRAS					BRAF		NRAS				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 5	6515	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	28,5 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	4,8 A146T
													8,8 A146T
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	25,9 V600E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

Die Zusammenschau der Pyrosequenzierungsergebnisse der Fallnummer 6122 zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bereits bestehenden Routineergebnisse. Es ließen sich in beiden Fällen eine Punktmutation des *BRAF*-Gens mit einem Aminosäureaustausch von Valin zu Glutamin (Codon 600) feststellen (vgl. Kap. 8.1). Bei den bestehenden Routineergebnissen konnte eine Mutationsfrequenz von 25,9 % in V600E und in den neu angefertigten Gewebepreparaten von 28,5 % festgestellt werden (Tab. 26). Bei der neu angefertigten Analyse zeigte sich zusätzlich eine Mutation im *NRAS*-Gen an der Stelle 146. Mit einer Mutationsfrequenz von 8,8 % konnte ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin beobachtet werden (vgl. Kap. 8.3). Die Wiederholung des Probe 6515 auf *NRAS* ergab eine PLLM von 4,8 % (Tab. 26: rote Schrift). Diese Mutation konnte in der bereits bestehenden Untersuchung des BwKrhs Ulm nicht nachgewiesen werden (vgl. Tab 26: bestehende Routine grau unterlegt und LMD-Vergleichsanalyse). Alle anderen untersuchten *RAS*-Sequenzen zeigen ausschließlich wildtypische Sequenzen, sowohl in der neu angefertigten als auch in der bereits bestehenden Analyse.

3.1.6 Routineergebnisse Fall 6

Für den letzten bearbeiteten Fall wurden vier verschiedene Gewebeproben analysiert (s. Kap. 2.1.5). Bei der Patientenummer 7919 handelte es sich um Befunde einer Coecum und Colon ascendens-Biopsie. Die Begutachtung zeigte ein pluriglandulär wachsendes Adenokarzinom, mit mäßiger bis höhergradiger Differenzierung (G1-2). Punktuell konnten zusätzlich zu den pluriglandulären Anteilen auch muzine Komponenten identifiziert werden. Die in der Tabelle 27 dargestellten Ergebnisse zur Fallnummer 7919 basierten ausschließlich auf Vorbefunde des BwKrhs und dienen der Vervollständigung des Patientenfalls. Zusätzlich wurden aus der Probennummer 8119 drei verschiedene Areale (III8, III26 und III41) untersucht (Tab. 27). Lediglich zu der Probennummer 8119 III8 existierten bereits Voranalysen. Bei der Probennummer 8119 handelte es sich um eine Hemikolektomie der rechten Seite. Die histologische Begutachtung ergab ein gering bis mäßig differenziertes Adenokarzinom mit sowohl pluriglandulärem als auch muzinösem Wachstumsmuster. Ein direkter Durchbruch der Serosa war zu erkennen.

Tabelle 27: Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 6 aus der diagnostischen Archivierung des BwKrhs Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün). Die grau unterlegten Ergebnisse in blauer Schrift stellen Mutationsanalysen dar, die bereits in der klinischen Routineuntersuchung des Bundeswehrkrankenhauses getestet wurden. Dargestellt sind getestete High-Level-Mutationen (HLM) in roter Schrift, potenzielle Low-Level-Mutationen (PLLM) in grüner Schrift und Wildtypsequenzen (Wt) in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] stellen die Mutationsfrequenzen dar, die für die jeweilige HLM (rot) oder PLLM (grün) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde. Proben die nicht auf entsprechende Primerpaare untersucht wurden, sind in der Tabelle mit einem N/A (*not available*) gekennzeichnet.

	Probe	KRAS					BRAF		NRAS				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 6	7919	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	33,4 V600E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	29,8 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	28,9 V600E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III26	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,4 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III41	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	6,7 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

Die Ergebnisse zeigten für alle drei Ansätze der Probennummer 8119 ein homogenes Bild einer *BRAF*-Punktmutation im Codon 600. Bei der detektierten V600E-Mutation erfolgte ein Austausch der ursprünglichen Aminosäure Valin zu Glutamin (vgl. Kap. 8.1). Dieses Ergebnis war übereinstimmend mit der vorausgegangenen Analyse der Patientennummer 8119 III8 (Tab. 27: 8119 III8 grau unterlegt), bei der eine identische Punktmutation V600E festgestellt werden konnte. Im Vergleich zwischen den neu angefertigten Analysen und den vorbestehenden Analysen im Rahmen der Routinediagnostik konnten fast identische Mutationsfrequenzen von 29,8 % (neue Analyse) und 28,9 % (Routine) festgestellt werden. Mit fortschreitender Aufarbeitung des Tumormaterials in Form von tieferen Schnittstufen (räumlich benachbarte Gewebeabschnitte im Tumor) zeigte sich eine Abnahme der Mutationsfrequenz von 10,4 % in 8119 III26 zu 6,7 % bei 8119 III41. Alle anderen untersuchten *RAS*-Sequenzen zeigten ausschließlich Wt-Sequenzen. In Zusammenschau zeigten Proben des Patientenfalls 6 homogene *BRAF*-Mutationen über alle Gewebeabschnitte hinweg.

3.1.7 Zusammenfassende und fallübergreifende Darstellung der Routineergebnisse Fall 1-6

Die fallübergreifende Darstellung der Routineergebnisse in Tabelle 28 zeigt alle diagnostizierten Mutationen der Patientenfälle 1-6. Eine erneute Sequenzierung der voranalysierten Gewebeblöcke und die Erweiterung der Fälle um neue Analysen von angrenzenden Gewebeblöcken zeigte sowohl homogene als auch heterogene Mutationsmuster. Einzelne ausführliche Ergebnisbeschreibungen sind den jeweiligen Kapiteln (Kapitel 3.1.1 bis 3.1.5) zu entnehmen. Patientenfall 2 und 3 zeigten jeweils ausschließlich eine einzelne homogene Hauptmutation (Fall 2: *BRAF* 600, Fall 3: *KRAS* 12/13). Die Fälle 1, 4, 5 und 6 zeigten neben einer HLM weitere PLLM (Fall 4) oder aber zusätzliche HLM (Fall 1, 5 und 6). Basierend auf den Vorversuchen wurden für die nachfolgenden Untersuchungen mit der LMD-PCR-Sequenzierungsmethode die Patientenfälle 1 und 3 ausgewählt.

Tabelle 28: Fallübergreifende Darstellung der Routineergebnisse aller analysierter Patientenfälle (Fall 1-6) aus der Archivierung des BwKrhs Ulm. Getestet wurde auf die Mutationen für *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS* (grün unterlegt). Grau unterlegt sind Vorergebnisse des BwKrhs. HLM in roter, PLLM in grüner und Wt-Sequenzen in schwarzer Schrift. Die dargestellten Zahlen in Prozent [%] sind Mutationsfrequenzen der jeweiligen HLM (rot) oder PLLM (grün). *N/A* (*not available*): Proben die nicht untersucht wurden. Rot markierte Fälle 1 und 3: für nachfolgende LMD-Untersuchungen auserwählt.

		<i>KRAS</i>				<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>					
		12/13	61	51	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 1	6407	Wt	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6487	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I5	8,9 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I6	40,5 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,9 A146T
	6880 I7	46,5 G12R	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6880 I8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 2	5518 I1	Wt	Wt	Wt	Wt	71,1 A146V	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	5518 I2	Wt	Wt	Wt	Wt	73,7 A146V	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	5518 II1	Wt	Wt	Wt	Wt	69,8 A146V	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 3	6978 II3	15,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5	18,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		18,3 G12A	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6978 II8	20,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 4	6703 1	Wt	PLLM 6,1 Q61R	Wt	Wt	Wt	36,0 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6122	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	41,5 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	35,1 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6270	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	29,1 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 5	6515	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	28,5 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	8,8 A146T
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	25,9 V600E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 6	7919	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	33,4 V600 E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	29,8 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	28,9 V600E	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III26	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,4 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	8119 III41	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	6,7 V600E	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

3.1.7.1 Fall 1

Der Patientenfall 1 (Abb. 4) bestand aus drei tumorhaltigen Gewebeproben unterschiedlichen Ursprungs: Primarius im Sigmaresektat (Probe 6880 I5-8), Rektumresektat (Probe 6487) und metastasensuspекtes Leberinfiltrat (Probe 6407). Die Analysen aus den Gewebeblöcken 6880 I5 - I7 zeigten eine HLM im *KRAS*-Gen Codon 12/13 mit Aminosäureaustausch Glycin zu Arginin (G12R). Der Gewebeblock 6880 I8 zeigte *Wt*-Sequenz. Analysen des Gewebeblocks 6487 ergaben in einer Doppelanalyse im Rahmen der Routinediagnostik und durch eine Analyse in der hier vorliegenden Arbeit in allen untersuchten Genabschnitten Wildtypsequenzen. Auch die metastasensuspекte Leberraumforderung zeigte *Wt*-Sequenz. Zusätzlich zu der detektierten *KRAS*-Mutation in der Probe 6880 I6 konnte eine *NRAS* 146 high-level-Mutation mit Aminosäureaustausch Alanin zu Threonin (A146T) detektiert werden. Somit handelte es sich möglicherweise beim Patientenfall 1 um ein molekular heterogenes kolorektales Karzinom, welches in anschließenden LMD-PCR-Sequenzierungsanalysen im Hinblick auf die räumliche Verteilung der unterschiedlichen Mutationen genauer untersucht werden sollte.

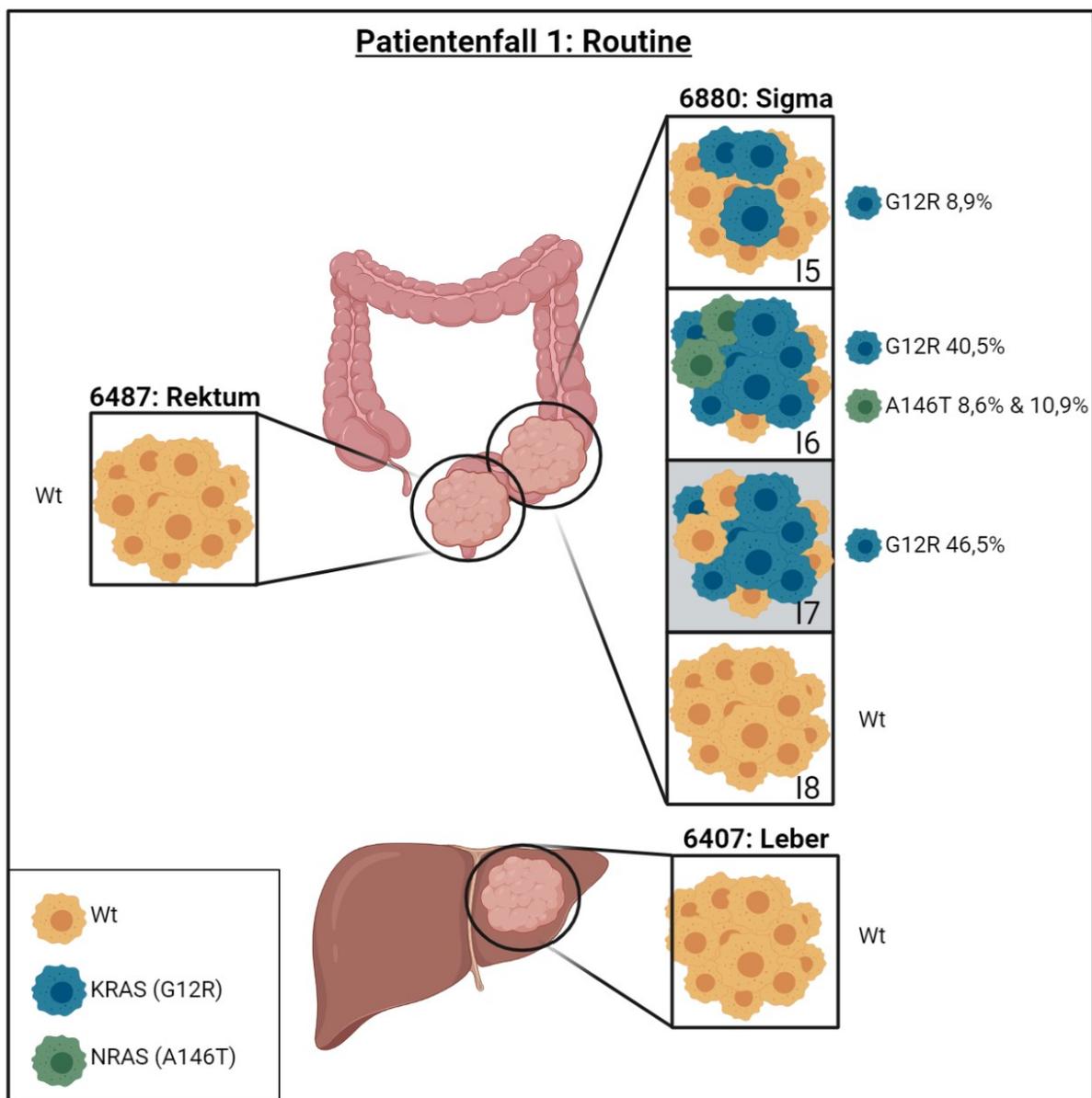


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfall 1.

Abgebildet sind die verschiedenen Lokalisationen der einzelnen Tumormanifestationen des Falls 1. 6487: Rektumbiopsie, 6880 I (5-8): Sigmaresektat, 6407 Leberstanzyylinder. Die verschiedenfarbigen Zellen (blau, grün, braun) stellen Tumorklone mit unterschiedlichem Mutationsprofil dar. *RAS*-Mutationen in *KRAS* in blau und in *NRAS* in grün dargestellt. Zellen mit wildtypischer Sequenz (*Wt*) ohne nachweisbare *RAS*-/*RAF*-Mutation in braun dargestellt. Mutationsfrequenzen in Prozent [%], die *NRAS*-Mutation der Probe I 6 wird in Doppelbestimmung analysiert Die Analyse von 6880 I 7 i.d.R. Routinediagnostik ist grau unterlegt und stellt 46,5 % dar. Created with BioRender.com.

3.1.7.2 Fall 3

Der Patientenfall 3 (Abb. 5) bestand aus unterschiedlichen Gewebearealen eines metastasierten Adenokarzinoms im Lungenoberlappen. Der Primarius entstammte aus einem Kolonkarzinom mit unbekanntem Mutationen. Dieses Kolonkarzinom wurde im Vorfeld neoadjuvant therapiert. In allen analysierten Gewebeproben zeigte sich eine homogene high-level-Mutation des *KRAS*-Gens (Codon 12/13) mit

Mutationsfrequenzen zwischen 15,5 % und 20,1 %. PLLM konnten nicht detektiert werden. Ein direkter Vergleich der Routineergebnisse (Abb. 5; Probe 6978 II5: grau unterlegt) mit neuen Analysen (Abb. 5; Probe 6978 II5) zeigte im *KRAS*-Codon 12/13 große Übereinstimmung in den detektierten Mutationsfrequenzen (vgl. Tab. 24 und 28; BwKrhs-Routine: 18,3 % und neue Analyse: 18,5 %). Beim Patientenfall 3 handelte es sich laut Routineanalysen somit um ein molekular homogenes, metastasiertes kolorektales Adenokarzinom, welches in anschließenden LMD-PCR-Sequenzierungsanalysen noch einmal in höherer räumlicher Auflösung auf eine mögliche molekulare Heterogenität untersucht werden sollte.

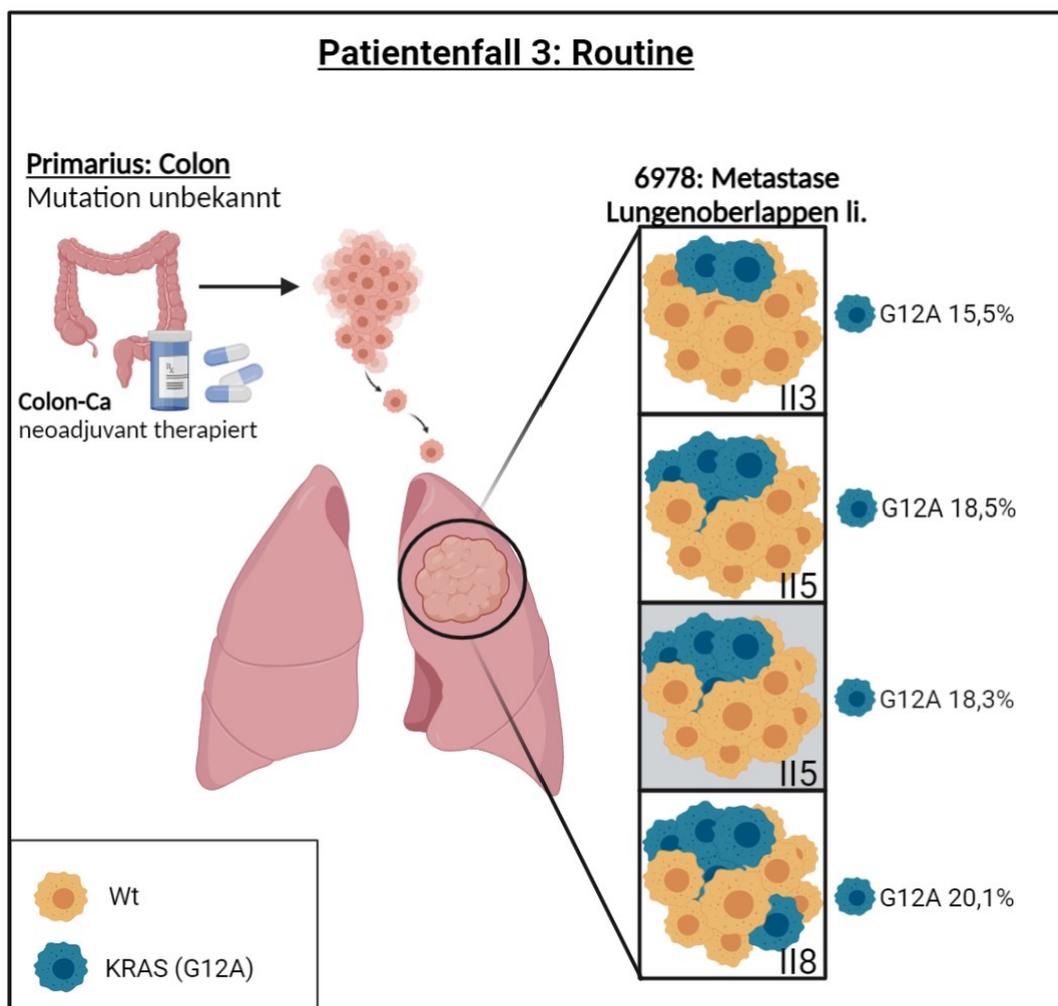


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Routineergebnisse des Patientenfalls 3.

Abgebildet ist die metastatische Absiedelung eines kolorektalen Karzinoms (neoadjuvant therapiert) im linken Lungenoberlappen (6978: II3-II8). Die verschiedenfarbigen Zellen (blau und braun) stellen Tumorklone mit unterschiedlichem Mutationsprofil dar. *RAS*-Mutationen in *KRAS* in blau dargestellt. Zellen mit wildtypischer Sequenz (*Wt*) ohne nachweisbare *RAS*/*RAF*-Mutation in braun dargestellt. Mutationsfrequenzen in Prozent [%], die *NRAS*-Mutation der Probe I6 wird in Doppelbestimmung analysiert Die Analyse von 6978 II5 i.d.R. Routinediagnostik ist grau unterlegt und stellt 18,3 % dar. Created with BioRender.com.

3.2 Etablierung der Lasermikrodissektion für Mutationsanalysen des kolorektalen Karzinoms

Die dargestellten Ergebnisse der Routineuntersuchungen (Kapitel 3.1) zeigten, dass bei einzelnen Proben zusätzlich zu den Major-Mutationen einzelne Minor-Nebenmutationen (bezogen auf die Mutationsfrequenz) nachweisbar waren. Diese traten nicht homogen in allen untersuchten Gewebelöcken eines Patienten auf, sondern zeigten sich meist beschränkt auf einen einzelnen Probenblock. In anderen Fällen waren initial vorhandene Major-Mutationen in anderen Tumorarealen nicht nachweisbar. Von einer sogenannten Tumorerogenität des kolorektalen Karzinom berichteten bereits andere Autoren (Lim und Lim 2018). Für derartige Konstellationen und die Durchführung von Untersuchungen bezüglich der Tumorerogenität eigneten sich die Routineuntersuchungen nur bedingt. Bei diesem Verfahren zur Analyse von Mutationen innerhalb des CRC wurden große Bereiche des zu untersuchenden Tumorareals als Ganzes untersucht und nicht in einzelne Abschnitte eines großen Tumors unterteilt. Die Methode der Lasermikrodissektion eröffnet die Möglichkeit, distinkte Bereiche eines Tumorareals getrennt voneinander und mit einer deutlich höheren Präzision der Auswahl der einzelnen Areale zu untersuchen. Man macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass man unter dem Mikroskop präzise bestimmte Bereiche auswählen und nachfolgend durch einen Laser ausschneiden kann. Dies ermöglicht eine Aufkonzentrierung von DNA in einzelnen Sequenzen. Zusätzlich können kleine Mutationsareale, die sich von den Major-Mutationen unterscheiden, aufgefunden und herausgearbeitet werden. Um die Methodik der Lasermikrodissektion für die Diagnostik nutzbar zu machen, wurden Untersuchungen zur Etablierung dieser Methodik durchgeführt (Kapitel 3.2.1ff).

3.2.1 Etablierung Gewebeparbeitung und Schnittherstellung

Die Herstellung und Etablierung optimaler Schnittpräparate für die Lasermikrodissektion stellte eine große Herausforderung dar. Einerseits war das Ziel möglichst dünne Schnittpräparate herzustellen, um die histologischen Eigenschaften der Gewebestrukturen besser darstellen zu können. Andererseits sollten die Schnitte nicht zu dünn angefertigt werden, da in dünneren Schnitten weniger DNA aus den einzelnen Bereichen gewonnen werden kann. Auch werden im LMD-Analyseverfahren, verglichen mit Routineanalysen, kleinere Bereiche eines

Tumorareals untersucht, um einzelne Subpopulationen im Tumorareal besser darstellen zu können. Jedoch besteht das Risiko, bei Verwendung kleinerer Areale, nicht genügend DNA für eine anschließende Pyrosequenzierung zu erhalten. Die Etablierung der optimalen Gewebeaufarbeitung für die LMD-Analysen ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

3.2.1.1 Versuche zur Schnittdicke

Um die geeignete Schnittdicke für die Untersuchungen mit dem LMD herauszufinden, wurden verschieden dicke Schnittpräparate einer Gewebeprobe des kolorektalen Karzinoms angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Diese wurden basierend auf ihren histologischen Merkmalen, respektive ihrer Gewebestrukturen, bewertet (Abb. 6).

Die Herstellung verschieden dicker Vergleichspräparate erfolgte an identischen Probenblöcken durch mehrfaches Abtragen verschieden dicker Gewebeschnitte. Die Färbung der Schnitte wurde äquivalent durch eine HE-Handfärbung durchgeführt. In der Abbildung 6 A-F sind die verschiedenen Aufnahmen dargestellt, die mit dem LMD-Mikroskop aufgenommenen wurden. Die Dicke der Schnitte wurde ausgehend von 4 μm (Abb. 6 A) bis 14 μm (Abb. 6 F) um jeweils 2 μm vergrößert. Es zeigte sich, dass die Darstellung der histologischen Strukturmerkmale stark abhängig von der Gewebedicke war. Je dünner die gewählte Schnitfführung, desto besser die Darstellung einzelner Strukturen im Gewebe. Besonders detailreiche Darstellungen einzelner Zellen eines Tumorzellverbandes ließen sich mit 4 und 6 μm erreichen. Mit zunehmender Schnittdicke waren einzelne Zellen und deren Zellkerne nur noch schwer zu identifizieren. Insbesondere ab einer Schnittdicke von 10 μm (Abb. 6 D) waren einzelne Zellen innerhalb des Tumorverbandes nicht mehr erkennbar. Das 8 μm dicke Präparat stellte die Grenze zwischen detailreicher Strukturmerkmale und nicht identifizierbarer Strukturen dar. Ob allerdings bei dünnen Gewebeschnitten, explizit 4, 6 und 8 μm , die gewonnenen DNA-Konzentration ausreichten, um diese als PCR-Insert zu verwenden, konnte hierbei nicht geklärt werden. Für die Klärung dieser Fragestellung als notwendige Bedingung für die Durchführung einer Polymerasen-Kettenreaktion und anschließender Mutationsanalyse sind weitere Versuche nötig. Anhand rein visuell- objektiver Kriterien der Schnittdicke für die Lasermikrodissektion, sollten ausschließlich Schnitte in einem Bereich zwischen 4

und maximal 8 μm verwendet werden. Je dünner die Schnitte, umso detailreicher die Darstellung der Tumorareale.

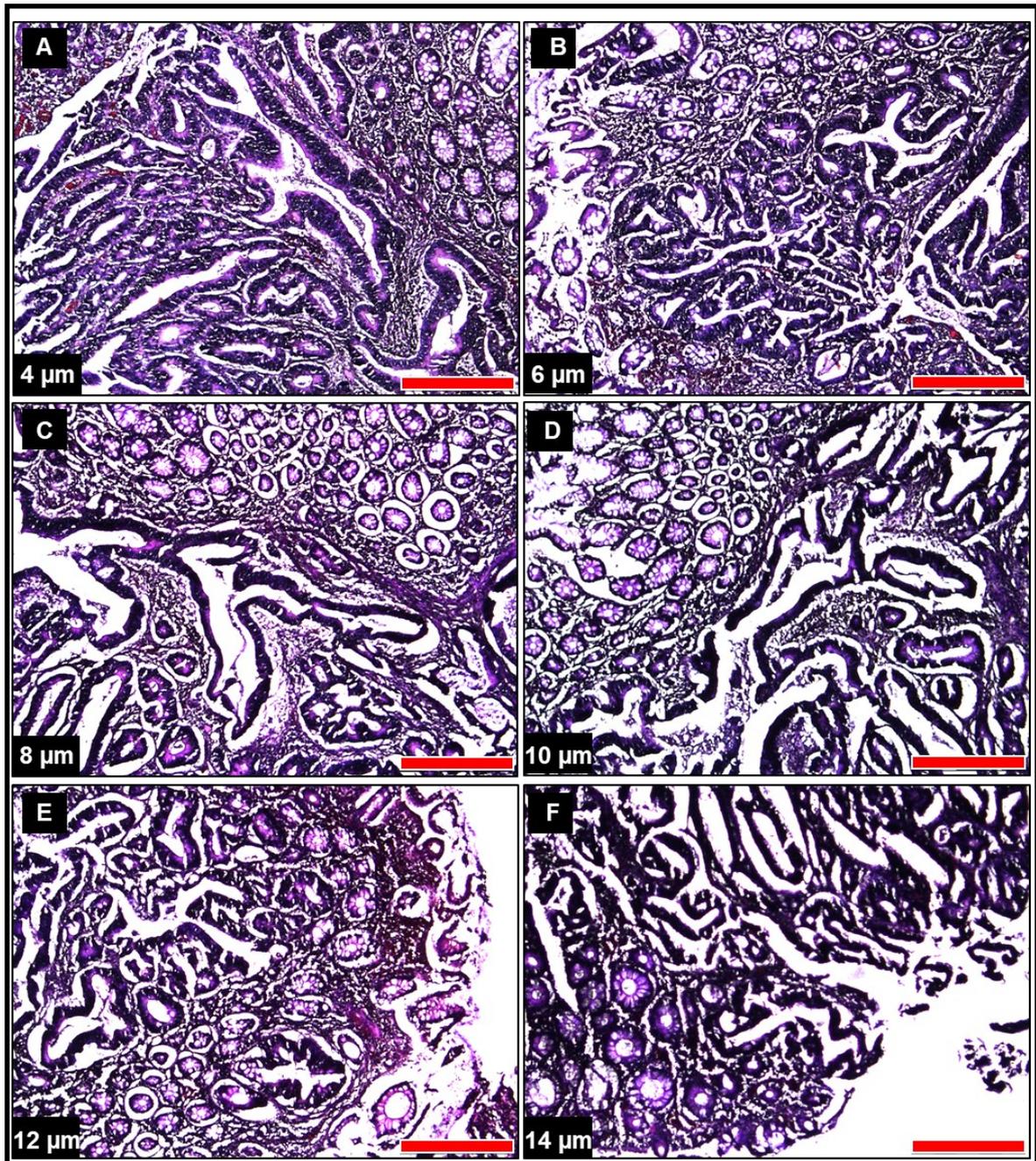


Abbildung 6: Mikroskopische Untersuchung der optischen Qualität von Gewebeschnitten im Lasermikrodissektions-Mikroskop (LMD) in Abhängigkeit von verschiedenen Schnittdicken der Gewebeslides. Dargestellt sind Aufnahmen von Gewebeschnitten des Patientenfalls 5899 7 (nicht Bestandteil der Mutationsanalysen), aus der Archivierung des BwKrhs Ulm. Unterschiedliche Gewebeschnittdicken von 4 μm (A), 6 μm (B), 8 μm (C), 10 μm (D), 12 μm (E) und 14 μm (F). Die Aufnahmen sind mittels LMD-Mikroskops und einem 10-fach Vergrößerungsobjektiv aufgenommen. Die Färbungen der Slides erfolgt mit Handfärbungen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Der Größenmaßstab der einzelnen Bilder entspricht 400 μm .

3.2.1.2 Versuche zur Gewebemenge

Für die Durchführbarkeit einer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR), als Bedingung für die Durchführung einer anschließenden Mutationsanalyse via Pyrosequenzierung, musste eine Mindestmenge an DNA in einem PCR-Reaktionsansatz erreicht werden. Zur Objektivierung der DNA-Konzentrationen wurden nach der DNA-Isolierung die DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. In diesem Versuchsteil wurde überprüft, wie hoch die DNA-Konzentrationen in den jeweiligen Schnittpräparaten der verschiedenen Dicken (4, 6, 8 und 10 μm) waren und ob diese für die erfolgreiche Durchführung einer PCR ausreichten. Dazu wurden über die Software des LMD-Mikroskops Viereck-Schablonen mit einer Länge und Breite von 350x350 μm und 700x700 μm generiert. Diese wurden für alle nachfolgenden Versuche verwendet (Abb. 7 A).

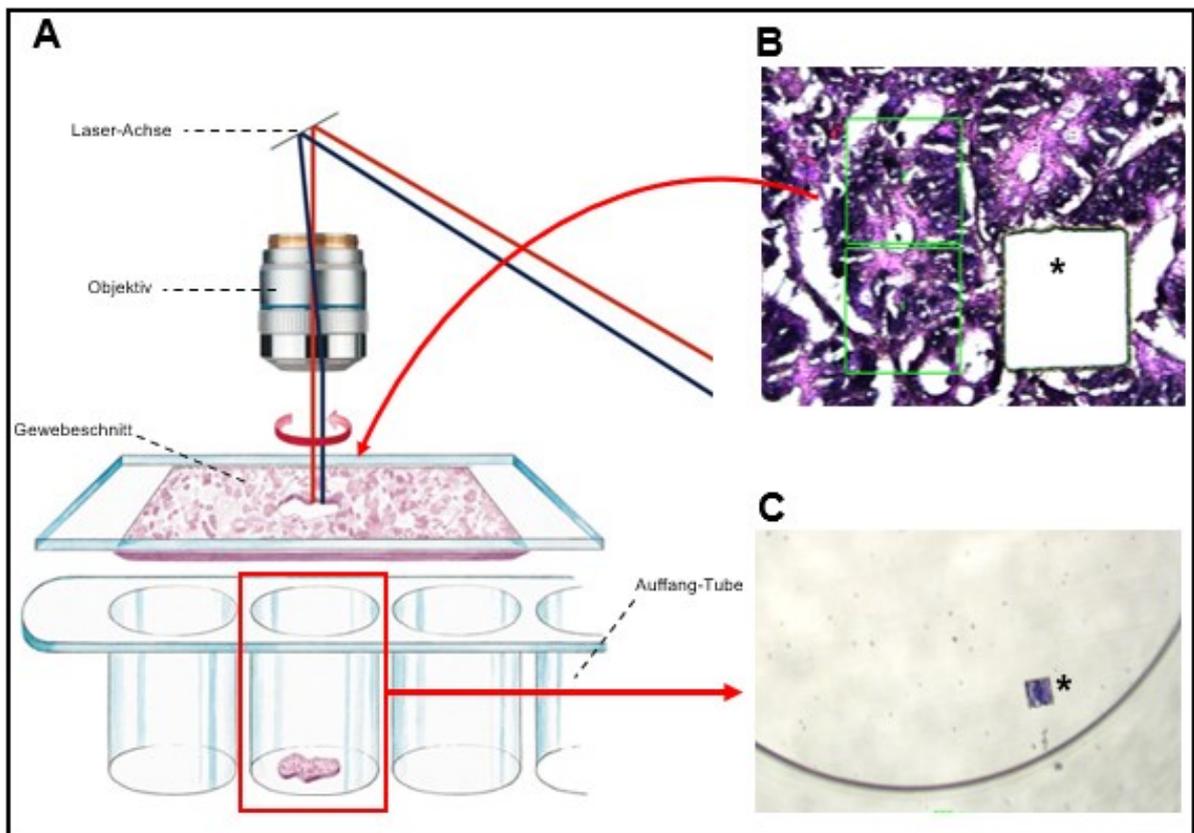


Abbildung 7: Darstellung des Versuchsaufbaus des Lasermikrodissektionsverfahrens (LMD). (A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Lasermikrodissektion. Der Laserstrahl des LMD kann anhand der beweglichen Achse einen variablen Bereich des Gewebepreparats ausschneiden, welches anschließend durch Schwerkraft in ein Kollektorbehältnis unterhalb des Gewebeschnitts fällt. (B) Mithilfe des LMD lassen sich verschieden große Bereiche einzeichnen (beispielhaft siehe grüne Umrandung), die anhand eines im Mikroskop installierten Lasers ausgeschnitten werden. (C) Darstellung des Auffangbehältnisses unter mikroskopischer Kontrolle. Der ausgeschnittene Bereich mit einem Stern (*) markiert (siehe (B)), fällt durch die Schwerkraft nach unten in ein Auffangbehältnis (C). Created with BioRender.com.

Die Generierung dieser Schablonen ermöglichte, dass in allen nachfolgenden Ansätzen eine exakt identische Menge an Gewebe verwendet wurde. Dabei wurden je nach Vorgabe die Schablonen 1-, 3-, 4-, 5- oder 6-mal hintereinander, innerhalb eines Tumoreals, ausgeschnitten. Dies ergab beispielsweise eine ausgeschnittene Gesamtfläche des Tumors für 1x (350x350 μm) von 122.500 μm^2 , bei 3x (350x350 μm) von 367.500 μm^2 , bei 4x (350x350 μm) von 490.000 μm^2 , bei 5x (350x350 μm) von 612.500 μm^2 und 6x (350x350 μm) von 735.000 μm^2 .

Aus den verschiedenen dicken Schnittpräparaten (4, 6, 8 und 10 μm) wurde ein vordefiniertes Gewebevolumen auf die enthaltene DNA-Konzentration untersucht (Abb. 8B-E). Dazu wurden die Flächen aus den Schablonen mithilfe der verwendeten Gewebedicken auf ein Volumen bezogen. Dies war beispielsweise für ein 4 μm dickes Schnittpräparat, bei einer Fläche von [1x (350x350 μm) \cong 122.500 μm^2] ein Volumen von 490.000 μm^3 . Zusätzlich wurde in den 10 μm dicken Schnitten eine Schablone von 700x700 μm verwendet, um einen noch größeren Bereich abzudecken. Dies ergab hier eine ausgeschnittene Gesamtfläche des Tumors für 1x (700x700 μm) von 490.000 μm^2 und entsprach der Fläche von 4x (350x350 μm). Bei einem 10 μm dicken Gewebeschnitt und einer Schablone von 2x (700x700 μm) ergab sich ein Volumen von 980.000 μm^3 und bei entsprechend identischer Schnittdicke bei 3x (700x700 μm) ein Volumen von 1.470.000 μm^3 . In allen untersuchten Ansätzen (Abb. 8 B-E) konnten lediglich DNA-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml gemessen werden. Alle untersuchten Proben lagen unterhalb der Detektionsfähigkeit des verwendeten DNA-Konzentrations-Kits. Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung wurde getestet, ob dennoch eine PCR mit anschließender Mutationsanalyse möglich war. Die PCR und die Sequenzierung erfolgten unter den etablierten Bedingungen und Protokollen der Routineuntersuchungen. Die Ergebnisse zeigten, dass bei den Schnitten mit 4 μm Schnittdicke, bei einer Schnittmenge von 1x (350x350 μm) und 6x (350x350 μm) und Einbringen von 10 μl PCR-Produkt keine Mutationsanalyse durch Pyrosequenzierung durchführbar war (Abb. 8 B; Rot unterlegt). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei einer Schnittdicke von 6 μm , für eine Schnittmenge von 1x (350x350 μm) und 3x (350x350 μm) (Abb. 8 C; Rot unterlegt). Für alle anderen durchgeführten Analysen konnte eine Mutationsanalyse durch Pyrosequenzierung durchgeführt werden (Abb. 8B-E; Grün unterlegt). Obwohl die DNA-Konzentration unter 0,5 ng/ml betrug, war nach durchgeführter PCR ausreichend DNA-Produkt vorhanden, um eine Sequenzierung durchzuführen. Es zeigte sich, dass ab einer Schnittdicke von 8 μm

alle durchgeführten Schnittmengen zu einer sequenzierbaren DNA-Konzentration führten (Abb. 8 D; grün unterlegt). Gleiche Ergebnisse konnten für die Schnittdicke von 10 µm festgestellt werden (Abb. 7 E; grün unterlegt). Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass der Erfolg einer PCR mit nachfolgender Sequenzierung sowohl mit ansteigender Schnittdicke als auch Schnittmenge zunimmt.

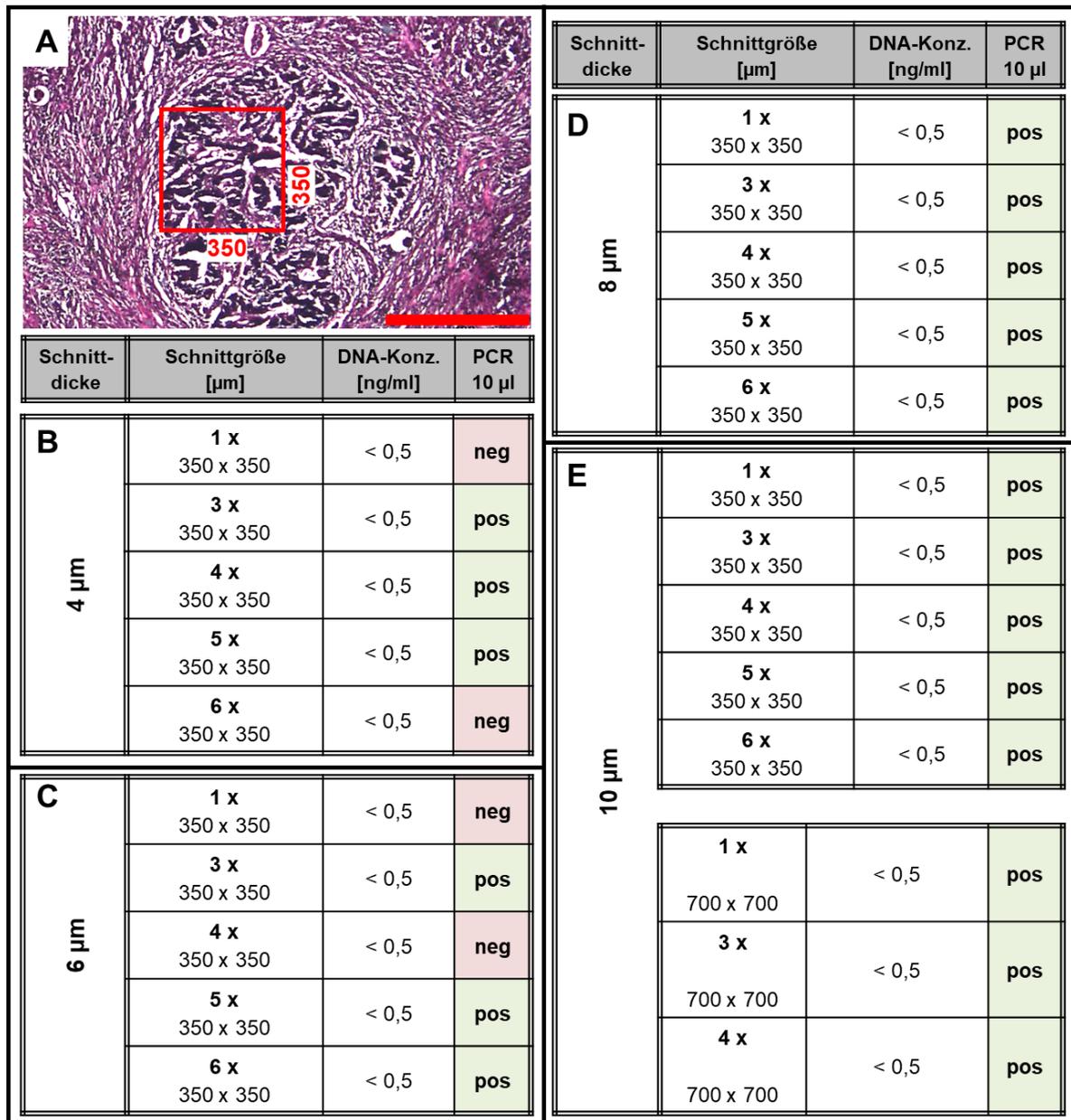


Abbildung 8: Untersuchungen zur Durchführbarkeit von LMD-Analysen basierend auf Schnittdicke und Schnittgröße der zu analysierenden Areale. (A) Beispiel eines mikroskopischen LMD-Bildes des Patientenfalls 5899 7 (nicht Bestandteil der Mutationsanalysen), aus der Archivierung des BwKrhs Ulm, mit Einzeichnung einer 350x350 µm großen Schablone. Anhand solcher vorgefertigten Schablonen werden aus verschiedenen dicken Gewebeschnitten verschiedene Karzinombereiche ausgeschnitten und einer Mutationsanalyse zugeführt. **(B-E)** Die Tabellen stellen die Untersuchungsergebnisse der Analyse von Schnittdicke vs. Schnittgröße dar. Anhand der verschiedenen Gewebeschnittsticken von 4 µm **(B)**, 6 µm **(C)**, 8 µm **(D)**, 10 µm **(E)** werden entsprechend unterschiedlich großer Schnittmengen analysiert. Die Schnittgrößen werden anhand von vorgefertigten Schablonen (**vgl. A**) realisiert. Die letzten Spalten der Tabellen B-E stellen die gemessenen DNA-Konzentrationen dar. Mutationsanalysen (mit 10 µl PCR-Produkt) bei denen ein

Ergebnis (**pos**) generiert wird, grün unterlegt. Mutationsanalysen bei denen kein Ergebnis (**neg**) generiert werden kann, rot unterlegt.

3.2.2 PCR und Pyrosequenzierung der LMD-Proben

Die vorherige Analyse zeigte eine gute Sequenzierbarkeit von Gewebeproben mit einer Probendicke von 8 μm . In diesem Anschlussversuch wurde ausschließlich mit 8 μm dicken Gewebeschnitten gearbeitet. In diesem Versuchsabschnitt wurden die Gewebeschnitte mit Schablonen unterschiedlicher Anzahl von 100x100 μm (Abb. 9 D; Gelb), 250x250 μm (Abb. 9 D; Grün) und 350x350 μm (Abb. 9 D; Rot) geschnitten, um eine noch bessere Auflösung der Sequenzierbarkeit zu zeigen. Die entstandenen Proben wurden anschließend einer DNA-Konzentrationsbestimmung, einer PCR-Analyse und einer Mutationsanalyse unterzogen.

Schnittgröße	Anzahl Schablonen	DNA-Konz. [ng/ml]	PCR 10 μl	PCR 15 μl
A 100 x 100 μm	1 x	< 0,5	neg	neg
	2 x	< 0,5	neg	neg
	3 x	< 0,5	neg	neg
B 250 x 250 μm	1 x	< 0,5	pos	pos
	2 x	< 0,5	neg	neg
	3 x	< 0,5	neg	neg
C 350 x 350 μm	1 x	< 0,5	neg	neg
	3 x	< 0,5	neg	neg
	5 x	< 0,5	neg	pos
	7 x	< 0,5	pos	pos
	9 x	< 0,5	neg	pos
	11 x	< 0,5	pos	pos
	13 x	< 0,5	pos	pos
	15 x	< 0,5	pos	pos

Schnittgröße	Anzahl Schablonen	DNA-Konz. [ng/ml]	PCR 10 μl	PCR 15 μl
B 250 x 250 μm	1 x	< 0,5	pos	pos
	2 x	< 0,5	neg	neg
	3 x	< 0,5	neg	neg

Schnittgröße	Anzahl Schablonen	DNA-Konz. [ng/ml]	PCR 10 μl	PCR 15 μl
C 350 x 350 μm	1 x	< 0,5	neg	neg
	3 x	< 0,5	neg	neg
	5 x	< 0,5	neg	pos
	7 x	< 0,5	pos	pos
	9 x	< 0,5	neg	pos
	11 x	< 0,5	pos	pos
	13 x	< 0,5	pos	pos
	15 x	< 0,5	pos	pos

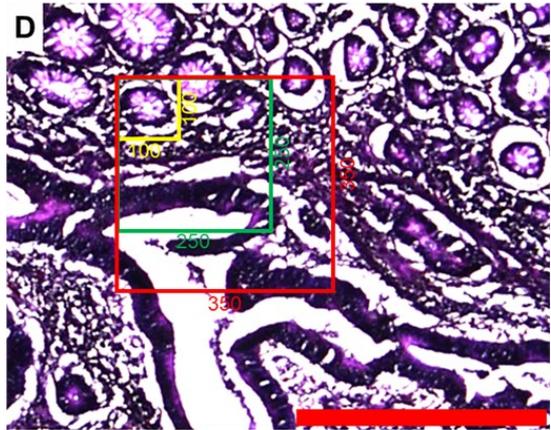


Abbildung 9: Spezifizierung der LMD-Analysen mit einer Schnittdicke von 8 μm zu unterschiedlichen Schnittgrößen (A-C) Die Tabellen stellen die Ergebnisse der Analyse von Gewebe mit einer Schnittdicke von 8 μm dar. Verwendet wird der Patientenfall 5899 7 (Probe nicht Bestandteil der Mutationsanalyse), aus der Archivierung des BwKrhs Ulm. Durch die Verwendung von verschieden großen Gewebeschablonen von 100x100 μm (vgl. (D) in Gelb) (**B**), 250x250 μm (vgl. (D) in Grün) und (**C**) 350x350 μm (vgl. (D) in Rot) wurden unterschiedliche Anzahlen an Schablonen hinsichtlich der Durchführbarkeit von Mutationsanalysen analysiert. Die einzelnen Schablonen und das Größenverhältnis zum Gewebe sind in (**D**) dargestellt. Die letzten beiden Spalten (**PCR 10 μl** und **PCR 15 μl**) der Tabellen A-C stellen die eingesetzten DNA-Mengen als Template für die PCR-Analyse dar. Die Mutationsanalysen mit positiven Ergebnissen (pos) sind grün unterlegt und rot bei Analysen, in denen kein Ergebnis (neg) generiert werden kann. Der Längenmaßstab in (D) beträgt 400 μm .

Äquivalent zu den Ergebnissen in Kapitel 3.2.1.2 wurden in allen untersuchten Ansätzen nach DNA-Extraktion (Abb. 8 A-C) keine messbaren DNA-Konzentrationen

gemessen. Alle Ansätze lagen unterhalb der Detektionsgrenze von 0,5 ng/ml. Dies bedeutete, dass in der nachfolgenden PCR 5 µl der unbekanntenen Konzentration als DNA-Input geladen wurde (Kap. 2.12.3.1). Im Anschluss an die DNA-Isolierung wurden zwei verschiedene Ansätze für die Pyrosequenzierung gewählt. Im ersten Sequenzierungsansatz wurde eine Menge von 10 µl DNA-PCR-Produkt an die Sepharose-Beads gekoppelt. Dies entsprach der identischen DNA-Menge, wie sie in den Routineanalysen und im Versuchsteil 3.2.1.2 eingesetzt wurde. In einem zweiten Versuchsansatz wurden 15 µl der PCR-DNA gekoppelt und sequenziert. Bei dem Ansatz der 100x100 Schablone (Abb. 8 A) konnten weder bei Verwendung von 10 µl noch 15 µl PCR-Produkt Ergebnisse in der Pyrosequenzierung generiert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch für den Versuchsansatz mit einer 250 x 250 µm Schablone. Jedoch zeigte sich, dass für die geringste Gewebemenge von 1x (250x250 µm) ein positives Sequenzierungsergebnis zu finden war, während 2x und 3x (250x250 µm) weder für 10 µl noch 15 µl PCR-DNA ein Pyrosequenzierungsergebnis hervorbrachte (Abb. 9 B; PCR 10 und 15 µl). Die Ergebnisse der 350x350 µm Versuche zeigten, dass in der Analyse mit 15 µl PCR-Produkt mehr positive Sequenzierungsergebnisse auftraten als in Ansätzen mit 10 µl PCR-Produkt (Abb. 8 C; PCR 15 µl). Bei der Verwendung von 5x und 9x 350x350 µm konnten Ergebnisse detektiert werden, während die Verwendung von 10 µl ein negatives Ergebnis zeigte (Abb. 8 C).

3.3 Untersuchung der Proben über Lasermikrodissektion

Im Anschluss an die Vorversuche, sollten nun zwei bereits in der Routine aufgearbeitete Patientenfälle (Kap. 3.1.1; Fall 1: 6880 und Kap. 3.1.3; Fall 3: 6978) mithilfe der Lasermikrodissektion untersucht werden. Das Ziel dieses Untersuchungsansatzes war es herauszufinden, ob sich die gefundenen Mutationsergebnisse der Vorversuche in den LMD-Ansätzen bestätigen lassen. Zusätzlich sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, ob man durch die Analyse von kleineren Gewebearealen innerhalb eines großen Tumorbereichs weitere distinkte und bisher noch nicht identifizierte Mutationen feststellen lassen, die in einem Routineansatz nicht detektiert werden konnten. Durch die gesammelten Ergebnisse der Vorversuche zu Schnittdicke und Schnittgröße für eine LMD-PCR-Pyrosequenzierung (siehe 3.2.1.+ 3.2.2) wurde unter der Annahme, dass die

Verwendung von dickeren Gewebeschnitten und größeren Gewebeflächen zu quantitativ und qualitativ besseren PCR- und Pyrosequenzierungsanalysen führte, mit einer Gewebedicke von 8 µm und einer maximal möglichen Gewebemenge durch das Schneiden von mehreren aufeinanderfolgenden Objektträgern weitergearbeitet. Zusätzlich wurde nach PCR mit einem PCR-DNA-Produkt von 15 µl weitergearbeitet.

3.3.1 Patientenfall 1: 6880

Die Vorergebnisse der Routineuntersuchung (Kap. 3.1.1.) zeigten in der Routineanalyse ein homogenes Mutationsmuster einer Punktmutation im *KRAS* Codon 12/13 mit einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin (G12R) mit Mutationsfrequenzen von 8,9% in Block I5 und 40,5% in Block I6. In der betrachteten Probe 6880 Block I7, konnte im Rahmen der Routinediagnostik eine Frequenz von 46,5 % festgestellt werden. In den untersuchten Codons *KRAS* 61 und *BRAF* 600 des gleichen Gewebeblocks zeigten sich Wildtypsequenzen. In einer Rektumbiopsie der Gewebeprobe 6487 zeigten sich Anteile eines invasiv wachsenden Adenokarzinoms. Alle getesteten Proben der Routineuntersuchung, in *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* wiesen Wildtypsequenzen auf. Auch bei der Analyse eines metastasensuspekten Rundherds in der Leber (Probe 6407) konnten ausschließlich Wt-Sequenzen detektiert werden. Durch die Entdeckung differenter Mutationsmuster zwischen den Adenokarzinomen des Sigmas, Rektums und der Leber wurden die Proben 6880 I5, I6 und I8 des Sigmaresektats auf weitere Mutationen der *RAS*-/*RAF*-Gruppe mit dem Routinediagnostikweg aufgearbeitet. Es zeigte sich eine zusätzliche Mutation im *NRAS* Codon 146 mit einer Mutationsfrequenz von 10,9 % und einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin (A146T). In der mikroskopischen Begutachtung des Sigmaresektats (Patientenfall 1: Schnittfolge 6880 I) zeigte sich ein zirkumferentiell wachsendes Adenokarzinom mit oberflächlichem pluriglandulären Wuchsmuster und zur Tiefe hin dominierender muzinöser Anteile. Durch eine Aufarbeitung der Patientenproben 6880 I5, I6 und I8 mit dem Verfahren der LMD-PCR-Pyrosequenzierung sollte geklärt werden, ob sich die Mutation im Codon *NRAS* 146 auch in anderen Schnittfolgen wiederfindet und ob sich die differenten Mutationsmuster in morphologisch unterschiedlichen Bereichen des Adenokarzinoms (glandulär vs. muzinös) nachweisen ließen.

3.3.1.1 6880 I 5

Die mikroskopische Betrachtung der angefertigten Hämalaun-Eosin-Übersichtsaufnahmen des Patientenfalls 6880 I5 (Abb. 10 A) zeigten ein konvex geformtes Gewebepreparat eines Sigmaresektats, welches zum einen aus tiefen Krypten und zum anderen aus transparent-wabenartig aussehenden muzinösen Anteilen aufgebaut war. Im unteren Anteil des Gewebeschnitts lagen großflächig Areale mit einem pluriglandulären Wachstumsmuster (Abb. 10 A: Übersichtsaufnahme grüner Kasten; Abb. 10 C: glanduläre Anteile des Karzinoms). Angrenzend am glandulären Anteil befanden sich im oberen Abschnitt des Gewebeschnitts transparent anmutende Bereiche eines muzinösen Karzinoms (Abb. 10 A: Übersichtsaufnahme roter Kasten; Abb. 10 B: muzinöse Anteile des Karzinoms).

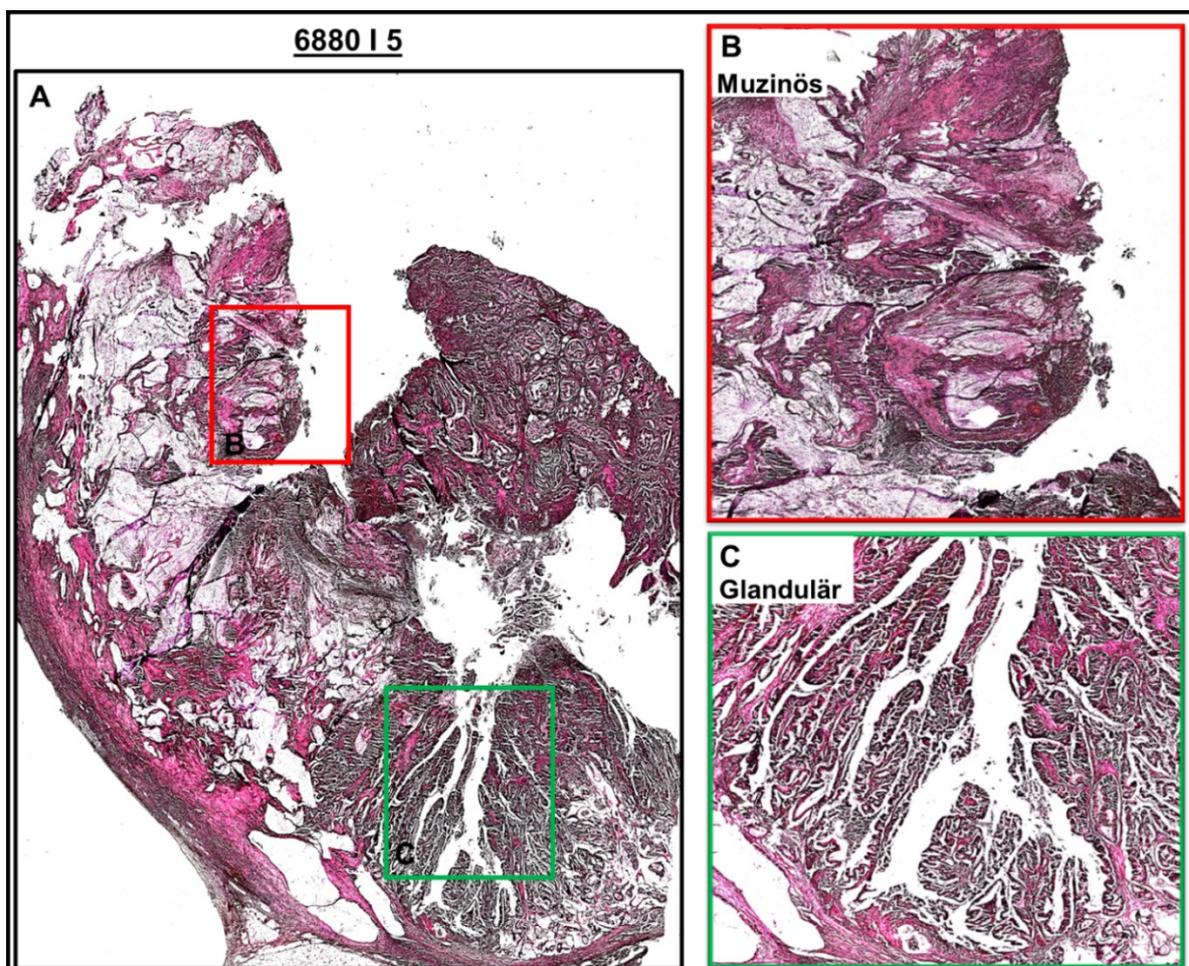


Abbildung 10: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Fall 1: 6880; Probe I5. (A) Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitt zu 6880 I5, welcher muzinöse als auch glanduläre Areale enthält. Der rote Rahmen kennzeichnet den Bereich aus (B). Der grüne Rahmen kennzeichnet den Bereich aus (C). (B) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten muzinösen Tumorareals. (C) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten glandulären Tumorareals. Die Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab.

Abbildung 10 A und B stellen die nativen Gewebeschnitte dar. Die Abbildungen zeigen in Abb. 10 A ein muzinöses und in Abb. 10 B ein glanduläres Wachstumsmuster des CRC. Unter mikroskopischer LMD-Kontrolle erfolgte die Auswahl der glandulären Bereiche (Abb. 11 B') und der muzinösen Bereiche (Abb. 11 A'). Alle sichtbaren Drüsenformationen innerhalb der Areale wurden unter Aussparung des umgebenden Stromagewebes ausgeschnitten (Abb. 11 A'' und B''). Die Analyse der Mutationsmuster erfolgte getrennt auf alle Codons von *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* (Tab. 29). Für die oben beschriebene Analyse wurden als muzinöses Areal sechs und als glanduläres Areal fünf aufeinanderfolgende Gewebeslices geschnitten und analysiert.

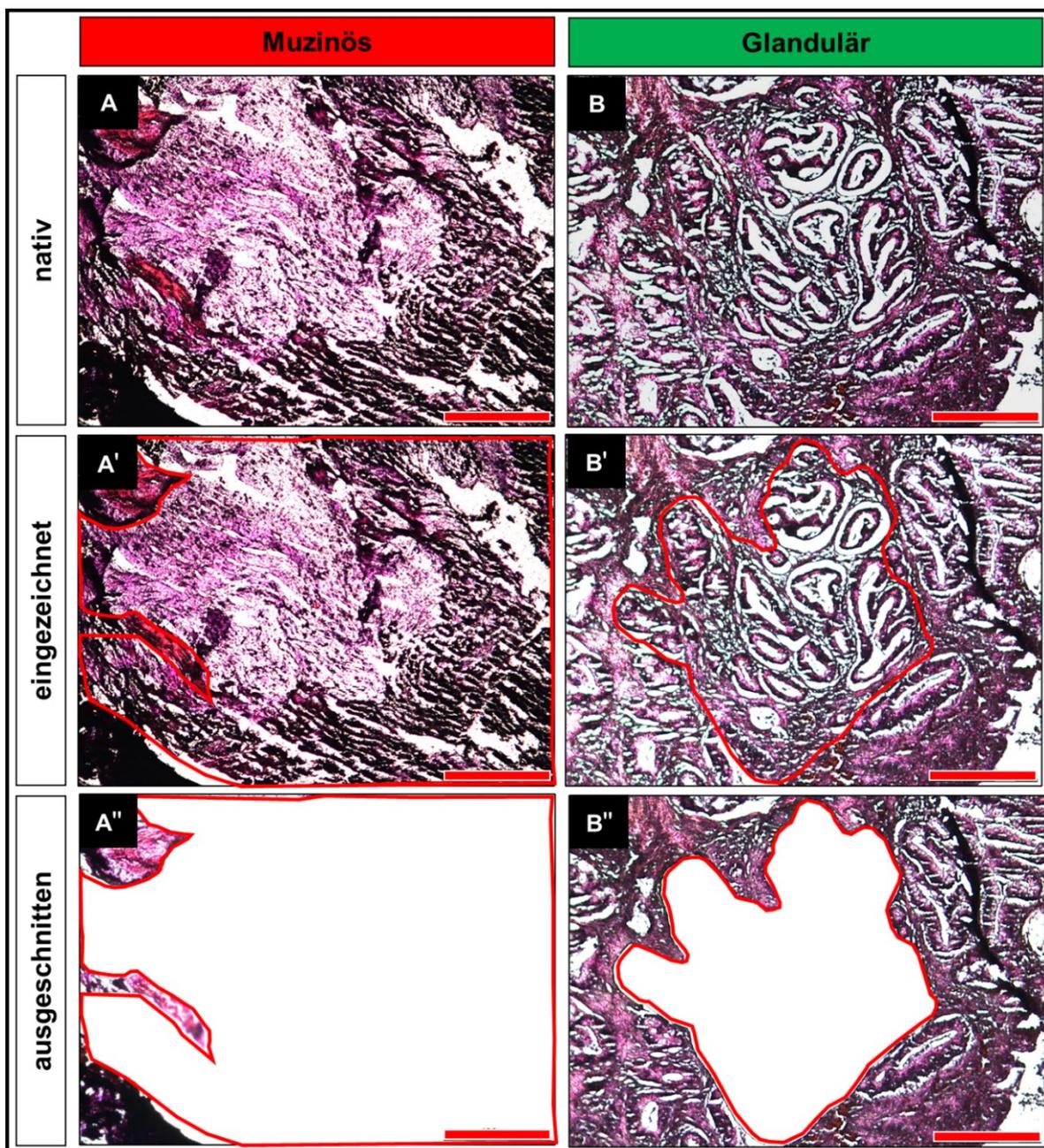


Abbildung 11: Gewebegenerierung zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop für den Patientenfall 6880 I5. Beispielhafte Darstellung der nativen, noch nicht geschnittenen mukösen (**A**) und glandulären Tumorareale (**B**) aus dem Fall 1: 6880; Probe I5. Zur Gewebegenerierung werden aus 8 µm dicken HE-Schnitten die jeweiligen muzinösen (**A'**) oder glandulären Tumorareale (**B'**) eingezeichnet und geschnitten. **A''** und **B''** zeigen die Bereiche, die zur Mutationsanalyse ausgeschnitten werden. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens, mehrere Bereiche auf 3-6 verschiedenen Gewebeschnitten kollektiert. Der Größenmaßstab entspricht 400 µm.

Eine vergleichende tabellarische Übersicht der Routineergebnisse und LMD-PCR-Pyrosequenzierung ist in Tab. 29 dargestellt. Die Routinediagnostik der Probe 6880 I5 zeigte eine Punktmutation im *KRAS*-Gen des Codons 12/13 mit einer Mutationsfrequenz von 8,9 %. Bei der detektierten Mutation handelte es sich um einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin. Es wurden keine weiteren

Mutationen identifiziert. Innerhalb der muzinösen Areale konnten keine Mutationen für *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* festgestellt werden. Die Ergebnisse der LMD-Analysen waren different zu den Ergebnissen der Routine-Analyse. Die Untersuchung der glandulären Areale mittels LMD zeigte wie die muzinösen Areale keine Mutation im *KRAS* Codon 12/13 (G12R). Im LMD-Ansatz zeigte sich jedoch eine neuauftretene potenzielle low-level-Mutation für das *NRAS* Codon 146, welches in der Routinediagnostik nicht identifiziert werden konnte. Die gefundene *NRAS*-Mutation war mit einer Frequenz von 7,2 % (Tab. 29: 6880 I5 glandulär, PLLM grün unterlegt) die einzige Mutation, die in den analysierten Gewebeproben der Schnittabfolge 6880 I5 identifiziert werden konnte.

Tabelle 29: Tabellarische Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch Pyrosequenzierung des Falls 1: 6880; Probe I5. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Pyrosequenzierung, die durch Routineverfahren (Kapitel 3.1.1.) gewonnen wurden. **LMD:** Tabellarische Auflistung der LMD-Pyrosequenzierungsergebnisse. Innerhalb des Gewebeschnitt 6880 I5 werden muzinöse gegen glanduläre Bereiche analysiert und miteinander verglichen. Dargestellt sind potenzielle Low-level-Mutationen (grüne Schrift) und Wildtypsequenzen (schwarze Schrift).

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Routine	6880 I5	8,9 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
LMD	6880 I5 Muzinös	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I5 Glandulär	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	PLLM 7,2 A146 T

3.3.1.2 6880 I 6

Die mikroskopische Betrachtung der HE-Übersichtsaufnahmen (Abb. 12 A) zeigte ein länglich geformtes Sigma-Gewebepräparat mit tiefen Krypten und großflächig imponierenden Anteilen eines kolorektalen Adenokarzinoms. Prominent zeigten sich großflächige Anteile eines pluriglandulären Adenokarzinoms (Abb. 12 A: Übersichtsaufnahme grüner Kasten; Abb. 12 C: glanduläre Anteile des Karzinoms). In direkter Umgebung zu den glandulären Anteilen zeigte sich zur Tiefe hin ein Wachstumsmuster mit mukösem Phänotyp (Abb. 12 A: Übersichtsaufnahmen roter Kasten; Abb. 19 B: muköse Anteile des Karzinoms).

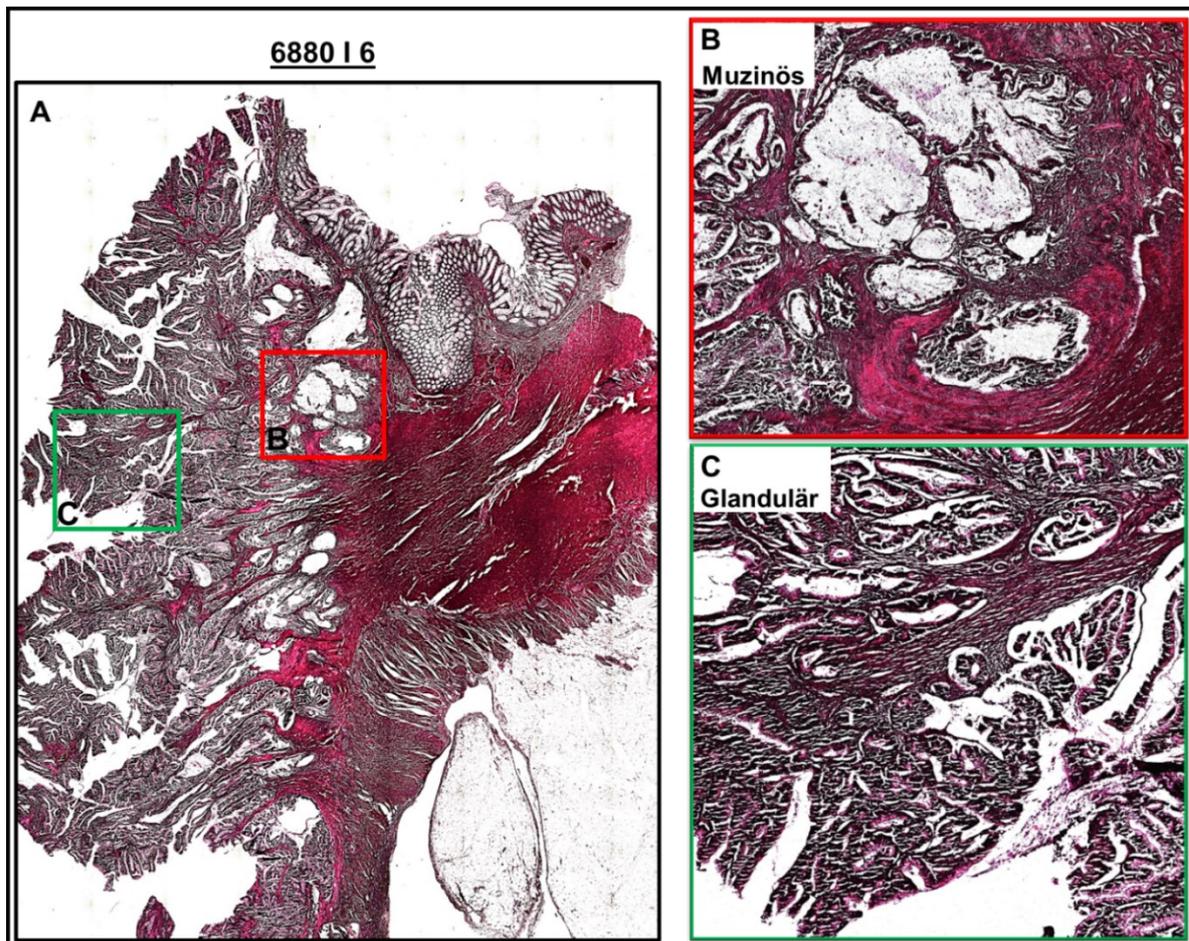


Abbildung 12: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Fall 1: 6880; Probe I 6. (A) Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitts zu 6880 I 6, welcher muzinöse als auch glanduläre Areale enthält. Der rote Rahmen kennzeichnet den Bereich aus (B). Der grüne Rahmen kennzeichnet den Bereich aus (C). (B) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten muzinösen Tumorareals. (C) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten glandulären Tumorareals. Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab.

Die Abbildung 13 A und B stellen die nativen Gewebeschnitte vor Einzeichnung der Areale dar. Dabei zeigt Abbildung 13 A ein muzinöses und die Abbildung 13 B ein glanduläres Wachstumsmuster. Unter mikroskopischer LMD-Kontrolle erfolgte die Auswahl der Bereiche für die einzelnen Areale (Abb. 13 A' und B'). Alle sichtbaren Drüsenformationen, unter Aussparung des umliegenden Stromas, wurden ausgeschnitten (Abb. 13 A", B" und C"). Die Analyse der einzelnen *RAS-RAF*-Mutationsmuster erfolgte getrennt auf *KRAS*, *NRAS* und *BRAF*.

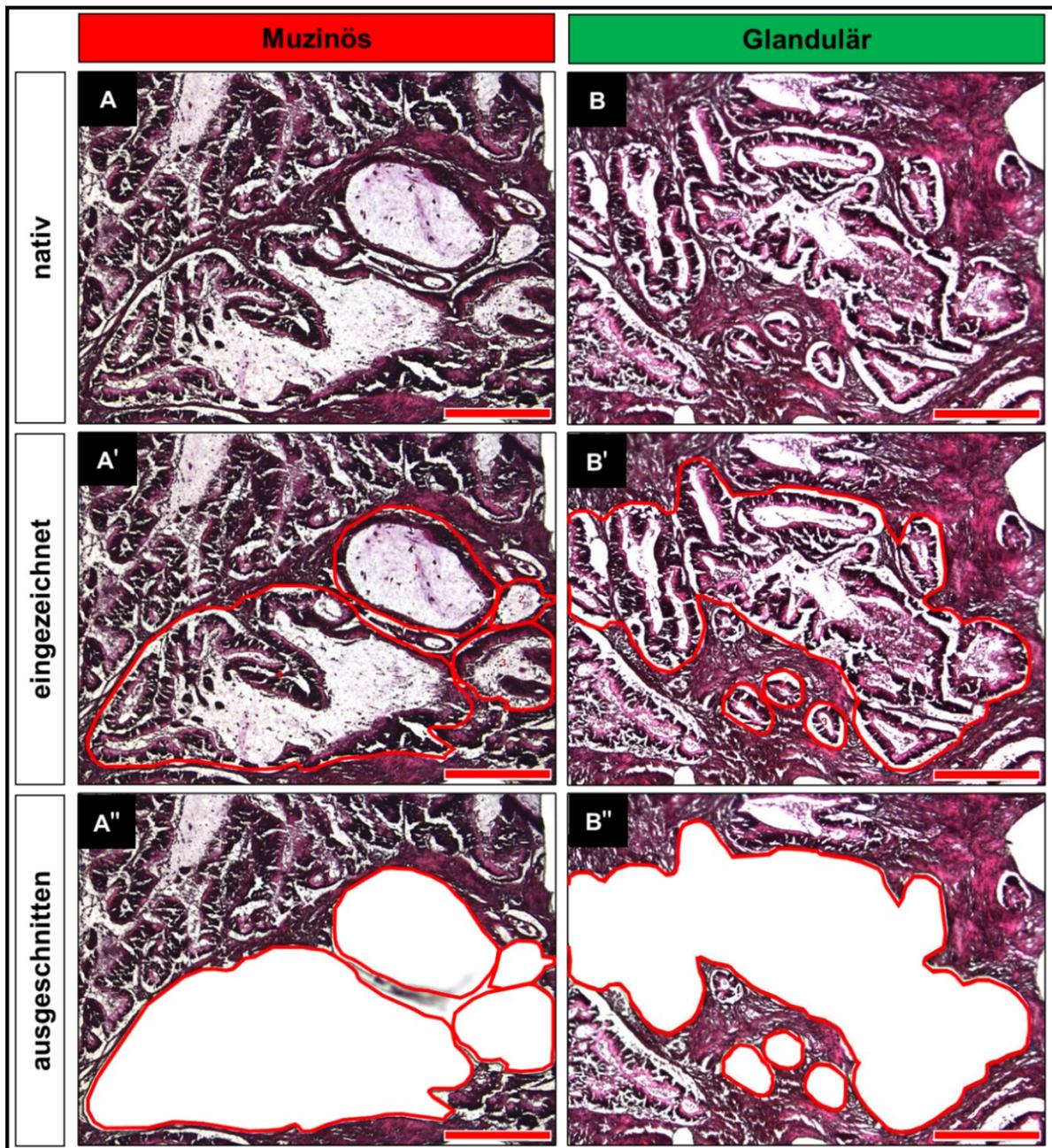


Abbildung 13: Gewebegenerierung zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop für den Patientenfall 6800 I6. Beispielhafte Darstellung der nativen, noch nicht geschnittenen muzinösen (**A**) und glandulären Tumorareale (**B**) aus dem Fall 1: 6880; Probe I6. Zur Gewebegenerierung werden aus 8 µm dicken HE-Schnitten die entsprechenden muzinösen (**A'**) oder die glandulären Tumorareale (**B'**) eingezeichnet und geschnitten. **A''** und **B''** zeigen die Bereiche, die zur Mutationsanalyse ausgeschnitten werden. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens, mehrere Bereiche auf 3-6 verschiedenen Gewebeschnitten gesammelt. Der Größenmaßstab entspricht 400 µm.

Die Ergebnisse von Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung sind der Tabelle 30 zu entnehmen. Für die Untersuchung wurde sowohl für das muzinöse Areal als auch für das glanduläre Areal drei aufeinanderfolgenden Schnittfolgen geschnitten und aufgearbeitet. Die Routinediagnostik der Probe 6880 I6 zeigte eine

Punktmutation (Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin) im *KRAS*-Gen des Codons 12/13, mit einer Mutationsfrequenz von 40,5 %. Die *KRAS* G12R Mutation entsprach einer high-level-Mutation. Zusätzlich zur *KRAS*-Mutation, wurde eine *NRAS* high-level-Mutation detektiert. Die identifizierte *NRAS*-Mutation mit einer Frequenz von 10,9 % wurde ebenfalls in der LMD-Analyse des Gewebepräparats 6880 I5 (vgl. Tab. 29), aber nicht in der Routineanalyse desselben Gewebblocks detektiert. Mutationen in anderen Protoonkogenen waren nicht zu identifizieren. Im Vergleich mit der Routinediagnostik, zeigte die LMD-Analyse von 6880 I6 (muzinös) keine Mutation für *NRAS* A146T (Tab. 30: Routine vs. LMD). Jedoch fand sich die aus der Routinediagnostik bekannte *KRAS* G12R Mutation. In der muzinösen Schnittanalyse zeigte die G12R Mutation mit 41,4 % eine ähnliche Mutationsfrequenz wie in der Routineanalyse (G12R: 40,5%). Betrachtet man die Ergebnisse für die glandulären Tumoreareale, zeigten sich zwei verschiedene Mutationen, *KRAS* G12R mit 11,6 % und die *NRAS* A146T Mutation mit 12,9 %. Somit stellte im Schnitt 6880 I6 bei den glandulären Arealen nicht mehr die *KRAS*-Mutation, sondern die *NRAS*-Punktmutation die frequenzführende Mutation dar.

Tabelle 30: Tabellarische Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch Pyrosequenzierung des Falls 1: 6880; Probe I6. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Pyrosequenzierung, die durch Routineverfahren (Kapitel 3.1.1.) gewonnen wurden. **LMD:** Die Tabelle listet die Ergebnisse der Pyrosequenzierung auf, die mittels LMD generiert wurden. Innerhalb des Gewebeschnitts 6880 I6 wurden muzinöse gegen glanduläre Bereiche untersucht und miteinander verglichen. Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen (rote Schrift), und Wildtyp-Sequenzen (schwarze Schrift).

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Routine	6880 I6	40,5 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,9 A146T
LMD	6880 I6 Muzinös	41,4 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I6 Glandulär	11,6 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	12,9 A146T

3.3.1.3 6880 I 8

Die Übersichtsaufnahmen (Abb. 14 A) des Patientenfalls 6880 I8 zeigten ein keulenförmig ausgezogenes Sigmaresektat. Im rechten Bildbereich zeigten sich kryptenförmige Einziehungen mit tumorfremem Epithel und Lamina propria. In der

Submucosa zeigten sich Gefäßanschnitte. Der linke Bildbereich des HE-Gewebeschnitts zeigte ein Tumorwachstum eines pluriglandulären Adenokarzinoms (Abb. 14 A: Übersichtsaufnahme mit hell- und dunkelgrünem Kasten; Abb. 21 B und C: zwei räumlich getrennte Areale eines glandulären Adenokarzinoms).

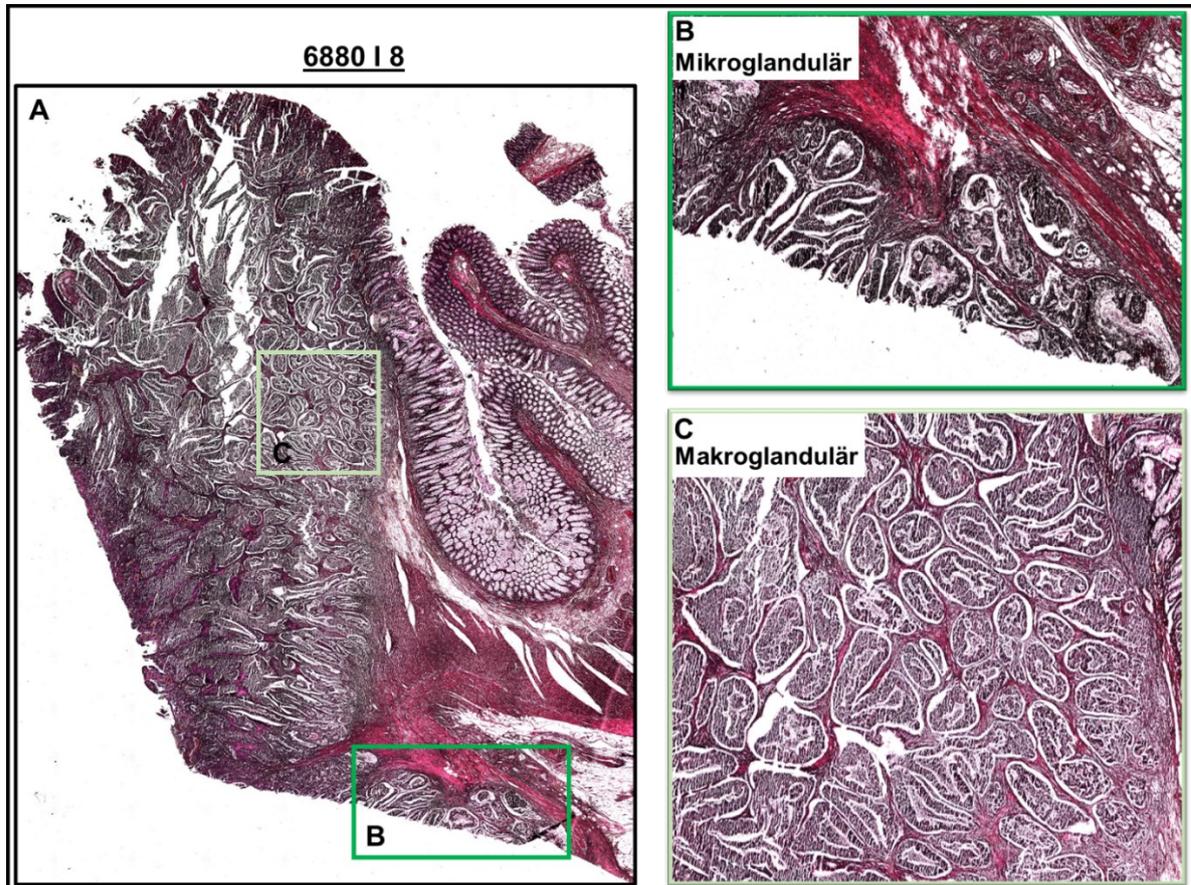


Abbildung 14: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Fall 1: 6880; Probe 18.

(A) Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitts zu 6880 18, welcher Areale eines glandulären Tumorwachstums enthält. Der hellgrüne Rahmen kennzeichnet den Bereich der in (B) vergrößert dargestellt ist. Der dunkelgrüne Rahmen kennzeichnet den Bereich der in (C) vergrößert dargestellt ist. (B) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten mikrogländulären Tumorareals, definiert als Areal 1. (C) Vergrößerte Aufnahme eines beispielhaft dargestellten makrogländulären Tumorareals, definiert als Areal 2. Übersichtsaufnahmen (A-C) enthalten keinen Größenmaßstab.

Die Abbildungen 15 A und B stellen die nativen Gewebeschnitte der glandulären Areale dar, mit mikro- und makrogländulärem Wachstumsmuster. Unter LMD-Kontrolle erfolgte die Auswahl der einzelnen Bereiche (Abb. 15 A', und B'). Alle sichtbaren Drüsenformationen innerhalb der Areale wurden ausgeschnitten (Abb. 15 A'', B'' und C''). Es wurde darauf geachtet ausschließlich Tumordrüsen zu schneiden und umliegendes nicht-tumoröses Areal auszusparen. Die Mutationsanalyse erfolgte für alle *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-Codons. Der oben beschriebene Vorgang wurde für

Areal 1 in vier und für das Areal 2 in sechs aufeinanderfolgenden Schnittpräparaten wiederholt.

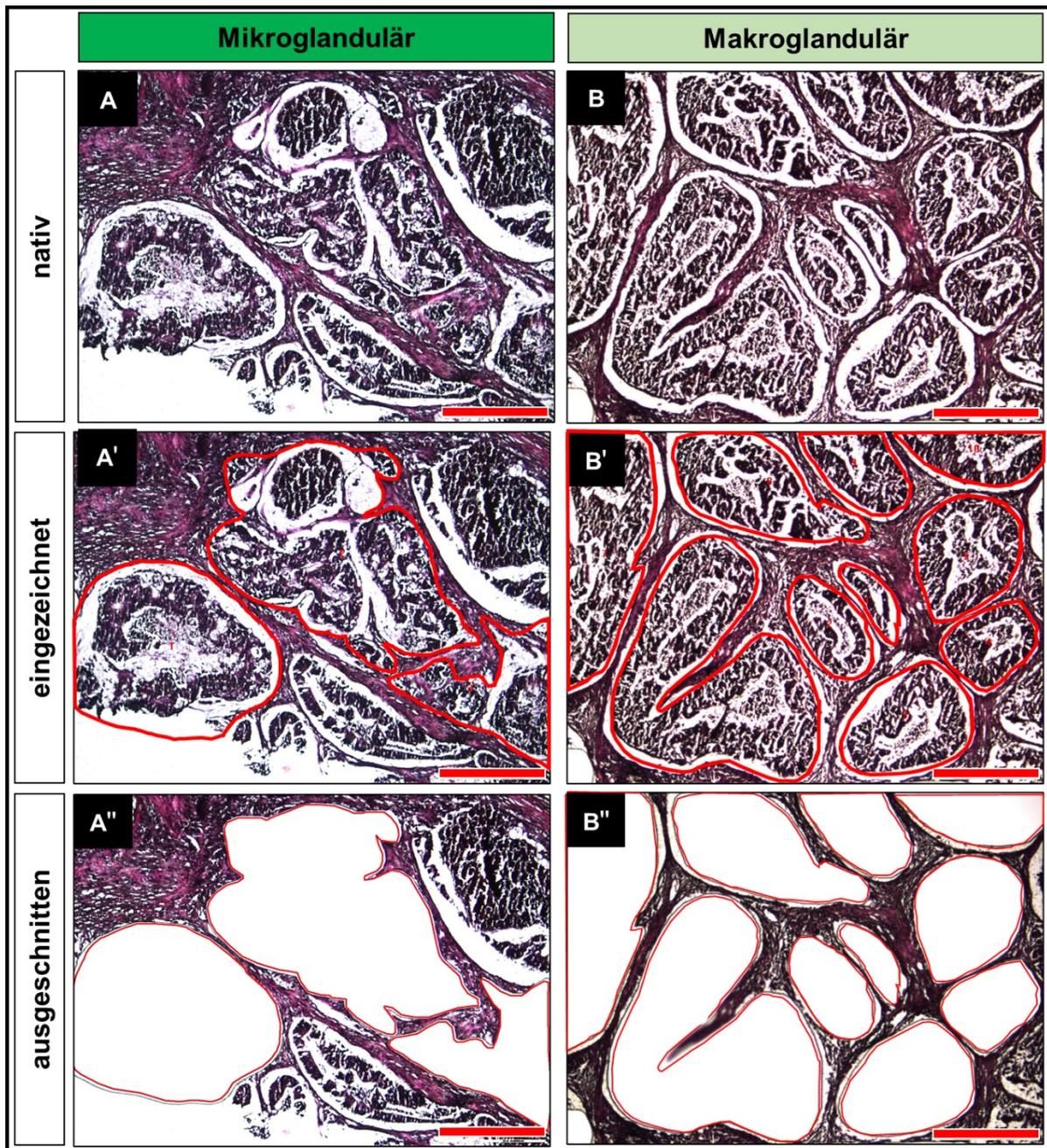


Abbildung 15: Gewebegenerierung zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop des Patientenfalls 6880 I8. Beispielhafte Darstellung der nativen Tumorareale von zwei benachbarten Bereichen eines glandulären Adenokarzinoms (**A & B**) aus dem Fall 1: 6880; Probe I8. Zur Gewebegenerierung werden aus 8 µm dicken HE-Schnitten eines mikroglandulären Areal 1 (**A'**) und ein makroglandulären Tumorareal 2 (**B'**) eingezeichnet und geschnitten. **A''** und **B''** zeigen die Bereiche, die zur Mutationsanalyse ausgeschnitten werden. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens, mehrere Bereiche auf 3-6 verschiedenen Gewebeschnitten gesammelt. Der Größenmaßstab entspricht 400 µm.

Die Ergebnisse von Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung sind der Tabelle 31 zu entnehmen. Sowohl in der Routine- als auch der LMD-Diagnostik waren keine Punktmutationen des *KRAS* Codons 12/13 vorhanden. Eine Analyse des *NRAS*-Gens zeigte in beiden analysierten Arealen (Mikro- und Makroglandulär) eine Mutation im Codon 146, welche in der Routineanalyse der identischen Probe nicht zu finden war (vgl. Tab. 31: Routine). Im mikroglandulären Areal wurde eine potenzielle low-level-Mutation A146T mit einer Frequenz von 6,0 % festgestellt. Das makroglanduläre Areal zeigte eine high-level-Mutation mit einer Frequenz von 9,1 % des gleichen Codons A146T. Die identifizierten *NRAS*-Mutationen konnten bereits in den zuvor analysierten LMD-Gewebepräparaten der Proben 6880 I5 und I6 (Tab. 29 & 30) in den glandulären Arealen detektiert werden. Eine *KRAS* G12R-Mutation, wie in den mukösen und glandulären Bereichen der Probe 6880 I6, ließ sich hingegen nicht feststellen. Auch weitere Mutationen in anderen Protoonkogenen des *KRAS*-, *NRAS*- und *BRAF*-Genabschnitts waren nicht zu identifizieren.

Tabelle 31: Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS* (blau), *BRAF* (rot) und *NRAS* (grün) durch Pyrosequenzierung des Falls 1: 6880; Probe I8. Getestet werden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Die Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Routineanalyse (Kapitel 3.1.1.). **LMD:** Tabellarische Auflistung der LMD-Pyrosequenzierung. Innerhalb des Gewebeschnitts 6880 I8 werden zwei unterschiedliche glanduläre Areale (Glandulär 1 und 2) definiert, die gegeneinander analysiert und verglichen werden. Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen in roter, potenzielle Low-level-Mutationen (PLL) in grüner und Wildtypsequenzen in schwarzer Schrift.

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>					
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Routine	6880 I8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
LMD	6880 I8 Mikro-glandulär	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	PLL 6,0 A146T
	6880 I8 Makro-glandulär	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	9,1 A146T

3.3.2 Patientenfall 1: Vergleichende Übersichtsdarstellung

Eine Zusammenfassung der Betrachtung der Routine- und LMD-Ergebnisse zum Patientenfall 6880 und den aufgearbeiteten Gewebeproben I5, I6 und I8 (Tab. 32) zeigte ein inhomogenes Mutationsmuster in den getesteten Gewebeproben. In der Routinediagnostik zeigte sich eine *KRAS* HLM im Codon 12/13 (G12R) mit einem

Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin. Lediglich in einer der drei untersuchten Gewebelöcke war eine Minor-Mutation im *NRAS* Codon 146 (A146T) mit einem Austausch von Alanin zu Threonin zu finden. Im Gewebeschnitt 6880 I8 zeigte sich im Gegensatz zu den zuvor analysierten Gewebelöcken weder eine *KRAS*- noch eine *NRAS*-Mutation. Auch die in der Routineanalytik untersuchten Adenokarzinome des Rektums (6487) oder der Lebermetastasen ergaben keinen Hinweis auf eine Mutation im *KRAS*- oder *NRAS*-Genabschnitt und zeigten in allen analysierten Mutationssequenzen eine Wildtypsequenz (*Wt*). Nach Feststellung der Inhomogenität wurden alle in der Routineanalyse untersuchten Gewebelöcke (I5, I6 und I8) erneut durch das Verfahren der LMD-PCR-Pyrosequenzierung analysiert (Abb. 16). Einige Besonderheiten der getesteten Analysen sind zusammenfassend in Tabelle 32 und Abbildung 16 hervorgehoben. Im Schnitt 6880 I8 konnten keine muzinösen Anteile des Adenokarzinoms detektiert werden, daher wurden zwei verschiedene glanduläre Areale untersucht. Die Ergebnisse der LMD-PCR-Pyrosequenzierung stellten, wie die Ergebnisse der Routineuntersuchung, ein inhomogenes Mutationsmuster dar. In den Analysen der Probe 6880 I5, muzinöse und glanduläre Areale, sowie 6880 I8, in beiden glandulären Arealen, konnten keine Punktmutationen im *KRAS* 12/13 Genabschnitt festgestellt werden. Ausschließlich im Gewebelöck der Probe 6880 I6, konnte die G12R Mutation sowohl im muzinösen als auch glandulären Areal detektiert werden. Die Mutationsfrequenz des muzinösen Areals entsprach ungefähr der Routineanalyse im identischen Gewebelöck (Routinediagnostik: 40,5 %, LMD-Diagnostik muköses Areal: 41,4 %). Das glanduläre Areal zeigte in 6880 I6 eine niedrige Mutationsfrequenz von 11,6 % (Tab. 32: LMD-PCR-Pyro:6880 I6 G).

Tabelle 32: Gesamtdarstellung der Ergebnisse von Routine und LMD-PCR-Pyrosequenzierung zum Fall 1: 6880 I5, I6 und I8. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen (rote Schrift), potenzielle Low-level-Mutationen (grüne Schrift) und Wildtyp-Sequenzen (schwarze Schrift). Muzinöse Proben (M: mit mikro (Mi)- und makroglandulär (Ma)), die mit der LMD-Methode untersucht wurden, sind orange unterlegt, glanduläre Proben (G) in braun unterlegt. Proben, mit denen keine Analyse durchgeführt wurde, sind mit N/A markiert.

Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>					
	12/13	61	51	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Fall 1: Routine	6407	Wt	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6487	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I5	8,9 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6880 I6	40,5 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	10,9 A146T
	6880 I7	46,5 G12R	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6880 I8	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	
Fall 1: LMD-PCR-Pyro	6880 I5	M	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		G	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	PLL M 7,2 A146T
	6880 I6	M	41,4 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		G	11,6 G12R	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	12,9 A146T
	6880 I8	Mi G	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	PLL M 6,0 A146T
		Ma G	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	9,1 A146T

Die in der Routinediagnostik festgestellte *NRAS* Mutation des Codons 146 (Tab. 32 6880 I6 Routine) zeigte sich auch in der LMD-Analyse. In allen untersuchten Gewebeproben der LMD-Analyse, zeigte sich eine PLLM für *NRAS* 146 (Tab. 32: LMD-Analyse, 6880 I5: Glandulär 7,2 % und 6880 I8: Glandulär 1 6,0 %) oder eine HLM (Tab. 32: LMD-Analyse 6880 I6 Glandulär mit 12,9 % und 6880 I8 Glandulär 2 mit 9,1 %). Somit lässt sich ausschließlich in den glandulär (G) differenzierten Gewebearealen eine *NRAS*-Mutation feststellen (Abb. 23). Dabei ist hervorzuheben, dass im Gewebeschnitt 6880 I6 glandulär (G) die höchste Mutationsfrequenz von A146T mit 12,9 % festgestellt wurde und dies auch dem Gewebestück entsprach, der in der Routineanalyse die Mutation enthielt. In den muzinösen (M) Arealen konnte hingegen keine *NRAS*-Mutation festgestellt werden (Abb. 16). Schlussfolgernd ergab die Analyse der Patientenprobe eine heterogene Analyse aus Proben mit *KRAS*- und/oder *NRAS*- oder Wildtypsequenz. Die *NRAS* 146 Punktmutation verteilte sich homogen auf die glandulären Areale des Adenokarzinoms.

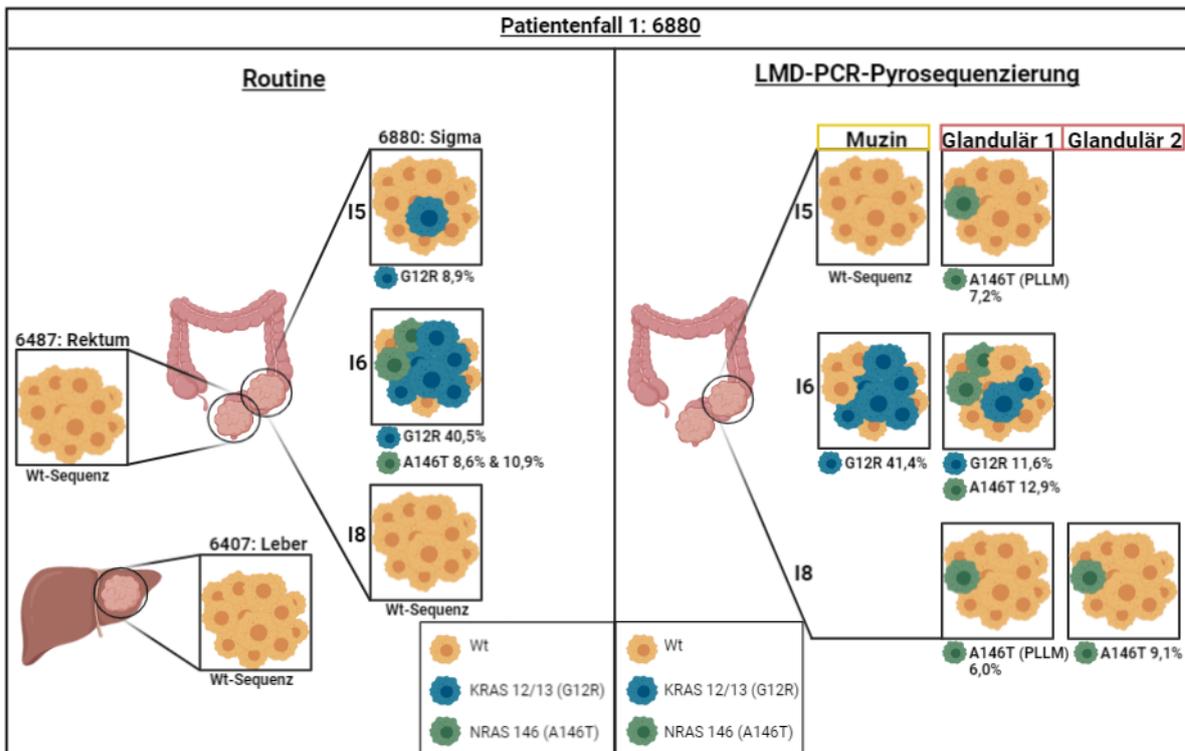


Abbildung 16: Übersichtsdarstellung der vergleichenden Analysen von Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung des Patientenfalls 1: 6880. Abgebildet sind die Lokalisationen des Primarius (Sigmakarzinom: 6880 I5, I6 und I8) und der Tumormanifestation im Rektum (6487) und der Leber (6407). In der linken Bildhälfte sind die Ergebnisse der Routineanalysen dargestellt. Die herausvergrößerten, verschiedenfarbigen Zellen (blau, grün und braun) stellen verschiedenen Tumorzellen unterschiedlicher Entität an differenten Stellen des Tumors dar. Die *RAS*-Mutation *KRAS* 12/13 ist in blau, *NRAS* 146 Mutationen in grün und Zellen mit Wildtypsequenz (*Wt*) ohne nachweisbare *RAS*-/*RAF*-Mutation in braun dargestellt. Die dargestellten Zahlen unterhalb der Tumorabbildungen stellen die Mutationsfrequenzen in Prozent [%] dar, die für die *KRAS* 12/13 Mutation (Routine: blaue Zellen im Gewebeblock 6880 I5 8,9 %, I6 40,5 %) und *NRAS* (Routine: grüne Zelle im Gewebeblock 6880 I6 10,9%) gemessen wurden. Die rechte Bildhälfte stellt die Ergebnisse der LMD-Analysen dar. Die Tumormasse wurde in verschiedene Areale (muzinös vs. glandulär) unterteilt. Die verschiedenfarbigen Zellen (blau, grün und braun) entsprechen denen der linken Bildseite. Die dargestellten Zahlen unterhalb der Tumorabbildungen stellen die Mutationsfrequenzen in Prozent [%] dar. *KRAS* 12/13 Mutation (I6: muzinös 41,4 % und glandulär 11,6 %); *NRAS* 146 Mutation (I5 glandulär: 7,2 %; I6 glandulär: 12,9%; I8 glandulär 1: 6,0 % und glandulär 2: 9,1 %). Created with BioRender.com.

3.3.3 Patientenfall 3: 6978

Die Vorergebnisse der Routineuntersuchung (Kapitel 3.1.3.) zeigten ein homogenes Mutationsmuster mit einer Punktmutation im *KRAS* Codon 12/13 in allen analysierten Proben. Anhand dieser Vorversuche waren keine weiteren Punktmutationen in anderen *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* Codons zu detektieren. Für den Patientenfall 3: 6978 war zu klären, ob es verglichen mit der Routinemethode, zu einer Aufkonzentrierung der Mutationsfrequenzen durch LMD-PCR-Pyro kommt. Möglicherweise könnte es bei der singulären Betrachtung einzelner Areale im

Tumorbereich zum Auftreten unterschiedlicher Mutationsfrequenzen kommen. Nachfolgend wurden alle bisher untersuchten Bereiche (6978 II3, 6978 II5 und 6978 II8) in einzelnen Arealen erneut untersucht und hinsichtlich ihrer Mutationen analysiert.

3.3.3.1 6978 II 3

Zur Aufarbeitung des Patientenfalls 6978 II3 wurden zu Beginn mit Hilfe des Wasserrutschenmikrotoms 8 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf spezielle Objektträger des Lasermikrodissektionsmikroskops übertragen und mittels Hämalaun-Eosin Handfärbung eingefärbt wurden. Unter mikroskopischer Betrachtung der gefertigten Übersichtsaufnahmen (Abb. 17 A) zeigte sich ein rechteckig geformtes Gewebepreparat eines Lungenoberlappenteilresektats mit metastatischen Absiedelungen eines kolorektalen Adenokarzinoms. Prominent lagen großflächig nekrotische Anteile eines zerfallenen Rektumkarzinoms (Abb. 17 A, nekrotische Areale mit einem Stern markiert). In direkter Umgebung zu den nekrotischen Anteilen des Adenokarzinoms zeigten sich zwei räumlich voneinander getrennte Tumorbereiche mit glandulärem Tumorwachstum, imponierend als vitaler Randsaum (Abb. 17 A: Areal 1 rot gestrichelte Umrandung; Abb. 17 A: Areal 2 grün gestrichelte Umrandung). Angrenzend an die glandulären Tumoreale fanden sich Bereiche mit Lungenparenchym, die teilweise einem emphysematösen Umbau glichen und entzündliche Infiltrate aufzeigten (Abb. 17 A, B und C: schwarz gestrichelte Umrandung). Der erhobene histologische Befund passte gut zur Lungenmetastase eines neoadjuvant therapierten kolorektalen Adenokarzinoms der Lunge.

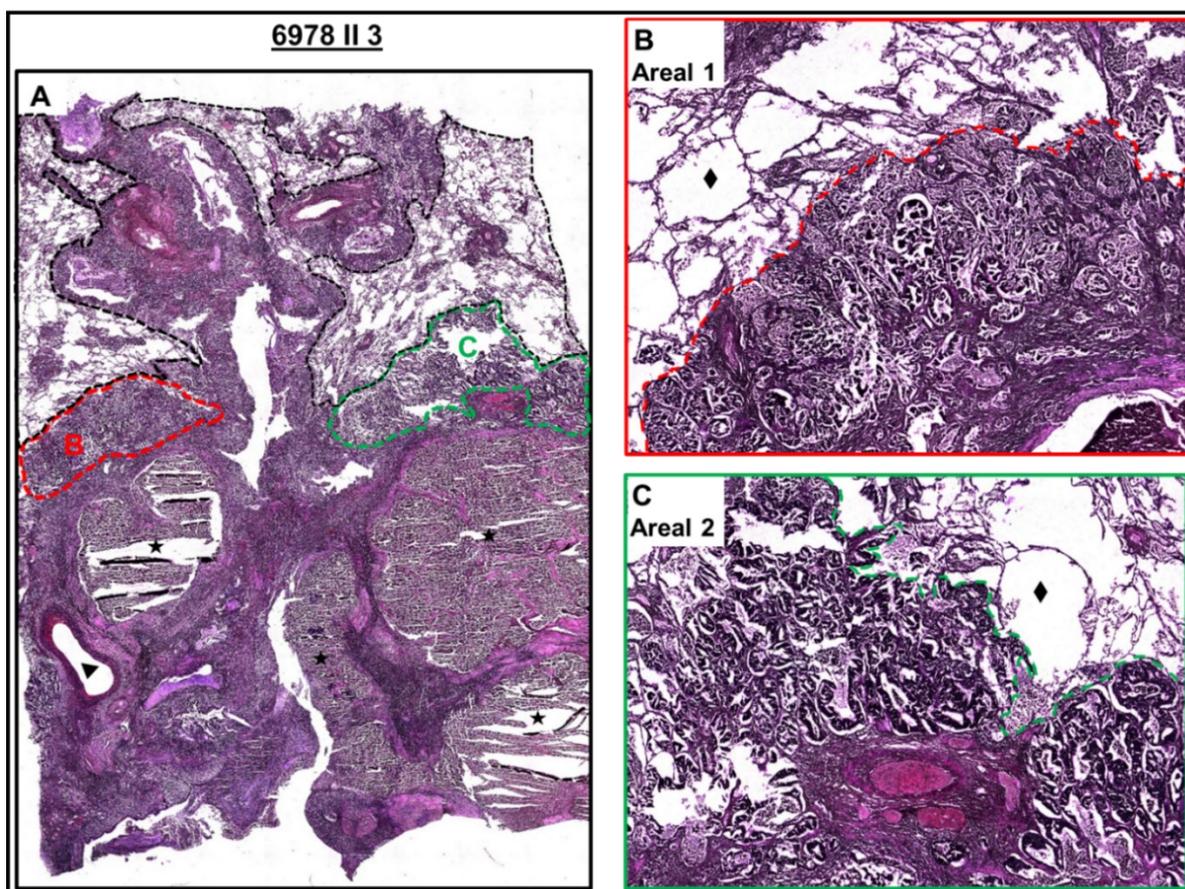


Abbildung 17: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Patientenfall 3: 6978; Probe II3. (A) entspricht einer Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitts von Patientenfall 6978 II3, welcher zwei verschiedene Tumorareale (B): Areal 1 mit roter Umrandung und (C): Areal 2 mit grüner Umrandung). Nekrotische Areale sind mit einem (★) markiert. Bereiche mit nicht-tumorhaltigem Lungenparenchym sind schwarz umrandet und einzelne Bereiche mit einer Raute (◆) markiert. (B) und (C) zeigen beispielhaft vergrößerte Darstellungen der Bereiche die in Bild A entsprechend farblich markiert. Alle Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab.

Die beiden unterschiedlichen Areale des vitalen Adenokarzinoms wurden unter mikroskopischer Auswahl der Bereiche und Kontrolle mittels LMD geschnitten (Abb. 18 A-A'' und Abb. 18 B-B'') und getrennt voneinander hinsichtlich ihres Mutationsmusters durch PCR-Amplifikation und Pyrosequenzierung für *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* (Abb. 18) untersucht. Bei der Auswahl der zu schneidenden Bereiche der jeweiligen Areale wurde darauf geachtet, dass möglichst viel Tumorgewebe und wenig umliegendes Stromagewebe geschnitten wurde. In Abbildung 18 A' und B' ist zu erkennen, dass für die Analyse am LMD alle gewählten Bereiche händisch eingezeichnet wurden, um so sicherzustellen, dass maximal viel Tumorgewebe in die Analyse einging. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis alle sichtbaren neoplastischen Drüsenformationen der Areale ausgeschnitten waren. Die Abb. 18 A'' und B'' zeigen beispielhaft die Bereiche 1 und 2 der jeweiligen Areale. Um eine ausreichende DNA-Menge für eine erfolgreiche PCR und Pyrosequenzierung

sicherzustellen, wurden bei den Gewebeschnitten 8 µm dicke Gewebeschnitte verwendet. Zusätzlich wurde der Schneidevorgang am LMD an neun (Areal 1) und acht (Areal 2) aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten wiederholt.

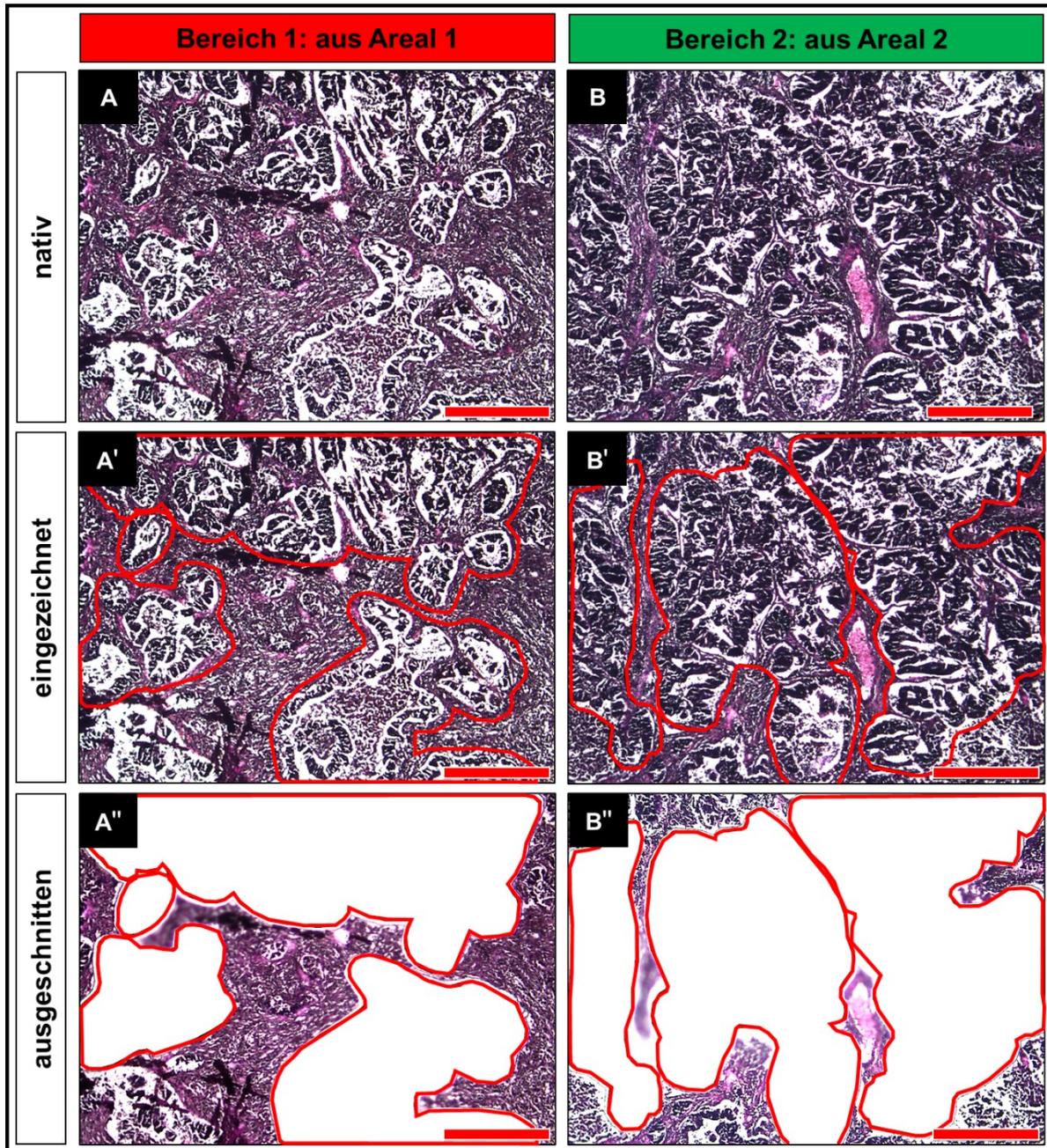


Abbildung 18: Gewebegenerierung verschiedener Tumorbereiche zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop im Patientenfall 3: 6978 Probe II 3. (A) und (B) sind beispielhafte Darstellungen von nativen, noch nicht geschnittenen Bereichen aus den vordefinierten Arealen 1 und 2. Der Bereich 1 (A) entspricht einem Ausschnitt, der im definierten Areal 1 (Abb. 10 B) zu finden ist. (B) entspricht einem Ausschnitt, der im Areal 2 (Abb. 10 C) des Falls 3: 6978; Probe II3 zu finden ist. Zur Gewebegenerierung für die PCR und die Sequenzierung werden aus 8 µm dicken HE-Gewebeschnitten einzelne Bereiche (A') und (B') aus den jeweiligen Arealen 1 und 2 eingezeichnet (rote Linien) und über das LMD-Mikroskop geschnitten. (A'') und (B'') stellen die Aufnahmen nach der Schnitfführung durch das LMD dar. Die jeweils zuvor eingezeichneten Bereiche (rote Linien) wurden exakt ausgeschnitten. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend über das oben beschriebene Vorgehen, mehrere der in (A) und (B) dargestellten Tumorbereiche aus 6 verschiedenen Gewebeschnitten entsprechend Abb. 10 A gesammelt. Der Größenmaßstab der einzelnen Bilder entspricht 400 µm.

Vergleichende Ergebnisse zwischen Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Tabellarische Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch Pyrosequenzierung des Falls 3: 6978; Probe II3. Untersucht wurden die Gewebeproben auf Mutationen von *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Pyrosequenzierung, die durch das Routineverfahren gewonnen wurden (Kapitel 3.1.3.). **LMD:** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Pyrosequenzierung, die mittels LMD-Verfahren generiert wurden. Es wurden zwei verschiedene Bereiche innerhalb des Gewebeschnitt 6978 II3 untersucht. *BRAF* 600 der Probe 6978 II3 Areal 2 wurde mittels Doppelbestimmung analysiert. Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen (HLM, rote Schrift), potenzielle Low-level-Mutationen (PLLM, grüne Schrift) und Wildtyp-Sequenzen (Wt, schwarze Schrift).

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>					
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Routine	6978 II3	15,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
LMD	6978 II3 Areal1	70,7 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II3 Areal2	71,2 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	PLLM 4,8 V600D PLLM 5,0 V600D	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

In der Routinediagnostik der Probe 6978 II3 zeigte sich mit einer Mutationsfrequenz von 15,5 % eine Punktmutation im *KRAS*-Gen des Codons 12/13, bei der es zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin kam. In den beiden separat untersuchten Arealen konnte entsprechend der Routinediagnostik eine Mutation im *KRAS* Codon 12/13 festgestellt werden. In beiden analysierten Fällen handelte es sich um dieselbe Punktmutation, die zu einem Austausch von Glycin zu Alanin führt. Jedoch zeigten die Ergebnisse der LMD-PCR-Pyro für die gefundene *KRAS* Mutation eine höhere Mutationsfrequenz. Im untersuchten Areal 1 konnte eine Frequenz von 70,7 % und im Areal 2 eine Frequenz von 71,2 % festgestellt werden. Im Gegensatz zu den gefundenen HLM in *KRAS* 12/13 wurde im Areal 2 neben der *KRAS*- auch eine *BRAF*-Mutation detektiert. Diese *BRAF*-Mutation hatte einen Aminosäureaustausch von Valin zu Asparaginsäure zur Folge. Mit einer Detektionsfrequenz von 4,8 % handelte es sich bei der gefundenen Mutation um eine PLLM im *BRAF*-Genabschnitt. Eine zweite unabhängige Untersuchung des *BRAF* Codons 600 mit LMD-PCR-Pyro bestätigte die Mutation für V600D mit einer Mutationsfrequenz von 5,0 % (Tab.33:

LMD II3 Areal 2). Für alle anderen untersuchten *RAS*- und *BRAF*-Codons konnte entsprechend der Routinediagnostik jeweils eine Wildtypsequenz detektiert werden.

3.3.3.2 6978 II 5

Die Aufarbeitung des Patientenfalls 6978 II5 entsprach jener für den Patientenfall 6978 II3. Durch das Wasserrutschenmikrotom wurden 8 µm dicke Schnitte angefertigt und mittels Hämalaun-Eosin Handfärbung eingefärbt. In der mikroskopischen Betrachtung der gefertigten Übersichtsaufnahmen (Abb. 19 A) zeigte sich ein annähernd rechteckig geformtes Gewebepreparat eines Lungenoberlappenteilresektats mit metastatischen Absiedelungen. Relativ prominent lagen im unteren Bereich des Gewebeschnittes großflächig nekrotische Anteile eines zerfallenen Karzinoms (Abb. 19 A, nekrotische Areale mit einem Stern markiert). Oberhalb der nekrotischen Anteile zeigten sich drei räumlich voneinander getrennte Tumorbereiche unterschiedlicher Größe und Ausdehnung mit glandulärem Tumorwachstum. Die Unterteilung der drei einzelnen Bereiche erfolgte entsprechend der dargestellten Übersichtsaufnahme (Abb. 19 A). Dabei stellte sich Areal 1 als ein großes Areal (Abb. 12 A: rot gestrichelte Umrandung), das Areal 2 als vitaler Randsaum an einen nekrotischen Bereich angrenzend (Abb. 19 A: grün gestrichelte Umrandung) und Areal 3 als ein Gewebebereich in der oberen Schnittfläche (Abb. 19 A: gelb gestrichelte Umrandung) dar. Bereiche mit Lungenparenchym waren spärlich im Randbereich des Schnittpräparats zu erahnen (Abb. 19 A: schwarz gestrichelte Umrandung).

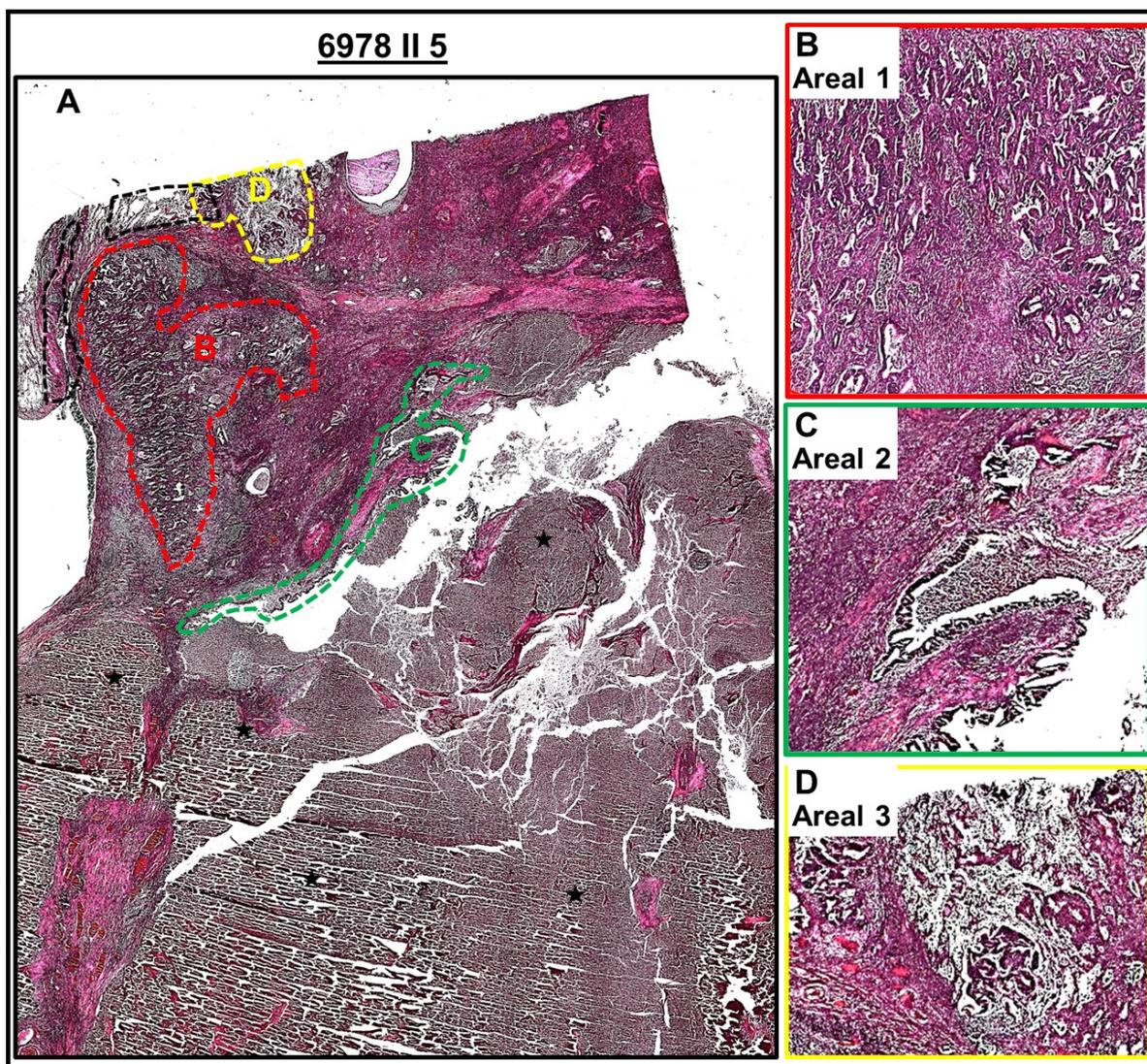


Abbildung 19: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Fall 3: 6978; Probe II5.

(A) entspricht einer Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitts zu 6978 II5, welcher drei unterschiedliche Areale eines Adenokarzinoms enthält. Die verschiedenfarbigen Umrandungen in Bild A markieren jeweils verschiedene Bereiche mit glandulärem Tumorwachstum, die sich in verschiedene Zonen innerhalb des Gewebeschnittes aufteilen. Areal 1 entspricht der roten Linie, Areal 2 grün umrandet und Areal 3 gelb umrandet. Zwei kleine Areale mit Lungenparenchym sind schwarz umrandet. Große Areale mit nekrotisch zerfallenem Adenokarzinom sind beispielhaft mit einem (★) markiert.

(B), (C) und (D) zeigen beispielhaft vergrößerte Darstellungen, aus den markierten Bereichen in Bild A. Die Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab. (B) entspricht Areal 1 und befindet sich im linken Bereich des Gewebeschnitts und stellt den größten tumorös durchsetzten Anteil dar. (C) entspricht Areal 2 und befindet sich an der Grenze zum nekrotisch zerfallenem Gewebe. (D) entspricht Areal 3 und befindet sich an der oberen Schnittkante des Gewebeschnitts. Die Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab.

Die drei Areale des vitalen Adenokarzinoms wurden unter mikroskopischer Auswahl der Bereiche und Kontrolle mittels LMD geschnitten (siehe Abb. 20 A-A", B-B" und C-C") und getrennt voneinander hinsichtlich ihrer Mutationsmuster (Tab. 41) untersucht. Die Auswahl und die Durchführung des Schneidevorgangs entsprach dem Prozedere aus Versuch 6978 II3 (Kap. 3.3.1.1). Es wurde darauf geachtet

möglichst viel tumoröses Drüsengewebe und wenig umliegendes Stromagewebe zu schneiden. Die Abb. 20 A', B' und C' zeigen beispielhaft die gewählten Bereiche für die Analyse. Alle Bereiche wurden händisch eingezeichnet. Alle sichtbaren Drüsenformationen innerhalb der Areale wurden ausgeschnitten (Abb. 20 A'', B'' und C''). Der oben beschriebene Vorgang wurde für Areal 1 viermal, Areal 2 viermal und Areal 3 bei elf aufeinanderfolgenden Schnittfolgen wiederholt um für die Analyse ausreichend Material zu gewinnen.

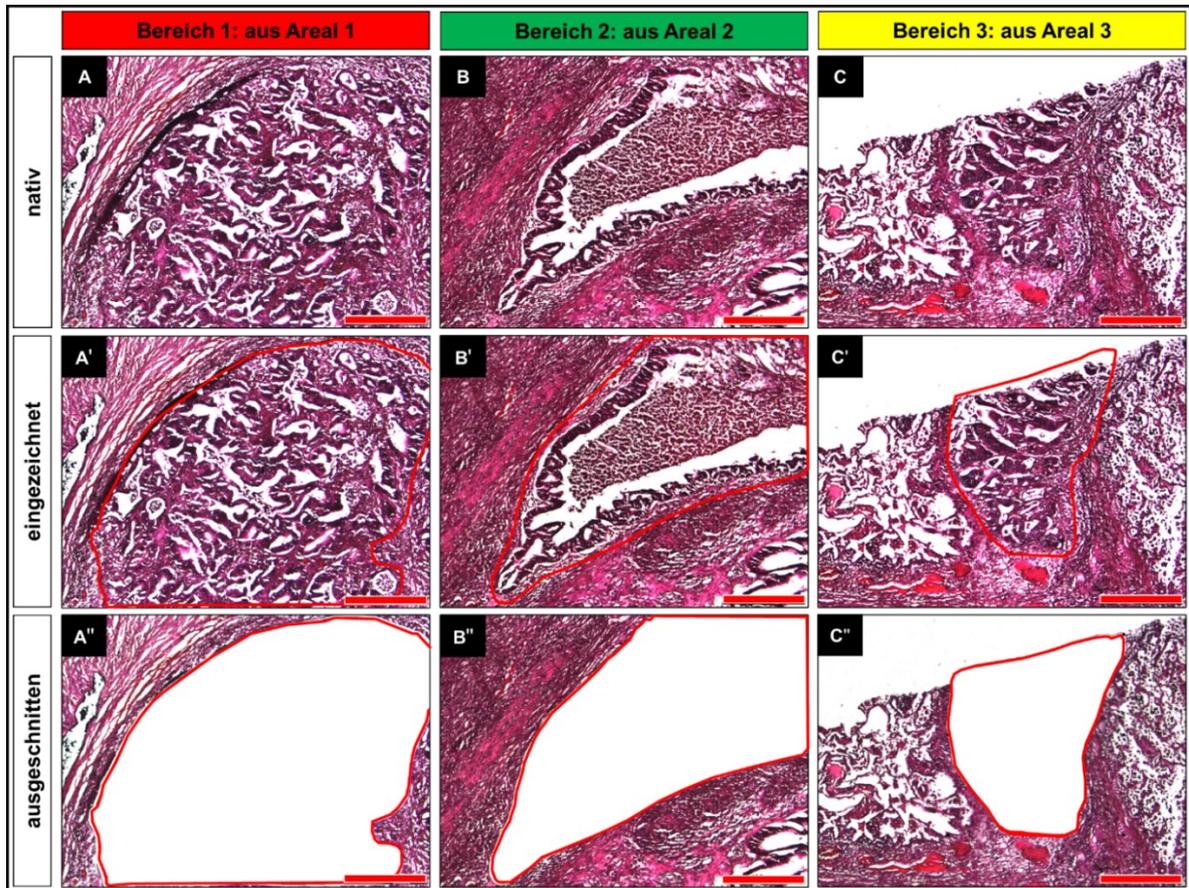


Abbildung 20: Selektion verschiedener Tumorbereiche zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop im Fall 3: 6978; Probe II5. In (A), (B) und (C) sind beispielhafte Darstellungen von nativen, noch nicht geschnittenen Bereichen abgebildet. Der Bereich 1 (A) entspricht dem definierten Areal 1 aus Abb. 12B, Bereich 2 dem Areal 2 aus Abb. 12C und (C) des Areals 3 aus Abb. 12D des Fall 3: 6978; Probe II5. Zur Gewebegenerierung für die PCR und Sequenzierung werden aus 8 µm dicken HE-Gewebeschnitten einzelne Bereiche (A'), (B') und (C') aus den jeweiligen Arealen 1 bis 3 eingezeichnet (rote Linien) und über das LMD-Mikroskop geschnitten. (A'' - C'') stellen die Aufnahmen nach der Schnittführung durch das LMD dar. Die jeweils zuvor eingezeichneten Bereiche (rote Linien) wurden exakt ausgeschnitten. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend über das oben beschriebene Vorgehen, mehrere der in (A), (B) und (C) dargestellten Tumorbereiche aus 3-6 verschiedenen Gewebeschnitten gesammelt. Der Größenmaßstab der einzelnen Bilder entspricht 400 µm.

Eine Übersicht der Ergebnisse von Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung ist in Tab. 34 dargestellt. Die Routinediagnostik der Probe 6978

II5 zeigte eine Punktmutation im *KRAS*-Gen des Codon 12/13 mit einer Mutationsfrequenz von 18,5 %. Die detektierte Mutation führte zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin (G12A). Die separat untersuchten Arealen 2 und 3 zeigten ebenfalls eine Mutation im *KRAS* Codon 12/13 (G12A). In beiden analysierten Fällen handelte es sich um dieselbe Punktmutation, bei der es zum Austausch von Glycin zu Alanin kam. Entsprechend der Ergebnisse des LMD-Ansatzes in Kap. 3.3.1.1 zeigte die gefundene *KRAS* Mutation im LMD-PCR-Pyrosequenzierungsansatz eine höhere Mutationsfrequenz verglichen mit der Routinediagnostik (Tab. 34). Im untersuchten Areal 2 konnte eine Frequenz von 56,1 % und im Areal 3 eine Frequenz von 100,0 % festgestellt werden. Sowohl im Areal 2 als auch Areal 3 waren keine weiteren Mutationen in *RAS*- und *BRAF*-Genen zu detektieren. Im untersuchten Areal 1 konnte keine Mutation festgestellt werden. Alle untersuchten DNA-Abschnitte des Tumors in Areal 1 zeigten Wildtyp-Sequenz.

Tabelle 34: Tabellarische Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch Pyrosequenzierung des Falls 3: 6978; Probe II5. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Die Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Pyrosequenzierung die durch Routineverfahren (Kapitel 3.1.3.) gewonnen wurden. **LMD:** Die Tabelle listet die Ergebnisse der Pyrosequenzierung auf, die mittels LMD generiert wurden. Es wurden drei verschiedene Bereiche innerhalb des Gewebeschnitts 6978 II5 untersucht. Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen in roter Schrift und Wildtypsequenz in schwarzer Schrift.

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>					
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146	
Routine	6978 II5	18,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
LMD	6978 II5 Areal 1	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	N/A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5 Areal 2	56,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5 Areal 3	100 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

3.3.3.3 6978 II 8

Die Aufarbeitung des Patientenfall 6978 II8 entsprach der Aufarbeitung des Patientenfalls 6978 II3 (Kap. 3.3.1.1.) und II5 (Kap. 3.3.1.2.).

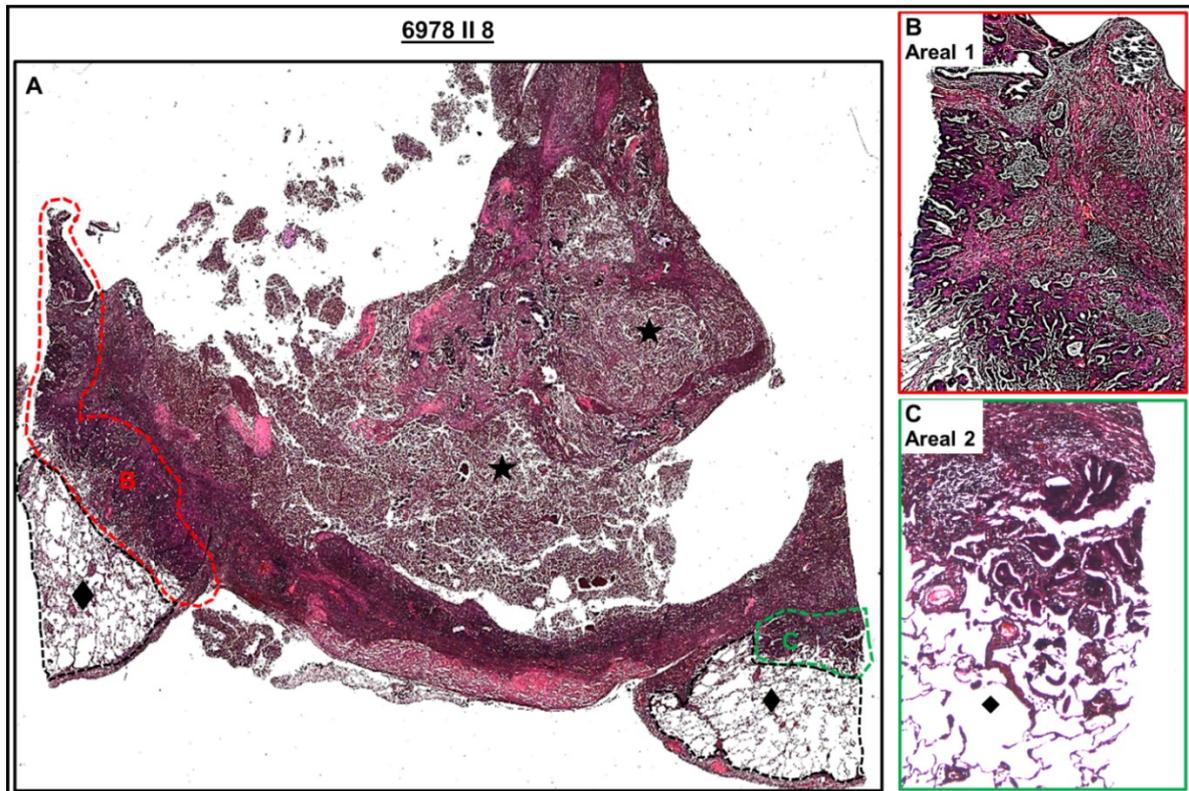


Abbildung 21: Mikroskopische Übersichtsdarstellung der LMD-Schnitte zum Fall 3: 6978; Probe II8.

(A) entspricht einer Übersichtsdarstellung des 8 µm dicken HE-Schnitt zu 6978 II8, welche zwei verschiedene und räumlich getrennte Areale an den unteren Eckpunkten des Gewebeschnittes beinhaltet. Die roten (Areal 1) und grünen Linien (Areal 2) markieren die verschiedenen Areale, in denen sich Bereiche mit glandulärem Tumorwachstum befinden. Zwei kleine Areale mit belüftetem Lungenparenchym ist mit einem (◆) markiert. Nekrotische Areale sind mit einem (★) markiert.

(B) und (C) sind beispielhaft vergrößerte Darstellungen aus (A). Die Übersichtsaufnahmen enthalten keinen Größenmaßstab.

Die mikroskopische Betrachtung der gefertigten Übersichtsaufnahmen (Abb. 21 A) zeigte ein dreieckig geformtes Gewebepreparat eines Lungenteilresektats mit Metastasen eines vorbekannten Kolonkarzinoms. In den beiden unteren Eckpunkten des Gewebeschnittes waren zwei Bereiche mit räumlich getrennten Tumorbereichen eines glandulären Adenokarzinoms unterschiedlicher Größe dargestellt. Das Areal 1 als größeres der beiden Areale (Abb. 21 A: rot gestrichelte Umrandung, Abb. 21 B: mikroskopische Vergrößerung) war in der Übersichtsaufnahme im linken Eckpunkt zu finden. Das Areal 2 bildete ein kleines Areal im rechten Eckpunkt (Abb. 21 A: grün gestrichelte Umrandung, Abb. 21 C: mikroskopische Vergrößerung). Der größte Teil des Gewebeschnittes bestand aus nekrotischen Anteilen des Karzinoms (Abb. 21,

nekrotische Areale mit einem Stern markiert). Unterhalb beider glandulärer Tumorareale schloss sich ein Bereich mit Lungenparenchym an (Abb. 21 A: schwarze gestrichelte Umrandung, Raute Markierung).

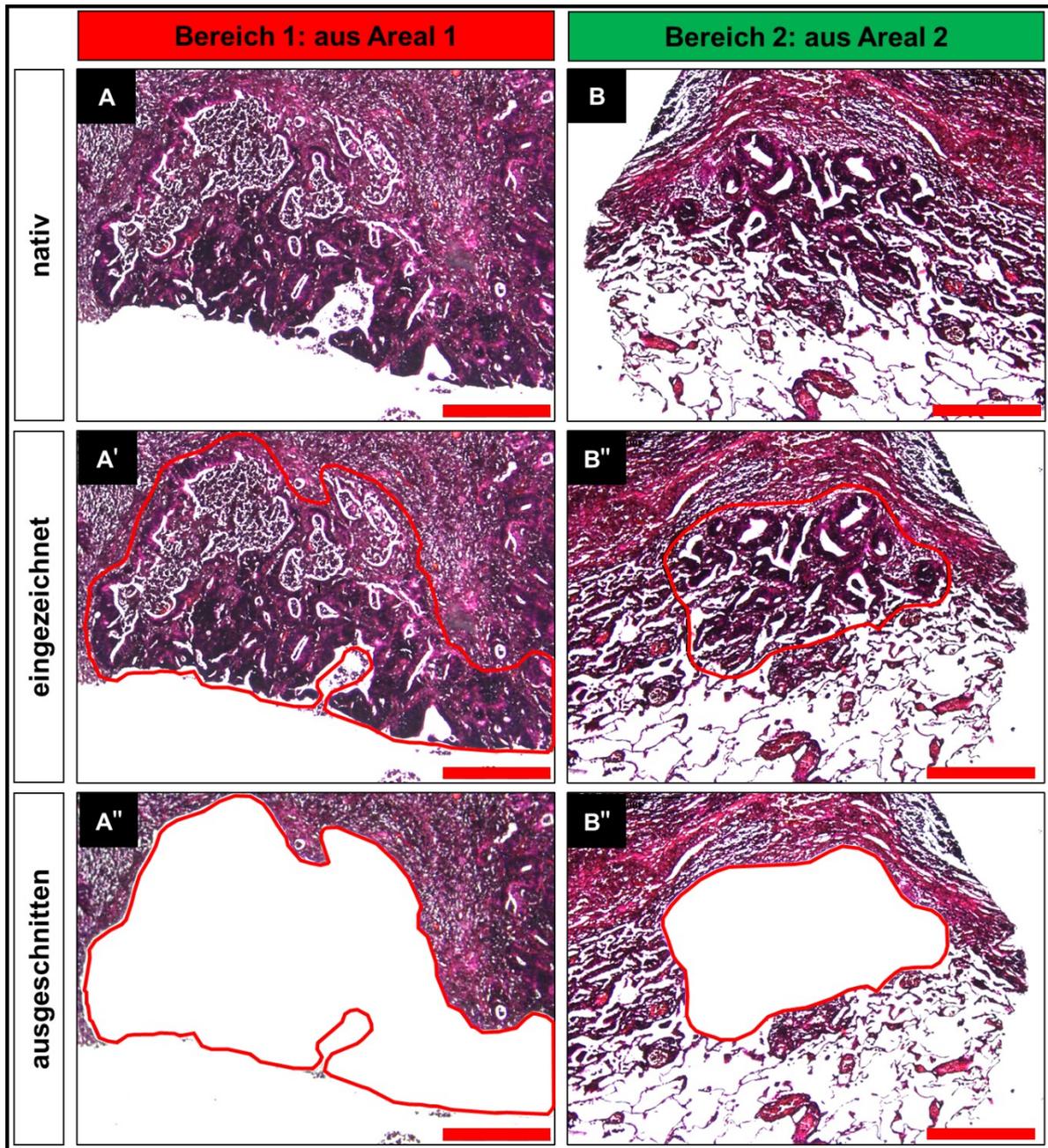


Abbildung 22: Selektion verschiedener Tumorbereiche zur Mutationsanalyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch das LMD-Mikroskop im Fall 3: 6978; Probe II8. In (A) und (B) sind beispielhafte Darstellungen von nativen, noch nicht geschnittenen Bereichen. Der Bereich 1 (A) entspricht dem definierten Areal 1 von Abb. 14 B und Bereich 2 von Abb. 14 C des Fall 3: 6978; Probe II8. Zur Gewebegenerierung für die PCR und Sequenzierung werden aus 8 µm dicken HE-Gewebeschnitten einzelne Bereiche (A') und (B') aus den jeweiligen Arealen 1 und 2 eingezeichnet (rote Linien) und über das LMD-Mikroskop geschnitten. (A'') und (B'') stellen die Aufnahmen nach der Schnitfführung durch das LMD dar. Die jeweils zuvor eingezeichneten Bereiche (rote Linien) wurden exakt ausgeschnitten. Um ausreichend Gewebematerial für die PCR-Analyse zu sammeln, werden entsprechend über das oben beschriebene Vorgehen, mehrere der in (A) und (B) dargestellten Tumorbereiche aus 6 aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten (Abb. 22 A) gesammelt. Der Größenmaßstab der einzelnen Bilder entspricht 400 µm.

Abb. 22 A (Areal 1) und B (Areal 2) stellen die nativen Gewebeschnitte dar, bevor die Areale am LMD eingezeichnet wurden. Die Abbildungen zeigen ein glanduläres Wachstumsmuster des CRC. Unter mikroskopischer Kontrolle im LMD erfolgte die Auswahl der Bereiche (Abb. 22 A' und B') für die Areale 1 und 2. Die Auswahl und die Durchführung des Schneidevorgangs entsprachen dem Prozedere aus den vorherigen Versuchen (Kapitel 3.3.1.1 + 3.3.1.2). Alle sichtbaren Drüsenformationen innerhalb der Areale wurden ausgeschnitten (Abb. 22 A", B" und C"). Die Mutationsmuster-Analyse erfolgte getrennt auf *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* (Tab. 42). Der oben beschriebene Vorgang wurde für Areal 1 in 15 und Areal 2 in 6 aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten wiederholt. Der Gewebekblock wurde am Wasserrutschenmikrotom aufgeschnitten, bis keine vitalen Tumorformationen mehr auffindbar waren. Alle verfügbaren Tumorareale sind in die Analyse eingegangen. Ein Nachschneiden von weiteren Gewebeproben war nicht mehr möglich.

Eine vergleichende Darstellung von Routinediagnostik und LMD-PCR-Pyrosequenzierung ist in Tab. 35 dargestellt. Die Routinediagnostik der Probe 6978 I18 zeigte eine Punktmutation im *KRAS* Codon 12/13 mit einer Mutationsfrequenz von 20,1 %. Bei der detektierten Mutation kam es zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin (G12A). Das untersuchte Areal 1 zeigte entsprechend der Ergebnisse aus den Vorversuchen eine Mutation im *KRAS* Codon 12/13 (G12A). In beiden Fällen handelte es sich um dieselbe Punktmutation. Im LMD-Ansatz zeigte die gefundene *KRAS*-Mutation mit einer Frequenz von 99,6 % eine höhere Mutationsfrequenz verglichen mit der Routinediagnostik (Tab. 35). Im untersuchten Areal 2 konnten für *BRAF* Codon 464 und 600, sowie *NRAS* Codon 117 wildtypische DNA-Abschnitte festgestellt werden. Die Pyrosequenzierung lieferte für das Areal 2 in allen anderen Codons für *KRAS* und *NRAS*-Mutationen keine Ergebnisse. Die für die Analyse geschnittenen Gewebeanteile enthielten für eine vollständige Untersuchung von allen *RAS*- und *BRAF*-Kits zu wenig DNA. Ein Nachschneiden von Areal 2 für einen erneuten Ansatz war aufgrund von fehlendem Gewebe nicht mehr möglich.

Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der LMD-Mutationsanalyse für *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* durch Pyrosequenzierung des Falls 3: 6978; Probe II8. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). **Routine:** Die Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse der Pyrosequenzierung die durch Routineverfahren (Kapitel 3.1.3.) gewonnen wurden. **LMD:** Die Tabelle listet die Ergebnisse der Pyrosequenzierung auf, die mittels LMD-PCR-Pyrosequenzierung generiert wurden. Insgesamt sind zwei verschiedene Tumorbereiche innerhalb des Gewebeschnitt 6978 II8 untersucht worden (Areal 1 und 2). Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen in roter Schrift und Wildtypsequenzen in schwarzer Schrift. Im Areal 2 sind Analysen, die kein Ergebnis erbrachten, mit **N/R** (no result) gekennzeichnet.

	Probe	<i>KRAS</i>					<i>BRAF</i>		<i>NRAS</i>				
		12/13	61	59	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Routine	6978 II8	20,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
LMD	6978 II8 Areal 1	99,6 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II8 Areal 2	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Wt	Wt	N/R	N/R	N/R	Wt	N/R

3.3.4 Patientenfall 3: Vergleichende Übersichtsdarstellung

Ein Vergleich von Routineanalysen und LMD-Analysen zum Patientenfall 6878 mit den Gewebeproben II3, II5 und II8 (Tab. 36) zeigte eine HLM von *KRAS* 12/13 in allen analysierten Gewebeproben inklusive aller Bereiche, mit Ausnahme von 6978 II5 Bereich 1. Dabei handelte es sich um eine *KRAS*-Mutation im Codon 12/13 mit einer Punktmutation, bei der es zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin (G12A) kommt. Einige Besonderheiten der getesteten Analysen sind zusammenfassend in Tabelle 36 und Abbildung 23 hervorgehoben.

Tabelle 36: Gesamtdarstellung der Ergebnisse von Routineanalyse und LMD-PCR-Pyrosequenzierung zum Fall 3: 6978. Getestet wurden die Gewebeproben gegen *KRAS* (blau unterlegt), *BRAF* (rot unterlegt) und *NRAS*-Aminosäureaustausch (grün unterlegt). Dargestellt sind getestete High-level-Mutationen in roter Schrift, potenzielle Low-level-Mutationen in grüner Schrift und Wildtypsequenzen in schwarzer Schrift). Proben, mit denen keine Analyse durchgeführt wurden, sind mit **N/A** (not available) markiert. Proben der Fallnummer 6978 II8, die in der Pyrosequenzierung kein Ergebnis hervorbrachten, sind mit einem **N/R** (no result) gekennzeichnet. **A1-3 (Areal 1-3)** entspricht den einzelnen untersuchten Arealen.

	Probe	KRAS					BRAF		NRAS				
		12/13	61	51	117	146	600	464	12/13	61	59	117	146
Fall 3: Routine	6978 II3	15,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5	18,5 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		18,3 G12A	Wt	N/A	N/A	N/A	Wt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	6978 II8	20,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
Fall 3: LMD-PCR-Pyro	6978 II3	A1	70,7 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		A2	70,2 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	PLLM 4,8 V600D PLLM 5,0 V600D	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II5	A1	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		A2	56,1 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		A3	100 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
	6978 II8	A1	99,6 G12A	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt
		A2	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Wt	Wt	N/R	N/R	N/R	Wt

In allen vergleichenden Proben der Routine und LMD-PCR-Pyro zeigten die Analysen, die durch LMD angefertigt und ausgewertet wurden, eine höhere Mutationsfrequenz für die G12A-Punktmutation als in der Routine (Tab. 36: Spalte *KRAS* 12/13). Teilweise konnte eine bis zu 5-fach höhere Mutationsfrequenz festgestellt werden (Tab 36: vgl. 6978 II5 A3 und II8 A1). Im Bereich des Gewebeblocks 6978 II8 Areal B1 ergab sich eine Differenz der Mutationsfrequenz von 79,5 Prozentpunkten. Bei der Analyse des Gewebeblocks 6978 II5 B3 zeigte sich eine Differenz von 81,5 Prozentpunkten. Das benachbarte Areal 2 in 6978 II5 zeigte eine Steigerung von 37,6 Prozentpunkten und lag somit bei einer 3-fachen Erhöhung der Analysewerte durch das LMD-Verfahren. Die analysierten Areale des Gewebeblocks II3 lagen bei LMD-Methode mit einer Frequenz von 70,7 % (Abb. 23: II3 A1) und 70,2 % (Abb. 23: II3 A2) in einem annähernd gleichen Frequenzmuster.

In beiden Bereichen des Gewebeblocks II3 A1 und A2 konnte jeweils eine annähernd 4-fache Steigerung erzielt werden. Es konnte eine Steigerung von 55,2 Prozentpunkten für A1 und 54,7 Prozentpunkte für A2 gegenüber der Routineanalyse errechnet werden.

Im Areal 1 des Gewebeschnitts II5 konnte als einziger Bereich keine Mutation im *KRAS*-Codon 12/13 festgestellt werden und zeigte wildtypische Sequenzen (*Wt*) für *RAS*-/ *RAF*. Für Proben des Gewebeblocks 6978 II8 A2 konnten ausschließlich für *BRAF* 600, *BRAF* 464 und *NRAS* 117 Analyseergebnisse generiert werden (Tab. 36 und Abb. 23: LMD-PCR-Pyro 6978 II8 A2). Für die restlichen *RAS*-/*RAF*-Codons wurden die erforderlichen DNA-Konzentrationen unterschritten.

Die Probe 6978 II3 A2 zeigte in der LMD-Methode, zusätzlich zur bekannten G12A-Mutation, eine zusätzliche PLLM V600D mit einer Mutationsfrequenz von 4,8 % im Codon *BRAF* 600. Zur Klärung der Echtheit dieser Mutation wurde eine von der vorherigen Analyse unabhängige Wiederholung über das LMD-PCR-Pyro-Verfahren durchgeführt. Die Wiederholungsanalyse bestätigte eine PLLM des *BRAF* Codons V600D mit einer Mutationsfrequenz von 5,0 %. Diese PLLM konnte weder in der Routineanalyse des gleichen Gewebeblocks (Tab. 36: Routineergebnisse, Abb. 23: LMD-PCR-Pyrosequenzierung 6978 II3 B2) noch in angrenzenden Gewebelöcken mittels LMD-PCR-Pyrosequenzierung detektiert werden.

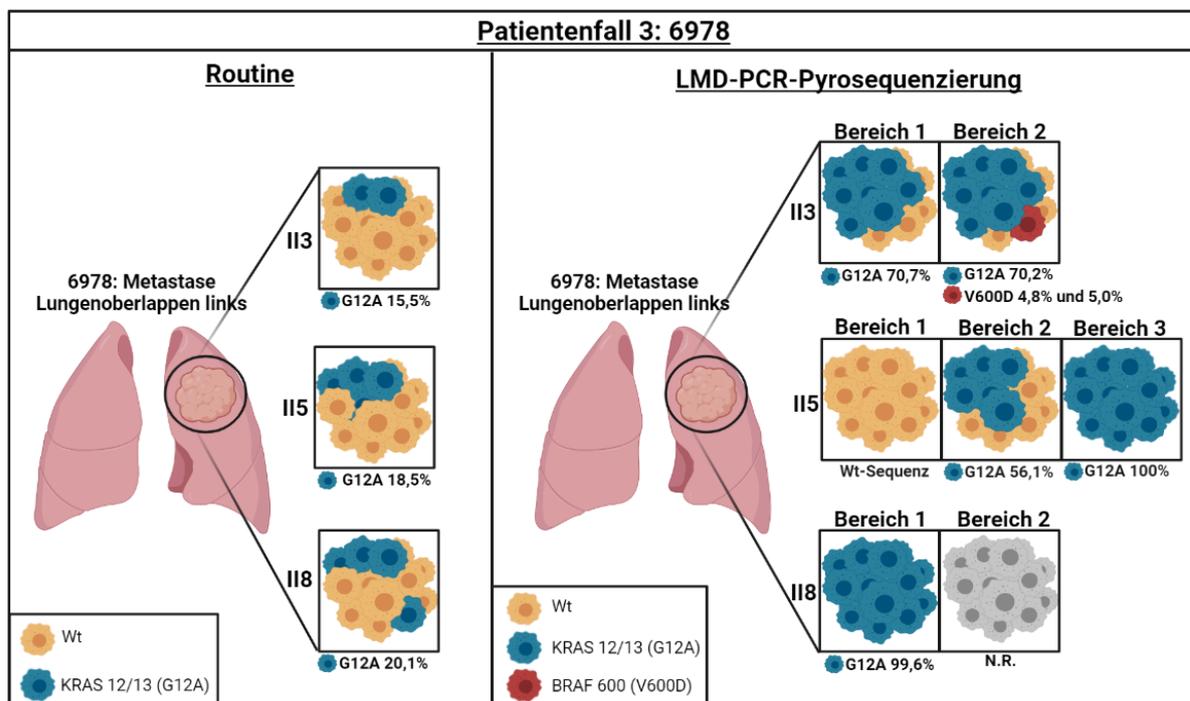


Abbildung 23: Übersichtsdarstellung der vergleichenden Analysen von Routineanalyse und LMD-PCR-Pyrosequenzierung des Patientenfalls 6978. Abgebildet ist die metastatische Absiedelung im linken Lungenoberlappen (6978: II3-II8) eines neoadjuvant therapierten Kolonkarzinom. In der linken Bildhälfte sind die Ergebnisse der Routineanalysen dargestellt. Die verschiedenfarbigen Zellen (blau, braun) stellen verschiedene Tumorzellen unterschiedlicher Entität an differenten Stellen der Metastase dar. Die *RAS*-Mutation *KRAS* 12/13 ist in blau und Zellen mit wildtypischer Sequenz (*Wt*) ohne nachweisbare *RAS*-/*RAF*-Mutation in braun dargestellt. Mutationsfrequenzen in Prozent [%] dar, die für die *KRAS* 12/13 Mutation (blaue Zelle) durch Pyrosequenzierung gemessen wurde (Gewebeblock II3 15,5 %, II5 18,5 % und II8 20,1 %). Die rechte Bildhälfte stellt die Ergebnisse der LMD-Analysen dar. Die Tumormasse wurde in verschiedene topografische Bereiche (B1-3) unterteilt. Die verschiedenfarbigen Zellen (blau, rot, braun und grau) stellen verschiedene Tumorzellen unterschiedlicher Entität an differenten Stellen der Lunge dar. Die *KRAS* 12/13-Mutation ist mit blauen, die *BRAF* 600-Mutation mit roten und die wildtypischen Sequenzen (*Wt*) mit braunen Zellen dargestellt. Bereich 2 aus dem Gewebeblock II8 liefert keine Ergebnisse für *KRAS* 12/13 und *BRAF* 600 (Zellen in grau) und ist mit N.R. (no result) gekennzeichnet. Die dargestellten Zahlen unterhalb der Tumorabbildungen stellen die Mutationsfrequenzen in Prozent [%] dar, die für die *KRAS* 12/13 Mutation (II3: B1 70,7% und B2 70,2 %; II5: B2 56,1 % und B3 100 %; II8: B1 99,6 %) durch Pyrosequenzierung gemessen wurden (Gewebeblock II3 15,5%, II5 18,5% und II8 18,3%) und *BRAF* 600 Mutation (II3 B2: Doppelbestimmung 4,8% und 5,0%). Created with BioRender.com.

4 Diskussion

Die S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom (2020) (Kapitel 9.2.: Initiale molekularbiologische Diagnostik vor Therapieeinleitung) fordert eine molekularpathologische Charakterisierung des Mutationszustands von *RAS*-Genen (*KRAS* und *NRAS*), sowie des *BRAF*-Gens, möglichst vor Einleitung einer Erstlinientherapie zur prognostischen Einschätzung und Erhebung prädiktiver Informationen über den Tumor. Die Identifizierung des Mutationsstatus im CRC wird als notwendige Voraussetzung für eine optimale Therapie angesehen. In verschiedenen Studiendesigns, u.a. PRIME und OPUS, konnte retrospektiv herausgefunden werden, dass Mutationen in *KRAS*- oder auch *NRAS*-Codons bei Verwendung eines anti-EGFR Antikörpers als Add-on-Therapie zur FOLFOX Chemotherapie, zu einem signifikant schlechteren progressionsfreien Überleben und der Gesamtüberlebensrate führen (Douillard et al. 2013; Bokemeyer et al. 2015). Nach Feststellung, dass *RAS*-Mutationen zu einem fehlenden Therapiebenefit und folgend zu einem schlechteren Outcome führen (Lièvre et al. 2006; Amado et al. 2008), wurden verschiedene Analyseverfahren für die Detektion von Mutationen etabliert. Diese gliederten sich zum einen in verschiedene gradientenbasierte Elektrophoreseverfahren (Kressner et al. 1998; Hayes et al. 2000; Zhao et al. 2004) und zum anderen in selektive Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (PCR) (Poehlmann et al. 2007). (Matsunaga et al. 2016) verglichen vier verschiedene PCR-basierte Analysemethoden miteinander (direkte Sequenzierungsmethode (Jonker et al. 2007), Luminex xMAP (Khan et al. 2009), Scorpion-ARMS (Kimura et al. 2006) und Pyrosequenzierung (Ahle et al. 2005)). Es zeigte sich, dass die Pyrosequenzierung allen Methoden der DNA-Mutationsanalyse ebenbürtig war. Der Vorteil im Einsatz der PCR-Pyrosequenzierungsmethode liegt in einem kosten- und zeiteffizienten, hoch sensitiven, hoch spezifischen und reproduzierbaren System mit gutem Detektionserfolg (Matsunaga et al. 2016). Im Bundeswehrkrankenhaus Ulm werden zum aktuellen Zeitpunkt alle zu untersuchenden Proben eines CRC mittels PCR und anschließender Pyrosequenzierung untersucht. Einer der ersten Schritte in dieser Arbeit war die Validität der Ergebnisse der Routinediagnostik zu untersuchen (Kapitel 3.1ff.). Zusätzlich konnten die neu erhobenen Mutationsfrequenzen mit den

bereits bestehenden Frequenzen verglichen werden und durch weitere Gewebeblöcke des Tumors oder ihrer metastatischen Absiedelungen ergänzt werden. Dies ermöglichte eine erweiterte Kartierung der Mutationsmuster der analysierten Patientenfälle und diene einer besseren Beurteilung der räumlichen Verteilung von Mutationen. Eine weitere Methode der Untersuchung hinsichtlich von Mutationsmustern im CRC stellt das in dieser Arbeit etablierte LMD-PCR-Pyrosequenzierungsverfahren da. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein Mikroskopie-basiertes Verfahren, bei dem einzelne distinkte Tumorbereiche für die Analyse separiert und anschließend über das etablierte Verfahren der PCR und Sequenzierung von Proto-Onkogenen analysiert werden können. Einerseits bietet dieses Verfahrens den Vorteil einer morphologisch stratifizierten Analyse von Tumorgewebe hinsichtlich verschiedener Tumormorphologien. Andererseits bietet sich die Chance, die räumliche Verteilung einzelner molekularer Subpopulationen in einem Tumor zu kartieren und dadurch das Vorliegen möglicher Tumorheterogenität zu überprüfen. Im gegenwärtigen Routineverfahren wurden lediglich makrodissezierte Tumorareale untersucht, bei denen hauptsächlich Mutationen mit hohen *RAS/RAF*-Mutationsfrequenzen (HLM) abgebildet wurden. Ein möglicher Grund hierfür war, dass Mutationen mit niedrigen Frequenzmustern (PLLM) aufgrund von zu niedrigen LOD in der extrahierten DNA von großen Mutationsfrequenzen der Major-Mutationen überschattet und dadurch womöglich nicht identifiziert werden konnten.

4.1 Etablierung des Lasermikrodissektions-Mikroskops für Routineanalysen beim kolorektalen Karzinom

Die Lasermikrodissektionsmikroskopie (LMD) ist eine Methode zur Analyse von Mutationen bei bestehender Gewebheterogenität (Jensen 2013). Dabei wird Gewebe auf spezielle Objektträger aufgebracht, die aus einer Polymermembran bestehen. Im Anschluss werden die Gewebeschnitte mit herkömmlichen Färbemethoden histologisch gefärbt und unter mikroskopischer Kontrolle eines Lichtmikroskops durch einen integrierten UV-Laser geschnitten (Jensen 2013). Dies ermöglicht die lichtmikroskopische Identifizierung kleiner Gewebeareale mit spezifischen Zellpopulationen, die selektiv geschnitten und analysiert werden können. Der in das Mikroskop integrierte UV-Laser schmilzt die Polymermembran,

sodass die auf die Membran aufgebrachten Zellverbände in ein darunter befindliches Auffangbehältnis fallen (Jensen 2013). Alle nachfolgenden Analyseschritte wie DNA-Extraktion, DNA-Amplifikation durch PCR und die letztendliche Analyse über Pyrosequenzierung sind entsprechend verschiedener etablierter Standardverfahren möglich (Cortes et al. 2015; Poehlmann et al. 2007; Dufort et al. 2009; Jensen 2013; Maitra et al. 1999). Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Methode der LMD-PCR-Pyrosequenzierung zu etablieren, um die Routineanalysen mit dem LMD-Verfahren zu vergleichen. Der erste Schritt in der Etablierung war es herauszufinden, mit welcher Gewebedicke gearbeitet werden kann. Einerseits sollten die Gewebeschnitte möglichst dick geschnitten werden, um die Anzahl der enthaltenen Zellen im Präparat zu erhöhen. Die in den Zellen enthaltene DNA wurde im nachfolgenden Schritt durch DNA-Extraktion aus den Zellen freigesetzt. Die DNA-Konzentration in den Proben war ein entscheidender Faktor für alle nachfolgenden Schritte wie PCR und Pyrosequenzierung, da ohne eine ausreichende DNA-Menge die nachfolgenden Arbeitsschritte nicht möglich waren. Verschiedene Arbeitsgruppen postulierten die Verwendung von mehreren hundert bis tausenden von Zellen als ausreichend (Böhm et al. 1997; Specht et al. 2001). Dicke Gewebepräparate verschlechtern die optische Auflösung von Schnitten in der Mikroskopie, da die histologische Darstellung von Gewebegrenzen verstreicht und dies zu einer detailärmeren Darstellung führt. Dünne Gewebepräparate garantieren eine detailreiche Auflösung in der Mikroskopie, generieren jedoch auch geringere DNA-Mengen für die nachfolgenden Analyseverfahren (Coope et al. 2021). Die Austrocknung der Gewebeschnitte auf den LMD-Objektträgern, da kein Eindeckmedium und Deckgläser verwendet werden, führt im Allgemeinen zu einer schlechteren optischen Auflösung der einzelnen Gewebeschnitte (Fend et al. 2000; Jensen 2013; Curran et al. 2000). So musste im ersten Etablierungsprozess ein Kompromiss zwischen der Generierung von ausreichenden DNA-Konzentrationen der Proben für nachfolgende Analyseprozesse und einer guten optischen Auflösung von Gewebeschnitten gefunden werden. Die Ergebnisse (Kap. 3.2.1.1.) zur Gewebedicke der Präparate konnten in Bezug auf eine gute optische Auflösung zeigen, dass Gewebeschnitte mit einer Gewebedicke zwischen 4 und 8 μm eine gute detailreiche Darstellung der Strukturen ermöglichten. Schnitte, die mehr als 8 μm Schnittdicke aufwiesen, zeigten eine schlechte Qualität bei der histologischen Betrachtung unter dem

Mikroskop. Vergleichend zu unseren Erkenntnissen empfehlen Curran et al. (2000) die Verwendung von 7 µm dicken Gewebeschnitten. Das nachfolgende Ziel der Etablierung war die Erfassung der Anzahl der benötigten Areale für eine erfolgreiche PCR-Analyse und insbesondere die benötigte Konzentration für eine erfolgreiche PCR Durchführung. Nach der DNA-Extraktion wurde ein Farbstoff verwendet, welcher an die DNA bindet und dabei Fluoreszenz emittiert. Diese Emission wurde gemessen und anhand der Menge an emittierten Photonen in eine Konzentration umgerechnet. Das Verfahren ermöglichte es Konzentrationen im Bereich von 0,2–100 ng zu messen. Bei allen durchgeführten LMD-Versuchen konnten, aufgrund der niedrigen DNA-Konzentrationen, keine Konzentrationen ermittelt werden. Während in den Routineanalysen die Schnitte eine Dicke von 10 µm aufwiesen, waren die beim LMD verwendeten Schnitte deutlich dünner und lagen optimal im Bereich von 4 bis 8 µm, um eine gute mikroskopische Auflösung der Gewebeproben zu gewährleisten. Ein weiterer Grund für die zu niedrige DNA-Konzentration im LMD-Ansatz könnte darin begründet sein, dass bei den Routineanalysen die gesamten Tumorareale auf dem Objektträger von insgesamt 3-7 aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten verwendet wurden. Eine Abgrenzung verschiedener Tumorzonen oder histologischer Tumorentitäten, wie bspw. muzinöse gegen glanduläre Tumorareale, kam innerhalb des Standardverfahrens nicht zum Tragen. Somit ließ sich über die Schnittdicke und über die verwendete Menge an Gewebe erklären, warum es bei Routineanalysen zu detektierbaren DNA-Konzentrationen kam, während eine Bestimmung in den LMD-Analysen fehlschlug. Eine Lösung wäre die Verwendung eines hochsensitiven DNA-Detektionskits, das bereits deutlich niedrigere DNA-Konzentrationen zu erfassen vermag. Hiermit könnte direkt im Anschluss an das LMD-Verfahren die Menge der gewonnenen DNA bestimmt werden. Die nicht-detektierbaren DNA-Konzentrationen im Ansatz des LMD-Versuchsaufbaus verdeutlichten die technische Limitierung dieses neuen Analysesystems. Verschiedene Autoren empfehlen den Einsatz von 10-100 ng genomischer DNA als DNA-Template (Poehlmann et al. 2007; Dufort et al. 2009; Cortes et al. 2015). Cummings et al. (2013) empfehlen die Verwendung von 10-20 ng genomischer DNA bei Durchführung einer PyroMark PCR. Der Einsatz von DNA-Konzentrationen unter 10 ng würde zu suboptimalen Bedingungen führen und die Störanfälligkeit von Versuchsansätzen fördern. Der Einsatz von zu wenig DNA führt dazu, dass verschiedene Primer möglicherweise nicht die komplementären DNA-

Bindestellen erkennen (Kreutz et al. 2013). Somit kann es zu falschen Negativergebnissen kommen, da potenziell vorhandene Mutationen nicht in ausreichender Menge für eine Sequenzierung amplifiziert werden. Eine spezifische PCR-Amplifikation stellt die Grundlage einer erfolgreichen Pyrosequenzierung dar (Kreutz et al. 2013). Da die Konzentration der DNA vor einer PCR nicht bestimmt werden konnte, wurden blind-PCR-Analysen durchgeführt. Die verwendete Konzentration konnte nur grob anhand der zugeschnittenen Gewebemenge abgeschätzt werden. Aber auch bei der Verwendung von Formalin innerhalb eines Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebes (FFPE) kann zu einer Brückenbildung innerhalb der DNA-Basen kommen, die eine PCR-Amplifikation der DNA behindert und so zu einer geringeren Amplifikatmenge führt (Marchetti et al. 2006; Bellevicine et al. 2017). Bei großen DNA-Mengen kommt dieses Phänomen nicht zu tragen, da ausreichend DNA für eine erfolgreiche Sequenzierung vorhanden ist. Bei zu geringer DNA-Menge kommt es zu unzureichenden Ergebnissen in der Mutationsanalyse, da eventuell Sequenzen mit vorhandenen Mutationen nicht ausreichend amplifiziert werden, sollte die Brückenbindung im Bereich der Mutation liegen. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1.2 zeigen einen Zusammenhang zwischen eingebrachter DNA-Menge (Arealgröße und Gewebedicke) und dem Erhalt einer erfolgreichen Sequenzierung (Abb. 8). Je mehr Gewebe in die Analyse eingebracht wurde, desto höher war die Wahrscheinlichkeit ein positives Sequenzierungsergebnis zu erhalten. Gemäß Herstellerprotokoll wird die Verwendung von Gewebeschnitten mit mindestens 20 % Tumorgehalt des analysierten Gewebes und die Verwendung von einer Schnittfläche von 4mm² Gewebe empfohlen. Ab einer Arealgröße von 350 x 350 µm und der Verwendung von 11 Schablonen konnte ein positives Sequenzierungsergebnis erhalten werden (Abb. 9). Dies ergab eine Gesamtschnittfläche von 1,3475 mm². Kleinere Schablonengrößen und geringere Mengen der verwendeten Schablonen führten zu einem inkonsistenten Sequenzierungsergebnis. Gleichermaßen verhielt es sich in Bezug auf die angefertigten Schnittdicken. Bei einem Gewebeareal von 350 x 350 µm und aufsteigender Anzahl an verwendeten Schablonen konnten bei Schnittdicken von 8 µm gute Ergebnisse in der Pyrosequenzierung erzielt werden. Auch bei der Verwendung von 10 µm dicken Schnitten konnten erfolgreiche Sequenzierungen durchgeführt werden, die jedoch in der Lichtmikroskopie der verwendeten Gewebeproben zu einer schlechten optischen Auflösung geführt

haben und daher nicht verwendet wurden (Abb. 6). Daher wurden alle Analysen unter Verwendung von 8 µm Schnitten und unter Einsatz von möglichst viel Gewebe durchgeführt. In einer vergleichenden Studie konnten aus 10µm dicken FFPE-Gewebeschnitten 4-12 ng/mm² DNA gewonnen werden. Für eine erfolgreiche NGS-Analyse mussten entsprechend 15-50mm² Gewebe durch ein LMD-Verfahren aufgearbeitet werden (Coope et al. 2021). Dies konnte in unseren Analysen nicht erreicht werden. Die Limitierung des Einsatzes an verwendetem Gewebe für Mutationsanalysen, war in dieser Arbeit das Tumorareal selbst. Mit fortschreitender Aufstufung des Tumorgewebeblocks für die o.g. Analysen kam es entweder zu massiven Veränderungen des Tumorgewebes, dass die für die Untersuchung vordefinierten Areale nicht mehr vorhanden waren, oder das Tumorareal wurde so weit aufgestuft, bis kein Tumor mehr auf den Gewebeblöcken enthalten war. Die Erträge an DNA aus FFPE-Gewebeschnitten variieren je nach verwendetem Gewebe stark (Coope et al. 2021; Haile et al. 2019).

Eine weitere Möglichkeit, die DNA-Konzentration zu erhöhen, war es dem Sequenzierungsansatz mehr DNA zuzuführen. Dies konnte in Anbetracht dessen, dass die DNA-Konzentration nicht messbar war, nur dadurch erreicht werden, dass man größere Mengen des PCR-Amplifikats der Sequenzierung zuführte. Im Routine-Protokoll wurden 10 µl des PCR-Amplifikats für die Sequenzierung verwendet. Die Ergebnisse (Kapitel 3.2.2) der Untersuchung ergaben, dass eine höhere Anzahl an erfolgreichen Sequenzierungsanalysen möglich war, wenn 15 µl Amplifikat in die Sequenzierung eingebracht wurde. Durch die Kenntnis, dass DNA über statische Wechselwirkungen an die Wände von Reaktionsgefäßen binden kann (Douillard et al. 2013), wurden sog. DNA-low-binding-Tubes verwendet. Diese sollen eine DNA-Bindung an die Gefäßwände verhindern und den Verlust von DNA in den Reaktionsansätzen minimieren.

Insgesamt zeigte das Setup unter Verwendung von low-binding-Tubes, 8 µm dicken Gewebeschnitten und einer Verwendung von maximal großen Gewebeschnitten mit einer Veranschlagung von ungefähr 4 mm² Tumorfläche je Analyse, einen funktionalen Ansatz zur Bearbeitung der Fragestellung. Insgesamt konnten in 6 von 6 analysierten LMD-Gewebeproben des Patientenfalls 1: 6880 (Kap. 3.3.1.ff.) und in 6 von 7 analysierten Gewebeproben des Patientenfalls 3: 6978 (siehe Kap. 3.3.3.ff.) erfolgreiche Mutationsanalysen durchgeführt werden. Im Patientenfall 6978 II8 Areal 2 konnten in der Sequenzierung für *KRAS* und *NRAS*, exklusive

NRAS 117, keine Ergebnisse gewonnen werden. Die für die Analyse geschnittenen Gewebeanteile enthielten für eine vollständige Untersuchung von allen extendierten *RAS*- und *BRAF*-Kits zu wenig DNA. Insbesondere das Areal 2 zeigte in der Schnittführung der Gewebeschnitte mit fortschreitender Aufstufung eine Nekrose des Tumorareals, sowie eine Reduktion der im Paraffinblock vorhandenen Gewebefläche bis zum vollständigen Verlust der Tumormasse. Ein Nachschneiden von Areal 2 für einen erneuten Ansatz war aufgrund der vollständigen Aufarbeitung des Tumorgewebes für erneute Analysen nicht mehr möglich.

4.2 Routineergebnisse

4.2.1 Die Routinemethode bildet alle hochfrequenten Hauptmutationen ab

In den Patientenfällen 1-6 konnten, entsprechend den Routineuntersuchungen der Molekularpathologie am BwKrhs Ulm, alle Hauptmutationen erneut detektiert werden (Tab. 28). Diese Ergebnisse verdeutlichten eine Reliabilität des PCR-Pyrosequenzierungsverfahrens für die Analyse von Tumorgeweben bei Patienten mit CRC. Das Verfahren der Pyrosequenzierung zeichnet sich als ein hoch spezifisches und sensitives, sowie reproduzierbares und untersucherunabhängiges System zur Analyse von *RAS*-Mutationen aus (Matsunaga et al. 2016). Die Patientenfälle 3-6 zeigten hohe Übereinstimmungen der Mutationsfrequenzen. Alle Analysen besaßen mit einer Abweichung von maximal 6,4 %-Einheiten identische Mutationsfrequenzen zu den Routineergebnissen (siehe Mutationsfrequenzen der einzelnen Fälle 3-6 in Tab. 28). In den Patientenfällen 3 und 6 zeigten die neu detektierten Mutationsfrequenzen mit < 1 %-Einheiten identische Ergebnisse zu den bestehenden Analysen (Tab. 24 und 28: Fall 3 *KRAS12/13*: neue Analyse 18,5 % zu Routine 18,3 % und Tab. 27 und 28: Fall 6 *BRAF 600*: neue Analyse 29,8 % zu Routine 28,9 %). In Fall 1 und Fall 2 wurden keine vergleichenden Doppelbestimmungen durchgeführt. In Fall 2 (Tab. 23: *KRAS 146* im Bereich 73,7 % bis 69,6 %) und Fall 3 (Tab. 24: *KRAS 12/13* im Bereich 15,5 % bis 20,1 %) zeigten alle untersuchten Gewebelöcke geringe Differenzen hinsichtlich der Mutationsfrequenzen. Dies deutete darauf hin, dass die Mutationsfrequenzen dieser Patientenfälle keinen räumlichen Unterschieden unterlagen und in allen Bereichen ähnlich stark ausgeprägt waren. Gegenteiliges ließ sich für Patientenfall 6 (Tab. 27 und 28) beobachten. In den aufeinanderfolgenden Schnitten 8119 III8, III26 und

III41 zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Mutationsfrequenzen im *BRAF*-Gen. Während im Gewebeblock III8 die höchste Frequenz mit 29,8 % festgestellt werden konnte, zeigt sich im letzten Block III41 lediglich eine Mutation von 6,7 %. Identisches ließ sich im Patientenfall 1 feststellen. Im Fall 1 (vgl. Tab. 22 und 28) zeigten sich für *KRAS 12/13* Mutationsfrequenzen von 8,9 % (Block 6880 I5), 40,5 % (6880 I6) und 46,5 % (6880 I7). Diese Ergebnisse zeigten eine Zunahme der Mutationsfrequenzen mit aufsteigenden Gewebeblocknummerierung. Dies ist vermutlich durch mehr Tumorgewebe auf den nachfolgenden Gewebeschnitten zu erklären. Mit einer Veränderung des FFPE-Gewebes kommt es auch zu einer Veränderung der DNA Menge im Tumorgewebe (Coope et al. 2021; Haile et al. 2019). Eine Ausnahme dieser ansteigenden Mutation bildete Gewebeblock 6880 I8. In diesem Gewebeblock war keine Mutation für *KRAS 12/13* detektierbar (vgl. Tab. 22 und 28). Die Ergebnisse zeigten die molekulare Heterogenität des CRC. *KRAS*-Mutationen stellen, je nach Autor, mit ca. 30 - 50% die häufigsten *RAS/RAF*-Mutationen des CRC dar (Poehlmann et al. 2007; Sahin et al. 2013; Guo et al. 2018). Davon stellen ca. 90% *KRAS 12/13* Mutationen dar (Breivik et al. 1994; Poehlmann et al. 2007). Kosmidou et al. (2014) konnten nachweisen, dass innerhalb eines Tumorzentrums *KRAS*-Mutationen neben Arealen mit WT-Sequenzen existieren. Die Studie konnte auch zeigen, dass in 44% aller untersuchten CRC-Proben eine intratumorale Heterogenität von *KRAS* existiert. Nicht nur im Gewebeblock 6880 I8, sondern auch in Gewebeblocken der anderen Tumorausdehnungen (6407: Leber und 6487: Rektum) ließ sich die *KRAS*-Mutation nicht nachweisen. In diesen Fällen ist es nötig mehrere Schnitte bezüglich ihrer Mutationsmuster zu analysieren, da Mutationen innerhalb des Tumors sehr inhomogen auftreten (Kosmidou et al. 2014). Da eine einzelne Analyse diese Variabilität nicht aufzuzeigen vermag, ist es empfehlenswert in einem Analyseverfahren mehrere Gewebeblocke, aber auch weitere Tumorlokalisationen inkl. der Metastasen zu analysieren. Zusammenfassend lässt sich aber festhalten, dass alle zu erwartenden Hauptmutationen aus den Routineanalysen konkordant in der Doppelbestimmung mit dem Verfahren der Pyrosequenzierung detektiert werden konnten.

4.2.2 Die Routinemethode bildet mögliche niedrigfrequente Minor-Mutationen ab

Die Patientenfälle 1, 4 und 5 zeigten Differenzen zu den bestehenden Ergebnissen. Im Fall 5 (6515, Tab. 26 und 28) zeigte sich eine Differenz der Ergebnisse zwischen den Analysen des Routineverfahrens und dieser Arbeit. Während bei der Routineanalyse im *NRAS 146* eine Wt-Sequenz detektiert wurde, zeigte sich in der Analyse dieser Arbeit eine *A146T* Mutation mit einer Mutationsfrequenz von 8,8 %. Dieses Ergebnis lässt drei mögliche Schlussfolgerungen zu. Möglicherweise handelt es sich um einen Messfehler. Die Methode der Pyrosequenzierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wodurch sie anfällig für Fehler wird (vgl. Kapitel 4.1). Um ein Ergebnis zu erhalten, benötigt man eine ausreichende DNA-Konzentration, da zu geringe Mengen ein unspezifisches PCR-Produkt fördern. Die DNA-Konzentration wird überprüft, indem man aus den Lyse-Extraktionen der jeweiligen Proben die Konzentration bestimmt, bevor man eine PCR durchführt. Im Analyseansatz Fall 5 zeigte sich nach DNA-Extraktion eine DNA-Konzentration von 11,8 ng/µl und diese war ausreichend für den nachfolgenden Analyseschritt. Die PCR wurde, wie alle anderen Analysen des Routineverfahrens mit 10 ng in 5 µl Ansatz beladen. Somit kann eine zu niedrige Konzentration im Versuchsansatz ausgeschlossen werden. Die zweite Möglichkeit liegt in der Verfälschung des Ergebnisses durch verschiedene Arbeitsschritte, bei denen es zu einer Kontaminierung des Ansatzes kommen kann. Daher wurde mit der gleichen DNA-Extraktionslösung eine Wiederholung der PCR-Pyrosequenzierung durchgeführt. Es ergaben sich im ersten Versuchslauf eine potenzielle Mutation mit einer Mutationsfrequenz von 4,8 % und in einer Wiederholung eine hochpotente Mutation von 8,8 %. In dieser Arbeit wurden fragliche Mutationen dann als reale Mutationen gewertet, wenn sie in zwei aufeinanderfolgenden und in voneinander unabhängigen Wiederholungsanalysen erneut gefunden wurden. Ein dritter Erklärungsansatz für eine Differenz zwischen Routine und dieser Arbeit könnte möglicherweise eine Tumorerheterogenität im Gewebe selbst bzw. innerhalb verschiedener Gewebeabschnitte sein. Für eine erneute Analyse der Gewebeproben über die Verwendung der LMD-Methodik wurden aus dem bereits angeschnittenen Gewebblock erneut Schnitte angefertigt. Wie bereits in Kapitel 4.2.1. diskutiert, zeigten manche Patientenfälle räumliche Variabilität, die neben einer unterschiedlichen Verteilung innerhalb eines einzelnen Gewebeschnittes auch

durch ein fortschreitendes Aufstufen von Gewebeblöcken zu erklären wäre, wodurch zusätzliches Tumorgewebe zur Analyse kommt oder auf vorangegangenen Schnitten enthaltene Tumorklone schwächer oder nicht mehr vertreten sind. So könnte neben der *BRAF 600* Hauptmutation in Fall 5 die Existenz einer Nebenmutation zu erklären sein, die in einem vorherigen Routineansatz noch nicht zu identifizieren war. Im Fall 1 Probe 6880 und Fall 4 Probe 6703 1 zeigten sich ähnliche Phänomene, bei denen neben der konstant detektierten Hauptmutation (Tab 22 und 28: Fall 1: *KRAS 12/13*, Tab. 25 und 28: Fall 4 *BRAF 600*;) weitere Mutationen gefunden wurden. Im Fall 4 Probe 6703 1 konnte im Codon 61 des *KRAS*-Gens eine PLLM mit einer Frequenz von 6,1 % identifiziert werden, die auch in einer Versuchswiederholung mit einer Frequenz von 5,1 % erneut zu identifizieren war. In Fall 1 zeigte sich eine zusätzliche *NRAS 146* Mutation. In zwei voneinander unabhängigen Analysen konnte die A146T Mutation mit 8,6 % und 10,9 % detektiert werden. Auch hier könnte es sich möglicherweise um Tumorheterogenität handeln. Bei Mutationen mit niedrigen Frequenzen scheint die PCR-Pyrosequenzierung fehleranfällig zu sein und benötigt ggf. Doppelbestimmungen, um Mutationen zu bestätigen. Dies bedeutet, dass ein sicherer Ausschluss von falsch identifizierten Ergebnissen entweder nur über Doppelbestimmungen oder über ein anderes sensibleres Verfahren wie Next-Generation-Sequencing (NGS) geprüft werden kann. Ob es sich tatsächlich um Heterogenität innerhalb unterschiedlicher Tumorareale handelt, kann möglicherweise über die Verwendung der LMD-Methode besser geklärt werden. Hierauf wird im Folgenden eingegangen.

4.3. LMD-PCR-Pyrosequenzierung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Versuchen und deren Ergebnisse, die über das Verfahren der LMD-PCR-Pyrosequenzierung angefertigt und analysiert wurden. Die Auswahl von zwei geeigneten Patientenfällen für die LMD-Analysen wurde anhand der Routineergebnisse (s. Kapitel 3.1.6: Abb. 28) vorgenommen. Eine Entscheidung für den Patientenfall 1 (6880 I5, I6 und I8) und den Patientenfall 3 (6978 II3, II5 und II8) erfolgte aufgrund entgegengesetzter Analyseergebnisse in der Routinediagnostik. In allen analysierten Gewebeblöcken des Patientenfalls 3 zeigte sich eine homogene high-level-Mutation des *KRAS*-Genabschnitts im Codon

12/13 mit Mutationsfrequenzen zwischen 15,5 % und 20,1 %. PLLM konnten nicht detektiert werden. Hingegen zeigten die Analysen aus den Gewebeproben 6880 I5 - I7 des Patientenfalls 1 eine HLM im *KRAS*-Gen Codon 12/13 mit Aminosäureaustausch Glycin zu Arginin (G12R). Zusätzlich zu der detektierten *KRAS*-Mutation in der Probe 6880 I6 konnte eine *NRAS* 146 high-level-Mutation mit Aminosäureaustausch Alanin zu Threonin (A146T) detektiert werden. Der Gewebeprobe 6880 I8, sowie die Metastasen im Rektum und der Leber zeigten Wt-Sequenz. Somit handelt es sich möglicherweise beim Patientenfall 1 um ein heterogenes kolonrektales Karzinom.

4.3.1 LMD-Analysen führen zur Potenzierung von Mutationsfrequenzen

Der Patientenfall 3 zeigte in der Routineanalyse eine über alle analysierten Schnitte hinweg durchgängig detektierbare Hauptmutation im *KRAS* 12/13 Genabschnitt, mit annähernd homogen verteilten Mutationsfrequenzen zwischen 15,5 % und 20,1 % (vgl. Tab. 24 + 28 und Abb. 5). Nebenmutationen konnten in allen analysierten Gewebeproben von Patientenfall 3 nicht detektiert werden. Im nachfolgenden Versuchsaufbau sollte geklärt werden, ob durch die Verwendung eines LMD-Verfahrens eine Potenzierung der Mutationsfrequenzen möglich ist, da lediglich Tumorgewebe und kein umliegendes Stroma in die Analyse eingeht. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob niedrigfrequente Nebenmutationen, sofern diese vorhanden waren, identifizierbar waren und sich in einem räumlichen Kontext zeigten. Hierzu wurden im Patientenfall 3 verschiedene Gewebeareale der einzelnen Gewebeproben einzeln analysiert (LMD-Ergebnisse Patientenfall 3: Kap. 3.3.3; zusammenfassend Tab. 36). Die Gewebeschnitte wurden unter mikroskopischer Kontrolle in distinkte Bereiche glandulären Tumorstromas eingeteilt. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Bereiche keinen räumlichen Zusammenhang zueinander aufwiesen. Die einzelnen Bereiche mit glandulärem Tumor wurden mittels Laser ausgeschnitten und getrennt voneinander gesammelt. Die Analyse mittels PCR und Pyrosequenzierung erfolgte für verschiedene Proto-Onkogene (Tab. 36: *KRAS*, *BRAF* und *NRAS*). Ein direkter Vergleich der Routineergebnisse des Patientenfalls 3 mit den Ergebnissen der LMD-Analyse zeigte eine starke Kongruenz zwischen beiden Analysen hinsichtlich der gefundenen *KRAS* G12A-Mutation in den analysierten Schnitten (Abb. 23). In

allen untersuchten Gewebelöcken (6978 II3, II5 und II8) konnte die *KRAS* G12A-Mutation erneut identifiziert werden und zeigte im Vergleich zu den Routineanalysen eine deutliche Potenzierung um das Fünffache der ursprünglich detektierten Mutationsfrequenz der Routine (Tab. 36, vgl. Mutationsfrequenz Routine mit LMD). In allen analysierten Bereichen der einzelnen Proben, insbesondere aber in den Proben 6978 II5 Bereich 3 (G12A: 100%) und II8 Bereich 1 (G12A: 99,6 %) konnte eine deutliche Steigerung der Mutationsfrequenz identifiziert werden (Abb. 23: vergleichende Darstellung Routine vs. LMD). Dies verdeutlicht das Potential der LMD-PCR-Pyrosequenzierungsmethode für Analysen von Gewebeproben, insbesondere solcher mit niedrigen Mutationsfrequenzen. Diese Potenzierung lässt sich dadurch erklären, dass beim LMD-Ansatz ausschließlich Areale von tumorös durchsetztem Gewebe selektiv gewählt und ausgeschnitten werden (Maag et al. 2022). In der Mehrheit aller Patientenproben setzten sich Gewebeproben aus verschiedenen histologischen Strukturen zusammen. Oftmals enthalten diese intakte, nicht-tumoröse Gewebestrukturen des ursprünglichen Gewebes wie Stromagewebe, Fettgewebe oder Drüsengewebe. All diese Strukturen enthalten keine Mutationen. Teilweise eingestreut liegen Gewebeformationen, die keine oder nur noch sehr geringe Mutationsfrequenzen enthalten, wie z.B. Areale mit fortschreitender Tumornekrose. Werden diese nicht-mutationstragenden Areale mit in eine Analyse einbezogen, sinkt die Rate der Mutationsfrequenzen durch die enthaltene Wt-DNA. Hinzu kommt die Tatsache der räumlichen Veränderung von Tumorgewebe bei fortschreitender Aufstufung des Gewebelocks. Mit fortschreitender Aufarbeitung der Gewebelöcke verändert sich Zusammensetzungen der Gewebeareale und der Mutationsfrequenzen (Coope et al. 2021; Haile et al. 2019). In den Routineanalysen wurden die benötigten Areale unter mikroskopischer Kontrolle in einem HE-Präparat eingezeichnet. Diese eingezeichneten Areale wurden als Schablone verwendet, um die aus dem Gewebelock weiter aufgeschnittenen und auf Objektträger übertragenen Areale abzukratzen. Eine Veränderung der Zusammensetzung des Gewebes durch das fortschreitende Aufschneiden des Gewebelocks wird hierbei nicht überprüft. Somit kann nicht genau festgestellt werden in welchen Mengen zusätzlich zum Tumorgewebe auch tumorfreie Gewebestrukturen enthalten sind. Das LMD bietet den großen Vorteil, dass innerhalb jedes Gewebeschnittes die Tumorzellen lichtmikroskopisch identifiziert (Espina et al. 2006) und durch Schneiden über den

UV-Laser nur histomorphologisch auserwählte Areale in den Analyseansatz zugeführt werden (Curran u. Murray 2005). Die strukturelle Veränderung, die sich durch ein fortschreitendes Aufschneiden des Gewebeblockes ergaben, konnten erfasst und entsprechend berücksichtigt werden. Dies garantierte, dass ausschließlich vitales und die definierte Zellpopulation analysiert wurden (Jensen 2013).

In der Probe 6978 II5 des glandulären Areals 1 wurde Wt-Sequenz festgestellt. Dies stellt vergleichend zu den anderen Bereichen der Probe 6978 II5 eine Besonderheit dar. Die benachbarten glandulären Bereiche A2 und A3 zeigten die in der Routine gefundene *KRAS* G12A Mutationen (Tab. 36). Bei histologischer Begutachtung des Wt-Tumorbereichs A1 von 6978 II5 zeigte sich ein glandulär wachsender Tumor, der von einer Vielzahl von immuninflammatorischen Zellen umgeben war. Im Verlauf zeigte sich beim Aufschneiden des Gewebeblocks II5 ein kontinuierlich voranschreitender Wandel von Tumorgewebe hin zu einem nekrotischen Areal. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der Patient bei einem Primarius im Colon mit unbekannter Mutation mit einer neoadjuvanten Chemotherapie antherapiert wurde.

Zusätzlich zeigte sich im Areal 2 des Tumorblocks 6978 II3 eine potenzielle geringgradige Mutation (PLLM) einer *BRAF*-Mutation V600D, mit einer Mutationsfrequenz von 5,0 % (Tab. 36). Eine unabhängige Wiederholung der Analyse des Areal 2 zeigte erneut eine PLLM mit einer Mutationsfrequenz von 4,8 %. Daher könnte es sich möglicherweise um einen kleinen heterogenen *BRAF*-Subklon in einem Tumorabschnitt mit einer G12A-Hauptmutation im *KRAS*-Gen handeln. Möglicherweise könnte dieser *BRAF*-Subklon als non-dominante-Nebenmutation neben der *KRAS*-Hauptmutation aufgrund von Adaption und Selektion bedingt durch die Chemotherapie als Bottleneck-Kondition hervorgegangen sein (McGranahan u. Swanton 2017).

In der LMD-Probenanalyse der Probe 6978 II8 Areal 2 ergab sich ein inhomogenes Detektionsmuster der *RAS*-Analysen (siehe Tab. 36, N/R: no result). Die Mehrheit der analysierten Proto-Onkogene brachte keine detektierbaren Ergebnisse hervor. Dies ist mit der Menge der eingesetzten DNA im Verhältnis zur geschnittenen Gewebeprobe zu erklären. Wie die Vorversuche bereits zeigten (vgl. Kapitel 3.2.1ff.) handelte es sich bei der LMD-PCR-Pyrosequenzierungsmethode um eine Methode, die hinsichtlich ihres Analyseerfolgs in starker Korrelation zur eingesetzten

Gewebemenge stand (Cummings et al. 2013). Durch die Verwendung des herkömmlichen DNA-Extraktionskits und DNA-Detektionskits konnte die DNA-Konzentration nicht gemessen werden. Bei dem Areal 2 (A2) der Probe 6978 II8 handelte es sich um einen sehr kleinen Tumorbereich, mit Lokalisation im Randbereich des Gewebepräparats (Abb. 21 A + C). Das Areal 2 des Gewebeblocks 6978 II8 wurde über den LMD-Laser so lange ausgeschnitten, bis kein Tumorgewebe mehr auf den Gewebeslides vorhanden war. Die geschnittene DNA-Menge war nicht ausreichend, um alle *KRAS*-, *BRAF*- und *NRAS*-Mutationssequenzen zu untersuchen.

4.4 Heterogenität im kolorektalen Karzinom

4.4.1 Existenz von intra- und intertumoraler Heterogenität im kolorektalen Karzinom

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowohl in den Routine- (Kap. 3.1.ff) als auch in den LMD-Versuchen (Kap. 3.3.ff) gaben Hinweise auf die Existenz von sowohl intra- als auch intertumoraler Heterogenität. In den Routineuntersuchungen zeigten sich Hinweise in Patientenfall 5 auf intratumorale Heterogenität, in Fall 4 auf intertumorale Heterogenität und in Fall 1 auf sowohl intra- als auch intertumorale Heterogenität. Insgesamt zeigten 3 Fälle (Fall 2, 3 und 6) keine Hinweise auf Tumorerheterogenität. Jeantet et al. (2016) postulierten, dass die Detektionswahrscheinlichkeit von intra- und intertumoraler Heterogenität von der Sensitivität der Untersuchungsmethode abhängt. Je sensitiver eine Methode, desto höher die Wahrscheinlichkeit Heterogenitäten im Tumorgewebe zu entdecken. Die intratumorale Heterogenität wird definiert als das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen genetischen Subklonen bei unterschiedlichen Tumormanifestation innerhalb eines Patienten, während die intertumorale Heterogenität durch verschiedene genetisch differente Subklone definiert ist (Jeantet et al. 2016). In dieser Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Subklonverteilungsmuster beobachtet. Sind gleichartige Subklone sowohl im Primarius als auch in allen metastatischen Absiedlungen existent, entspricht dies einem identischen genetischen Mutationsprofil in allen intra- und intertumoralen Abschnitten. Treten keine weiteren Subklone auf, spricht man von einem

homogenen Mutationsprofil. Homogene Mutationsprofile konnten in den Routineanalysen von Fall 2 (*KRAS* 146), Fall 3 (*KRAS* 12/13) und Fall 6 (*BRAF* 600) festgestellt werden (Tab. 28: Fallübergreifende Darstellung der Routineergebnisse). Sie stellen das Gegenteil von Tumorheterogenität dar, da sich die Mutationen über alle analysierten Gewebeproben hinweg identisch darstellten. Kommen jedoch zu den homogen verteilten Subklonen weitere genetisch differente Subklonpopulationen hinzu, spricht man von Tumorheterogenität. Diese zusätzlichen genetischen Subklonpopulationen enthalten entweder zusätzliche Mutationstypen oder zeigen keinen Hinweis mehr auf die ursprüngliche Mutation (Wt-Genniveau). Kim et al. (2015) und Jeantet et al. (2016) beschreiben in ihren Arbeiten zwei verschiedene Muster, das „primary-clonal“-Muster und das „primary-private“-Muster. Bei den „primary-clonal“-Mutationen enthält jeder einzelne Subklon identische Mutationen. Die „primary-private“-Mutationen enthalten zusätzlich zur „primary-clonal“-Mutation weitere zusätzliche Mutationen oder Wt-Genabschnitte innerhalb der untersuchten Bereiche des Primarius, während alle anderen Subklone identisch sind.

Patientenfall 1 (6880 I6) zeigte ein typisches Verteilungsmuster einer intratumoralen Verteilung mit „primary-clonal“ und „primary-private“. Die primary-clonale Population stellte die Hauptmutation der *KRAS* Exon 2 (Codon 12/13) Mutation dar. Sie war in den makrodissezierten Bereichen 6880 I5-I7 vorhanden. In 6880 I6 konnte eine zur Hauptmutation differente Nukleotidsubstitution in *NRAS* Exon 4; c.436G>A identifiziert werden. Zum anderen konnte man im Tumorbereich 6880 I8 ein weiteres „primary-private“-Muster entdecken. Hier war die „primary-clonal“-Mutation nicht mehr zu identifizieren. Beide zuvor beschriebenen Fälle entsprachen einer intratumoralen Heterogenität. Betrachtet man nun die Metastasen (Probe 6407: Lebermetastase; Probe 6487: PE-Rectum) zeigten sich hier ebenfalls Wt-Sequenzen, die different zur im Primarius gefundenen *KRAS* 12/13 Hauptmutation waren.

Patientenfall 5 (6515) stellte einen „primary-private“-Fall dar. Über das Verfahren der Makrodissektion konnte zusätzlich zur *BRAF* 600 Hauptmutation eine *NRAS* 146 Subklon identifiziert werden. Seit einigen Jahren weiß man um eine Vielzahl verschiedener Heterogenitäten im kolorektalen Karzinom, von denen man ursprünglich ausgegangen ist, diese seien jeweils für *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* exklusiv und könnten nicht nebeneinander entstehen (Rajagopalan et al. 2002).

Sahin et al. (2013) zeigten erstmals *KRAS*- und *BRAF*-Komutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,001 %, während Deshwar et al. (2018) 5 Jahre später in einem retrospektiven Studiendesign mit 820 CRC-Patienten bereits eine Inzidenz von 0,5 % für eine *KRAS/BRAF* Doppelmutation postulierten. Dies untermauert die Aussagen der Arbeitsgruppe um Jeantet et al. 2016, dass die Detektionswahrscheinlichkeit von Tumorheterogenität in Korrelation zur Sensitivität der Methoden steht. Es existieren jedoch neben Studien zu *BRAF/KRAS*-Doppelmutationen (Sahin et al. 2013; Guo et al. 2018; Midthun et al. 2019; Poulsen et al. 2021) weitere Studien, die eine Koexistenz von anderen Doppelmutationen der *RAS*- und *RAF*-Genfamilie zeigen, wie *BRAF* und *NRAS* (Guo et al. 2018; Poulsen et al. 2021) und *KRAS* mit *NRAS* (Vagaja et al. 2015; Jeantet et al. 2016; Poulsen et al. 2021). Jeantet et al. (2016) konnten zeigen, dass in 33 % aller mittels Pyrosequenzierung analysierten makrodissezierten CRC-Proben eine intratumorale Heterogenität mit einer Koexistenz von *KRAS/NRAS*-Mutationen zu finden ist. Auch die Routineergebnisse des Patientenfalls 1 (Probe: 6880 I6) zeigten eine Doppelmutation mit *KRAS* 12/13 und *NRAS* 146 innerhalb eines makrodissezierten Tumorgewebebereichs. Der *NRAS*-Subklon konnte dabei lediglich in einem der drei makrodissezierten Gewebeareale des Primarius festgestellt werden. Dieser *NRAS* Exon 4 Subklon stellt im Patientenfall 1 eine intratumorale Heterogenität dar.

Zwar scheint die Existenz solcher Doppelmutationen bei den meisten Studienergebnissen noch immer selten zu sein, jedoch steigen die berichteten Inzidenzen für Doppelmutationen. Auch die Anzahl an publizierten Komutationen in den Case Reports nimmt zu (Sahin et al. 2013; Deshwar et al. 2018; Midthun et al. 2019; Cafiero et al. 2020; Poulsen et al. 2021; Maag et al. 2022). Bei den meisten publizierten Routineuntersuchungen, bei denen die Gewebebereiche makrodisseziert wurden, zeigten sich die Doppelmutationen ubiquitär verteilt, d.h. sowohl im Primärtumor als auch in den Fern- und Lymphknotenmetastasen. Jedoch existieren auch Fälle, in denen Doppelmutationen als Subklone in nur einem einzelnen Bereich detektierbar waren (Jeantet et al. 2016). Untersuchungen zur Verteilung von Tumorheterogenität sollten zum besseren Verständnis durch ein vollumfängliches Screening des Tumorgewebes auf alle Mutationstypen (Extended *RAS* und *RAF*) durchgeführt werden (Richman et al. 2011). Ebenso wichtig erscheint die Analyse von verschiedenen Bereichen eines Primärtumors und seiner

Metastasen, um ein besseres Verständnis über die räumliche Verteilung verschiedener Tumorsubklone zu erhalten.

4.4.2 Räumliche Verteilung von Heterogenität mit morphologischer Clusterung im kolorektalen Karzinom

Jahrelang war es umstritten, ob morphologische und molekularbiologische Korrelationen der verschiedenen kolorektalen Karzinomtypen existieren. Zeitweise ist man davon ausgegangen, dass morphologisch differente Karzinomtypen zu unterschiedlichen Genotypen führen. Es konnte durch verschiedene Autoren gezeigt werden, dass morphologische Unterschiede der einzelnen Tumortypen nicht zwangsweise zu genetischer Variabilität und vice versa spezifische Genmutationen nicht zu identischen Tumormorphologien führen müssen (Navin et al. 2010; Blank et al. 2018). Allerdings gibt es einige Hinweise, dass der Genotyp durchaus Einfluss auf den Phänotyp ausüben kann. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kann zu differentiellen Wachstumsmustern führen indem es die Mikroumgebung des Tumors beeinflussen kann (Greenon et al. 2003; Smedt et al. 2015). So sind muzinöse Adenokarzinome häufig mit MSI assoziiert (Green et al. 1993) und zeigen in 65 % der Fälle eine gehäufte Inzidenz von *KRAS*-Mutationen, jedoch auch *BRAF*-Mutationen (Remo et al. 2019). *KRAS* Codon 12 Mutationen zeigen eine signifikante Assoziation zu kolorektalen Tumoren, dem klassischen Adenokarzinom, gut bis mäßig differenzierten Tumoren und Mikrosatellitenstabilität (MSS) (Rimbert et al. 2018). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *NRAS*-Mutationen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich einer pathologischen Verteilung aufzeigen. Insgesamt zeigte die Studie unterschiedliche pathologische und genetische Disparitäten bei verschiedenen *RAS*- und *BRAF*-Mutationen, wobei zu erwähnen ist, dass Tumore mit *RAS*- und *BRAF*-Doppelmutationen oder Tumore mit zwei verschiedene *RAS*-Doppelmutationen aus der Studie ausgeschlossen wurden (Rimbert et al. 2018). Diese Arbeit untersucht mit dem Patientenfall 6880, gegensätzlich zur Studie von Rimbert et al. 2018, Proben die bereits in der makrodissezierten Routineanalyse Hinweise auf eine *KRAS/NRAS* Doppelmutation zeigten und phänotypisch durch ein oberflächlich imponierendes glanduläres und ein in der tiefe dominierendes muzinöses Tumorstadium dominiert waren. Die in dieser Arbeit verwendete LMD-PCR-Pyrosequenzierungsmethode bot die

Möglichkeit einzelne Bereiche der beiden morphologisch ungleichen Phänotypen hinsichtlich ihres genetischen Profils zu analysieren und ein besseres Verständnis von Phäno-vs.-Genotyp herzustellen. Die Ergebnisse der Kapitel 3.3.3.ff. zeigten, dass ausschließlich in den glandulären Arealen der Gewebeproben 6880 I5, I6 und I8 Subklone mit *NRAS* Codon 146-Mutationen zu detektieren waren (Abb. 16). In den analysierten muzinösen Arealen der Proben 6880 I5 und I6 waren keine *NRAS*-Mutationen zu detektieren. Die muzinösen Areale in der Probe 6880 I6 zeigten, verglichen mit den glandulären Arealen, eine höhere Mutationsfrequenz für die *KRAS* G12R-Mutation. Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die LMD-Methode eine Möglichkeit eröffnet potenzielle Mutationen in verschiedenen histologischen Tumortypen zu analysieren, um ein besseres Verständnis zur Diversität von morphologischen Verteilungsmustern zu erlangen und diese geno- und phänotypischen Erkenntnisse für eine therapeutische patientenzentrierte Behandlung zu nutzen.

4.4.3 Heterogene Subklone mit potenziellen niedrigfrequenten Mutationen im kolorektalen Karzinom

Ein Verständnis über die Komplexität der Tumorerogenität des kolorektalen Karzinoms über intra- und intertumorale Verteilungen von hochfrequenten Mutationen im Gewebe sind für die klinische Forschung, insbesondere für die therapeutischen Optionen eines Patienten und letztendlich der Gesamtüberlebensrate von enormer Wichtigkeit. Sowohl hochfrequente *KRAS*- als auch *NRAS*-Mutationen sind mit einer negativen Überlebensrate und einem schlechten Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie assoziiert (Roock et al. 2010; Douillard et al. 2013; Yoon et al. 2014). Bei den Analysen von Tumorarealen kann man oftmals neben hochfrequenten Mutationen auch potenzielle niedrigfrequente Mutationen entdecken. So ließen sich im Patientenfall 1 (s. Tab. 32: LMD-Probe 6880) neben den hochfrequenten *NRAS*-Mutationen in den angrenzenden Schnitten auch niedrigfrequente Mutationen der identischen Entität detektieren. Aber auch im Patientenfall 3 (s. Tab. 36: LMD-Probe 6978) konnte man neben den detektierten Hauptmutationen eine PLLM für *BRAF* V600D identifizieren. Diese steigenden Detektionsraten könnten unter anderem im Zusammenhang mit der Entwicklung von immer sensitiveren Untersuchungsmethoden zur Identifizierung

von Mutationen liegen. Das LMD-PCR-Pyrosequenzierungsverfahren ist eine geeignete Methode, um die spezifische Verteilungsmuster von Mutationen innerhalb eines Tumors und seiner Absiedelungen zu untersuchen (Maag et al. 2022). Sie bietet zusätzlich den Vorteil der Aufkonzentrierung von vorhandenen Mutationsfrequenzen im untersuchten Tumorgewebe (Kap. 4.3.1). Folglich dient das LMD-Verfahren als Methode zur Demaskierung einzelner Bereiche in denen unter den HLM einzelne PLLM verdeckt liegen. Zu den Effekten der PLLM existieren bis heute nur wenige Daten. Über die klinische Relevanz einzelner PLLM können keine bis wenige Aussagen getroffen werden (Tougeron et al. 2013). Die Arbeitsgruppe vom Laurent-Puig et al. (2015) konnte zeigen, dass PLLM vom *KRAS*-Mutationstyp mit einer therapeutischen Resistenz von anti-EGFR-AK assoziiert sind. Somit lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass nicht nur das Vorhandensein von hochfrequenten Hauptmutationen, sondern auch sondern auch Mutationsfrequenzen unabhängig ihrer Frequenzhöhe einen Einfluss auf die Wirksamkeit von antikörperspezifischen Therapieverfahren nehmen können. Eine vollumfängliche Analyse von Mutationen des extendierten *RAS*- und *BRAF*-Typs durch hochselektive Mutationsdetektionsmethoden, wie dem LMD-PCR-Pyrosequenzierungsverfahren, ist zur Heterogenitätsanalyse des CRC bei neu diagnostizierten Tumoren zur Abwägung eines optimalen Therapieregimes unabdingbar.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung des kolorektalen Karzinoms (CRC) als dritthäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen verdeutlicht die Notwendigkeit intensiver Forschung. So vielseitig wie die Pathologie des CRC ist auch die Findung einer optimalen Therapiestrategie. Endoskopische Verfahren und die radikal chirurgische Intervention stellen einen bedeutenden Bestandteil des heutigen Therapiesettings dar. Der Einsatz einzelner Chemotherapeutika sowie molekular zielgerichteter Therapien hat gezeigt, dass CRC unterschiedliche Sensitivität aufweisen. Das Wissen, dass einzelne *RAS-* (*rat sarcoma*) und *RAF-* (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) Mutationen im CRC zu einem negativen therapeutischen Outcome führen, insbesondere in Bezug auf die Therapie mit Anti-EGFR- (epidermal growth factor receptor) Antikörpern, macht eine eingehende molekularbiologische Typisierung der CRCs notwendig. Tumorheterogenität, das gleichzeitige Vorhandensein von heterogenen Subklonen innerhalb eines Tumors, dient als Erklärungsansatz für das Therapieversagen bei einzelnen Patientengruppen. Die Identifizierung von unterschiedlichen Mutationsprofilen innerhalb eines Tumors und seiner Metastasen sowie die Untersuchung der räumlichen Verteilung spielen sowohl für das Verständnis der Tumorbiologie als auch die Therapie eine große Rolle. Die Identifizierung von unterschiedlichen Mutationssubklonen in einzelnen Tumorealen gestaltet sich mit herkömmlichen Routineverfahren, wie der Polymerase-Kettenreaktion-Pyrosequenzierung (PCR-Pyro), als schwierig. Bei der PCR-Pyro wird für die Analysen Tumorgewebe in toto und morphologisch unselektiert der Analyse zugeführt. Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein Verfahren zur Analyse der Heterogenität des CRC zu etablieren, mit dem es möglich ist, morphologisch selektierte Mikroareale innerhalb eines Tumors gezielt zu analysieren. Mit dem Lasermikrodissektions (LMD)-Verfahren können mehrere kleine Bereiche über repetitive Schnittfolgen hinweg unter mikroskopischer Kontrolle ausgewählt, mittels Laser ausgeschnitten und vergleichend analysiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Routineverfahren (Sequenzierung von möglichst reinem Tumorgewebe ohne räumliche Selektion) eine Zuordnung von möglichen mehreren Mutationen innerhalb eines Tumors zu einzelnen Arealen nicht

gewährleisten kann. In einzelnen Fällen konnten vorhandene niedrigfrequente Nebenmutationen (PLLM) zusätzlich zu den hochfrequenten Hauptmutationen (HLM) nicht detektiert werden, da diese unter den HLM maskiert wurden. In der hier vorliegenden vergleichenden Studie mittels LMD konnten in identischen Patientenproben entsprechende PLLM von *NRAS*- und *BRAF*-Mutationen identifiziert werden. Das LMD war somit imstande, die technischen Limitierungen des Routineverfahrens zu umgehen. So können mikroskopisch kleinere Bereiche unterschiedlicher Tumormorphologie gewählt und selektiv über mehrere Tumorschnittabfolgen kollektiviert werden. Hierdurch kommt es zum einen zu einer hochselektiven Auswahl einzelner Bereiche aus großen Tumormassen und als Nebeneffekt zu einer Aufkonzentrierung von PLLM, da potenziell überlagernde Mutationen nicht mitanalysiert werden. In einer Analyse zeigte sich ein Bereich mit wildtypischer Sequenz in direkter Nachbarschaft zur *KRAS*-HLM. In derselben Patientenprobe zeigte sich bei Untersuchung des Metastasengewebes Wildtypsequenz. Trotz der Möglichkeit hinsichtlich einer räumlichen Zuordnung für Mutationssubtypen im Gewebe des CRC, hat das LMD gegenüber dem Routineverfahren jedoch den Nachteil, dass viele kleine Tumorgewebsareale via Laser geschnitten werden müssen. Da die verwendeten Areale deutlich kleiner sind, birgt dieses Vorgehen das Risiko, nicht genügend DNA für eine anschließende Pyrosequenzierung zu gewinnen. Daher konnten in einzelnen Fällen, bei denen die vorhandenen Tumorzellzahl zu gering war, keine Ergebnisse generiert werden. Das LMD-Verfahren könnte jedoch potenziell, insbesondere in Kombination mit hochsensitiven Verfahren wie dem Next-Generation-Sequencing (NGS), einen bedeutenden Beitrag zur Identifizierung von PLLM in großen Tumorealen leisten. Abschließend kann die Verwendung der LMD für das Verständnis der Tumorheterogenität im CRC einen großen Beitrag leisten, insbesondere dahingehend, dass initial niedrigfrequente *RAS/RAF*-Mutationen im Therapieverlauf biologisch selektioniert und damit einen entscheidenden Einfluss auf den langfristigen Therapieverlauf nehmen könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aaltonen, Peltomäki, Leach, Sistonen, Pylkkänen, Mecklin, Järvinen, Powell, Jen, Hamilton:** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)* 5109: 812–816 (1993)
2. **Ahle, Barr, Chin, Battersby:** Sequence determination of nucleic acids containing 5-methylisocytosine and isoguanine: identification and insight into polymerase replication of the non-natural nucleobases. *Nucleic acids research* 10: 3176–3184 (2005)
3. **Amado, Wolf, Peeters, van Cutsem, Siena, Freeman, Juan, Sikorski, Suggs, Radinsky, Patterson, Chang:** Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 10: 1626–1634 (2008)
4. **Arnold, Sierra, Laversanne, Soerjomataram, Jemal, Bray:** Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 4: 683–691 (2017)
5. **Baena, Salinas:** Diet and colorectal cancer. *Maturitas* 3: 258–264 (2015)
6. **Baretton, Tannapfel, Schmitt:** Standardisierte und strukturierte histopathologische Befundung kolorektaler Polypen: Eine Checkliste für die Praxis vor dem Hintergrund der neuen WHO-Klassifikation. *Der Pathologe* 4: 289–296 (2011)
7. **Bastide, Pierre, Corpet:** Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 2: 177–184 (2011)
8. **Bastide, Chenni, Audebert, Santarelli, Taché, Naud, Baradat, Jouanin, Surya, Hobbs, Kuhnle, Raymond-Letron, Gueraud, Corpet, Pierre:** A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer research* 5: 870–879 (2015)

9. **Bellevicine, Malapelle, Vigliar, Pisapia, Vita, Troncone:** How to prepare cytological samples for molecular testing. *Journal of clinical pathology* 10: 819–826 (2017)
10. **Bisgaard, Ripa, Knudsen, Bülow:** Familial adenomatous polyposis patients without an identified APC germline mutation have a severe phenotype. *Gut* 2: 266–270 (2004)
11. **Blank, Roberts, Dawson, Zlobec, Lugli:** Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? *Frontiers in medicine*: 234 (2018)
12. **Böhm, Wieland, Schütze, Rübber:** Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *The American journal of pathology* 1: 63–67 (1997)
13. **Bokemeyer, Köhne, Ciardiello, Lenz, Heinemann, Klinkhardt, Beier, Duecker, van Krieken, Tejpar:** FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 10: 1243–1252 (2015)
14. **Bos:** The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation research* 3: 255–271 (1988)
15. **Bos:** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* 17: 4682–4689 (1989)
16. **Botteri, Iodice, Bagnardi, Raimondi, Lowenfels, Maisonneuve:** Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 23: 2765–2778 (2008)
17. **Botteri, Borroni, Sloan, Bagnardi, Bosetti, Peveri, Santucci, Specchia, van den Brandt, Gallus, Lugo:** Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *The American journal of gastroenterology* 12: 1940–1949 (2020)
18. **Bray, Ferlay, Soerjomataram, Siegel, Torre, Jemal:** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 6: 394–424 (2018)

19. **Breivik, Meling, Spurkland, Rognum, Gaudernack:** K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *British journal of cancer* 2: 367–371 (1994)
20. **Bülow, Faurschou Nielsen, Bülow, Bisgaard, Karlsen, Moesgaard:** The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish Polyposis Register. *International journal of colorectal disease* 2: 88–91 (1996)
21. **Bülow:** Familiær adenomatøs polypose. *Ugeskrift for læger* 19: 1335–1339 (2013)
22. **Burrell, McGranahan, Bartek, Swanton:** The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 7467: 338–345 (2013)
23. **Burrell, Swanton:** Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular oncology* 6: 1095–1111 (2014)
24. **Cafiero, Re, D’Amato, Surico, Surico, Pirrelli, Pisconti:** KRAS and RAS Concomitant Mutations in a Patient with Metastatic Colon Adenocarcinoma: An Interesting Case Report. *Case reports in oncology* 2: 595–600 (2020)
25. **Calvert, Frucht:** The genetics of colorectal cancer. *Annals of internal medicine* 7: 603–612 (2002)
26. **Canavan, Abrams, Mayberry:** Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 8: 1097–1104 (2006)
27. **Cancer Genome Atlas Network.** Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 7407: 330–337 (2012)
28. **Coope, Schlosser, Corbett, Pleasance, Tessier-Cloutier, Pandoh, Kirk, Haile, Zhao, Mungall, Marra:** Whole-slide laser microdissection for tumour enrichment. *The Journal of pathology* 2: 225–233 (2021)
29. **Cortes, Guilloteau, Rouvreau, Archaimbault, Villalva, Karayan-Tapon:** Development of pyrosequencing methods for the rapid detection of RAS mutations in clinical samples. *Experimental and molecular pathology* 2: 207–211 (2015)

30. **Cross, Boca, Freedman, Caporaso, Huang, Sinha, Sampson, Moore:** Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 7: 1516–1522 (2014)
31. **Cummings, Ahmed, Durocher, Jessen, Vardi, Obom:** Pyrosequencing for microbial identification and characterization. *Journal of visualized experiments: JoVE* 78: e50405 (2013)
32. **Curran, McKay, McLeod, Murray:** Laser capture microscopy. *Molecular pathology: MP* 2: 64–68 (2000)
33. **Curran, Murray:** An introduction to laser-based tissue microdissection techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.):* 3–8 (2005)
34. **Deaton, Bird:** CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* 10: 1010–1022 (2011)
35. **Deshwar, Margonis, Andreatos, Barbon, Wang, Buettner, Wagner, Sasaki, Beer, Løes, Pikoulis, Damaskos, Garpis, Kamphues, He, Kaczirek, Poultsides, Lønning, Mischinger, Aucejo, Kreis, Wolfgang, Weiss:** Double KRAS and BRAF Mutations in Surgically Treated Colorectal Cancer Liver Metastases: An International, Multi-institutional Case Series. *Anticancer research* 5: 2891–2895 (2018)
36. **Dhillon, Hagan, Rath, Kolch:** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 22: 3279–3290 (2007)
37. **Douillard, Oliner, Siena, Tabernero, Burkes, Barugel, Humblet, Bodoky, Cunningham, Jassem, Rivera, Kocákova, Ruff, Błasińska-Morawiec, Šmakal, Canon, Rother, Williams, Rong, Wiezorek, Sidhu, Patterson:** Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 11: 1023–1034 (2013)
38. **Dufort, Richard, Fraipont:** Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Analytical biochemistry* 2: 166–168 (2009)
39. **Espina, Wulfkuhle, Calvert, VanMeter, Zhou, Coukos, Geho, Petricoin, Liotta:** Laser-capture microdissection. *Nature protocols* 2: 586–603 (2006)

40. **Fang, Ou, Hutchinson, Green:** The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Molecular cell* 6: 904–915 (2014)
41. **Fearon, Vogelstein:** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 5: 759–767 (1990)
42. **Fend, Kremer, Quintanilla-Martinez:** Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 4-5: 209–214 (2000)
43. **Fleming, Ravula, Tatishchev, Wang:** Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology* 3: 153–173 (2012)
44. **Gamage, Dissabandara, Lam, Gopalan:** The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Critical reviews in oncology/hematology*: 121–128 (2018)
45. **Geigl, Obenauf, Schwarzbraun, Speicher:** Defining 'chromosomal instability'. *Trends in genetics: TIG* 2: 64–69 (2008)
46. **Grady, Carethers:** Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 4: 1079–1099 (2008)
47. **Green, Timmcke, Mitchell, Hicks, Gathright, Ray:** Mucinous carcinoma-- just another colon cancer? *Diseases of the colon and rectum* 1: 49–54 (1993)
48. **Guo, Gong, Zhao, Chen, Zhang, Zhang, Shi, Zhang, Jin, Zhang, He:** Mutation status and prognostic values of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA in 353 Chinese colorectal cancer patients. *Scientific reports* 1: 6076 (2018)
49. **Haile, Corbett, Bilobram, Bye, Kirk, Pandoh, Trinh, MacLeod, McDonald, Bala, Miller, Novik, Coope, Moore, Zhao, Mungall, Ma, Holt, Jones, Marra:** Sources of erroneous sequences and artifact chimeric reads in next generation sequencing of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Nucleic acids research* 2: e12 (2019)
50. **Half, Bresalier:** Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Current opinion in gastroenterology* 1: 32–42 (2004)

51. **Hamilton, Aaltonen:** Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization (2000)
52. **Hawkins, Norrie, Cheong, Mokany, Ku, Meagher, O'Connor, Ward:** CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 5: 1376–1387 (2002)
53. **Hayes, Westra, Verlind, Bleeker, Plukker, Hofstra, Buys:** New comprehensive denaturing-gradient-gel- electrophoresis assay for KRAS mutation detection applied to paraffin-embedded tumours. *Genes, chromosomes & cancer* 4: 309–314 (2000)
54. **Heinemann, Weikersthal, Decker, Kiani, Vehling-Kaiser, Al-Batran, Heintges, Lerchenmüller, Kahl, Seipelt, Kullmann, Stauch, Scheithauer, Hielscher, Scholz, Müller, Link, Niederle, Rost, Höffkes, Moehler, Lindig, Modest, Rossius, Kirchner, Jung, Stintzing:** FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 10: 1065–1075 (2014)
55. **Hughes, Simons, van den Brandt, van Engeland, Weijnenberg:** Lifestyle, Diet, and Colorectal Cancer Risk According to (Epi)genetic Instability: Current Evidence and Future Directions of Molecular Pathological Epidemiology. *Current colorectal cancer reports* 6: 455–469 (2017)
56. **Islami, Goding Sauer, Miller, Siegel, Fedewa, Jacobs, McCullough, Patel, Ma, Soerjomataram, Flanders, Brawley, Gapstur, Jemal:** Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: a cancer journal for clinicians* 1: 31–54 (2018)
57. **Jass:** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 1: 113–130 (2007)
58. **Jeanet, Tougeron, Tachon, Cortes, Archambaut, Fromont, Karayan-Tapon:** High Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of RAS Mutations in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* 12 (2016)
59. **Jensen:** Laser-capture microdissection. *Anatomical record (Hoboken, N.J.:* 2007) 11: 1683–1687 (2013)

60. **Jonker, O'Callaghan, Karapetis, Zalcborg, Tu, Au, Berry, Krahn, Price, Simes, Tebbutt, van Hazel, Wierzbicki, Langer, Moore:** Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 20: 2040–2048 (2007)
61. **Katona, Jones, Wang, Eble, Billings, Cheng:** Genetically heterogeneous and clonally unrelated metastases may arise in patients with cutaneous melanoma. *The American journal of surgical pathology* 7: 1029–1037 (2007)
62. **Keum, Giovannucci:** Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 12: 713–732 (2019)
63. **Khan, Krishnan, Ziman, Janatpour, Wun, Luciw, Tuscano:** A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 3: 159–168 (2009)
64. **Kimura, Fujiwara, Sone, Kunitoh, Tamura, Kasahara, Nishio:** High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer science* 7: 642–648 (2006)
65. **Korinek, Barker, Morin, van Wichen, Weger, Kinzler, Vogelstein, Clevers:** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* 5307: 1784–1787 (1997)
66. **Kosmidou, Oikonomou, Vlassi, Avlonitis, Katseli, Tsipras, Mourtzoukou, Kontogeorgos, Zografos, Pintzas:** Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Human mutation* 3: 329–340 (2014)
67. **Kressner, Bjørheim, Westring, Wahlberg, Pålman, Glimelius, Lindmark, Lindblom, Børresen-Dale:** Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 4: 518–521 (1998)

68. **Kreutz, Hochstein, Kaiser, Narz, Peist: Pyrosequencing:** powerful and quantitative sequencing technology. *Current protocols in molecular biology*: 7.15.1-7.15.23 (2013)
69. **Lenz, van Cutsem, Khambata-Ford, Mayer, Gold, Stella, Mirtsching, Cohn, Pippas, Azarnia, Tsuchihashi, Mauro, Rowinsky:** Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30: 4914–4921 (2006)
70. **Li, Qiu, Guo, Ying:** Major challenges related to tumor biological characteristics in accurate mutation detection of colorectal cancer by next-generation sequencing. *Cancer letters*: 92–99 (2017)
71. **Lièvre, Bachet, Le Corre, Boige, Landi, Emile, Côté, Tomasic, Penna, Ducreux, Rougier, Penault-Llorca, Laurent-Puig:** KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research* 8: 3992–3995 (2006)
72. **Lim, Lim:** Proteome Heterogeneity in Colorectal Cancer. *Proteomics* 3-4 (2018a)
73. **Lim, Lim:** Proteome Heterogeneity in Colorectal Cancer. *Proteomics* 3-4 (2018b)
74. **Lin, Buckley, Lu, Kouzminova, Salpeter:** Effect of KRAS mutational status in advanced colorectal cancer on the outcomes of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical colorectal cancer* 1: 63–69 (2011)
75. **Lynch, Smyrk, Lynch:** An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer genetics and cytogenetics* 1: 84–99 (1997)
76. **Lynch, Hoops:** The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 4: 775–810 (2002)
77. **Lynch, La Chapelle:** Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 10: 919–932 (2003)

78. **Maag, Arndt, Steinestel:** Lasermikrodissektion zur Analyse molekularer Heterogenität im kolorektalen Karzinom [Laser microdissection for the analysis of molecular heterogeneity in colorectal cancer]. *Pathologie (Heidelb)*. Aug;43(Suppl 1):36-41 (2022)
79. **Maitra, Wistuba, Virmani, Sakaguchi, Park, Stucky, Milchgrub, Gibbons, Minna, Gazdar:** Enrichment of epithelial cells for molecular studies. *Nature medicine* 4: 459–463 (1999)
80. **Mäkinen, George, Jernvall, Mäkelä, Vihko, Karttunen:** Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *The Journal of pathology* 3: 286–294 (2001)
81. **Mann, Gelos, Siedow, Hanski, Gratchev, Ilyas, Bodmer, Moyer, Riecken, Buhr, Hanski:** Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 4: 1603–1608 (1999)
82. **Marchetti, Felicioni, Buttitta:** Assessing EGFR mutations. *The New England journal of medicine* 5: 526-8; author reply 526-8 (2006)
83. **Mármol, Sánchez-de-Diego, Pradilla Dieste, Cerrada, Rodriguez Yoldi:** Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* 1 (2017)
84. **Matsunaga, Kaneta, Miwa, Ichikawa, Fujita, Nagashima, Furuse, Kage, Akagi, Sasaki:** A comparison of four methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed specimens from metastatic colorectal cancer patients. *Oncology letters* 1: 150–156 (2016)
85. **McGranahan, Swanton:** Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 4: 613–628 (2017)
86. **Meissner, Breen, Klabunde, Vernon:** Patterns of colorectal cancer screening uptake among men and women in the United States. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2: 389–394 (2006)

87. **Midthun, Shaheen, Deisch, Senthil, Tsai, Hsueh:** Concomitant KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology* 3: 577–581 (2019)
88. **Misale, Arena, Lamba, Siravegna, Lallo, Hobor, Russo, Buscarino, Lazzari, Sartore-Bianchi, Bencardino, Amatu, Lauricella, Valtorta, Siena, Di Nicolantonio, Bardelli:** Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Science translational medicine* 224: 224ra26 (2014)
89. **Morelli, Overman, Dasari, Kazmi, Mazard, Vilar, Morris, Lee, Herron, Eng, Morris, Kee, Janku, Deaton, Garrett, Maru, Diehl, Angenendt, Kopetz:** Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 4: 731–736 (2015)
90. **Murphy, Devesa, Cross, Inskip, McGlynn, Cook:** Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International journal of cancer* 7: 1668–1675 (2011)
91. **Nagasaka, Sasamoto, Notohara, Cullings, Takeda, Kimura, Kambara, MacPhee, Young, Leggett, Jass, Tanaka, Matsubara:** Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22: 4584–4594 (2004)
92. **Navin, Krasnitz, Rodgers, Cook, Meth, Kendall, Riggs, Eberling, Troge, Grubor, Levy, Lundin, Månér, Zetterberg, Hicks, Wigler:** Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome research* 1: 68–80 (2010)
93. **Normanno, Tejpar, Morgillo, Luca, van Cutsem, Ciardiello:** Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nature reviews. Clinical oncology* 9: 519–527 (2009)
94. **Normanno, Rachiglio, Lambiase, Martinelli, Fenizia, Esposito, Roma, Troiani, Rizzi, Tatangelo, Botti, Maiello, Colucci, Ciardiello:** Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic

colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 8: 1710–1714 (2015)

95. **Ogino, Cantor, Kawasaki, Brahmandam, Kirkner, Weisenberger, Campan, Laird, Loda, Fuchs:** CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 7: 1000–1006 (2006a)
96. **Ogino, Kawasaki, Kirkner, Loda, Fuchs:** CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 5: 582–588 (2006b)
97. **Ogino, Nosh, Kirkner, Kawasaki, Meyerhardt, Loda, Giovannucci, Fuchs:** CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 1: 90–96 (2009)
98. **Palma, D'Argenio, Pol, Kroemer, Maiuri, Salvatore:** The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers* 7 (2019)
99. **Parc, Piquard, Dozois, Parc, Tiret:** Long-term outcome of familial adenomatous polyposis patients after restorative coloproctectomy. *Annals of surgery* 3: 378–382 (2004)
100. **Petersen, Slack, Nakamura:** Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 6: 1658–1664 (1991)
101. **Pino, Chung:** The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 6: 2059–2072 (2010)
102. **Poehlmann, Kuester, Meyer, Lippert, Roessner, Schneider-Stock:** K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathology, research and practice* 7: 489–497 (2007)
103. **Popat, Hubner, Houlston:** Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 3: 609–618 (2005)

104. **Poulsen, Oliveira, Espersen, Klarskov, Skovrider-Ruminski, Hogdall:** Frequency and coexistence of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations and occurrence of MMR deficiency in Danish colorectal cancer patients. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2: 61–69 (2021)
105. **Powell, Zilz, Beazer-Barclay, Bryan, Hamilton, Thibodeau, Vogelstein, Kinzler:** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 6392: 235–237 (1992)
106. **Pruitt, Der:** Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer letters* 1: 1–10 (2001)
107. **Rajagopalan, Bardelli, Lengauer, Kinzler, Vogelstein, Velculescu:** Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 6901: 934 (2002)
108. **Remo, Fassan, Vanoli, Bonetti, Barresi, Tatangelo, Gafà, Giordano, Pancione, Grillo, Mastracci:** Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers* 7 (2019)
109. **Rhee, Kim, Kang:** CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut and liver* 1: 38–46 (2017)
110. **Richman, Chambers, Seymour, Daly, Grant, Hemmings, Quirke:** Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 1-2: 61–66 (2011)
111. **Rimbert, Tachon, Junca, Villalva, Karayan-Tapon, Tougeron:** Association between clinicopathological characteristics and RAS mutation in colorectal cancer. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 3: 517–526 (2018)
112. **Roerink:** Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature <London>* 7702: 457–462 (2018)
113. **Roock, Claes, Bernasconi, Schutter, Biesmans, Fountzilas, Kalogeras, Kotoula, Papamichael, Laurent-Puig, Penault-Llorca, Rougier, Vincenzi,**

- Santini, Tonini, Cappuzzo, Frattini, Molinari, Saletti, Dosso, Martini, Bardelli, Siena, Sartore-Bianchi, Tabernero, Macarulla, Di Fiore, Gangloff, Ciardiello, Pfeiffer, Qvortrup, Hansen, van Cutsem, Piessevaux, Lambrechts, Delorenzi, Tejpar:** Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet. Oncology* 8: 753–762 (2010)
114. **Roock, Vriendt, Normanno, Ciardiello, Tejpar:** KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet. Oncology* 6: 594–603 (2011)
115. **Rowland, Dias, Wiese, Kichenadasse, McKinnon, Karapetis, Sorich:** Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 12: 1888–1894 (2015)
116. **Sagaert, Vanstapel, Verbeek:** Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology* 1-2: 72–84 (2018)
117. **Sahin, Kazmi, Yorio, Bhadkamkar, Kee, Garrett:** Rare Though Not Mutually Exclusive: A Report of Three Cases of Concomitant KRAS and BRAF Mutation and a Review of the Literature. *Journal of Cancer* 4: 320–322 (2013)
118. **Saltz, Meropol, Loehrer, Needle, Kopit, Mayer:** Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 7: 1201–1208 (2004)
119. **Saxonov, Berg, Brutlag:** A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 5: 1412–1417 (2006)
120. **Scheffzek, Ahmadian, Kabsch, Wiesmüller, Lautwein, Schmitz, Wittinghofer:** The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science (New York, N.Y.)* 5324: 333–338 (1997)

121. **Schmiegel, Buchberger, Follmann, Graeven, Heinemann, Langer, Nothacker, Porschen, Rödel, Rösch, Schmitt, Wesselmann, Pox:** S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom. Zeitschrift für Gastroenterologie 12: 1344–1498 (2017)
122. **Shen, Toyota, Kondo, Lin, Zhang, Guo, Hernandez, Chen, Ahmed, Konishi, Hamilton, Issa:** Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 47: 18654–18659 (2007)
123. **Siegel, Miller, Goding Sauer, Fedewa, Butterly, Anderson, Cercek, Smith, Jemal:** Colorectal cancer statistics, 2020. CA: a cancer journal for clinicians 3: 145–164 (2020)
124. **Sorich, Wiese, Rowland, Kichenadasse, McKinnon, Karapetis:** Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology 1: 13–21 (2015)
125. **Sottoriva, Kang, Ma, Graham, Salomon, Zhao, Marjoram, Siegmund, Press, Shibata, Curtis:** A Big Bang model of human colorectal tumor growth. Nature genetics 3: 209–216 (2015)
126. **Sousa, Carvalho:** Heterogeneity in Lung Cancer. Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology 1-2: 96–107 (2018)
127. **Specht, Richter, Müller, Walch, Werner, Höfler:** Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. The American journal of pathology 2: 419–429 (2001)
128. **Stoffel, Kastrinos:** Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 7: 1059–1068 (2014)
129. **Tougeron, Lecomte, Pagès, Villalva, Collin, Ferru, Tourani, Silvain, Levillain, Karayan-Tapon:** Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. Annals of

- oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology 5: 1267–1273 (2013)
130. **Toyota, Ahuja, Ohe-Toyota, Herman, Baylin, Issa:** CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15: 8681–8686 (1999)
131. **Umar, Boland, Terdiman, Syngal, La Chapelle, Rüschoff, Fishel, Lindor, Burgart, Hamelin, Hamilton, Hiatt, Jass, Lindblom, Lynch, Peltomaki, Ramsey, Rodriguez-Bigas, Vasen, Hawk, Barrett, Freedman, Srivastava:** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* 4: 261–268 (2004)
132. **Vagaja, Parry, McCallum, Thomas, Bentel:** Are all RAS mutations the same? Coexisting KRAS and NRAS mutations in a caecal adenocarcinoma and contiguous tubulovillous adenoma. *Journal of clinical pathology* 8: 657–660 (2015)
133. **van Cutsem, Köhne, Hitre, Zaluski, Chang Chien, Makhson, D'Haens, Pintér, Lim, Bodoky, Roh, Folprecht, Ruff, Stroh, Tejpar, Schlichting, Nippgen, Rougier:** Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 14: 1408–1417 (2009)
134. **van Cutsem, Cervantes, Adam, Sobrero, van Krieken, Aderka, Aranda Aguilar, Bardelli, Benson, Bodoky, Ciardiello, D'Hoore, Diaz-Rubio, Douillard, Ducreux, Falcone, Grothey, Gruenberger, Haustermans, Heinemann, Hoff, Köhne, Labianca, Laurent-Puig, Ma, Maughan, Muro, Normanno, Österlund, Oyen, Papamichael, Pentheroudakis, Pfeiffer, Price, Punt, Ricke, Roth, Salazar, Scheithauer, Schmoll, Tabernero, Taïeb, Tejpar, Wasan, Yoshino, Zaanan, Arnold:** ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 8: 1386–1422 (2016)
135. **Watson, Ashwathnarayan, Lynch, Roy:** Tobacco use and increased colorectal cancer risk in patients with hereditary nonpolyposis colorectal

- cancer (Lynch syndrome). Archives of internal medicine 22: 2429–2431 (2004)
136. **Weisenberger, Siegmund, Campan, Young, Long, Faasse, Kang, Widschwendter, Weener, Buchanan, Koh, Simms, Barker, Leggett, Levine, Kim, French, Thibodeau, Jass, Haile, Laird:** CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nature genetics 7: 787–793 (2006)
137. **Weitz, Koch, Debus, Höhler, Galle, Büchler:** Colorectal cancer. Lancet (London, England) 9454: 153–165 (2005)
138. **White, Ironmonger, Steele, Ormiston-Smith, Crawford, Seims:** A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. BMC cancer 1: 906 (2018)
139. **Wittekind:** TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-Blackwell; Wiley-VCH-Verl. (2010)
140. **Wu, Lu, Shen, Yuan, Wang, Yin, Sun, Shen, Hu, Jiang, Wang:** Intratumoral heterogeneity and genetic characteristics of prostate cancer. International journal of cancer 12: 3369–3378 (2020)
141. **Yagi, Akagi, Hayashi, Nagae, Tsuji, Isagawa, Midorikawa, Nishimura, Sakamoto, Seto, Aburatani, Kaneda:** Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 1: 21–33 (2010)
142. **Yancovitz, Litterman, Yoon, Ng, Shapiro, Berman, Pavlick, Darvishian, Christos, Mazumdar, Osman, Polsky:** Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. PloS one 1: e29336 (2012)
143. **Yoon, Tougeron, Shi, Alberts, Mahoney, Nelson, Nair, Thibodeau, Goldberg, Sargent, Sinicrope:** KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). Clinical cancer research: an

official journal of the American Association for Cancer Research 11: 3033–3043 (2014)

144. **Zhao, Xu, Shi, Ma, Lu, Yang:** Detection of K-ras exon 1 mutations by constant denaturant capillary electrophoresis. Biomedical chromatography: BMC 8: 538–541 (2004)

7 Anhang

7.1 Aminosäuresequenz des BRAF

766AS
Chr 7 (7q34)

```

10          20          30          40          50
MAALSGGGGG GAEPGQALFN GDMEPEAGAG AGAAASSAAD PAIPPEEVWNI
60          70          80          90          100
KQMIKLTQEH IEALLDKFGG EHNPPSIYLE AYEEYTSKLD ALQQREQQLL
110         120         130         140         150
ESLNGTDFS  VSSASMDTV TSSSSSSLSV LPSSLSVFQN PTDVARSNPK
160         170         180         190         200
SPQKPIRVF  LPNKQRTVVP ARCGVTVRDS LKKALMMRGL IPECCAVYRI
210         220         230         240         250
QDGEKKPIGW DTDISWLTGE ELHVEVLENV PLTTHNFVRK TFFTlafCDF
260         270         280         290         300
CRKLLFQGER CQTCGYKFHQ RCSTEVPLMC VNYDQLDLLF VSKFFEHHPI
310         320         330         340         350
PQEEASLAET ALTSGSSPSA PASDSIGPQI LTSPSPSKI PIPQPFRRPAD
360         370         380         390         400
EDHRNQFQR  DRSSSAPNVH INTIEPVNID DLIRDQGRG  DGGSTGLSA
410         420         430         440         450
TPPASLPGSL TNVKALQKSP GPQREKSSS SSEDNRMKT  LGRRDSSDDW
460         470         480         490         500
EIPDGQITVG QRI[SGSFGT VYKGKWHGDV AVKMLNVTAP TPQQLQAFKN
510         520         530         540         550
EVGVLKTRH  VNILLFMGYS TKPQLAIVTQ WCEGSSLYHH LHIETKFEM
560         570         580         590         600
IKLIDIARQT AQGMDYLHAK SIIHRDLKSN NIFLHEDLTV KIGDFGLATV
610         620         630         640         650
KSRWSGSHQF EQLSGSILWM APEVIRMQDK NPYSFQSDVY AFGIVLYELM
660         670         680         690         700
TGQLPYSNIN NRDQIIFMVG RGYLSPDLK VRSNCPKAMK RLMAECLKKK
710         720         730         740         750
RDERPLFPQI LASIELLARS LPKIHRSASE PSLNRAGFQT EDFSLYACAS
760         766
PKTPIQAGGY GAFPVH

```

Mutationsstellen BRAF		
Codon	464	600
AS-Sequenz	Glycin	Valin
Triplet-code	GGU	GUU
	GGC	GUC
	GGA	GUA
	GGG	GUG

7.2 Aminosäuresequenz des KRAS Isoform 2A

189 AS
Chr 12 (12p12.1)

```

10          20          30          40          50
MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
60          70          80          90          100
CLLDILDITG [EEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI
110         120         130         140         150
KRVKDSQDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETS[KTRQ
160         170         180         189
RVEDAFYTLV REIRQYRLKK ISKEEKTPGC VKIKKCIIM

```

Isoform 2B

```

      10           20           30           40           50
MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
      60           70           80           90          100
CLLDILDITAG EEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREIQ
      110          120          130          140          150
KRVKDSSEVDP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
      160          170          180
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM

```

Unterschiede zwischen den Isoformen sind unterstrichen dargestellt.

Mutationsstellen KRAS					
Codon	12/13	59	61	117	146
AS-Sequenz	Glycin-Glycin	Alanin	Glutamin	Lysin	Alanin
Triplet-code	GGT-GGC	GCU GCC GCA GCG	GAA GAG	AAA AAG	GCU GCC GCA GCG

7.3 Aminosäuresequenz des NRAS

189 AS
Chr 1 (1p13.2)

```

      10           20           30           40           50
MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
      60           70           80           90          100
CLLDILDITAG EEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNSKSF ADINLYREQ
      110          120          130          140          150
KRVKSDSDVDP MVLVGNKCDL PTRTVDTKQA HELAKSYGIP FIETSAKTRQ
      160          170          180          189
GVEDAFYTLV REIRQYRLKK LNSSDDGTQG CMGSPCVLM

```

Mutationsstellen NRAS					
Codon	12/13	59	61	117	146
AS-Sequenz	Glycin-Glycin	Alanin	Glutamin	Lysin	Alanin
Triplet-code	GGT-GGC	GCU GCC GCA GCG	GAA GAG	AAA AAG	GCU GCC GCA GCG

8 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.