

Aus dem Pathologischen Institut  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



*Untersuchung zu prognostischen Gewebemarkern für unterschiedliche  
organotrope Metastasierungswege beim kolorektalen Karzinom*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Francesco Taverna

aus

München

Jahr

2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med.-univ. Jens Neumann

Zweiter Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Marlies Michl

Dritter Gutachter: apl. Prof. Dr. med. Martin K. Angele

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2022

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis.....   | 3  |
| Zusammenfassung.....  | 5  |
| Abstract (English).....   | 7  |
| Abbildungsverzeichnis.....  | 9  |
| Tabellenverzeichnis.....  | 11 |
| Abkürzungsverzeichnis.....  | 13 |
| 1. Einleitung: Das kolorektale Karzinom.....                        | 16 |
| 1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....                           | 16 |
| 1.2 Metastasierung.....   | 17 |
| 1.3 Therapie und Nachsorge.....                                     | 19 |
| 1.4 Molekulare Alterationen kanzerogener Signalwege.....            | 20 |
| 1.4.1 Karzinogenesewege und epithelial-mesenchymale Transition..... | 20 |
| 1.4.2 MAP-Kinase-Signalweg.....                                     | 21 |
| 1.4.3 $\beta$ -Catenin.....   | 22 |
| 1.4.4 CD133.....  | 23 |
| 1.4.5 p53.....  | 23 |
| 1.4.6 Mismatch-Reparatur-Gene.....                                  | 24 |
| 1.4.7 Weitere Biomarker.....  | 24 |
| 1.5 Fragestellung.....  | 26 |
| 2. Material und Methoden.....                                       | 27 |
| 2.1 Die untersuchten Patientenkollektive.....                       | 27 |
| 2.2 Mutationsanalyse.....   | 28 |
| 2.2.1 DNA-Isolation.....  | 28 |
| 2.2.2 PCR.....  | 29 |
| 2.2.3 Pyrosequenzierung.....  | 30 |
| 2.3 Analyse der RNA-Expression.....                                 | 31 |
| 2.3.1 Effizienztestung der Primer.....                              | 31 |
| 2.3.2 RNA-Isolation.....  | 36 |
| 2.3.3 Reverse Transkription.....                                    | 37 |
| 2.3.4 qPCR.....   | 38 |
| 2.4 Immunhistochemische Auswertung.....                             | 41 |
| 2.5 Statistische Auswertung.....                                    | 44 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 2.6 Materialien.....                            | 46  |
| 2.6.1 Verbrauchsmaterialien .....               | 46  |
| 2.6.2 Materialien (wiederverwendbar).....       | 48  |
| 2.6.3 Reagenzien und Chemikalien .....          | 49  |
| 2.6.4 Primer.....                               | 52  |
| 2.6.5 UPL-Sonden.....                           | 54  |
| 2.6.6 Antikörper .....                          | 55  |
| 2.6.7 Geräte .....                              | 56  |
| 2.6.8 Software .....                            | 58  |
| 3. Ergebnisse .....                             | 59  |
| 3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika .....   | 59  |
| 3.2 Immunhistochemie und Mutationsanalyse ..... | 68  |
| 3.3 RNA-Expressionsanalyse .....                | 71  |
| 3.4 Markerkombinationen .....                   | 77  |
| 3.5 Multivariate Analyse .....                  | 82  |
| 3.6 Überlebensdaten .....                       | 83  |
| 4. Diskussion und Schlussfolgerung .....        | 87  |
| Literaturverzeichnis.....                       | 102 |
| Anhang .....                                    | 116 |
| Danksagung.....                                 | 118 |
| Affidavit .....                                 | 119 |
| Lebenslauf .....                                | 120 |
| Publikationsliste .....                         | 121 |

## Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Tumorentitäten und Krebstodesursachen in Deutschland. Besonders beim Auftreten von Metastasen kommt es zu einer starken Verringerung des Gesamtüberlebens der Patienten. Molekulare Alterationen in verschiedenen karzinogenen Signalwegen scheinen einen Einfluss auf die Metastasierung zu haben. Deshalb wurden in dieser Arbeit unterschiedliche organotropen Metastasierungswege auf eine spezifische Verteilung molekularpathologischer Biomarker analysiert.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden zwei unabhängige Kollektive zusammengestellt und jeweils als Fall-Kontroll-Studien designt. Das Kollektiv A bestand aus 246 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom und wurde aufgeteilt in drei gleich große Gruppen, wobei die eine Gruppe ausschließlich Lungenmetastasen, die andere Gruppe ausschließlich Lebermetastasen und die Kontrollgruppe keine Metastasen aufwies. Das Kollektiv B bestand aus 45 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom und wurde ebenfalls in drei gleich große Gruppen aufgeteilt, bei der die eine Gruppe aus Fällen mit einer ZNS-Metastasierung, die andere Gruppe aus Fällen mit einer hepatischen Metastasierung und die Kontrollgruppe aus Fällen ohne Metastasierung bestand. Das Kollektiv A wurde mittels Pyrosequenzierung auf Mutationen in *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* untersucht sowie eine immunhistochemische Auswertung von CD133,  $\beta$ -Catenin, p53, MLH1 und MSH2 durchgeführt. Beim Kollektiv B wurde die RNA-Expression von *EMILIN3*, *SV2B*, *MTA1*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *ACVR1C* und *NFAT5*, welche sich in zu dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen als potenziell relevante Biomarker herauskristallisiert haben, mittels qPCR analysiert.

Dabei waren im Kollektiv A bei 52 von 82 (63,4%) Fällen mit einer pulmonalen Metastasierung eine Mutation in *KRAS*, *NRAS* oder *BRAF* nachweisbar, was signifikant häufiger war als in der Kontrollgruppe (39 von 82 [47,6%];  $p=0,04$ ). In der Gruppe der Lebermetastasen wiesen signifikant mehr Fälle eine hohe CD133-Expression auf (25 von 82 [30,5%]) als in der Kontrollgruppe (12 von 82 [14,6%];  $p=0,02$ ). Beim direkten Vergleich der Gruppe mit Lungenmetastasen mit der Lebermetastasen-Gruppe war die Kombination aus MAP-Kinase-Mutation und starker  $\beta$ -Catenin-Expression häufiger bei den Fällen mit einer pulmonalen Metastasierung (23 von 82 [28,0%] vs. 11 von 82 [13,4%];  $p=0,02$ ). Im Kollektiv B war in der Gruppe mit ZNS-Metastasen *NFAT5* mit einer relativen RNA-Menge von  $5,33 \times 10^{-2}$  (95%CI:  $2,76 \times 10^{-2}$ - $10,03 \times 10^{-2}$ ) stärker exprimiert als in der

Gruppe mit Lebermetastasen ( $3,00 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1,32 \times 10^{-2}$ - $4,18 \times 10^{-2}$ ]) oder in der Kontrollgruppe ( $1,78 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1,26 \times 10^{-2}$ - $6,36 \times 10^{-2}$ ]; globales  $p=0,02$ ). Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Gruppe der ZNS-Metastasen und einer sehr starken *ACVR1C*- und *SMC3*-Expression sowie den Kombinationen aus *ACVR1C*, *SMC3* und *NFAT5*. Das gleichzeitige Auftreten einer starken *NFAT5*-, *ACVR1C*- und *SMC3*-Expression fand sich ausschließlich in der Gruppe mit ZNS-Metastasen (5 von 15 [33,3%]; globales  $p=0,004$ ).

Diese Arbeit zeigt, dass Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und speziell die Kombination aus MAP-Kinase-Mutation und Deregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges mit der Metastasierung in die Lunge korrelieren. Eine starke Expression des Stammzellmarkers CD133 korreliert mit der Metastasierung in die Leber. Für die Metastasierung in das ZNS findet sich ein Zusammenhang mit der verstärkte RNA-Expression von *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3*. Diese Ergebnisse lassen auf die Existenz mehrerer molekularer Subgruppen schließen, die sich in der Ausprägung verschiedener Biomarker und in der Lokalisation der Metastasierung unterscheiden. Diese könnten einen Einfluss auf die Risikostratifizierung für die Entstehung von Metastasen in der Leber, Lunge und dem ZNS und damit auf das klinische Management von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom haben.

## Abstract (English)

Colorectal cancer is one of the most common tumour entities and causes of cancer death in Germany. The occurrence of metastases leads to a strong reduction in patient's survival. Molecular alterations in various carcinogenic pathways seem to have an influence on the formation of metastases. In this work, different metastatic patterns were analysed for a specific distribution of molecular biomarkers.

To investigate this hypothesis, two case-control studies were conducted with two independent collectives. Collective A consisted of 246 patients with colorectal cancer and was divided into three equally sized groups, one group with only lung metastases, the other group with only liver metastases and the control group with no metastases. Collective B consisted of 45 patients with colorectal cancer and was also divided into three equally sized groups, one group with brain metastases, the other one with hepatic metastases and the control group with no metastases. Collective A was analysed for mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* using pyrosequencing and an immunohistochemical evaluation of CD133,  $\beta$ -catenin, p53, MLH1 and MSH2 was performed. In collective B, the RNA expression of *EMILIN3*, *SV2B*, *MTA1*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *ACVR1C* and *NFAT5*, which emerged as potentially relevant biomarkers in studies preceding this work, was investigated using qPCR.

In collective A, 52 of 82 (63.4%) cases with pulmonary metastasis had a mutation in *KRAS*, *NRAS* or *BRAF*, which was significantly more frequent than in the control group (39 of 82 [47.6%];  $p=0.04$ ). In the group with liver metastases, significantly more cases had high CD133 expression (25 of 82 [30.5%]) than the control group (12 of 82 [14.6%];  $p=0.02$ ). In a head-to-head comparison of the group with pulmonary metastases versus the group with liver metastases, a combination of MAP-kinase mutation and strong  $\beta$ -catenin expression was more frequent in the cases with pulmonary metastasis (23 of 82 [28.0%] vs. 11 of 82 [13.4%];  $p=0.02$ ). In collective B, the group with brain metastases had a higher expression of *NFAT5* with a relative RNA quantity of  $5.33 \times 10^{-2}$  (95%CI:  $2.76 \times 10^{-2}$ - $10.03 \times 10^{-2}$ ) than the group with liver metastases ( $3.00 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1.32 \times 10^{-2}$ - $4.18 \times 10^{-2}$ ]) or the control group ( $1.78 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1.26 \times 10^{-2}$ - $6.36 \times 10^{-2}$ ]; global  $p=0.02$ ). In addition, there were significantly more cases with strong *ACVR1C* and *SMC3* expression and with combinations of *ACVR1C*, *SMC3* and *NFAT5* in the group with brain metastases. The co-occurrence of strong *NFAT5*, *ACVR1C* and *SMC3* expression was found exclusively in the group with brain metastases (5 of 15 [33.3%]; global  $p=0.004$ ).

This work shows that mutations in the MAP-kinase pathway and specifically the combination of MAP kinase mutation and deregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway correlate with metastasis to the lung. Strong expression of the stem cell marker CD133 correlates with metastasis to the liver. Furthermore, an increased RNA expression of *NFAT5*, *ACVR1C* and *SMC3* is associated with the formation of brain metastases. These results suggest the existence of several molecular subgroups that differ in the expression of various biomarkers and in the metastatic pattern. This could have an impact on the risk stratification for the development of metastases to the liver, lung and brain and on the clinical management of patients with colorectal cancer.



## Abbildungsverzeichnis

|              |  |          |
|--------------|--|----------|
| Abbildung 1: | Pyrogramme des Genabschnitts <i>KRAS</i> Exon 2 Kodon 12-13.   | Seite 31 |
| Abbildung 2: | Bandenmuster der Amplikons der Primer für <i>EMILIN3</i> , <i>ACVR1C</i> , <i>TMPRSS6</i> , <i>SMC3</i> , <i>NFAT5</i> , <i>SV2B</i> und <i>MTA1</i> .   | Seite 33 |
| Abbildung 3: | Diagramm zur Berechnung der Effizienz beispielhaft aus der Verdünnungsreihe von <i>MTA1</i> .  | Seite 35 |
| Abbildung 4: | Ergebnisdiagramm der qPCR beispielhaft von einem Fall für <i>NFAT5</i> , <i>ACVR1C</i> , <i>SMC3</i> und den Referenzgenen <i>GAPDH</i> , <i>YWHAZ</i> und $\beta$ - <i>Actin</i> .                    | Seite 39 |
| Abbildung 5: | Immunhistochemische Färbungen der Biomarker $\beta$ -Catenin, CD133, p53, MLH1 und MSH2.   | Seite 43 |
| Abbildung 6: | Vergleich der Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs A durch Balkendiagramme und einen Box-Plot.   | Seite 61 |
| Abbildung 7: | Vergleich der Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs B durch Balkendiagramme und einen Box-Plot.   | Seite 65 |
| Abbildung 8: | Box-Plots zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach dem relativen Anteil der RNA-Menge von <i>NFAT5</i> , <i>ACVR1C</i> , <i>SMC3</i> und <i>TMPRSS6</i> zu der RNA-Menge der Referenzgene. | Seite 72 |

- Abbildung 9: Heat-Map zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach dem relativen Anteil der RNA-Menge von *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und *TMPRSS6* zu der RNA-Menge der Referenzgene. Seite 74
- Abbildung 10: Venn-Diagramme zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Biomarker und Markerkombinationen. Seite 79
- Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für den Vergleich der Überlebensdaten der PUL- und HEP-Gruppe des Kollektivs A. Seite 85
- Abbildung 12: Zusammenfassung der Charakteristika der drei möglichen Subgruppen. Seite 100

## Tabellenverzeichnis

|             |   |          |
|-------------|---|----------|
| Tabelle 1:  | Auflistung der verwendeten Zelllinien für die einzelnen Gene in der Effizienztestung.   | Seite 32 |
| Tabelle 2:  | Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien.   | Seite 46 |
| Tabelle 3:  | Auflistung aller wiederverwendbaren Materialien.  | Seite 48 |
| Tabelle 4:  | Auflistung aller verwendeten Reagenzien und Chemikalien.  | Seite 49 |
| Tabelle 5:  | Auflistung aller für die Mutationsanalyse und RNA-Expressionsanalyse verwendeten Primer einschließlich der 5'-3' Basensequenz.  | Seite 52 |
| Tabelle 6:  | Auflistung aller verwendeten UPL-Sonden.  | Seite 54 |
| Tabelle 7:  | Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper.   | Seite 55 |
| Tabelle 8:  | Auflistung aller verwendeten Geräte.  | Seite 56 |
| Tabelle 9:  | Auflistung der verwendeten Software.  | Seite 58 |
| Tabelle 10: | Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs A (N=246).   | Seite 60 |
| Tabelle 11: | Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs B (N=45).  | Seite 64 |
| Tabelle 12: | Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und nach ihrer immunhistochemischen Ausprägung von CD133, $\beta$ -Catenin und p53 sowie nach der Mikrosatelliteninstabilität. | Seite 68 |

---

|             |  |          |
|-------------|--|----------|
| Tabelle 13: | Direkter Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A untereinander nach dem Auftreten der einzelnen Biomarker bzw. der Markerkombinationen.  | Seite 70 |
| Tabelle 14: | Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach ihrer RNA-Expression von <i>NFAT5</i> , <i>ACVR1C</i> , <i>SMC3</i> und <i>TMPRSS6</i> .  | Seite 71 |
| Tabelle 15: | Direkter Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B untereinander nach dem relativen Anteil der RNA-Menge des entsprechenden Gens zu der RNA-Menge der Referenzgene, nach der Verteilung der Hochrisikogruppen und nach den Markerkombinationen.                      | Seite 75 |
| Tabelle 16: | Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Markerkombinationen.   | Seite 77 |
| Tabelle 17: | Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach der Häufigkeit der aufgetretenen Markerkombinationen.   | Seite 80 |
| Tabelle 18: | Multivariate Analyse der einzelnen Gruppen des Kollektivs A untereinander unter Berücksichtigung der Variablen Alter (<65 Jahren vs. ≥65 Jahren), Lymphknotenstatus (N0 vs. N+), MAP-Kinase-Status, MSI-Status, p53-Status, β-Catenin-Expression und CD133-Expression. | Seite 82 |
| Tabelle 19: | Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) in der PUL- und HEP-Gruppe des Kollektivs A.   | Seite 84 |

## Abkürzungsverzeichnis

|           |   |
|-----------|---|
| 95%CI     | 95%-Konfidenzintervall  |
| ACVR1C    | Activin A Receptor Type 1C  |
| ALK7      | Activin Receptor-Like Kinase 7  |
| ANOVA     | Analysis of Variance  |
| APC       | Adenomatous-Polyposis-Coli-Protein  |
| Bcl-2     | B-Cell Lymphoma 2   |
| bp        | Basenpaare  |
| BRA       | Gruppe bestehend aus Fällen mit ZNS-Metastasen                                  |
| bzw.      | beziehungsweise   |
| C         | Celsius   |
| ca.       | circa   |
| CAPOX     | Chemotherapie-Schema mit Capecitabin und Oxaliplatin                            |
| CD133     | Cluster of Differentiation 133  |
| CEA       | Carcinoembryonales Antigen  |
| cm        | Zentimeter  |
| c-myc     | Cellular Myelocytomatosis Oncogene  |
| Cq        | Quantification Cycle  |
| CSC       | Cancer Stem Cell  |
| CT        | Computertomographie   |
| (c)DNA    | (complementary) Deoxyribonucleic Acid   |
| dNTP      | Desoxyribonukleosidtriphosphat  |
| EGFR      | Epidermal Growth Factor Receptor  |
| EMILIN3   | Elastin Microfibril Interfacer 3  |
| EMT       | Epithelial-mesenchymale Transition  |
| FFPE      | Formalin-Fixed Paraffin-Embedded  |
| FOLFIRI   | Chemotherapie-Schema mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Irinotecan              |
| FOLFOX    | Chemotherapie-Schema mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin             |
| FOLFOXIRI | Chemotherapie-Schema mit Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin und Irinotecan |
| x g       | Vielfaches der Erdbeschleunigung  |

|            |   |
|------------|---|
| g          | Gramm   |
| GAPDH      | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                  |
| GDP/GTP    | Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat                    |
| GSK-3      | Glykogensynthase-Kinase 3                                 |
| HE         | Hämatoxylin-Eosin   |
| HEP        | Gruppe bestehend aus Fällen mit Lebermetastasen           |
| HR         | Hazard Ratio  |
| µl         | Mikroliter  |
| LEF-1      | Lymphoid Enhancer Binding Factor 1                        |
| µM         | mikromolar  |
| M0         | Kontrollgruppe bestehend aus Fällen ohne Metastasen       |
| M1         | Zusammengelegte Gruppe bestehend aus PUL und HEP          |
| MAP        | Mitogen-Activated Protein                                 |
| MEK        | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase                   |
| MDM2       | Mouse Double Minute 2 Homolog                             |
| ml         | Milliliter  |
| MLH1       | MutL Protein Homolog 1                                    |
| MSH2       | MutS Protein Homolog 2                                    |
| MSI        | Mikrosatelliteninstabilität/mikrosatelliteninstabil       |
| MSS        | Mikrosatellitenstabilität/mikrosatellitenstabil           |
| MTA1       | Metastasis-Associated Protein 1                           |
| N          | Anzahl  |
| NFAT5      | Nuclear Factor of Activated T-cells 5                     |
| ng         | Nanogramm   |
| OS         | Overall Survival (=Gesamtüberleben)                       |
| PFS        | Progression-Free Survival (=progressionsfreies Überleben) |
| (q)PCR     | (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion                  |
| PUL        | Gruppe bestehend aus Fällen mit Lungenmetastasen          |
| (B)RAF     | (B) Rapidly Accelerated Fibrosarcoma                      |
| (H/K/N)RAS | (Harvey/Kirsten/Neuroblastoma) Rat Sarcoma Proto-Oncogene |
| (m)RNA     | (messenger) Ribonucleic Acid                              |
| ROC        | Receiver Operating Characteristic                         |
| rpm        | Revolutions per Minute (=Umdrehungen pro Minute)          |

---

|              |  |
|--------------|--|
| RT           | Reverse Transkription  |
| S.           | Seite  |
| S100A4       | S100 Calcium-Binding Protein A4  |
| Smad         | Mothers Against Decapentaplegic Homolog  |
| SMC3         | Structural Maintenance of Chromosomes 3  |
| SV2B         | Synaptic Vesicle Glycoprotein 2B   |
| Taq          | Thermus aquaticus  |
| TCF          | Transcription Factor   |
| TGF- $\beta$ | Transforming growth factor $\beta$   |
| TMPRSS6      | Transmembrane Serine Protease 6  |
| UICC         | Union internationale contre le cancer  |
| UPL          | Universal ProbeLibrary   |
| YWHAZ        | Tyrosine 3 Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase<br>Activation Protein Zeta |
| ZEB          | Zinc-Finger E Homeobox-Binding Protein   |
| ZNS          | Zentrales Nervensystem   |

# 1. Einleitung: Das kolorektale Karzinom

## 1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. So gab es im Jahr 2016 ca. 58.000 Neuerkrankungen. Damit liegt der Darm bei Frauen auf dem zweiten und bei Männern auf dem dritten Platz der häufigsten Tumorlokalisationen. Anders ausgedrückt bedeutet das, dass jeder 17. Mann und jede 20. Frau im Laufe ihres Lebens die Diagnose „kolorektales Karzinom“ erhält. Gleichzeitig verstarben im Jahr 2016 in Deutschland ca. 25.000 Menschen an dieser Erkrankung, wodurch das kolorektale Karzinom sowohl bei Männern als auch bei Frauen die dritthäufigste Krebstodesursache ist (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019, S. 17 und 38).

Weltweit finden sich sehr unterschiedliche Prävalenzen für das kolorektale Karzinom. Besonders in wirtschaftlich stärker entwickelten Ländern findet sich ein erhöhtes Auftreten des kolorektalen Karzinoms, was auf einen starken Einfluss von Risikofaktoren auf die Krebsentstehung schließen lässt (Zentrum für Krebsregisterdaten 2016, S. 28-29). So zeigt sich beispielsweise bei Einwandererfamilien, die aus einem Land mit niedriger Inzidenz in ein Land mit hoher Inzidenz migrieren, dass sich das Risiko der Nachkommen an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken an das Risiko der allgemeinen Bevölkerung des Einwanderungslandes in den nachfolgenden Generationen annähert. Dementsprechend handelt es sich beim kolorektalen Karzinom um eine Tumorentität, deren Entstehung stark von äußeren Faktoren beeinflusst wird (Hagggar et al. 2009).

Zu den Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms zählen neben erblichen Faktoren, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und einem Alter über 50 Jahren vor allem Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung, Verzehr von rotem Fleisch, Alkohol- und Tabakkonsum (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019, S. 38). Bei diesen modifizierbaren Risikofaktoren handelt es sich um Lebensstil- und Ernährungsgewohnheiten, die in der Allgemeinbevölkerung sehr weit verbreitet sind (Robert-Koch-Institut 2016, S. 14-15 und 18-19). Daraus lässt sich schließen, dass eine Großzahl aller Erwachsenen mindestens einen Risikofaktor besitzt und damit potenziell zu der Risikogruppe für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms gehört.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das kolorektale Karzinom aufgrund seiner hohen Inzidenz und Mortalität sowie aufgrund seiner häufig vorkommenden Risikofaktoren von sehr hoher Relevanz für die Gesundheit der Gesamtbevölkerung ist.



## **1.2 Metastasierung**

Obwohl das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Tumorlokalisationen und Krebstodesursachen gehört, hat es generell eine potenziell bessere Prognose im Vergleich zu anderen Tumorentitäten. Bei der Betrachtung des Überlebens in Abhängigkeit vom UICC Stadium liegt das 5-Jahres-Überleben im Stadium I bei ca. 90% und im Stadium III bei ca. 66%. Dies fällt jedoch stark im Stadium IV beim Auftreten einer Fernmetastase ab. Hier liegt das relative 5-Jahres-Überleben nur noch bei ca. 14% (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019, S. 40). Die Organmetastasierung stellt beim kolorektalen Karzinom einen der wichtigsten Prognosefaktoren dar (Qiu et al. 2015). Dieser Effekt ist besonders schwerwiegend, da bei ca. 20% der Patienten bereits bei Diagnosestellung eine synchrone Metastasierung vorliegt (Van der Geest et al. 2015) und ca. die Hälfte aller Patienten im Laufe der Erkrankung eine metachrone Fernmetastasierung entwickeln (Van Cutsem et al. 2014).

Im Allgemeinen erfolgt der Prozess zur Entstehung von Metastasen in mehreren Schritten. Er beginnt mit dem Loslösen einzelner Tumorzellen vom Primarius und dem Eintritt dieser Zellen in entweder das Blut- oder Lymphgefäßsystem. Darauf folgt das Anhaften der Zellen an das Gewebe eines anderen Organs und schließlich muss die neu gebildete Metastase Wachstum und die Bildung einer eigenen Gefäßversorgung im neuen Organ initiieren. Für die Organspezifität der Metastasierung geht man zum einen davon aus, dass Metastasen in den Organen gebildet werden, die ein passendes Mikromilieu besitzen. Zum anderen hängt die Spezifität auch von mechanischen Faktoren ab wie dem Verlauf des Blut- und Lymphgefäßsystems (Chambers et al. 2002).

Die häufigsten Lokalisationen der Organmetastasen beim kolorektalen Karzinom sind die Leber und die Lunge. Die Studie von Holch et al. 2017 hat bei dem untersuchten Kollektiv (bestehend aus Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom) gezeigt, dass ca. 70% der Metastasen in der Leber und ca. 24% in der Lunge lokalisiert waren. Seltene Lokalisationen, wie Knochen und ZNS, traten nur in 4% bzw. 2% der Fälle auf (Holch et al. 2017). Im Folgenden werden einige Eigenschaften der hepatischen, pulmonalen und ZNS-Metastasierung beschrieben:

### **Hepatische Metastasierung:**

Grundsätzlich werden die anatomischen Verhältnisse dafür verantwortlich gemacht, dass die häufigste Metastasenlokalisierung des kolorektalen Karzinoms die Leber ist. Da der venöse Abfluss des gesamten Kolons und die oberen Anteile des Rektums über das Portalvenensystem zur Leber verlaufen (Aumüller 2010, S. 639 und 647), erhöht das die

Wahrscheinlichkeit für Lebermetastasen (Jin et al. 2012). Bei der Betrachtung des Erkrankungsverlaufs bei Patienten mit Lebermetastasen sieht man, dass diese beim kolorektalen Karzinom häufiger synchron als metachron entstehen und dass diese sich auch etwas häufiger beim Kolon- als beim Rektumkarzinom finden lassen (Holch et al. 2017). Eine synchrone Metastasierung gilt als ein negativer prognostischer Faktor. So haben Patienten mit synchronen Metastasen ein geringeres 5-Jahres-Überleben als Patienten mit einer metachronen Metastasierung (Ghiringhelli et al. 2014). Das Auftreten von Metastasen in der Leber an sich ist ebenfalls ein negativer prognostischer Faktor für Patienten mit kolorektalem Karzinom. So ist das mediane Überleben von Patienten mit Lebermetastasen geringer als das mediane Überleben von Patienten mit einer alleinigen pulmonalen Metastasierung (Prasanna et al. 2018).

#### Pulmonale Metastasierung:

Die Metastasierung in die Lunge entsteht im Gegensatz zu der Leber etwas häufiger metachron als synchron. Es handelt sich somit um eine Progression der Erkrankung, die meist erst im späteren Verlauf stattfindet (Holch et al. 2017). Die pulmonale Metastasierung hat von allen Lokalisationen das beste mediane Überleben (Prasanna et al. 2018). Außerdem finden sich pulmonale Metastasen häufiger beim Rektumkarzinom als beim Kolonkarzinom (Qiu et al. 2015). Im Allgemeinen wird der Verlauf der Blutgefäße als Ursache hierfür angesehen. Der venöse Abfluss des mittleren und unteren Abschnitts des Rektums findet über Äste der Venae iliacae in die Vena cava inferior statt, wodurch die Leber umgangen wird (Aumüller 2010, S. 647).

#### ZNS-Metastasierung:

Die seltene Metastasierung in das ZNS verhält sich anders als die bisher genannten. So findet diese in der Regel im sehr späten Krankheitsverlauf statt. Metastasen im ZNS treten ca. 24 bis 29 Monate nach der Erstdiagnose des Primärtumors auf (Damiens et al. 2012; Michl et al. 2015). Die solitäre Metastasierung in das ZNS ohne zusätzlichen extrazerebralen Befall ist dabei selten. Es bestehen meist vorher schon Leber- und/oder Lungenmetastasen. Die Lunge ist dabei noch häufiger betroffen (Michl et al. 2015; Damiens et al. 2012; Kye et al. 2012; Farnell et al. 1996) und der Primarius befindet sich häufiger im Rektum als im Kolon (Michl et al. 2015; Damiens et al. 2012; Tan et al. 2009). Zudem weisen Patienten mit kolorektalem Karzinom und ZNS-Metastasen mit ca. 2-6 Monaten das kürzeste mediane Überleben von allen Metastasenlokalisationen auf (Michl et al. 2015; Prasanna et al. 2018).

### **1.3 Therapie und Nachsorge**

Im Folgenden wird grob auf die Therapie und die Nachsorge des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingegangen. Die Entscheidung für den entsprechenden Therapieweg ist analog der aktuellen S3-Leitlinie von mehreren Faktoren abhängig. Dabei hat neben dem Allgemeinzustand des Patienten und der Ausdehnung der Erkrankung auch die Molekularbiologie des Tumors einen großen Einfluss auf die Therapiewahl. Bei Patienten mit einem guten Allgemeinzustand, einer primär resektablen Erkrankung und prognostisch günstigen Faktoren sollte eine Operation der Metastase angestrebt werden. (AWMF 2019, S. 183-184 und 191-194). So spielen beispielsweise für die Einschätzung der Resektabilität von Lebermetastasen zum einen technische Faktoren und zum anderen prognostische Faktoren eine Rolle, wie die Größe und die Anzahl der Lebermetastasen (Fong et al. 1999; Van Cutsem et al. 2016, S. 1395 - 1396).

Wenn die Resektion der Metastase nicht möglich ist, wird eine systemische Therapie mit dem Ziel einer maximalen Tumorreduktion empfohlen. Dabei ist die Wahl der Therapie von der Molekularbiologie des Tumors abhängig. Hierfür stehen Chemotherapie-Doubletten wie FOLFOX, FOLFIRI oder CAPOX mit oder ohne Bevacizumab als Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Die Hinzunahme eines anti-EGFR-Antikörpers wie Cetuximab oder Panitumumab ist von dem RAS-Status abhängig. Zudem sollte beim Vorliegen einer *BRAF*-Mutation eine sehr effektive Chemotherapie wie beispielsweise die Chemotherapie-Triplette FOLFOXIRI verwendet werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Patienten beim Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität von einer Therapie mit Immun-Checkpointinhibitoren profitieren. Jedoch ist dieser Therapieweg noch nicht Teil der S3-Leitlinie (AWMF 2019, S. 198-216).

Während sich die Nachsorge bei Patienten im UICC Stadium I auf die Koloskopie beschränkt, erstreckt sie sich bei Patienten im UICC Stadium II oder III standardmäßig auf 5 Jahre und besteht aus der regelmäßigen Durchführung einer Anamnese mit körperlicher Untersuchung, einer CEA-Bestimmung, einer Koloskopie, einer Abdomensonografie und bei Rektumkarzinomen einer CT-Untersuchung, einem Röntgen vom Thorax und eventuell einer Sigmoidoskopie. Eine konsequente Nachsorge ist essentiell, da Patienten mit einem kolorektalen Karzinom in den 5 Jahren nach ihrer Therapie ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und für die Bildung von Fernmetastasen haben (AWMF 2019, S. 231 und 235).

## **1.4 Molekulare Alterationen kanzerogener Signalwege**

### **1.4.1 Karzinogenesewege und epithelial-mesenchymale Transition**

Die Entstehung von kolorektalen Karzinomen kann auf verschiedenen Karzinogenesewegen ablaufen. Dabei ist die Adenom-Karzinom-Sequenz die häufigste Form, bei der ein benignes Adenom durch das Anhäufen mehrerer molekularer Alterationen in ein malignes Karzinom transformiert wird. Eine Veränderung im APC-Gen und die dadurch anschließende Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist meist für die Initiierung dieses Karzinogeneseweges verantwortlich. Weitere molekulare Veränderungen, die sich häufig im Verlauf dieses Prozesses anhäufen, sind unter anderem Mutationen in *RAS* und *TP53*. Ein weiterer Entstehungsweg für das kolorektale Karzinom ist die serratierte Karzinogenese. Hierbei sind sessil serratierte Adenome die Vorläuferläsionen und auf molekularer Ebene finden sich häufiger Mutationen in *BRAF* und eine Mikrosatelliteninstabilität als in der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2017, S. 276; Kirchner et al. 2018, S. 403-405).

Für die Entstehung von Metastasen ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ein wichtiger Prozess. Die EMT beschreibt einen zellulären Vorgang, bei der sich eine eigentlich polare und mit der Basalmembran verbundene Epithelzelle durch verschiedene biochemische Veränderungen in eine Zelle mit einem mesenchymalen Phänotyp entwickelt. Dadurch erhält die Zelle die Fähigkeiten zur Migration und Invasion (Kalluri et al. 2009). Auf zellulärer Ebene kommt es bei der EMT zu einer verringerten Expression von Oberflächenproteinen und Bestandteilen des Zytoskeletts wie E-Cadherin, Claudine, Occludine und Zytokeratine und zu einer verstärkten Expression von mesenchymalen Biomarkern (Zeisberg et al. 2009; Tripathi et al. 2018). Speziell die Expression von E-Cadherin wird von mehreren zellulären Proteinen beeinflusst. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren TWIST, SNAIL und ZEB, die direkt E-Cadherin herunterregulieren und gleichzeitig die Expression mesenchymaler Biomarker wie Fibronectin, N-Cadherin and Vimentin steigern können (Georgakopoulos-Soares et al. 2020). Die EMT findet sich in physiologischen Prozessen wie bei der Embryonalentwicklung und der Gewebsheilung. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich die EMT auch in neoplastischen Zellen finden lässt, ausgelöst durch genetische und epigenetische Alterationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen. Es ist davon auszugehen, dass die EMT ein relevanter Schritt für die Bildung von Metastasen ist (Kalluri et al. 2009).

### **1.4.2 MAP-Kinase-Signalweg**

Sowohl bei der Karzinogenese als auch bei der Metastasenbildung spielen mehrere Biomarker eine wichtige Rolle. Zu diesen Biomarkern zählen auch Veränderungen im MAP-Kinase-Signalweg. Allgemein beginnt dieser mit einer Bindung eines extrazellulären Liganden an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Kierszenbaum 2019, S. 108). Dadurch kann durch GTP-Austauschfaktoren das GDP am RAS-Protein entfernt werden und durch ein GTP ersetzt werden, wodurch RAS nun in seiner aktiven Form vorliegt. Die Inaktivierung des RAS-Proteins erfolgt wiederum durch eine Hydrolyse des GTPs zu GDP, was zum einen durch eine eigene GTPase-Aktivität von RAS geschieht und zum anderen durch GTPase aktivierende Proteine verstärkt wird (Pantsar 2020). Anschließend folgt eine Kaskade, bei der nacheinander RAF, MEK und die MAP-Kinase aktiviert werden. Diese kann selbst wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche das Zellwachstum, Zelldifferenzierung und die Proliferation regulieren (Kierszenbaum 2019, S. 108). So wird beispielsweise auch die Expression der Transkriptionsfaktoren TWIST, SNAIL und ZEB vom MAP-Kinase-Signalweg reguliert, wodurch dieser auch einen Einfluss auf die EMT hat (Tripathi et al. 2018).

Veränderungen im MAP-Kinase-Signalweg gehören zu den häufigsten Alterationen in neoplastischen Zellen. So haben ca. 27% aller Tumore des Menschen eine Mutation im *RAS*-Gen. Dabei sind in der *RAS*-Proteinfamilie am häufigsten Mutationen in *KRAS* und am zweithäufigsten in *NRAS* zu finden. *HRAS* ist nur sehr selten betroffen (Hobbs et al. 2016). Innerhalb der Gene von *KRAS* und *NRAS* finden sich die häufigsten Mutationen im Codon 12 und 13 des Exons 2 (Li et al. 2020). Aber es gibt auch seltenere Lokalisationen wie im Codon 61 des Exons 3 und im Codon 117 und 146 des Exons 4 (Stolze et al. 2015). Besonders die Mutationen im Codon 12, 13 und 61 führen zu einer Beeinträchtigung der intrinsischen und durch GTPase aktivierende Proteine verstärkten Hydrolyse des GTP, wodurch das RAS dauerhaft aktiv bleibt (Lu et al. 2016).

In der RAF-Proteinfamilie finden sich beim kolorektalen Karzinom vor allem Mutationen im *BRAF*. So weisen ca. 10% der Patienten mit einem metastasierten, kolorektalen Karzinom hier eine Mutation auf. Im Codon 600 des Exons 15 finden sich die meisten *BRAF*-Mutationen und dabei handelt es sich vor allem um V600E-Mutationen. V600 ist in seiner physiologischen Form dafür zuständig, dass RAF ohne die Aktivierung durch RAS inaktiv bleibt. Eine Mutation führt zu einer dauerhaften Aktivierung von RAF (Li et al. 2020).

Einige Studien verweisen auf einen Zusammenhang zwischen Mutationen in *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* und einer schlechteren Prognose der Patienten. So zeigte die Studie von Modest et al. 2016 bei Patienten mit Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg ein verringertes Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben (Modest et al. 2016). Die Studie von Tsilimigras et al. 2018 wies eine Korrelation zwischen einer Verringerung des generellen und rezidivfreien Überlebens und dem Vorhandensein von *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen speziell beim hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom nach (Tsilimigras et al. 2018). Neben dem möglichen prognostischen Einfluss dieser Marker zeigt sich auch, dass eine Mutation in *KRAS*, *NRAS* oder *BRAF* Einfluss auf die Lokalisation der Metastasierung haben kann. So findet sich eine Mutation in diesen Genen häufiger bei Patienten mit Metastasen in der Lunge oder im ZNS (Tie et al. 2011).

### **1.4.3 $\beta$ -Catenin**

Der Biomarker  $\beta$ -Catenin ist Teil des WNT-Signalweges. Hierbei spielt vor allem die intrazelluläre Protein-Kinase GSK-3 eine zentrale Rolle. Im Grundzustand ist diese dauerhaft aktiv, wodurch sich das Protein Axin binden kann, an dem wiederum APC und  $\beta$ -Catenin gebunden sind, und wodurch GSK-3  $\beta$ -Catenin phosphorylieren kann. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin von Proteasomen abgebaut und die  $\beta$ -Catenin-Konzentration innerhalb der Zelle bleibt konstant niedrig. Die Bindung von WNT an seinen Rezeptor führt zu einer Inhibition von GSK-3, die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bleibt aus und dessen Konzentration steigt. Nun kann das  $\beta$ -Catenin zusammen mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF-1 verschiedene Gene regulieren, die für das Zellwachstum zuständig sind, wie beispielsweise *c-myc*. Bei einem Ausfall des APC-Proteins kann  $\beta$ -Catenin nicht inaktiviert werden, wodurch es ebenfalls zu einem Anstieg der Konzentration kommt (Doenecke 2005, S. 506-507 und S. 755).

Eine hohe  $\beta$ -Catenin-Expression und das Vorhandensein von  $\beta$ -Catenin im Zellkern führt zu einer erhöhten Zellproliferation und kann Teil der Tumorgenese sein (Shang et al. 2017). Neben dem Einfluss des WNT-Signalweges auf das Zellwachstum kann dieser auch im Zusammenhang mit einer möglichen EMT stehen. So hat sich gezeigt, dass der zusammen mit  $\beta$ -Catenin wirkende Transkriptionsfaktor LEF-1 eine EMT auslösen kann (Kim et al. 2002). Bei Patienten mit einem sporadischen kolorektalen Karzinom finden sich sehr häufig Veränderungen bei Proteinen des WNT-Signalweges vor allem beim APC. Dies wird als frühes Ereignis in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms gesehen (Cheng et al. 2019). Die Auswirkung einer hohen nukleären  $\beta$ -Catenin-Expression auf die Prognose

der Patienten ist nicht komplett eindeutig. Einige Studien zeigen, dass eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin im Zellkern mit einem schlechteren Überleben korreliert (Lugli et al. 2007; Yoshida et al. 2015). Aber es finden sich auch andere Untersuchungen, die diese Korrelation nicht aufzeigen (Chung et al. 2001; Wanitsuwan et al. 2008).

#### **1.4.4 CD133**

Ein weiterer relevanter Biomarker ist das CD133. CD133 ist ein transmembranes Protein, welches als Marker für Tumorzellen verwendet wird, die die Fähigkeiten einer Stammzelle besitzen (Horst et al. 2008). Nach dem sogenannten CSC-Modell ist das Tumorgewebe hierarchisch aufgebaut und an oberster Stelle dieser Hierarchie ist eine kleine Zellpopulation, die in ihren Eigenschaften normalen Stammzellen ähnelt. Diese Tumorstammzellen sind nach dem CSC-Modell für die Aufrechterhaltung der Zellpopulation und damit des Tumors selbst verantwortlich (Kim et al. 2017). Für diese stammzellähnlichen Zellen hat sich gezeigt, dass sie eine starke Expression von CD133 aufweisen und speziell auch beim kolorektalen Karzinom eine Rolle spielen (Ricci-Vitiani et al. 2007). Neben der Relevanz von CD133 als Stammzellmarker wird für CD133 auch angenommen, dass es sich um einen Prognosefaktor des kolorektalen Karzinoms handelt. Bei starker Expression von CD133 zeigt sich eine Verringerung des 5- und 10-Jahres-Überlebens der Patienten (Horst et al. 2008). Zudem finden sich bei einer starken CD133-Expression häufiger Fernmetastasen als bei einer niedrigen Expression (Neumann et al. 2012).

#### **1.4.5 p53**

Zu den klassischen Alterationen beim kolorektalen Karzinom zählen auch Veränderungen im p53. Mehr als die Hälfte aller Tumore, die beim Menschen vorkommen, weisen eine Mutation im entsprechenden Gen von p53 auf. Grundsätzlich wird p53 durch seine Bindung an den Faktor MDM2 dauerhaft von Proteasomen abgebaut und dessen Konzentration in der Zelle konstant niedrig gehalten (Doenecke 2005, S. 754). Beim Auftreten von DNA-Schädigungen wird die Bindung zwischen p53 und MDM2 gehemmt und damit der Abbau von p53 verhindert. Durch die Anhäufung von p53 kommt es nun zu einem Stoppen des Zellzyklus in der G1-Phase unter anderem durch die Aktivierung von p21. Dadurch soll die Zelle die Möglichkeit bekommen die Schäden in der DNA zu reparieren, bevor sie in die S-Phase übergeht. Außerdem kann p53 unter anderem durch die Aktivierung der Bcl-2-Proteinfamilie die Apoptose der Zelle auslösen. Aufgrund dieser

Funktionen wird p53 zu den Tumorsuppressoren gezählt (Zilfou und Lowe 2009). Karzinome mit Veränderungen im p53 zeigen häufiger eine lymphatische oder vaskuläre Invasion, eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapien und sie korrelieren mit einem schlechteren Überleben (Li und Zhou et al. 2015).

#### **1.4.6 Mismatch-Reparatur-Gene**

Eine weitere relevante, pathologische Alteration in Zellen des kolorektalen Karzinoms sind Mutationen in den Mismatch-Reparatur-Genen. Die Aufgabe der Mismatch-Reparatur-Gene ist die Korrektur von Basenfehlpaarungen und kleinere Insertionen der DNA (Murken 2006, S. 86). Beim Auftreten von Mutationen in diesen Genen kommt es zu einer Anhäufung von Replikationsfehlern, wozu auch die Mikrosatelliteninstabilität gehört, also eine Variabilität in der Länge von kurzen, repetitiven Basensequenzen in der DNA. Eine Mikrosatelliteninstabilität tritt sehr häufig bei erblich bedingten Formen des kolorektalen Karzinoms auf, aber auch bei sporadischen Fällen (Xiao and Freeman 2015). Die Mismatch-Reparatur-Gene *MLH1* und *MSH2* sind dabei am häufigsten betroffen. Beim kolorektalen Karzinom finden sich Ausfälle von *MLH1* oder *MSH2* häufiger bei Tumoren der rechten Kolonseite und Patienten mit einem *MLH1*- oder *MSH2*-Verlust weisen auch ein besseres Gesamtüberleben auf (Wang et al. 2019).

#### **1.4.7 Weitere Biomarker**

Neben den bisher genannten, etablierten und gut untersuchten Biomarkern gibt es auch weitere Faktoren, die Einfluss auf die Karzinogenese und Metastasenbildung haben könnten, über deren Rolle beim kolorektalen Karzinom es aber bisher nur wenige Studien gibt. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit haben sich die Biomarker *EMILIN3*, *SV2B*, *MTA1*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *ACVR1C* und *NFAT5* als solche potenziellen Kandidaten herauskristallisiert.

Das Protein *EMILIN3* gehört zur *EMILIN*-Familie. Deren Funktion liegt vor allem darin, dass sie Bestandteil der extrazellulären Matrix sind. Es werden jedoch auch Wechselwirkungen mit Proteinen wie TGF- $\beta$  beschrieben. Speziell zum *EMILIN3* ist nur wenig bekannt. Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass es vor allem während der Embryogenese im mesenchymalen Gewebe aufzufinden ist. Im Erwachsenenstadium nimmt die Expression jedoch stark ab (Schiavinato et al. 2012).

Ein weiteres, möglicherweise relevantes Protein ist das *SV2B*, welches Teil der *SV2*-Familie ist. Dabei handelt es sich um synaptische Vesikel-Proteine, die vor allem im ZNS



exprimiert werden (Bajjalieh et al. 1993). Es ist davon auszugehen, dass die Funktion dieser Proteine vor allem die Regulation der Exozytose der synaptischen Vesikel und damit die Freisetzung der Neurotransmitter umfasst (Nowack et al. 2010).

Das Protein MTA1 befindet sich hauptsächlich im Zellkern und es besitzt eine sehr weitläufige Funktion. Über viele Gene und Proteine hat es Einfluss auf Zellwachstum, DNA-Reparatur, Angiogenese und in Tumorzellen auch auf Invasion und Metastasierung (Sen et al. 2014).

Bei dem Protein TMPRSS6 handelt es sich um eine transmembrane Serin-Protease, die hauptsächlich in der Leber exprimiert wird. Es ist bekannt, dass das TMPRSS6 einen Einfluss auf den Eisenstoffwechsel aufgrund seiner regulatorischen Funktion auf Heparin hat (Dion et al. 2018).

Das Protein SMC3 ist im Zellkern Teil des Cohesin-Komplexes, wodurch es relevant für die Kohäsion und die Trennung der Schwesterchromatiden während der Mitose ist (Ghiselli et al. 2003). Im Allgemeinen findet sich im kolorektalen Karzinom eine vermehrte *SMC3*-Expression. Es hat sich gezeigt, dass eine Überexpression von *SMC3* zu einer vermehrten Zelltransformation und -wachstum führt (Ghiselli und Iozzo 2000). Außerdem gibt es Hinweise, dass *SMC3* zu einer verstärkten Aktivierung von  $\beta$ -Catenin führen kann, wodurch es ebenfalls Einfluss auf die Tumorgenese und Metastasierung haben könnte (Ghiselli et al. 2003).

Beim *ACVR1C* (auch *ALK7* genannt) handelt es sich um eine Typ I Rezeptor Serin/Threoninkinase, die Teil des TGF- $\beta$ -Signalweges ist. Nach Bindung eines Mitglieds der TGF- $\beta$ -Liganden an die transmembranen Typ I und II Rezeptor Serin/Threoninkinasen kommt es zur Aktivierung der Smad-Proteine (Bondestam et al. 2001). Diese wirken als Transkriptionsfaktoren und führen unter anderem zu einer verminderten Zellproliferation, wodurch sie Einfluss auf die Karzinogenese haben (Shi und Massagué 2003). Zu den Organen, die am meisten mRNA von *ACVR1C* exprimieren, zählen das Gehirn, das Kolon und der Pankreas (Bondestam et al. 2001). Über die Auswirkungen einer Überexpression von *ACVR1C* ist die Studienlage nicht eindeutig. Während viele Studien (beispielsweise zu Gallenblasen-, Brust- und Ovarialkarzinomen) zeigen, dass die Expression von *ACVR1C* mit einer besseren Prognose korreliert (Loomans und Andl 2016), existieren auch Studien zum Retinoblastom, die einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von *ACVR1C* und einer verstärkten Invasion finden (Asnaghi et al. 2019).

Schließlich ist noch das *NFAT5* zu nennen. Die ursprünglich nachgewiesene Funktion des Proteins *NFAT5* war der Schutz der Zelle vor Hyperosmolarität, welche zu einem

Schrumpfen der Zelle und zur Apoptose führen kann. Bei einer Erhöhung der Osmolarität innerhalb der Zelle kommt es unter anderem zu einer Aktivierung von NFAT5 sowie zu dessen verstärkter Transkription und Translokation in den Zellkern. Dabei wirkt es als Transkriptionsfaktor für verschiedene Transporterproteine und Enzyme, die zu einer erhöhten Konzentration organischer Osmolyte in der Zelle führen. Dadurch wird ein intra- und extrazelluläres Gleichgewicht erreicht. Diese Funktion des NFAT5 ist physiologisch in der Niere sowie in lymphatischen Organen nachweisbar, wo grundsätzlich eine erhöhte Osmolarität im Interstitium herrscht. Eine Hyperosmolarität findet sich jedoch auch bei einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion, weshalb NFAT5 hierauf ebenfalls Einfluss haben könnte. Zudem hat sich aber auch gezeigt, dass NFAT5 mehrere Gene regulieren kann, die nicht direkt im Zusammenhang mit der Anpassung an osmotischen Stress stehen (Neuhofer 2010). So gibt es Hinweise, dass in Tumorzellen die Aktivität von NFAT5 mit einer erhöhten Invasion, Zellmigration und Metastasierung korreliert (Jauliac et al. 2002).

### **1.5 Fragestellung**

Wie bisher aufgezeigt, handelt es sich beim kolorektalen Karzinom um eine Erkrankung, die aufgrund ihrer hohen Inzidenz und ihrer weit verbreiteten Risikofaktoren besonders relevant ist. Gleichzeitig gehört zu den wichtigsten Prognosefaktoren das Vorhandensein von Metastasen, welche das Überleben eines Patienten sehr stark reduzieren. Jedoch verhält sich der klinische Verlauf bei Metastasen in verschiedenen Organen anders. Zusätzlich ist auch eine Vielzahl von Biomarkern bekannt, die einen Einfluss auf die Tumorgenese, die Metastasierung und auf die Auswahl der Therapie haben können. Es liegt also beim kolorektalen Karzinom eine starke Heterogenität sowohl im Verlauf der Erkrankung als auch in der Ausprägung der Biomarker vor. Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der Metastasenlokalisationen Lunge, Leber und ZNS auf die Expression verschiedener Biomarker. Dadurch können Hinweise auf die Existenz molekularer Subgruppen mit speziellen klinischen Verläufen gewonnen werden. Hierzu wird in zwei Kollektiven untersucht, ob es eine spezifische Verteilung von Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und ein spezielles immunhistochemisches Ausprägungsmuster von CD133, p53,  $\beta$ -Catenin, MLH1 und MSH2 bei der hepatischen und pulmonalen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms sowie ein charakteristisches RNA-Expressionsmuster für die Gene *EMILIN3*, *SV2B*, *NFAT5*, *MTA1*, *SMC3*, *ACVR1C* und *TMPRSS6* bei der Metastasierung in das zentrale Nervensystem gibt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Die untersuchten Patientenkollektive

#### Kollektiv A:

Für die Untersuchung dieser Hypothese werden zwei unabhängige Kollektive erstellt und jeweils als eine Fall-Kontroll-Studie designiert. Das erste Kollektiv A besteht aus 246 Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen kolorektalen Karzinom, die in drei gleich große Gruppen unterteilt sind. Die erste Gruppe PUL besteht aus Patienten mit einer nachgewiesenen Metastasierung in die Lunge. In der zweiten Gruppe HEP befinden sich ausschließlich Patienten mit einem kolorektalem Karzinom, das hepatisch metastasiert ist, und in der Kontrollgruppe M0 befinden sich nur Patienten, die innerhalb eines Zeitraums von fünf Jahren keine Metastasierung aufgewiesen haben. Die Metastasen der PUL- und HEP-Gruppe sind entweder histologisch oder radiologisch nachgewiesen worden und es wurden sowohl synchrone als auch metachrone Metastasen in dieser Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten des Kollektivs A wurde die Diagnose im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München gestellt und mithilfe der Datenbanken des Tumorregisters München ausgewählt. Fälle mit Zweitmalignomen wurden ausgeschlossen. Die einzelnen Gruppen innerhalb des Kollektivs A werden zueinander nach ihrer pT-Kategorie, Grading und der Kolonseite des Primärtumors gematcht. Das Kollektiv A wird herangezogen zur Mutationsanalyse im MAP-Kinase-Signalweg und zur Untersuchung der immunhistochemischen Ausprägung von CD133, p53,  $\beta$ -Catenin, MLH1 und MSH2 bei einer pulmonalen und hepatischen Metastasierung im Vergleich zueinander und zur Kontrollgruppe (Michl et al. 2021). Es wird keine RNA-Expressionsanalyse an dem Kollektiv A durchgeführt, da die Vorarbeiten zu dieser Arbeit einen möglichen Einfluss der dabei untersuchten Gene speziell auf die Metastasierung in das ZNS gezeigt haben.

#### Kollektiv B:

Das zweite Kollektiv B besteht aus 45 Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen kolorektalen Karzinom, die ebenfalls in drei gleich große Gruppen unterteilt sind. Hier setzt sich die Gruppe BRA aus Patienten zusammen, die im Laufe ihrer Erkrankung Metastasen im ZNS aufwiesen. Die Gruppe HEP ist charakterisiert durch eine hepatische Metastasierung und die Kontrollgruppe M0 sind wiederum Patienten, bei denen keine Metastasen innerhalb von fünf Jahren aufgetreten sind. Der Nachweis der Metastasen in der BRA- und HEP-Gruppe erfolgte entweder histologisch oder radiologisch. Die Diagnosestellung der Fälle des Kollektivs B ist durch das Pathologische Institut der

Ludwig-Maximilians-Universität München und die Auswahl der Fälle ist mittels der Datenbanken des Tumorregisters München erfolgt. Zweitmalignome waren ein Ausschlusskriterium für die Fälle. Die drei Gruppen des Kollektivs B werden zueinander nach ihrer pT-Kategorie, pN-Kategorie, Grading, Kolonseite des Primärtumors, der genauen Lokalisation des Primarius und nach dem Geschlecht gematcht. Aufgrund der Seltenheit der ZNS-Metastasen war es nicht möglich, das Kollektiv A um eine ausreichende Anzahl von passenden Patienten mit ZNS-Metastasen zu erweitern, sondern es musste ein zweites, unabhängiges Kollektiv B erstellt werden. Das Kollektiv B wird zur Analyse der RNA-Expression der Gene *EMILIN3*, *SV2B*, *NFAT5*, *MTA1*, *SMC3*, *ACVR1C* und *TMPRSS6* von kolorektalen Karzinomen, die in das ZNS metastasiert sind, im Vergleich zu hepatisch metastasierten und nicht-metastasierten kolorektalen Karzinomen herangezogen. Es wird keine Mutationsanalyse und immunhistochemische Auswertung beim Kollektiv B durchgeführt, da die dabei untersuchten Biomarker häufig beim kolorektalen Karzinom nachweisbar sind und dadurch lediglich ein prozentualer Unterschied der verschiedenen Gruppen bei der Ausprägung dieser Biomarker zu erwarten ist. Somit würden sich bei der geringen Fallzahl des Kollektivs B von 15 Fällen pro Gruppe keine signifikanten Ergebnisse finden lassen.

## **2.2 Mutationsanalyse**

### **2.2.1 DNA-Isolation**

Der erste Schritt der DNA-Isolation ist die Entparaffinierung. Hierzu inkubieren Leerschnitte der Fälle auf Färbegestellen nacheinander drei Mal in Xylol (reinst) und drei Mal in Ethanol (absolut) für jeweils 5 Minuten, was einer Vereinfachung des Entparaffinierungsprotokolls für immunhistochemische Färbungen entspricht (Nagy 2008, S. 191). Ein mit dem Tumoreal eingezeichneter HE-Schnitt wird als Vorlage für die entparaffinierten Leerschnitte verwendet. Das markierte Areal wird mittels eines Skalpells abgekratzt und das Gewebe wird in ein Eppendorf Safe-Lock Tube 0,5 ml gegeben (Van Cutsem et al. 2016, S. 1388).

Für die weiteren Schritte wird das QIAamp® DNA Micro Kit verwendet. Mittels eines Vortexmischers werden 15µl des ATL-Buffer und 10µl der Proteinase K vermischt und zu dem Gewebe in das 0,5ml-Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wird kurz mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend in einem Eppendorf ThermoMixer® 0,5ml für 3 Stunden bei 56° C inkubiert. Nach der Inkubation werden 25µl des ATL-Buffer, 50µl des AL-Buffer und 50µl Ethanol (absolut) hinzugefügt und anschließend für 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die ca. 180µl dieser Mischung werden zentral auf den Filter der QIAamp® MinElute® Column, die in einem 2ml Collection Tube steht, pipettiert und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die Säule in ein neues Collection Tube gegeben, 0,5ml des AW1-Waschpuffers werden hinzugefügt und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird ein weiteres Mal in ein neues Collection Tube gegeben und 0,5ml des AW2-Waschpuffers werden hinzugefügt. Danach wird erneut für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Schließlich wird das Collection Tube nochmals ausgetauscht und für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wird die Säule in ein SafeSeal Tube 1,5ml gesetzt und es werden 20µl des Elution Buffer AE auf den Filter der Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die Probe für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert (Qiagen® 2014, S. 28-30). Die isolierte DNA befindet sich nun gelöst in dem 1,5ml-Reaktionsgefäß und kann bei -20°C gelagert werden (Qiagen® 2014, S. 12).

### **2.2.2 PCR**

Auf die DNA-Isolation folgt eine PCR. Hierzu werden die für den entsprechenden Genabschnitt passenden Primer zusammengemischt und eine 20µM Lösung hergestellt. Bei den untersuchten Genabschnitten handelt es sich um *KRAS* Exon 2, 3, 4 Kodon 117 und 146, *NRAS* Exon 2, 3, 4 Kodon 117 und 146 und *BRAF* Exon 15. Anschließend wird ein Mastermix erstellt, der sich pro Probe aus 16,2µl Wasser, 2µl eines 10x Puffers, 0,2µl eines dNTP Mixes, 0,2µl einer Taq-Polymerase und 0,4µl der 20µM Primermischung zusammensetzt, und in eine Multiply®-µStrip Pro 8er Kette gegeben. Danach wird noch 1µl der isolierten DNA hinzugefügt. Dies entspricht dem Protokoll des Herstellers, jedoch wird hier nur die Hälfte der Menge des dNTP Mixes und die doppelte Menge an Taq-Polymerase verwendet. Nach einer kurzen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge werden die Proben in einen PCR-Cycler gegeben. Für den PCR-Cycler wird ein Protokoll verwendet, bei dem die Proben zuerst für 15 Minuten bei 95°C erhitzt werden. Dann folgen nacheinander 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 60°C und eine Minute bei 72°C. Dieser Schritt wiederholt sich dann für 45 Zyklen. Schließlich endet das Protokoll mit 72°C für 10 Minuten (Qiagen® 2010, S. 14-16 und 31). Für jedes Gen werden zusätzlich eine Negativkontrolle mit Wasser und eine Kontrolle mit der DNA eines gesunden Erwachsenen durchgeführt. Die Negativkontrolle zeigt dabei mögliche Kontaminationen auf und die DNA des gesunden Erwachsenen wird benötigt, um am Ende das Ergebnis der Pyrosequenzierung mit der Basensequenz eines gesunden Menschen zu vergleichen.

### **2.2.3 Pyrosequenzierung**

Für die Pyrosequenzierung wird der Pyrosequenzierer PyroMark® Q24, die PyroMark® Q24 Vacuum Workstation zur Vorbereitung der Proben vor der Sequenzierung und für die anschließende Auswertung die entsprechende PyroMark® Q24 Software verwendet. Die Workstation besteht zum einen aus der Station selbst, die Stellplätze für eine Flachbodenplatte und für eine Spitzbodenplatte und mehrere Wannen für die verschiedenen benötigten Reagenzien besitzt, und zum anderen aus einer Pumpe. Zuerst wird eine PyroMark® Q24 Cartridge mit einem Enzyme Mixture, Substrate Mixture und den einzelnen Thymin-, Adenin-, Cytosin- und Guaninnukleotiden aus dem PyroMark® Gold Q24 Reagents beladen und in den Sequenzierer eingesetzt. Danach werden in eine Spitzbodenplatte pro Probe 24µl Wasser, 40µl PyroMark® Q24 Binding Buffer und 1µl Streptavidin Sepharose™ pipettiert. Anschließend werden 15µl des PCR-Produktes hinzugefügt und für 5 Minuten bei 1400 rpm auf einen Mikroplatten-Schüttler gestellt. Danach wird eine 0,3µM Lösung der Sequenzierprimer mit dem PyroMark® Q24 Annealing Buffer hergestellt und die Flachbodenplatte wird mit 25µl dieser Primerlösung beladen. Auch hierfür werden bereits etablierte Sequenzierprimer für die Genabschnitte *KRAS* Exon 2, 3, 4 Kodon 117 und 146, *NRAS* Exon 2, 3, 4 Kodon 117 und 146 und *BRAF* Exon 15 verwendet.

Für die weiteren Schritte werden die einzelnen Wannen der Workstation mit 70%igem Ethanol, mit einer PyroMark® Q24 Denaturation Solution und einem PyroMark® Q24 Wash Buffer befüllt und die Spitz- und die Flachbodenplatte werden an die für sie vorgesehenen Einsenkungen der Workstation gesetzt. Die Pumpe wird eingeschaltet und die Kanäle des Pumpenkopfes werden für 15-20 Sekunden in die Spitzbodenplatte gehalten. Anschließend wird der Pumpenkopf für 5-7 Sekunden in die Wanne mit 70%igem Ethanol, danach für 5-7 Sekunden in die Wanne mit der Denaturation Solution und zuletzt noch für 10-12 Sekunden in die Wanne mit dem Wash Buffer gesetzt. Daraufhin wird der Pumpenkopf über die Flachbodenplatte gehalten, die Pumpe wird ausgeschaltet, die Kanäle des Pumpenkopfes werden in die Näpfe der Platte gedrückt und für 7 Sekunden in der Platte gerüttelt. Die Flachbodenplatte wird für 2 Minuten auf eine 80°C heiße Heizplatte gelegt und anschließend in den Sequenzierer gestellt, der dann gestartet wird (Qiagen® 2016). Das nach der Pyrosequenzierung entstandene Pyrogramm zeigt nun die Basensequenz des analysierten Genabschnittes. Zur Identifizierung von Mutationen in dem Genabschnitt wird das Pyrogramm mit der Kontrolle des gesunden

Erwachsenen verglichen. In der Abbildung 1 ist dieser Vergleich beispielhaft an dem Genabschnitt *KRAS* Exon 2 Kodon 12-13 dargestellt.

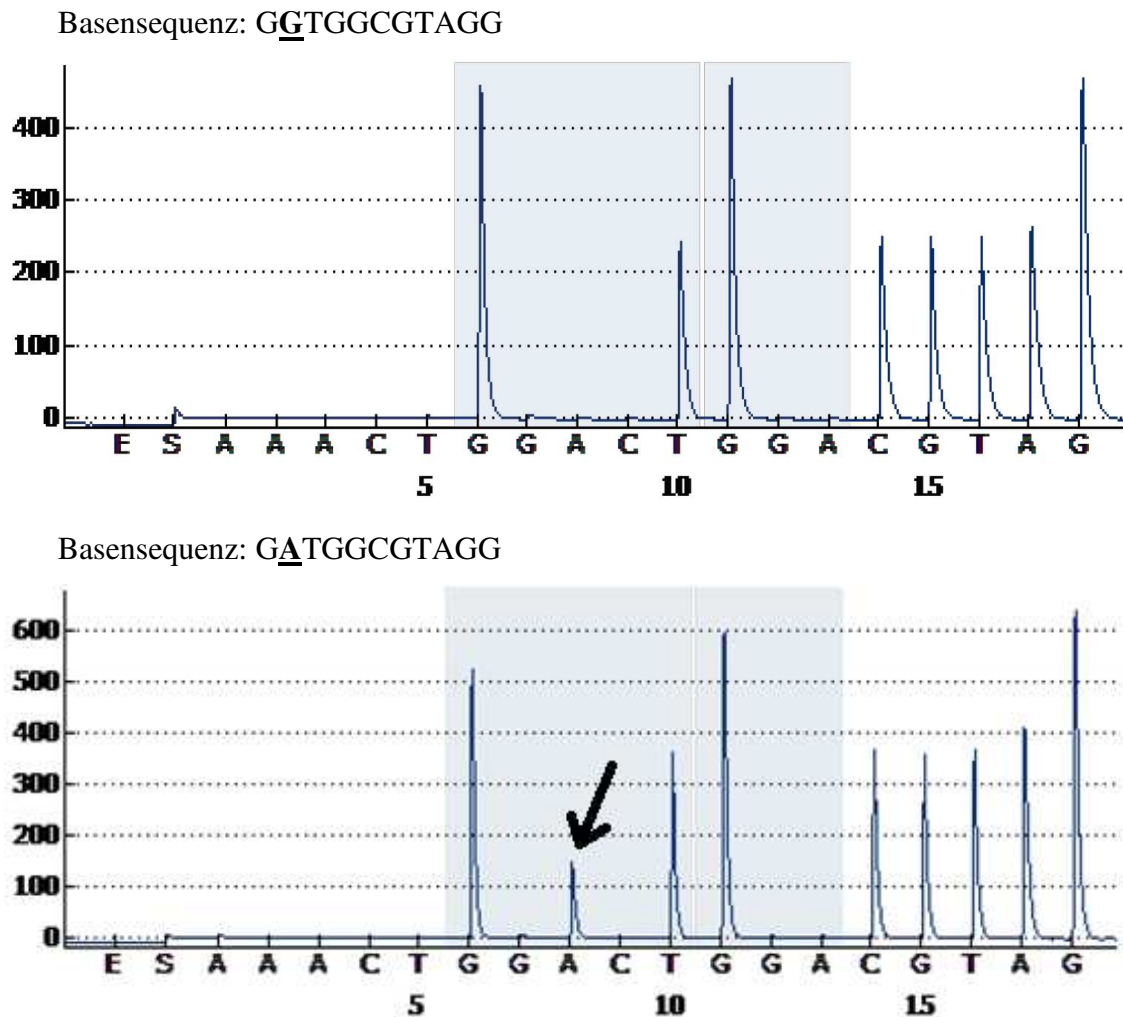


Abbildung 1: Pyrogramme des Genabschnitts *KRAS* Exon 2 Kodon 12-13. Die horizontale Achse gibt die Abfolge der bei der Pyrosequenzierung hinzugegebenen Nukleotiden an und die vertikale Achse zeigt die entsprechende Lichtreaktion. Beim oberen Pyrogramm handelt es sich um den Wildtyp, während das untere beispielhaft die Mutation c.35G>A (pG12D) darstellt. Der Pfeil weist auf die entsprechende Punktmutation. Legende: A=Zeitpunkt der Hinzugabe von ATP; C=Zeitpunkt der Hinzugabe von CTP; E=Zeitpunkt der Hinzugabe des Enzym-Mixes; G=Zeitpunkt der Hinzugabe von GTP; S=Zeitpunkt der Hinzugabe des Substrat-Mixes; T=Zeitpunkt der Hinzugabe von TTP.

## 2.3 Analyse der RNA-Expression

### 2.3.1 Effizienztestung der Primer

Zur Analyse der RNA-Expression des Kollektivs B wird für die Gene *EMILIN3*, *SV2B*, *ACVR1C*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *MTA1* und *NFAT5* eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Hierfür werden die entsprechenden Primer neu

erstellt und die dazugehörigen UPL-Sonden herausgesucht. Anschließend muss die Effizienz der neu designten Primer getestet werden.

Die Effizienz der Primer und der Sonden wird an verschiedenen Zelllinien des kolorektalen Karzinoms getestet. Dazu wird die Expression aller untersuchten Gene in den Zelllinien mittels qPCR analysiert. Die Zelllinie mit der höchsten RNA-Expression des entsprechenden Gens wird für die weiteren Testungen verwendet. Welche Zelllinien für die verschiedenen Gene benutzt werden, kann der Tabelle 1 entnommen werden.

| Gen            | Verwendete Zelllinie |
|----------------|----------------------|
| <i>EMILIN3</i> | CaCo2                |
| <i>SV2B</i>    | SW480                |
| <i>TMPRSS6</i> | HCT116               |
| <i>ACVR1C</i>  | HCT116               |
| <i>NFAT5</i>   | HCT116               |
| <i>MTA1</i>    | CaCo2                |
| <i>SMC3</i>    | HCT116               |

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien für die einzelnen Gene in der Effizienztestung.

Für die Effizienztestung wird die bereits isolierte RNA aus diesen Zelllinien in einer Reversen Transkription in cDNA umgewandelt. Dann wird mithilfe einer qPCR die dabei entstandene cDNA vervielfältigt. Der Ablauf der Reversen Transkription und der qPCR ist in Punkt 2.3.3 (siehe S. 37) und 2.3.4 (siehe S. 38) genauer beschrieben.

Anschließend wird die cDNA mithilfe des Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gels und PCR Clean-up Kits für die nächsten Schritte aufgereinigt. Dabei werden die PCR-Produkte mit dem Binding Buffer NTI in einem Verhältnis 1:2 vermischt und auf den Filter der NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Column, die in einem 2ml Collection Tube steht, gegeben und bei 11000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Collection Tube wird geleert und 700µl des Wash Buffer NT3 werden auf den Filter der Clean-up Column hinzugegeben und bei 11000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt und anschließend wird das Collection Tube nochmals geleert und bei 11000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Nun wird die Clean-up Column in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß gesteckt und 20µl des Elution Buffer NE werden auf den Filter gegeben. Nach einer Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur wird die Probe ein letztes Mal bei 11000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die aufgereinigten PCR-Produkte befinden sich nun in dem 1,5ml-Reaktionsgefäß (Macherey-Nagel™ 2017, S. 17-18).



Um besser zu evaluieren, ob die entstandenen Amplikons der Primer auch den zuvor berechneten Längen entsprechen, kann zusätzlich eine Gelelektrophorese mit der aufgereinigten cDNA durchgeführt werden. Für die Herstellung des Gels werden 100ml eines 1x TAE Puffers mit 2g Agarose vermischt und kurz erhitzt, bis eine klare Flüssigkeit entsteht. Zu der Mischung werden 5µl einer GelRed® Nucleic Acid Gel Stain hinzugefügt und anschließend wird die Mischung in den Gelträger zum Aushärten geschüttet. In das Gel wird noch ein 14-Zähne Kamm gesteckt, damit anschließend die notwendigen Taschen im Gel vorhanden sind. Nach einer Aushärtungszeit von 20 Minuten wird das Gel in die Hauptpufferkammer gelegt und die Kammer wird mit dem 1x TAE Buffer befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt ist. Die Proben werden mit einem 6x DNA Loading Dye im Verhältnis 5:1 vermischt und 10µl dieser Mischung werden in eine der Taschen des Gels gegeben. Zusätzlich werden noch 5µl einer GeneRuler™ Low Range DNA Ladder in eine der Taschen pipettiert. Daraufhin wird die Spannung am Bio-Rad® PowerPac™ 300 auf 100V und die Laufzeit auf 20 bis 40 Minuten eingestellt. Das dabei entstandene Bandenmuster ist in Abbildung 2 dargestellt. Die vorher berechneten Längen der Amplikons passen zu den Positionen der Banden. Somit konnte nochmal verifiziert werden, dass die neu designten Primer auch die gewünschten PCR-Produkte generieren (Lee et al. 2012).

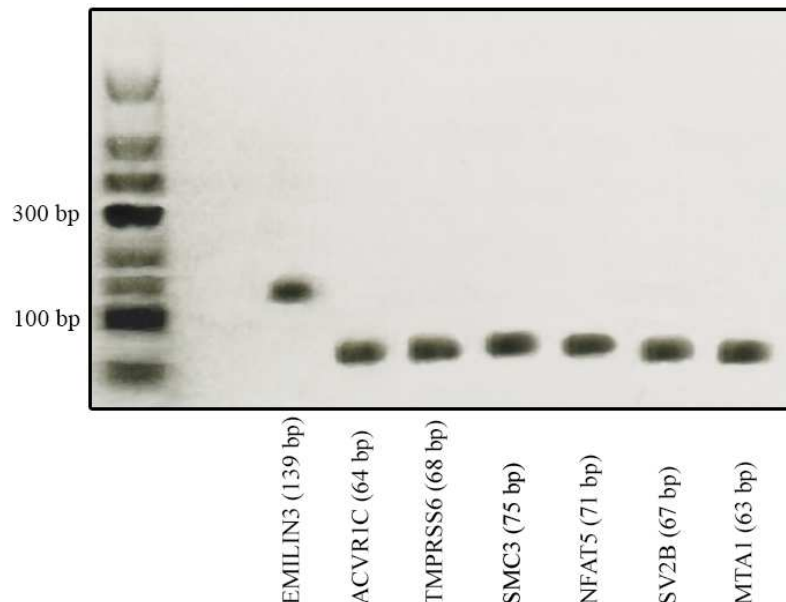


Abbildung 2: Bandenmuster der Amplikons der Primer für *EMILIN3*, *ACVR1C*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *NFAT5*, *SV2B* und *MTA1*. Angegeben ist die Basenpaarlänge der Amplikons der entsprechenden Gene und die DNA-Leiter als Größenreferenz.

Für die eigentliche Effizienztestung wird eine qPCR mit definierten Verdünnungen der vorher aus den Zelllinien hergestellten und aufgereinigten cDNA durchgeführt. Die Konzentration der entstandenen cDNA wird mithilfe eines NanoDrop™ Spectrophotometers ND-1000 vermessen. Dafür wird 1µl der aufgereinigten Probe auf das Spektrometer gegeben (Thermo Fisher Scientific 2011). Mithilfe dieses Wertes und der nachfolgenden Rechnung kann nun ermittelt werden, wie weit die Probe verdünnt werden muss, damit eine Verdünnung von 50000 cDNA-Kopien pro Mikroliter entsteht:

$$1. \text{ Anzahl der Kopien pro } \mu\text{l} = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \times b}{a \times 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}$$

$$2. \text{ Für 50000 Kopien pro } \mu\text{l} \text{ erforderliche Verdünnung} = \frac{\text{Anzahl der Kopien pro } \mu\text{l}}{50000}$$

a = Anzahl der Basenpaare der cDNA

b = cDNA-Konzentration in g/µl

660 g/mol  $\hat{=}$  durchschnittliche molare Masse eines Basenpaares

$6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$   $\hat{=}$  Avogadro-Konstante

Anschließend wird eine Verdünnungsreihe für jedes Gen erstellt mit 50000, 5000, 500, 50 und 5 Kopien pro Mikroliter. Für jede dieser Verdünnungen wird eine qPCR in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert der C<sub>q</sub>-Werte dieser Triplikate ermittelt. Für die Berechnung der Effizienz wird nun die Konzentration, die ursprünglich mittels des NanoDrop™ Spectrophotometers gemessen wurde, mit der Verdünnung geteilt, die sich aus der vorherigen Rechnung ergeben hat, also die nötig war, um eine Lösung mit 50000 Kopien pro Mikroliter herzustellen. Dadurch wird die cDNA-Konzentration der Lösung für 50000 Kopien in ng/µl berechnet. Dieser Wert wird noch einmal verdoppelt, da in der qPCR 2µl verwendet werden. Dies ergibt nun die Masse von 100000 Kopien der cDNA in Nanogramm. Die Masse der cDNA der anderen Verdünnungen der Reihe wird bestimmt, indem jeweils durch Zehn geteilt wird. Diese Masse der cDNA bei den verschiedenen Verdünnungen wird anschließend noch mit einem dekadischen Logarithmus logarithmiert und in ein Diagramm eingetragen. Der dekadische Logarithmus der Masse liegt dabei auf der horizontalen Achse und die entsprechenden, mittleren C<sub>q</sub>-Werte der Verdünnungsreihe auf der vertikalen Achse. In Abbildung 3 (siehe S. 35) ist dieses Diagramm beispielhaft mit den Werten von *MTA1* dargestellt.

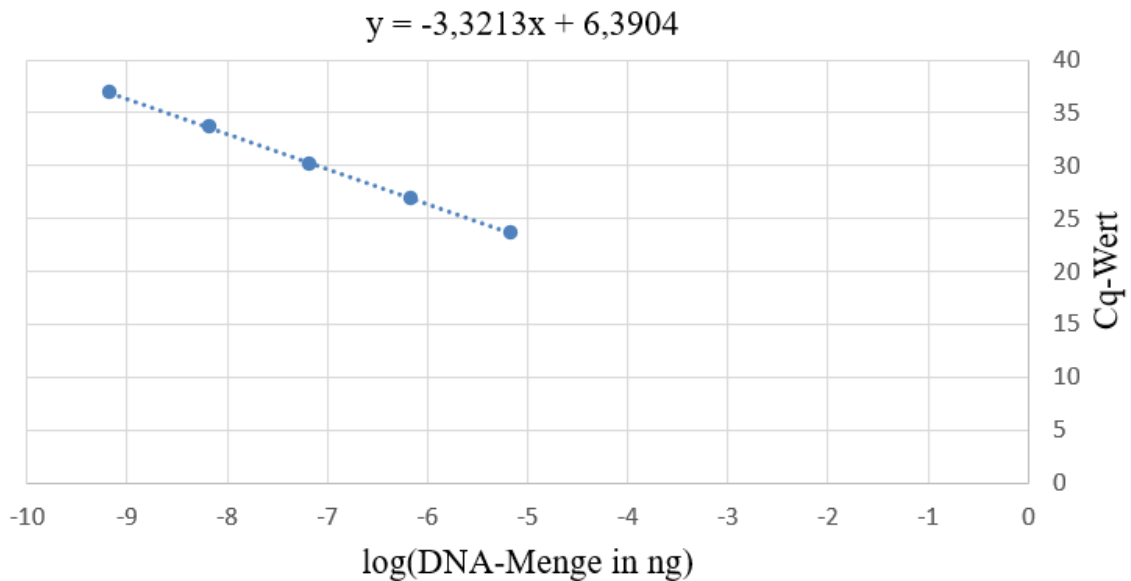


Abbildung 3: Diagramm zur Berechnung der Effizienz beispielhaft aus der Verdünnungsreihe von *MTA1*. Die horizontale Achse gibt den dekadischen Logarithmus der Masse der cDNA bei den verschiedenen Verdünnungen an und die vertikale Achse die entsprechenden Cq-Werte. Die Funktionsgleichung der daraus entstandenen Geraden ist über dem Diagramm angegeben.

Die Steigung des daraus entstehenden Diagramms wird in die folgende Gleichung eingetragen, wodurch dann die Effizienz berechnet wird:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$$

Ergibt diese Berechnung einen Wert  $\geq 90\%$ , werden die Primer als effizient angesehen und für die weiteren Versuche verwendet. Bei einer zu niedrigen Effizienz können die Konzentrationen der Primer in der qPCR verändert werden (Dorak 2007, S. 40-41 und 135). Grundsätzlich wurde für jedes Primerpaar eine Konzentration von 500nM für den Vorwärts- und Rückwärts-Primer benutzt. Bei einer zu geringen Effizienz können noch die Konzentration 50nM, 300nM und 900nM sowie sämtliche Kombinationen dieser Konzentrationen getestet werden. Für alle Primer außer für *ACVR1C* war die Konzentration von 500nM für beide Primer effizient. Bei *ACVR1C* war eine Konzentration von 900nM für beide Primer nötig.

Die Effizienztestung hat nun ergeben, dass die speziell für die Gene erstellten Primer in der qPCR cDNA aus Zelllinien nachweisen können, Amplikons in den Größen generieren können, die zuvor berechnet wurden, und eine hohe Effizienz aufweisen, sodass diese Primer nun für die eigentlichen Proben verwendet werden können.

### **2.3.2 RNA-Isolation**

Nachdem die Effizienz der Primer nachgewiesen worden ist, folgt nun die eigentliche RNA-Expressionsanalyse der FFPE-Gewebe-Proben. Diese beginnt mit der RNA-Isolation, für die eine Deparaffinization Solution und das RNeasy® FFPE Kit verwendet werden. Zuerst werden 160µl der Deparaffinization Solution in ein SafeSeal Tube 1,5ml gegeben. Anschließend wird ein Leerschnitt einer Probe über einen HE gefärbten Schnitt gelegt und das auf dem HE-Schnitt markierte Tumorareal wird von dem Leerschnitt mit einem Skalpell abgekratzt. Das abgekratzte Gewebe wird in das 1,5ml-Reaktionsgefäß mit der Deparaffinization Solution gegeben. Das Gefäß wird für mindestens 10 Sekunden mittels eines Vortex-Mixers vermischt und kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird die Probe in einem Eppendorf ThermoMixer® 1,5ml bei 56°C für 3 Minuten inkubiert. Danach werden 150µl des Buffers PKD hinzugegeben und die Probe wird für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. In dem Reaktionsgefäß haben sich nun zwei Phasen gebildet, eine blaue obere Phase und eine farblose untere Phase. In die untere farblose Phase werden nun 10µl der Proteinase K hinzugefügt und die farblose Lösung wird gemischt, indem die Lösung vorsichtig in die Pipette aufgenommen und wieder abgegeben wird. Dabei dürfen sich die blaue und die farblose Phase jedoch nicht vermischen. Nun wird die Probe für 15 Minuten bei 56°C inkubiert und danach für 15 Minuten bei 80°C. Dabei werden zwei Eppendorf ThermoMixer® 1,5ml verwendet. Nach der Inkubation werden 110µl der unteren farblosen Phase in ein neues SafeSeal Micro Tube 2,0ml gegeben. Dieses wird anschließend für 3 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 15 Minuten bei 13500 rpm zentrifugiert (Qiagen® 2020, S. 12-13).

Für die weiteren Schritte wird der QIAcube® Connect verwendet. Zur Vorbereitung werden die Rotor Adapters mit der RNeasy MinElute® Spin Column und einem 1,5ml Elution Tube ohne Verschlussmechanismus beladen. Anschließend wird ein Reagent Bottle Rack mit vier Reagent Bottles (30ml) beladen und die einzelnen Fläschchen mit dem Buffer RBC, mit 100%igem Ethanol, mit dem Buffer RPE und mit RNase freiem Wasser befüllt. In ein SafeSeal Micro Tube 2,0ml werden 145µl der DNase I und 232µl DNase Booster Buffer pipettiert. Dies entspricht der Menge für 12 Proben (Qiagen® 2015). Schließlich werden die Rotor Adapters, die SafeSeal Micro Tubes 2,0ml mit den Proben, das Reagent Bottle Rack, die 1000µl QIAcube® Filter-Tips und das einzelne SafeSeal Micro Tube 2,0ml mit dem DNase-Mix an die entsprechenden Positionen im QIAcube® platziert (Qiagen® 2019, S. 27). Nun wird der QIAcube® geschlossen und das entsprechende Programm für das RNeasy® FFPE Kit ausgewählt. Nach Ende des

Programms ist die isolierte RNA der Probe in dem 1,5ml Elution Tube, das in den Rotor Adapter gesteckt wurde. Die Konzentration der RNA wird nun noch mittels des NanoDrop™ Spectrophotometers ND-1000 vermessen und anschließend kann die Probe bei -70°C gelagert werden (Qiagen® 2020, S. 27).

### **2.3.3 Reverse Transkription**

Der nächste Schritt zur Analyse der RNA-Expression ist die Reverse Transkription. Zuerst muss ein Endvolumen bestimmt werden, das nach der RT entstehen soll und für die weiteren Analysen in der qPCR ausreicht. Da in dieser Arbeit zehn Gene analysiert werden, jedes Gen in Triplikaten getestet wird und für jede einzelne Analyse der qPCR 2µl der umgeschriebenen Probe nötig sind, wird ein gewünschtes Endvolumen von 60µl pro Probe gewählt. Für ein Endvolumen von 60µl sind 12µl eines 5x Reaction Buffers, 1,5µl eines Thermo Scientific™ RiboLock RNase-Inhibitors, 6µl eines Thermo Scientific™ dNTP Mixes, 3µl eines Thermo Scientific™ Random Hexamer Primers und 3µl einer Thermo Scientific™ RevertAid™ Reverse Transcriptase nötig. Diese Mengen werden in eine Multiply®-µStrip Pro 8er Kette pipettiert, um den Master Mix für eine Probe herzustellen. Damit in der anschließenden qPCR genug cDNA vorhanden ist, wird zudem eine RNA-Konzentration von 25ng/µl festgelegt, die jede Probe bei der RT aufweisen sollte. Um das Volumen einer Probe zu bestimmen, das nötig ist, um eine Konzentration von 25ng/µl bei einem Endvolumen von 60µl zu erreichen, wird folgende Rechnung verwendet:

$$\text{Benötigtes Volumen der Probe} = \frac{25 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 60 \mu\text{l}}{\text{RNA-Konzentration der Probe in } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}$$

Dieses Volumen der Probe wird zum vorher hergestellten Master Mix pipettiert und das restliche Volumen, das noch zum gewünschten Endvolumen fehlt, wird mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Diese so entstandene Lösung entspricht jetzt dem gewünschten Endvolumen von 60µl und besitzt die benötigte RNA-Konzentration von 25ng/µl.

Die Proben in der Multiply®-µStrip Pro 8er Kette werden nun in ein Eppendorf Mastercycler™ PCR System gestellt und das für die RT entsprechende Protokoll wird gestartet. Hierbei werden die Proben zuerst für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Schließlich werden sie noch für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Proben können anschließend bei -20°C gelagert werden (Thermo Fisher Scientific 2016).

### **2.3.4 qPCR**

Der letzte Schritt zur Analyse der RNA-Expression ist die qPCR. Für die qPCR muss zuerst ein Master Mix für jedes getestete Gen hergestellt werden. Dabei werden 5µl der LightCycler® 480 Probes Master Mischung und 0,1µl der entsprechenden UPL-Sonde sowie die beiden entsprechenden Primer und RNase-freies Wasser zusammengemischt. Der Anteil des Wassers und der Primer ist abhängig von der nötigen Konzentration der Primer. Wie in Punkt 2.3.1 (siehe S. 35) bereits beschrieben wurde, sind für alle Primerpaare (außer für die Primer von *ACVR1C*) eine Konzentration von 500nM am effizientesten. Für die Primer von *ACVR1C* ist hingegen eine 900nM Konzentration nötig. Für die 500nM Primer werden für die Herstellung des Master Mixes jeweils 0,05µl der beiden 100µM Primerlösungen und entsprechend 2,8µl Wasser benötigt. Für die 900nM Primer von *ACVR1C* werden 0,09µl der 100µM Primer und 2,72µl Wasser gebraucht. Die 8µl des Master Mixes werden anschließend in eine LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 pipettiert. Danach werden noch 2µl der Probe dazugegeben. Für eine bessere Genauigkeit der Ergebnisse wird jedes Gen einer Probe in Triplikaten getestet. Für jeden Master Mix wird ebenfalls eine Negativkontrolle mit Wasser in Triplikaten durchgeführt, um mögliche Kontaminationen aufzudecken. Zudem wird für jedes Gen eine Positivkontrolle mit der verdünnten cDNA der Zellkulturen aus der Effizienztestung vorgenommen, um sicherzustellen, dass bei der qPCR alle Schritte korrekt abgelaufen sind. Die Platte wird nach der Beladung mit einer LightCycler® 480 Sealing Foil verschlossen und für zwei Minuten bei 1500 x g in einer Hettich Zentrifuge Universal 320 zentrifugiert. Dann wird die Platte in ein Bio-Rad® CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System gestellt, das entsprechende Protokoll wird ausgewählt und das Gerät gestartet (Roche Diagnostics GmbH 2017, S. 5 und 9). Nun werden die Proben für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend folgen 10 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 60°C und eine Sekunde bei 72°C und daraufhin werden die Signale gemessen. Dieser Schritt wird in 45 Zyklen wiederholt. Zum Schluss endet das Protokoll mit 30 Sekunden bei 40°C (Roche Diagnostics GmbH 2017, S. 7). Das Real-Time PCR Detection System gibt nach Ablauf des Programms ein Diagramm aus, das den Verlauf der entstandenen Menge der PCR-Produkte zeigt, und den C<sub>q</sub>-Wert für jede Messung. Das Diagramm einer Probe ist beispielhaft in Abbildung 4 (siehe S. 39) dargestellt.

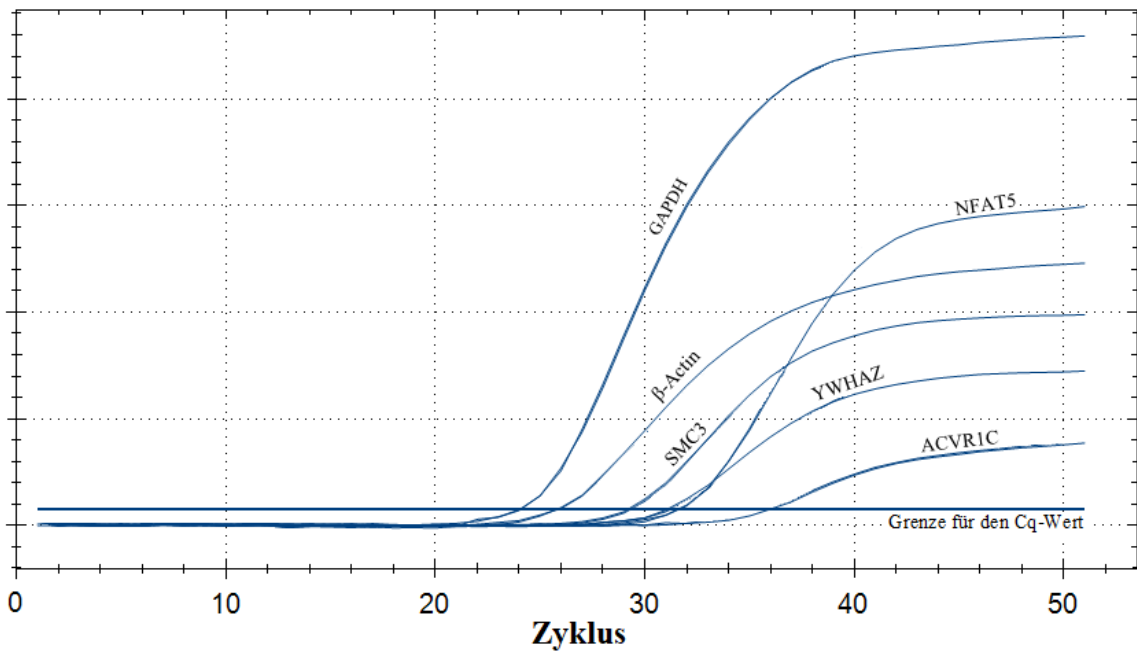


Abbildung 4: Ergebnisdiagramm der qPCR beispielhaft von einem Fall für *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und den Referenzgenen *GAPDH*, *YWHAZ* und  $\beta$ -*Actin*. Dargestellt ist der Verlauf der Menge der PCR-Produkte in Abhängigkeit zum PCR-Zyklus. Der PCR-Zyklus, der am Schnittpunkt der Kurven mit der Grenzlinie liegt, ist der entsprechende Cq-Wert.

Zur Auswertung der Ergebnisse der qPCR wird folgendermaßen vorgegangen:

- Für jedes untersuchte Gen jeder Probe wird aus den Triplikaten ein Mittelwert der Cq-Werte berechnet.
- Jede Analyse, die keinen Wert oder einen Cq-Wert über 40 ergibt, wird als „nicht nachweisbar“ angesehen.
- Der Abstand der Triplikate untereinander sollte kleiner als  $\pm 0,5$  sein. Bei Werten über 35 werden auch Abstände von  $\pm 1,0$  akzeptiert.
- Wenn nur zwei der drei Triplikate in einem Abstand von  $\pm 0,5$  bzw.  $\pm 1,0$  liegen, der Cq-Wert des dritten Triplikates jedoch nicht, wird der Mittelwert nur aus den beiden nahe beieinanderliegenden Cq-Werten berechnet und der dritte Wert wird als „Ausreißer“ angesehen.
- Wenn nur einer der drei Triplikate ein Ergebnis liefert und bei den anderen beiden kein Cq-Wert bestimmt werden kann, wird die Analyse dieses Gens komplett als „nicht nachweisbar“ angesehen.

Um die Proben anhand der Mittelwerte der Cq-Werte vergleichen zu können, müssen diese zuerst noch ins Verhältnis zu den Referenzgenen gesetzt werden. Dafür werden die Referenzgene *GAPDH*, *YWHAZ* und  $\beta$ -*Actin* herangezogen, die neben *EMILIN3*, *SV2B*, *MTA1*, *TMPRSS6*, *ACVR1C*, *SMC3* und *NFAT5* für jede Probe mitbestimmt werden.

Hierfür wird für jede Probe ebenfalls aus den Triplikaten von *GAPDH*, *YWHAZ* und  $\beta$ -*Actin* ein Mittelwert der Cq-Werte bestimmt und anschließend ein gemeinsamer Mittelwert aus allen drei Referenzgenen berechnet. Dieser Mittelwert ist der Referenzwert für die entsprechende Probe. Daraufhin wird die Differenz der mittleren Cq-Werte der untersuchten Gene zu dem Mittelwert der Referenzgene berechnet. Aus diesem mittleren Abstand der Cq-Werte wird schließlich der relative Anteil der RNA-Menge des Gens zu der RNA-Menge der Referenzgene folgendermaßen berechnet:

$$\text{Relativer Anteil der RNA-Menge} = 2^{-(\text{Cq des Gens} - \text{Cq der Referenzgene})} = 2^{-(\text{mittlerer Abstand})}$$

Mit diesem relativen Anteil der RNA-Menge der untersuchten Gene zu der RNA-Menge der Referenzgene können die Proben nun untereinander verglichen werden (Dorak 2007, S. 65-66). Grundsätzlich ergibt eine niedrigere RNA-Expression einen größeren Cq-Wert. Demnach müsste bei dem Fall eines nicht nachweisbaren Gens (also bei einem nicht oder sehr niedrig exprimierten Gen) der Cq-Wert des entsprechenden Gens auf „unendlich“ gesetzt werden. Wird dies nun in die vorherige Gleichung zur Berechnung des relativen Anteils der RNA-Menge eingesetzt, erhält man bei einem  $\lim_{\text{Cq des Gens} \rightarrow \infty} (2^{-(\text{Cq des Gens} - \text{Cq der Referenzgene})})$  näherungsweise „0“. Somit wird bei den Fällen, bei denen kein Cq-Wert nachweisbar ist, der relative Anteil der RNA-Menge mit „0“ angegeben.

Für die Gene *NFAT5*, *TMPRSS6*, *ACVR1C* und *SMC3* werden zudem Hochrisikogruppen bestimmt. Bei *NFAT5* entspricht ein relativer Anteil der RNA-Menge von  $\geq 1,87 \times 10^{-2}$ , bei *ACVR1C* ein relativer Anteil von  $\geq 6,60 \times 10^{-3}$ , bei *SMC3* ein relativer Anteil von  $\geq 13,73 \times 10^{-2}$  und bei *TMPRSS6* ein relativer Anteil von  $\geq 3,64 \times 10^{-4}$  einer starken Expression und alle Fälle mit einer starken Expression werden der Hochrisikogruppe des entsprechenden Gens zugeordnet.



## **2.4 Immunhistochemische Auswertung**

Das Kollektiv A wird neben der Mutationsanalyse auch immunhistochemisch untersucht. Hierfür sind neben den Leerschnitten auch 5µm dicke FFPE-Schnitte der Proben vorhanden, die entsprechend der verschiedenen Biomarker angefärbt worden sind. Diese Färbungen sind in Abbildung 5 (siehe S. 43) dargestellt und die Liste der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 7 (siehe S. 55). Anschließend werden die Schnitte mit einem Leica DM LB Durchlichtmikroskop untersucht und dabei wird für die einzelnen Marker folgendermaßen vorgegangen:

### MLH1/MSH2:

Die Mismatch-Reparatur-Proteine MLH1 bzw. MSH2 zeigen nach der Färbung in physiologischen Zellen eine nukleäre Proteinexpression sowie eine diffuse Färbung des Zytoplasmas. Bei Proben, die eine pathologische Veränderung der Mismatch-Reparatur-Gene aufweisen, kommt es zu einem kompletten Ausfall der entsprechenden Proteine. Dies äußert sich in den immunhistochemisch gefärbten Proben durch eine komplette Negativität des Zellkerns (Neumann et al. 2012).

### p53:

Für die Auswertung der p53-Expression werden immunhistochemische Verteilungsmuster definiert, die an die Kriterien beim Ovarialkarzinom angelehnt sind. Ein fleckenförmiges, immunhistochemisches Bild mit unterschiedlich stark gefärbten Zellkernen im Tumorgewebe wird für die weitere Auswertung als „*reguliert*“ bezeichnet. Außerdem ist aus den Studien für das Ovarialkarzinom bereits bekannt, dass es bei einer Mutation im Gen von p53 entweder zu einer starken Überexpression in der Immunhistochemie oder zu einem kompletten Verlust kommt. Somit werden die Fälle, die entweder eine starke, gleichmäßige Färbung von mehr als 80% der Zellkerne im Tumorgewebe aufweisen oder bei denen sämtliche Zellkerne ungefärbt sind, in einer Gruppe zusammengefasst und als pathologisch bzw. „*dereguliert*“ klassifiziert (Yemelyanova et al. 2011).

### β-Catenin:

Die immunhistochemische Färbung von β-Catenin zeigt in physiologischen Zellen eine Färbung der Zellmembran und des Zytoplasmas, jedoch keine Färbung der Zellkerne. Bei einer Veränderung des Biomarkers finden sich Zellkerne, die stärker positiv gefärbt sind als das umgebende Zytoplasma. Hierbei wird ein Score verwendet, der abhängig ist vom Anteil der gefärbten Zellkerne im Tumorgewebe zu den ungefärbten Zellkernen. Das Fehlen einer nukleären Färbung entspricht dem Score 0, >0% und <30% gefärbte Zellkerne dem Score 1, ≥30% und ≤60% dem Score 2 und >60% dem Score 3. Alle Fälle mit einem

Score von 0 oder 1 werden als Fälle mit einer niedrigen Expression bezeichnet und alle Fälle mit einem Score von 2 oder 3 als Fälle mit einer hohen Expression (Neumann et al. 2012).

#### CD133:

In der immunhistochemischen Auswertung des Stammzellmarker CD133 weisen physiologische Zellen keine Färbung auf. Pathologisch ist die Überexpression von CD133, was sich in einer verstärkten Anfärbung der Zellmembran bzw. in einer Anfärbung des Detritus im Lumen der Tumordrüsen äußert. Die Proben, bei denen <50% der Tumordrüsen angefärbt sind, werden für die weitere Auswertung der Gruppe mit niedriger Expression zugeordnet und die Proben mit  $\geq 50\%$  positiven Tumordrüsen der Gruppe mit hoher Expression (Horst et al. 2008).

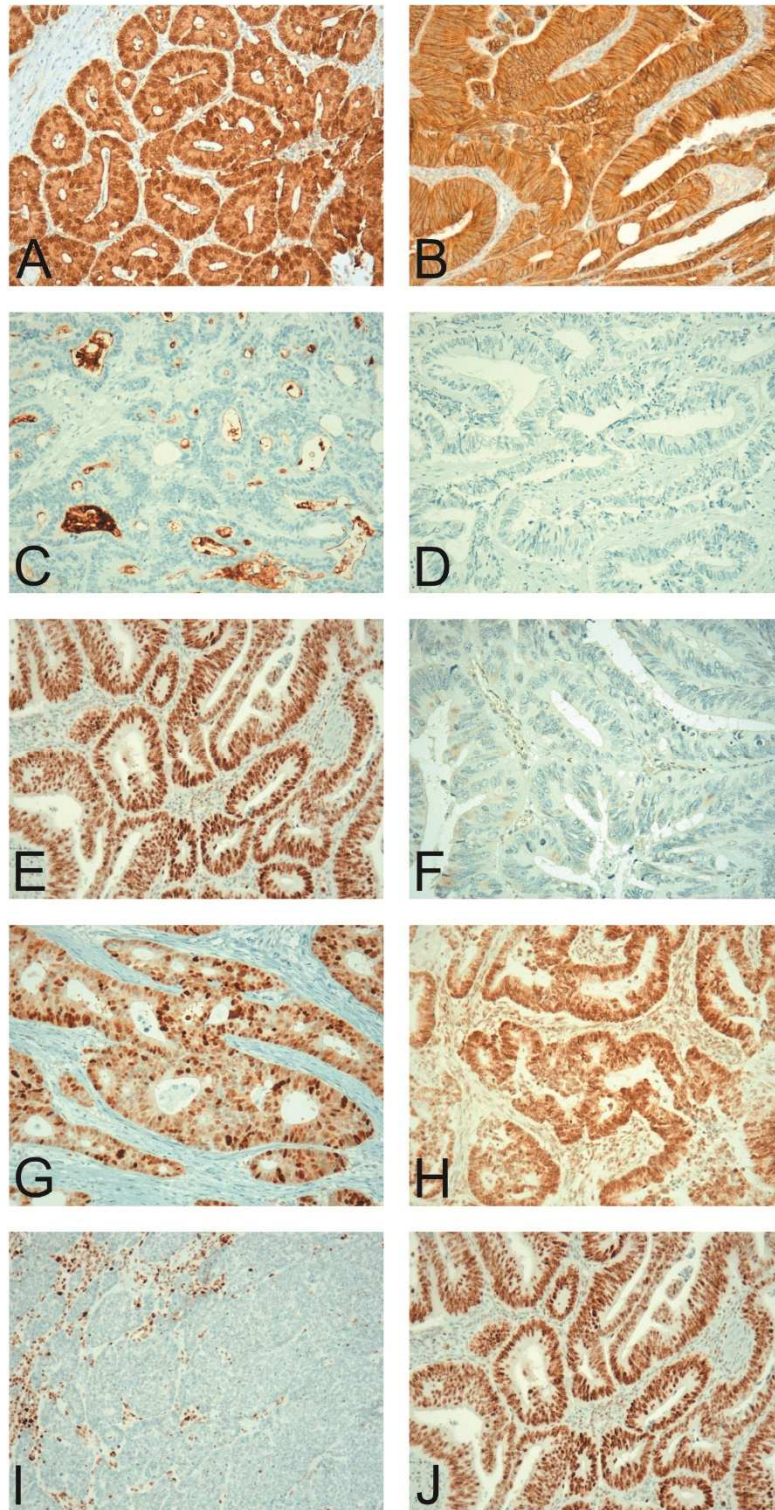


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbungen der Biomarker  $\beta$ -Catenin, CD133, p53, MLH1 und MSH2. A) Hohe, nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expression. B) Niedrige, nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expression. C) Hohe CD133-Expression mit Anfärbung der Zellmembran und des Zelldetritus. D) Niedrige CD133-Expression. E) Dereguliertes Expressionsmuster von p53 mit starker, nukleärer Färbung. F) Dereguliertes Expressionsmuster von p53 mit einem kompletten Ausbleiben der nukleären Färbung. G) Reguliertes Expressionsmuster von p53. H) Positive, nukleäre Färbung von MLH1. I) Negative, nukleäre Färbung von MLH1. J) Positive, nukleäre Färbung von MSH2. (Michl et al. 2021)

### **2.5 Statistische Auswertung**

Als Grundlage für die statistische Auswertung werden zwei Tabellen für die beiden Kollektive mittels Microsoft® Excel erstellt und die Ergebnisse aus den bereits beschriebenen Versuchen zusammengetragen. Daraufhin werden die Daten in das Programm IBM® SPSS® Statistics 26.0 importiert.

Für den Vergleich der Tumor- und Patientencharakteristika zwischen den Gruppen wird für die nominal-skalierten bzw. dichotomen Variablen ein beidseitiger Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Da es sich bei der Kategorie „Alter“ jedoch um eine metrische Variable handelt, wird hier anders vorgegangen. Zuerst wird ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um die Normalverteilung zu prüfen. Im Kollektiv A ist die Variable „Alter“ nicht-normalverteilt, weshalb der Median berechnet wird und anschließend der Kruskal-Wallis-Test für den globalen Vergleich und der Mann-Whitney-U Test für den Vergleich zwischen der PUL- und der HEP-Gruppe verwendet wird. Im Kollektiv B weist die Kategorie „Alter“ eine Normalverteilung auf, weshalb der Mittelwert angegeben wird und für die globale Testung eine ANOVA und für den Vergleich zwischen der BRA- und der HEP-Gruppe ein t-Test durchgeführt wird.

Im Kollektiv A wird die Signifikanz der Korrelation der einzelnen Biomarker und der Biomarkerkombinationen im globalen Vergleich und im direkten Vergleich der Gruppen zueinander mittels des Chi-Quadrat-Tests bestimmt.

Im Kollektiv B wird für den relativen Anteil der RNA-Menge von *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und *TMPRSS6* zu der RNA-Menge der Referenzgene zuerst ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Da dieser jedoch keine Normalverteilung zeigt, wird anschließend der Kruskal-Wallis-Test für den globalen Vergleich und der Mann-Whitney-U Test für den Vergleich der Gruppen untereinander verwendet. Die Grenzwerte für die Einteilung der Hochrisikogruppen werden mittels einer ROC-Analyse und dem Youden-Index bestimmt. Für den Vergleich der Hochrisikogruppen von *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* sowie deren Kombinationen wird der Chi-Quadrat-Test verwendet.

Zudem wird für das Kollektiv A eine multivariate Analyse durchgeführt. Dabei werden die einzelnen Gruppen miteinander verglichen und, da es sich dann bei der abhängigen Variable um eine dichotome kategoriale Variable handelt, wird die binär logistische Regression zur Berechnung verwendet. Bei den unabhängigen Variablen, die in die Analyse einfließen, handelt es sich um das Alter bei Erstdiagnose, um den Lymphknotenstatus und um die fünf untersuchten Biomarker. Das Alter wird in Fälle über 65 Jahre und in Fälle unter 65 Jahren unterteilt und gegenübergestellt. Beim

Lymphknotenstatus werden die Fälle mit einem Befall der Lymphknoten in der N1- und N2-Kategorie zusammengefasst (N+) und mit den Fällen ohne Lymphknotenmetastasen (N0) verglichen.

Außerdem wird für das Kollektiv A zusätzlich noch eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Dabei wird für das Gesamtüberleben (OS) die Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem Todesdatum ermittelt und für das progressionsfreie Überleben (PFS) die Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem Auftreten der ersten Progression bzw. dem Todesdatum. Die Fälle, bei denen kein Todesdatum oder kein Datum der ersten Progression angegeben war, werden am Datum der letzten Beobachtung zensiert. Aus diesen Daten werden für die einzelnen Biomarker Kaplan-Meier-Kurven erstellt und die Gruppe der pulmonalen Metastasen wird mit der Gruppe der hepatischen Metastasen verglichen. Hierfür wird für die Bestimmung der Signifikanz der Log-Rank-Test verwendet. Für alle durchgeführten, statistischen Tests wird ein  $p$ -Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

## **2.6 Materialien**

### **2.6.1 Verbrauchsmaterialien**

| <b>Verbrauchsmaterialien</b>  | <b>Hersteller</b>               | <b>Sitz</b>             |
|---|---------------------------------|-------------------------|
| BAYHA® Skalpellklingen  | C. Bruno Bayha GmbH             | Tuttlingen, Deutschland |
| Biosphere® Filter Tips<br>- Low Retention –<br>0,1 – 10µl                           | SARSTEDT AG & Co. KG            | Nümbrecht, Deutschland  |
| Biosphere® Filter Tips<br>- Low Retention –<br>2 – 100µl                            | SARSTEDT AG & Co. KG            | Nümbrecht, Deutschland  |
| Collection Tube (2ml)   | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |
| Elution Tube (1,5ml)  | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |
| Eppendorf Safe-Lock<br>Tubes 0.5ml  | Eppendorf AG                    | Hamburg, Deutschland    |
| Kimtech™ Purple<br>Nitrile™ Gloves  | Kimberly-Clark<br>Corporation   | Dallas, USA             |
| LightCycler® 480<br>Multiwell Plate 96  | F. Hoffmann-La Roche AG         | Basel, Schweiz          |
| LightCycler® 480 Sealing<br>Foil  | F. Hoffmann-La Roche AG         | Basel, Schweiz          |
| Multiply®-µStrip Pro 8er<br>Kette (0,2ml)   | SARSTEDT AG & Co. KG            | Nümbrecht, Deutschland  |
| NucleoSpin™ Gel and<br>PCR Clean-up Column  | MACHEREY-NAGEL<br>GmbH & Co. KG | Düren, Deutschland      |
| PCR-Platte, 24-well, no-<br>skirt, standard profile,<br>-clear- (=Spitzbodenplatte) | BRAND GmbH & Co. KG             | Wertheim, Deutschland   |
| PyroMark® Q24 Plate<br>(=Flachbodenplatte)  | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |
| QIAamp® MinElute®<br>Column   | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |
| QIAcube® Filter-Tips<br>(1000µl)  | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |
| QIAcube® Rotor Adapter  | QIAGEN N.V.                     | Hilden, Deutschland     |

---

|   |                        |                                    |
|---|------------------------|------------------------------------|
| RNeasy MinElute® Spin<br>Column             | QIAGEN N.V.            | Hilden, Deutschland                |
| SafeSeal Micro Tube<br>2,0ml                | SARSTEDT AG & Co. KG   | Nümbrecht, Deutschland             |
| SafeSeal SurPhob®<br>Spitzen 1250µl, steril | Biozym Scientific GmbH | Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland |
| SafeSeal Tube 1,5ml                         | SARSTEDT AG & Co. KG   | Nümbrecht, Deutschland             |

---

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien.

**2.6.2 Materialien (wiederverwendbar)**

| <b>Materialien<br/>(wiederverwendbar)</b>  | <b>Hersteller</b>                | <b>Sitz</b>             |
|--|----------------------------------|-------------------------|
| Färbetrog mit Deckel,<br>Natron-Kalk-Glas  | BRAND GmbH & Co. KG              | Wertheim, Deutschland   |
| neoBox 81 plus, Kryobox<br>(9x9 Plätze; für<br>1,5ml/2,0ml Gefäße)                                   | neoLab Migge GmbH                | Heidelberg, Deutschland |
| neoLab®<br>Aufbewahrungsrack für<br>PCR-Tubes, 96-Well   | neoLab Migge GmbH                | Heidelberg, Deutschland |
| neoLab® Combi-Rack für<br>Reaktionsgefäße, 96-Well<br>(Oberseite: 1,5ml/2,0ml;<br>Unterseite: 0,5ml) | neoLab Migge GmbH                | Heidelberg, Deutschland |
| PyroMark® Q24 Cartridge  | QIAGEN N.V.                      | Hilden, Deutschland     |
| QIAcube® Reagent Bottle<br>(30ml)  | QIAGEN N.V.                      | Hilden, Deutschland     |
| QIAcube® Reagent Bottle<br>Rack  | QIAGEN N.V.                      | Hilden, Deutschland     |
| Thermo Scientific™<br>Edelstahl-Färbegestell mit<br>Drahtbügel                                       | Thermo Fisher Scientific<br>Inc. | Waltham, USA            |

Tabelle 3: Auflistung aller wiederverwendbaren Materialien.



**2.6.3 Reagenzien und Chemikalien**

| <b>Reagenzien und Chemikalien</b>              | <b>Hersteller</b>             | <b>Sitz</b>                     |
|--|-------------------------------|---------------------------------|
| 1x TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA)              | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                    |
| 5x Reaction Buffer                             | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                    |
| 6x DNA Loading Dye                             | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                    |
| Ambion® Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                    |
| Biozym LE Agarose                              | Biozym Scientific GmbH        | Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Deparaffinization Solution                     | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland             |
| dNTP Mix, PCR Grade, 10mM each                 | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland             |
| Ethanol absolute p. A.                         | AppliChem GmbH                | Darmstadt, Deutschland          |
| GelRed® Nucleic Acid Gel Stain                 | Biotium, Inc.                 | Fremont, USA                    |
| GeneRuler™ Low Range DNA Ladder                | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                    |
| HotStarTaq® DNA Polymerase Kit, beinhaltet:    | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland             |
| - HotStarTaq® Polymerase 5 U/μl                |                               |                                 |
| - PCR Buffer, 10x                              |                               |                                 |
| Human Genomic DNA: Male                        | Promega Corporation           | Fitchburg, USA                  |
| LightCycler® 480 Probes Master                 | F. Hoffmann-La Roche AG       | Basel, Schweiz                  |
| Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel und            | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG  | Düren, Deutschland              |

PCR Clean-up Kit,

beinhaltet:

- Binding Buffer NTI
- Elution Buffer NE
- Wash Buffer NT3

PyroMark® Gold Q24            QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

Reagents, beinhaltet:

- Enzyme Mixture
- Substrate Mixture
- dATP $\alpha$ S
- dCTP
- dGTP
- dTTP

PyroMark® Q24            QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

Annealing Buffer

PyroMark® Q24 Binding    QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

Buffer

PyroMark® Q24            QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

Denaturation Solution

PyroMark® Wash Buffer    QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

concentrate

QIAamp® DNA Micro        QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

Kit, beinhaltet:

- AL-Buffer
- ATL-Buffer
- AW1 Waschpuffer
- AW2 Waschpuffer
- Elution Buffer AE
- Proteinase K

RNeasy® FFPE Kit,            QIAGEN N.V.            Hilden, Deutschland

beinhaltet:

- Buffer PKD
- Buffer RBC
- Buffer RPE

|   |                                  |   |
|---|----------------------------------|---|
| - DNase I   |                                  |   |
| - DNase Booster<br>Buffer   |                                  |   |
| - Proteinase K  |                                  |   |
| Streptavidin Sepharose™<br>High Performance<br>(=Beads)             | GE Healthcare                    | Chalfont Saint Giles,<br>Großbritannien |
| Thermo Scientific™<br>dNTP Mix (10μM each)                          | Thermo Fisher<br>Scientific Inc. | Waltham, USA                            |
| Thermo Scientific™<br>Random Hexamer Primer<br>(0,2μg/μl)           | Thermo Fisher<br>Scientific Inc. | Waltham, USA                            |
| Thermo Scientific™<br>RevertAid™ Reverse<br>Transcriptase (200U/μl) | Thermo Fisher<br>Scientific Inc. | Waltham, USA                            |
| Thermo Scientific™<br>RiboLock RNase-Inhibitor<br>(40U/μl)          | Thermo Fisher<br>Scientific Inc. | Waltham, USA                            |
| Xylol, Isomerengemisch<br>reinst                                    | AppliChem GmbH                   | Darmstadt, Deutschland                  |

---

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Reagenzien und Chemikalien.

**2.6.4 Primer**

|   | <b>Basensequenz 5'-3'</b>  | <b>Hersteller</b> | <b>Sitz</b> |
|---|--|-------------------|-------------|
| <i>β-Actin</i>                              | V: ACAGGATGCAGAAGGAGATCA   | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: CGATCCACACGGAGTACTTG  | GmbH              | Deutschland |
| <i>ACVR1C</i>                               | V: TTATGATGTGACCGCCTCTG  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: TGCAATTGTCCTTTGAACCA  | GmbH              | Deutschland |
| <i>BRAF</i><br>Exon 15,<br>Kodon<br>600-601 | V: TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT<br>(Modifikation am 5'-Ende mit Biotin) | GmbH              | Deutschland |
|   | S: GTAAAAATAGGTGATTTTGG  |                   |             |
| <i>EMILIN3</i>                              | V: GAGCACCTCAGCGACCAT  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: CTGGGCCTTTCCTTCCAT  | GmbH              | Deutschland |
| <i>GAPDH</i>                                | V: AGCCACATCGCTCAGACAC   | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: GCCCAATACGACCAAATCC   | GmbH              | Deutschland |
| <i>KRAS</i><br>Exon 2,<br>Kodon 12-<br>13   | V: NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT<br>(Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)  | GmbH              | Deutschland |
|   | S: TGTGGTAGTTGGAGCT  |                   |             |
| <i>KRAS</i><br>Exon 3,<br>Kodon 59-<br>61   | V: AATTGATGGAGAAACCTGTCTCTT  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: TCCTCATGTACTGGTCCCTCATT<br>(Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)   | GmbH              | Deutschland |
|   | S: TCTCTTGGATATTCTCGAC   |                   |             |
| <i>KRAS</i><br>Exon 4,<br>Kodon<br>117      | V: CTGAAGATGTACCTATGGTCCTAG  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: CTGAGCCTGTTTTGTGTCTACTG<br>(Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)   | GmbH              | Deutschland |
|   | S: ACCTATGGTCCTAGTAGGAA  |                   |             |
| <i>KRAS</i><br>Exon 4,<br>Kodon<br>146      | V: GGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTA  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: AGTTATGATTTTGCAGAAAACAGA<br>(Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)  | GmbH              | Deutschland |
|   | S: GAATTCCTTTTATTGAAAC   |                   |             |
| <i>MTA1</i>                                 | V: CGTGTTCTACATGCCCAAAG  | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: GTTCCGAGGATGAGAGCAG   | GmbH              | Deutschland |
| <i>NFAT5</i>                                | V: GTCAGACAAGCGGTGGTGA   | biomers.net       | Ulm,        |
|   | R: TGCTTCAGAGGCAAATCCA   | GmbH              | Deutschland |

|                |   |             |             |
|----------------|---|-------------|-------------|
| <i>NRAS</i>    | V: CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG                                    | biomers.net | Ulm,        |
| Exon 2,        | R: TGGATTGTCAGTGCCTTTT  | GmbH        | Deutschland |
| Kodon 12-13    | (Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)<br>S: TGGTGGTGGTTGGAG    |             |             |
| <i>NRAS</i>    | V: AAACCTGTTTGTGGACATACTG                                     | biomers.net | Ulm,        |
| Exon 3,        | R: TATTGGTCTCTCATGGCACTGT                                     | GmbH        | Deutschland |
| Kodon 59-61    | (Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)<br>S: TTGTTGGACATACTGGAT |             |             |
| <i>NRAS</i>    | V: ATGATGTACCTATGGTGCTAGTGG                                   | biomers.net | Ulm,        |
| Exon 4,        | (Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)                          | GmbH        | Deutschland |
| Kodon 117      | R: CGTAACTCTTGGCCAGTTCG<br>S: TCCTTGTGGCAAATC                 |             |             |
| <i>NRAS</i>    | V: GCAACTGGCCAAGAGTTACG                                       | biomers.net | Ulm,        |
| Exon 4,        | R: TGAAAGCTGTACCATACCTGTCTG                                   | GmbH        | Deutschland |
| Kodon 146      | (Modifikation am 5'-Ende mit Biotin)<br>S: TCCATTCATTGAAACCT  |             |             |
| <i>SMC3</i>    | V: TGGAGAAAAATCCAGACAATTAAGA                                  | biomers.net | Ulm,        |
|                | R: ACTTGGCGTTCGATATCCTC                                       | GmbH        | Deutschland |
| <i>SV2B</i>    | V: TGGAGCATCATCCCACACTA                                       | biomers.net | Ulm,        |
|                | R: TCCAGCTATGGAAGTGGTAATTG                                    | GmbH        | Deutschland |
| <i>TMPRSS6</i> | V: GCCAGTGGACGATCCAGA   | biomers.net | Ulm,        |
|                | R: GATCCTCTCGGCGTAGGG   | GmbH        | Deutschland |
| <i>YWHAZ</i>   | V: GATCCCCAATGCTTCACAAG                                       | biomers.net | Ulm,        |
|                | R: TGCTTGTGTGACTGATCGAC                                       | GmbH        | Deutschland |

Tabelle 5: Auflistung aller für die Mutationsanalyse und RNA-Expressionsanalyse verwendeten Primer einschließlich der 5'-3' Basensequenz. Legende: A=Adenin; C=Cytosin; G=Guanin; N=jedes Nukleotid möglich; R=Rückwärts-Primer; S=Sequenzierprimer; T=Thymin; V=Vorwärts-Primer. (Michl et al. 2021)

**2.6.5 UPL-Sonden**

| <b>UPL-Sonden</b> | <b>Gen</b>                      | <b>Hersteller</b>            | <b>Sitz</b>    |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------|
| UPL Probe 018     | <i>SMC3</i>                     | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 021     | <i>ACVR1C</i>                   | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 025     | <i>NFAT5</i>                    | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 030     | <i>YWHAZ</i>                    | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 045     | <i>SV2B</i>                     | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 054     | <i>MTA1</i>                     | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 057     | <i>EMILIN3</i>                  | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 060     | <i>GAPDH</i>                    | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 063     | <i><math>\beta</math>-Actin</i> | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |
| UPL Probe 075     | <i>TMPRSS6</i>                  | Sigma-Aldrich<br>Corporation | St. Louis, USA |

Tabelle 6: Auflistung aller verwendeten UPL-Sonden.

**2.6.6 Antikörper**

|                  | <b>Ursprung</b>      | <b>Klon</b>   | <b>Verdünnung</b>  | <b>Firma</b>                           | <b>Sitz</b>                   | <b>Nachweis</b>                                     |
|------------------|----------------------|---------------|--------------------|--|-------------------------------|---|
| $\beta$ -Catenin | Maus<br>(monoklonal) | clone<br>14   | nicht<br>notwendig | Ventana<br>Medical<br>Systems,<br>Inc. | Oro<br>Valley,<br>USA         | Ventana<br>OptiView<br>DAB IHC<br>Detection<br>Kit  |
| p53              | Maus<br>(monoklonal) | DO-7          | 1:1000             | Thermo<br>Fisher<br>Scientific<br>Inc. | Waltham,<br>USA               | Ventana<br>OptiView<br>DAB IHC<br>Detection<br>Kit  |
| CD133            | Maus<br>(monoklonal) | AC133         | 1:50               | Miltenyi<br>Biotec<br>Inc.             | Auburn,<br>USA                | Ventana<br>OptiView<br>DAB IHC<br>Detection<br>Kit  |
| MLH1             | Maus<br>(monoklonal) | ES05          | 1:100              | Leica<br>Bio-<br>systems               | Newcastle<br>upon<br>Tyne, UK | Ventana<br>UltraView<br>DAB IHC<br>Detection<br>Kit |
| MSH2             | Maus<br>(monoklonal) | G219-<br>1129 | nicht<br>notwendig | Ventana<br>Medical<br>Systems,<br>Inc. | Oro<br>Valley,<br>USA         | Ventana<br>OptiView<br>DAB IHC<br>Detection<br>Kit  |

Tabelle 7: Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper. (Michl et al. 2021)

**2.6.7 Geräte**

| <b>Gerät</b>   | <b>Hersteller</b>                | <b>Sitz</b>             |
|--|----------------------------------|-------------------------|
| AEG Electrolux ARCTIS<br>70340 GS1 Gefrierschrank                  | Electrolux AB                    | Stockholm, Schweden     |
| Bio-Rad® CFX Connect™<br>Real-Time PCR Detection<br>System         | Bio-Rad Laboratories,<br>Inc.    | Hercules, USA           |
| Bio-Rad® PowerPac™ 300   | Bio-Rad Laboratories,<br>Inc.    | Hercules, USA           |
| Eppendorf Centrifuge<br>5427 R                                     | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf Research® plus<br>Pipette, 0,5 - 10µl                    | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf Research® plus<br>Pipette, 10 - 100µl                    | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf Research® plus<br>Pipette, 100 - 1000µl                  | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf ThermoMixer®<br>0,5ml                                    | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf ThermoMixer®<br>1,5ml                                    | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Eppendorf Vapo.Protect<br>Mastercycler™ pro PCR<br>System, 96-well | Eppendorf AG                     | Hamburg, Deutschland    |
| Hettich Zentrifuge<br>Universal 320                                | Andreas Hettich GmbH &<br>Co. KG | Tuttlingen, Deutschland |
| Kern Präzisionswaage KB<br>1200-2N                                 | KERN & SOHN GmbH                 | Balingen, Deutschland   |
| Leica DM LB<br>Durchlichtmikroskop                                 | Leica Microsystems<br>GmbH       | Wetzlar, Deutschland    |
| Liebherr Universal-<br>kühlschrank FKv 4310                        | Liebherr-International<br>S.A.   | Bulle, Schweiz          |
| NanoDrop™ Spectro-<br>photometer ND-1000                           | Thermo Fisher Scientific<br>Inc. | Waltham, USA            |



|  |                               |                                  |
|--|-------------------------------|----------------------------------|
| neoLab® Mini-Zentrifuge Spectrafuge™ mit Rotor für 2 x 0,2 ml 8er PCR-Strips und Rotor für 8 x 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße  | neoLab Migge GmbH             | Heidelberg, Deutschland          |
| PRÄZITHERM Präzisions-Heizplatte   | HARRY GESTIGKEIT GmbH         | Düsseldorf, Deutschland          |
| PyroMark® Q24, Pyrosequenzierer  | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland              |
| PyroMark® Q24 Vacuum Workstation   | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland              |
| QIAcube® Connect   | QIAGEN N.V.                   | Hilden, Deutschland              |
| Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B1 Minigel-Elektrophoresesystem, beinhaltet:   | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- EasyCast™ abgedichteter UVT Gelträger</li> <li>- Hauptpufferkammer</li> <li>- Kamm, 14-Well</li> <li>- SuperSafe™ Deckel mit Netzanschlusskabeln</li> </ul> |                               |                                  |
| Thermo Scientific™ VARIOMAG Monoshake, Mikroplatten-Schüttler  | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                     |
| Ultra-Tiefkühlunterbauschrank TUS 80-100   | FRYKA-Kältetechnik GmbH       | Esslingen am Neckar, Deutschland |
| Vortex-Genie 2   | Scientific Industries, Inc.   | Bohemia, USA                     |

Tabelle 8: Auflistung aller verwendeten Geräte.

**2.6.8 Software**

| <b>Software</b>                       | <b>Firma</b>  | <b>Sitz</b>         |
|---------------------------------------|---|---------------------|
| Bio-Rad® CFX<br>Manager™ Software 3.1 | Bio-Rad Laboratories, Inc.                              | Hercules, USA       |
| IBM® SPSS® Statistics<br>26.0         | International Business<br>Machines Corporation<br>(IBM) | Armonk, USA         |
| Microsoft® Office 2016                | Microsoft Corporation                                   | Redmond, USA        |
| NanoDrop™ ND-1000<br>Software V3.5.2  | Thermo Fisher Scientific<br>Inc.                        | Waltham, USA        |
| PyroMark® Q24 Software<br>2.0.8       | QIAGEN N.V.   | Hilden, Deutschland |

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software.

## 3. Ergebnisse

### **3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika**

#### Kollektiv A:

In der nachfolgenden Tabelle 10 (siehe S. 60) sind die Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs A zusammengefasst und in Abbildung 6 (siehe S. 61) grafisch dargestellt:

| Gesamtanzahl<br>N=246                  | PUL<br>N=82 | HEP<br>N=82 | M0<br>N=82 | P      |             |
|--|-------------|-------------|------------|--------|-------------|
|  |             |             |            | Global | PUL vs. HEP |
| <b>Geschlecht</b>                      |             |             |            |        |             |
| Weiblich                               | 27 (32,9)   | 32 (39,0)   | 42 (51,2)  | 0,053  | 0,42        |
| Männlich                               | 55 (67,1)   | 50 (61,0)   | 40 (48,8)  |        |             |
| <b>Alter bei Erstdiagnose</b>          |             |             |            |        |             |
| Median in Jahren                       | 64,4        | 63,5        | 71,3       | <0,001 | 0,28        |
| ≥ 70 Jahre                             | 28 (34,1)   | 24 (29,3)   | 46 (56,1)  | 0,001  | 0,50        |
| ≥ 65 Jahre                             | 39 (47,6)   | 37 (45,1)   | 64 (78,0)  | <0,001 | 0,75        |
| < 65 Jahre                             | 43 (52,4)   | 45 (54,9)   | 18 (22,0)  |        |             |
| <b>Kolonseite des Primarius</b>        |             |             |            |        |             |
| Rechtes Kolon                          | 9 (11,0)    | 9 (11,0)    | 9 (11,0)   | 1,00   | 1,00        |
| Linkes Kolon                           | 73 (89,0)   | 73 (89,0)   | 73 (89,0)  |        |             |
| <b>Lokalisation des Primarius (I)</b>  |             |             |            |        |             |
| Kolon                                  | 25 (30,5)   | 32 (39,0)   | 51 (62,2)  | <0,001 | 0,29        |
| Rektosigmoid                           | 7 (8,5)     | 10 (12,2)   | 7 (8,5)    |        |             |
| Rektum                                 | 50 (61,0)   | 40 (48,8)   | 24 (29,3)  |        |             |
| <b>Lokalisation des Primarius (II)</b> |             |             |            |        |             |
| Zökum                                  | 5 (6,1)     | 5 (6,1)     | 4 (4,9)    | <0,001 | 0,01        |
| Colon ascendens                        | 4 (4,9)     | 4 (4,9)     | 3 (3,7)    |        |             |
| Rechte Kolonflexur                     | -           | -           | -          |        |             |
| Colon transversum                      | -           | -           | 2 (2,4)    |        |             |
| Linke Kolonflexur                      | -           | 1 (1,2)     | 2 (2,4)    |        |             |
| Kolon descendens                       | 15 (18,3)   | 8 (9,8)     | 4 (4,9)    |        |             |
| Sigma                                  | -           | 14 (17,1)   | 36 (43,9)  |        |             |
| Rektosigmoid                           | 7 (8,5)     | 10 (12,2)   | 7 (8,5)    |        |             |
| Rektum, oberes Drittel                 | 16 (19,5)   | 12 (14,6)   | 6 (7,3)    |        |             |
| Rektum, mittleres Drittel              | 19 (23,2)   | 17 (20,7)   | 12 (14,6)  |        |             |
| Rektum, unteres Drittel                | 9 (11,0)    | 10 (12,2)   | 6 (7,3)    |        |             |
| Nicht klassifizierbar                  | 7 (8,5)     | 1 (1,2)     | -          |        |             |
| <b>Grading</b>                         |             |             |            |        |             |
| Low grade (G1, G2)                     | 54 (65,9)   | 56 (68,3)   | 56 (68,3)  | 0,97   | 0,59        |
| High grade (G3)                        | 27 (32,9)   | 26 (31,7)   | 26 (31,7)  |        |             |
| Unbekannt                              | 1 (1,2)     | -           | -          |        |             |
| <b>pT-Kategorie</b>                    |             |             |            |        |             |
| pT0                                    | 2 (2,4)     | -           | -          | 0,50   | 0,49        |
| pT1                                    | 3 (3,7)     | 4 (4,9)     | 4 (4,9)    |        |             |
| pT2                                    | 11 (13,4)   | 11 (13,4)   | 8 (9,8)    |        |             |
| pT3                                    | 57 (69,5)   | 58 (70,7)   | 60 (73,2)  |        |             |
| pT4                                    | 7 (8,5)     | 9 (11,0)    | 10 (12,2)  |        |             |
| Unbekannt                              | 2 (2,4)     | -           | -          |        |             |
| <b>pN-Kategorie</b>                    |             |             |            |        |             |
| pN0                                    | 32 (39,0)   | 31 (37,8)   | 52 (63,4)  | 0,001  | 0,14        |
| pN1                                    | 31 (37,8)   | 37 (45,1)   | 26 (31,7)  |        |             |
| pN2                                    | 14 (17,1)   | 14 (17,1)   | 3 (3,7)    |        |             |
| Unbekannt                              | 5 (6,1)     | -           | 1 (1,2)    |        |             |
| <b>Zeitpunkt der Metastasierung</b>    |             |             |            |        |             |
| Metachron                              | 42 (51,2)   | 23 (28,0)   | n.a.       | -      | 0,002       |
| Synchron                               | 40 (48,8)   | 59 (72,0)   | n.a.       |        |             |

Tabelle 10: Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs A (N=246). Für jede Kategorie sind die absolute Anzahl der Patienten und in den Klammern der prozentuale Anteil angegeben. Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen; n.a.=nicht auswertbar. (Michl et al. 2021)

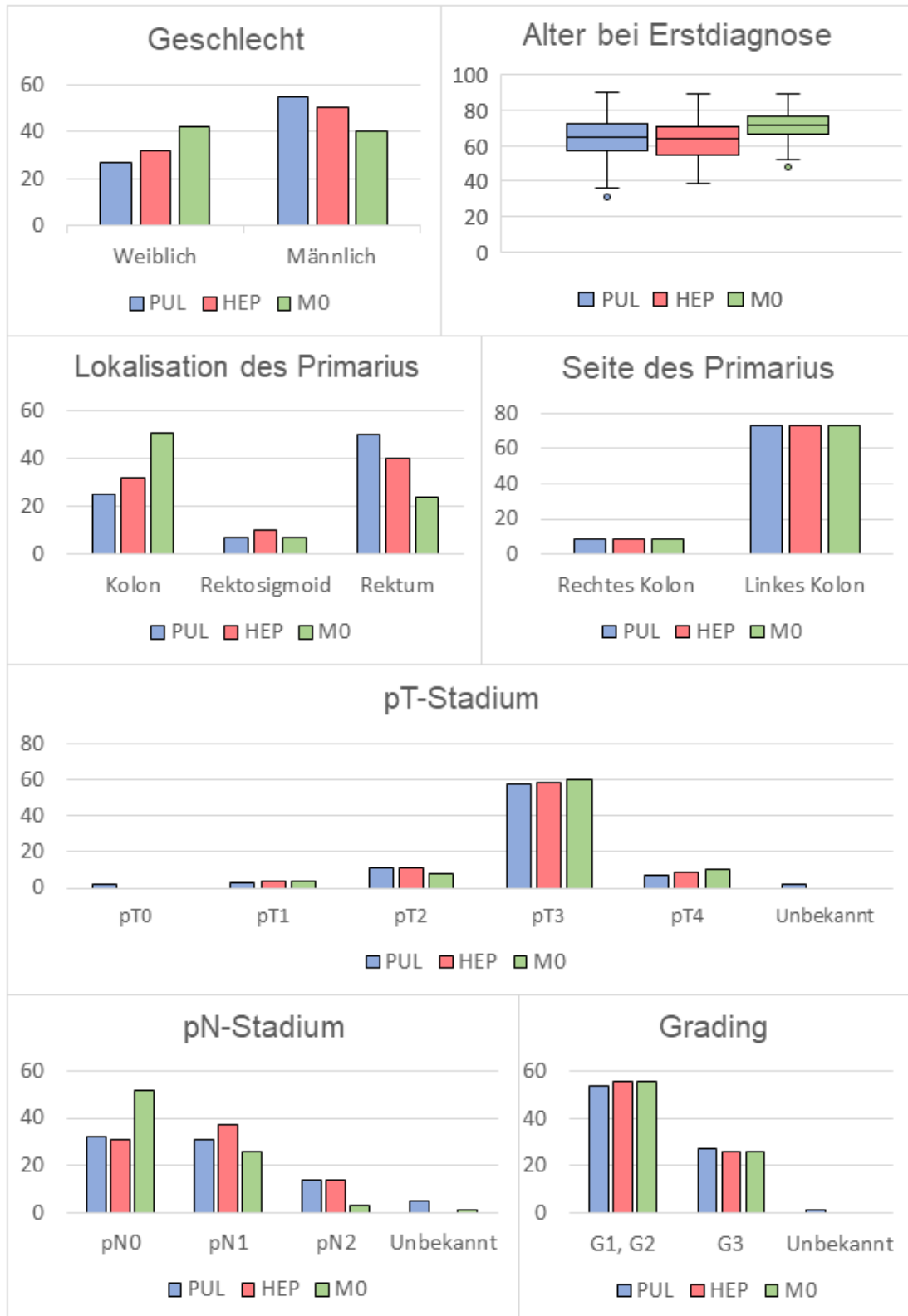


Abbildung 6: Vergleich der Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs A durch Balkendiagramme und einen Box-Plot. Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen. (Michl et al. 2021)

Wie bereits erwähnt, besteht das Kollektiv A aus 246 Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen Adenokarzinom im Kolon oder im Rektum, aufgeteilt auf jeweils drei gleich große Gruppen, bei der die eine Gruppe aus Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen (PUL), die andere aus Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen (HEP) und die dritte Gruppe aus Patienten ohne Metastasen (M0) besteht. Insgesamt waren 145 Patienten männlich (59%) und 101 Patienten weiblich (41%). Beim Vergleich der Verteilung des Geschlechts zwischen den Gruppen zeigte sich im globalen Test mit einem  $p$ -Wert = 0,053 knapp kein statistisch signifikanter Unterschied. Das mediane Alter war statistisch signifikant höher in der M0-Gruppe verglichen mit der PUL- und der HEP-Gruppe (71,3 vs. 64,4 vs. 63,5 Jahre; globales  $p < 0,001$ ). Beim direkten Vergleich des Alters zwischen der PUL- und der HEP-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,28$ ).

In allen drei Gruppen war der Primarius häufiger im linken Kolon (N=219 [89%]) als im rechten Kolon (N=27 [11%]) und diese Seitenverteilung war auch in allen Gruppen identisch. Während eine Mehrheit der Patienten der PUL- und der HEP-Gruppe den Primarius im Rektum aufwiesen (50 [61,0%] und 40 [48,8%]), lag in der M0-Gruppe beim Großteil der Patienten der Primarius im restlichen Kolon (N=51 [62,2%]). Dabei unterschied sich diese Verteilung statistisch signifikant im Vergleich zwischen der PUL- und der M0-Gruppe (PUL vs. M0:  $p < 0,001$ ) und im Vergleich zwischen der HEP- und der M0-Gruppe (HEP vs. M0:  $p = 0,01$ ), aber nicht zwischen der PUL- und der HEP-Gruppe untereinander (PUL vs. HEP:  $p = 0,29$ ). Bei einer genaueren Betrachtung der Lokalisation befand sich der Primärtumor in der PUL- und der HEP-Gruppe am häufigsten im mittleren Drittel des Rektums (19 [23,2%] und 17 [20,7%]), hingegen war der Primarius in der M0-Gruppe vor allem im Sigma lokalisiert (N=36 [43,9%]). Bei den nicht klassifizierbaren Fällen in der Kategorie „Lokalisation des Primarius (II)“ handelte es sich um Fälle, bei denen der Primärtumor mehrere Gebiete befiel, weshalb diese Fälle nicht genauer eingeteilt werden konnten. Jedoch war es trotzdem möglich sie dem Kolon, dem Rektosigmoid oder dem Rektum zuzuteilen, weshalb in der Kategorie „Lokalisation des Primarius (I)“ keine unklassifizierbaren Fälle vorlagen. Die PUL-Gruppe wies eine fast gleichmäßige Verteilung der syn- und metachronen Fälle auf (40 [48,8%] vs. 42 [51,2%]), wohingegen in der HEP-Gruppe die Karzinome häufiger synchron als metachron auftraten (59 [72,0%] vs. 23 [28,0%];  $p = 0,002$  bei PUL vs. HEP).

In allen Gruppen waren die Tumore mehrheitlich low-grade-Tumore und die Verteilung der low- und high-grade-Karzinome war auch in allen drei Gruppen annähernd identisch,

weshalb sich im globalen Test auch kein statistisch signifikanter Unterschied fand (globales  $p=0,97$ ). Darüber hinaus waren in allen Gruppen die meisten Karzinome in der pT3-Kategorie (PUL=57 [69,5%]; HEP=58 [70,7%]; M0=60 [73,2%]), weshalb sich auch hier kein signifikanter Unterschied zeigte (globales  $p=0,50$ ). In der pN-Kategorie fand sich jedoch eine differente Verteilung in den Gruppen. Während sich in der PUL- und der HEP-Gruppe annähernd gleich viele Fälle in der pN0- und pN1-Kategorie befanden ( $p=0,14$  bei PUL vs. HEP), unterschied sich hierbei die M0-Gruppe, da die Fälle hier größtenteils in der pN0-Kategorie (52 [63,4%]; globales  $p=0,001$ ) waren (Michl et al. 2021).

Kollektiv B:

Die Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs B sind in der nachfolgenden Tabelle 11 zusammengefasst und in Abbildung 7 (siehe S. 65) grafisch dargestellt:

| Gesamtanzahl<br>N=45                   | BRA<br>N=15 | HEP<br>N=15 | M0<br>N=15 | P      |             |
|--|-------------|-------------|------------|--------|-------------|
|  |             |             |            | Global | BRA vs. HEP |
| <b>Geschlecht</b>                      |             |             |            |        |             |
| Weiblich                               | 9 (60,0)    | 7 (46,7)    | 10 (66,7)  | 0,53   | 0,46        |
| Männlich                               | 6 (40,0)    | 8 (53,3)    | 5 (33,3)   |        |             |
| <b>Alter bei Erstdiagnose</b>          |             |             |            |        |             |
| Mittelwert in Jahren                   | 64,1        | 62,5        | 73,3       | 0,004  | 0,66        |
| ≥ 70 Jahre                             | 4 (26,7)    | 2 (13,3)    | 11 (73,3)  | 0,002  | 0,36        |
| ≥ 65 Jahre                             | 7 (46,7)    | 7 (46,7)    | 13 (86,7)  | 0,04   | 1,00        |
| < 65 Jahre                             | 8 (53,3)    | 8 (53,3)    | 2 (13,3)   |        |             |
| <b>Kolonseite des Primarius</b>        |             |             |            |        |             |
| Rechtes Kolon                          | 6 (40,0)    | 6 (40,0)    | 6 (40,0)   | 1,00   | 1,00        |
| Linkes Kolon                           | 9 (60,0)    | 9 (60,0)    | 9 (60,0)   |        |             |
| <b>Lokalisation des Primarius (I)</b>  |             |             |            |        |             |
| Kolon                                  | 9 (60,0)    | 9 (60,0)    | 9 (60,0)   | 1,00   | 1,00        |
| Rektosigmoid                           | -           | -           | -          |        |             |
| Rektum                                 | 6 (40,0)    | 6 (40,0)    | 6 (40,0)   |        |             |
| <b>Lokalisation des Primarius (II)</b> |             |             |            |        |             |
| Zökum                                  | 1 (6,7)     | 1 (6,7)     | 2 (13,3)   | 1,00   | 1,00        |
| Colon ascendens                        | 4 (26,7)    | 4 (26,7)    | 3 (20,0)   |        |             |
| Rechte Kolonflexur                     | 1 (6,7)     | 1 (6,7)     | 1 (6,7)    |        |             |
| Colon transversum                      | -           | -           | -          |        |             |
| Linke Kolonflexur                      | -           | -           | -          |        |             |
| Colon descendens                       | -           | -           | -          |        |             |
| Sigma                                  | 3 (20,0)    | 3 (20,0)    | 3 (20,0)   |        |             |
| Rektosigmoid                           | -           | -           | -          |        |             |
| Rektum, oberes Drittel                 | 1 (6,7)     | 1 (6,7)     | 1 (6,7)    |        |             |
| Rektum, mittleres Drittel              | 1 (6,7)     | 1 (6,7)     | -          |        |             |
| Rektum, unteres Drittel                | 4 (26,7)    | 4 (26,7)    | 5 (33,3)   |        |             |
| <b>Grading</b>                         |             |             |            |        |             |
| Low grade (G1, G2)                     | 10 (66,7)   | 10 (66,7)   | 9 (60,0)   | 0,91   | 1,00        |
| High grade (G3)                        | 5 (33,3)    | 5 (33,3)    | 6 (40,0)   |        |             |
| <b>pT-Kategorie</b>                    |             |             |            |        |             |
| pT0                                    | -           | -           | -          | 0,07   | 0,59        |
| pT1                                    | -           | -           | -          |        |             |
| pT2                                    | -           | -           | 4 (26,7)   |        |             |
| pT3                                    | 11 (73,3)   | 12 (80,0)   | 7 (46,7)   |        |             |
| pT4                                    | 3 (20,0)    | 3 (20,0)    | 4 (26,7)   |        |             |
| Unbekannt                              | 1 (6,7)     | -           | -          |        |             |
| <b>pN-Kategorie</b>                    |             |             |            |        |             |
| pN0                                    | 4 (26,7)    | 4 (26,7)    | 4 (26,7)   | 0,25   | 0,79        |
| pN1                                    | 3 (20,0)    | 3 (20,0)    | 8 (53,3)   |        |             |
| pN2                                    | 7 (46,7)    | 8 (53,3)    | 3 (20,0)   |        |             |
| Unbekannt                              | 1 (6,7)     | -           | -          |        |             |

Tabelle 11: Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs B (N=45). Für jede Kategorie sind die absolute Anzahl der Patienten und in den Klammern der prozentuale Anteil angegeben. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.



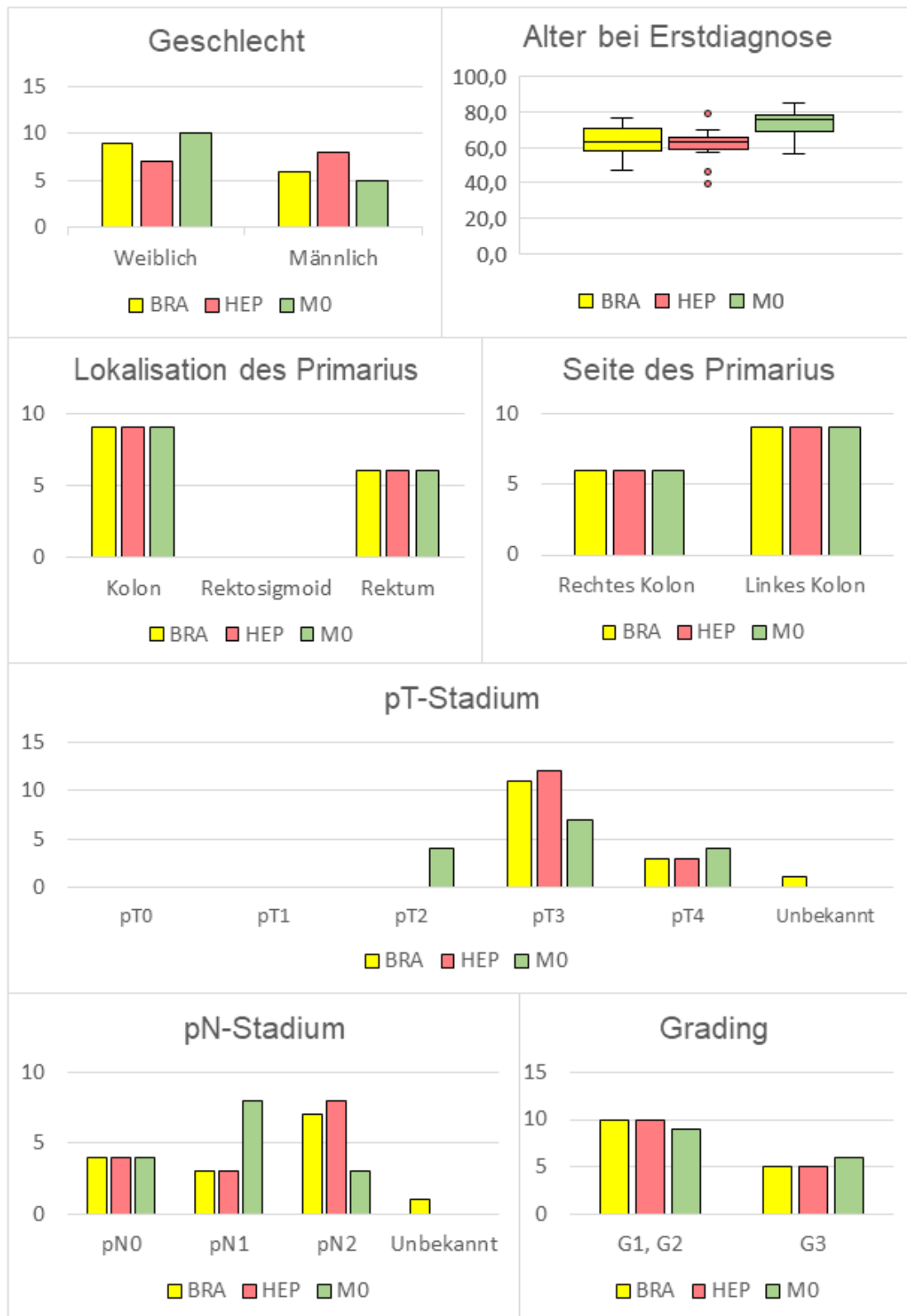


Abbildung 7: Vergleich der Patienten- und Tumorcharakteristika des Kollektivs B durch Balkendiagramme und einen Box-Plot. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

Das Kollektiv B bestand aus 45 Fällen, die in drei gleichgroße Gruppen mit Patienten, die entweder ZNS-Metastasen besaßen (BRA) oder nur hepatisch metastasiert waren (HEP) oder keine Metastasierung aufwiesen (M0), aufgeteilt waren. Insgesamt waren 26 Patienten weiblich (57,8%) und 19 Patienten männlich (42,2%). Bei der Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen zeigte sowohl die globale Testung als auch der direkte Vergleich zwischen der BRA- und der HEP-Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied (Global:  $p=0,53$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,46$ ). Beim Alter war der Mittelwert statistisch signifikant höher in der M0-Gruppe verglichen mit der BRA- und der HEP-Gruppe (73,3 vs. 64,1 vs. 62,5 Jahre; globales  $p=0,004$ ). Beim Vergleich des Alters nur zwischen der BRA- und der HEP-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,66$ ).

Jede Gruppe besaß gleichviele Fälle mit dem Primarius auf der linken bzw. auf der rechten Kolonseite. Dabei war eine Mehrheit der Fälle auf der linken Seite mit jeweils 9 Fällen pro Gruppe (60,0%) und eine Minderheit auf der rechten Seite mit jeweils 6 Fällen pro Gruppe (40,0%) lokalisiert. Auch bei der Verteilung der Primärtumore auf das Kolon und das Rektum war die Anzahl in jeder Gruppe identisch. So lag mehrheitlich in jeder Gruppe der Primarius mit jeweils 9 Fällen im Kolon (60,0%) und mit jeweils 6 Fällen im Rektum (40,0%). Bei der genaueren Betrachtung der Lokalisation des Primarius waren die meisten Fälle im Colon ascendens (BRA=4 [26,7%]; HEP=4 [26,7%]; M0=3 [20,0%]), im Sigma (BRA=3 [20,0%]; HEP=3 [20,0%]; M0=3 [20,0%]) und im unteren Drittel des Rektums (BRA=4 [26,7%]; HEP=4 [26,7%]; M0=5 [33,3%]) verortet. Sowohl bei der gröberen als auch bei der genaueren Einteilung der Lokalisation der Primärtumore waren die Fälle in jeder Gruppe annähernd identisch verteilt, sodass sich auch in jeder dieser Kategorien sowohl in der globalen Testung als auch im Vergleich der Gruppe der ZNS-Metastasen und der Gruppe der Lebermetastasen mit einem  $p$ -Wert von 1,00 kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte.

Auch bei der Verteilung des Gradings des Primarius waren die Gruppen fast identisch. Die meisten Fälle wiesen einen low-grade-Tumor auf (BRA=10 [66,7%]; HEP=10 [66,7%]; M0=9 [60,0%]) und dabei waren die Gruppen hier ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (globales  $p=0,91$ ). Bei der pT-Kategorie waren die meisten Fälle in der Kategorie pT3 (BRA=11 [73,3%]; HEP=12 [80,0%]; M0=7 [46,7%]), jedoch besaß die M0-Gruppe noch 4 Fälle in der pT2- Kategorie (26,7%), während die BRA- und die HEP-Gruppe keine Fälle in dieser Kategorie aufwiesen. Trotzdem zeigte sich knapp kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (globales  $p=0,07$ ). Darüber hinaus waren die Fälle der BRA- und der HEP-Gruppe vor allem in der pN2-Kategorie (BRA=7 [46,7%];

HEP=8 [53,3%]), während die meisten Fälle der M0-Gruppe in der pN1-Kategorie waren (M0=8 [53,3%]). Dabei fand sich wiederum kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (globales  $p=0,25$ ). Daten zu dem Zeitpunkt der Metastasierung waren beim Kollektiv B nicht vorhanden, weshalb der Vergleich zwischen der BRA- und der HEP-Gruppe nach ihrem Anteil an metachronen und synchronen Fällen nicht möglich war.

### 3.2 Immunhistochemie und Mutationsanalyse

Die Fälle des Kollektivs A wurden auf Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg, genauer in *KRAS* und *NRAS* Exon 2, 3, und 4 und in *BRAF* Exon 15, analysiert und es wurde deren immunhistochemische Ausprägung von  $\beta$ -Catenin, CD133, p53 und MLH1 bzw. MSH2 betrachtet. Die Häufigkeit der aufgetretenen Biomarker in den verschiedenen Gruppen ist in Tabelle 12 aufgelistet:

|                                    | <b>Gesamt<br/>N=246</b> | <b>PUL<br/>N=82</b> | <b>HEP<br/>N=82</b> | <b>M0<br/>N=82</b> | <b>Globales<br/>P</b> |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>MAP-Kinase-Status</b>           |                         |                     |                     |                    |                       |
| MAP-Kinase-Mutation                | 133                     | 52 (63,4)           | 42 (51,2)           | 39 (47,6)          | 0,10                  |
| MAP-Kinase-Wildtyp                 | 113                     | 30 (36,6)           | 40 (48,8)           | 43 (52,4)          |                       |
| <i>RAS</i> Mutation                | 124                     | 48 (58,5)           | 41 (50,0)           | 35 (42,7)          | 0,13                  |
| <i>RAS</i> Wildtyp                 | 122                     | 34 (41,5)           | 41 (50,0)           | 47 (57,3)          |                       |
| <i>KRAS</i> Mutation               | 117                     | 46 (56,1)           | 38 (46,3)           | 33 (40,2)          | 0,12                  |
| Exon 2                             | 103                     | 42 (51,2)           | 33 (40,2)           | 28 (34,1)          |                       |
| Exon 3                             | 8                       | 1 (1,2)             | 4 (4,9)*            | 3 (3,7)            |                       |
| Exon 4                             | 6                       | 3 (3,7)             | 1 (1,2)             | 2 (2,4)            |                       |
| <i>KRAS</i> Wildtyp                | 129                     | 36 (43,9)           | 44 (53,7)           | 49 (59,8)          |                       |
| <i>NRAS</i> Mutation               | 8                       | 2 (2,4)             | 4 (4,9)             | 2 (2,4)            | 0,60                  |
| Exon 2                             | 5                       | 1 (1,2)             | 2 (2,4)*            | 2 (2,4)            |                       |
| Exon 3                             | 3                       | 1 (1,2)             | 2 (2,4)             | -                  |                       |
| Exon 4                             | -                       | -                   | -                   | -                  |                       |
| <i>NRAS</i> Wildtyp                | 238                     | 80 (97,6)           | 78 (95,1)           | 80 (97,6)          |                       |
| <i>BRAF</i> Mutation               | 9                       | 4 (4,9)             | 1 (1,2)             | 4 (4,9)            | 0,35                  |
| V600E                              | 8                       | 4 (4,9)             | 1 (1,2)             | 3 (3,7)            |                       |
| K601E                              | 1                       | -                   | -                   | 1 (1,2)            |                       |
| <i>BRAF</i> Wildtyp                | 237                     | 78 (95,1)           | 81 (98,8)           | 78 (95,1)          |                       |
| <b>Stammzellmarker</b>             |                         |                     |                     |                    |                       |
| CD133 hoch                         | 57                      | 20 (24,4)           | 25 (30,5)           | 12 (14,6)          | 0,05                  |
| CD133 niedrig                      | 189                     | 62 (75,6)           | 57 (69,5)           | 70 (85,4)          |                       |
| <b>Wnt-Signalweg</b>               |                         |                     |                     |                    |                       |
| $\beta$ -Catenin hoch              | 109                     | 41 (50,0)           | 33 (40,2)           | 35 (42,7)          | 0,43                  |
| $\beta$ -Catenin niedrig           | 137                     | 41 (50,0)           | 49 (59,8)           | 47 (57,3)          |                       |
| <b>p53-Signalweg</b>               |                         |                     |                     |                    |                       |
| p53 reguliert                      | 80                      | 28 (34,2)           | 24 (29,3)           | 28 (34,2)          | 0,74                  |
| p53 dereguliert                    | 166                     | 54 (65,8)           | 58 (70,7)           | 54 (65,8)          |                       |
| <b>Mikrosatelliteninstabilität</b> |                         |                     |                     |                    |                       |
| MSS                                | 239                     | 81 (98,8)           | 80 (97,6)           | 78 (95,1)          | 0,36                  |
| MSI                                | 7                       | 1 (1,2)             | 2 (2,4)             | 4 (4,9)            |                       |

Tabelle 12: Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und nach ihrer immunhistochemischen Ausprägung von CD133,  $\beta$ -Catenin und p53 sowie nach der Mikrosatelliteninstabilität. Für jede Kategorie sind die absolute Anzahl der Patienten und in den Klammern der prozentuale Anteil angegeben. \*Ein Fall wies gleichzeitig eine Mutation in *KRAS* Exon 3 und *NRAS* Exon 2 auf. **Legende:** PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen; MSS=mikrosatellitenstabil; MSI=mikrosatelliteninstabil. (Michl et al. 2021)

Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg waren in der PUL-Gruppe bei 52 Fällen (63,4%), in der HEP-Gruppe bei 42 Fällen (51,2%) und in der M0-Gruppe bei 39 Fällen (47,6%) nachweisbar (globales  $p=0,10$ ). Diese Mutationen waren somit in der Gruppe der Lungenmetastasen am häufigsten vertreten. Der Großteil der MAP-Kinase-Mutationen waren RAS-Mutationen und hierbei waren es überwiegend Mutationen in *KRAS* Exon 2. Dies verhielt sich auch in allen drei Gruppen ähnlich. Ein Fall in der Gruppe der Lebermetastasen wies gleichzeitig eine Mutation in *KRAS* Exon 3 und *NRAS* Exon 2 auf. Mutationen in *NRAS* waren seltener als in *KRAS* und es zeigte sich in der globalen Testung auch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Auch *BRAF*-Mutationen waren weniger häufig vorhanden und die Gruppen unterschieden sich hierbei auch nicht signifikant (PUL=4 [4,9%]; HEP=1 [1,2%]; M0=4 [4,9%]; globales  $p=0,35$ ). Die Mehrheit der *BRAF*-Mutationen waren V600E-Mutationen. Nur ein Fall in der M0-Gruppe wies eine K601E-Mutation (c.1801A>G) auf.

Für den Stammzellmarker CD133 zeigte sich eine hohe immunhistochemische Expression am häufigsten in der Gruppe der Lebermetastasen (N=25 [30,5%]), jedoch war dies in der globalen Testung knapp nicht statistisch signifikant (PUL=20 [24,4%]; M0=12 [14,6%]; globales  $p=0,053$ ). In der Expression von  $\beta$ -Catenin fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (globales  $p=0,43$ ) und auch die p53-Expression war in allen drei Gruppen fast identisch ausgeprägt (globales  $p=0,74$ ).

Die Testung der Fälle auf Mikrosatelliteninstabilität erfolgte durch den Nachweis eines Mismatch-Reparatur-Defektes auf Basis der immunhistochemischen Ausprägung von MLH1 bzw. MSH2. Jedoch wies keiner der Fälle einen kompletten Verlust von MSH2 auf, sodass bei diesem Kollektiv lediglich die Expression von MLH1 eine Rolle spielte. Hierbei fand sich aber nur bei einem geringen Anteil der Fälle ein MLH1-Verlust und dadurch ein Mismatch-Reparatur-Defekt (PUL=1 [1,2%]; HEP=2 [2,4%]; M0=4 [4,9%]). Der Unterschied zwischen den Gruppen war auch nicht statistisch signifikant (globales  $p=0,36$ ).

Neben der globalen Testung aller drei Gruppen wurden die einzelnen Gruppen auch direkt miteinander verglichen. Die  $p$ -Werte dieser direkten Vergleiche sind in Tabelle 13 (siehe S. 70) zusammengefasst:

|   | M1 ↔ M0     | PUL ↔ M0    | HEP ↔ M0    | PUL ↔ HEP   |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Einzelne Biomarker</b>                             |             |             |             |             |
| MAP-Kinase-Status                                     | 0,15        | <b>0,04</b> | 0,64        | 0,11        |
| CD133-Expression                                      | <b>0,03</b> | 0,12        | <b>0,02</b> | 0,38        |
| β-Catenin-Expression                                  | 0,72        | 0,35        | 0,75        | 0,21        |
| MSI-Status  | 0,18        | 0,17        | 0,41        | 0,56        |
| p53-Expression  | 0,70        | 1,00        | 0,50        | 0,50        |
| <b>Markerkombinationen</b>                            |             |             |             |             |
| MAP-Kinase-Status<br><b>PLUS</b> β-Catenin-Expression | 0,50        | 0,09        | 0,52        | <b>0,02</b> |
| MAP-Kinase-Status<br><b>PLUS</b> CD133-Expression     | <b>0,01</b> | <b>0,02</b> | <b>0,01</b> | 0,69        |
| β-Catenin-Expression<br><b>PLUS</b> CD133-Expression  | 0,67        | 0,80        | 0,62        | 0,81        |

Tabelle 13: Direkter Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A untereinander nach dem Auftreten der einzelnen Biomarker bzw. der Markerkombinationen. Alle angegebenen Werte sind *p*-Werte und signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Die Alterationen sind für den MAP-Kinase-Status durch den Nachweis einer Mutation, für CD133 und β-Catenin durch eine hohe immunhistochemische Expression, für p53 durch eine deregulierte Expression und für den MSI-Status durch den immunhistochemischen Verlust von MLH1 oder MSH2 definiert. Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen; M1=PUL und HEP zusammengefasst; MSI=Mikrosatelliteninstabilität. (Michl et al. 2021)

Beim direkten Vergleich der PUL-Gruppe mit der M0-Gruppe fanden sich statistisch signifikant mehr Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg ( $p=0,04$ ). Eine hohe Expression von CD133 hingegen war in der Gruppe der Lebermetastasen und in der M1-Gruppe häufiger nachzuweisen verglichen mit der Kontrollgruppe (HEP vs. M0:  $p=0,02$ ; M1 vs. M0:  $p=0,03$ ). Die M1-Gruppe entspricht einer Vereinigung der PUL- und der HEP-Gruppe. Bei allen anderen direkten Vergleichen der einzelnen Biomarker zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Michl et al. 2021).

### **3.3 RNA-Expressionsanalyse**

Für das Kollektiv B wurde die RNA-Expression für die Gene *EMILIN3*, *SV2B*, *MTA1*, *TMPRSS6*, *SMC3*, *ACVR1C* und *NFAT5* analysiert. Die Ergebnisse der qPCR sind in Tabelle 14 zusammengestellt und zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 8 (siehe S. 72) dargestellt:

| <b>Total<br/>N=45</b>                        | <b>BRA<br/>N=15</b>   | <b>HEP<br/>N=15</b>  | <b>M0<br/>N=15</b>   | <b>Globales<br/>P</b> |
|--|---|--|--|-----------------------|
| <b>Relativer Anteil zu den Referenzgenen</b> |   |  |  |                       |
| <i>NFAT5</i>                                 | 5,33x10 <sup>-2</sup><br>(2,76x10 <sup>-2</sup> ;<br>10,03x10 <sup>-2</sup> ) | 3,00x10 <sup>-2</sup><br>(1,32x10 <sup>-2</sup> ;<br>4,18x10 <sup>-2</sup> ) | 1,78x10 <sup>-2</sup><br>(1,26x10 <sup>-2</sup> ;<br>6,36x10 <sup>-2</sup> ) | <b>0,02</b>           |
| <i>ACVR1C</i>                                | 3,35x10 <sup>-3</sup><br>(0,17x10 <sup>-3</sup> ;<br>13,74x10 <sup>-3</sup> ) | 0,80x10 <sup>-3</sup><br>(0; 1,98x10 <sup>-3</sup> )                         | 0,67x10 <sup>-3</sup><br>(0; 4,72x10 <sup>-3</sup> )                         | 0,15                  |
| <i>SMC3</i>                                  | 8,36x10 <sup>-2</sup><br>(4,97x10 <sup>-2</sup> ;<br>21,85x10 <sup>-2</sup> ) | 6,70x10 <sup>-2</sup><br>(4,32x10 <sup>-2</sup> ;<br>9,73x10 <sup>-2</sup> ) | 7,02x10 <sup>-2</sup><br>(4,99x10 <sup>-2</sup> ;<br>9,63x10 <sup>-2</sup> ) | 0,38                  |
| <i>TMPRSS6</i>                               | 0 (0; 0)  | 0 (0; 5,60x10 <sup>-3</sup> )  | 0 (0; 0)   | 0,07                  |
| <b><i>NFAT5</i>-Expression</b>               |   |  |  |                       |
| schwach                                      | 0 (0,0)   | 6 (40,0)   | 8 (53,3)   | <b>0,01</b>           |
| stark  | 15 (100,0)  | 9 (60,0)   | 7 (46,7)   |                       |
| <b><i>ACVR1C</i>-Expression</b>              |   |  |  |                       |
| schwach                                      | 8 (53,3)  | 13 (86,7)  | 13 (86,7)  | <b>0,049</b>          |
| stark  | 7 (46,7)  | 2 (13,3)   | 2 (13,3)   |                       |
| <b><i>SMC3</i>-Expression</b>                |   |  |  |                       |
| schwach                                      | 9 (60,0)  | 14 (93,3)  | 14 (93,3)  | <b>0,02</b>           |
| stark  | 6 (40,0)  | 1 (6,7)  | 1 (6,7)  |                       |
| <b><i>TMPRSS6</i>-Expression</b>             |   |  |  |                       |
| schwach                                      | 13 (86,7)   | 8 (53,3)   | 13 (86,7)  | <b>0,049</b>          |
| stark  | 2 (13,3)  | 7 (46,7)   | 2 (13,3)   |                       |

Tabelle 14: Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach ihrer RNA-Expression von *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und *TMPRSS6*. Angegeben ist der Median der relativen Anteile der RNA-Menge der jeweiligen Gene zu der RNA-Menge der Referenzgene mit dem 95%-Konfidenzintervall und die Häufigkeiten der starken bzw. schwachen Ausprägungen der Gene als absolute Anzahl der Fälle mit dem prozentualen Anteil in Klammern. Für *NFAT5* ist eine starke Expression durch einen relativen Anteil zu den Referenzgenen von  $\geq 1,87 \times 10^{-2}$ , für *ACVR1C* durch einen relativen Anteil von  $\geq 6,60 \times 10^{-3}$ , für *SMC3* durch einen relativen Anteil von  $\geq 13,73 \times 10^{-2}$  und für *TMPRSS6* durch einen relativen Anteil  $\geq 3,64 \times 10^{-4}$  definiert. Signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

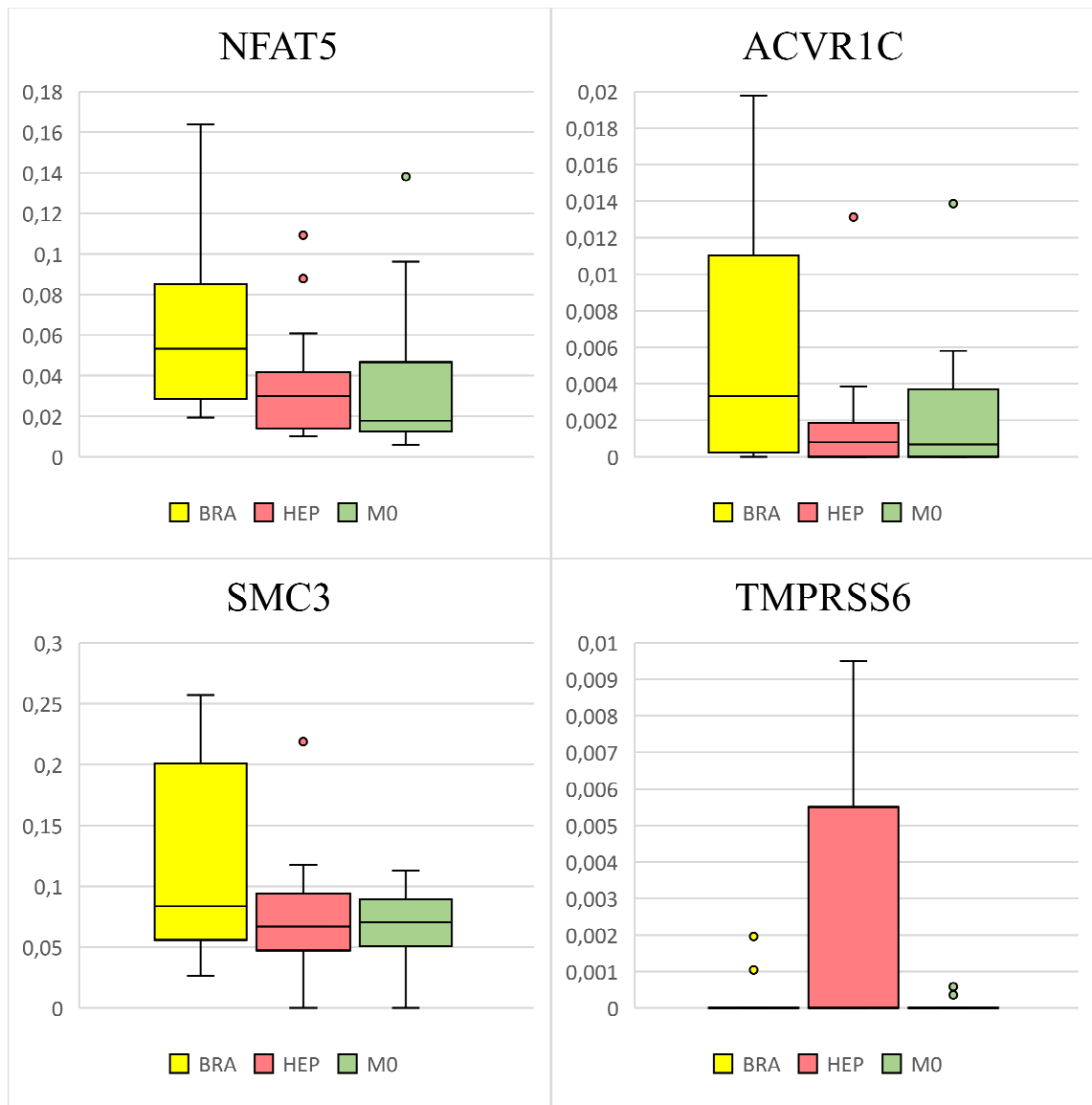


Abbildung 8: Box-Plots zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach dem relativen Anteil der RNA-Menge von *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und *TMPRSS6* zu der RNA-Menge der Referenzgene. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

Für den Vergleich der RNA-Expression wurde für jeden Fall der relative Anteil der RNA-Menge des zu untersuchenden Gens zu der RNA-Menge der Referenzgene bestimmt und der Median dieser relativen Anteile in den einzelnen Gruppen berechnet. Für *NFAT5* war der Median in der Gruppe der ZNS-Metastasen um das Dreifache höher als in der Kontrollgruppe, hingegen war in der Gruppe der Lebermetastasen der Median um das 1,7-fache höher als in der M0-Gruppe (BRA= $5,33 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $2,76 \times 10^{-2}$ - $10,03 \times 10^{-2}$ ]; HEP= $3,00 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1,32 \times 10^{-2}$ - $4,18 \times 10^{-2}$ ]; M0= $1,78 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $1,26 \times 10^{-2}$ - $6,36 \times 10^{-2}$ ]). Dieser Unterschied war in der globalen Testung auch statistisch signifikant (globales  $p=0,02$ ). Für *NFAT5* entsprachen die Fälle, deren relativer Anteil von *NFAT5* zu



den Referenzgenen über dem Grenzwert von  $\geq 1,87 \times 10^{-2}$  lagen, einer starken Expression. Jeder Fall in der BRA-Gruppe wies diese starke Expression auf und dies war beim Vergleich der Häufigkeit der starken Expression in der globalen Testung auch signifikant (BRA=15 [100,0%]; HEP=9 [60,0%]; M0=7 [46,7%]; globales  $p=0,01$ ).

Bei der Analyse von *ACVR1C* ergab sich in der BRA-Gruppe ein Median, der um das Fünffache höher lag als der Median der Kontrollgruppe. Die Gruppe der Lebermetastasen wies hingegen mit einem 1,2-fachen höheren Median als die M0-Gruppe eine leicht höhere RNA-Expression von *ACVR1C* auf. Trotzdem waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant (BRA= $3,35 \times 10^{-3}$  [95%CI:  $0,17 \times 10^{-3}$ - $13,74 \times 10^{-3}$ ]; HEP= $0,80 \times 10^{-3}$  [95%CI:  $0-1,98 \times 10^{-3}$ ]; M0= $0,67 \times 10^{-3}$  [95%CI:  $0-4,72 \times 10^{-3}$ ]; globales  $p=0,15$ ). Im Falle von *ACVR1C* wurden die Fälle als „stark exprimiert“ definiert, wenn der relative Anteil von *ACVR1C* zu den Referenzgenen über dem Grenzwert von  $\geq 6,60 \times 10^{-3}$  lag. Diese starke Expression war in der globalen Testung signifikant häufiger in der Gruppe der ZNS-Metastasen als in der HEP- und der M0-Gruppe (BRA=7 [46,7%]; HEP=2 [13,3%]; M0=2 [13,3%]; globales  $p=0,049$ ).

Auch bei der Expression von *SMC3* fand sich ein um das 1,2-fache höherer Median in der Gruppe der ZNS-Metastasen als in der Kontrollgruppe (BRA= $8,36 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $4,97 \times 10^{-2}$ - $21,85 \times 10^{-2}$ ]; M0= $7,02 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $4,99 \times 10^{-2}$ - $9,63 \times 10^{-2}$ ]). Im Vergleich dazu war der Median in der HEP-Gruppe niedriger als der Median in der M0-Gruppe (HEP= $6,70 \times 10^{-2}$  [95%CI:  $4,32 \times 10^{-2}$ - $9,73 \times 10^{-2}$ ])). Hierbei zeigte sich aber keine statistische Signifikanz beim globalen Vergleich der Gruppen miteinander (globales  $p=0,38$ ). Wenn ein Fall einen relativen Anteil von *SMC3* zu den Referenzgenen über dem Grenzwert von  $\geq 13,73 \times 10^{-2}$  aufwies, wurde dieser für *SMC3* als „stark exprimiert“ definiert. Diese Hochrisikogruppe mit einer sehr starken *SMC3*-Expression war häufiger in der BRA-Gruppe nachzuweisen (BRA=6 [40,0%]) und nur selten in der HEP- und M0-Gruppe (HEP=1 [6,7%]; M0=1 [6,7%]). Dieser Unterschied war auch statistisch signifikant (globales  $p=0,02$ ).

Die Analyse der Expression von *TMPRSS6* ergab in jeder Gruppe einen Median von „0“. Lediglich in der Gruppe der Lebermetastasen gab es einige Fälle, die ein Ergebnis über „0“ brachten. Dadurch lag die obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls in der HEP-Gruppe bei  $5,60 \times 10^{-3}$ , während in der BRA- und in der M0-Gruppe sowohl die untere als auch die obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls „0“ ergaben. Dieser Unterschied war knapp nicht signifikant. Als Hochrisikogruppe bzw. als starke Expression wurden beim *TMPRSS6* die Fälle bezeichnet, deren relativer Anteil von *TMPRSS6* zu den Referenzgenen über dem

Grenzwert von  $\geq 3,64 \times 10^{-4}$  lagen. Diese starke Expression von *TMPRSS6* fand sich häufiger in der HEP-Gruppe (HEP=7 [46,7%]) im Vergleich zur Gruppe der ZNS-Metastasen und der Kontrollgruppe (BRA=2 [13,3%]; M0=2 [13,3%]), was statistisch signifikant war (globales  $p=0,049$ ).

In der nachfolgenden Heat-Map der Abbildung 9 sind die Ergebnisse nochmal veranschaulicht:

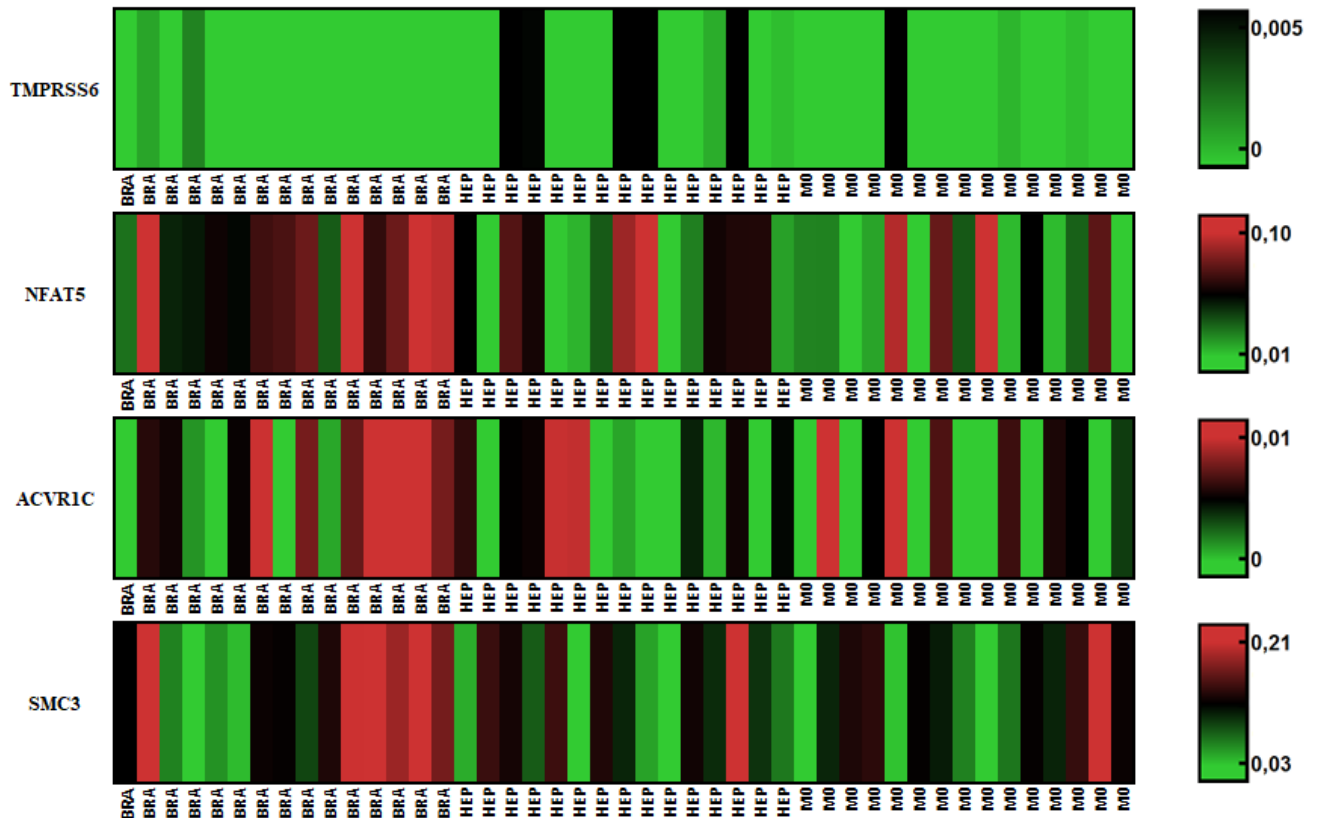


Abbildung 9: Heat-Map zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach dem relativen Anteil der RNA-Menge von *NFAT5*, *ACVR1C*, *SMC3* und *TMPRSS6* zu der RNA-Menge der Referenzgene. Die Farbe ist abhängig von der Höhe des relativen Anteils des entsprechenden Gens. Bei *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* verlaufen die Farben von „Rot“ über „Schwarz“ zu „Grün“, wobei zusätzlich die 90%-Quantile als oberer Wert und die 10%-Quantile als unterer Wert angegeben ist. Bei *TMPRSS6* verlaufen die Farben von „Schwarz“ zu „Grün“ und dabei gibt der untere Wert den Median und der obere Wert die 90%-Quantile an. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

RNA von *EMILIN3*, *SV2B* und *MTA1* war in keinem Fall des Kollektivs B nachweisbar, weshalb hier auch keine Expressionsanalyse durchgeführt werden konnte.

Zusätzlich zu dem globalen Vergleich der Gruppen wurden die Gruppen auch einzeln miteinander verglichen. Die entsprechenden  $p$ -Werte für diese Vergleiche sind in der nachfolgenden Tabelle 15 (siehe S. 75) zusammengestellt worden:

|  | BRA ↔ M0     | HEP ↔ M0     | BRA ↔ HEP    |
|--|--------------|--------------|--------------|
| <b>Relativer Anteil zu den Referenzgenen</b>   |              |              |              |
| <i>NFAT5</i>   | <b>0,01</b>  | 0,47         | <b>0,04</b>  |
| <i>ACVR1C</i>  | 0,10         | 0,93         | 0,09         |
| <i>SMC3</i>  | 0,24         | 0,90         | 0,22         |
| <i>TMPRSS6</i>   | 0,68         | 0,11         | <b>0,04</b>  |
| <b>Hochrisikogruppen</b>   |              |              |              |
| <i>NFAT5</i> -Hochrisikogruppe   | <b>0,001</b> | 0,46         | <b>0,01</b>  |
| <i>ACVR1C</i> -Hochrisikogruppe  | <b>0,046</b> | 1,00         | <b>0,046</b> |
| <i>SMC3</i> -Hochrisikogruppe  | <b>0,03</b>  | 1,00         | <b>0,03</b>  |
| <i>TMPRSS6</i> -Hochrisikogruppe   | 1,00         | <b>0,046</b> | <b>0,046</b> |
| <b>Markerkombinationen</b>   |              |              |              |
| <i>NFAT5</i> -Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>ACVR1C</i> -Hochrisikogruppe   | <b>0,01</b>  | 0,31         | <b>0,003</b> |
| <i>NFAT5</i> -Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -Hochrisikogruppe   | <b>0,03</b>  | 1,00         | <b>0,03</b>  |
| <i>ACVR1C</i> -Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -Hochrisikogruppe  | <b>0,01</b>  | 1,00         | <b>0,01</b>  |
| <i>NFAT5</i> -Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>ACVR1C</i> -Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -Hochrisikogruppe | <b>0,01</b>  | 1,00         | <b>0,01</b>  |

Tabelle 15: Direkter Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B untereinander nach dem relativen Anteil der RNA-Menge des entsprechenden Gens zu der RNA-Menge der Referenzgene, nach der Verteilung der Hochrisikogruppen und nach den Markerkombinationen. Alle angegebenen Werte sind *p*-Werte und signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Für *NFAT5* ist die Hochrisikogruppe durch einen relativen Anteil der RNA-Menge zu der RNA-Menge der Referenzgene von  $\geq 1,87 \times 10^{-2}$ , für *ACVR1C* durch einen relativen Anteil von  $\geq 6,60 \times 10^{-3}$ , für *SMC3* durch einen relativen Anteil von  $\geq 13,73 \times 10^{-2}$  und für *TMPRSS6* durch einen relativen Anteil  $\geq 3,64 \times 10^{-4}$  definiert. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

Hierbei hat sich gezeigt, dass beim direkten Vergleich der relativen Anteile von *NFAT5* zu den Referenzgenen *NFAT5* statistisch signifikant stärker exprimiert wird in der Gruppe der ZNS-Metastasen sowohl im Vergleich mit der HEP- als auch mit der M0-Gruppe (BRA vs. M0:  $p=0,01$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,04$ ). Der Vergleich der *NFAT5*-Expression zwischen der Gruppe der Lebermetastasen und der Kontrollgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied. Zusätzlich gehörten statistisch signifikant mehr Fälle der BRA-Gruppe zur *NFAT5*-Hochrisikogruppe als Fälle der HEP- ( $p=0,01$ ) oder der M0-Gruppe ( $p=0,001$ ). Der direkte Vergleich der relativen Anteile von *ACVR1C* und *SMC3* zu den Referenzgenen zwischen den einzelnen Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede. Jedoch wiesen signifikant mehr Fälle aus der BRA-Gruppe eine sehr starke *ACVR1C*-Expression auf bzw.

gehörten mehr Fälle der *ACVR1C*-Hochrisikogruppe an als der HEP- oder der M0-Gruppe (BRA vs. M0:  $p=0,046$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,046$ ). Ebenfalls fanden sich in der Gruppe der ZNS-Metastasen mehr Fälle mit einer hohen *SMC3*-Expression als in der Gruppe der Lebermetastasen ( $p=0,03$ ) oder der Kontrollgruppe ( $p=0,03$ ), was auch statistisch signifikant war.

Der relative Anteil von *TMPRSS6* zu den Referenzgenen war statistisch signifikant höher in der HEP-Gruppe im direkten Vergleich mit der BRA-Gruppe (HEP vs. BRA:  $p=0,04$ ). Zudem war die *TMPRSS6*-Hochrisikogruppe signifikant häufiger in der Gruppe der Lebermetastasen vertreten als im direkten Vergleich mit der Gruppe der ZNS-Metastasen und der Kontrollgruppe (HEP vs. BRA:  $p=0,046$ ; HEP vs. M0:  $p=0,046$ ).

### **3.4 Markerkombinationen**

#### Kollektiv A:

Zusätzlich zu der Untersuchung der einzelnen Biomarker wurden auch die Kombinationen der Marker zueinander betrachtet. Die Ergebnisse der Markerkombinationen aus dem Kollektiv A sind in Tabelle 16 dargestellt:

| <b>Gesamt<br/>N=246</b>  | <b>PUL<br/>N=82</b> |           | <b>HEP<br/>N=82</b> |           | <b>M0<br/>N=82</b> |           | <b>Globales<br/>P</b> |
|--|---------------------|-----------|---------------------|-----------|--------------------|-----------|-----------------------|
|  | positiv             | negativ   | positiv             | negativ   | positiv            | negativ   |                       |
| <b>MAP-Kinase-<br/>Status<br/>PLUS<br/>β-Catenin-<br/>Expression</b> | 23 (28,0)           | 59 (72,0) | 11 (13,4)           | 71 (86,6) | 14 (17,1)          | 68 (82,9) | <b>0,048</b>          |
| <b>MAP-Kinase-<br/>Status<br/>PLUS<br/>CD133-<br/>Expression</b>     | 15 (18,3)           | 67 (81,7) | 17 (20,7)           | 65 (79,3) | 5 (6,1)            | 77 (93,9) | <b>0,02</b>           |
| <b>β-Catenin-<br/>Expression<br/>PLUS<br/>CD133-<br/>Expression</b>  | 9 (11,0)            | 73 (89,0) | 10 (12,2)           | 72 (87,8) | 8 (9,8)            | 74 (90,2) | 0,88                  |

Tabelle 16: Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Markerkombinationen. Für jede Kategorie sind die absolute Anzahl der Patienten und in den Klammern der prozentuale Anteil angegeben. Signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Als „positiv“ werden die Kombinationen gesehen, bei denen beide Biomarker gleichzeitig positiv sind (Positiv ist der MAP-Kinase-Status beim Vorhandensein einer Mutation und β-Catenin und CD133 bei einer hohen Expression). Als „negativ“ werden die Kombinationen angesehen, bei denen einer oder beide Biomarker negativ sind (Negativ ist der MAP-Kinase-Status beim Nachweis des Wildtyps und β-Catenin und CD133 bei einer niedrigen Expression). Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen. (Michl et al. 2021)

Die Markerkombinationen wurden so definiert, dass diese beim Vorhandensein beider Biomarker als „positiv“ angesehen wurden und beim Fehlen eines oder beider Biomarker als „negativ“. Bei den Biomarkern, die bei den Kombinationen betrachtet wurden, handelte es sich um Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und um eine hohe Expression von β-Catenin und CD133. Die Expression von p53 wurde bei der Analyse der Markerkombinationen nicht weiter untersucht, da dessen Verteilung auf alle drei Gruppen annähernd identisch war. Bei der Expression von MLH1 bzw. MSH2 war die Anzahl der Fälle mit einem kompletten Verlust so gering, dass diese keine Relevanz auf die Verteilung der Kombinationen hatte und deshalb ebenfalls nicht bei der Analyse betrachtet wurde.

Bei der Kombination von MAP-Kinase-Mutationen und hoher  $\beta$ -Catenin-Expression zeigte sich, dass diese häufiger in der Gruppe der Lungenmetastasen nachweisbar war (PUL=23 [28,0%]) im Vergleich zur Gruppe der Lebermetastasen (HEP=11 [13,4%]) und der Kontrollgruppe (M0=14 [17,1%]), was in der globalen Testung auch statistisch signifikant war (globales  $p=0,048$ ). Gleichzeitig war die Kombination von MAP-Kinase-Mutation und hoher CD133-Expression statistisch signifikant öfter in der Gruppe der Lungenmetastasen (PUL=15 [18,3%]) und in der Gruppe der Lebermetastasen (HEP=17 [20,7%]) vorhanden als in der M0-Gruppe (M0=5 [6,1%]; globales  $p=0,02$ ). Für das gleichzeitige Vorhandensein einer hohen  $\beta$ -Catenin- und einer hohen CD133-Expression fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Zur besseren Veranschaulichung der Häufigkeit der einzelnen Biomarker und Markerkombinationen in den Gruppen dienen die nachfolgenden Venn-Diagramme in Abbildung 10 (siehe S. 79):

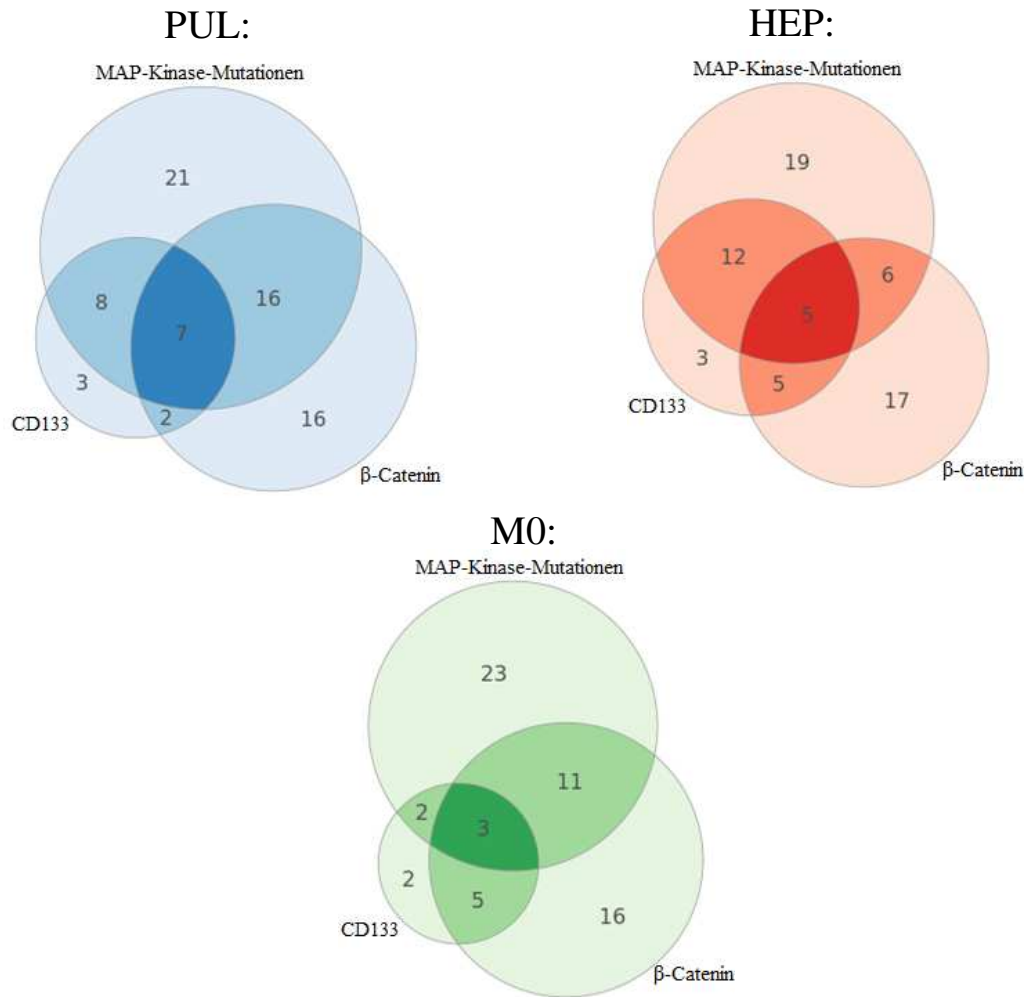


Abbildung 10: Venn-Diagramme zum Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs A nach der Häufigkeit der aufgetretenen Biomarker und Markerkombinationen. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der Fälle, bei denen der jeweilige Biomarker aufgetreten ist bzw. bei denen zwei oder alle drei Marker gleichzeitig vorhanden waren. Die Alterationen sind für den MAP-Kinase-Status durch den Nachweis einer Mutation und für CD133 und β-Catenin durch eine hohe immunhistochemische Expression definiert. Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen. (Michl et al. 2021)

Die  $p$ -Werte der direkten Vergleiche der Gruppen untereinander hinsichtlich der Häufigkeit der Markerkombinationen finden sich in Tabelle 13 (siehe S. 70). Hier wies die Gruppe der Lungenmetastasen statistisch signifikant häufiger eine Kombination aus MAP-Kinase-Mutation und hoher β-Catenin-Expression auf als im direkten Vergleich mit der Gruppe der Lebermetastasen ( $p=0,02$ ). Die Kombination aus MAP-Kinase-Mutation und hoher CD133-Expression war häufiger in der PUL-, HEP- und M1-Gruppe nachweisbar im Vergleich mit der M0-Gruppe (PUL vs. M0:  $p=0,02$ ; HEP vs. M0:  $p=0,01$ ; M1 vs. M0:  $p=0,01$ ). Alle weiteren Kombinationen der Biomarker zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Michl et al. 2021).

Kollektiv B:

Die Markerkombinationen des Kollektivs B sind in der nachfolgenden Tabelle 17 zusammengestellt:

| Marker-kombinationen   | BRA<br>N=15 |           | HEP<br>N=15 |            | M0<br>N=15 |            | Globales<br><i>P</i> |
|--|-------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|----------------------|
|  | positiv     | negativ   | positiv     | negativ    | positiv    | negativ    |                      |
| <i>NFAT5</i> -<br>Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>ACVR1C</i> -<br>Hochrisikogruppe   | 7 (46,7)    | 8 (53,3)  | 0 (0,0)     | 15 (100,0) | 1 (6,7)    | 14 (93,3)  | <b>0,001</b>         |
| <i>NFAT5</i> -<br>Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -<br>Hochrisikogruppe   | 6 (40,0)    | 9 (60,0)  | 1 (6,7)     | 14 (93,3)  | 1 (6,7)    | 14 (93,3)  | <b>0,02</b>          |
| <i>ACVR1C</i> -<br>Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -<br>Hochrisikogruppe  | 5 (33,3)    | 10 (66,7) | 0 (0,0)     | 15 (100,0) | 0 (0,0)    | 15 (100,0) | <b>0,004</b>         |
| <i>NFAT5</i> -<br>Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>ACVR1C</i> -<br>Hochrisikogruppe<br><b>PLUS</b><br><i>SMC3</i> -<br>Hochrisikogruppe | 5 (33,3)    | 10 (66,7) | 0 (0,0)     | 15 (100,0) | 0 (0,0)    | 15 (100,0) | <b>0,004</b>         |

Tabelle 17: Vergleich der drei Gruppen des Kollektivs B nach der Häufigkeit der aufgetretenen Markerkombinationen. Für jede Kategorie sind die absolute Anzahl der Patienten und in den Klammern der prozentuale Anteil angegeben. Signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Als „positiv“ werden die Kombinationen gesehen, wenn der jeweilige Fall bei den Zweierkombinationen zu beiden bzw. bei der Dreierkombination zu allen drei Hochrisikogruppen gleichzeitig gehört. Für *NFAT5* ist die Hochrisikogruppe durch einen relativen Anteil der RNA-Menge zu der RNA-Menge der Referenzgene von  $\geq 1,87 \times 10^{-2}$ , für *ACVR1C* durch einen relativen Anteil von  $\geq 6,60 \times 10^{-3}$  und für *SMC3* durch einen relativen Anteil von  $\geq 13,73 \times 10^{-2}$  definiert. Als „negativ“ werden die Kombinationen angesehen, wenn der jeweilige Fall bei den Zweierkombinationen nur zu einer oder zu keiner Hochrisikogruppe gehört bzw. bei der Dreierkombination nur zu zwei, zu einer oder zu keiner Hochrisikogruppe gehört. Legende: BRA=Patienten mit ZNS-Metastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen.

Für die Analyse der Verteilung der Markerkombinationen wurde das gleichzeitige Vorhandensein der Hochrisikogruppen von *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3*, die durch eine starke RNA-Expression des jeweiligen Gens charakterisiert waren, betrachtet. Die Markerkombinationen wurden als „positiv“ definiert, wenn im Falle der Zweierkombinationen beide Hochrisikogruppen bzw. im Falle der Dreierkombination alle drei Hochrisikogruppen gleichzeitig vorhanden waren. Bei den Zweierkombinationen



wurden die Fälle als „negativ“ bezeichnet, die entweder nur zu einer oder zu keiner Hochrisikogruppe gehörten, und die Dreierkombination war „negativ“, wenn für den jeweiligen Fall nur zwei, eine oder keine Hochrisikogruppe nachweisbar war. Es wurden nur Kombinationen von *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* betrachtet, da diese Marker bereits einzeln stärker in der Gruppe der ZNS-Metastasen aufgetreten sind, während *TMPRSS6* als einziges Gen in der Gruppe der Lebermetastasen verstärkt exprimiert wurde.

Für die Kombination aus starker *NFAT5*-Expression und starker *ACVR1C*-Expression fand sich in der globalen Testung ein statistisch signifikant häufigeres Auftreten in der Gruppe der ZNS-Metastasen als in der Gruppe der Lebermetastasen und der Kontrollgruppe (BRA=7 [46,7%]; HEP=0 [0,0%]; M0=1 [6,7%]; globales  $p=0,001$ ). Auch die Kombination aus der *NFAT5*- und *SMC3*-Hochrisikogruppe war häufiger in der BRA-Gruppe (BRA=6 [40,0%]) als in der HEP- oder M0-Gruppe (HEP=1 [6,7%]; M0=1 [6,7%]). Dabei ergab die globale Testung auch eine statistische Signifikanz (globales  $p=0,02$ ). Die Kombination aus starker *ACVR1C*- und *SMC3*-Expression trat ausschließlich in der Gruppe der ZNS-Metastasen (BRA=5 [33,3%]) auf. Dies war in der globalen Testung auch statistisch signifikant (globales  $p=0,004$ ). Die Dreierkombination aus der *NFAT5*-, *ACVR1C*- und *SMC3*-Hochrisikogruppe fand sich ebenfalls ausschließlich in der BRA-Gruppe (BRA=5 [33,3%]), während in den anderen beiden Gruppen diese Kombination nicht nachweisbar war. Dieser Unterschied war auch statistisch signifikant (globales  $p=0,004$ ).

Die  $p$ -Werte der direkten Vergleiche der Gruppen untereinander nach der Häufigkeit der Markerkombinationen im Kollektiv B finden sich in Tabelle 15 (siehe S. 75). Hierbei hat sich gezeigt, dass die Kombination aus starker *NFAT5*- und *ACVR1C*-Expression signifikant häufiger in der Gruppe der ZNS-Metastasen war als im direkten Vergleich mit der Gruppe der Lebermetastasen und auch mit der Kontrollgruppe (BRA vs. M0:  $p=0,01$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,003$ ). Beim direkten Vergleich zwischen der HEP- und der M0-Gruppe fand sich hingegen kein Unterschied bei dieser Kombination (HEP vs. M0:  $p=0,31$ ). Diese Verteilung hat sich ebenfalls bei der Kombination der *NFAT5*- und *SMC3*-Hochrisikogruppe ergeben (BRA vs. M0:  $p=0,03$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,03$ ; HEP vs. M0:  $p=1,00$ ), bei der Kombination der *ACVR1C*- und *SMC3*-Hochrisikogruppe (BRA vs. M0:  $p=0,01$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,01$ ; HEP vs. M0:  $p=1,00$ ) und bei der Dreierkombination aus *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* (BRA vs. M0:  $p=0,01$ ; BRA vs. HEP:  $p=0,01$ ; HEP vs. M0:  $p=1,00$ ).

### 3.5 Multivariate Analyse

Für das Kollektiv A wurde als multivariate Analyse eine binär logistische Regression durchgeführt und die Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle 18 zusammengefasst:

|                        | <b>M0 → M1</b>                        | <b>M0 → PUL</b>                       | <b>M0 → HEP</b>                       | <b>PUL → HEP</b>               |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
|                        | <i>P</i>                              | <i>P</i>                              | <i>P</i>                              | <i>P</i>                       |
| <b>Biomarker</b>       | <b>Odds Ratio<br/>(95% CI)</b>        | <b>Odds Ratio<br/>(95% CI)</b>        | <b>Odds Ratio<br/>(95% CI)</b>        | <b>Odds Ratio<br/>(95% CI)</b> |
| Alter bei Erstdiagnose | <b>&lt;0,001</b><br>0,26 [0,14; 0,50] | <b>&lt;0,001</b><br>0,26 [0,13; 0,55] | <b>&lt;0,001</b><br>0,25 [0,12; 0,51] | 0,93<br>0,97 [0,51; 1,86]      |
| Lymphknotenstatus      | <b>0,01</b><br>2,33 [1,27; 4,27]      | <b>0,04</b><br>2,17 [1,05; 4,50]      | <b>0,01</b><br>2,66 [1,30; 5,44]      | 0,92<br>1,03 [0,53; 2,01]      |
| MAP-Kinase-Status      | 0,26<br>1,42 [0,77; 2,60]             | <b>0,046</b><br>2,07 [1,01; 4,24]     | 0,94<br>0,97 [0,47; 2,01]             | 0,09<br>0,55 [0,27; 1,09]      |
| MSI-Status             | 0,16<br>0,28 [0,05; 1,68]             | 0,25<br>0,23 [0,02; 2,84]             | 0,18<br>0,22 [0,03; 1,97]             | 0,74<br>1,55 [0,12; 19,88]     |
| p53 Status             | 0,91<br>1,04 [0,54; 1,99]             | 0,96<br>1,02 [0,48; 2,18]             | 0,88<br>1,06 [0,49; 2,31]             | 0,48<br>1,29 [0,64; 2,62]      |
| β-Catenin-Expression   | 0,53<br>1,22 [0,66; 2,25]             | 0,15<br>1,70 [0,82; 3,51]             | 0,78<br>0,90 [0,43; 1,87]             | 0,12<br>0,59 [0,30; 1,16]      |
| CD133-Expression       | 0,054<br>2,12 [0,99; 4,54]            | 0,23<br>1,74 [0,71; 4,26]             | <b>0,02</b><br>2,94 [1,22; 7,09]      | 0,30<br>1,48 [0,71; 3,07]      |

Tabelle 18: Multivariate Analyse der einzelnen Gruppen des Kollektivs A untereinander unter Berücksichtigung der Variablen Alter (<65 Jahren vs. ≥65 Jahren), Lymphknotenstatus (N0 vs. N+), MAP-Kinase-Status, MSI-Status, p53-Status, β-Catenin-Expression und CD133-Expression. Angegeben sind die Odds Ratios mit dem 95%-Konfidenzintervall in den Klammern und dem entsprechenden *p*-Wert. Signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Die Alterationen sind für den MAP-Kinase-Status durch den Nachweis einer Mutation, für den MSI-Status durch den immunhistochemischen Verlust von MLH1 oder MSH2, für CD133 und β-Catenin durch eine hohe immunhistochemische Expression und für p53 durch ein dereguliertes immunhistochemisches Muster definiert. **Legende:** PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; M0=Patienten ohne Metastasen; M1=PUL und HEP zusammengefasst; MSI=Mikrosatelliteninstabilität. (Michl et al. 2021)

Für das Alter hat die logistische Regression einen inversen Einfluss ergeben sowohl beim Vergleich der PUL- und HEP-Gruppe mit der Kontrollgruppe als auch beim Vergleich der M1- mit der M0-Gruppe. Bei einem Alter über 65 Jahren war mit einer Odds Ratio von 0,26 bzw. 0,25 die Chance niedriger in der PUL-, HEP- oder M1-Gruppe zu sein als in der M0-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Beim Vergleich der Gruppe der Lungenmetastasen zu der Gruppe der Lebermetastasen fand sich kein Einfluss des Alters.

Der Lymphknotenstatus wies in den Vergleichen zwischen der PUL-, HEP- bzw. M1-Gruppe zu der M0-Gruppe einen direkten Zusammenhang auf. Die Chance auf einen positiven Lymphknotenstatus war in der PUL-, HEP- oder M1-Gruppe statistisch signifikant um mehr als das Doppelte erhöht verglichen mit der Kontrollgruppe

(M0 → M1:  $p=0,01$ ; M0 → PUL:  $p=0,04$ ; M0 → HEP:  $p=0,01$ ). Es zeigte sich kein Unterschied beim Lymphknotenstatus im Vergleich der PUL- mit der HEP-Gruppe.

Die Chance auf das Vorhandensein einer MAP-Kinase-Mutation war in der Gruppe der Lungenmetastasen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit einer Odds Ratio von 2,07 statistisch signifikant erhöht ( $p=0,046$ ). Bei einer hohen CD133-Expression war die Chance in der HEP-Gruppe annähernd dreimal so hoch als in der Kontrollgruppe (Odds Ratio=2,94;  $p=0,02$ ). Beim Status der Mikrosatelliteninstabilität, bei der p53- und  $\beta$ -Catenin-Expression erbrachte die multivariate Analyse in keinem Vergleich statistisch signifikante Auswirkungen (Michl et al. 2021).

### **3.6 Überlebensdaten**

Das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) des Kollektivs A wurden unter Berücksichtigung der bisher relevanten Biomarker und Markerkombinationen analysiert. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle 19 (siehe S. 84) zusammengefasst und teilweise in den Kaplan-Meier-Kurven der Abbildung 11 (siehe S. 85) dargestellt. Eine Analyse des Gesamtüberlebens bzw. des progressionsfreien Überlebens des Kollektivs B war nicht möglich, da die Überlebensdaten dieser Patienten nicht vorhanden waren. Somit umfasste die Analyse der Überlebensdaten lediglich die Gruppen der Lungen- und der Lebermetastasen. Zudem wurde die Mikrosatelliteninstabilität aufgrund der zu geringen Anzahl der Fälle in der Betrachtung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens nicht berücksichtigt.

|   | <b>Gesamt<br/>N=164</b>            | <b>PUL<br/>N=82</b>  |                                     |                      | <b>HEP<br/>N=82</b>  |                                     |              | <b>Globales<br/>P<br/>Hazard<br/>Ratio</b> |
|---|------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------|--|
| OS  | N (PUL) = 53/82<br>N (HEP) = 56/82 | 65,7 [57,2; 74,2]    |                                     |                      | 37,1 [25,5; 48,6]    |                                     |              | 0,08<br>1,41 [0,96;<br>2,06]               |
| PFS   | N (PUL) = 77/82<br>N (HEP) = 77/82 | 23,9 [15,4; 32,5]    |                                     |                      | 16,1 [9,7; 22,6]     |                                     |              | <b>0,02</b><br>1,45 [1,06;<br>2,00]        |
| MAP-Kinase-Status                                 | Mutation                           | Wildtyp              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Mutation             | Wildtyp              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 51,5 [36,4;<br>66,6]               | 83,6 [75,0;<br>92,3] | <b>0,03</b><br>1,96 [1,07;<br>3,60] | 26,4 [19,1;<br>33,6] | 46,3 [20,3;<br>72,3] | <b>0,02</b><br>1,93 [1,13;<br>3,29] | <b>0,004</b> |  |
| PFS   | 19,0 [11,5;<br>26,6]               | 28,8 [15,1;<br>42,6] | <b>0,01</b><br>1,99 [1,18;<br>3,35] | 10,1 [5,8;<br>14,3]  | 19,1 [15,5;<br>22,6] | 0,07<br>1,53 [0,97;<br>2,42]        | <b>0,002</b> |  |
| CD133-Expression                                  | hoch                               | niedrig              | P<br>Hazard<br>Ratio                | hoch                 | niedrig              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 59,0 [38,7;<br>79,4]               | 67,4 [55,9;<br>78,9] | 0,25<br>1,42 [0,78;<br>2,61]        | 63,1 [30,3;<br>96,0] | 33,9 [23,7;<br>44,1] | 0,16<br>0,66 [0,37;<br>1,19]        | 0,08         |  |
| PFS   | 22,8 [15,0;<br>30,5]               | 26,4 [13,7;<br>39,1] | 0,20<br>1,42 [0,83;<br>2,43]        | 14,8 [4,5;<br>25,1]  | 19,1 [11,9;<br>26,2] | 0,78<br>0,93 [0,57;<br>1,53]        | 0,07         |  |
| β-Catenin-Expression                              | hoch                               | niedrig              | P<br>Hazard<br>Ratio                | hoch                 | niedrig              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 67,4 [54,8;<br>80,0]               | 60,0 [39,8;<br>80,1] | 0,38<br>0,79 [0,46;<br>1,35]        | 33,9 [14,5;<br>53,2] | 42,0 [29,4;<br>54,5] | 0,70<br>0,90 [0,52;<br>1,56]        | 0,28         |  |
| PFS   | 24,8 [13,7;<br>35,9]               | 23,9 [10,5;<br>37,4] | 0,83<br>0,95 [0,60;<br>1,52]        | 19,1 [14,4;<br>23,8] | 12,2 [7,0;<br>17,5]  | 0,24<br>0,76 [0,48;<br>1,20]        | 0,07         |  |
| p53-Expression                                    | dereguliert                        | reguliert            | P<br>Hazard<br>Ratio                | dereguliert          | reguliert            | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 67,3 [55,6;<br>79,0]               | 63,9 [36,1;<br>91,7] | 0,49<br>0,82 [0,46;<br>1,45]        | 37,1 [23,1;<br>51,0] | 44,1 [26,7;<br>61,5] | 0,61<br>1,16 [0,65;<br>2,07]        | 0,23         |  |
| PFS   | 26,4 [15,9;<br>36,9]               | 20,8 [9,6;<br>31,9]  | 0,18<br>0,72 [0,44;<br>1,17]        | 16,1 [10,2;<br>22,1] | 16,1 [3,7;<br>28,5]  | 0,96<br>1,01 [0,62;<br>1,66]        | 0,08         |  |
| MAP-Kinase-Status<br>PLUS<br>β-Catenin-Expression | positiv                            | negativ              | P<br>Hazard<br>Ratio                | positiv              | negativ              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 67,0 [39,4;<br>94,5]               | 63,9 [55,6;<br>72,3] | 0,91<br>0,97 [0,51;<br>1,82]        | 33,9 [14,8;<br>52,9] | 37,1 [25,0;<br>49,1] | 0,61<br>1,21 [0,57;<br>2,58]        | 0,31         |  |
| PFS   | 22,8 [14,0;<br>31,5]               | 26,4 [14,0;<br>38,8] | 0,07<br>1,63 [0,96;<br>2,79]        | 19,1 [11,2;<br>27,0] | 14,8 [8,3;<br>21,3]  | 0,83<br>0,93 [0,48;<br>1,82]        | 0,07         |  |
| MAP-Kinase-Status<br>PLUS<br>CD133-Expression     | positiv                            | negativ              | P<br>Hazard<br>Ratio                | positiv              | negativ              | P<br>Hazard<br>Ratio                | Globales P   |  |
| OS  | 48,1 [27,7;<br>68,5]               | 67,4 [55,6;<br>79,2] | <b>0,01</b><br>2,37 [1,20;<br>4,67] | 44,1 [24,6;<br>63,5] | 35,3 [23,7;<br>46,9] | 0,54<br>1,22 [0,65;<br>2,28]        | 0,05         |  |
| PFS   | 19,0 [16,3;<br>21,8]               | 28,5 [18,8;<br>38,2] | <b>0,04</b><br>1,86 [1,01;<br>3,43] | 9,8 [8,1;<br>11,6]   | 18,1 [13,0;<br>23,2] | 0,24<br>1,38 [0,80;<br>2,38]        | <b>0,03</b>  |  |

| $\beta$ -Catenin-Expression<br>PLUS<br>CD133-Expression | positiv              | negativ              | <i>P</i><br>Hazard<br>Ratio  | positiv              | negativ              | <i>P</i><br>Hazard<br>Ratio  | Globales <i>P</i> |
|---|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-------------------|
| OS  | 60,4 [56,9;<br>63,9] | 65,7 [56,8;<br>74,6] | 0,59<br>1,27 [0,53;<br>3,02] | 45,8 [29,2;<br>62,3] | 35,3 [22,6;<br>48,0] | 0,21<br>0,56 [0,22;<br>1,40] | 0,16              |
| PFS   | 22,8 [14,8;<br>30,8] | 23,9 [12,4;<br>35,5] | 0,26<br>1,53 [0,72;<br>3,27] | 16,4 [13,3;<br>19,5] | 14,8 [7,3;<br>22,3]  | 0,44<br>0,76 [0,38;<br>1,53] | 0,06              |

Tabelle 19: Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) in der PUL- und HEP-Gruppe des Kollektivs A. Für die Überlebensdaten sind die Mediane in Monaten mit dem 95%-Konfidenzintervall in den Klammern angegeben sowie die Hazard Ratio und der entsprechende *p*-Wert. Signifikante *p*-Werte sind fett gedruckt. Als „positiv“ werden die Kombinationen angesehen, bei denen beide Biomarker gleichzeitig positiv sind (Positiv ist der MAP-Kinase-Status beim Vorhandensein einer Mutation und  $\beta$ -Catenin und CD133 bei einer hohen Expression). Als „negativ“ werden die Kombinationen angesehen, bei denen einer oder beide Biomarker negativ sind (Negativ ist der MAP-Kinase-Status beim Nachweis des Wildtyps und  $\beta$ -Catenin und CD133 bei einer niedrigen Expression). Legende: PUL=Patienten mit ausschließlich Lungenmetastasen; HEP=Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen; OS=Overall Survival (Gesamtüberleben); PFS=Progression-free Survival (Progressionsfreies Überleben). (Michl et al. 2021)

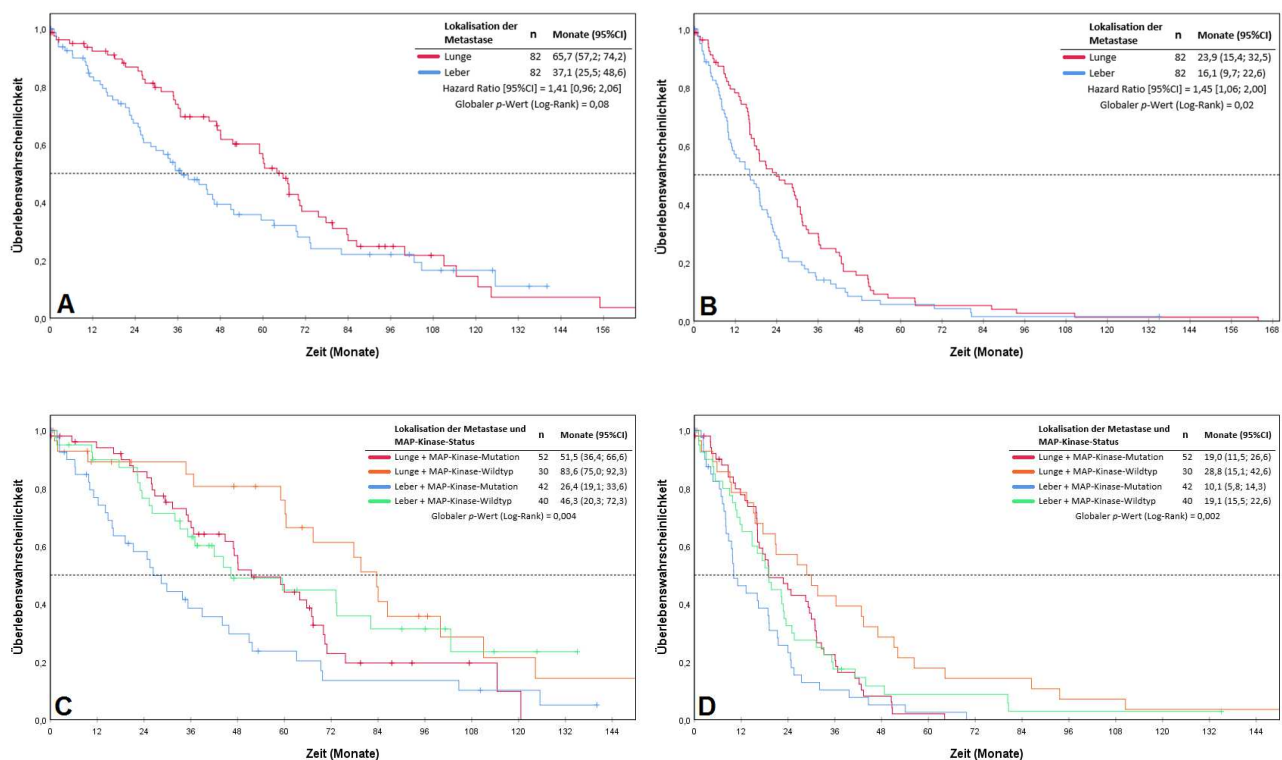


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für den Vergleich der Überlebensdaten der PUL- und HEP-Gruppe des Kollektivs A. A) Vergleich des Gesamtüberlebens (OS) zwischen der Gruppe mit Lungenmetastasen und Lebermetastasen. B) Vergleich des progressionsfreien Überlebens (PFS) zwischen der Gruppe mit Lungenmetastasen und Lebermetastasen. C) Abhängigkeit der Lokalisation der Metastasen und der MAP-Kinase-Mutationen auf das Gesamtüberleben (OS). D) Abhängigkeit der Lokalisation der Metastasen und der MAP-Kinase-Mutationen auf das progressionsfreie Überleben (PFS). Eine Vergrößerung der Abbildung befindet sich im Anhang auf Seite 116-117. (Michl et al. 2021)

Bei der Analyse des Gesamtüberlebens trat das Ereignis in der PUL-Gruppe bei 53 von 82 Fällen ein und in der HEP-Gruppe bei 56 von 82 Fällen. Das Ereignis für das Gesamtüberleben war durch das Eintreten des Todes definiert. Beim progressionsfreien Überleben trat das Ereignis in beiden Gruppen bei 77 von 82 Fällen ein. Das Ereignis für das progressionsfreie Überleben war durch die Progression der Erkrankung oder durch das Eintreten des Todes definiert.

Der grundsätzliche Vergleich zwischen der PUL-Gruppe und der HEP-Gruppe zeigte ein längeres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei den Fällen mit Lungenmetastasen (OS: 65,7 vs. 37,1 Monate, HR 1,41 [95%CI: 0,96-2,06]; PFS: 23,9 vs. 16,1 Monate, HR 1,45 [95%CI: 1,06-2,00]). Für das progressionsfreie Überleben war dieser Unterschied auch statistisch signifikant ( $p=0,02$ ). Für das Gesamtüberleben war er jedoch knapp nicht signifikant ( $p=0,08$ ).

Beim Vorhandensein einer MAP-Kinase-Mutation fand sich sowohl in der PUL- als auch in der HEP-Gruppe ein verkürztes Gesamtüberleben (PUL: 51,5 vs. 83,6 Monate, HR 1,96 [95%CI: 1,07-3,60],  $p=0,03$ ; HEP: 26,4 vs. 46,3 Monate, HR 1,93 [95%CI: 1,13-3,29],  $p=0,02$ ) und verkürztes progressionsfreies Überleben (PUL: 19,0 vs. 28,8 Monate, HR 1,99 [95%CI: 1,18-3,35],  $p=0,01$ ; HEP: 10,1 vs. 19,1 Monate, HR 1,53 [95%CI: 0,97-2,42],  $p=0,07$ ) verglichen mit den Fällen ohne Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg. Dieser Effekt ist auch statistisch signifikant sowohl in den Einzeltestungen als auch in der globalen Testung (OS: globales  $p=0,004$ ; PFS: globales  $p=0,002$ ). Nur der Unterschied im progressionsfreien Überleben bei den Fällen mit und ohne MAP-Kinase-Mutation innerhalb der HEP-Gruppe war knapp nicht statistisch signifikant ( $p=0,07$ ).

Innerhalb der PUL-Gruppe fand sich noch ein weiterer Effekt auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben. Das gleichzeitige Vorhandensein einer MAP-Kinase-Mutation und einer hohen CD133-Expression war bei Fällen mit Lungenmetastasen mit einer statistisch signifikanten Reduktion des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens verbunden, verglichen mit Fällen mit nur einem oder keinem der beiden Biomarker (OS: 48,1 vs. 67,4 Monate, HR 2,37 [95%CI: 1,20-4,67],  $p=0,01$ ); PFS: 19,0 vs. 28,5 Monate, HR 1,86 [95%CI: 1,01-3,43],  $p=0,04$ ).

Weder die CD133- noch die  $\beta$ -Catenin oder p53-Expression hatten einzeln oder als Kombination eine Auswirkung auf das Gesamtüberleben oder das progressionsfreie Überleben und auch die Markerkombination, bestehend aus MAP-Kinase-Mutationen und einer hohen  $\beta$ -Catenin-Expression, wies keinen signifikanten Effekt bei der Analyse der Überlebensdaten auf (Michl et al. 2021).

## 4. Diskussion und Schlussfolgerung

Wie in der Einleitung bereits hervorgehoben, gibt es beim kolorektalen Karzinom eine Vielzahl an verschiedenen relevanten Biomarkern, die in ihrer Ausprägung sehr variabel sind (Taieb et al. 2019). Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich also um eine Tumorentität, die auf molekularer Ebene sehr heterogen ist. Gleichzeitig hat das Vorhandensein der einzelnen Biomarker großen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung (Li und Zhou et al. 2015; Modest et al. 2016; Neumann et al. 2012), auf die Therapieauswahl (AWMF 2019, S. 198-216) und auf das Überleben der Patienten (Horst et al. 2008; Modest et al. 2016; Tsilimigras et al. 2018; Wang et al. 2019). Das Ziel dieser Arbeit war es, diese Vielzahl an Biomarkern unter Berücksichtigung der Metastasenlokalisierung zu untersuchen. Daraus sollten Hinweise auf die Existenz mehrerer, molekularer Subgruppen gewonnen werden, die sich in der Ausprägung dieser Biomarker und in der Lokalisation der Metastasierung unterscheiden.

Da in dieser Arbeit für beide Kollektive eine Fall-Kontroll-Studie als Studiendesign gewählt wurde, ist die Vergleichbarkeit der Gruppen innerhalb der Kollektive essentiell für die Aussagekraft der Ergebnisse. Deshalb wurden die Fälle nach wichtigen Patienten- und Tumorcharakteristika gematcht, um etwaige Störvariablen auszuschließen. Im Kollektiv A wurden die Fälle nach ihrer pT-Kategorie, Grading und der Kolonseite des Primärtumors gematcht. Da sich in der Auswertung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in diesen Kategorien fand, ist anzunehmen, dass die verschiedenen Gruppen homogen sind. Zudem zeigte sich, dass sich beim direkten Vergleich der Gruppe der Lungenmetastasen mit der Gruppe der Lebermetastasen auch kein Unterschied im Geschlecht, im Alter, in der groben Lokalisation des Primarius (I) und in der pN-Kategorie finden lässt. Diese beiden Gruppen ähneln sich also noch in weiteren Charakteristika.

Die pT-Kategorie und das Grading des Tumors wurden als Matching-Kriterien für die Gruppen des Kollektivs A gewählt, da es sich hierbei um grundlegende pathologische Eigenschaften des Primarius handelt. Zusätzlich wurden die Fälle nach der Lokalisation des Primarius gematcht. Hierbei ist bereits bekannt ist, dass sich Karzinome auf der linken Seite des Kolons von denen auf der rechten Seite molekular unterscheiden (Baran et al. 2018). Beim Geschlecht gibt es insgesamt im Kollektiv A eine Verteilung von männlichen zu weiblichen Patienten von 59% zu 41%. In Deutschland im Jahr 2016 waren 55,4% der neu an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten Männer und 44,6% Frauen (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019, S. 38). Die Verteilung der Geschlechter im

Kollektiv A ähnelt also den allgemeinen Werten. Beim Alter unterscheiden sich die beiden Gruppen mit Metastasen zu der Gruppe ohne Metastasierung. Das mediane Alter betrug hier in der PUL-Gruppe 64,4 Jahre und in der HEP-Gruppe 63,5 Jahre. In mehreren Studien wurde das mediane Alter von Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom mit ca. 62 Jahren angegeben, was sehr ähnlich zu den Werten des Kollektivs A ist (Sorbye et al. 2007). Für das allgemeine Alter der Patienten mit einem kolorektalem Karzinom gibt das Tumorregister München ein medianes Alter von 71,3 bis 74,5 Jahren und das Robert-Koch-Institut ein mittleres Alter von 70,3 bis 72,9 Jahren an. Dies stimmte beides mit dem medianen Alter der Kontrollgruppe M0 von 71,3 Jahren überein (Tumorregister München 2020, S. 13; Zentrum für Krebsregisterdaten 2016, S. 28). Außerdem wiesen mehr Fälle in der Gruppe der Lebermetastasen eine synchrone Metastasierung auf (72,0%), während sich in der Gruppe der Lungenmetastasen etwas mehr Fälle mit einer metachronen Metastasierung fanden (51,2%). Dieser Aspekt des Zeitpunkts der Metastasierung, wonach Lebermetastasen häufiger synchron und Lungenmetastasen metachron entstehen, stimmte mit den allgemeinen Daten überein (Holch et al. 2017). Darüber hinaus waren bei 62,2% der Fälle in der Kontrollgruppe der Primarius im Kolon lokalisiert und 29,3% im Rektum. Dies passte zu den Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten, bei dem der Anteil der Primärtumore im Kolon mit zwei Drittel und im Rektum mit einem Drittel angegeben wird (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019, S. 38). In der Gruppe der Lungen- und der Lebermetastasen gab es hingegen mehr Patienten, deren Primarius im Rektum lokalisiert war. Wie bereits genannt, tendieren kolorektale Karzinome mit dem Primärtumor im Rektum zur Metastasierung in die Lunge, wohingegen ein Primärtumor im Kolon häufiger mit einer hepatischen Metastasierung korreliert (Holch et al. 2017). Nun existiert aber in dieser Arbeit zwischen der PUL- und der HEP-Gruppe keinen Unterschied in der Verteilung der Primärtumore zwischen Kolon und Rektum, sodass der Einfluss der Lokalisation des Primarius auf die Entstehung der Metastase in der Lunge oder Leber verringert wurde.

Bei dem Kollektiv B wurde ebenfalls als Studiendesign eine Fall-Kontroll-Studie gewählt. Dies ist aufgrund der Seltenheit der ZNS-Metastasen sinnvoll. Aufgrund der geringen Fallzahl und des damit verbundenen, größeren Einflusses von Störvariablen wurde zusätzlich darauf geachtet, dass sich hier die drei Gruppen in den meisten Kategorien ähneln. Deshalb wurden die Fälle des Kollektivs B nach vielen Patienten- und Tumorcharakteristika wie nach dem Geschlecht, nach der Kolonseite, nach der Lokalisation des Primarius, nach dem Grading und nach der pT- und pN-Kategorie



gemacht. Da in der Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in diesen Kategorien nachweisbar war, scheinen die Gruppen eine große Homogenität aufzuweisen. Bei der genauen Betrachtung der pN-Kategorie sind die meisten Fälle der beiden metastasierten Gruppen in der pN2-Kategorie, wohingegen in der Kontrollgruppe die pN1-Kategorie am häufigsten aufgetreten ist. In der pN-Kategorie wurden die Fälle danach gemacht, ob generell Lymphknotenmetastasen vorhanden sind. Demnach wurden die pN1- und die pN2-Kategorie zu einer gemeinsamen pN+-Kategorie vereint und der pN0-Kategorie gegenübergestellt. Beim Vergleich der drei Gruppen nach dem Lymphknotenstatus fand sich eine beinahe identische Verteilung der pN0- und pN+-Kategorie. In der pT-Kategorie gab es einen kleinen Unterschied zwischen den Gruppen. Während die Gruppe der ZNS-Metastasen und die der Lebermetastasen auch in dieser Kategorie eine beinahe identische Verteilung besitzen, wies die Kontrollgruppe hier eine kleinere Abweichung auf. In allen Gruppen war am häufigsten die pT3-Kategorie vertreten, jedoch besaß die M0-Gruppe noch vier Fälle in der pT2-Kategorie. Diese Kategorie kam in den anderen Gruppen nicht vor. Dieser kleine Unterschied ist aufgrund der geringen Fallzahl entstanden, jedoch ist er beim Vergleich der drei Gruppen miteinander nicht statistisch signifikant. Somit weisen die drei Gruppen auch in der pT-Kategorie eine große Ähnlichkeit auf, sodass die Gruppen auch hier als homogen angesehen werden können.

Beim Alter zeigte sich im Kollektiv B, genauso wie im Kollektiv A, ebenfalls ein Unterschied zwischen den Gruppen. Der Mittelwert in der BRA-Gruppe betrug 64,1 Jahre und in der HEP-Gruppe 62,5 Jahre. Dies entspricht dem allgemeinen, medianen Alter von Patienten mit einem metastasiertem kolorektalen Karzinom, das meist mit ca. 62 Jahren angegeben wird (Sorbye et al. 2007). Für das generelle Alter bei der Erstdiagnose von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom nennt das Tumorregister München ein medianes Alter von 71,3 bis 74,5 Jahren (Tumorregister München 2020, S. 13) und das Robert-Koch-Institut ein mittleres Alter von 70,3 bis 72,9 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten 2016, S. 28). Dies stimmt mit dem Mittelwert der M0-Gruppe von 73,3 Jahren überein. Die Altersverteilung des Kollektivs B deckt sich also sowohl mit der Verteilung des Kollektivs A als auch mit den bereits bekannten Studiendaten.

Beim Kollektiv A konnte somit beobachtet werden, dass es nach wichtigen pathologischen Eigenschaften gemacht wurde und in weiteren Charakteristika mit der allgemeinen Studien- und Datenlage von Patienten mit kolorektalen Karzinomen übereinstimmt. Beim Kollektiv B zeigte sich eine nahezu identische Verteilung in sehr vielen Patienten- und

Tumorcharakteristika. Dadurch wurde die Vergleichbarkeit der Gruppen für die Kollektive nachgewiesen, was die Grundlage für die Analyse der Daten bildet.

Für die Metastasierung beim kolorektalen Karzinom sind die Lunge und die Leber von großem Interesse, da sie zu den häufigsten Lokalisationen für Metastasen gehören. Das ZNS gehört zwar zu den eher seltenen Lokalisationen (Holch et al. 2017), jedoch haben Patienten mit einer Metastase im ZNS im Vergleich zu anderen Lokalisationen eine noch schlechtere Prognose (Michl et al. 2015; Prasanna et al. 2018). Deshalb ist die Betrachtung dieses Metastasierungsweges ebenfalls sehr relevant. Diese Arbeit hat nun bei diesen Lokalisationen gezeigt, dass die organotrope Metastasierung mit der Ausprägung verschiedener Biomarker korreliert. Dies impliziert die Existenz mehrerer, molekularer Subgruppen mit speziellen klinischen Verläufen.

Für die pulmonale Metastasierung fand sich ein vermehrtes Auftreten von Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg mit einer Odds Ratio von 2,07. Wie bereits in Punkt 1.4.2 (siehe S. 21) genannt, spielt der MAP-Kinase-Signalweg eine Rolle bei der Proliferation, der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum (Kierszenbaum 2019, S. 108) und der EMT (Tripathi et al. 2018). Es ist speziell bei Mutationen in den *KRAS* Exonen 2 und 3 bereits bekannt, dass sie zu einer dauerhaften Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges führen (Lu et al. 2016). Es ist also nachvollziehbar, dass eine dauerhafte Aktivierung dieses Signalweges einen relevanten Einfluss auf die Metastasierung haben könnte. Zudem werden über den MAP-Kinase-Signalweg auch Transkriptionsfaktoren wie TWIST, SNAIL und ZEB aktiviert. Diese spielen eine Rolle bei der EMT (Tripathi et al. 2018), die als ein relevanter Schritt für die generelle Bildung von Metastasen angesehen wird (Kalluri et al. 2009).

Es zeigte sich jedoch keine Korrelation von Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg mit der allgemeinen Metastasierung, sondern speziell mit der Metastasierung in die Lunge. Dieses Ergebnis bestätigt damit andere Studien, die diesen Zusammenhang ebenfalls entdeckt haben (Pereira et al. 2015; Tie et al. 2011). Neben dem Einfluss der MAP-Kinase-Mutationen auf die Formierung der Metastasen war bei der Betrachtung der Überlebensdaten zu sehen, dass das Auftreten einer Mutation mit einem schlechteren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben korrelierte. Dieser Effekt fand sich sowohl in der Gruppe der Lungenmetastasen als auch in der Gruppe der Lebermetastasen. Das Auftreten von MAP-Kinase-Mutationen scheint demnach einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben. Dies stimmte mit anderen Studien überein, die eine Mutation im MAP-Kinase-Signalweg als einen möglichen Prognosefaktor für das

kolorektale Karzinom beschrieben. Dieser Effekt trat auch bei hepatisch metastasierten Patienten auf, obwohl MAP-Kinase-Mutationen eher mit der Metastasierung in die Lunge korrelieren (Modest et al. 2016, Tsimimigras et al. 2018).

Die Studien von Li et al. 2020 und von Stolze et al. 2015 geben zudem an, dass die häufigste Lokalisation für Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg das *KRAS* Exon 2 ist. *KRAS* Exon 3 und 4 sowie generell *NRAS* sind seltener betroffen (Li et al. 2020; Stolze et al. 2015). Dies wird von dieser Arbeit bestätigt, bei der ebenfalls die Mehrheit der Mutationen in *KRAS* Exon 2 zu finden waren. Mutationen in *KRAS* Exon 3 und 4 und *NRAS* Exon 2, 3 und 4 sind dabei nur sporadisch aufgetreten. Mutationen in *BRAF* waren ebenfalls seltener vorhanden. Es handelte sich hierbei vor allem um V600E-Mutationen. Dies stimmt ebenfalls mit der allgemeinen Studienlage überein, bei der auch die V600E-Mutation am häufigsten ist (Li et al. 2020). Somit spiegeln die Ergebnisse dieser Arbeit auch in der genauen Betrachtung der Mutationen die bekannten Studiendaten wider.

Zusätzlich fanden sich in der Gruppe der Lungenmetastasen bei den Markerkombinationen signifikant mehr Fälle mit einem gleichzeitigen Auftreten einer MAP-Kinase-Mutation und einer hohen  $\beta$ -Catenin-Expression als beim direkten Vergleich mit der Gruppe der Lebermetastasen. Die Studien von Horst et al. 2012 und Phelps et al. 2009 haben einen Zusammenhang zwischen nukleärem  $\beta$ -Catenin und dem Vorhandensein einer Mutation im MAP-Kinase-Signalweg beschrieben. Sie zeigten, dass beim Auftreten einer MAP-Kinase-Mutation die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern verstärkt wird (Horst et al. 2012, Phelps et al. 2009). Besonders vermehrtes nukleäres  $\beta$ -Catenin hat eine Auswirkung auf die Zellproliferation (Shang et al. 2017). Nun hat sich in dieser Arbeit die Kombination aus MAP-Kinase-Mutationen und einem dysregulierten WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vermehrt in der Gruppe der Lungenmetastasen gezeigt. Dies bestätigt zum einen die Studien von Horst et al. 2012 und Phelps et al. 2009 dahingehend, dass diese Kombination einen Einfluss auf das Tumorgeschehen und auf die Metastasierung haben könnte. Zum anderen legt es die Vermutung nahe, dass dieser Effekt möglicherweise einen stärkeren Einfluss auf die Metastasierung in die Lunge als in die Leber haben könnte. Bei der Analyse der Überlebensdaten fand sich jedoch kein Einfluss dieser Markerkombination, sodass eventuell ausschließlich auf eine Relevanz dieser Kombination für die Formierung einer Metastase ohne zusätzliche prognostischen Wirkung geschlossen werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nun die Vermutung zu, dass eine molekulare Subgruppe existiert, bei der häufiger eine MAP-Kinase-Mutation bzw. die Kombination aus MAP-

Kinase-Mutation und einer erhöhten  $\beta$ -Catenin-Expression nachweisbar ist und die vermehrt in die Lunge metastasiert.

Für die Metastasierung in die Leber ergab sich in dieser Arbeit eine Korrelation mit einer hohen CD133-Expression. Eine erhöhte CD133-Expression fand sich mit einer Odds Ratio von 2,94 signifikant häufiger bei den Fällen mit einer hepatischen Metastasierung als bei den Fällen ohne Metastasen. Wie bereits angesprochen, ist CD133 ein Marker für Tumorzellen, die Eigenschaften von Stammzellen besitzen und die für die Aufrechterhaltung der Zellpopulation des Tumors zuständig sind (Horst et al. 2008; Kim et al. 2017). Es gibt bereits Hinweise darauf, dass eine hohe Expression von CD133 mit der Entstehung von Lebermetastasen korreliert (Neumann et al. 2012), was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird.

Aus den Ergebnissen der RNA-Expressionsanalyse des Kollektivs B hat sich zudem gezeigt, dass eine starke Expression von *TMPRSS6* signifikant häufiger in der Gruppe der Lebermetastasen vorkommt als im Vergleich mit der Kontrollgruppe und der Gruppe der ZNS-Metastasen. Es ist bereits bekannt, dass *TMPRSS6* über die Regulation von Heparin einen Einfluss auf den Eisenstoffwechsel hat (Dion et al. 2018) und das Heparin bei der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen eventuell eine Rolle spielt (Kijima et al. 2008; Udali et al. 2018). Diese Arbeit zeigt nun eine Auswirkung des *TMPRSS6* beim kolorektalen Karzinom. Physiologisch wird das *TMPRSS6* hauptsächlich in der Leber exprimiert (Dion et al. 2018). Es ist nun auffällig, dass diese Arbeit speziell bei Lebermetastasen eine Korrelation ergeben hat. Ob eine Metastase in einem Organ entsteht, kann von dessen Mikromilieu beeinflusst werden. Dazu muss das Mikromilieu des Organs zu dem Mikromilieu des Primarius passen (Chambers et al. 2002). Die Ähnlichkeit in der Ausprägung von *TMPRSS6* könnte auf eine Ähnlichkeit des Mikromilieus des Tumors mit dem Mikromilieu der Leber hinweisen, weshalb sich bevorzugt hier Metastasen bilden könnten. Diese These muss jedoch in weiteren Studien verifiziert werden. Diese Arbeit gibt nun Hinweise auf eine weitere Subgruppe, die eine hohe CD133- und eventuell *TMPRSS6*-Expression aufweist und vermehrt hepatisch metastasiert.

Für die Metastasierung in das ZNS hat diese Studie mehrere Ergebnisse gebracht. Der klinische Verlauf von Patienten mit ZNS-Metastasen unterscheidet sich etwas von dem klinischen Verlauf von Patienten mit anderen Metastasen. Während Leber- und Lungenmetastasen frühzeitiger auftreten und häufig schon bei der Erstdiagnose des Karzinoms vorhanden sind (Holch et al. 2017), zeigen sich ZNS-Metastasen eher im späteren Verlauf (Damiens et al. 2012; Michl et al. 2015). Außerdem finden sich in der

Vergangenheit von Patienten mit ZNS-Metastasen meistens bereits Leber- und/oder Lungenmetastasen (Michl et al. 2015; Damiens et al. 2012; Kye et al. 2012; Farnell et al. 1996). Trotz der bereits vorhandenen Metastasen in anderen Organen und der damit verbundenen schlechten Prognose scheinen die Patienten dennoch so lange zu überleben, dass eine Metastase im ZNS überhaupt entstehen kann. Dies lässt die Vermutung zu, dass Patienten mit einer ZNS-Metastasierung vor der Entstehung der Metastase einen langwierigeren Verlauf der Erkrankung haben. Nach der Entstehung der ZNS-Metastase hat der Patient dann jedoch eine sehr schlechte Prognose (Michl et al. 2015; Prasanna et al. 2018). Die Annahme, dass der Tumor grundsätzlich eher weniger aggressiv ist, aber trotzdem seine Fähigkeit zur Metastasierung behalten hat, könnte eine Erklärung für den klinischen Verlauf von Patienten mit ZNS-Metastasen sein. Hierfür könnten auch die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalyse des Kollektivs B sprechen.

Dabei fand sich signifikant häufiger in der Gruppe der ZNS-Metastasen eine sehr starke Expression von *ACVR1C* im Vergleich zu der Kontrollgruppe und zu der Gruppe der Lebermetastasen. Wie bereits genannt, handelt es sich bei *ACVR1C* um eine Typ I Rezeptor Serin/Threoninkinase, an den sich TGF- $\beta$ -Liganden binden können (Bondestam et al. 2001). Durch die Aktivierung des darauffolgenden Signalweges wird die Zellproliferation vermindert (Shi und Massagué 2003). Eine verstärkte Expression von *ACVR1C* scheint also eher mit einem weniger aggressiven Tumor assoziiert zu sein. Dies spiegelt sich auch in den Studien wider, die bei unterschiedlichen Karzinomen den Einfluss einer starken *AVCR1C*-Expression auf das Überleben der Patienten betrachtet haben. Bei mehreren Tumorentitäten handelte es sich bei einer starken Expression von *ACVR1C* um einen positiven Prognosefaktor (Loomans und Andl 2016).

Darüber hinaus war in der BRA-Gruppe auch eine sehr starke Expression von *SMC3* signifikant häufiger nachweisbar als in der HEP- und der M0-Gruppe. Das Protein *SMC3* ist Teil des Cohesin-Komplexes und hat dadurch Einfluss auf die Kohäsion und die Trennung der Schwesterchromatiden bei der Mitose (Ghiselli et al. 2003). Eine Überexpression von *SMC3* ist mit einer vermehrten Zelltransformation und vermehrtem Zellwachstum assoziiert (Ghiselli und Iozzo 2000). Die Primärtumore der ZNS-Metastasen scheinen also trotzdem Eigenschaften eines aggressiven Tumors behalten zu haben. Dies ist aber auch eine Voraussetzung, da diese Tumore für die Entstehung von ZNS-Metastasen zumindest die Fähigkeit zur Metastasierung beibehalten müssen. Da *SMC3* eventuell die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin beeinflussen kann (Ghiselli et al. 2003) und dieses wiederum im Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 zu einer EMT führen kann (Kim

et al. 2002), könnte *SMC3* auch einen direkten Einfluss auf die Metastasenbildung haben. Zudem hat sich generell in dieser Arbeit gezeigt, dass *SMC3* unabhängig von der Gruppe im Vergleich zu den anderen Genen sehr stark exprimiert wird. Diese Beobachtung passt zu den bereits bekannten Studiendaten, die eine grundsätzlich erhöhte *SMC3*-Expression beim kolorektalen Karzinom angeben (Ghiselli und Iozzo 2000).

Schließlich zeigte diese Arbeit vor allem eine signifikant höhere Expression von *NFAT5* in der Gruppe der ZNS-Metastasen sowohl im Vergleich mit der Kontrollgruppe als auch mit der Gruppe der Lebermetastasen. Da *NFAT5* einerseits eine zentrale Rolle bei der Anpassung der Zelle auf osmotischen Stress spielt und es andererseits grundsätzlich ein Transkriptionsfaktor für viele verschiedene Gene ist (Neuhofer 2010), gibt es nun mehrere Möglichkeiten, weshalb *NFAT5* relevant für die Metastasierung in das ZNS ist. Eines der von *NFAT5* beeinflussten Zielgene ist das *S100A4* (Chen et al. 2009). Bei *S100A4* handelt es sich um ein Protein, das die Fähigkeit des Tumors zur Metastasenbildung verstärken kann. Einerseits wird dies durch eine Steigerung der Zellmigration und Angiogenese erreicht und andererseits kann *S100A4* auch zu einer EMT führen. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass *S100A4* zwar Metastasen-induzierend wirkt, aber keinen Einfluss auf die Tumorentstehung an sich hat (Fei et al. 2017). Darüber hinaus ist auch eine Wechselwirkung zwischen *NFAT5* und dem  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin bekannt. Das  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin spielt grundsätzlich eine Rolle in der extrazellulären Matrix und speziell in Tumorzellen beeinflusst es die Zellmobilität, die Überlebensfähigkeit der Zellen und die Invasion (Jauliac et al. 2002). Außerdem hat auch das  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin einen Einfluss auf das *S100A4* (Chen et al. 2009). Somit sind also *NFAT5*, *S100A4* und das  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin in molekularen Prozessen miteinander verknüpft und stehen im Zusammenhang mit der Fähigkeit des Tumors zu metastasieren.

Aber auch die Funktion des *NFAT5* osmotischem Stress entgegenzuwirken, könnte ursächlich für dessen Erhöhung in Tumoren mit ZNS-Metastasen sein. Bei einer lokalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer Hyperosmolarität, was wiederum das *NFAT5* aktiviert (Neuhofer 2010). Aufgrund des Tumors selbst kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems und zu einer damit assoziierten lokalen Inflammation. Diese Immunzellen können den Tumor in frühen Stadien bis zu einem gewissen Grad zurückhalten, jedoch kann sich der Tumor daran auch anpassen und eine Toleranz gegenüber dem Immunsystem entwickeln (Gonzalez et al. 2018). Da nun die Aktivierung des Immunsystems zu einer Entzündungsreaktion führt, diese zu einer Hyperosmolarität und diese wiederum zu einer Aktivierung des *NFAT5*, könnte das *NFAT5* auch nur ein Marker für ein stark aktiviertes

Immunsystem sein. Diese Immunzellen könnten die Aggressivität des Tumors reduzieren. Wie bereits genannt, lässt der klinische Verlauf von Patienten mit ZNS-Metastasen die Annahme zu, dass der Tumor eher weniger aggressiv ist. Dies lässt sich eventuell durch eine starke Aktivierung des Immunsystems erklären. Gleichzeitig gibt es aber auch Hinweise, dass *NFAT5* als Transkriptionsfaktor selbst stimulierend auf das Immunsystem wirken kann (Neuhofer 2010). Welche dieser Möglichkeiten nun ursächlich für die erhöhte Expression des *NFAT5* in der Gruppe der ZNS-Metastasen ist oder ob es sich eventuell auch um eine Kombination dieser Möglichkeiten handelt, lässt sich aus dieser Arbeit nicht eruieren. Für die Beantwortung dieser Fragen sind weitere Studien nötig.

Sehr auffallend bei der Analyse der RNA-Expression ist die Korrelation zwischen den Kombinationen aus den Hochrisikogruppen von *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* und der Gruppe der ZNS-Metastasen. Besonders deutlich ist das unter anderem an der Dreierkombination zu sehen, also bei der gleichzeitig starken Expression aller drei Marker. Diese findet sich bei keinem Fall der M0-Gruppe oder der HEP-Gruppe, sondern ausschließlich in der BRA-Gruppe. Damit beschreibt diese Arbeit eine starke Korrelation zwischen diesen drei Markern und der Entwicklung von ZNS-Metastasen. Die bereits genannten, möglichen Funktionen dieser Biomarker beziehen sich entweder auf eine Verringerung der Aggressivität des Tumors oder auf eine Verstärkung der Fähigkeit des Tumors zur Metastasenbildung. Dies entspricht wiederum den Eigenschaften, die sich aus dem klinischen Verlauf von Patienten mit ZNS-Metastasen schließen lassen können. Somit kann aus dieser Arbeit auf die Existenz einer dritten Subgruppe geschlossen werden, die als Merkmale eine erhöhte Expression von *NFAT5*, *ACVR1C* und/oder *SMC3* sowie die Metastasierung in das ZNS aufweist.

Für die allgemeine, von der Lokalisation unabhängigen Metastasierung fand diese Arbeit eine Korrelation mit der Markerkombination bestehend aus MAP-Kinase-Mutation und hoher CD133-Expression. Diese zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen der Lungen- und Lebermetastasen. Da diese Kombination aber signifikant häufiger in der PUL-Gruppe, der HEP-Gruppe und der Vereinigung der beiden Gruppen (M1-Gruppe) im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzufinden war, scheint diese Kombination einen Einfluss auf die Metastasierung im Allgemeinen zu haben. Die Ursache hierfür könnte sein, dass MAP-Kinase-Mutationen und eine hohe CD133-Expression einzeln bereits einen Effekt auf die Entstehung von Metastasen haben. Dieser ist bei der MAP-Kinase-Mutation jedoch stärker bei der Metastasierung in die Lunge und bei der CD133-Expression stärker bei der Metastasierung in die Leber.

Zusätzlich haben die Überlebensdaten gezeigt, dass diese Kombination ausschließlich bei den Fällen mit Lungenmetastasen einen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben hat. In der Gruppe der Lebermetastasen fand sich dieser Einfluss nicht. Sowohl für die MAP-Kinase-Mutation als auch für eine hohe CD133-Expression wird angenommen, dass sie negative prognostische Faktoren sind (Horst et al. 2008; Modest et al. 2016). Da diese Arbeit eine Verringerung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens beim Vorhandensein einer MAP-Kinase-Mutation aufgezeigt hat, liegt die Vermutung nahe, dass das gleichzeitige Auftreten der beiden Marker ebenso einen Einfluss auf das Überleben haben sollte. Jedoch beschränkt sich dieser Effekt in dieser Arbeit nur auf die Gruppe der Lungenmetastasen und CD133 als einzelner Biomarker zeigt weder in der PUL- noch in der HEP-Gruppe eine Auswirkung auf das Überleben. Dies stimmt nicht mit der Studie von Horst et al. 2008 überein.

Zusätzlich fand sich in der M1-Gruppe des Kollektivs A, die sich aus der PUL- und HEP-Gruppe zusammensetzt, statistisch signifikant mehr Fälle mit einer hohen CD133-Expression als in der Kontrollgruppe. Eine hohe CD133-Expression scheint also auch eine Auswirkung auf die generelle Metastasierung zu haben. Aber da die Einzelanalysen ausschließlich einen signifikanten Unterschied in der Gruppe der Lebermetastasen im Vergleich zu der M0-Gruppe erbrachten, könnte der Einfluss von CD133 auf die Entstehung von Lebermetastasen größer sein als auf die Entstehung von Metastasen in anderen Lokalisationen.

In dieser Arbeit wurden jedoch auch mehrere Biomarker analysiert, die keinen Einfluss auf die Metastasierung ergeben haben. Diese Biomarker werden im Folgenden näher betrachtet. So fand sich kein Effekt bei der  $\beta$ -Catenin-, p53-, *EMILIN3*-, *SV2B*- und *MTA1*-Expression sowie bei der Mikrosatelliteninstabilität. Besonders nukleäres  $\beta$ -Catenin kann zu einer verstärkten Zellproliferation führen (Shang et al. 2017) und über den Transkriptionsfaktor LEF-1 zu einer EMT (Kim et al. 2002), sodass eine Auswirkung von  $\beta$ -Catenin auf die Metastasierung zu erwarten wäre. Die Ursache für den fehlenden Effekt von  $\beta$ -Catenin in dieser Arbeit könnte an dem bereits erwähnten Einfluss der MAP-Kinase-Mutation auf die Wirkung des  $\beta$ -Catenins liegen. Wenn eine Mutation im MAP-Kinase-Signalweg nötig für die Initiierung der Effekte des  $\beta$ -Catenins ist (Horst et al. 2012, Phelps et al. 2009), ist das Vorhandensein einer hohen  $\beta$ -Catenin-Expression alleine eventuell nicht ausreichend. Auch führte eine erhöhte  $\beta$ -Catenin-Expression nicht zu einer Veränderung des Überlebens der Patienten. Dazu wurde jedoch bereits erwähnt, dass in verschiedenen Studien teilweise eine Verringerung des Gesamtüberlebens bei hoher  $\beta$ -



Catenin-Expression gefunden wurde (Lugli et al. 2007; Yoshida et al. 2015), aber auch teilweise kein Effekt auf das Überleben nachweisbar war (Chung et al. 2001; Wanitsuwan et al. 2008). Des Weiteren ergab auch die Markerkombination aus hoher  $\beta$ -Catenin-Expression und hoher CD133-Expression keinen Zusammenhang mit der organspezifischen Metastasierung und keinen Einfluss auf das Überleben. Im Gegensatz dazu fand sich in der Studie von Neumann et al. 2012 bei dieser Markerkombination eine Korrelation mit der Metastasierung in die Leber. Jedoch wurden in dieser Studie ausschließlich Fälle mit einem Primarius auf der rechten Kolonseite betrachtet, während in dieser Arbeit der Großteil der Karzinome linksseitig war. Da sich die Tumorbilogie von rechtsseitigen und linksseitigen Kolonkarzinomen unterscheidet (Baran et al. 2018), könnte dies die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der  $\beta$ -Catenin-Expression sein.

Auch bei einer Deregulation der p53-Expression wäre aufgrund der Funktion des p53 als Tumorsuppressor eine Auswirkung auf die Metastasierung zu erwarten. Jedoch fand sich in dieser Arbeit auch hier keine Korrelation zwischen einer deregulierten p53-Expression und der Metastasenentstehung. Der Anteil der Fälle mit einer deregulierten p53-Expression war sogar beinahe in jeder Gruppe des Kollektivs A identisch. Da Mutationen im p53 jedoch zu typischen pathologischen Veränderungen in der Adenom-Karzinom-Sequenz gehören (Li und Zhou et al. 2015), könnten diese eventuell bei der Entstehung des Karzinoms an sich relevant sein, aber bei der Bildung der Metastasen nur noch eine untergeordnete Rolle spielen. Möglicherweise fand sich deshalb eine p53-Deregulation mehrheitlich und gleich verteilt in jeder Gruppe des Kollektivs A. Zudem hatte p53 ebenfalls keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Dies steht im Widerspruch zu manchen Studien, die bei p53-Mutationen ein schlechteres Überleben nachgewiesen haben (Katkooi et al. 2012; Li und Zhou et al. 2015).

Darüber hinaus konnten Aussagen zu den Auswirkungen der Mikrosatelliteninstabilität aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht getroffen werden. Nur 7 Fälle im gesamten Kollektiv A waren mikrosatelliteninstabil bzw. wiesen einen kompletten immunhistochemischen Verlust von MLH1 auf. Da das Kollektiv A größtenteils aus Fällen mit Primärtumoren auf der linken Kolonseite bestand, Mikrosatelliteninstabilität aber vor allem bei kolorektalen Karzinomen auf der rechten Seite zu finden ist (Wang et al. 2019), ist die geringe Anzahl an Fällen mit einer Mikrosatelliteninstabilität nachvollziehbar. Trotzdem zeigte sich angedeutet in den Ergebnissen dieser Arbeit, dass sich eine Mehrheit der Fälle mit einer Mikrosatelliteninstabilität in der Gruppe ohne Metastasen fand. Dies

stimmt mit den Ergebnissen der Studien von Malesci et al. 2007 und Neumann et al. 2012 überein. Diese beschrieben bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren eine seltenere Bildung von Fernmetastasen. Wie bereits erwähnt, können jedoch aufgrund der zu geringen Fallzahl in dieser Arbeit trotzdem keine klaren, statistisch signifikanten Aussagen zu dem Einfluss der mikrosatelliteninstabilen Tumore auf die Metastasierung oder auf das Überleben der Patienten getroffen werden.

Schließlich waren *EMILIN3*, *SV2B* und *MTAI* bei keinem Fall des Kollektivs B nachweisbar. Für *EMILIN3* und *SV2B* könnte der Grund dafür die geringe Menge an RNA sein, die grundsätzlich im gastrointestinalen Bereich exprimiert wird. In der Studie von Schiavinato et al. 2012 wurde für *EMILIN3* nachgewiesen, dass dessen RNA-Expression nach der Embryogenese stark abnimmt. Im adulten Stadium ist es nur noch in einzelnen Organen, wie dem Auge und dem Gehirn, aufzufinden (Schiavinato et al. 2012). Für *SV2B* ist die Situation ähnlich, da es als synaptisches Vesikel-Protein ebenfalls vor allem im ZNS exprimiert wird (Bajjalieh et al. 1993). Somit könnte die Ursache für den fehlenden Nachweis von *EMILIN3* und *SV2B* darin liegen, dass die Menge an RNA für den Nachweis in der qPCR insgesamt zu gering war, auch wenn es einen Unterschied in der *EMILIN3*- und *SV2B*-Expression zwischen den Gruppen geben würde. Für *MTAI* kann diese Erklärung jedoch nicht angenommen werden. Da *MTAI* Einfluss auf das Zellwachstum, die DNA-Reparatur und dadurch auf die Tumordinvasion und Metastasierung hat (Sen et al. 2014) und es in Studien bereits beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen wurde (Li und Ye et al. 2015), war dessen Nachweis in dieser Arbeit sowohl in den beiden Gruppen mit Metastasen als auch in der Kontrollgruppe zu vermuten. Eine Erklärung für den fehlenden Nachweis von *MTAI* konnte nicht gefunden werden. Ein methodischer Fehler als Ursache hierfür ist unwahrscheinlich. In den Vorarbeiten der qPCR war die RNA von *MTAI* in den Zellkulturen nachweisbar und die entsprechenden Primer waren in der Testung effizient. Zudem wurde bei den Läufen der qPCR immer eine Positivkontrolle für *MTAI* mitgetestet, sodass die Wahrscheinlichkeit von etwaigen Fehlern in der qPCR gering war. Darüber hinaus waren die Referenzgene bei jedem Fall nachweisbar, sodass die RNA-Isolation und die Reverse Transkription ebenfalls korrekt abgelaufen sein müssen. Ansonsten hätte die qPCR auch kein Ergebnis bei den Referenzgenen geliefert. Schließlich bleibt der Grund für die fehlende *MTAI*-Expression unklar.

Neben der Analyse der Biomarker hat diese Arbeit zusätzliche Ergebnisse im Zusammenhang mit der Metastasierung aufgezeigt. Bei der Betrachtung des Lymphknotenstatus in der multivariaten Analyse des Kollektivs A fand sich bei den Fällen

mit einer pN1- oder pN2-Kategorie eine höhere Chance in den beiden Gruppen mit Fernmetastasen zu sein als in der Gruppe ohne Metastasierung. Dies spiegelt die Ergebnisse anderer Studien wider, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenbefall und der Formierung von Fernmetastasen gefunden haben (Zlobec et al. 2008).

Außerdem fand sich in der allgemeinen Analyse der Überlebensdaten ein besseres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei Patienten mit einer pulmonalen Metastasierung als bei Patienten mit einer hepatischen. Dies deckt sich mit der allgemeinen Studienlage, die die Metastasierung in die Lunge als einen positiven prognostischen Faktor und die Metastasierung in die Leber als einen negativen beschreibt (Prasanna et al. 2018). Da es sich jedoch bei dieser Arbeit um eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie handelt, muss die Überlebensdatenanalyse mit Vorsicht betrachtet werden. Teilweise umfassen die einzelnen Gruppen mit den verschiedenen Biomarkern und Markerkombinationen nur wenige Fälle, sodass nicht immer klare Aussagen getroffen werden können.

Grundsätzlich ist diese Arbeit aufgrund ihres Studiendesigns und aufgrund der Datengewinnung aus einem Tumorregister beschränkt, sodass zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse In-vivo-Experimente folgen sollten und der Nutzen dieser Erkenntnisse in prospektiven, klinischen Studien geprüft werden sollte. Trotzdem hat diese Arbeit interessante Zusammenhänge zwischen bestimmten Tumormarkern und der Entstehung von Metastasen in speziellen Organen erbracht. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Formierung von Metastasen in spezielle Organe nicht nur von den anatomischen Verhältnissen und der Lokalisation des Primarius abhängig ist, sondern auch von der grundlegenden Tumorbiologie. Dies impliziert die mögliche Existenz von molekularen Subgruppen, die sich in der Ausprägung von Biomarkern unterscheiden und Auswirkungen auf die Lokalisation und Formierung von Metastasen und den Verlauf der Erkrankung haben. Die möglichen, molekularen Subgruppen mit ihren Eigenschaften sind in der Abbildung 12 (siehe S. 100) zusammengefasst. Der Nachweis dieser Subgruppen und deren genauere Charakterisierung und Differenzierung müssen in weiteren Studien erarbeitet werden.

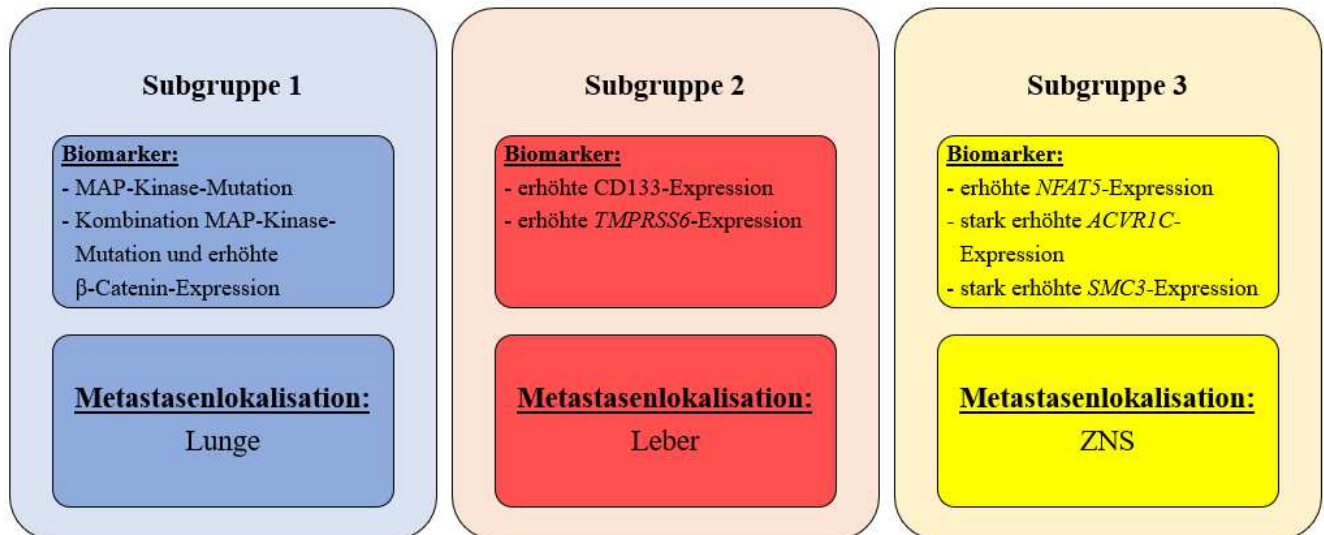


Abbildung 12: Zusammenfassung der Charakteristika der drei möglichen Subgruppen. Aufgelistet werden die für die Subgruppen spezifische Ausprägung der Biomarker und die dazugehörige Lokalisation der Metastasen.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnten zudem einen praktischen, klinischen Nutzen haben. Die bereits im Punkt 1.3 (siehe S. 19) erwähnte, allgemeine Nachsorge von Patienten nach der operativen Entfernung des Karzinoms differenziert lediglich zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen, ob zur Detektion von möglichen Lungen- oder Lebermetastasen eine Abdomensonografie oder eine CT-Untersuchung und ein Röntgen vom Thorax durchgeführt wird. Das ZNS wird in der Routinenachsorge nicht berücksichtigt (AWMF 2019, S. 235). Die Fälle mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Metastase in ein spezielles Organ könnten durch die Analyse von Biomarkern eingegrenzt werden. Dementsprechend könnte die Nachsorge angepasst und auf ein bestimmtes Organ fokussiert werden, wodurch mögliche Metastasen frühzeitig entdeckt werden könnten. Dies hätte dann direkte Auswirkungen auf die Therapie der Metastasen. Durch die frühere Diagnose der Metastase könnten auch entsprechende Behandlungen früher begonnen werden. So ist beispielsweise die Resektabilität einer Lebermetastase vom restlichen, funktionellen Lebergewebe abhängig (Van Cutsem et al. 2016, S. 1395 - 1396) und die Prognose gemäß des Fong-Scores von der Größe und der Anzahl der Metastasen in der Leber (Fong et al. 1999). Dies kann durch eine frühere Entdeckung der Metastase beeinflusst werden. Auch bei den ZNS-Metastasen wäre eine frühere Diagnose von großem Nutzen, da sich die Therapiemöglichkeiten bei ZNS-Metastasen vor allem auf die chirurgische Resektion und die Strahlentherapie erstreckt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2015). Das Outcome dieser Therapien könnte sich bei einer frühzeitig entdeckten, noch singulären Metastase positiv verändern (Imaizumi et

al. 2019). Zudem könnten für neu entdeckte, molekulare Subgruppen spezifische Therapien entwickelt werden. Bei dem Vorhandensein einer MAP-Kinase-Mutation, einer *BRAF*-Mutation oder einer Mikrosatelliteninstabilität gibt es bereits spezielle Behandlungsempfehlungen (AWMF 2019, S. 198-216). Somit haben die in dieser Arbeit entdeckten, möglichen Subgruppen das Potenzial die Entwicklung neuer und zielgerichteter Therapieschemata zu initiieren.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg und besonders die Kombination aus MAP-Kinase-Mutationen und einer verstärkten Aktivität des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweges mit der pulmonalen Metastasierung korreliert und eine hohe CD133- und *TMPRSS6*-Expression mit der hepatischen Metastasierung. Für die Metastasierung in das ZNS hat sich eine Korrelation mit einer starken Expression der Gene *NFAT5*, *ACVR1C* und *SMC3* gezeigt. Besonders die Kombinationen dieser Marker waren sehr spezifisch für die ZNS-Metastasierung. Diese Ergebnisse lassen auf eine unterschiedliche Tumorbilogie und auf die Existenz möglicher, molekularer Subgruppen des kolorektalen Karzinoms mit charakteristischen Eigenschaften schließen. Zusätzlich könnten die Erkenntnisse aus dieser Arbeit eine Auswirkung auf das klinische Management von Patienten mit einem metastasierten, kolorektalen Karzinom haben und durch die Präzisierung der Nachsorge und einer frühzeitigeren Therapieeinleitung das Überleben der Patienten verbessern.

## Literaturverzeichnis

**Asnaghi, Laura, White, David, Key, Nolan, Choi, Joshua, Mahale, Alka, Alkatan, Hind, Edward, Deepak, Elkhamary, Sahar, Al-Mesfer, Saleh, Maktabi, Azza, Hurtado, Christopher, Lee, Grace, Carcaboso, Angel, Mumm, Jeff, Abu Safieh, Leen, Eberhart, Charles (2019):** *ACVR1C/SMAD2 signaling promotes invasion and growth in retinoblastoma*. *Oncogene*, Band 38, S. 2056–2075

**Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L., Zilch, H. (2010):** *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage, Stuttgart, Thieme

**AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe (2019):** *Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*. AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, Langversion 2.1

URL: <http://www.leitlinienprogrammmonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>  
(aufgerufen am 23.09.2020)

**Bajjalieh, S.M., Peterson, K., Linial, M., Scheller, R.H. (1993):** *Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 90/6, S. 2150-2154

**Baran, Burcin, Ozupek, Nazli Mert, Tetik, Nihal Yerli, Acar, Emine, Bekcioglu, Omer, Baskin, Yasemin (2018):** *Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature*. *Gastroenterology Research*, Band 11/4, S. 264–273

**Bondestam, J., Huotari, M.A., Morén, A., Ustinov, J., Kaivo-Oja, N., Kallio, J., Horelli-Kuitunen, N., Aaltonen, J., Fujii, M., Moustakas, A., Ten Dijke, P., Otonkoski, T., Ritvos, O. (2001):** *cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C)*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, Band 95/3-4, S. 157-162

**Chambers, Ann, Groom, Alan, MacDonald, Ian (2002):** *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nature Reviews Cancer, Band 2, S. 563–572

**Chen, Min, Sinha, Mala, Luxon, Bruce, Bresnick, Anne, O'Connor, Kathleen (2009):** *Integrin  $\alpha 6\beta 4$  Controls the Expression of Genes Associated with Cell Motility, Invasion, and Metastasis, Including S100A4/Metastasin.* Journal of Biological Chemistry, Band 284/3, S. 1484–1494

**Cheng, Xiaofei, Xu, Xiangming, Chen, Dong, Zhao, Feng, Wang, Weilin (2019):** *Therapeutic potential of targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colorectal cancer.* Biomedicine & Pharmacotherapy, Band 110, S. 473-481

**Chung, G.G., Provost, E., Kielhorn, E.P., Charette, L.A., Smith, B.L., Rimm, D.L. (2001):** *Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis.* Clinical Cancer Research, Band 7/12, S. 4013-4020

**Damiens, K., Ayoub, J.P., Lemieux, B., Aubin, F., Saliba, W., Campeau, M.P., Tehfe, M. (2012):** *Clinical features and course of brain metastases in colorectal cancer: an experience from a single institution.* Current Oncology, Band 19/5, S. 254-258

**Deutsche Gesellschaft für Neurologie, AWMF (2015):** *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Hirnmetastasen und Meningeosis neoplastica.* Deutsche Gesellschaft für Neurologie, AWMF Registrierungsnummer: 030/060, Version 3

**Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (11/2017):** *Gastrointestinale Tumoren.* 1. Auflage, Elsevier

**Dion, Sébastien, Béliveau, François, Morency, Louis-Philippe, Désilets, Antoine, Najmanovich, Rafaël, Leduc, Richard (2018):** *Functional diversity of Tmprss6 isoforms and variants expressed in hepatocellular carcinoma cell lines.* Scientific Reports, Band 8, Artikelnummer 12562

- Doenecke, Detlef, Koolman, Jan, Fuchs, Georg, Gerok, Wolfgang (2005):** *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Auflage, Georg Thieme Verlag
- Dorak, Mehmet Tefik (2007):** *Real-time PCR*. 1. Auflage, New York und Abingdon, Taylor & Francis Group
- Farnell, G.F., Buckner, J.C., Cascino, T.L., O'Connell, M.J., Schomberg, P.J., Suman, V. (1996):** *Brain metastases from colorectal carcinoma. The long term survivors*. *Cancer*, Band 78/4, S. 711-716
- Fei, Fei, Qu, Jie, Zhang, Mingqing, Li, Yuwei, Zhang, Shiwu (2017):** *S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review*. *Oncotarget*, Band 8/42, S. 73219–73239
- Fong, Yuman, Fortner, Joseph, Sun, Ruth, Brennan, Murray, Blumgart, Leslie (1999):** *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. Analysis of 1001 consecutive cases*. *Annals of Surgery*, Band 230/3
- Georgakopoulos-Soares, Ilias, Chartoumpekis, Dionysios, Kyriazopoulou, Venetsana, Zaravinos, Apostolos (2020):** *EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer*. *Frontiers in Oncology*, Band 10, S. 499
- Ghiringhelli, Francois, Hennequin, Audrey, Drouillard, Antoine, Lepage, Côme, Faivre, Jean, Bouvier, Anne-Marie (2014):** *Epidemiology and prognosis of synchronous and metachronous colon cancer metastases: a French population-based study*. *Digestive and liver disease*, Band 46/9, S. 854-858
- Ghiselli, Giancarlo, Coffee, Nefeteria, Munnery, Christine, Koratkar, Revati, Siracusa, Linda (2003):** *The cohesin SMC3 is a target for the beta-catenin/TCF4 transactivation pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, Band 278/22, S. 20259-20267
- Ghiselli, Giancarlo, Iozzo, Renato (2000):** *Overexpression of bamacan/SMC3 causes transformation*. *Journal of Biological Chemistry*, Band 275/27, S. 20235-20238



- Gonzalez, Hugo, Hagerling, Catharina, Werb, Zena (2018):** *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression.* Genes & Development, Band 32/19-20, S. 1267–1284
- Haggar, Fatima, Boushey, Robin (11/2009):** *Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors.* Clinics in Colon and Rectal Surgery, Ausgabe 22, Band 4, S. 191-197
- Hobbs, Aaron, Der, Channing, Rossman, Kent (2016):** *RAS isoforms and mutations in cancer at a glance.* Journal of Cell Science, Band 129/7, S. 1287–1292
- Holch, J., Demmer, M., Lamersdorf, C., Michl, M., Schulz, C., von Einem, J., Modest, D., Heinemann, V. (2017):** *Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer.* Visceral medicine, Band 33, S. 70-75
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., Jung, A. (2008):** *CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer.* British Journal of Cancer. Band 99, S. 1285–1289
- Horst, David, Chen, Justina, Morikawa, Teppei, Ogino, Shuji, Kirchner, Thomas, Shivdasani, Ramesh A. (2012):** *Differential WNT Activity in Colorectal Cancer Confers Limited Tumorigenic Potential and Is Regulated by MAPK Signaling.* Cancer Research, Band 72/6, S. 1547–1556
- Imaizumi, Jun, Shida, Dai, Narita, Yoshitaka, Miyakita, Yasuji, Tanabe, Taro, Takashima, Atsuo, Boku, Narikazu, Igaki, Hiroshi, Itami, Jun, Kanemitsu, Yukihide (2019) :** *Prognostic factors of brain metastases from colorectal cancer.* BMC Cancer, Band 19/1, Artikelnummer 755
- Jauliac, Sebastien, López-Rodríguez, Cristina, Shaw, Leslie, Brown, Lawrence, Rao, Anjana, Toker, Alex (2002):** *The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion.* Nature Cell Biology, Band 4, S. 540–544

**Jin, Ketao, Gao, Weili, Lu, Yanyan, Lan, Huanrong, Teng, Lisong, Cao, Feilin (2012):** *Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review)*. *Oncology Letters*, Band 3, S. 11–15

**Kalluri, Raghu, Weinberg, Robert (2009):** *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *Journal of Clinical Investigation*, Band 119, S. 1420–1428

**Katkoori, Venkat, Shanmugam, Chandrakumar, Jia, Xu, Vitta, Swaroop, Sthanam, Meenakshi, Callens, Tom, Messiaen, Ludwine, Chen, Dongquan, Zhang, Bin, Bumpers, Harvey, Samuel, Temesgen, Manne, Upender (2012):** *Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas*. *PLOS One*, Band 7/1, Artikelnummer e30020

**Kierszenbaum, Abraham, Tres, Laura (2019):** *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 5. Auflage, Elsevier

**Kijima, Hiroaki, Sawada, Tokihiko, Tomosugi, Naohisa, Kubota, Keiichi (2008):** *Expression of hepcidin mRNA is uniformly suppressed in hepatocellular carcinoma*. *BMC Cancer*, Band 8, Artikelnummer 167

**Kim, Dong-Yeop, Ryu, Chun-Geun, Jung, Eun-Joo, Paik, Jin-Hee, Hwang, Dae-Yong (2018):** *Brain metastasis from colorectal cancer: a single center experience*. *Annals of Surgical Treatment and Research*, Band 94/1, S. 13–18

**Kim, Kwonseop, Lu, Zifan, Hay, Elizabeth (2002):** *Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT*. *Cell Biology International*, Band 26/5, S. 463-476

**Kim, Y.S., Kaidina, A.M., Chiang, J.H., Yarygin, K.N., Lupatov, A.Y. (2017):** *Cancer stem cell molecular markers verified in vivo*. *Biochemistry Moscow Supplement Series B*, Band 11/1, S. 43–54

**Kirchner, Thomas, Müller-Hermelink, Hans Konrad, Roessner, Albert (07/2018):** *Kurzlehrbuch Pathologie*. 13. Auflage, Elsevier

**Kye, B.H., Kim, H.J., Kang, W.K., Cho, H.M., Hong, Y.K., Oh, S.T. (2012):** *Brain metastases from colorectal cancer: the role of surgical resection in selected patients.* Colorectal Disease, Band 14/7, S. e378-385

**Lee, Pei Yun, Costumbrado, John, Hsu, Chih-Yuan, Kim, Yong Hoon (2012):** *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.* Journal of Visualized Experiments, Band 62, Artikelnummer e3923

**Li, Jun, Ye, Lin, Sun, Ping-Hui, Satherley, Lucy, Hargest, Rachel, Zhang, Zhongtao, Jiang, Wen (2015):** *MTA1 Is Up-regulated in Colorectal Cancer and Is Inversely Correlated with Lymphatic Metastasis.* Cancer Genomics & Proteomics, Band 12/6, S. 339-345

**Li, Xiao-Lan, Zhou, Jianbiao, Chen, Zhi-Rong, Chng, Wee-Joo (2015):** *p53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation.* World Journal of Gastroenterology, Band 21/1, S. 84–93

**Li, Zi-Nan, Zhao, Lin, Yu, Li-Feng, Wei, Min-Jie (2020):** *BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy.* Gastroenterology Report, Band 8/3, S. 192–205

**Loomans, Holli, Andl, Claudia (2016):** *Activin receptor-like kinases: a diverse family playing an important role in cancer.* American Journal of Cancer Research, Band 6/11, S. 2431–2447

**Lu, Shaoyong, Jang, Hyunbum, Nussinov, Ruth, Zhangb, Jian (2016):** *The Structural Basis of Oncogenic Mutations G12, G13 and Q61 in Small GTPase K-Ras4B.* Scientific Reports, Band 6, Artikelnummer 21949

**Lugli, A., Zlobec, I., Minoo, P., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J.R. (2007):** *Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis.* Histopathology, Band 50/4, S. 453-464

**Macherey-Nagel™ (02/2017):** *PCR Clean-up, Gel Extraction - User Manual*. 4. Revision

**Malesci, Alberto, Laghi, Luigi, Bianchi, Paolo, Delconte, Gabriele, Randolph, Ann, Torri, Valter, Carnaghi, Carlo, Doci, Roberto, Rosati, Riccardo, Montorsi, Marco, Roncalli, Massimo, Gennari, Leandro, Santoro, Armando (2007):** *Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer*. *Clinical Cancer Research*, Band 13/13, S. 3831-3839

**Michl, M., Taverna, F., Kumbrink, J., Schiergens, T. S., Heinemann, V., Engel, J., Kirchner, T., Neumann, J. (2021):** *Biomarker alterations associated with distinct patterns of metastatic spread in colorectal cancer*. *Virchows Archiv*, Band 478/4, S. 695-705

**Michl, Marlies, Thurmaier, Johannes, Schubert-Fritschle, Gabriele, Wiedemann, Max, Laubender, Rüdiger, Nüssler, Natascha, Ruppert, Reinhard, Kleeff, Jörg, Schepp, Wolfgang, Reuter, Clemens, Löhe, Florian, Karthaus, Meinolf, Neumann, Jens, Kirchner, Thomas, Engel, Jutta, Heinemann, Volker (2015):** *Brain Metastasis in Colorectal Cancer Patients: Survival and Analysis of Prognostic Factors*. *Clinical colorectal cancer*, Band 14/4, S. 281-290

**Modest, D.P., Ricard, I., Heinemann, V., Hegewisch-Becker, S., Schmiegel, W., Porschen, R., Stintzing, S., Graeven, U., Arnold, D., von Weikersthal, L.F., Giessen-Jung, C., Stahler, A., Schmoll, H.J., Jung, A., Kirchner, T., Tannapfel, A., Reinacher-Schick, A. (2016):** *Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group*. *Annals of Oncology*, Band 27, S. 1746-1753

**Murken, Jan, Grimm, Tiemo, Holinski-Feder, Elke (2006):** *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 7. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag

**Nagy, Laura E. (2008):** *Alcohol: Methods and Protocols*. 1. Auflage, Springer Science & Business Media

**Neuhofer, Wolfgang (2010):** *Role of NFAT5 in Inflammatory Disorders Associated with Osmotic Stress.* Current Genomics, Band 11/8, S. 584–590

**Neumann, Jens, Horst, David, Kriegl, Lydia, Maatz, Susanne, Engel, Jutta, Jung, Andreas, Kirchner, Thomas (2012):** *A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer.* Histopathology 2012, Band 60, S. 416-426

**Nowack, Amy, Yao, Jia, Custer, Kenneth, Bajjalieh, Sandra (2010):** *SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, Band 299/5, S. C960-967

**Pantsar, Tatu (2020):** *The current understanding of KRAS protein structure and dynamics.* Computational and Structural Biotechnology Journal, Band 18, S. 189–198

**Pereira, A., Rego, J., Morris, V., Overman, M., Eng, C., Garrett, C., Boutin, A., Ferrarotto, R., Lee, M., Jiang, Z-Q., Hoff, P., Vauthey, J-N., Vilar, E., Maru, D., Kopetz, S. (2015):** *Association between KRAS mutation and lung metastasis in advanced colorectal cancer.* British Journal of Cancer, Band 112/3, S. 424–428

**Phelps, Reid, Chidester, Stephanie, Dehghanizadeh, Somaye, Phelps, Jason, Sandoval, Imelda, Rai, Kunal, Broadbent, Talmage, Sarkar, Sharmistha, Burt, Randall, Jones, David (2009):** *A two step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss.* Cell, Band 137/4, S. 623–634

**Prasanna, Thiru, Karapetis, Christos, Roder, David, Tie, Jeanne, Padbury, Robert, Price, Timothy, Wong, Rachel, Shapiro, Jeremy, Nott, Louise, Lee, Margaret, Chua, Yu Jo, Craft, Paul, Piantadosi, Cynthia, Sorich, Michael, Gibbs, Peter, Yip, Desmond (2018):** *The survival outcome of patients with metastatic colorectal cancer based on the site of metastases and the impact of molecular markers and site of primary cancer on metastatic pattern.* Acta Oncologica, Band 57/11, S. 1438-1444

**Qiagen® (10/2010): *HotStarTaq® PCR Handbook***

URL: <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=53e71936-cf64-4a9b-a9d2-fccee4868aa7&lang=en> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiagen® (12/2014): *QIAamp® DNA Micro Handbook*. 3. Auflage**

URL: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=085e6418-1ec0-45f2-89eb-62705f86f963&lang=en> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiagen® (04/2015): *QIAcube® Protocol Sheet: RNeasy FFPE - 1-2 FFPE tissue sections - DNase digest***

URL: <https://www.qiagen.com/us/qiacube/standard/protocolview.aspx?StandardProtocolID=1273> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiagen® (01/2016): *PyroMark® Q24 User Manual*. Version 5**

URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=59f0275d-e60f-4517-b786-b0e0ca13952e&lang=en> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiagen® (09/2019): *QIAcube® Connect User Manual***

URL: <https://www.qiagen.com/nl/resources/resourcedetail?id=40c8ffa5-8662-434d-ba70-5a098d1294c4&lang=en> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiagen® (01/2020): *RNeasy® FFPE Handbook***

URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=7b8ed707-c2d6-4b9e-a1ba-8893935622f9&lang=en> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Qiu, Miaozen, Hu, Jianming, Yang, Dajun, Cosgrove, David Peter, Xu, Ruihua (2015): *Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study*. Oncotarget. Band 6, S. 38658-38666**

**Ricci-Vitiani, Lucia, Lombardi, Dario, Pilozi, Emanuela, Biffoni, Mauro, Todaro, Matilde, Peschle, Cesare, De Maria, Ruggero (2007): *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, Band 445, S. 111–115**

**Robert-Koch-Institut (Hrsg.) (2016):** *Gesundheit in Deutschland – die wichtigsten Entwicklungen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis.* Berlin, Robert-Koch-Institut

URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsGiD/2015/kurzfassung\\_gesundheit\\_in\\_deutschland.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsGiD/2015/kurzfassung_gesundheit_in_deutschland.pdf?_blob=publicationFile) (aufgerufen am 15.09.2020)

**Roche Diagnostics GmbH (08/2017):** *LightCycler® 480 Probes Master.* Version 11

URL: [https://lifescience.roche.com/en\\_de/products/lightcycler14301-480-probesmaster.html#documents](https://lifescience.roche.com/en_de/products/lightcycler14301-480-probesmaster.html#documents) (aufgerufen am 29.04.2020)

**Schiavinato, Alvise, Becker, Ann-Kathrin, Zanetti, Miriam, Corallo, Diana, Milanetto, Martina, Bizzotto, Dario, Bressan, Giorgio, Guljelmovic, Marija, Paulsson, Mats, Wagener, Raimund, Braghetta, Paola, Bonaldo, Paolo (2012):** *EMILIN-3, Peculiar Member of Elastin Microfibril Interface-located Protein (EMILIN) Family, Has Distinct Expression Pattern, Forms Oligomeric Assemblies, and Serves as Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Antagonist.* *Journal of Biological Chemistry*, Band 287/14, S. 11498–11515

**Sen, Nirmalya, Gui, Bin, Kumar, Rakesh (2014):** *Role of MTA1 in Cancer Progression and Metastasis.* *Cancer and Metastasis Reviews*, Band 33/4, S. 879–889

**Shang, Shuang, Hua, Fang, Hu, Zhuo-Wei (2017):** *The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities.* *Oncotarget*, Band 8/20, S. 33972–33989

**Shi, Yigong, Massagué, Joan (2003):** *Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus.* *Cell*, Band 113/6, S. 685-700

**Sorbye, H., Köhne, C.-H., Sargent, D.J., Glimelius, B. (2007):** *Patient characteristics and stratification in medical treatment studies for metastatic colorectal cancer: A proposal for standardization of patient characteristic reporting and stratification.* *Annals of Oncology*, Band 18/10, S. 1666-1672

**Stolze, Britta, Reinhart, Stefanie, Bullinger, Lars, Fröhling, Stefan, Scholl, Claudia (2015):** *Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61 and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines.* Scientific Reports, Band 5, Artikelnummer: 8535

**Taieb, Julien, Jung, Andreas, Sartore-Bianchi, Andrea, Peeters, Marc, Seligmann, Jenny, Zaanan, Aziz, Burdon, Peter, Montagut, Clara, Laurent-Puig, Pierre (2019):** *The Evolving Biomarker Landscape for Treatment Selection in Metastatic Colorectal Cancer.* Drugs, Band 79, S. 1375–1394

**Tan, W.S., Ho, K.S., Eu, K.W. (2009):** *Brain metastases in colorectal cancers.* World journal of surgery, Band 33/4, S. 817-821

**Thermo Fisher Scientific (09/2011):** *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual.* Version 3.8

**Thermo Fisher Scientific (06/2016):** *Product Information Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase*

URL: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012757\\_RevertAid\\_Reverse\\_Transcriptase\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUmV2ZXJ0QWlkIFJldmVyc2UgVHJhbnNjcmlwdGFzZQ==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012757_RevertAid_Reverse_Transcriptase_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUmV2ZXJ0QWlkIFJldmVyc2UgVHJhbnNjcmlwdGFzZQ==) (aufgerufen am 29.04.2020)

**Tie, Jeanne, Lipton, Lara, Desai, Jayesh, Gibbs, Peter, Jorissen, Robert, Christie, Michael, Drummond, Katharine, Thomson, Benjamin, Usatoff, Valery, Evans, Peter, Pick, Adrian, Knight, Simon, Carne, Peter, Berry, Roger, Polglase, Adrian, McMurrick, Paul, Zhao, Qi, Busam, Dana, Strausberg, Robert, Domingo, Enric, Tomlinson, Ian, Midgley, Rachel, Kerr, David, Sieber, Oliver (2011):** *KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer.* Clinical Cancer Research, Band 17, S. 1122-1130

**Tripathi, Kiran, Garg, Minal (2018):** *Mechanistic regulation of epithelial-to-mesenchymal transition through RAS signaling pathway and therapeutic implications in human cancer.* Journal of Cell Communication and Signaling, Band 12/3, S. 513–527



**Tsilimigras, Diamantis, Ntanasis-Stathopoulos Ioannis, Bagante, Fabio, Moris, Demetrios, Cloyd, Jordan, Spartalis, Eleftherios, Pawlik, Timothy (2018):** *Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence.* Surgical Oncology, Band 27, S. 280-288

**Tumorregister München (2020):** *ICD-10 C18-C20: Darmtumor - Inzidenz und Mortalität.*

URL: <https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC1820G-ICD-10-C18-C20-Darmtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf> (aufgerufen am 12.11.2020)

**Udali, Silvia, Castagna, Annalisa, Corbella, Michela, Ruzzenente, Andrea, Moruzzi, Sara, Mazzi, Filippo, Campagnaro, Tommaso, De Santis, Domenica, Franceschi, Antonia, Pattini, Patrizia, Gottardo, Rossella, Olivieri, Oliviero, Perbellini, Luigi, Guglielmi, Alfredo, Choi, Sang-Woon, Girelli, Domenico, Friso, Simonetta (2018):** *Hepcidin and DNA promoter methylation in hepatocellular carcinoma.* European Journal of Clinical Investigation, Band 48/2, Artikelnummer e12870

**Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J.-Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., Heinemann, V., Hoff, P., Köhne, C.-H., Labianca, R., Laurent-Puig, P., Ma, B., Maughan, T., Muro, K., Normanno, N., Österlund, P., Oyen, W. J. G., Papamichael, D., Pentheroudakis, G., Pfeiffer, P., Price, T. J., Punt, C., Ricke, J., Roth, A., Salazar, R., Scheithauer, W., Schmoll, H. J., Taberero, J., Taïeb, J., Tejpar, S., Wasan, H., Yoshino, T., Zaanan, A., Arnold, D. (2016):** *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer.* Annals of Oncology, Band 27, S. 1386–1422

URL: <https://www.esmo.org/guidelines/gastrointestinal-cancers/metastatic-colorectal-cancer/management-of-patients-with-metastatic-colorectal-cancer> (aufgerufen am 22.04.2020)

**Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. (2014):** *Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Annals of Oncology, Band 25, Supplement 3, III1-III9

**Van der Geest, Lydia, Lam-Boer, Jorine't, Koopman, Miriam, Verhoef, Cees, Elferink, Marloes, de Wilt, Johannes (2015):** *Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases.* Clinical & experimental metastasis, Band 32, S. 457–465

**Wang, Shui-Ming, Jiang, Bin, Deng, Youping, Huang, Shu-Liang, Fang, Ming-Zhi, Wang, Yu (2019):** *Clinical significance of MLH1/MSH2 for stage II/III sporadic colorectal cancer.* World Journal of Gastrointestinal Oncology, Band 11/11; S. 1065–1080

**Wanitsuwan, Worrawit, Kanngurn, Samornmas, Boonpipattanapong, Teeranut, Sangthong, Rassamee, Sangkhathat, Surasak (2008):** *Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers.* World Journal of Gastroenterology, Band 14/39, S. 6052–6059

**Xiao, Yanping, Freeman, Gordon (2015):** *The Microsatellite Instable (MSI) Subset of Colorectal Cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy.* Cancer Discovery, Band 5/1, S. 16–18

**Yemelyanova, Anna, Vang, Russell, Kshirsagar, Malti, Lu, Dan, Marks, Morgan A., Shih, Ie Ming, Kurman, Robert J. (2011):** *Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis.* Modern Pathology, Band 24, S. 1248–1253

**Yoshida, Naohiro, Kinugasa, Tetsushi, Ohshima, Koichi, Yuge, Kotaro, Ohchi, Takafumi, Fujino, Shinya, Shiraiwa, Sachiko, Katagiri, Mitsuhiro, Akagi, Yoshito (2015):** *Analysis of Wnt and  $\beta$ -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer.* Anticancer Research, Band 35/8, S. 4403-4410

**Zeisberg, Michael, Neilson, Eric (2009):** *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. Journal of Clinical Investigation, Band 119/6, S. 1429–1437

**Zentrum für Krebsregisterdaten (11/2016):** *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Berlin, Robert Koch-Institut

URL: [https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3264/28oaKVmif0wDk.pdf?](https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3264/28oaKVmif0wDk.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

sequence=1&isAllowed=y (aufgerufen am 11.09.2020)

**Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019):** *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Auflage, Berlin, Robert Koch-Institut

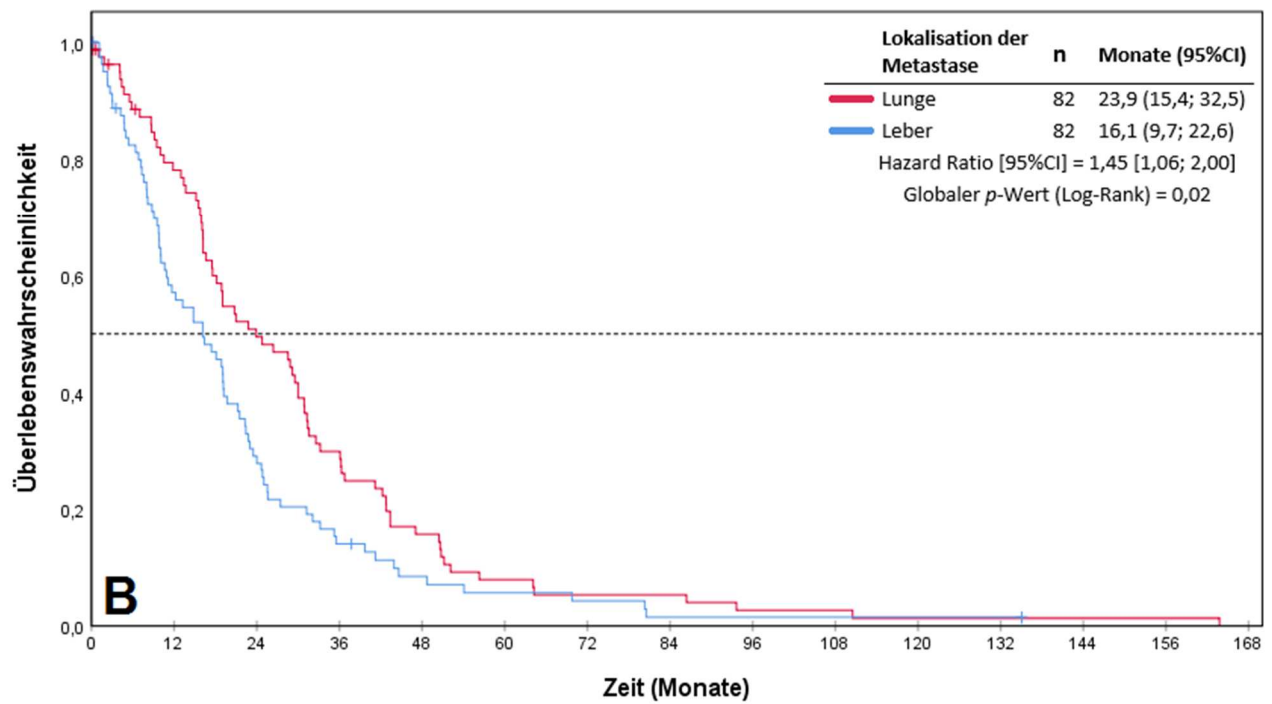
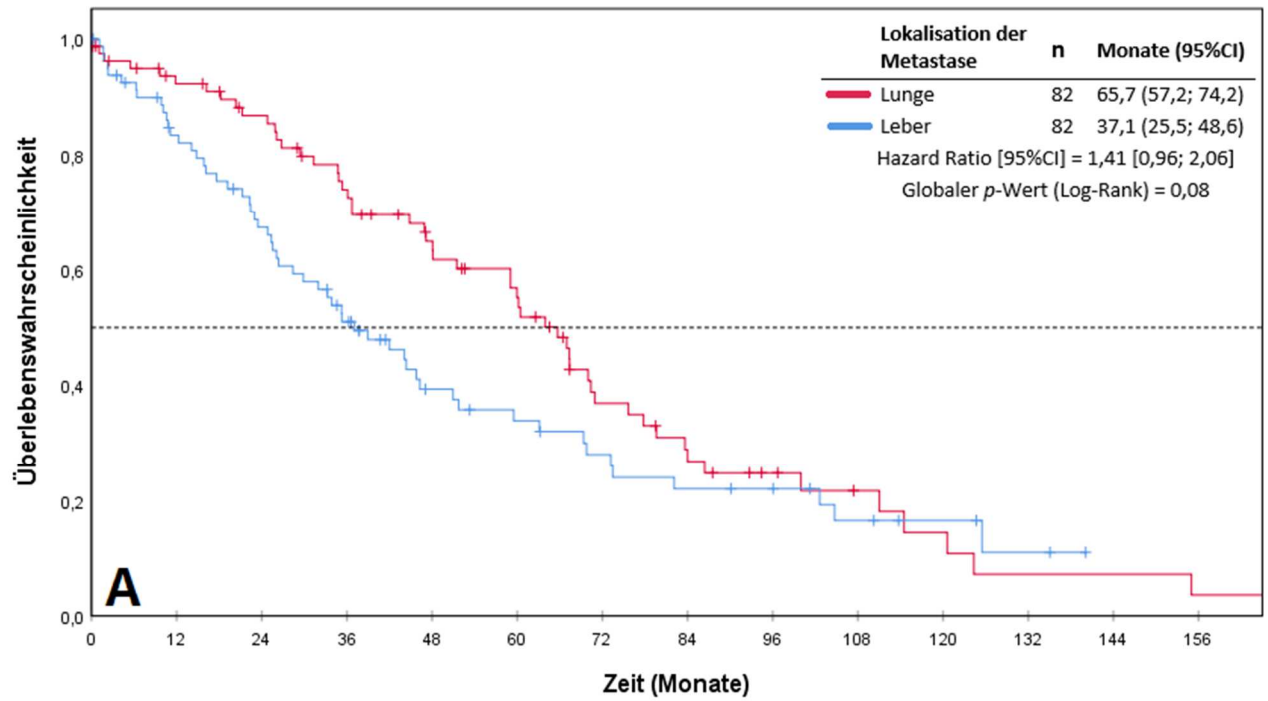
URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile) (aufgerufen am 11.09.2020)

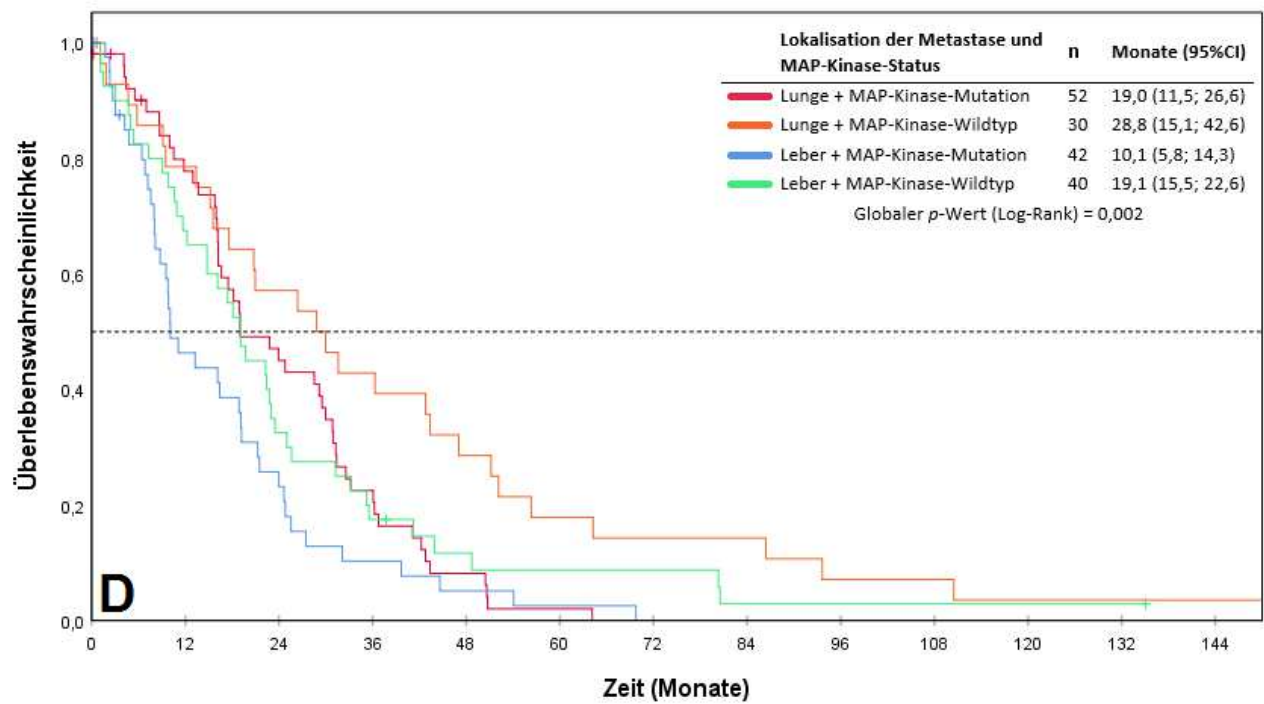
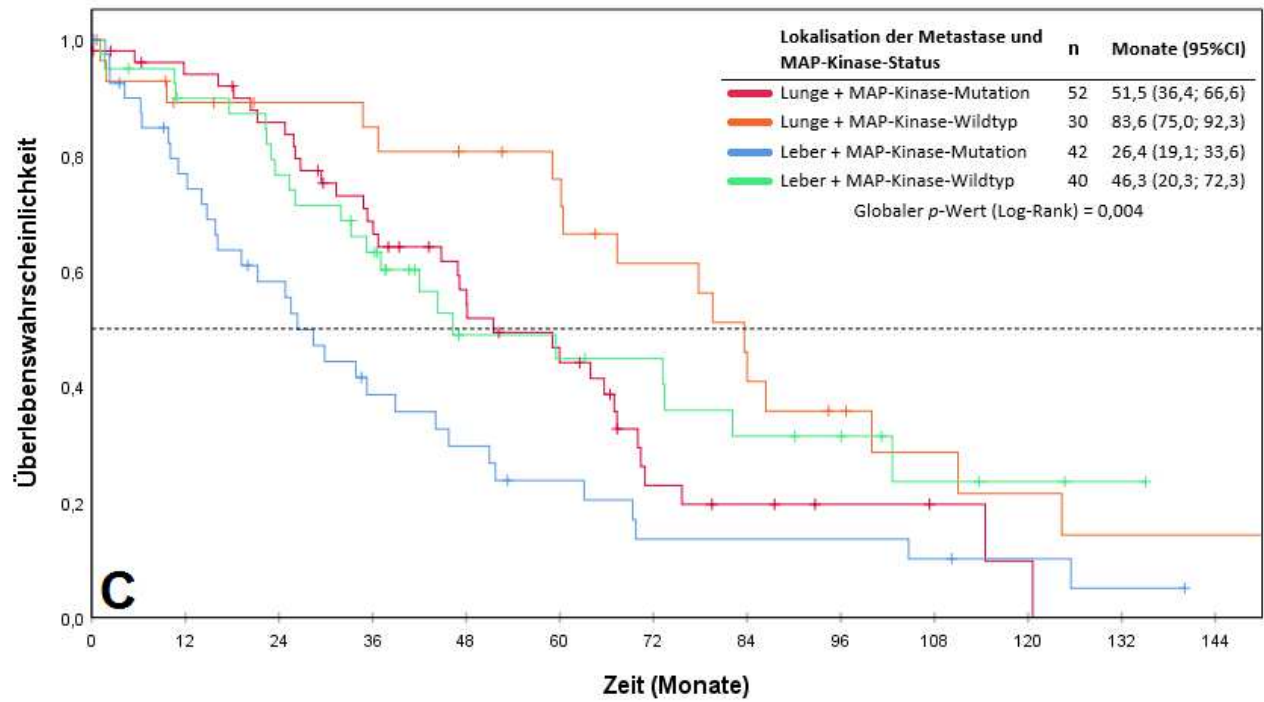
**Zilfou, Jack, Lowe, Scott (2009):** *Tumor Suppressive Functions of p53*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Band 1/5, Artikelnummer a001883

**Zlobec, Inti, Baker, Kristi, Minoo, Parham, Jass, Jeremy, Terracciano, Luigi, Lugli, Alessandro (2008):** *Node-negative colorectal cancer at high risk of distant metastasis identified by combined analysis of lymph node status, vascular invasion, and Raf-1 kinase inhibitor protein expression*. Clinical Cancer Research, Band 14/1, S. 143-148

# Anhang

Vergrößerung der Abbildung 11 (siehe S. 85):





## **Danksagung**

Ich bedanke mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med.-univ. Jens Neumann und Frau PD Dr. med. Marlies Michl, die mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen und die mich zusammen mit Herrn PD Dr. med. Jan D'Haese hervorragend betreut haben. Besonders danke ich ihnen für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei allen Problemen, die im Laufe der Promotion entstanden sind.

Zudem bedanke ich mich noch bei der gesamten Arbeitsgruppe und dem Labor des Pathologischen Instituts der LMU München für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, den wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Und schließlich bedanke ich mich noch ganz besonders bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung während meines Studiums und während der Promotion, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

# Affidavit

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Francesco Taverna, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

*Untersuchung zu prognostischen Gewebemarkern für unterschiedliche organotrope Metastasierungswege beim kolorektalen Karzinom*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 09.04.2022

Francesco Taverna

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

# Lebenslauf



## Publikationsliste

Teile der Dissertation sind bereits in folgender Publikation veröffentlicht worden:

**Michl, M., Taverna, F., Kumbrink, J., Schiergens, T. S., Heinemann, V., Engel, J., Kirchner, T., Neumann, J. (2021):** *Biomarker alterations associated with distinct patterns of metastatic spread in colorectal cancer.* Virchows Archiv, Band 478/4, S. 695-705

Weitere Publikation:

**Thurmaier, Johannes, Heinemann, Volker, Engel, Jutta, Schubert-Fritschle, Gabriele, Wiedemann, Max, Nüssler, Natascha, Ruppert, Reinhard, Kleeff, Jörg, Schepp, Wolfgang, Löhe, Florian, Karthaus, Meinolf, Neumann, Jens, Kumbrink, Jörg, Taverna, Francesco, Stahler, Arndt, Heinrich, Kathrin, Westphalen, Christoph Benedikt, Holch, Julian, Kirchner, Thomas, Michl, Marlies (2020):** *Patients with colorectal cancer and brain metastasis: The relevance of extracranial metastatic patterns predicting time intervals to first occurrence of intracranial metastasis and survival.* International Journal of Cancer, Band 148/8, S.1919-1927