

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Tumorheterogenität am Beispiel des Kolonkarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Wätzoldt, geb. Melching

aus Wuppertal

Datum der Promotion: 06.03.2020

Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Tumoren und sind einer der Hauptgründe Tumor-verursachter Mortalität. Sie entstehen durch die Anhäufung typischer Veränderungen, wie Mutationen in den Genen APC, TP53 und KRAS sowie den Verlust und Gewinn chromosomaler Abschnitte.

Durch das Auftreten neuer Eigenschaften in nur einem Teil der Tumorzellen kann es innerhalb eines Tumors zur Entstehung von intratumoraler Heterogenität kommen. Ein Tumor besteht dann aus mehreren Subklonen, die sich hinsichtlich ihres genetischen Profils sowie ihrer Morphologie unterscheiden können. Intratumorale Heterogenität ist in der Diagnostik auf genetischer Ebene nicht ohne weiteres erfassbar und hat Auswirkungen auf den Verlauf von Tumorerkrankungen. Liegt in einem Tumor Heterogenität vor, so spiegelt ein einzelner Teil des Tumors nicht seine Gesamtheit wider. Regional unterschiedliche Veränderungen werden dann durch eine einzelne Biopsie nicht ausreichend erfasst. Wenn nicht das gesamte Profil des Tumors bekannt ist, kann die Therapie nicht adäquat gewählt werden. Bei der Therapie eines Tumors kommt es nach einem gutem initialen Ansprechen häufig zu einem Rezidiv der Erkrankung. Eine der möglichen Ursachen dafür ist das Vorliegen von resistenten Tumorzellen, die die Grundlage für ein erneutes Tumorwachstum darstellen können. Intratumorale Heterogenität auf der Ebene der Morphologie ist schon lange bekannt. Durch den Gebrauch neuer Sequenzierverfahren hat nun auch die Analyse von intratumoraler genetischer Heterogenität in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Kolonkarzinom in 68 Proben unterteilt. In 100 ausgewählten Genen werden Mutationen und Kopienzahl-Veränderungen analysiert. Für die Mutationsanalyse wird die Sequenziermaschine *PGM*[™] verwendet, die Analyse der Kopienzahlen erfolgt mittels CNVPanelizer. Eine Verifizierung wird mit davon unabhängigen Methoden, der Sanger-Sequenzierung sowie quantitativer Polymerasekettenreaktion bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, durchgeführt. Es zeigt sich, dass in dem untersuchten Kolonkarzinom zwei homogen verteilte Hotspot-Mutationen in APC und TP53 vorliegen. Die Kopienzahl-Veränderungen weisen hingegen in einigen Genen Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorproben auf. Mittels Clusteranalyse und dreidimensionaler Rekonstruktion kann gezeigt werden, dass sich die Tumorproben in zwei Clustern entlang der oral-aboralen Achse des Tumors anordnen.

Abstract

Colorectal cancers are one of the most frequent tumor diseases and one of the main causes of tumor-related mortality. Colorectal cancers arise due to typical alteration such as mutations in APC, TP53, and KRAS as well as chromosomal gains and deletions.

Intratumor heterogeneity occurs if only a part of the tumor cells gain new characteristics. This can happen at every cell division. In this case, the tumor can consist of several subclones. The subclones may differ in their genetic profile and morphology. Intratumor heterogeneity is important in diagnostics and therapy of tumors. Therefore, it can influence the course of disease. Often, tumors show a relapse after a good initial response to the therapy. One reason are resistant tumor cells in a subclone. In case of intratumor heterogeneity, a single biopsy does not represent all characteristics of the tumor. Subsequently, a therapy might not be chosen suitably. Resistant tumor cells do not respond to the therapy and can be the source of new tumor growth.

The presence of heterogeneous morphology in tumors is well known for a long time. Due to new sequencing technologies, e.g., Next Generation Sequencing, genetic intratumor heterogeneity becomes an important subject of research.

In this thesis, one colon cancer is investigated and therefore dissected into 68 distinct samples. Mutations and copy number variants (CNV) are analysed in a subset of 100 genes using the sequencing machine *PGMTM* and the CNVPanelizer. The analysis is verified by independent methods, such as Sanger sequencing, quantitative polymerase chain reaction, and fluorescence in situ hybridisation.

The analysis of the tumor reveals two hot spot mutations in APC and TP53, which are evenly distributed in the whole tumor. However, copy numbers are variable in several genes. In a three-dimensional reconstruction of the tumor, the samples show two clusters with differences in copy numbers along the aboral-oral axis.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumorheterogenität	1
1.2	Kolorektales Karzinom	6
1.3	Nachweis von Mutationen mit moderner Hochdurchsatz-Sequenzierung	8
1.4	Ziele der Arbeit	9
2	Methodik	10
2.1	Erstellen von Schnittpräparaten	10
2.2	Sequenzieren mit der <i>Ion Personal Genome Machine</i> [®]	10
2.3	Verifizierung der <i>PGM</i> [™] -Ergebnisse mit Sanger-Sequenzierung	14
2.4	CNVPanelizer: Analyse der Kopienzahlen	18
2.5	Verifizierung der CNVPanelizer-Ergebnisse mit qPCR	18
2.6	Verifizierung der CNVPanelizer-Ergebnisse mit FISH	22
2.7	Dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors	26
2.8	Material-Listen	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Einteilung des Tumors	29
3.2	Mutationsanalyse mittels CRC5.2 Panel Sequenzierung	31
3.3	Veränderung der Kopienzahlen	43
4	Diskussion	68
4.1	Räumliche Heterogenität der genetischen Veränderungen	68
4.2	Potentielle funktionelle Konsequenzen der beobachteten Veränderungen	70
4.3	Bewertung des methodischen Ansatzes	77
4.4	Ausblick	81
	Literaturverzeichnis	82
	Eidesstattliche Erklärung	93
	Lebenslauf	94
	Publikationsliste	95
	Danksagung	96

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse von intratumoraler Heterogenität im kolorektalen Karzinom. Dieses Kapitel beinhaltet die Einleitung der Arbeit und gibt einen Überblick über Tumorheterogenität, kolorektale Karzinome und für die Arbeit benötigte Methoden. Abschließend werden die Ziele der Arbeit erläutert.

1.1 Tumorheterogenität

Tumorheterogenität ist ein anerkanntes Problem in der Klinik. Sie ist auf morphologischer Ebene schon lange bekannt. Tumore verschiedener Gewebetypen weisen unterschiedliche genetische Profile auf und werden auf verschiedene Arten behandelt [1]. In den letzten Jahren hat die Tumorheterogenität durch neue Analyseverfahren wieder vermehrt an Bedeutung gewonnen. Neue Sequenzierungsverfahren wie Next Generation Sequencing (NGS) und die benötigte bioinformatische Auswertung sind hier entscheidend [2].

1.1.1 Formen von Heterogenität

Heterogenität kann sich auf die Unterschiede zwischen Tumoren verschiedener Patienten, auf die Unterschiede innerhalb eines Tumors oder auf die Unterschiede innerhalb mehrerer Tumorkläsionen eines Patienten beziehen.

Intertumorale Heterogenität beschreibt Unterschiede zwischen Tumoren des gleichen histologischen Subtypens einer Tumorentität, die von verschiedenen Patienten stammen. Es ist anerkannt, dass sich diese Tumore hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie genetischen Veränderungen, Ansprechen auf Therapien und Prognose voneinander unterscheiden [1]. Das basiert zum einen auf unterschiedlichen genetischen Profilen des Tumors wie Keimbahnmutationen des Patienten, zum anderen auf Unterschieden in der Mikroumgebung des Tumors [2]. Intratumorale Heterogenität hingegen bezieht sich auf die molekularen und histologischen Eigenschaften innerhalb eines einzelnen Tumors. Es kann innerhalb des Tumors zur Bildung von Subklonen kommen, die sich u.a. hinsichtlich ihres genetischen Profils und ihrer Morphologie unterscheiden. Bei jeder Zellteilung kann es zum Auftreten neuer Veränderungen kommen, die folglich Unterschiede zwischen den Zellen bewirken [3].

Das Konzept der inter- und intratumoralen Heterogenität trifft sowohl auf Primärtumore als auch auf Metastasen zu. Intermetastatische Heterogenität bezieht sich auf die Unterschiede zwischen zwei metastatischen Läsionen, meist des selben Patienten [4]. Metastasen von kolorektalen Tumoren entstehen aus einzelnen oder wenigen Zellen des Primärtumors, die sich über das Blut oder die Lymphe fortbewegen und in einer geeigneten Umgebung festsetzen [5]. Wenn sich die Gründerzellen der verschiedenen Metastasen voneinander unterscheiden, so findet man diese Unterschiede auch in den sich daraus entwickelnden Metastasen [6]. Intrametastatische Heterogenität beschreibt, dass es innerhalb einer metastatischen Läsion zur Bildung von Subklonen kommt [4]. Die Heterogenität innerhalb eines Patienten beschreibt die Heterogenität aller Tumorkläsionen dieses Patienten. Sie bezieht sich somit auf den Primärtumor und die vorhandenen Metastasen. Die Eigenschaften von Metastasen können sich deutlich von denen des Primärtumors unterscheiden. Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen lassen sich durch die Entstehung der Metastasen erklären. Wie oben beschrieben, entstehen Metastasen häufig nur aus einer oder wenigen Gründerzellen und spiegeln so nicht die Gesamtheit des Primärtumors wider [6]. Zudem können sich unterschiedliche Eigenschaften durchsetzen, wenn in den Läsionen verschiedene Mikroumgebungen mit variierendem Selektionsdruck vorliegen [1]. Für die effektive Behandlung eines Tumors muss die Gesamtheit der Tumoreigenschaften betrachtet und es müssen alle vorhandenen Tumorkläsionen einbezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit geht es ausschließlich um intratumorale Heterogenität. Vereinfachend wird der Begriff der intratumoralen Heterogenität im Folgenden mit „Heterogenität“ bezeichnet.

Heterogenität betrifft verschiedene Eigenschaften wie die Morphologie und Genetik eines Tumors [7]. Während der Nachweis von genetischer Heterogenität auf Ebene der Mutationen und der Kopienzahl relativ neu ist, sind morphologische Unterschiede schon lange bekannt. Ein Beispiel für morphologische Unterschiede innerhalb von kolorektalen Karzinomen ist das sog. *Tumor Budding*. Dabei unterscheiden sich die Zellen der Invasionsfront von denen des Tumorzentrums. *Tumor Budding* beschreibt, dass sich einzelne Zellen oder kleine Zellverbände an der Invasionsfront von dem Tumor lösen und in das umliegende Stroma einwandern [8]. Es kommt durch den Verlust von Zelladhäsion und Zytoskelettstrukturen zur epithelial-mesenchymalen Transition [9]. Die Zellen verlieren dabei ihren epithelialen Phänotyp und erlangen Eigenschaften, die wichtig für Invasion und Metastasierung sind [10]. Der Grund für die morphologischen Unterschiede liegt in der unterschiedlichen Expression von Proteinen wie β -Catenin und E-Cadherin zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum [11]. Hlubek et al. zeigen, dass sich Invasionsfront und Tumorzentrum in gut differenzierten Kolonkarzinomen hinsichtlich der Expression von β -Catenin-Targets voneinander unterscheiden. So sind Gene, die eine Rolle in der Invasivität eines Tumors spielen, in der Invasionsfront relativ zum Tumorzentrum erhöht vorhanden [12].

Genetische Heterogenität wurde für mehrere solide Tumore wie das Nierenzellkarzinom [13, 14], das Mammakarzinom [15], das hepatozelluläre Karzinom [16], das Magenkarzinom [17] sowie das kolorektale Karzinom [18, 19, 20] gezeigt.

Im kolorektalen Karzinom konnten Kosmidou et al. Unterschiede in der räumlichen Verteilung von KRAS-Mutationen nachweisen [18]. Lu et al. haben in drei kolorektalen Karzinomen Heterogenität u.a. in den Genen APC, BRCA2, ERBB4 und TP53 detektiert [20]. Sottoriva et al. konnten außerdem regionale Unterschiede der Kopienzahlen in kolorektalen Karzinomen zeigen [19]. Im Magenkarzinom wurde Heterogenität der Kopienzahlen mittels FISH für die Gene CCND1, EGFR, HER2 und MYC gezeigt. Dabei ist die Amplifikation dieser Gene regional unterschiedlich stark ausgeprägt [17]. Mittels FISH werden Veränderungen in der Anzahl eines ausgewählten Gens auf Zellebene bestimmt. Dafür wird eine spezifische Gen-Sonde eingesetzt. Zusätzlich wird die Sonde des dazugehörigen Zentromers verwendet, um zwischen einer Aneuploidie und einer lokalen Amplifikation bzw. Deletion zu unterscheiden [21]. Das Vorliegen von intratumoraler Heterogenität wurde von Yates et al. ebenfalls für Mutationen im Mammakarzinom gezeigt. Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzierung wurde außerdem eine Analyse der Kopienzahl ausgewählter Gene durchgeführt [15]. Die Detektion von Kopienzahl-Veränderungen ist außerdem mittels qPCR möglich. Die qPCR wird bisher vor allem für die Analyse von Genexpressionen verwendet. Die Verwendung für die Detektion von Kopienzahl-Veränderungen wurde 2010 von D'haene et al. [22] und Weavers et al. [23] beschrieben. Die Menge der vorhandenen DNA eines Gens wird dabei für eine Tumorseite mit einer Referenzprobe verglichen. So kann ermittelt werden, ob das Gen im Tumor vermindert oder vermehrt vorliegt [22].

1.1.2 Entstehung von intratumoraler Heterogenität

Peter Nowell beschreibt die Tumorentstehung als einer der Ersten als evolutionären Prozess. Er geht von einer Gründerzelle aus, die durch genetische Veränderung einen Wachstumsvorteil erlangt. Diese Zelle teilt sich und ihre Nachkommen setzen sich im Verhältnis zu umliegenden gesunden Zellen vermehrt durch [24]. Gerlinger und Swanton unterstützen diese These auf der Basis moderner Hochdurchsatzdaten und ziehen den Vergleich zur Evolutionstheorie von Charles Darwin. Günstige Eigenschaften werden positiv selektiert, während sich andere nicht durchsetzen [3]. Die Zellen eines Tumors tragen sowohl Veränderungen, die in der Gründerzelle des Tumors vorhanden waren, als auch solche, die erst im Laufe der Entwicklung in einigen Zellen entstanden sind [3]. Es wird zwischen überall vorliegenden, sogenannten klonalen, und zwischen nicht überall vorliegenden, sogenannten subklonalen, Eigenschaften eines Tumors unterschieden. Die Präsenz einer Veränderung innerhalb des Tumors hängt u.a. von dem Zeitpunkt ihrer Entstehung ab [19]. Veränderungen, die früh in der Tumorentwicklung auftreten, sind in allen Tumorzellen vorhanden. Diese Veränderungen

umfassen die Initiator Mutationen, die für die Entstehung des Tumors nötig sind [25]. Später auftretende Eigenschaften sind häufig nur in einem Teil des Tumors präsent und stellen somit Heterogenität dar [19]. Das Ausmaß der Verteilung einer Veränderung innerhalb des Tumors ist auch abhängig davon, wie gut sich diese durchsetzen kann. Bestimmte Veränderungen sind so potent, dass die Zellen, die diese tragen, alle anderen Zellen verdrängen. Die Folge ist eine lineare Tumorentwicklung, bei der Veränderungen klonal vorkommen.

Aufgrund der ständigen Zellteilung kommt es in Tumoren zur Selektion von Eigenschaften. Die Tumorzellen konkurrieren um Platz und Nährstoffe und nur die Stärksten setzen sich durch [26]. Neu auftretende Eigenschaften führen dazu, dass sich Zellen voneinander unterscheiden. Die meisten Veränderungen, die bei Zellteilungen zufällig entstehen, setzen sich jedoch nicht durch. Zum einen kann es sich dabei um neutrale Eigenschaften handeln, die keinen Wachstumsvorteil bringen, zum anderen kann es zur Entstehung von negativen Eigenschaften kommen, die zum Absterben der Zellen führen [26]. Nur in einigen Fällen kommt es zu Veränderungen, die Wachstumsvorteile bringen. Zellen mit solchen Veränderungen setzen sich vermehrt durch und können den Ausgang eines neuen Subklons darstellen [3].

Ein wichtiger Grund für die Entstehung von Heterogenität ist die genetische Instabilität von Tumoren [1]. Genetische Instabilität führt zu höheren Mutationsraten und verstärkt so die Entwicklung parallel vorliegender Subklone in einem Tumor [3]. Gründe für genetische Instabilität liegen u.a. in Defekten der Chromosomensegregation, erhöhter Exposition gegenüber Mutagenen sowie in einem Verlust von DNA-Reparaturmechanismen [25]. Mechanismen zur DNA-Reparatur setzen sich aus der Detektion von Schäden der DNA, dem Schutz vor Mutagenen und der direkten Reparatur geschädigter DNA-Abschnitte durch Reparaturproteine zusammen. DNA-Reparaturmechanismen halten physiologischerweise die Rate an DNA-Defekten gering [27]. Zwei wichtige Beispiele für Reparaturproteine sind MLH1 und MSH2, die fehlerhaft eingebaute Nukleotide bei der DNA-Replikation erkennen und beseitigen [28]. Durch Defekte der Reparaturmechanismen kommt es in den betroffenen Zellen zu erhöhten Mutationsraten. Außerdem können diese Zellen durch fehlende Zellzykluskontrolle positiv selektiert werden [3].

1.1.3 Bedeutung von Heterogenität für die Therapie

Liegt in einem Tumor Heterogenität vor, so spiegelt ein einzelner Teil des Tumors nicht seine Gesamtheit wider [29]. So werden regional unterschiedliche Veränderungen durch eine einzelne Biopsie nicht ausreichend erfasst [30]. Wenn nicht das gesamte Profil des Tumors bekannt ist, kann die Therapie ggf. nicht adäquat gewählt werden. Bei der Durchführung einer Therapie wird ein großer Selektionsdruck auf die Tumorzellen gelegt. Eine erfolgreiche Therapie muss idealerweise gegenüber allen vorhandenen Subklonen effektiv sein. Ist sie das

nicht, kommt es zunächst zur drastischen Reduktion der Tumorzellen, die sensitiv gegenüber der Therapie sind [26]. Subklonal vorhandene Tumorzellen, die resistent gegenüber der Therapie sind, werden jedoch nicht erreicht und können sich anschließend vermehrt ausbreiten [31]. Die Therapie selektiert somit die ihr gegenüber resistenten Zellen, die häufig als minimaler Anteil im Tumor vorliegen [32]. Es kommt zu einer dramatischen Reduktion der Heterogenität, die sich anschließend, ausgehend von den verbleibenden, resistenten Zellen, wieder aufbauen kann [3]. Dieser Prozess spielt in der gezielten Tumorthherapie eine besondere Rolle. Aufgrund der Einzigartigkeit eines jeden Tumors ist es sinnvoll, die Therapie auf die vorhandenen Eigenschaften abzustimmen [7]. So werden bei der gezielten Tumorthherapie ausgewählte Strukturen der Tumorzellen direkt angegriffen. Die Effizienz einer Behandlung kann durch die gezielte Tumorthherapie gesteigert werden, während die Toxizität für den Patienten reduziert wird [33]. Liegen vor Therapiebeginn resistente Zellen vor, werden diese positiv selektiert, was zu einem Versagen der Therapie führen kann [34]. Beispielhaft sind hier EGFR-Inhibitoren für die Therapie kolorektaler Karzinome zu nennen, die bei einer vorliegenden KRAS-Mutation ineffektiv sind. Deshalb werden EGFR-Inhibitoren ausschließlich bei KRAS-negativen kolorektalen Karzinomen angewendet [18]. Liegt innerhalb eines Tumors eine KRAS-Mutation in einer geringen Häufigkeit vor, wird sie möglicherweise durch konventionelle Diagnostik nicht detektiert. Der Tumor wird folglich fälschlicherweise als KRAS-negativ eingestuft und konsekutiv mit EGFR-Inhibitoren behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass der Therapieerfolg von EGFR-Inhibitoren bei metastasierten kolorektalen Karzinomen maßgeblich davon abhängt, ob ein Tumor tatsächlich KRAS-negativ ist, oder ob die Mutation in einer geringen Häufigkeit vorliegt. Die Ansprechrate von KRAS-negativen Tumoren auf die Therapie mittels EGFR-Inhibitor ist dabei deutlich höher [35].

Aufgrund der beschriebenen Selektion kommt es bei der Therapie von Tumoren häufig nach einem initial gutem Ansprechen zu einem Rezidiv der Erkrankung [34]. Rezidive gehen häufig mit einer Metastasierung einher. Die nicht behandelbare Metastasierung stellt die Haupttodesursache von an Tumoren erkrankten Patienten dar [6]. Die Entwicklung von Resistenzen ist entscheidend für den Verlauf einer Tumorerkrankung. Es kann zwischen primären und sekundären Resistenzen unterschieden werden. Bei primären Resistenz reagieren die Tumoren bereits initial nicht auf die Therapie. Bei sekundären Resistenzen kommt es zunächst zu einem Ansprechen der Therapie, die Resistenz entsteht im Laufe der Zeit [7]. Eine Möglichkeit für die Entstehung von sekundären Resistenzen ist der Erwerb neuer Eigenschaften während der Therapie [7]. Die resistenten Zellen entstehen dabei zufällig und getriggert durch den hohen Selektionsdruck der Therapie [34]. Eine Resistenz kann außerdem auf der Grundlage von Heterogenität entstehen, wobei die resistenten Zellen dabei schon vor Therapiebeginn mit einer geringen Häufigkeit vorliegen. Erst unter dem Selektionsdruck der Therapie kommt ihre Veränderung zum Tragen [25]. Die resistenten Zellen stellen dann die Grundlage für ein neues Tumorstadium dar.

1.2 Kolorektales Karzinom

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Tumoren und sind einer der Hauptgründe Tumor-verursachter Mortalität [9]. Ungefähr ein Drittel der Patienten mit kolorektalen Karzinomen stirbt an der Erkrankung [36]. Bei den kolorektalen Karzinomen wird zwischen hereditären und sporadischen Formen unterschieden.

Der APC/ β -Catenin/WNT-Signalweg ist der wichtigste Tumorsuppressor-Signalweg in kolorektalen Karzinomen. Sporadische Formen des kolorektalen Karzinoms haben zu 70-80 % eine APC-Mutation, die APC inaktiviert und zu einer Überaktivierung des WNT-Signalweges führt [36]. Weiterhin werden in 5 % der Tumoren aktivierende Mutationen im CTNNB1-Gen (β -Catenin) gefunden [37]. Zudem ist in den meisten kolorektalen Karzinomen der TGF- β -Signalweg verändert. Dabei spielen die Rezeptor-Gene TGFBR2 und TGFBR1 sowie Gene im nachgeschalteten Signalweg wie SMAD2 und SMAD4 eine entscheidende Rolle. SMAD4 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 18, welches häufig von einer Deletion betroffen ist [38], Mutationen in SMAD4 kommen zusätzlich in 10-15 % der kolorektalen Karzinome vor [36]. Das Protoonkogen KRAS ist in ca. 40 % der kolorektalen Karzinome mutiert, dies führt zu einer ständigen Aktivierung des MAPK-Signalweges [38]. Weitere Mutationen innerhalb dieses Signalweges kommen in den Genen EGFR, BRAF und NRAS vor [37]. In über der Hälfte der kolorektalen Karzinome ist das Tumorsuppressorgen TP53 verändert, dabei sind Punktmutationen und Verluste eines Allels häufig [36].

Bei sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen kann es zur Mikrosatelliteninstabilität kommen. Die Tumoren werden als Mikrosatelliten-instabile Tumoren (MSI-Tumoren) bezeichnet. Hier ist eine sporadische Mutation in einem oder eine abnormale DNA-Methylierung von einem DNA-Reparaturgen ursächlich. Davon grenzen sich sporadische Tumoren ohne Mikrosatelliteninstabilität ab, die als Mikrosatelliten-stabile Tumoren (MSS-Tumoren) bezeichnet werden. 15 % der kolorektalen Karzinome sind MSI-Tumoren [38].

Chromosomale Instabilität tritt in 85 % der kolorektalen Karzinome auf und führt zur Aneuploidie. Dabei liegen gesamte Chromosomen oder größere Abschnitte in einer veränderten Struktur vor [38]. Zu der chromosomalen Instabilität kommt es aufgrund einer fehlerhaften Trennung der Schwesterchromatide in der Mitose [39]. Häufig sind die Loci von Tumorsuppressorgen auf den Chromosomen 5q, 8p, 17p und 18q betroffen. Das Vorliegen von Mikrosatelliteninstabilität und chromosomaler Instabilität schließt sich dabei gegenseitig aus [39].

Hereditäre Formen kolorektaler Karzinome basieren auf bestimmten, in der Keimbahn vorhandenen Mutationen. Den größten Anteil bezogen auf alle Karzinome macht das hereditäre,

nicht-polypöse kolorektale Karzinom mit ca. 5 % aus [36]. Hier liegen verschiedene Mutationen in DNA-Reparaturgenen vor, am häufigsten sind MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 betroffen [40].

Eine weitere vererbte Form ist die familiäre adenomatöse Polyposis. Diese Form ist für ungefähr 1 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich [41]. Hier kommt es meist aufgrund einer APC-Mutation zur einer stark vermehrten Entstehung von Polypen. Die Entartungswahrscheinlichkeit der einzelnen Polypen ist nicht erhöht, die Masse an Polypen ist ausschlaggebend für die erhöhte Wahrscheinlichkeit, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln [36].

Sporadischen Formen des kolorektalen Karzinoms lässt sich keine direkte monokausale Ursache zuordnen. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa haben ein erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Zusätzlich sind einige allgemeine Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol, Adipositas, Diabetes sowie eine fleischreiche Kost bekannt [42].

1.2.1 Entstehung von kolorektalen Karzinomen: Adenom-Karzinom-Sequenz

Die anfängliche Entwicklung eines spontanen Tumors kann im Menschen nicht direkt verfolgt werden. Die Zusammensetzung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnostik kann jedoch Rückschlüsse auf seine Entstehung geben [19]. Fearon und Vogelstein haben 1990 ein Modell zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen vorgestellt. Darin beschreiben sie, dass sich Karzinome durch schrittweise Anhäufung von genetischen Veränderungen aus Adenomen entwickeln, der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz. Aus gesundem Gewebe entsteht zunächst ein hyperproliferatives Epithel, dann ein frühes Adenom, ein spätes Adenom, ein Karzinom und schließlich ein metastasiertes Karzinom. Durch die Analyse von kolorektalen Karzinomen und Adenomen konnten sie darstellen, welche Veränderungen typischerweise in welchem Stadium vorliegen. Das hyperproliferative Epithel ist gekennzeichnet durch den Verlust des langen Arms von Chromosom 5 sowie Mutationen oder den Verlust von FAP, das Adenom durch DNA-Hypomethylierungen sowie den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 12, des langen Arms von Chromosom 18 sowie Mutationen in KRAS und das Karzinom durch den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 sowie Mutationen in TP53 [43].

Die Akkumulation der Veränderungen ist dabei wichtiger als die zeitliche Abfolge [43]. Das von Fearon und Vogelstein vorgestellte Modell wird dadurch gestützt, dass in Karzinomen verbleibende Reste von Adenomen gefunden werden, sowie in Adenomen erste Anteile von Karzinomen. Die Entwicklung eines Karzinoms aus einem Adenom dauert dabei Jahre, meist sogar Jahrzehnte [36].

1.3 Nachweis von Mutationen mit moderner Hochdurchsatz-Sequenzierung

1977 stellten Sanger et al. ein Sequenzierverfahren vor, das auf Kettenabbrüchen beruht. Zur Sequenzierung einer DNA-Sequenz werden vier getrennte Ansätze mit jeweils einem Didesoxynukleotid benötigt. Für das Erzeugen von Kettenabbrüchen werden Didesoxynukleotide eingesetzt, die statistisch nach jeder einzelnen Base in der Sequenz einen Abbruch erzeugen. So entstehen DNA-Fragmente, die mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden [44]. Heutzutage wird vereinzelt noch eine weiterentwickelte und automatisierte Form der Sanger-Sequenzierung verwendet, die auch als „erste Generation“ bezeichnet wird [45].

Weitestgehend in Gebrauch sind neuere Methoden, die als Next Generation Sequencing (NGS) zusammengefasst werden. NGS zeichnet sich durch das massiv parallele Sequenzieren vieler DNA-Stränge aus, was die Geschwindigkeit der Sequenzierung stark erhöht. Außerdem reduzieren sich die Kosten pro sequenzierter Base [46]. Die Sequenzierung des Exoms ist kostengünstiger als die des gesamten Genoms. Außerdem ist die Relevanz vieler Informationen im gesamten Genom noch ungeklärt. Die Sequenzierung einer Auswahl relevanter Gene wird gezielte Sequenzierung (*targeted sequencing*) genannt. Hierbei wird die Tiefe und damit auch die Genauigkeit erhöht. Die Tiefe beschreibt, wie häufig eine bestimmte Stelle des Genoms sequenziert wird [47].

Gängige Systeme für NGS sind das *454 System* von Roche, das *HiSeq System* und das *MiSeq System* von Illumina, das *SOLiD System* von Applied Biosystems sowie die *Personal Genome Machine (PGM™)* von Life Technologies. Detaillierte Vergleiche der NGS-Systeme finden sich bei Jessri et al. [48], Liu et al. [49], Meldrum et al. [46] und Rizzo et al. [47].

Die verschiedenen NGS-Methoden haben gemein, dass Proben gewonnen, amplifizierte DNA-Stränge generiert, DNA-Sequenzen parallel sequenziert und abschließend Daten ausgewertet werden. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der dafür verwendeten Techniken. Dadurch ergeben sich Unterschiede in Genauigkeit, Schnelligkeit, Leselänge und Kosten [47]. Das eingesetzte Material ist doppelsträngige DNA. Es folgt eine Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Die Amplifikation schließt nur die Regionen ein, die später sequenziert werden [50]. Abhängig vom System wird entweder eine Emulsions-PCR (454 System, *PGM™*, SOLiD) oder eine Brücken-PCR (HiSeq, MiSeq) verwendet. Beide Methoden ermöglichen eine klonale Amplifikation der gewünschten DNA-Stränge durch Schaffung von Mikroreaktionsräumen [45]. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt durch *Ion Sequencing (PGM™)*, *Pyrosequencing* (454 System), *Reverse Terminator Sequencing* (HiSeq, MiSeq) oder durch *Ligation Sequencing* (SoLiD) [47]. In dieser Arbeit wird die *PGM™* verwendet. Eine nähere Beschreibung der Funktionsweise findet sich in den Methoden, siehe Abschnitt 2.2.4, Seite 13.

1.4 Ziele der Arbeit

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Tumoren. In mehreren Arbeiten wurde für kolorektale Karzinome sowohl morphologische als auch genetische intratumorale Heterogenität nachgewiesen. Liegt in einem Tumor intratumorale Heterogenität vor, so werden nicht alle Eigenschaften des Tumors mit einer oder wenigen Biopsien erfasst. Werden Veränderungen des Tumors übersehen, wird die Therapie ggf. nicht adäquat gewählt. Intratumorale Heterogenität kann Therapieversagen verursachen, wenn resistente Eigenschaften nicht detektiert wurden. Intratumorale Heterogenität stellt somit eine Herausforderung in der Diagnostik von Tumoren dar. Die räumliche Verteilung von intratumoraler Heterogenität im kolorektalen Karzinom wurde bisher nur wenig untersucht.

Diese Arbeit hat zum Ziel zu untersuchen, ob eine räumlich verteilte Heterogenität von Mutationen und Kopienzahlen im Kolonkarzinom Stadium II vorliegt. Dafür wird zunächst untersucht, ob Hotspot-Mutationen und Kopienzahl-Veränderungen im Kolonkarzinom heterogen verteilt vorliegen. Anschließend erfolgt eine dreidimensionale Rekonstruktion der detektierten Veränderungen und eine Beurteilung der Heterogenität.

2 Methodik

2.1 Erstellen von Schnittpräparaten

In dieser Arbeit wird ein Kolonkarzinom Stadium II (T2N0M0) analysiert. Das Kolonkarzinom wurde vollständig reseziert; orale, aborale und zirkumferente Resektionsränder sowie alle untersuchten Lymphknoten sind tumorfrei. Außerdem wurden keine Metastasen detektiert. Das genannte Kolonkarzinom wird in fünf in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebettete Blöcke unterteilt. Zusätzlich liegt ein Block mit Normalgewebe des Kolons vor. Die Blöcke werden bis auf einen Reserverest, der für eine mögliche spätere Verwendung im Institut für Pathologie verbleibt, komplett zu Schnittpräparaten verarbeitet. Es liegen 68 Tumorproben und zwei Proben des Normalgewebes vor. Für das Erstellen der Schnitte wird das Mikrotom *HM 340E Electronic Rotary Microtome* verwendet, für weitere Informationen siehe Abschnitt 2.8, Seite 27. Die Schnittdicke beträgt 5 bzw. 10 µm. Die Schnitte werden in einem 40°C warmen Wasserbad geglättet und anschließend auf Glasobjektträger (*Superfrost Ultra Plus R*) gezogen. Nach dem Trocknen auf einer Heizplatte bei 40°C für eine Stunde können die Schnitte gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Aus dem Großteil der Schnitte wird DNA isoliert, die für die Sequenzierung verwendet wird. Weitere Schnitte werden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (HE-Schnitte) bzw. für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet. Die Schnitte, aus dem DNA isoliert wird, haben jeweils einen dazugehörigen HE-Schnitt, auf dem das zu isolierende Tumorgewebe eingezeichnet wird. Die Einteilung des Tumors in die 68 Proben findet sich in den Ergebnissen, siehe Abschnitt 3.1, Seite 29.

2.2 Sequenzieren mit der *Ion Personal Genome Machine*[®]

2.2.1 DNA-Isolation und Quantifizierung mit RNase P

Die Schnitte werden zunächst nach folgendem Schema entparaffiniert und vorbereitet: 10 min im Ofen bei 80°C, 10 min in Küvette mit Xylol, sowie 10 min in Küvette mit 100 %igem Ethanol.

Das Gewebe der jeweiligen Schnitte wird für alle 70 Proben (68 Tumorproben sowie 2 Proben des Normalgewebes) isoliert. Auf den HE-Schnitten wird zuvor das zu isolierende Areal

unter einem Lichtmikroskop eingezeichnet. Dabei werden Tumorareale mit hoher Immunzell-Infiltration ausgespart, um den Tumorzellgehalt nicht zu verringern. Die Isolation des Gewebes erfolgt im Vergleich zu den Einzeichnungen auf den HE-Schnitten. Für die DNA-Isolation wird das Protokoll *DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)* verwendet. Abweichungen vom Protokoll sind im Folgenden dargestellt.

Im ersten Schritt wird das Gewebe zunächst in ein 1,5 ml-Gefäß mit 180 µl *ATL Lyse Buffer* transferiert. Dafür wird es mit dem *ATL Lyse Buffer* benetzt und vom Objektträger abgekratzt. Für die Inkubation der Proben wird der *Thermomixer 5436* verwendet. Die DNA-Isolation aus dem Gewebe erfolgt bis auf den letzten Schritt anhand des Protokolls. Die DNA wird in einer geringeren Menge AE Puffer gelöst, es werden nur 40 µl verwendet. Die isolierte DNA der Probe liegt im AE Puffer vor und kann weiterverwendet werden.

Aufgrund von Fragmentierung und chemischer Modifizierung durch die zuvor erfolgte Fixierung mit Formalin und Einbettung in Paraffin ist nur ein Teil der DNA amplifizierbar. Für die Bestimmung der amplifizierbaren DNA werden die Reagenzien des *TaqMan® RNase P Detection Reagents Kits* und das *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* eingesetzt. Der Anteil dieser DNA-Abschnitte wird für jede Probe einzeln durch eine Messung mit RNase P ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach dem Protokoll *Sample Quantification for Ion AmpliSeq™ Library Preparation Using the TaqMan® RNase P Detection Reagents Kit*. Die Proben werden 1:100 verdünnt und in eine *96-well*-Platte gegeben. Im Vergleich zu der verwendeten Standardkurve kann so die DNA-Konzentration der Proben bestimmt werden. Dabei wird jeweils der Mittelwert von drei Replikaten verwendet.

2.2.2 Amplifikation der Zielregionen und Quantifizierung mittels qPCR

Die Amplifikation ausgewählter Gene hat zum Ziel, ausreichend Material für die Sequenzierung bereitzustellen. Für die Sequenzierung wird das *CRC5.2 Panel*, welches 100 für kolorektale Karzinome wichtige Gene abdeckt, verwendet. Das Panel wurde von Dr. Liam Childs und Dr. Soulafa Mamlouk erstellt und beinhaltet Primer-Paare für 793 Amplikons.

Neben der Amplifikation der Zielregionen werden die Primer verdaut, Barcodes anhängt und die Proben aufgereinigt, was als Library zusammengefasst wird. Für die Library werden der *2720 Thermal Cycler*, der *Ion AmpliSeq™ Library Preparation User Guide* und die Reagenzien des *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* verwendet. Der Versuch läuft in Mikroreaktionsgefäßen mit einem Volumen von 0,5 ml ab. Für die Amplifikation werden die 793 Primer-Paare des CRC5.2 Panels verwendet. Diese sind auf zwei Primer Pools aufgeteilt. In der Library wird der Ansatz nach *2X Primer Pools* und das *Ion AmpliSeq Sample ID Panel* verwendet.

Nach der Amplifikation werden die Proben aufgereinigt, da neben der DNA ebenfalls Überreste wie Primer und Enzyme vorliegen. Diese unerwünschten Bestandteile werden entfernt, um die sich anschließende Amplifikation nicht zu behindern.

Im Anschluss erfolgt eine weitere Messung der DNA-Konzentration. Sie wird mit einer quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) durchgeführt. Die Proben werden dafür 1:100 verdünnt. Es werden die Reagenzien des *Ion Library Quantitation Kits* verwendet. Die Durchführung erfolgt anhand der Option 2 des *Ion AmpliSeq™ Library Preparation User Guide*. Das Reaktionsvolumen liegt bei 10 µl. Jede Probe liegt als Triplikat vor, es wird der Mittelwert errechnet. Die qPCR wird mit dem *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* durchgeführt.

2.2.3 Emulsions-PCR mit One Touch 2

Die Emulsions-PCR dient der direkten Vorbereitung der Sequenzierung. Hier werden DNA-Stränge einzeln an *Ion Sphere Particles (ISPs)* gebunden und klonal amplifiziert. Während der Sequenzierung kann so die benötigte räumliche Trennung verschiedener DNA-Fragmente gewährleistet werden.

Für die Emulsions-PCR werden die beiden *Primer Pools* von jeweils zwei Probe zusammengeführt, welche gemeinsam weiterverwendet und sequenziert werden. Für die Emulsions-PCR werden das *Ion OneTouch™ 2 Instrument*, die Reagenzien des *Ion PGM™ Template OT2 Solutions 200 Kit* und der *Ion PGM™ Template OneTouch™ 2 200 Kit User Guide* verwendet. In den Wasserblasen der Wasser-in-Öl-Emulsion werden Mikroreaktionsräume geschaffen, in denen parallel jeweils eine PCR-Reaktion ablaufen kann. Idealerweise befinden sich in jeder Wasserblase ein *ISP*, ein DNA-Strang und die benötigten PCR-Reagenzien. Die DNA-Stränge können so klonal amplifiziert und an den *ISP* gebunden werden. Es kommt jedoch ebenfalls zu Wasserblasen mit keinem oder mehr als einem DNA-Strang. Die dabei entstehenden *ISPs* sind nicht für die Sequenzierung geeignet.

Nach der Amplifikation wird die Emulsion aufgebrochen und es werden die *ISPs* gesammelt. In der sich anschließenden Aufreinigung werden überschüssige PCR-Reagenzien entfernt. Dabei erfolgt eine Anreicherung der verwendbaren *ISPs*, indem *ISPs*, die keine DNA gebunden haben, aussortiert werden. Dazu wird das Gerät *Ion OneTouch™ ES (enrichment system)* mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet. *ISPs* mit mehreren, unterschiedlichen DNA-Strängen werden während der Sequenzierung erkannt und automatisch nicht weiterverwendet.

2.2.4 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird die *Ion Personal Genome Machine*[®] (*PGM*[™]) der Firma *Life Technologies* und das dazugehörige Handbuch *Ion PGM[™] Sequencing 200 Kit v2 User Guide* verwendet. Es werden zwei Proben gemeinsam sequenziert, die, wie oben beschrieben, für die Emulsions-PCR zusammengeführt wurden. Durch das vorherige Anhängen von *Barcodes* an die DNA-Fragmente können die Sequenzierergebnisse eindeutig einer Probe zugeordnet werden. Verwendet wird der *Ion 316[™] Chip*. Mikroreaktionsräume des Chips erlauben das parallele Sequenzieren verschiedener DNA-Stränge. Die Sequenzierung basiert auf der Detektion von pH-Unterschieden, die beim Einbau von Nukleotiden entstehen. Die Mikroreaktionsräume des Chips werden sequentiell mit einem der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) geflutet. Es kommt zur Freisetzung eines Protons, wenn ein dNTP zur Elongation des komplementären DNA-Stranges eingebaut wird. Der dabei entstehende pH-Unterschied wird durch einen Sensor detektiert.

2.2.5 Auswertung der Sequenzierdaten

Die Auswertung der Sequenzierdaten wurde von Dr. Liam Childs durchgeführt. Die von der *PGM*[™] ermittelten Sequenzen werden auf dem Referenzgenom GRCh37 angeordnet. Dafür wird das Torrent Mapping and Alignment Program (TMAP) von Life Technologies genutzt. Es werden nur Sequenzen mit mehr als 50 Nukleotiden und einer *mapping quality* > 4 verwendet. Für die Proben, die diesen Filter passiert haben, liegen die Häufigkeit der jeweiligen Mutation und ein dazugehöriger Qualitätswert vor. Für alle anderen Proben wird die Information der Häufigkeit vervollständigt, hier liegt jedoch kein Qualitätswert vor. In einer Tabelle werden alle vorliegenden Daten zusammengefasst, diese werden als Quelldaten benannt. Es liegen Informationen über die Mutation, wie das Chromosom, die Veränderung der Aminosäure und die Art der Mutation sowie die Häufigkeit und ggf. der Qualitätswert von allen Tumorproben und dem Normalgewebe vor. Ausgehend von dieser Tabelle werden weitere Kriterien zum Filtern der Quelldaten angelegt. Die folgenden Eigenschaften werden herausgefiltert und nicht weiterverwendet: Mutationen in Introns (*intronic mutations*) und Mutationen ohne Änderung der Aminosäure (*synonymous mutations*); Mutationen, mit einem Qualitätswert < 50; homopolymere Sequenzen mit mehr als 4 mal der gleichen Base; Mutationen, die zum Anfang oder Ende des Amplikons einen Abstand von zwei Basen oder weniger haben; sowie Mutationen, die im gesunden Gewebe vorkommen. Aus den gefilterten Daten wird mit dem Programm **R**¹ eine Heatmap erstellt. Die Rohdaten der Sequenzierung mittels *PGM*[™] werden durch das Programm *Golden Helix GenomeBrowse*^{®2} visualisiert.

¹ <https://www.r-project.org>

² Golden Helix GenomeBrowse[®] visualization tool, version 2.1.1, <https://www.goldenhelix.com>

2.3 Verifizierung der *PGM*[™]-Ergebnisse mit Sanger-Sequenzierung

2.3.1 Vorbereitung der Verifizierung

Auswahl der Mutationen und Proben

Die Rohdaten der *PGM*[™]-Sequenzierung werden entsprechend der zuvor beschriebenen Kriterien gefiltert. Es verbleiben 14 Mutationen, die teilweise verifiziert werden. Bereits vor Beginn der Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe einige der Mutationen überprüft und als technische Fehler eingestuft. Sie werden daher nicht erneut in die Verifizierung einbezogen. Es verbleiben sechs Mutationen, die im Rahmen meiner Arbeit mit Sanger-Sequenzierung verifiziert werden.

Tabelle 2.1 zeigt die sechs zu überprüfenden Mutationen. Die Tabelle beinhaltet das Gen, das Chromosom, die Aminosäure-Position, die Nukleotid-Position und die Art der Mutation. Die Mutationen werden anhand des Gens und der Aminosäure-Position benannt (z.B. APC p.1367).

Tabelle 2.1 – Mutationen, die mittels Sanger-Sequenzierung überprüft werden.

Gen	Chromosom	Aminosäure-Position	Nukleotid-Position	Art der Mutation	Benennung
APC	5	1367	112175390	stop gain	APC p.1367
ERBB4	2	1268	212248464	frameshift	ERBB4 p.1268
MCF2	X	596	138697051	missense	MCF p.596
PIK3CA	3	1053	178952103	missense	PIK3CA p.1053
TP53	17	175	7578406	missense	TP53 p.175
WNK3	X	908	54276057	frameshift	WNK p.908

Für jede der ausgewählten Mutationen werden mehrere Proben überprüft, diese sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Es werden sowohl Proben, in denen die jeweilige Mutation gefunden wurde, als auch solche, in denen die Mutation nicht gefunden wurde, überprüft. Für die Mutationen APC p.1367 und TP53 p.175 wird eine Auswahl der Proben mit der Mutation überprüft. Für die anderen vier Mutationen werden alle Proben, die jeweilige Mutation tragen, überprüft. Außerdem wird für jedes Primer-Paar das Normalgewebe (Probe 3.1.1) als Referenz untersucht. Zusätzlich werden für einige Mutationen noch weitere Proben untersucht, die Auffälligkeiten aufweisen oder die als weitere Vergleichsproben dienen.

Tabelle 2.2 – Auswahl der verifizierten Proben für die Mutationen APC p.1367, ERBB4 p.1268, MCF2 p.596, PIK3CA p.1053, TP53 p.175 sowie WNK3 p.908; 3.1.1: Normalgewebe; 3.2.1C - 3.6.7C: Tumorproben; die Auswahl einer Probe zur Verifizierung ist mit einem † markiert.

Mutation: Probe:	APC p.1367	ERBB4 p.1268	MCF2 p.596	PIK3CA p.1053	TP53 p.175	WNK3 p.908
3.1.1	†	†	†	†	†	†
3.2.1C	†					
3.2.3C	†					
3.2.4C				†		
3.2.5A				†		
3.2.5B				†		
3.3.1A	†					
3.3.1D				†		
3.3.2C					†	
3.3.2D				†		
3.3.3A					†	†
3.3.4B						†
3.4.4B	†					
3.4.4C		†				
3.5.1A						†
3.5.1B				†	†	
3.5.1D	†					
3.5.2C						†
3.5.2D		†				
3.5.3A		†	†			†
3.5.3C		†				
3.5.3D	†					
3.5.4B	†					
3.6.6B	†					
3.6.6C		†				
3.6.6D		†				
3.6.7C		†				
3.6.7D	†					

Primer-Design

Für die Verifizierung mittels Sanger-Sequenzierung werden, wenn möglich, die Primer des *Panel CRC5.2* verwendet. Für die Mutationen PIK3CA p.1053 und WNK3 p.908 werden die Primer neu erstellt, da die zu untersuchende Stelle nah am Rand des Amplikons liegt. Für die Mutation in APC p.1367 ist die Tiefe beim Sequenzieren mit *PGMTM* sehr niedrig. Eine schwache Bindung der Primer ist vermutlich für die geringe Amplifikation verantwortlich. Auch für diese Mutation werden neue Primer erstellt.

Zum Designen von neuen Primern wird zunächst die Basensequenz um die fragliche Mutation herum mittels Gen-Suche auf *Ensemble³* die Basensequenz um die fragliche Mutation herum herausgesucht. Die gewünschte Länge des PCR-Produktes beträgt ca. 150 bis 200 Basenpaare, wobei die fragliche Mutation idealerweise mittig gelegen ist. Nach Eingabe der ausgewählten Basensequenz werden bei *Primer3Plus⁴* mögliche Primer-Kombinationen für die Region vorgeschlagen. Die Primer werden anschließend hinsichtlich ihrer Bindung überprüft. Mit der *BLAST/BLAT-Suche⁵* kann getestet werden, ob die Primer spezifisch an der gewünschten Sequenz binden. Wenn dies nicht der Fall ist, werden die Primer um einige Basen verschoben bis sie laut Vorhersage spezifisch binden. Abschließend wird jedes Primer-Paar bei *UCSC In-Silico PCR⁶* überprüft. Die Plattform legt die Primer auf die Referenz-DNA und überprüft, ob das Primer-Paar ein Produkt ergibt und wie lang dieses ist. Die Tabelle 2.3 umfasst die verwendeten Primer.

Tabelle 2.3 – Verwendete Primer für die Sanger-Sequenzierung, dargestellt sind die Vorwärts- und Rückwärtsstränge der Primer-Paare.

Mutation	Vorwärtsstrang	Rückwärtsstrang
APC p.1367	AGAATCAGCCAGGCAC AAAG	GCAATCGAACGACTCT CAAA
ERBB4 p.1268	CTTCAGGGAGAACTCA GAGAGGTA	ACAACCCTGACTACTG GAACCA
MCF2 p.596	TGAAGAATAAACTCAG TATTACATCAAGAGT	AATTTGTGGTACCCAC ACCTGAAA
PIK3CA p.1053	TGAGCAAGAGGCTTTG GAGT	ATGCTGTTCATGGATT GTGC
TP53 p.175	CAGCTGCTCACCATCG CTAT	GTTTTGCCAACTGGCC AAGA
WNK3 p.908	TCGTCAGTACGTGCTT AGCC	CCATCAACCACATCCT TGTGT

³ <http://www.ensembl.org>

⁴ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

⁵ <http://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>

⁶ <http://browser.xenbase.org/ucsc/cgi-bin/hgPcr>

2.3.2 Durchführung der Verifizierung

Testung der Primer

Für alle Primer-Paare wird zur Testung ihrer Funktion eine PCR mit Zelllinien-DNA durchgeführt. Dies dient der Sicherstellung, dass die Primer-Paare ein spezifisches PCR-Produkt erstellen, wobei gleichzeitig die DNA-Reserven der Versuchsreihe geschont werden. Für jedes Primer-Paar wird eine PCR mit Zelllinien-DNA und einer Negativkontrolle ohne DNA durchgeführt. Für den Primer-Mix werden die Primer des Vorwärts- und des Rückwärtsstrangs vermischt.

Der PCR-Ansatz jeder Probe besteht aus den folgenden Reagenzien:

- 12 µl PCR Master Mix (2X)
- 3 µl Primer-Mix (2,5 pmol/µl)
- 7 µl Nuklease-freies Wasser
- 3 µl DNA (mind. 6 ng).

Die PCR läuft nach folgendem Schema ab: (1) 5 min bei 95°C, (2) 40 Zyklen à 30 s bei 95°C, 30 s bei 55 bzw. 60°C (spezifische Temperatur) sowie 30 s bei 72°C, (3) 7 min bei 72°C. Für die Primer der Mutation APC p.1367 wird eine spezifische Temperatur von 55°C verwendet, für die verbleibenden Primer liegt die spezifische Temperatur bei 60°C. Zur Überprüfung ob ein PCR-Produkt der gewünschten Länge vorliegt, werden die Proben mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt (1g Agarose auf 50 ml TAE, 1 µl Ethidiumbromid). Es werden 10 µl jeder Probe sowie 5 µl der DNA-Leiter *Gene Ruler Ladder* für das Erstellen einer Referenzbande auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit beträgt ca. 45 min bei 50 V. Mit einem Transilluminator wird überprüft, ob ein PCR-Produkt vorliegt und welche Länge es hat.

Für jede der ausgewählten Proben wird eine PCR durchgeführt. Verwendet wird der oben bei der Testung der Primer aufgeführte PCR-Ansatz und PCR-Ablauf. Vor der Überprüfung, ob ein spezifisches PCR-Produkt vorliegt, werden die Proben mit dem *PCR Purification Kit* aufgereinigt. Nach dem letzten Schritt liegt die aufgereinigte DNA in einem Mikroreaktionsgefäß mit einem Volumen von 1,5 ml vor. Vor dem Auftragen von jeweils 10 µl auf das Agarosegel wird den Proben je 1 µl Ethidiumbromid hinzugefügt.

Die Sanger-Sequenzierung wird durch die Firma *MWG-Biotech AG, Eurofins Genomics* durchgeführt. 3 µl PCR-Produkt jeder Probe werden mit 2 µl der Primer-Verdünnung des Vorwärts- bzw. Rückwärtsstrangs (10 pM) sowie 12 µl Nuklease-freiem Wasser in einem Mikroreaktionsgefäß mit einem Volumen von 1,5 µl gemischt und an die Firma geschickt.

Als Ergebnis der Sanger-Sequenzierung liegen die Nukleotid-Sequenzen der zu untersuchenden DNA-Abschnitte vor. Die Rohdaten der Sequenzierung mit *PGM^m* werden durch das Programm *Golden Helix GenomeBrowse[®]* visualisiert. Die Nukleotid-Sequenzen der beiden Methoden können so verglichen werden.

2.4 CNVPanelizer: Analyse der Kopienzahlen

Die Analyse der Kopienzahlen wurde von Dr. Liam Childs nach Ansatz von C. Oliveira und T. Wolf⁷ durchgeführt. Mittels CNVPanelizer werden die Sequenzierdaten hinsichtlich Kopienzahl-Veränderungen ausgewertet. Als Referenzgewebe dient dafür Blut von Gesunden und das Normalgewebe des Tumors. Aus den dabei erhaltenen Rohdaten wird mit dem Programm **R** eine Heatmap erstellt.

2.5 Verifizierung der CNVPanelizer-Ergebnisse mit qPCR

2.5.1 Gene und Proben

Für die Qualität der Ergebnisse aus der CNVPanelizer-Analyse liegen bisher keine Erfahrungen vor. Deshalb werden die Gene APC, EDEM2, GNAS, MAP2K4, MMP9, SMAD4, SOX9 und TP53 zusätzlich mittels qPCR hinsichtlich ihrer Kopienzahl untersucht. Die Auswahl der Gene zur Überprüfung gestaltet sich anhand der Ergebnisse, siehe Abschnitt 3.3.1, Seite 43. Es werden Gene ausgewählt, die bei der Analyse mittels CNVPanelizer auffällige Veränderungen zeigen bzw. die in kolorektalen Karzinomen häufig verändert sind. Es werden zunächst Gene ausgewählt, die von einer Deletion betroffen sind; dies trifft zu für APC, MAP2K4, SMAD4 und TP53. Zudem werden Gene ausgewählt, die von einer Amplifikation betroffen sind; dies trifft zu für EDEM2, GNAS und MMP9.

Für jedes der Gene werden vier Tumorproben sowie das Normalgewebe, überprüft. Im Folgenden wird für das Normalgewebe die Probe 3.1.2 verwendet. Das Normalgewebe dient als Referenzprobe für die qPCR. Die Proben werden für jedes Gen aus mindestens zwei Blöcken gewählt, in den meisten Fällen aus drei verschiedenen. Für die Gene APC, MAP2K4, MMP9, SMAD4, SOX9 und TP53 werden sowohl Proben, die laut Analyse mittels CNVPanelizer eine Deletion bzw. Amplifikation der Kopienzahl tragen, als auch solche, die keine tragen, ausgewählt. Die Gene EDEM2 und GNAS sind laut Analyse mittels CNVPanelizer in allen Proben amplifiziert, sodass hier nur Proben mit einer Amplifikation gewählt werden. Zur

⁷Oliveira, C. & Wolf, T. Reliable CNV detection in targeted sequencing applications. R package version 1.1.0. (2015). <https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/html/CNVPanelizer.html>

besseren Handhabung werden soweit möglich für mehrere Gene die gleichen Tumorproben gewählt. In Tabelle 2.4 ist die Auswahl der Proben für die acht untersuchten Gene dargestellt.

Tabelle 2.4 – Auswahl der mit qPCR verifizierten Proben; 3.1.2: Gewebe vom Resektionsrand des Tumors; 3.2.1C - 3.6.7C: Tumorproben; die Auswahl einer Probe zur Überprüfung ist mit einem + markiert.

Gen: Probe:	APC	EDEM2	GNAS	MAP2K4	MMP9	SMAD4	SOX9	TP53
3.1.2	+	+	+	+	+	+	+	+
3.2.2B				+		+		+
3.2.2D	+							
3.2.3A			+		+		+	
3.2.3D		+						
3.2.5C			+		+		+	
3.3.4A		+						
3.3.4C				+		+		+
3.4.4A			+		+		+	
3.4.4B	+							
3.4.4C			+					
3.4.4D				+		+		+
3.5.1A	+							
3.5.1D		+						
3.5.4C	+	+						
3.5.4D					+		+	
3.6.7C				+		+		+

2.5.2 Vorbereitung der Versuche

Für die ausgewählten Gene werden zunächst Primer erstellt. Das Erstellen der Primer erfolgt nach dem in Abschnitt 2.3.1, Seite 16 dargestellten Vorgehen. Für jedes der acht Gene werden zwei Primer-Paare erstellt, einige davon (jeweils ein Primer-Paar für EDEM2, MAP2K4, MMP9 und SOX9) haben nicht zufriedenstellend funktioniert. Sie wurden nicht weiter verwendet und sind hier nicht aufgeführt. TERT dient als Referenzgen. Die Tabelle 2.5 umfasst alle für die qPCR verwendeten Primer-Paare.

Tabelle 2.5 – Darstellung der verwendeten Primer-Paare für die qPCR.

Gen, Primer-Paar	Primer Vorwärtsstrang	Primer Rückwärtsstrang
APC, Paar 1	TCCCTGGAGTAAACTGCGG	CCGGCTTCCATAAGAACGGA
APC, Paar 2	TTGGCCGAGTCTTGTAGTGC	GCCTGCTAACATTCTGCGTT
EDEM2	CAGGACAGCGTGGACTTTGA	GCAGCCCTTACCTCGAATGT
GNAS, Paar 1	CCAGGCCAGTGATGTCATGT	ATCTCATCCCTCTGCTGGGT
GNAS, Paar 2	CCCTACACTCCAGCACACAG	GGCCGAGTTGGGATGGATAG
MAP2K4, Paar 1	GGGGAAGACTTGCCTGCTAC	GCCTCCTACCACGCAAATG
MAP2K4, Paar 2	CCCACACATGTGAGTATTCTTGG	ATCTTTGCTTGAGTTGAGCCTTT
MMP9	GCAGACCATCCATGGGTCA	AAGGCGGAGACAGCACATTA
SMAD4, Paar 1	CTTTGAGGGACAGCCATCGT	CTTGGTGGATGCTGGATGGT
SMAD4, Paar 2	GTTGTCCAGTGCATTGCAGG	TGGGCATCTGGTGGCTAAAG
SOX9	AGCTTTGGTTTGTGTTTCGTGT	GCTGGGAGGGAAACAAGTGA
TP53, Paar 1	GGCCCACCTCTTACCGATTT	CAGTAAGGAGATTCCCCGCC
TP53, Paar 2	CTCTGTTGCTGCAGATCCGT	GCCTCATTCAGCTCTCGGAA
TERT	GGTTGTGGTGACGTTGCTTC	CCAGGTTTGCAAGCTGACAC

2.5.3 Durchführung der Verifizierung

Die Primer werden zunächst an Zelllinien-DNA getestet. Anschließend erfolgt die Überprüfung der ausgewählten Proben.

Für die qPCR wird der folgende Ansatz verwendet:

1 µl Primer-Mix (Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit jeweils 5pmol/µl)

7,5 µl SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)

5,5 µl Nuklease-freies Wasser

1 µl DNA (100 ng)

Es wird die Maschine *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* verwendet. Die qPCR läuft nach folgendem Schema ab: (1) 2 min bei 95°C, (2) 40 Zyklen à (a) 15 s bei 95°C, (b) 30 s bei 60°C, (3) 15 s bei 95°C, 15 s bei 60°C, 15 s bei 95°C.

Für die Auswertung des Versuches ist es erforderlich, dass die Ergebnisse auf die gleiche Menge eingesetzter DNA bezogen werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration mit RNaseP wurde schon zuvor durchgeführt, siehe Abschnitt 2.2.1, Seite 10. Von jeder Probe werden 0,5 µg DNA eingesetzt.

Für jede Probe wird zusätzlich zu den ausgewählten Genen eine qPCR für das Referenzgen durchgeführt. Für alle Proben, die zu einem Gen gehören, wird die qPCR auf einer *96 well*-Platte durchgeführt. So werden die Unterschiede, die bei der qPCR zwischen zwei Platten auftreten können, nicht in die Auswertung einbezogen. Es wird der oben genannten Ansatz benutzt. Für jede Probe werden Triplikate erstellt und der Mittelwert verwendet.

2.5.4 Auswertung der qPCR

Zur Auswertung der qPCR wird der Ansatz $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verwendet [23]. Die Vervielfältigungskurve der Tumorproben wird derjenigen der Referenzprobe (Normalgewebe) gegenübergestellt. Dabei wird die Menge der zu Beginn der qPCR vorhandenen DNA verglichen. So kann relativ angegeben werden, wie sich die Menge der DNA der Tumorproben zu der der Referenzprobe verhält. Es wird jeweils ein bestimmtes Gen untersucht. Zusätzlich werden die zu analysierenden Gene einem Vergleichs-gen (TERT) gegenübergestellt.

Für jede durchgeführte qPCR liegt eine Vervielfältigungskurve als Ergebnis vor. Es wird jeweils der Ct-Wert bestimmt. Der Ct-Wert beschreibt den Vervielfältigungszyklus bei einem bestimmten Schwellenwert (*cycle threshold*). Es wird in allen Proben eines Primer-Paares der gleiche Schwellenwert festgelegt, er befindet sich in der exponentiellen Phase der Vervielfältigungskurve. Die Ct-Werte für alle Proben werden erfasst und zur weiteren Berechnung verwendet.

Berechnung von $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{Gen} - Ct_{Vergleichs-gen})_{Tumorprobe} - (Ct_{Gen} - Ct_{Vergleichs-gen})_{Referenzprobe}$$

Die relative Änderung der Genmenge einer Tumorprobe in Bezug zur Referenzprobe wird wie folgt berechnet: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Für die Berechnung wird Microsoft Excel⁸ genutzt. GraphPad Prism⁹ wird für den Vergleich der Ergebnisse des CNVPanelizers und der qPCR verwendet. Die Ergebnisse für jedes Gen werden zunächst in einem Balkendiagramm verglichen. Anschließend werden zur statistischen Überprüfung der beiden Methoden alle Ergebnis-Punkte der acht Gene verglichen. Die Datenpunkte werden in einer Graphik dargestellt, es werden R^2 und der p-Wert berechnet.

⁸Microsoft Excel Version 14.0.7166.5000

⁹GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, <http://www.graphpad.com>

2.6 Verifizierung der CNVPanelizer-Ergebnisse mit FISH

2.6.1 Gene und Proben

Zur Überprüfung der CNVPanelizer-Analyse werden zusätzlich weitere Gene mittels FISH überprüft. Es werden die Gene BRCA2, CARD11, EGFR, MMP9 und TP53 ausgewählt. Die Gene BRCA2, CARD11, EGFR und MMP9 liegen laut der Analyse mittels CNVPanelizer amplifiziert vor. Das TP53-Gen liegt laut der Analyse mittels CNVPanelizer in einigen der Tumorproben deletiert vor.

Die Anzahl der zu untersuchenden Proben variiert, sie liegt je nach Gen bei 12 bis 17 Tumorproben. Hinzu kommt außerdem für alle Gene das Normalgewebe (Probe 3.1.2). Bei der FISH werden gehäuft mehrere Quadranten einer Gruppe untersucht, da sie simultan gefärbt werden können. Für jedes Gen werden Proben aus mindestens drei der fünf Tumorblöcke untersucht. Für die Gene BRCA2, CARD11, MMP9 und TP53 werden sowohl Proben, die eine Deletion bzw. Amplifikation der Kopienzahl tragen, als auch solche, die keine tragen, ausgewählt. Das Gen EGFR ist in allen Proben amplifiziert, sodass hier nur Proben mit einer Amplifikation gewählt werden. Eine Übersicht der Proben ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

2.6.2 Gewebe und Sonden

Für die FISH werden Schnitte der oben ausgewählten Proben verwendet. Die Schnitte haben eine Dicke von 5 μm . Es wird sowohl das ausgewählte Gen als auch das dazugehörige Zentromer hybridisiert. Tabelle 2.6 zeigt Informationen über die Sonden für die fünf zu untersuchenden Gene.

Tabelle 2.6 – Darstellung der für die FISH verwendeten Sonden.

Gen	Gen-Sonde	Zentromer-Sonde	Firma	Spektrum
BRCA2	BRCA2-20-OR	CON 13	Empire Genomics	orange / grün
CARD11	CARD11-20-OR	CEN 7	Empire Genomics	orange / grün
EGFR	Vysis LSI EGFR	Vysis CEP 7	Abbott Molecular	orange / grün
MMP9	MMP9-20-OR	CON 20	Empire Genomics	orange / grün
TP53	Vysis LSI TP53	Vysis CEP 17	Abbott Molecular	orange / grün

Tabelle 2.7 – Auswahl der mit FISH verifizierten Proben; 3.1.2: Normalgewebe; 3.2.1A - 3.6.7C: zu untersuchende Tumورproben; die Auswahl einer Probe zur Überprüfung ist mit einem + markiert.

Gen: Probe:	BRCA2	CARD11	EGFR	MMP9	TP53
3.1.2	+	+	+	+	+
3.2.1A	+	+			+
3.2.1C	+	+			+
3.2.1D	+	+			+
3.2.2B				+	+
3.2.2D	+			+	+
3.2.3A		+		+	
3.2.4A	+	+		+	+
3.2.4B	+	+		+	+
3.2.4C	+	+		+	+
3.2.4D	+				
3.2.5A	+	+	+		
3.2.5B			+		
3.2.5C			+	+	
3.2.5D			+		
3.3.1C					+
3.3.1D				+	
3.3.3A	+	+			
3.3.3B	+				
3.3.3C	+				
3.3.4A		+	+		+
3.3.4B			+		
3.3.4C			+		
3.3.4D			+		
3.4.1A		+		+	+
3.4.1C		+		+	+
3.4.1D		+			+
3.5.4A			+		
3.5.4B			+		
3.5.4C		+	+		
3.5.4D			+		
3.6.6B	+			+	
3.6.6C	+			+	+
3.6.6D	+				+
3.6.7B	+				+
3.6.7C	+				+

2.6.3 Durchführung der Hybridisierung

Die FISH wird mit den oben genannten Gewebeschnitten und Sonden durchgeführt. Verwendet wird das *DAKO-FISH-Accessory-Kit*.

Zunächst wird die zu untersuchende Stelle markiert. Dafür wird die Glasoberfläche auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantstift eingeritzt.

Es folgt die Entparaffinierung und weitere Vorbereitung der Schnitte:

Schmelzen des Paraffins bei 80°C im *Hybridizer* für 1 Stunde

Zweimaliges Eintauchen in Xylol für jeweils 10 min

96%iger, 80%iger und 70%iger Alkohol für jeweils 3 min

Waschpuffer für 3 min

Kochen in *Pretreatment Buffer* für 10 min

Waschpuffer für 3 min

Nachdem die Schnitte abgetropft sind, erfolgt die Behandlung mittels Pepsin für 2 Minuten. Anschließend wird den Schnitten durch eine aufsteigende Ethanolreihe Wasser entzogen:

Bedecken des Gewebes mit einigen Tropfen Pepsin

Erwärmung der Schnitte auf 37°C im *Hybridizer* für 2 min

Waschpuffer für 10 min

70%iger, 80%iger und 96%iger Alkohol für jeweils 3 min

Lufttrocknen der Schnitte für 15-20 min

Es folgt das Auftragen der Sonden:

Vorbereitung der nicht gebrauchsfertigen Sonden für BRCA2, CARD11, MMP9 und TP53, siehe Tabelle 2.8

Auftragen von 4 µl Sonden-Fertiglösung (EGFR) oder 5,2 µl (BRCA2, CARD11, MMP9) bzw. 7 µl (TP53) hergestellter Sondenlösung pro Schnitt

Bedecken der Schnitte mit einem Deckgläschen, Versiegeln mit Flüssigkleber

Der *Hybridizer* wird mit zwei in bidestilliertes Wasser getränkten Filterstreifen versehen, um ein starkes Austrocknen der Schnitte zu verhindern

Erhitzen der Schnitte im *Hybridizer* bei 80°C für 10 min

Inkubation der Schnitte über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 37°C

Tabelle 2.8 – Mengenangaben zur Herstellung der nicht gebrauchsfertigen Sonden, Angaben in μl .

Gen	Gen-Sonde	Zentromer-Sonde	Hybmix	bidestilliertes Wasser
BRCA2	1	1	8	/
CARD11	1	1	8	/
MMP9	1	1	8	/
TP53	0,5	0,2	4,4	3,6

Die Proben werden weiterverarbeitet und mit DAPI angefärbt:

Abziehen der Klebeversiegelung und des Deckgläschens

Behandlung der Schnitte in 63°C-warmem *Stringency Buffer* für 25 min

70%iger, 80%iger und 96%iger Alkohol für jeweils 3 min

Trocknung der Schnitte für 15-20 min

Auftragen von 5 μl *Fluorescence Mounting Medium* zur Färbung der Nukleinsäuren mit DAPI

Auflegen von Deckgläschen, Versiegelung mit farblosem Nagellack

2.6.4 Auswertung der Schnitte

Die Auswertung der FISH-Präparate erfolgt mit dem *BioView-System*, das aus dem *DUET System* und dem *SOLO System* besteht. Mit dem *DUET System* werden automatisiert die HE- und FISH-Schnitte gescannt. Anschließend können Bildausschnitte für die Analyse ausgewählt werden. Die Auswertung einzelner Zellen erfolgt mit dem *SOLO System*.

Mit dem Mikroskop des *DUET Systems* werden zunächst Übersichtsbilder von der DAPI-Färbung der Schnitte und von allen dazugehörigen HE-Schnitten in 5facher und 10facher Vergrößerung angefertigt. Die zwei zusammengehörigen Schnitte werden anschließend übereinandergelegt. Dadurch ist es möglich, im HE-Schnitt Bereiche (*Field of view*, FOV) auszuwählen, deren dazugehörige Bereiche anschließend im FISH-Schnitt in 40facher Vergrößerung gescannt werden. Für jede Probe werden zehn FOVs ausgewählt, gescannt und ausgewertet.

Die Auswertung der einzelnen Zellkerne erfolgt im *SOLO System*. Pro Probe werden die Sonden in 20 (für EGFR) bzw. 30 (für alle anderen Gene) Zellkernen gezählt. Die zu untersuchenden Zellkerne werden in der DAPI-Einstellung aus den FOV ausgewählt, dabei werden die Sonden nicht gesehen. Anschließend werden die zuvor ausgewählten Zellkerne mit überlagerten Signalen der Sonden betrachtet und die Anzahl der Sonden gezählt. Für

jeden Zellkern werden die Signale für die Gen- und Zentromersonden einzeln gezählt und dokumentiert.

Die Ergebnisse des CNVPanelizers und der FISH werden anschließend verglichen. Verwendet wird GraphPad Prism. Für jede Probe werden alle in der FISH ausgewerteten Zellen verwendet, um die durchschnittliche Anzahl von Gen- sowie Zentromersonden zu bestimmen. Außerdem wird die Standardabweichung berechnet. Für jedes Gen werden anschließend die durchschnittliche Kopienzahl der FISH mit dem Ergebnis des CNVPanelizers verglichen. Die Ergebnisse des CNVPanelizers werden zuvor mit 2 multipliziert, um die absolute Genanzahl anstatt der relativen Änderung zu erhalten. Zur statistischen Überprüfung der beiden Methoden werden anschließend alle Ergebnis-Punkte der fünf Gene verglichen. Die Daten-Punkte werden in einer Graphik dargestellt, es werden R^2 und der p-Wert berechnet.

2.7 Dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors

Ziel der dreidimensionalen Rekonstruktion des Tumors ist die räumliche Betrachtung der Verteilung der Kopienzahl-Veränderungen. Zunächst werden die Tumorproben basierend auf den Ergebnissen der CNVPanelizer-Analyse hierarchisch geclustert. Die Cluster-Analyse wurde durchgeführt von Dr. Liam Childs. Anschließend werden die HE-Schnitte der 17 Gruppen eingescannt und die jeweils vier Quadranten jedes Schnittes eingezeichnet. Die Ergebnisse der Cluster-Analyse werden anschließend auf die 3D-Rekonstruktion übertragen. Zusätzlich werden die Kopienzahl-Veränderungen bestimmter Gene einzeln auf die 3D-Rekonstruktion übertragen. Die dreidimensionale Rekonstruktion erfolgte durch Daniel Heim und Frederick Klauschen.

2.8 Material-Listen

Maschine	Firma
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
DynaMag™-96 Side Magnet	Life Technologies
Heizofen, Universalschrank	Memmert GmbH
Heizplatte Typ 14801	MEDAX GmbH & Co.KG
HM 340E Electronic Rotary Microtome	Thermo Scientific
Leitz DMRB Durchlicht-Mikroskop	Leica
Ion OneTouch™ 2 Instrument	Life Technologies
Ion OneTouch™ Enrichment System	Life Technologies
Ion Personal Genome Machine (<i>PGM</i> ™)	Life Technologies
Schüttelmaschine, Typ REAX 2000	Heidolph
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies
Thermomixer 5436	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Spectrafuge®	NeoLab®

Protokoll	Firma
Ion <i>PGM</i> ™ Sequencing 200 Kit v2 User Guide	Life Technologies
Ion <i>PGM</i> ™ Template OneTouch™ 2 200 Kit User Guide	Life Technologies
Ion AmpliSeq™ Library Preparation User Guide	Life Technologies

Kit	Firma
QIAamp®DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TaqMan®RNaseP Detection Reagents Kit	Life Technologies
Ion AmpliSeq™Library Kit 2.0	Life Technologies
Ion Library Quantitation Kit	Life Technologies
Ion PGM™Template OT2 Solutions 200 Kit	Life Technologies

Reagenzien	Firma
AMPure®XP	Beckman Coulter GmbH
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific
Ready Mix / PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific
DNA-Marker: Gene Ruler 100 bp Ladder 0,5 µg/µl	Thermo Scientific

weitere Materialien	Firma
Glasobjektträger Superfrost Ultra Plus R	Thermo Scientific
Ion 316™ Chip	Life Technologies

3 Ergebnisse

3.1 Einteilung des Tumors

Um möglichst umfassende Sequenzanalysen des Tumors durchführen zu können, wird ein Kolonkarzinom Stadium II (T2N0M0), bestehend aus den Blöcken 2 bis 6, in insgesamt 68 Proben unterteilt, siehe Abbildung 3.1, Seite 30. Aus den vorhandenen Schnitten werden jeweils mehrere hintereinanderliegende zusammengefasst, die gemeinsam eine Gruppe bilden, siehe Abschnitt 2.1, Seite 10. So ist ausreichend Material für die verschiedenen Versuche verfügbar.

Eine Gruppe besteht immer aus 19 aufeinanderfolgenden Schnitten mit unterschiedlicher Dicke:

- 12 * 10 μm für die DNA-Isolation
- 1 * 5 μm für einen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt (HE-Schnitt)
- 6 * 5 μm für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Anzahl der Schnitte pro Block hängt von seiner Dicke ab und variiert somit. Es ergeben sich für Block 2 fünf, Block 3 vier, Block 4 zwei, Block 5 vier und Block 6 zwei der oben aufgeführten Gruppen, sodass insgesamt 17 Gruppen für den Tumor vorliegen. Jeder der Schnitte wird in vier Quadranten unterteilt: A, B, C und D (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Auf dem HE-Schnitt einer jeden Gruppe wird dafür das Tumorgewebe unter einem Lichtmikroskop eingezeichnet. In Abbildung 3.2 ist die Einzeichnung der vier Quadranten auf einem HE-Schnitt beispielhaft dargestellt.

Alle Schnitte einer Gruppe, die zu einem Quadranten gehören, bilden eine Probe. Es ergeben sich aus den 17 Gruppen 68 Tumorproben. Neben den Tumorproben wird zusätzlich gesundes Gewebe vom Resektionsrand des Tumors verwendet (Block 1), welches als Kontrolle dient. Es umfasst die Proben 3.1.1 und 3.1.2 und wird in dieser Arbeit als Normalgewebe bezeichnet.

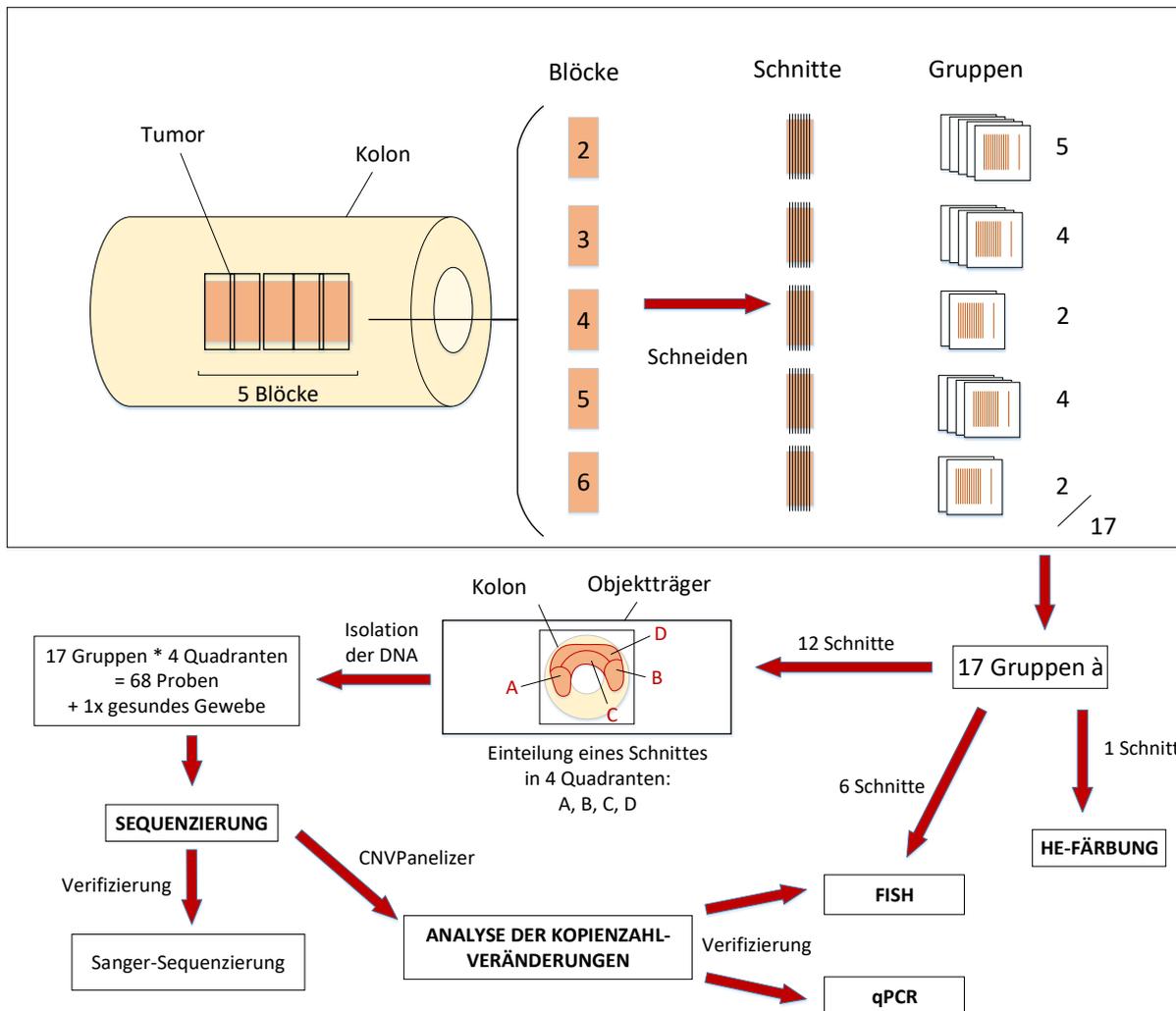


Abbildung 3.1 – Einteilung des Tumors in 68 Proben. Aus den Blöcken 2-6 werden 17 Gruppen gewonnen, die durch Einteilung in Quadranten 68 Proben ergeben. Eine Gruppe besteht dabei aus 19 Schnitten. Ein Schnitt pro Gruppe wird HE-gefärbt. Die DNA wird aus zwölf Schnitten gewonnen und anschließend sequenziert; die Verifizierung erfolgt mit Sanger-Sequenzierung. Aus den Sequenzierdaten wird mittels CNVPanelizer eine Analyse der Kopienzahl der Gene durchgeführt; die Verifizierung erfolgt mittels qPCR sowie FISH. Für die FISH können pro Gruppe bis zu 6 Schnitte verwendet werden.

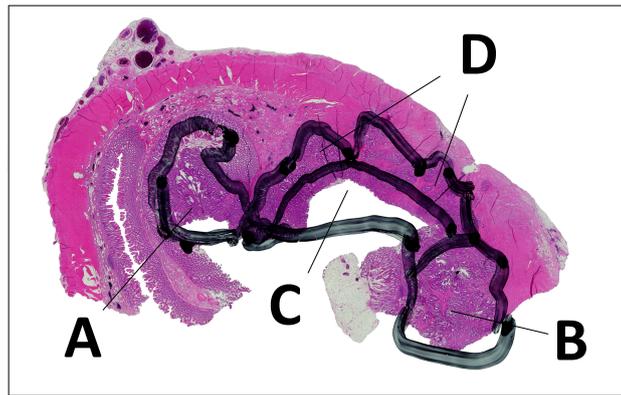


Abbildung 3.2 – HE-Schnitt einer Tumor-Gruppe, die Quadranten A bis D werden unter einem Lichtmikroskop eingezeichnet.

Benennung der Proben

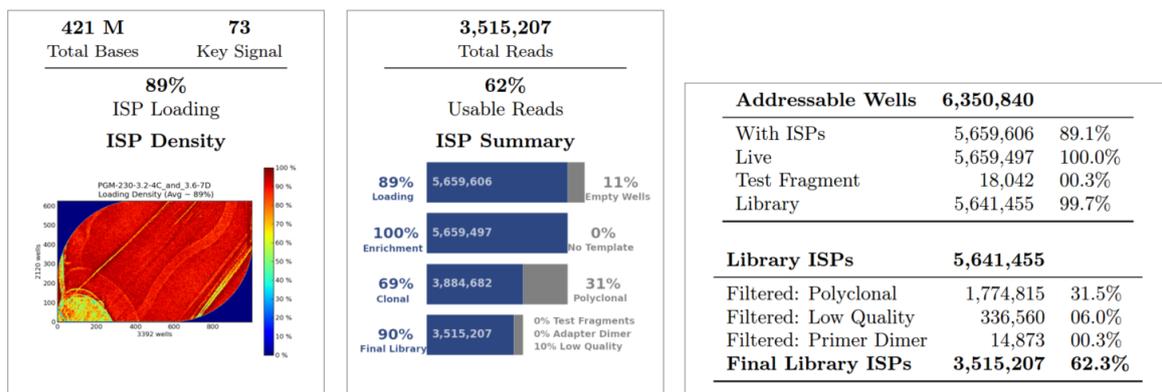
Die Benennung der Proben gestaltet sich zu deren späteren eindeutigen Identifizierung anhand der Tumornummer, der Blocknummer, der Gruppe und dem Quadranten. In diesem Projekt wird ausschließlich der Tumor 3 verwendet, die Benennung ergibt sich aus dem ursprünglich angedachten Projekt mit drei Tumoren. Block 1 umfasst das Normalgewebe vom Resektionsrand des Tumors, die Blöcke 2 bis 6 umfassen das Tumorgewebe. Die Gruppen sind aufsteigend nummeriert. Jeder Schnitt wird in die vier Quadranten A, B, C und D eingeteilt, siehe auch Abbildung 3.2. So stammt z.B. die Probe 3.2.1A von Tumor 3, Block 2, Gruppe 1, Quadrant A. Die Gruppen 3.4.2, 3.4.3 sowie 3.6.1 bis 3.6.5 werden aufgrund eines technischen Fehlers im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

3.2 Mutationsanalyse mittels CRC5.2 Panel Sequenzierung

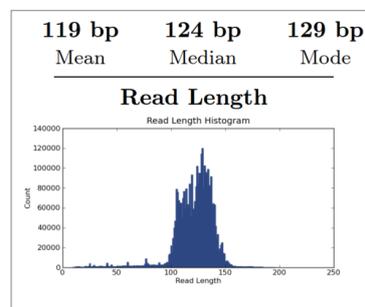
3.2.1 Qualitätskontrolle der Sequenzierung

Bei jedem Sequenzierlauf wird ein *Run Report* erstellt, der zeigt, ob ein Lauf technisch gut funktioniert hat. Ein Sequenzierlauf kann u.a. hinsichtlich Tiefe (*Depth*), Leselänge (*Read Length*) und verwendeten *Ion Sphere Particles* (*ISPs*) beurteilt werden. Die Tiefe beschreibt, wie häufig eine Stelle im Genom während der Sequenzierung abgelesen wurde. Die Leselänge gibt die Länge der einzelnen abgelesenen DNA-Abschnitte an. Ein DNA-Abschnitt wird als Amplikon bezeichnet, für jedes Amplikon wird ein Primer-Paar benötigt. Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des *Run Reports* für die Proben 3.2.4C und 3.6.7D. Dargestellt ist die Beladung des Chips, die Leselänge und der Anteil der verwendeten *ISPs*. Abbildung 3.3(a) zeigt auf der linken Seite farblich kodiert die Beladung des verwendeten Chips, die bei 89 % liegt. Die mittlere sowie rechte Abbildung stellen dar, dass insgesamt ca. 3,5 Mio. Leseläufe verwendet werden konnten. Ca. 5,6 Mio. der Vertiefungen

des Chips sind mit *ISPs* beladen, von denen 31 % nicht ausgewertet werden konnte, da es sich um polyklonale *ISPs* handelt. Weitere 10 % der klonalen *ISPs* weisen eine zu niedrige Qualität auf. Abbildung 3.3(b) zeigt die Leselängen der beiden Proben, die durchschnittlich bei 119 Basenpaaren liegt. Die Auswertung aller *Run Reports* zeigt, dass alle Proben eine ausreichende Qualität aufweisen. Die durchschnittliche Tiefe der Proben reicht von 920 bis 2739, der Mittelwert liegt bei 1868. Die durchschnittliche Leselänge der einzelnen Proben reicht von 110 bis 122, der Mittelwert liegt bei 118. Die Proben weisen damit hinsichtlich Tiefe und Leselänge eine ausreichende Qualität auf. Alle untersuchten Proben können somit in die Auswertung einbezogen werden.



(a)



(b)

Abbildung 3.3 – *Run Report* der Tumorproben 3.2.4C und 3.6.7D: (a) zeigt in der linken Abbildung die farblich kodierte Beladung des verwendeten Chips mit *ISPs*. Die Beladung beträgt insgesamt 89 %, d.h. 89 % der Vertiefungen des Chips beinhalten *ISPs*. In der mittleren und rechten Abbildung wird der Anteil der verwendbaren *ISPs* aufgezeigt. Der Chip beinhaltet ca. 6,4 Mio. Vertiefungen, von denen ca. 5,6 Mio. mit *ISPs* gefüllt sind, was der Beladung von 89 % entspricht. Von *ISPs* können 31,5 % nicht verwendet werden, da es sich um polyklonale *ISPs* handelt. Insgesamt können 62,3 % der *ISPs* in die Auswertung einbezogen werden. (b) zeigt die Leselängen der beiden Proben, die durchschnittlich 119 Basenpaare beträgt.

3.2.2 Auswertung und Visualisierung der Quelldaten

Aus den von der *PGM*^m erstellten Rohdaten werden zunächst die Quelldaten generiert. Sie bilden den Ausgangspunkt für die Auswertung der Sequenzierdaten. Die Quelldaten werden, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, gefiltert und anschließend visualisiert.

Die Tabelle der Quelldaten umfasst 316 Mutationen in den 68 Tumorproben. Zunächst werden die 167 *intronic mutations* und die 55 *synonymous mutations* ausgeschlossen. Es verbleiben 71 *missense*-, 16 *frameshift*-, sowie 7 *stop gain*-Mutationen.

Anschließend werden homopolymere Sequenzen, Mutationen mit einem Abstand von zwei oder weniger Basen zum Rand des Amplikons sowie Mutationen, die im gesunden Gewebe vorliegen, ausgeschlossen. Abschließend werden nur noch die Mutationen eingeschlossen, die einen Qualitätswert von > 50 aufweisen.

Nach diesen Filterschritten verbleiben zunächst 14 Mutationen des Tumors. Abbildung 3.4 zeigt die Visualisierung der verbleibenden 14 Mutationen in einer Heatmap. Die Art der Mutation und das Vorliegen in den jeweiligen Proben ist farblich kodiert: orange für *frameshift*-Mutationen, braun für *missense*-Mutationen sowie schwarz für *stop gain*-Mutationen. Es liegen Mutationen in 12 verschiedenen Genen vor, in APC und HDAC2 sind jeweils zwei Mutationen vorhanden.

Die Tabelle 3.1 zeigt die relevanten Informationen über die 14 in der Heatmap dargestellten Mutationen. Die Tabelle beinhaltet Informationen über das Gen, das Chromosom, die Aminosäure-Position, die Nukleotid-Position und die Art der Mutation. Die Mutationen werden anhand des Gens und der Aminosäure-Position benannt (z.B. APC p.1367).

Es zeigt sich, dass die Mutation TP53 p.175 in allen Tumorproben vorkommt, die Mutation APC p.1367 und NOTCH3 p.1494 in den meisten, während alle anderen Mutationen nur in einigen und einzelnen Tumorproben vorliegen, siehe Abbildung 3.4.

Sechs der in der Abbildung 3.4 dargestellten Mutationen werden im Rahmen meiner Arbeit mit Sanger-Sequenzierung verifiziert. Es handelt sich um die folgenden Mutationen: APC p.1367, ERBB4 p.1268, MCF2 p.596, PIK3CA p.1053, TP53 p.175 sowie WNK3 p.908. Wie in den Methoden (siehe Abschnitt 2.3, Seite 14) aufgezeigt, wurden einige der 14 in Abbildung 3.4 dargestellten Mutationen schon im Vorfeld meiner Arbeit überprüft und als technische Fehler eingestuft. Sie werden deshalb im Rahmen meiner Arbeit nicht in die Verifizierung eingeschlossen. Dies umfasst die Mutationen ADAM29 p.800, APC p.1553, ERBB3 p.442, HDAC2 p.553, LRRK2 p. 1638, NOTCH3 p.1494 sowie TCF7L2 p.458.

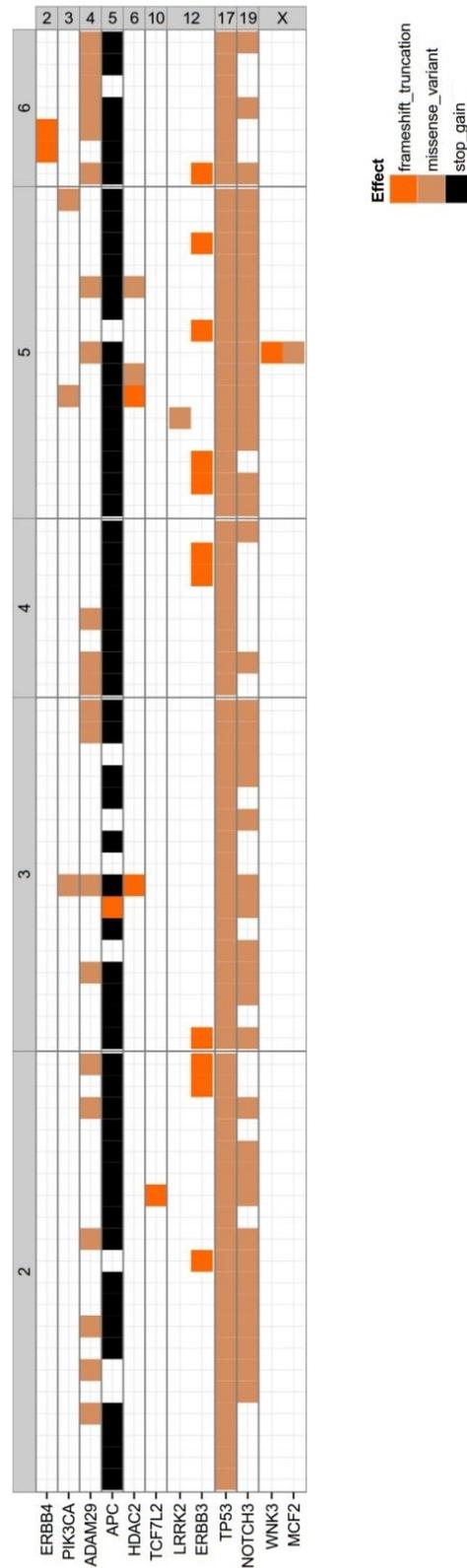


Abbildung 3.4 – Darstellung der verbleibenden 14 Mutationen in einer Heatmap. Auf der x-Achse sind die Tumorproben, eingeteilt in die Blöcke 2 bis 6, dargestellt. Auf der y-Achse erfolgt die Darstellung der 14 Mutationen in insgesamt 12 Genen. Links sind die Gene benannt, rechts nach Chromosomen sortiert. Der Effekt der Mutation ist farblich kodiert: orange für *frameshift*-Mutationen, braun für *missense*-Mutationen, schwarz für *stop gain*-Mutationen. Eine Probe ist farblich markiert, wenn die jeweilige Mutation vorliegt und die Filterkriterien passiert hat.

Tabelle 3.1 – Informationen zu den Mutationen aus Abbildung 3.4. Alphabetische Reihenfolge der Gene; dargestellt sind die Gene, das Chromosom, die Aminosäure-Position, die Nukleotid-Position sowie die Art der Mutation für die gezeigten 14 Mutationen.

Gen	Chromosom	Aminosäure-Position	Nukleotid-Position	Art der Mutation
ADAM29	4	800	175899075	missense
APC	5	1367	112175390	stop gain
APC	5	1553	112175951	frameshift
ERBB3	12	442	56487179	missense
ERBB4	2	1268	212248464	frameshift
HDAC2	6	553	114264516	frameshift
HDAC2	6	553	114264517	missense
LRRK2	12	1638	40713874	missense
MCF2	X	596	138697051	missense
NOTCH3	19	1494	15285135	missense
PIK3CA	3	1053	178952103	missense
TCF7L2	10	458	114925316	frameshift
TP53	17	175	7578406	missense
WNK3	X	908	54276057	frameshift

3.2.3 Validierung der Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung

APC p.1367

Das Gen APC weist laut den Quelldaten in 59 der 68 Tumorproben eine Mutation an der Aminosäure-Position p.1367 (Basen-Position 112175390, p.1367) auf. Diese führt zu einem Stop-Kodon im Leserahmen. Im Normalgewebe ist diese Mutation nicht vorhanden. Die Mutation wird in neun Tumorproben und dem Normalgewebe mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Es werden sowohl Tumorproben, die diese Mutation tragen, als auch solche, die sie laut Quelldaten nicht tragen, zur Verifizierung ausgewählt.

Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung für die zehn untersuchten Proben. Die Teilabbildung 3.5(a) zeigt die Sequenz für das Normalgewebe. An der fraglichen Position 1367 befindet sich die Base Guanin. Die Teilabbildungen 3.5(b) bis 3.5(j) zeigen die Sanger-Sequenzierung der 9 Tumorproben. Alle Tumorproben weisen an der zu untersuchenden Stelle einen G>A Austausch auf, der mit einem orangenen Kreis markiert ist.

Die Betrachtung der Mutation mittels Golden Helix GenomeBrowse[®] gibt Aufschluss über die Rohdaten der Sequenzierung. Es zeigt sich, dass die Tiefe des gesamten APC-Amplikons sehr niedrig ausfällt. Damit hebt sich die Tiefe dieses Amplikons deutlich von der durchschnittlichen Tiefe der gesamten Arbeit ab, die bei 1868 liegt. Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft die Tiefe verschiedener APC-Amplikons für die Probe 3.2.1C. Die Mutation APC p.1367 ist mit einer vertikalen gestrichelten Linie markiert und liegt innerhalb eines Amplikons mit einer vergleichsweise sehr geringen Tiefe. Die Abbildung 3.7 zeigt die Tiefen an der Stelle der Mutation APC p.1367 für die Proben 3.1.1, 3.2.1C und 3.2.3C. Die Tiefen liegen bei 47, 69 bzw. 15 und fallen damit sehr gering aus.

Die Mutation APC p.1367 ist in allen mittels Sanger-Sequenzierung untersuchten Tumorproben vorhanden. Einige der Tumorproben haben aufgrund einer zu geringen Tiefe an der Stelle der Mutation die Qualitätskriterien beim Filtern nicht passiert. Es ist davon auszugehen, dass die Mutation ebenfalls in allen nicht untersuchten Tumorproben und somit homogen im Tumor verteilt vorliegt.

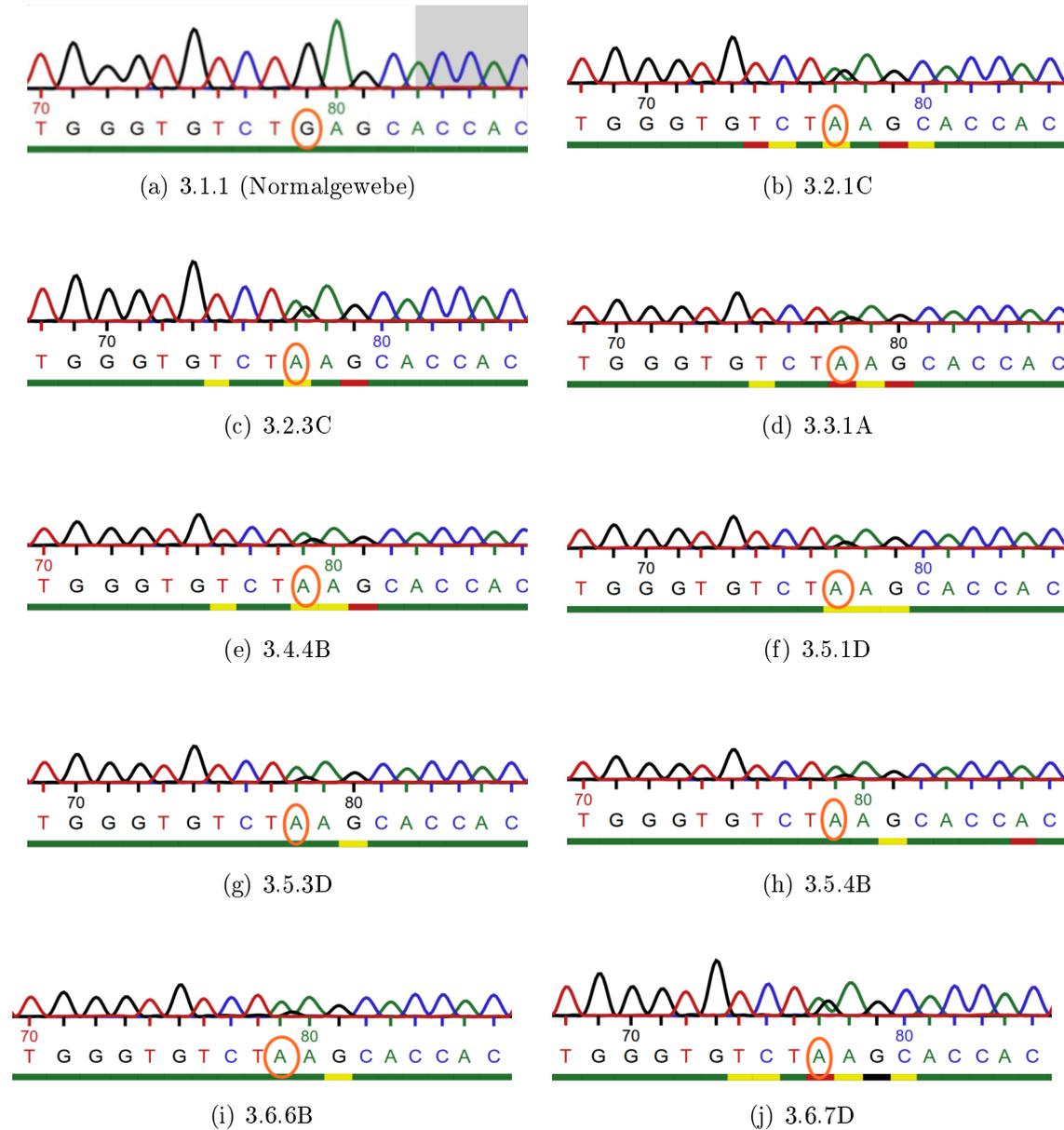


Abbildung 3.5 – Sanger-Ergebnisse für die Mutation APC p.1367. (a) zeigt das Normalgewebe, (b) – (j) die 9 untersuchten Tumorproben. Es ist jeweils der Rückwärtsstrang dargestellt, die Stelle der Mutation APC p.1367 ist mit einem orangenen Kreis markiert. Das Normalgewebe zeigt an der fraglichen Stelle keine Veränderung, bei allen Tumorproben kommt es zu einem Austausch von G>A.



Abbildung 3.6 – Tiefen verschiedener Amplicons von APC für die Probe 3.2.1C. Die Rohdaten der Sequenzierung sind in Golden Helix GenomeBrowse[®] visualisiert. Die vertikale gestrichelte Linie markiert die Mutation APC p.1367. Die Tiefen der APC-Amplicons fallen sehr unterschiedlich aus und reichen bis ca. 4500. Die Mutation APC p.1367 liegt in einem Amplicon mit einer vergleichsweise sehr geringen Tiefe.

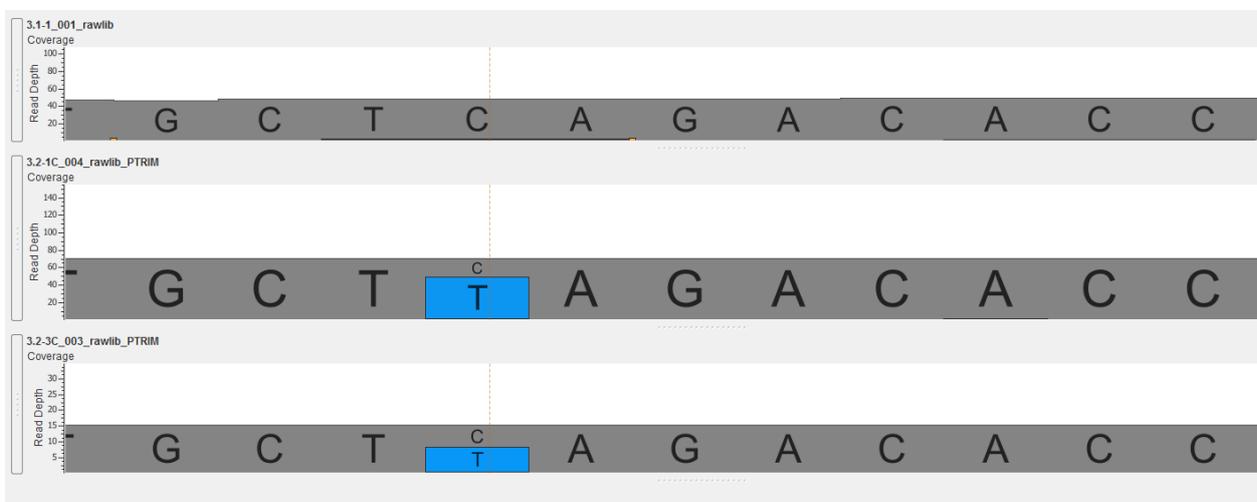


Abbildung 3.7 – Darstellung der Basensequenz um die Mutation APC p.1367 für die Proben 3.1.1, 3.2.1C und 3.2.3C. Die Rohdaten der Sequenzierung sind in Golden Helix GenomeBrowse[®] visualisiert. Dargestellt sind die Vorwärtsstränge. Die vertikale gestrichelte Linie markiert die Stelle der Mutation. Es zeigt sich für die beiden Tumorsequenzen 3.2.1C und 3.2.3C ein Austausch C>T an der fraglichen Stelle. Das Normalgewebe (Probe 3.1.1) zeigt diesen Austausch nicht. Ebenfalls dargestellt ist die Tiefe der einzelnen Sequenzierläufe, siehe linke Legende. Die Tiefe liegt bei den drei Proben bei 47, 69 bzw. 15 und fällt damit gering aus.

TP53 p.175

In allen Tumorproben wurde eine Mutation im Gen TP53 gefunden. Es handelt sich um eine *missense*-Mutation, bei der es zu einem Austausch der Aminosäure 175 kommt (Basen-Position 54276057, p.175). Die Quelldaten zeigen gute Qualitätswerte in allen Proben.

Zur Überprüfung der Mutation werden das Normalgewebe und drei Tumorproben mit der Sanger-Sequenzierung analysiert. In Abbildung 3.8 sind die Sanger-Sequenzen für das Normalgewebe und die Tumorproben 3.3.2C, 3.3.3A und 3.5.1B dargestellt. Die Sequenz des Normalgewebes weist keine Veränderungen auf. In den Tumorproben zeigt sich an ein G>A Austausch. Die Mutation TP53 p.175 wird somit durch die Sanger-Sequenzierung bestätigt.

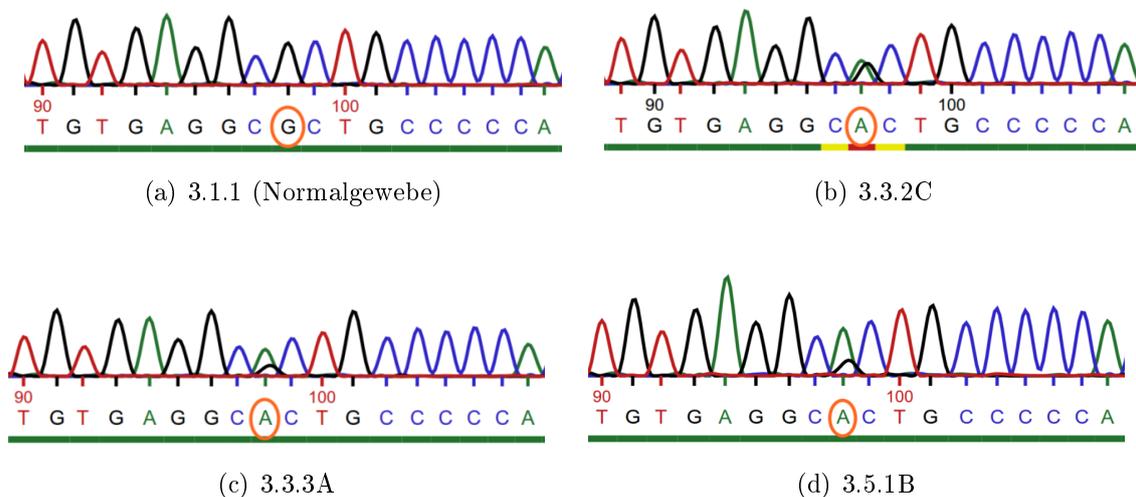


Abbildung 3.8 – Sanger-Ergebnisse für die Mutation TP53 p.175. (a) zeigt das Normalgewebe, (b) – (d) die Tumorproben 3.3.2C, 3.3.3A und 3.5.1B. Es ist jeweils der Rückwärtsstrang dargestellt, die Stelle der Mutation TP53 p.175 ist mit einem orangenen Kreis markiert. Das Normalgewebe zeigt an der fraglichen Stelle keine Veränderung, bei allen Tumorproben kommt es zu einem Austausch von G>A.

Mutationen in den Genen ERBB4 p.1268, MCF2 p.596, PIK3CA p.1053 sowie WNK3 p.908 können durch Sanger-Sequenzierung nicht validiert werden

Vier weitere der mit *PGMTM* detektierten Mutationen werden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Es werden die Mutationen ERBB4 p.1268, MCF2 p.596, PIK3CA p.1053 sowie WNK3 p.908 untersucht, für weitere Informationen über die Mutationen siehe Tabelle 3.1, Seite 35. Keine der fraglichen Mutationen bestätigt sich in der Sanger-Sequenzierung. In Abbildung 3.9 sind die *PGMTM*-Ergebnisse und vergleichend die Sanger-Ergebnisse für jeweils eine Tumorprobe pro Mutation dargestellt. Die Darstellung der *PGMTM*-Ergebnisse erfolgt mittels Golden Helix GenomeBrowse[®]. Abbildung 3.9(a) zeigt die Probe 3.5.3A für die Mutation ERBB4 p.1268. Das *PGMTM*-Ergebnis zeigt eine Deletion der Base Adenosin (in pink) sowie einen Austausch zu Thymin (in blau). Dies kann in der Sanger-Sequenzierung nicht bestätigt werden, es liegt ausschließlich die Base Adenosin vor. Abbildung 3.9(b) zeigt die Probe 3.5.3A für die Mutation MCF2 p.596. Das *PGMTM*-Ergebnis zeigt eine Deletion der Base Adenosin (in pink) sowie einen Austausch zu Guanin (in grün). Dies kann in der Sanger-Sequenzierung ebenfalls nicht bestätigt werden, es liegt ausschließlich die Base Adenosin vor. Abbildung 3.9(c) zeigt die Probe 3.3.2D für die Mutation PIK3CA p.1053. Das *PGMTM*-Ergebnis zeigt eine Deletion der Base Adenosin (in pink) sowie einen Austausch zu Cytosin (in gelb). Die Sanger-Sequenzierung kann diesen Austausch nicht bestätigen. Abbildung 3.9(d) zeigt die Probe 3.5.3A für die Mutation WNK3 p.809. Das *PGMTM*-Ergebnis zeigt eine Deletion der Base Thymin (in pink). Die Sanger-Sequenzierung kann diese Deletion ebenfalls nicht bestätigen. Es kann somit keine der hier untersuchten, mittels *PGMTM* detektierten Mutationen in der Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Alle untersuchten Mutationen betreffen die erste Base innerhalb einer homopolymeren Sequenz.

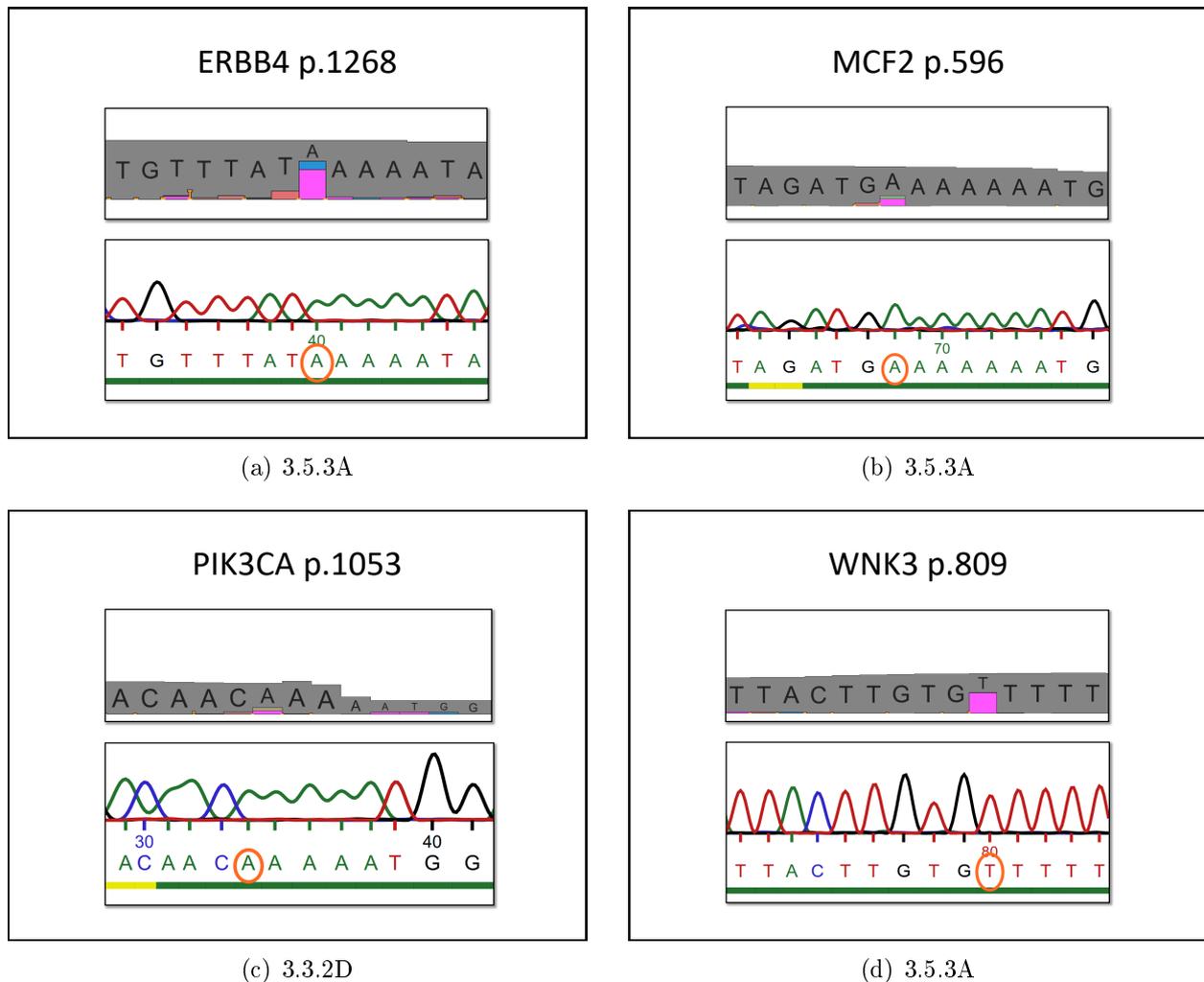


Abbildung 3.9 – Vergleichende Darstellung der *PGM*[™]- und Sanger-Ergebnisse für die Mutationen ERBB4 p.1268, MCF2 p.596, PIK3CA p.1053 und WNK3 p.908. Es ist jeweils eine Probe pro Mutation dargestellt. Oben in jeder Teilabbildung findet sich die Rohdaten der *PGM*[™]-Ergebnisse, visualisiert in Golden Helix GenomeBrowse[®]. Die sequenzierten Basen, die der Vergleichssequenz entsprechen, sind grau dargestellt, Deletionen einer Base in pink, sowie der Austausch einer Base zu Adenosin in rot, zu Thymin in blau, zu Guanin in grün und zu Cytosin in gelb. Unten in jeder Teilabbildung ist die dazugehörige Sequenz in der Sanger-Sequenzierung dargestellt. Die zu untersuchende Base ist mit einem orangefarbenen Kreis umrandet. Es ist für alle Proben der Vorwärtsstrang gezeigt. In der Sanger-Sequenzierung zeigt sich für die vier untersuchten Proben keine Mutation, es liegt jeweils ausschließlich die Vergleichssequenz vor.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung

Durch die Sanger-Sequenzierung kann gezeigt werden, dass in dem Tumor von den untersuchten Mutationen nur die Mutationen APC p.1367 und TP53 p.175 vorliegen. Die Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse aller mit Sanger-Sequenzierung verifizierten Mutationen auf. Die Mutationen APC p.1367 und TP53 p.175 bestätigen sich in allen untersuchten Tumorproben, jedoch nicht im Normalgewebe. Die weiteren vier Mutationen konnten weder im Normalgewebe noch in den Tumorproben nachgewiesen werden.

Tabelle 3.2 – Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung. Bestätigte Mutationen sind mit einem + dargestellt, nicht bestätigte mit einem •.
3.1.1: Normalgewebe, 3.2.1C - 3.6.7D: Tumorproben.

Probe: \ Mutation:	APC p.1367	ERBB4 p.1268	MCF2 p.596	PIK3CA p.1053	TP53 p.175	WNK3 p.908
3.1.1	•	•	•	•	•	•
3.2.1C	+					
3.2.3C	+					
3.2.4C				•		
3.2.5A				•		
3.2.5B				•		
3.3.1A	+					
3.3.1D				•		
3.3.2C					+	
3.3.2D				•		
3.3.3A					+	•
3.3.4B						•
3.4.4B	+					
3.4.4C		•				
3.5.1A						•
3.5.1B				•	+	
3.5.1D	+					
3.5.2C						•
3.5.2D		•				
3.5.3A		•	•			•
3.5.3C		•				
3.5.3D	+					
3.5.4B	+					
3.6.6B	+					
3.6.6C		•				
3.6.6D		•				
3.6.7C		•				
3.6.7D	+					

3.3 Veränderung der Kopienzahlen

3.3.1 Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer

Da in Tumoren nicht nur Mutationen, sondern auch Veränderungen der Kopienzahlen vorliegen können, werden diese zusätzlich untersucht. Die Analyse der Kopienzahlen erfolgt mittels CNVPanelizer. Als Ergebnis dieser Analyse liegen in den Quelldaten Werte vor, die die Kopienzahl eines Gens relativ zu dem Referenzgewebe beschreiben. Dabei zeigen Werte < 1 , dass das ausgewählte Gen weniger häufig als im Referenzgewebe, also vermindert vorliegt. Werte > 1 zeigen, dass das Gen häufiger als in der Referenzprobe, also vermehrt, vorliegt.

Die Quelldaten werden anhand der in den Methoden aufgezeigten Methode ausgewertet, siehe Abschnitt 2.4, Seite 18. Abbildung 3.10 visualisiert die Kopienzahl-Veränderungen der dabei verbleibenden 62 Gene in einer Heatmap. Auf der x-Achse sind die 68 Tumorproben aufgezeigt, auf der y-Achse die 62 Gene, die die angewendeten Kriterien erfüllt haben. Die Tumorproben sind anhand der Blöcke (*Blocks*, Leiste oben), die Gene anhand der Chromosomen (*Chromosomes*, Leiste rechts) sortiert. Im oberen Teil der Abbildung ist zunächst die Verteilung der beiden zuvor mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen dargestellt. Die Mutation TP53 p.175 ist grün (*missense variant*), die Mutation APC p.1367 orange (*stop gain*) markiert. Der untere Teil der Abbildung umfasst die Kopienzahl-Veränderungen der 68 Tumorproben. Für eine bessere Übersicht sind nur die für diese Arbeit relevanten Gene beschriftet. Die Kopienzahl-Veränderungen (*Copy Number Variation*, CNV) sind farblich kodiert dargestellt. Die Skala auf der rechten Seite zeigt, dass Werte > 1 rot und Werte < 1 blau dargestellt sind. Rote Felder stellen somit eine Vermehrung (Amplifikation), blaue Felder eine Verminderung (Deletion) der Genabschnitte im Vergleich zu der Referenzprobe dar. Je stärker die Intensität der Farbe, desto stärker die Amplifikation bzw. Deletion des Gens. Die Gene EGFR, GNAS und EDEM2 liegen in allen Proben amplifiziert vor, MMP9 in den meisten und BRCA2 sowie CARD11 in einem Teil der Proben. Es liegen u.a. die Gene APC, MAP2K4, TP53 sowie SMAD4 vermindert vor; bei diesen Genen ist nur ein Teil der Tumorproben betroffen. Es zeigt sich außerdem, dass in bestimmten Chromosomen vermehrte Amplifikationen bzw. Deletionen vorliegen. So liegen in den Chromosomen 7, 8, 13 und 20 mehrere Gene mit Amplifikationen vor, in den Chromosomen 17 und 18 vermehrt Gene mit Deletionen.

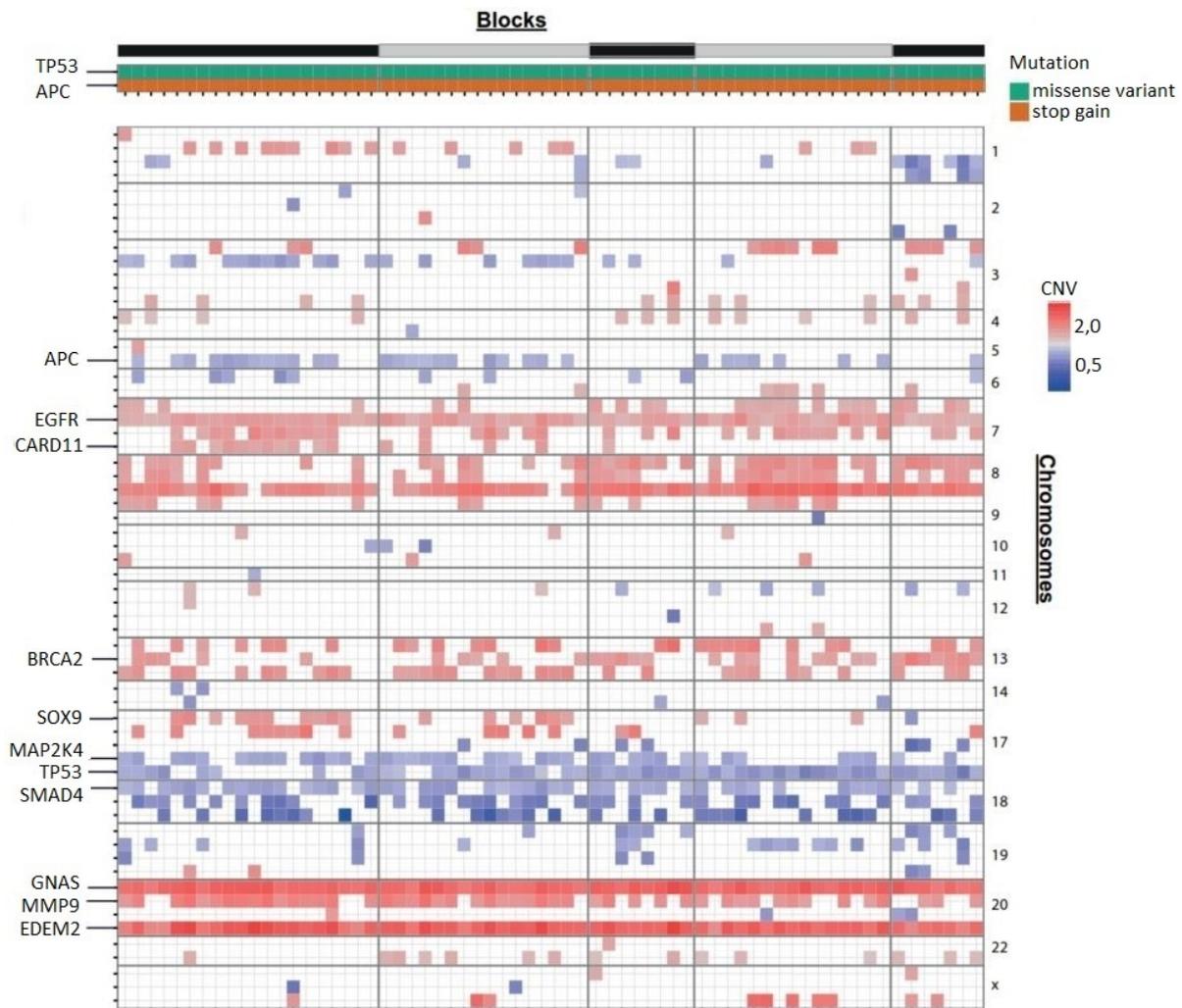


Abbildung 3.10 – Darstellung der Verteilung von Mutationen und Kopienzahl-Veränderungen in den 68 Proben des untersuchten Tumors. Auf der x-Achse sind die 68 Tumorproben dargestellt, sortiert anhand der Blöcke (*Blocks*, Leiste oben). Im oberen Teil der Abbildung sind die beiden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen aufgezeigt. In grün ist die *missense*-Mutation von TP53 p.175 dargestellt, in orange die *stop gain*-Mutation von APC p.1367. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Kopienzahl-Veränderungen relativ zum Referenzgewebe. Auf der y-Achse sind die 62 Gene mit Kopienzahl-Veränderungen dargestellt; die Gene sind anhand der Chromosomen sortiert (*Chromosomes*, Leiste rechts). Die Farbe kodiert die Veränderung: weiß: keine signifikante Veränderung, blau: Deletion, rot: Amplifikation. Die Intensität der Farbe spiegelt die Höhe der Deletion bzw. Amplifikation wider. Von den 62 dargestellten Genen sind die 11 für diese Arbeit relevanten Gene beschriftet. Abbildung ähnlich veröffentlicht in [51].

3.3.2 Verifizierung der Kopienzahl-Veränderungen mittels qPCR

Bei der Analyse von Kopienzahl-Veränderungen mittels CNVPanelizer handelt es sich um eine neue, bisher wenig erprobte Methode. Die sequenzierte DNA ist außerdem aufgrund von Vervielfältigungsschritten nicht proportional zur eingesetzten DNA. Die Verifizierung der Ergebnisse des CNVPanelizers erfolgt zunächst mittels qPCR. Die zuvor dargestellten Kopienzahl-Veränderungen der Gene APC, EDEM2, GNAS, MAP2K4, MMP9, SMAD4, SOX9 und TP53 werden dabei im Vergleich zum Normalgewebe (Probe 3.1.2) überprüft. Für jedes der acht Gene werden vier Tumorproben analysiert. Wenn möglich, wurde die qPCR mit zwei Primer-Paaren pro Gen durchgeführt (dies trifft zu für die Gene APC, GNAS, MAP2K4, SMAD4 und TP53). Für EDEM2, MMP9 und SOX9 war dies aufgrund technischer Probleme nicht möglich, sodass für diese Gene jeweils nur ein Primer-Paar verwendet wurde. Die Primer sind so gewählt, dass sie nicht identisch sind zu denen, die für die Sequenzierung mittels *PGM*[™] verwendet wurden.

Sowohl die Ergebnisse des CNVPanelizers als auch der qPCR beschreiben zunächst relative Veränderungen im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe. Es wird angenommen, dass die Kopienzahl des Normalgewebes $n=2$ beträgt. Die Ergebnisse des CNVPanelizers und der qPCR werden mit 2 multipliziert um sie als absolute Kopienzahlen darzustellen. Die Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse für die acht untersuchten Gene. Dabei werden jeweils die Ergebnisse des CNVPanelizers und der qPCR miteinander verglichen.

Die Abbildung 3.11 zeigt, dass die Kopienzahlen von APC für alle vier Proben sowohl in der Analyse mittels CNVPanelizer als auch mittels qPCR vermindert sind. Für die Proben 3.2.2D, 3.4.4B, 3.5.1A und 3.5.4C kann die qPCR somit die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer bestätigen. Die absoluten Werte der beiden Methoden ähneln sich und die Standardabweichung der qPCR ist dabei gering.

Die Abbildung zeigt weiterhin die vergleichende Darstellung der Amplifikation von EDEM2 sowie GNAS. Für drei der Proben unterscheiden sich dabei die Werte der beiden Methoden. So beträgt bei der Analyse von EDEM2 für die Probe 3.5.4C die Kopienzahl 4,3 bzw. 7,4 (Analyse mittels CNVPanelizer bzw. qPCR). Bei der Analyse von GNAS zeigt die Probe 3.2.3A eine Kopienzahl von 5,1 bzw. 3,1 bzw. 3,5 und die Probe 3.4.4C eine Kopienzahl von 6,2 bzw. 3,5 bzw. 4,2 (Analyse mittels CNVPanelizer bzw. qPCR, Primer-Paar 1 bzw. qPCR, Primer-Paar 2). Für die Proben 3.2.3D, 3.3.4A und 3.5.1D von EDEM2 sowie die Proben 3.2.5C und 3.4.4.A von GNAS zeigen beide Methoden sehr ähnliche Ergebnisse und die Analyse des CNVPanelizers kann durch die qPCR bestätigt werden.

Für die Gene MAP2K4 und SMAD4 kann die qPCR eine Verminderung der Kopienzahlen bestätigen. Die Werte der einzelnen Proben unterscheiden sich beim Vergleich der beiden Methoden jedoch größtenteils. Für die Proben 3.2.2B, 3.3.4C und 3.4.4D fallen für beide

Gene die Kopienzahlen der qPCR deutlich geringer aus als die des CNVPanelizers. Allein für die Probe 3.6.7C liefern beide Methoden sowohl bei der Analyse von MAP2K4 als auch von SMAD4 ähnliche Ergebnisse.

Für MMP9 kann mittels der qPCR eine Vervielfältigung des Gens bestätigt werden. Zwei der vier Proben (3.2.3A und 3.5.4D) zeigen sehr ähnliche Kopienzahlen, bei den weiteren zwei Proben (3.2.5C und 3.4.4A) unterscheiden sich die beiden Methoden hinsichtlich der Höhe der Kopienzahlen. So liegen für die Probe 3.2.5C Werte von 2,7 bzw. 4,0 und für die Probe 3.4.4A Werte von 2,5 bzw. 3,5 vor (Analyse mittels CNVPanelizer bzw. qPCR).

In der Abbildung ist weiterhin dargestellt, dass die qPCR für drei der vier Proben von SOX9 die Analyse mittels CNVPanelizer bestätigt. In den Proben 3.2.5C, 3.4.4A und 3.5.4D liegt eine Vervielfältigung des Gens vor, die mit beiden Methoden gezeigt werden kann. 3.2.3A ist die einzige aller sowohl mittels CNVPanelizer als auch mittels qPCR untersuchten Proben, bei der die beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich einer Vervielfältigung bzw. Verminderung des Gens liefern. Der CNVPanelizer zeigt hier eine Vervielfältigung (Kopienzahl von 2,8), die qPCR eine Verminderung (Kopienzahl 1,5) des Gens.

Im Gen TP53 liegt eine Verminderung der Kopienzahlen vor. Für die Probe 3.2.2B zeigt sich ein Unterschied der Kopienzahlen von 1,8 bzw. 1,0 bzw. 0,9 (Analyse mittels CNVPanelizer bzw. qPCR, Primer-Paar 1 bzw. qPCR, Primer-Paar 2). Für die Proben 3.3.4C, 3.4.4D und 3.6.7C liefern beide Methoden ähnliche Ergebnisse und die qPCR kann die Analyse des CNVPanelizers bestätigen.

Da für alle Gene jede Probe nur einmal untersucht wurde, werden die Ergebnisse der acht Gene anschließend zusammengefasst betrachtet. In Abbildung 3.12 sind alle Ergebnisse der qPCR im Vergleich mit denen des CNVPanelizers dargestellt. Das Ergebnis jeder Probe ist dabei als Punkt in der Abbildung dargestellt. Die x-Achse zeigt die absolute Kopienzahl der Analyse mittels CNVPanelizer an, die y-Achse die absolute Kopienzahl der qPCR. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der beiden Methoden, der R^2 -Wert beträgt 0,73, der P-Wert beträgt $< 0,0001$. Die Analyse mittels CNVPanelizer wird somit weitgehend durch die qPCR bestätigt.

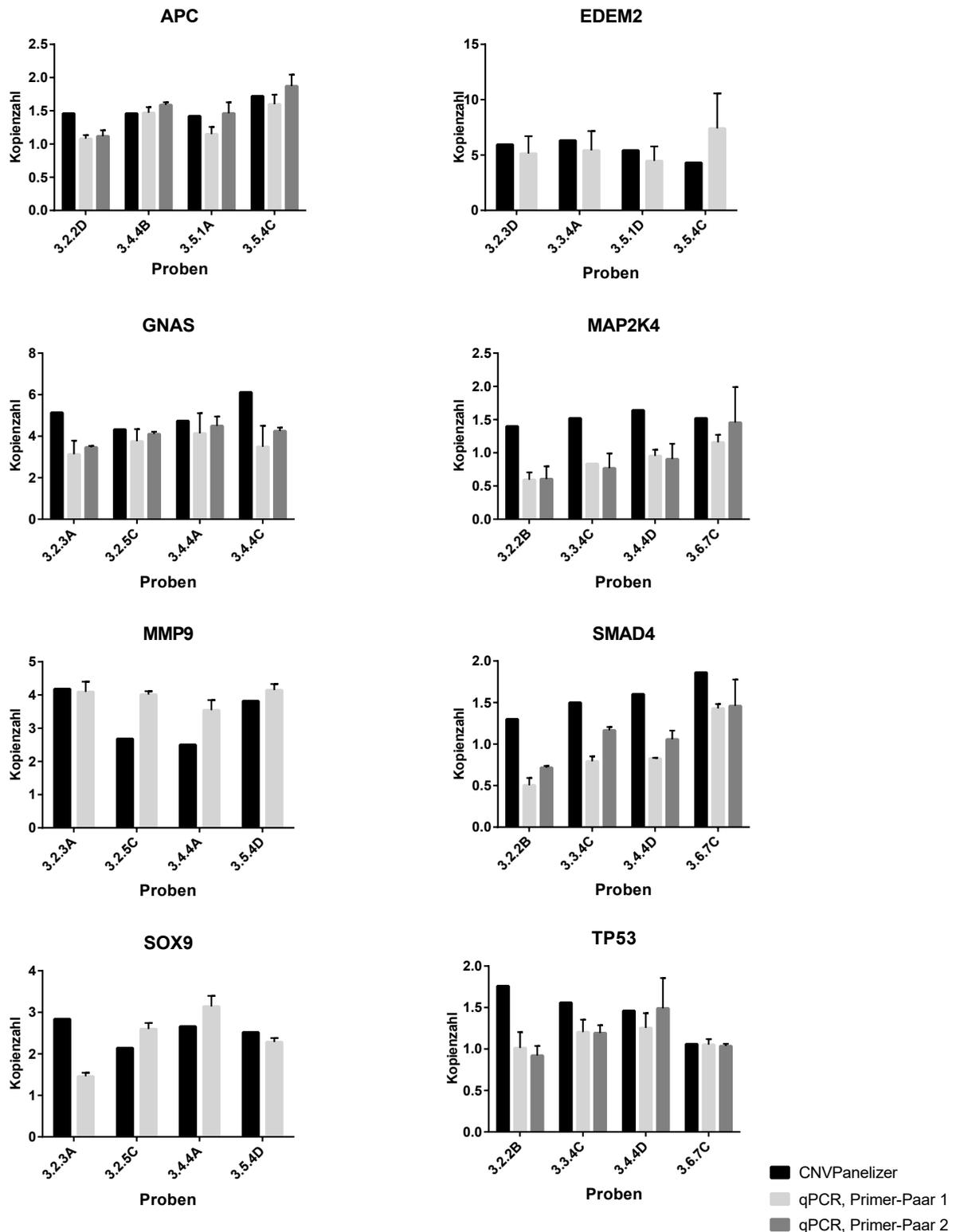


Abbildung 3.11 – Vergleichende Darstellung der CNVPanelizer- und qPCR-Ergebnisse für die Gene APC, EDEM2, GNA, MAP2K4, MMP9, SMAD4, SOX9 und TP53. Jedes der acht einzelnen Diagramme zeigt auf der y-Achse die absolute Kopienzahl und auf der x-Achse die jeweils vier untersuchten Proben. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse des CNVPanelizers, die grauen die der qPCR (hellgrau für das Primer-Paar 1, dunkelgrau für das Primer-Paar 2). Für die qPCR ist außerdem die Standardabweichung angegeben.

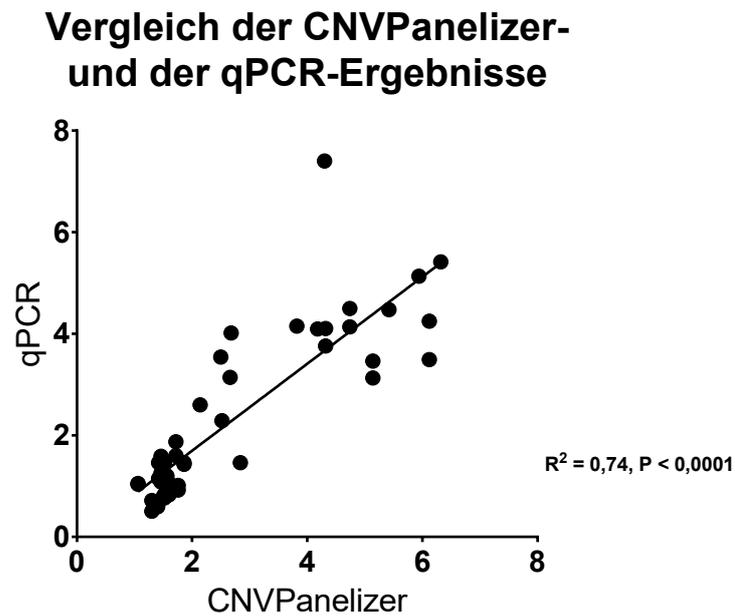


Abbildung 3.12 – Vergleich der absoluten Kopienzahlen der Analyse mittels CNVPanelizer und mittels qPCR. Aufgetragen sind die 52 Datenpunkte, es wurden für acht Gene jeweils vier Tumorproben mittels qPCR (mit einem bzw. zwei Primer-Paaren) untersucht. Die x-Achse zeigt die absolute Kopienzahl der Analyse mittels CNVPanelizer an, die y-Achse die absolute Kopienzahl der qPCR.

3.3.3 Verifizierung der Kopienzahl-Veränderungen mittels FISH

Die Kopienzahl-Veränderungen werden zusätzlich mittels FISH, einer PCR-Amplifikation-unabhängigen Methode, verifiziert. FISH basiert darauf, die absolute Anzahl eines Gens pro Zellkern zu detektieren. Die Ergebnisse des CNVPanelizers werden deshalb wie zuvor mit 2 multipliziert, damit die Ergebnisse mit denen der FISH vergleichbar sind. Es wurden jeweils 13 bis 18 Proben der Gene BRCA2, CARD11, EGFR, MMP9 und TP53 untersucht. Die Auswahl der Gene und Proben wird in den Methoden in Abschnitt 2.6, Seite 22 erläutert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der FISH für die fünf untersuchten Gene dargestellt. Die Höhe der Kopienzahlen der FISH werden damit mit denen der Analyse mittels CNVPanelizer verglichen.

Erhöhte Kopienzahlen für das EGFR-Gen

Für das Gen EGFR wurden in der FISH jeweils 20 Zellkerne von 13 Proben untersucht. In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse des CNVPanelizers im Vergleich zu den Ergebnissen der FISH für die 12 Tumorproben und das Normalgewebe dargestellt. Das Normalgewebe zeigt bei beiden Methoden eine Kopienzahl von 2. Bei allen Tumorproben liegt eine Vervielfältigung von EGFR vor. Die Kopienzahlen variieren in der FISH für die Tumorproben von 2,5 bis 4,2 und entsprechen denen des CNVPanelizers. Die mit dem CNVPanelizer detektierten Amplifikation von EGFR wird somit mittels FISH bestätigt.

Die Kopienzahlen der einzelnen untersuchten Zellkerne unterscheiden sich in den untersuchten Proben unterschiedlich stark. Abbildung 3.14 zeigt die Verteilung der Kopienzahlen innerhalb der einzelnen Proben. Im Normalgewebe liegen hauptsächlich zwei Kopien, in drei Zellkernen drei Kopien des Gens vor. Die Anzahl der EGFR-Gene variiert in den Tumorproben unterschiedlich stark. Die meisten Proben zeigen eine Anzahl von 2 bis 6 Kopien. Einige der Proben zeigen eine höhere Anzahl und starke Heterogenität innerhalb der Proben. So reichen bei der Probe 3.3.4A die Kopienzahlen von 1 bis 8, bei der Probe 3.5.4B von 2 bis 11 und bei der Probe 3.5.4C von 1 bis 8 Kopien.

Beispielhaft sind zwei Bilder der FISH für Zellkerne der Proben 3.2.5A und 3.2.5C gezeigt, siehe Abbildung 3.15. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Die Sonde für das EGFR-Gen ist rot, die Sonde für das Zentromer 7 ist grün. Die Anzahl des EGFR-Gens liegt bei drei bzw. fünf Kopien. Die Aufnahmen zeigen, dass die Zentromersonde ebenfalls vermehrt vorliegt. In Abbildung 3.16 sind die Werte der EGFR- und Zentromer-Sonden für alle Proben dargestellt. Es zeigt sich, dass in allen Proben jeweils beide Sonden simultan vermehrt vorliegen.

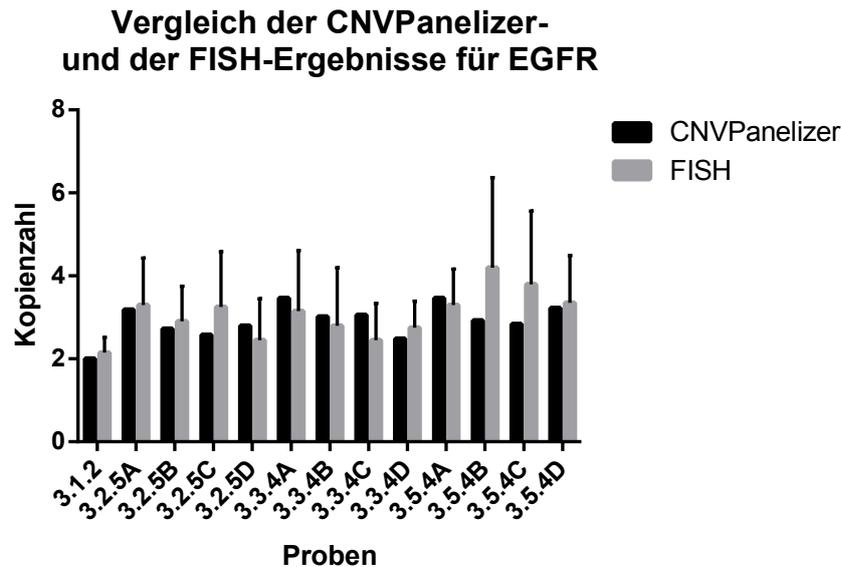


Abbildung 3.13 – Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Analyse mittels FISH und mittels CNVPanelizer für das EGFR-Gen. Es wurden 12 Tumorproben und das Normalgewebe analysiert. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer, die grauen Balken die Ergebnisse der FISH. Für die FISH wurden 20 Zellen pro Probe gezählt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

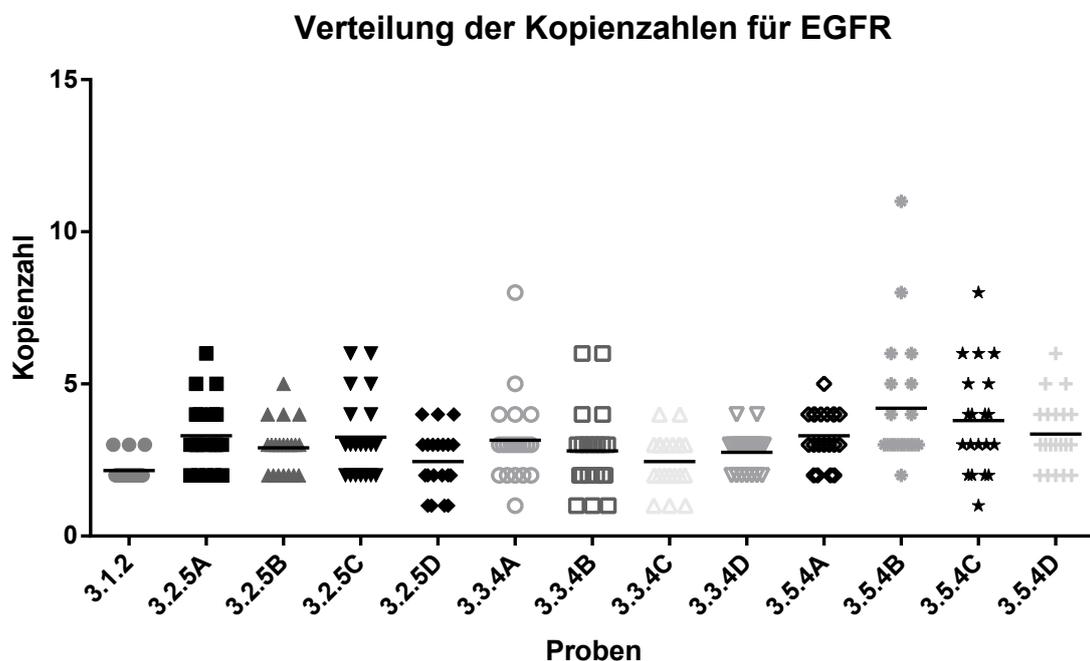


Abbildung 3.14 – Verteilung der Kopienzahlen der FISH-Ergebnisse für EGFR. Untersucht wurden das Normalgewebe und 12 Tumorproben. Es sind alle in der FISH gezählten EGFR-Gene dargestellt. Im Normalgewebe liegt die Kopienzahl in 17 von 20 Zellen bei 2, in den drei weiteren Zellen bei 3. In den Tumorproben variiert die Kopienzahl von 1 bis 11 und zeigt zum Teil starke Heterogenität.

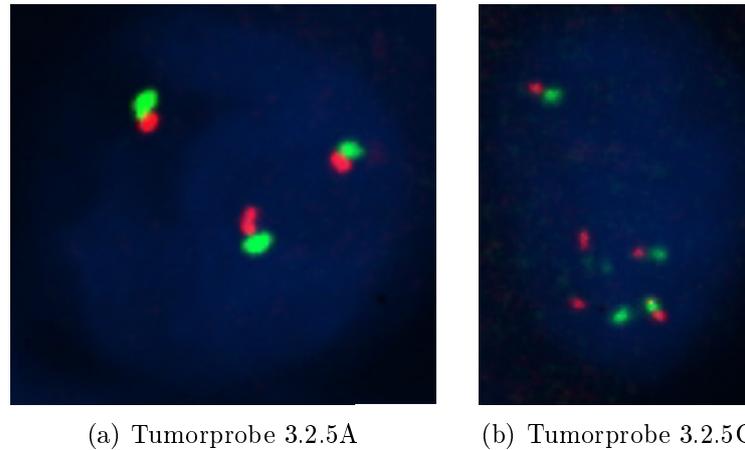


Abbildung 3.15 – Darstellung der EGFR- und Zentromer-Sonden zweier Tumorzellen. Blau: DAPI (Färbung der Zellkerne); rot: EGFR-Gen; grün: Zentromer von Chromosom 7 (Vysis CEP 7); (a) zeigt die Tumorprobe 3.2.5A mit drei EGFR- und drei Zentromer-Sonden; (b) zeigt die Tumorprobe 3.2.5C mit fünf EGFR- und vier Zentromer-Sonden.

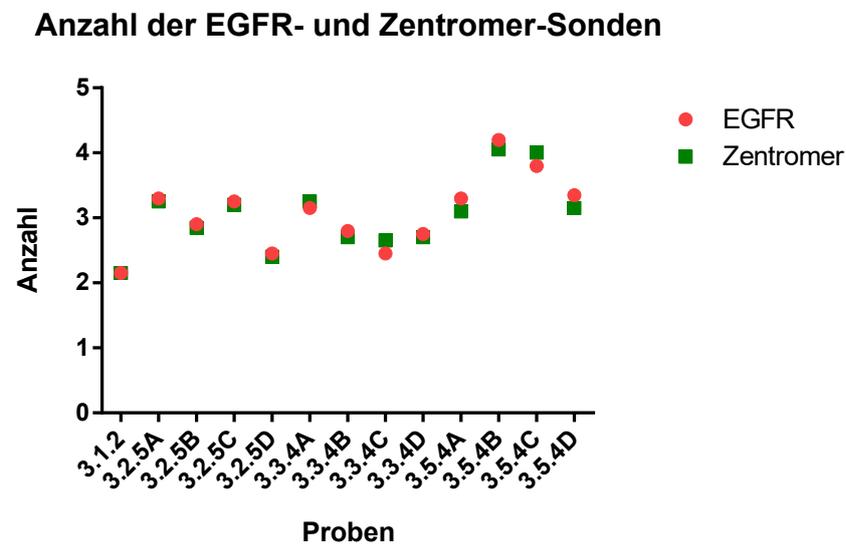


Abbildung 3.16 – Durchschnittliche Anzahl der EGFR- und Zentromer-Sonden für die 13 untersuchten Proben. Beide Sonden liegen für alle Proben jeweils gleich häufig vor. Das Normalgewebe zeigt eine Anzahl von 2, die Tumorproben variieren von 2,4 bis 4,2 Sonden.

CARD11 weist Heterogenität innerhalb der Tumorproben auf

Das CARD11-Gen liegt in einigen, aber nicht allen Tumorproben vermehrt vor. Dies geht aus den Daten des CNVPanelizers hervor, siehe Abbildung 3.10. In der FISH konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden. Abbildung 3.17 zeigt für die untersuchten 14 Tumorproben und das Normalgewebe die Ergebnisse des CNVPanelizers und der FISH im Vergleich. Das Normalgewebe weist mit beiden Methoden eine Kopienzahl von 2 auf. Die Tumorproben zeigen bei der Analyse mittels FISH Werte von 1,8 bis 2,4. Bei der Analyse mittels CNVPanelizer wurden hingegen Werte von 1,8 bis 3,1 gezeigt. Bei Betrachtung der FISH-Ergebnisse auf Zellebene fällt auf, dass die Kopienzahlen in den Tumorproben stark variieren, dadurch ergibt sich die hohe Standardabweichung für die Tumorproben. In Abbildung 3.18 ist die Verteilung der Kopienzahlen der jeweils 30 ausgewerteten Zellkerne für das Normalgewebe und die 14 Tumorproben dargestellt. Im Normalgewebe liegen in den 30 Zellkernen bis auf eine Ausnahme zwei Kopien von CARD11 vor. Die Kopienzahlen in den Tumorproben streuen stark. Hauptsächlich liegen in den Tumorproben ein bis drei Kopien von CARD11 vor. In den Proben 3.4.1C, 3.4.1D und 3.5.4C reicht die Spannbreite bis 4 Kopien, in der Probe 3.2.3A bis 5 Kopien sowie in den Proben 3.2.1D und 3.4.1A bis 6 Kopien.

Die Abbildung 3.19 zeigt beispielhaft Aufnahmen der FISH von den Tumorproben 3.2.1C und 3.2.4C. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Die Sonde für das CARD11-Gen ist rot, die Sonde für das Zentromer 7 ist grün. Es zeigt sich, dass sowohl das untersuchte Gen, also auch das Zentromer mit der gleichen Häufigkeit vorliegen. In Abbildung 3.20 ist die Anzahl der CARD11- und Zentromer-Sonden für alle untersuchten Proben dargestellt. Das CARD11-Gen und das Zentromer liegen in allen Proben mit einer Anzahl von ungefähr 2 vor, die Werte reichen von 1,6 bis 2,3. Obwohl sich Heterogenität innerhalb der einzelnen Tumorproben gezeigt hat, liegt im Durchschnitt weder das CARD11-Gen noch das Zentromer von Chromosom 7 vervielfältigt vor.

Vergleich der CNVPanelizer- und der FISH-Ergebnisse für CARD11

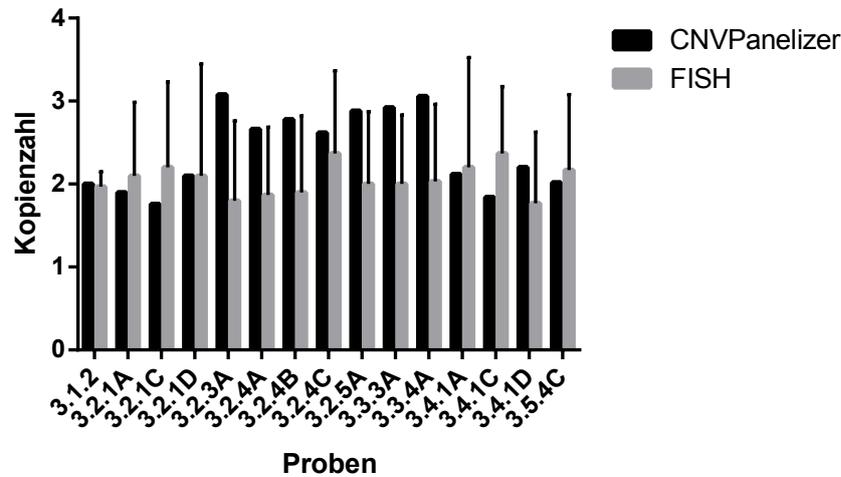


Abbildung 3.17 – Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Analyse mittels FISH und mittels CNVPanelizer für das CARD11-Gen. Es wurden das Normalgewebe und 14 Tumorproben analysiert. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer, die grauen Balken die Ergebnisse der FISH. Für die FISH wurden 30 Zellen pro Probe gezählt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Verteilung der Kopienzahlen für CARD11

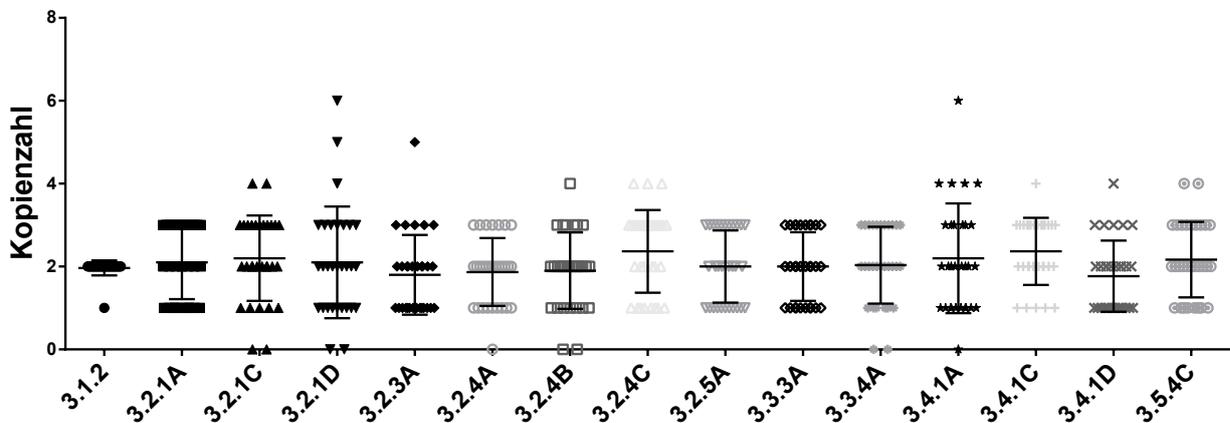


Abbildung 3.18 – Verteilung der Kopienzahlen des Normalgewebes und der 14 Tumorproben für CARD11. Es sind alle in der FISH gezählten CARD11-Gene dargestellt. Im Normalgewebe liegt die Kopienzahl bis auf eine Ausnahme bei 2 Kopien. In den Tumorproben zeigt die Kopienzahl Werte von 0 bis 6 Kopien.

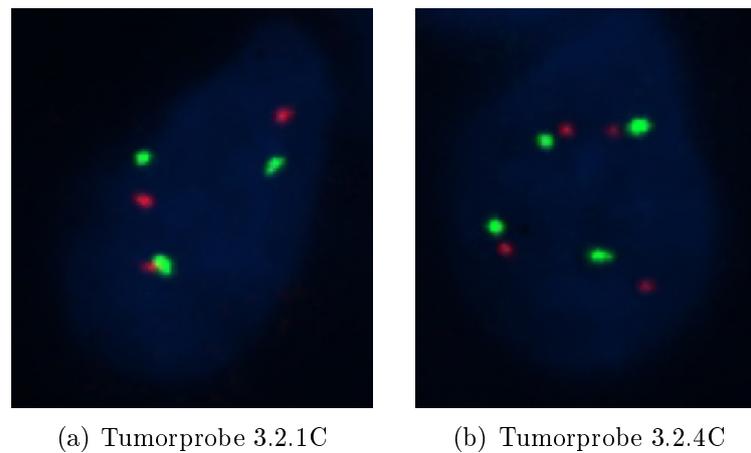


Abbildung 3.19 – Darstellung der CARD11- und Zentromer-Sonden zweier Tumorzellen. Blau: DAPI (Färbung der Zellkerne); rot: CARD11-Gen; grün: Zentromer von Chromosom 7 (CEN 7). (a) zeigt die Tumorprobe 3.2.1C mit drei CARD11- und drei Zentromer-Sonden; (b) zeigt die Tumorprobe 3.2.4C mit vier CARD11- und vier Zentromer-Sonden.

Anzahl der CARD11- und Zentromer-Sonden

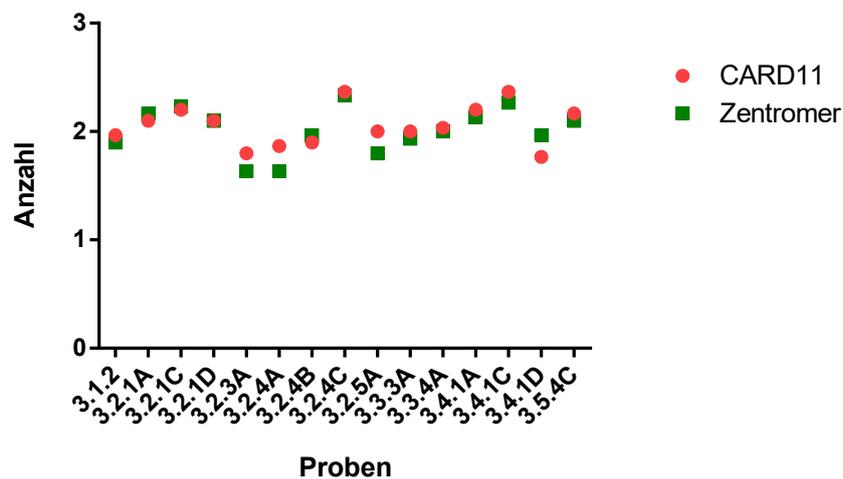


Abbildung 3.20 – Durchschnittliche Anzahl der CARD11- und Zentromer-Sonden für die 15 untersuchten Proben. Im Normalgewebe liegt die CARD11-Sonde mit einer Anzahl von 2,0 sowie die Zentromer-Sonde mit einer Anzahl von 1,9 vor. In den Tumorproben reicht die Anzahl der CARD11-Sonden von 1,8 bis 2,4 sowie die der Zentromer-Sonden von 1,6 bis 2,4.

Das TP53-Gen zeigt in allen untersuchten Tumorproben eine Deletion

Für das Gen TP53 wird mit der FISH in allen Tumorproben eine Kopienzahl von 1 detektiert, für das Normalgewebe liegt eine Kopienzahl von 2 vor. Die ermittelte Kopienzahl der Tumorproben stimmt dabei nicht mit den Ergebnissen des CNVPanelizers überein. Wie aus der Abbildung 3.10 hervorgeht, wurde die Deletion mittels CNVPanelizer nur in einigen der Tumorproben detektiert. In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse des CNVPanelizers und der FISH im Vergleich dargestellt. Die Analyse mittels CNVPanelizer zeigt für die hier dargestellten Tumorproben Kopienzahlen von 0,8 bis 1,8 Kopien. Die Analyse mittels FISH weist jedoch für alle überprüften Tumorproben eine Deletion vom TP53-Gen nach. In den Proben ist jeweils nur eine Kopie des Gens vorhanden. In Abbildung 3.22 ist die Verteilung der Kopienzahlen der jeweils 30 ausgewerteten Zellkerne für das Normalgewebe und die 17 Tumorproben dargestellt. Im Normalgewebe liegt in allen untersuchten Zellkernen eine Kopienzahl von 2 vor. In den Tumorproben liegt das TP53-Gen bis auf vereinzelte Ausnahmen mit einer Kopienzahl von 1 vor. Für die Probe 3.2.1A wurde einmalig eine Kopienzahl von 3 detektiert; in den weiteren Tumorproben liegen maximal vier (Probe 3.2.4A) bzw. sechs Zellkerne (Probe 3.6.6C) mit einer Kopienzahl von 2 vor.

Die Abbildung 3.23 zeigt beispielhaft Aufnahmen der FISH von Zellen der Tumorproben 3.2.2B und 3.6.6.C. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Die Sonde für das TP53-Gen ist rot, die Sonde für das dazugehörige Zentromer, Zentromer 17, ist grün. Das Zentromer liegt in beiden Zellen mit einer Anzahl von 2 vor; die Tumorprobe 3.2.2B zeigt eine Sonde des TP53-Gens, die Tumorprobe 3.6.6C zwei Sonden. Die Abbildung 3.24 zeigt eine Übersicht der Anzahl der TP53- und der Zentromer-Sonden in den 18 untersuchten Proben. In allen Proben liegt die Zentromer-Sonde mit einer Häufigkeit von 2 und somit unverändert vor. Im Normalgewebe liegt das TP53-Gen ebenfalls unverändert mit einer Häufigkeit von 2 vor. In den Tumorprobe liegt ausschließlich die TP53-Sonde vermindert vor, es handelt sich um eine lokale Deletion des TP53-Gens.

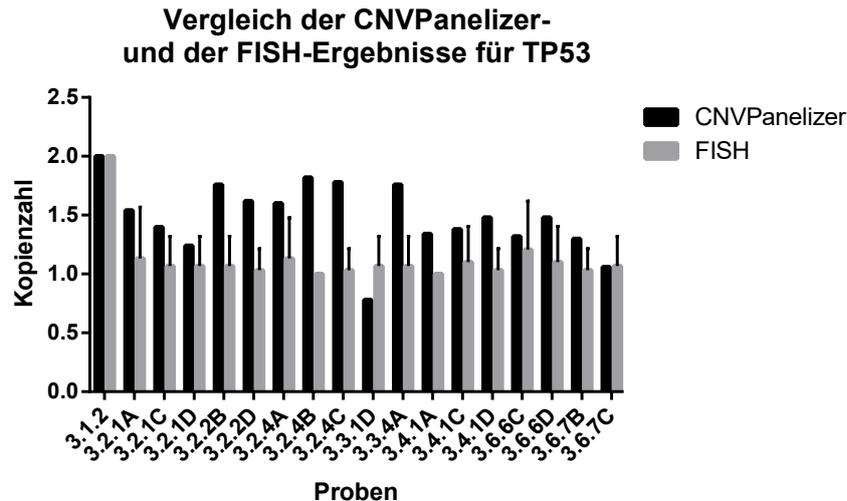


Abbildung 3.21 – Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Analyse mittels FISH und mittels CNVPanelizer für das TP53-Gen. Es wurden das Normalgewebe und 17 Tumorproben analysiert. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer, die grauen Balken die Ergebnisse der FISH. Für die FISH wurden 30 Zellen pro Probe gezählt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

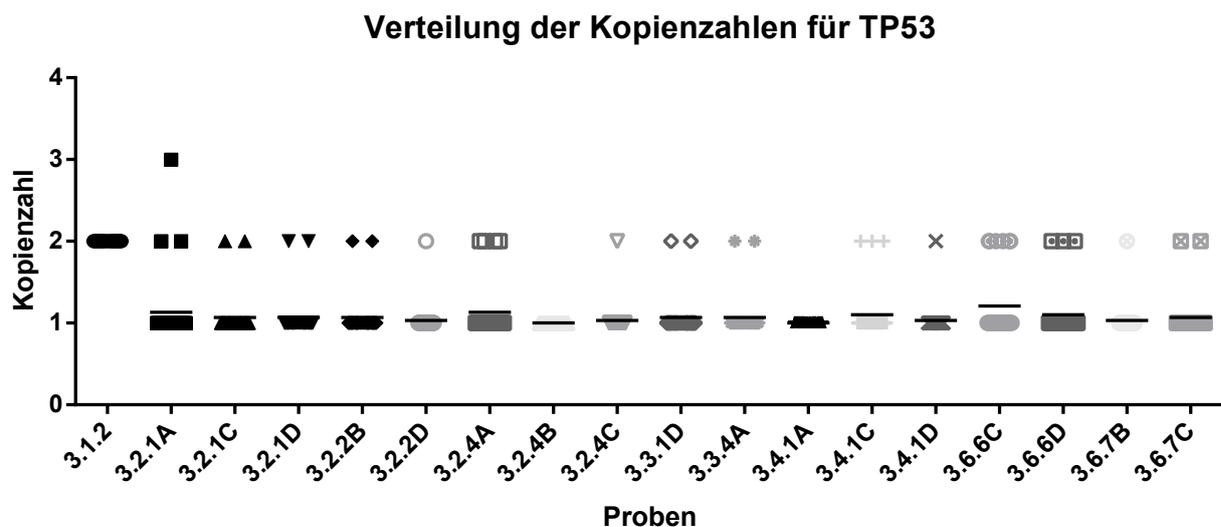


Abbildung 3.22 – Verteilung der Kopienzahlen des Normalgewebes und der 17 Tumorproben für TP53. Es sind alle in der FISH gezählten TP53-Gene dargestellt. Im Normalgewebe liegt die Kopienzahl bei 2. In den Tumorproben liegt bis auf einzelne Ausnahmen eine Kopienzahl von 1 vor.

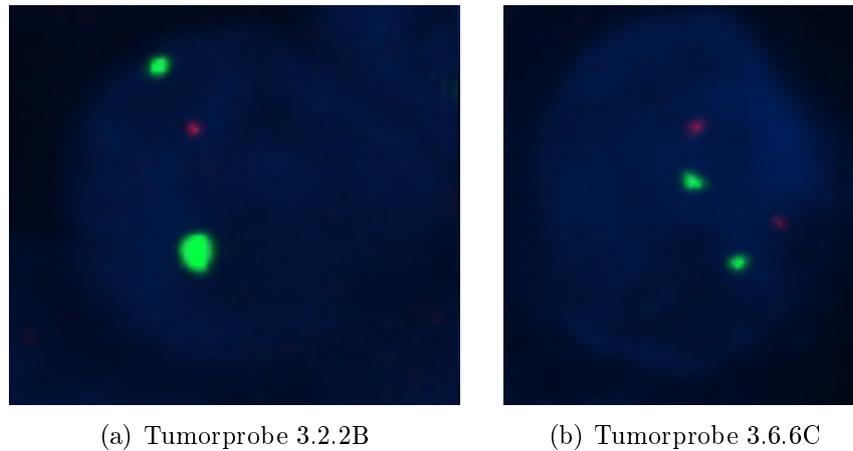


Abbildung 3.23 – Darstellung der TP53- und Zentromer-Sonden zweier Tumorzellen. Blau: DAPI (Färbung der Zellkerne); rot: TP53-Gen; grün: Zentromer von Chromosom 17 (Vysis CEP 17). (a) zeigt die Tumorprobe 3.2.2B mit einem TP53- und zwei Zentromer-Sonden; (b) zeigt die Tumorprobe 3.6.6C mit zwei TP53- und zwei Zentromer-Sonden.

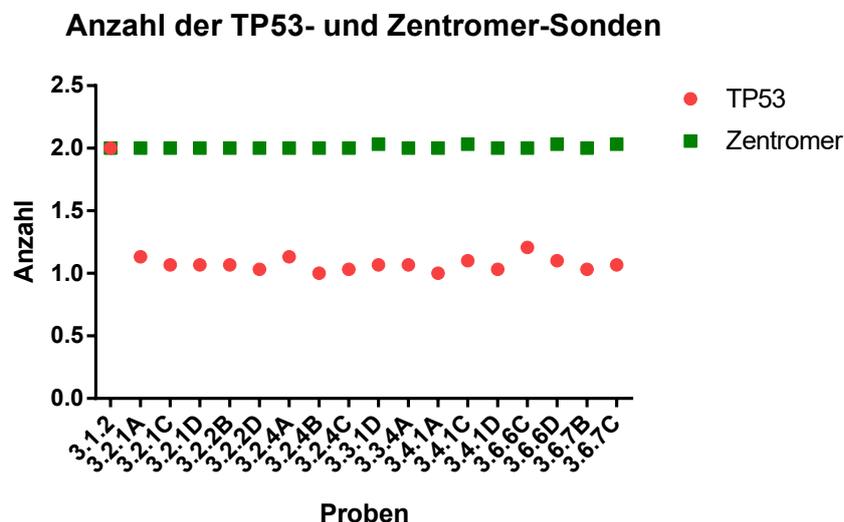


Abbildung 3.24 – Durchschnittliche Anzahl der TP53- und Zentromer-Sonden für die untersuchten 18 Proben. Im Normalgewebe liegen beide Sonden mit einer absoluten Anzahl von 2 vor. In den Tumorproben liegt die TP53-Sonde mit einer Anzahl von ca. 1, die Zentromer-Sonde mit einer Anzahl von ca. 2 vor.

Das BRCA2-Gen ist innerhalb der Tumorproben heterogen amplifiziert

Die Untersuchung von BRCA2 mittels FISH bestätigt die mittels CNVPanelizer detektierte Amplifikation. Es wurden neben dem Normalgewebe 17 Tumorproben untersucht. Abbildung 3.25 zeigt die Ergebnisse des CNVPanelizer und der FISH im Vergleich. Im Normalgewebe liegt weder bei der Analyse mittels CNVPanelizer noch in der FISH eine Amplifikation vor, die Kopienzahl des BRCA2-Gens liegt bei 2. In den meisten Tumorproben zeigen die beiden Methoden sehr ähnliche Ergebnisse. In einigen Proben wie z.B. 3.2.1A und 3.6.7C zeigt die FISH eine deutlich höhere Kopienzahl als die Analyse mittels CNVPanelizer (3.2.1A: 4,0 statt 2,6; 3.6.7C: 6,7 statt 3,4). Die Standardabweichung ist in einigen Proben sehr hoch, dies trifft u.a. für die Proben 3.2.5A, 3.6.6C, 3.6.6D sowie 3.6.7C zu.

Es zeigt sich, dass die Kopienzahlen in der FISH auf Zellebene stark streuen. Abbildung 3.26 zeigt die Verteilung der Kopienzahlen für die jeweils 30 Zellkerne der Proben. Im Normalgewebe liegen die Kopienzahlen bis auf eine Ausnahme bei 2. In den Tumorproben streuen die Kopienzahlen für BRCA2 von 0 bis 18 Kopien. In den meisten Tumorproben liegen Kopienzahlen von 0 bis 8 vor; die Probe 3.6.7B umfasst Zellen mit bis zu 10 Kopien von BRCA2, die Probe 3.6.6D bis 11, die Proben 3.2.5A sowie 3.6.6C bis 12 und die Probe 3.6.7C bis 18 Kopien. In allen Tumorproben zeigen sich also heterogen amplifizierte Kopienzahlen für das BRCA2-Gen, die unterschiedliche Verteilungen aufweisen.

Die Abbildung 3.27 zeigt beispielhaft Aufnahmen der FISH von Zellen aus zwei Tumorproben. Abbildung 3.27(a) zeigt die Probe 3.3.3A mit einer mäßigen Amplifikation, sowohl für BRCA2 (rot) als auch das Zentromer (grün) liegen vier Sonden vor. Abbildung 3.27(b) zeigt eine starke Amplifikation der Probe 3.6.7C mit 18 Sonden von BRCA2 und 13 Sonden des Zentromers.

Abbildung 3.28 zeigt die durchschnittliche Anzahl der beiden Sonden für die 18 untersuchten Proben. Da sowohl das BRCA2-Gen als auch das Zentromer ungefähr gleich häufig vorliegen, ist davon auszugehen, dass größere Abschnitte des Chromosoms amplifiziert sind.

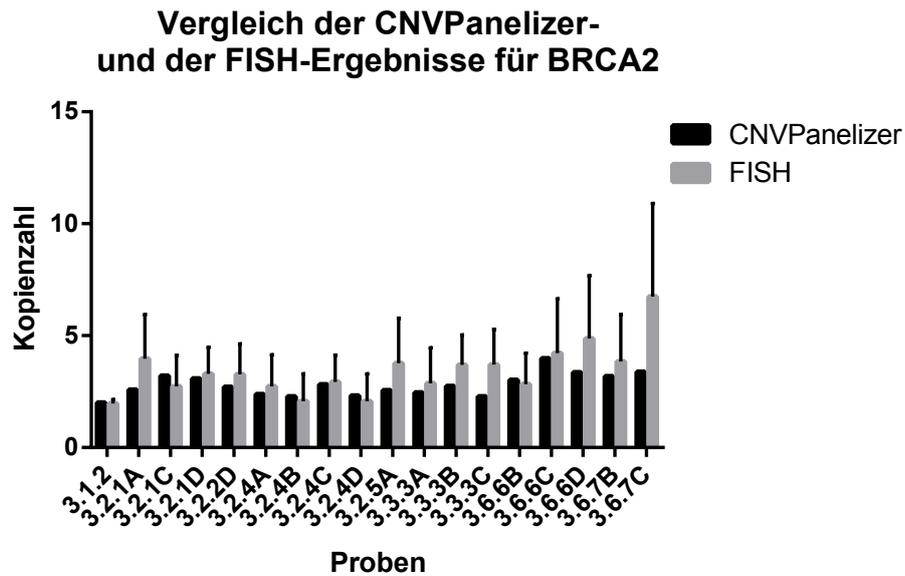


Abbildung 3.25 – Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Analyse mittels FISH und mittels CNVPanelizer für das BRCA2-Gen. Es wurden das Normalgewebe und 17 Tumorproben analysiert. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer, die grauen Balken die Ergebnisse der FISH. Für die FISH wurden 30 Zellen pro Probe gezählt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

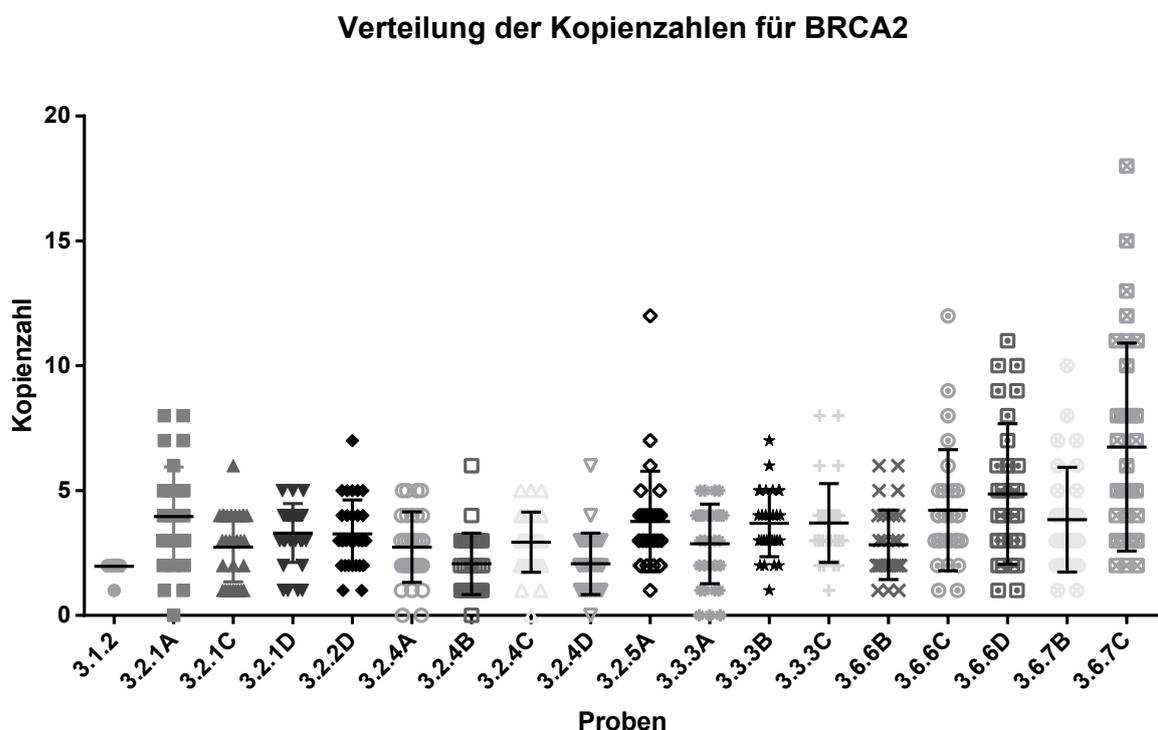


Abbildung 3.26 – Verteilung der Kopienzahlen für das Normalgewebe und die 17 Tumorproben. Es sind alle in der FISH gezählten BRCA2-Gene dargestellt. Im Normalgewebe liegt die Kopienzahl bis auf einer Ausnahme bei 2 Kopien. In den Tumorproben streut die Kopienzahl stark, sie liegt bei 0 bis 18 Kopien.

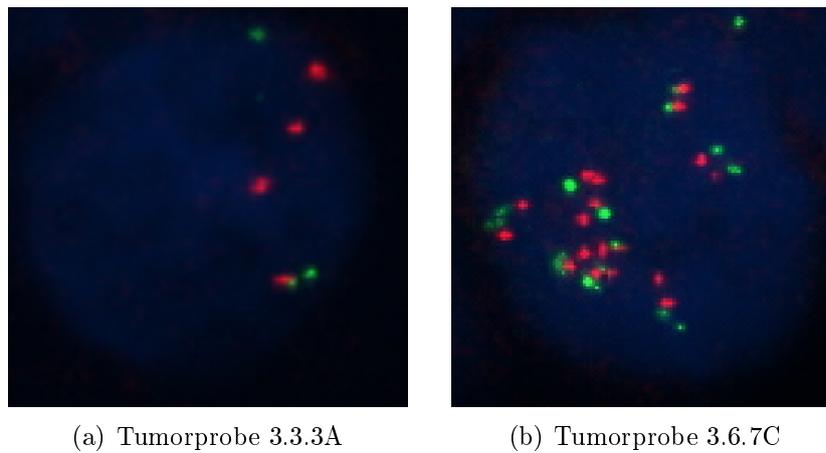


Abbildung 3.27 – Darstellung der BRCA2- und Zentromer-Sonden zweier Tumorzellen. Blau: DAPI (Färbung der Zellkerne); rot: BRCA2-Gen; grün: Zentromer von Chromosom 13 (CON 13). (a) zeigt die Tumorprobe 3.3.3A mit vier BRCA2- und vier Zentromer-Sonden; (b) zeigt die Tumorprobe 3.6.7C mit 18 BRCA2- und 13 Zentromer-Sonden.

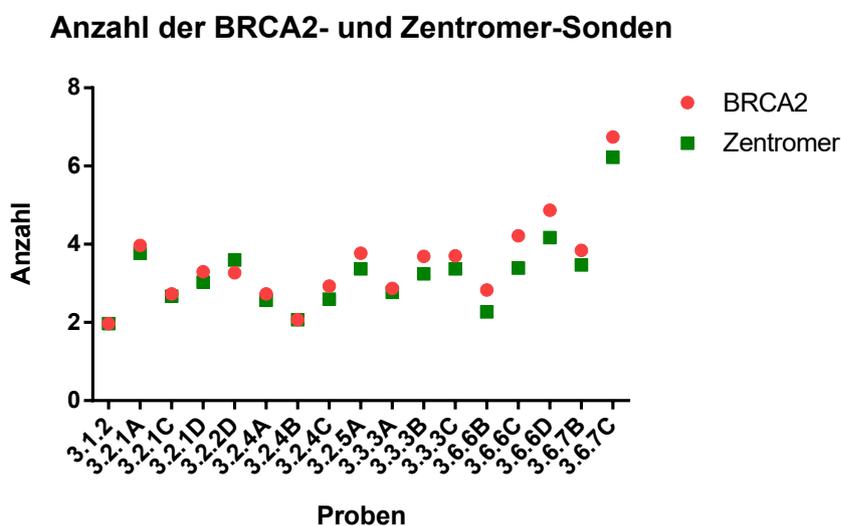


Abbildung 3.28 – Durchschnittliche Anzahl der BRCA2- und Zentromer-Sonden für die 19 untersuchten Proben. Im Normalgewebe liegen beide Sonden mit einer absoluten Anzahl von 2 vor. In den Tumorproben variiert die Anzahl der Sonden für BRCA2 von 2,1 bis 6,7 sowie für das Zentromer von 2,1 bis 6,2. In den meisten Tumorproben ist die Anzahl der BRCA2-Sonden geringfügig höher als die der Zentromer-Sonden.

Das MMP9-Gen ist innerhalb der Tumorproben heterogen amplifiziert

Die Ergebnisse der FISH weichen für MMP9 zum Teil deutlich von denen des CNVPanelizers ab. Die Abbildung 3.29 zeigt vergleichend die Ergebnisse der beiden Methoden für die 14 Tumorproben und das Normalgewebe. Die Kopienzahl des Normalgewebes liegt bei beiden Methoden bei 2 Kopien. Die Tumorproben weisen bei der Analyse mittels CNVPanelizer Kopienzahlen von 1,5 bis 4,3 Kopien auf. In der FISH liegen die Tumorproben bei 2,5 bis 3,3 Kopien. Die Darstellung der FISH-Ergebnisse auf Zellebene zeigt, dass die Kopienzahlen innerhalb der einzelnen Tumorproben unterschiedlich stark streuen, siehe Abbildung 3.30. In 8 der 14 Tumorproben liegt die Kopienzahl der einzelnen Zellkerne zwischen 1 und 4 Kopien; in den verbleibenden 6 Tumorproben streuen die Kopienzahlen bis zu Werten von 0 bis 8. So weist die Probe 3.2.2D 0 bis 8 Kopien auf, die Probe 3.2.3A 1 bis 6 Kopien, die Probe 3.2.4C 0 bis 6 Kopien, die Probe 3.4.1A 2 bis 5 Kopien, die Probe 3.6.6C 1 bis 6 Kopien sowie die Probe 3.6.7C 1 bis 5 Kopien. Im Normalgewebe liegt in allen Zellen eine Kopienzahl von 2 vor.

Die Abbildung 3.31 zeigt beispielhaft Aufnahmen der FISH von zwei Tumorproben. Abbildung 3.31(a) zeigt die Tumorprobe 3.2.2D und Abbildung 3.31(b) die Tumorprobe 3.3.1D. Es liegen in beiden Zellkernen vier MMP9- und drei Zentromer-Sonden vor. Abbildung 3.32 zeigt die durchschnittliche Anzahl der MMP9- und Zentromer-Sonden für alle 15 Proben. Beide Sonden liegen im Normalgewebe mit einer Anzahl von 2 vor. Die Zentromer-Sonde schwankt in den Tumorproben von 1,8 bis 2,6. Die MMP9-Sonde liegt in allen Tumorproben häufiger vor als die Zentromer-Sonde, sie erreicht Werte von 2,4 bis 3,3.

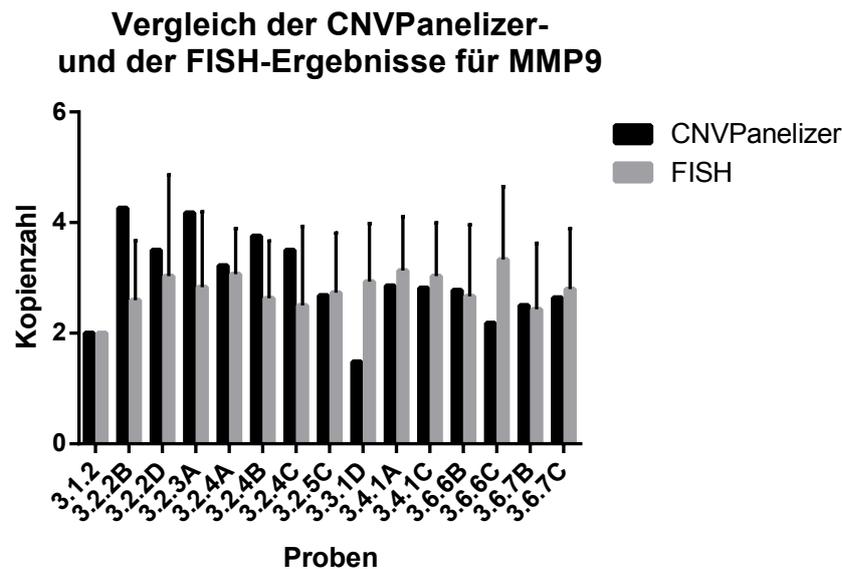


Abbildung 3.29 – Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Analyse mittels FISH und mittels CNVPanelizer für das MMP9-Gen. Es wurden das Normalgewebe und 14 Tumorproben analysiert. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer, die grauen Balken die Ergebnisse der FISH. Für die FISH wurden 30 Zellen pro Probe gezählt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

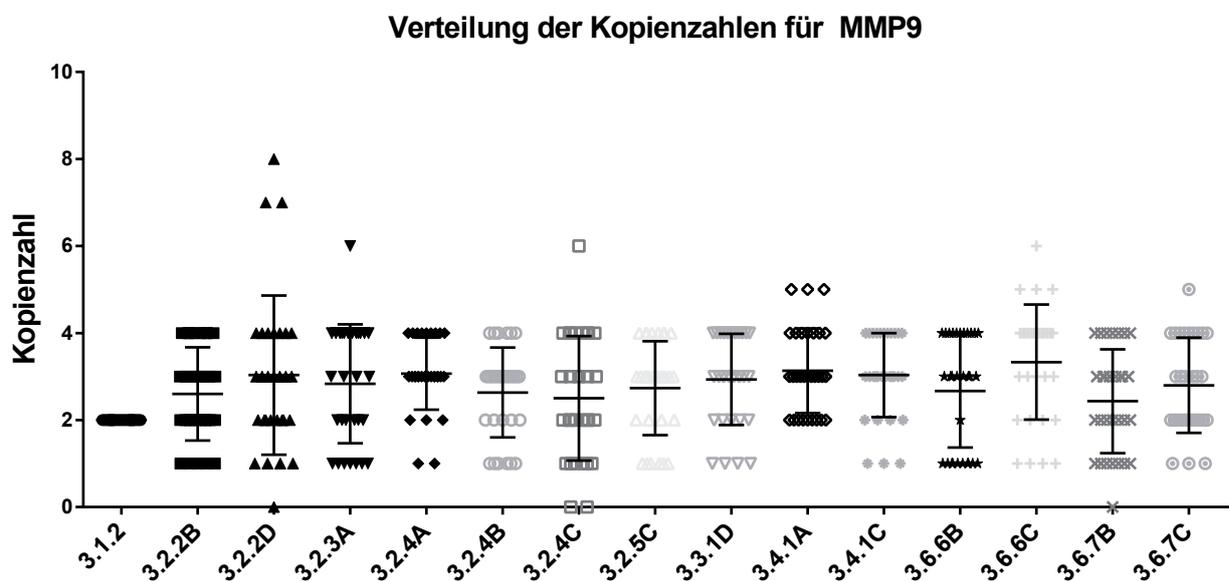


Abbildung 3.30 – Verteilung der Kopienzahlen für das Normalgewebe und die 14 Tumorproben. Es sind alle in der FISH gezählten MMP9-Gene dargestellt. Im Normalgewebe liegen die Kopienzahlen in allen Zellen bei 2 Kopien. In den Tumorproben streuen sie stark, sie reichen von 0 bis 8 Kopienzahlen.

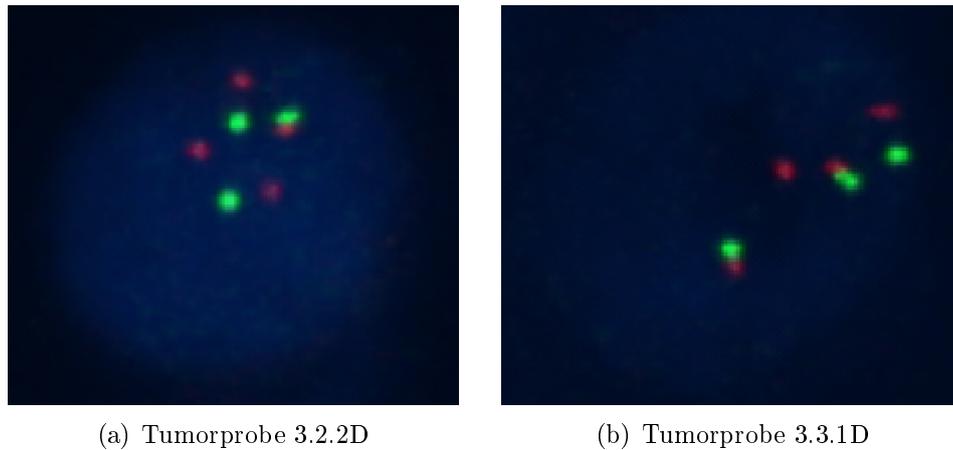


Abbildung 3.31 – Darstellung der MMP9- und Zentromer-Sonden zweier Tumorzellen. Blau: DAPI (Färbung der Zellkerne); rot: MMP9-Gen; grün: Zentromer von Chromosom 20 (CON 20). (a) zeigt die Tumorprobe 3.2.2D mit vier MMP9- und drei Zentromer-Sonden. (b) zeigt die Tumorprobe 3.3.1D mit ebenfalls vier MMP9- und drei Zentromer-Sonden.

Anzahl der MMP9- und Zentromer-Sonden

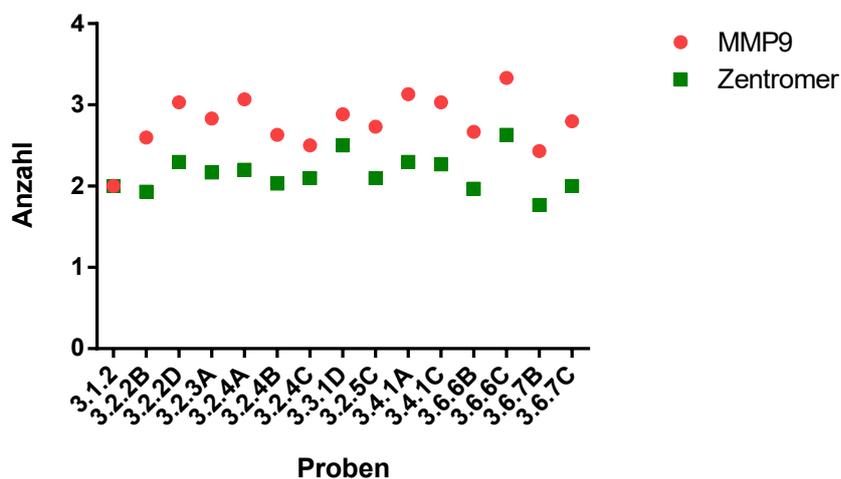


Abbildung 3.32 – Durchschnittliche Anzahl der MMP9- und Zentromer-Sonden für die 14 Tumorproben und das Normalgewebe. Beiden Sonden liegen im Normalgewebe mit einer Anzahl von 2 vor. In den Tumorproben reichen die MMP9-Sonden von 2,4 bis 3,3 sowie die Zentromer-Sonden von 1,8 bis 2,6.

Korrelation der CNVPanelizer- und FISH-Daten

Da für jedes Gen nur 13 bis 18 Proben untersucht wurden, werden die Ergebnisse der fünf Gene zusammengefasst betrachtet. In Abbildung 3.33 sind alle Ergebnisse der FISH im Vergleich mit denen des CNVPanelizers dargestellt. Die x-Achse zeigt die absoluten Kopienzahlen der Analyse mittels CNVPanelizer, die y-Achse die der Analyse mittels FISH. Dargestellt sind alle Datenpunkte der insgesamt 77 mittels FISH untersuchten Proben. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der beiden Methoden, der R^2 -Wert beträgt 0,47, der P-Wert beträgt $< 0,0001$. Die Analyse des CNVPanelizers wird somit weitgehend durch die FISH bestätigt.

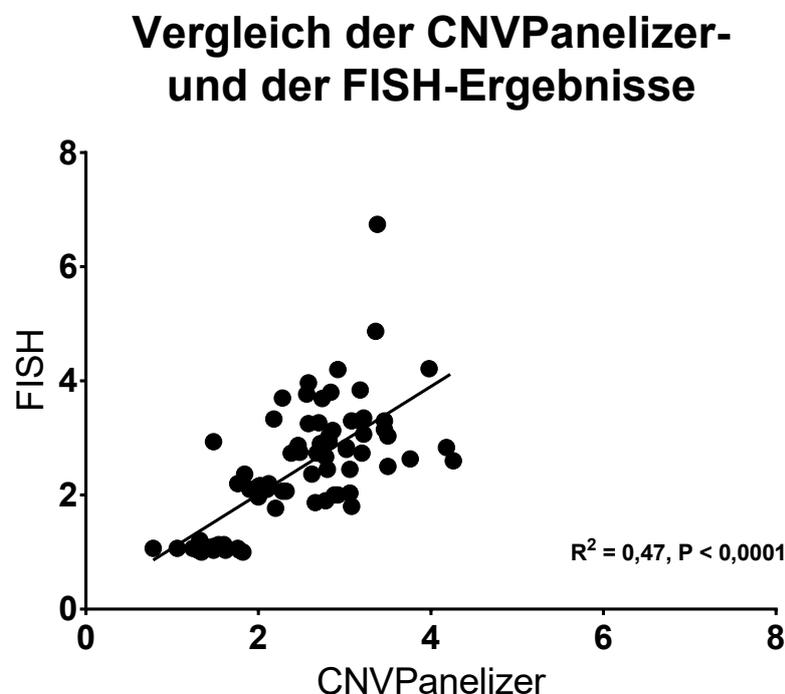


Abbildung 3.33 – Vergleich der absoluten Kopienzahlen der Analyse mittels CNVPanelizer und der FISH. Insgesamt wurden 77 Proben für die Gene BRCA2, CARD11, EGFR, MMP9 und TP53 untersucht. Die x-Achse zeigt die Kopienzahlen der Analyse mittels CNVPanelizer, die y-Achse zeigt die der FISH.

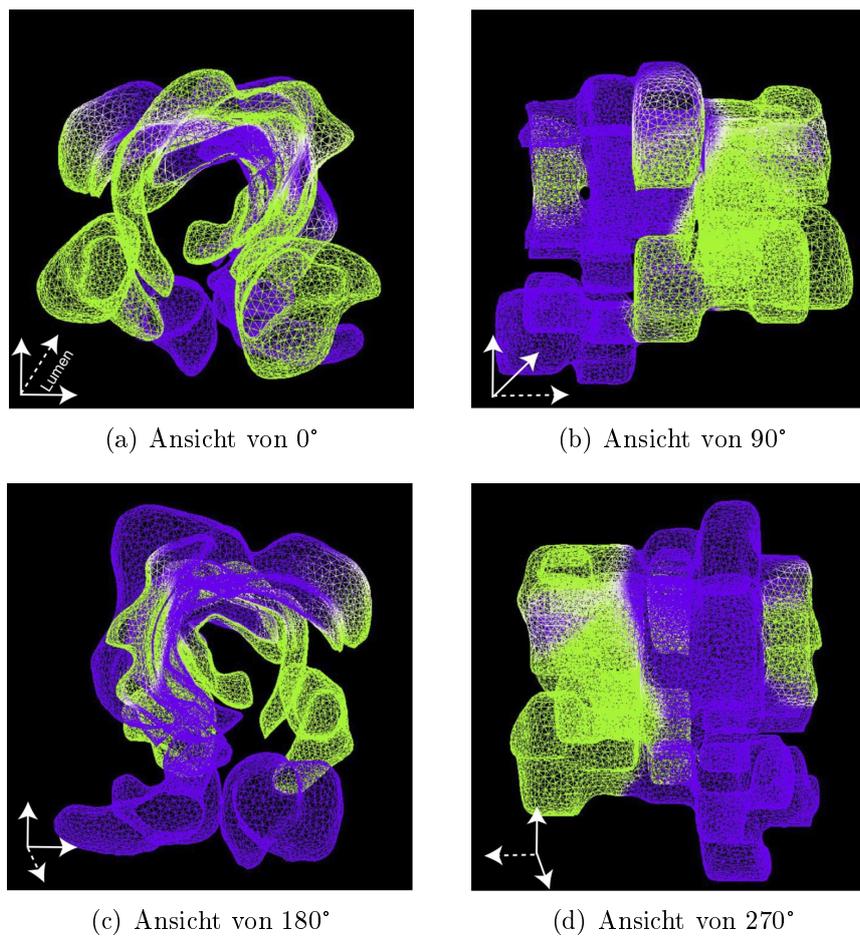


Abbildung 3.35 – Darstellung der räumlichen Verteilung der zuvor geclusterten Proben (siehe Abbildung 3.34). Abhängig von der Einteilung zu einem der beiden Cluster wird die Farbe der Tumorprobe festgelegt: grün in Cluster 1, blau in Cluster 2. (a): Ansicht von 0°, (b): Ansicht von 90°, (c): Ansicht von 180°, (d): Ansicht von 270°.

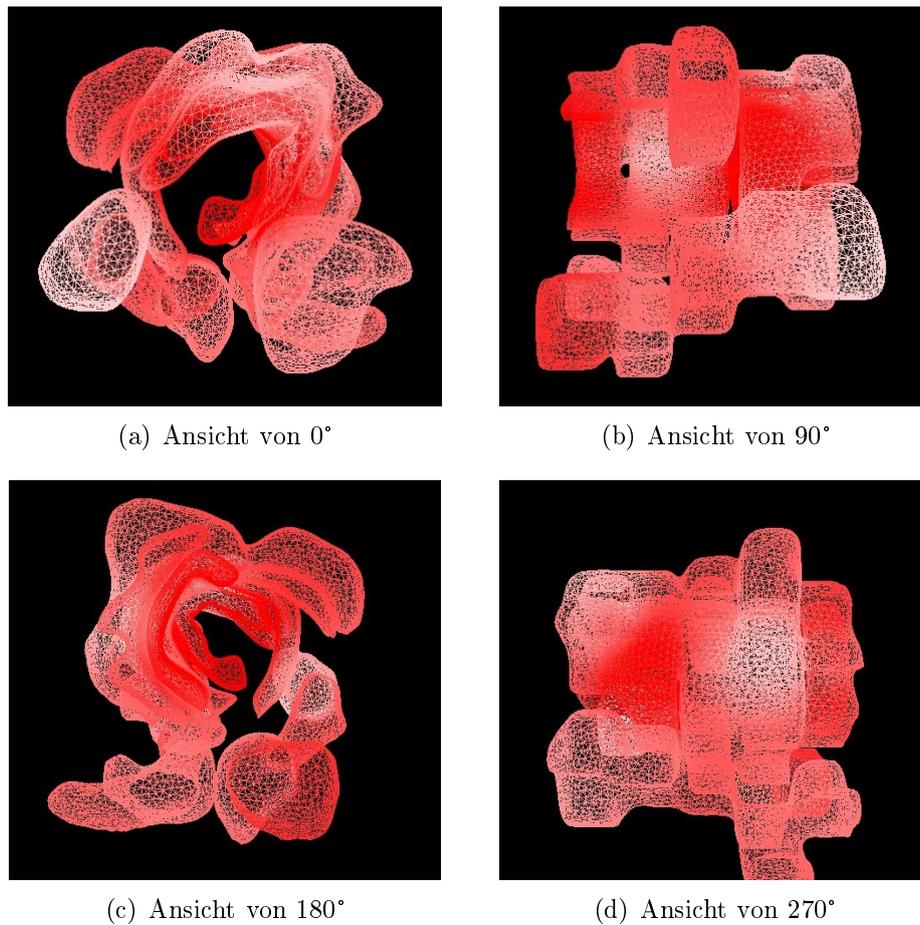


Abbildung 3.36 – Darstellung der räumlichen Verteilung der Kopienzahl-Veränderungen von BRCA2. Je höher die Intensität der Farbe rot, desto höher die Anzahl der Kopien von BRCA2. (a): Ansicht von 0°, (b): Ansicht von 90°, (c): Ansicht von 180°, (d): Ansicht von 270°.

4 Diskussion

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Kolonkarzinom, Stadium II (T2N0M0), in seiner Gesamtheit auf die räumlich unterschiedliche Verteilung von Mutationen und Kopienzahl-Veränderungen untersucht. Die Analyse erfolgte mittels gezielter Sequenzierung, unter Verwendung eines *PGM[™]*-Panels, welches die 100 häufigsten in kolorektalen Karzinomen mutierten Gene enthält. Diese Analyse ergab, dass in dem Tumor von den untersuchten Genen nur zwei mutiert vorliegen. Die Mutationen APC p.1367 und TP53 p.175 liegen dabei mit einer gleichmäßigen Verteilung in allen untersuchten Regionen des Tumors, jedoch nicht im angrenzenden gesunden Gewebe vor. Weitere Mutationen, die in der Analyse mittels *PGM[™]* beobachtet wurden, konnten mittels Sanger-Sequenzierung nicht verifiziert werden. Es handelt sich dabei ausschließlich um Mutationen in homopolymeren Sequenzen.

Die Analyse der Kopienzahl-Veränderungen erfolgte durch den CNVPanelizer. Dabei wurden die Sequenzierdaten mittels eines bioinformatischen Algorithmus ausgewertet. Die Verifizierung ausgewählter Gene mittels qPCR und FISH bestätigte die Ergebnisse des CNVPanelizers weitgehend. Die Kopienzahlen einiger der untersuchten Gene lagen in den verschiedenen Regionen des Tumors in unterschiedlicher Höhe, also heterogen verteilt, vor. Für die Gene BRCA2, EGFR, CARD11 und MMP9 wurde mittels FISH außerdem Heterogenität innerhalb einzelner Tumorproben gezeigt. Direkt nebeneinanderliegende Zellen unterscheiden sich dabei deutlich hinsichtlich der Kopienzahlen des untersuchten Gens. Anschließend wurde eine Clusteranalyse der Tumorproben in Hinblick auf die Ergebnisse der Kopienzahl-Veränderungen durchgeführt und zwei deutlich unterschiedliche Cluster identifiziert. In der darauffolgenden dreidimensionalen Rekonstruktion der Tumorproben konnte gezeigt werden, dass sich die Tumorproben in zwei Cluster entlang der oral-aboralen Achse anordnen.

4.1 Räumliche Heterogenität der genetischen Veränderungen

Die Mutationen in den Genen APC und TP53 finden sich homogen verteilt im gesamten Tumor. Es konnte mit den verwendeten Methoden keine Heterogenität von Mutationen nachgewiesen werden. Heterogenität findet sich jedoch auf Ebene der Kopienzahlen. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigten andere Arbeiten auch räumliche Heterogenität von Mutationen in kolorektalen Karzinomen. So konnten Lu et al. in drei untersuchten Kolonkarzinomen Heterogenität zeigen. Sie untersuchten 333 ausgewählte Gene mittels gezielter Sequenzierung.

Dabei teilten sie die kolorektalen Tumore in bis zu drei Proben ein. Sie konnten zeigen, dass nur 63 %, 70 % bzw. 75 % der detektierten Mutationen in allen untersuchten Proben des jeweiligen Tumors vorliegen [20]. Die dabei detektierten Mutationen wurden im Gegensatz zu denen in meiner Arbeit jedoch nicht mit einer davon unabhängigen Sequenziermethode verifiziert. Die Sequenzierung mittels *PGM*[™] im Rahmen meiner Arbeit offenbarte ebenfalls Heterogenität, welche anschließend mittels Sanger-Sequenzierung widerlegt werden konnte. Im Rahmen meiner Arbeit wurden außerdem weniger Gene untersucht, was eine Ursache für die nicht detektierte Heterogenität sein könnte. Jedoch haben Lu et al. Heterogenität u.a. für die Gene APC, BRCA2, ERBB4 und TP53 gefunden, welche auch im Rahmen meiner Arbeit untersucht wurden. Die von Lu et al. untersuchten Tumore sind T2N1M0, T2N2M0 sowie T3N2M2 Kolonkarzinome, weisen also alle ein späteres Stadium auf als der Tumor meiner Arbeit. Tumore im früheren Stadium können weniger Heterogenität aufweisen als solche im späteren Stadium [52]. Des Weiteren wurde im Rahmen meiner Arbeit nur ein Tumor analysiert, die Analyse eines weiteren Tumors könnte ein anderes Ergebnis liefern.

Die Analyse mittels CNVPanelizer und die anschließende dreidimensionale Rekonstruktion zeigten zwei genetisch unterschiedliche Bereiche des Tumors. Diese Bereiche stellen sich entlang der oral-aboralen Achse dar. Sottoriva et al. wiesen ebenfalls Heterogenität der Kopienzahlen in kolorektalen Karzinomen nach. Sie haben 11 kolorektale Karzinome auf Unterschiede in Kopienzahlen sowie sechs dieser Tumore zusätzlich auf Unterschiede in Mutationen analysiert. Untersucht wurden einzelne Krypten sowie größere, räumlich getrennte Tumoreale. Sequenziert wurde das gesamte Genom. 10 der 11 Tumore weisen Heterogenität auf der Ebene der Kopienzahlen auf und tragen neben ubiquitär vorhandenen Kopienzahl-Veränderungen auch seitenspezifische, regionale und einzeln vorhandene Veränderungen. In den sechs detailliert untersuchten Tumoren wurde zudem Heterogenität auf Ebene der Mutationen festgestellt [19]. Durch die Analyse des gesamten Genoms werden deutlich mehr Informationen erlangt und das Erstellen eines Stammbaumes zur Rekonstruktion der Tumorentstehung ist möglich. Jedoch ist bisher nicht geklärt, wie groß die Bedeutung der meisten detektierten Veränderungen ist, da nicht zwischen Treiber- und Passenger-Mutationen unterschieden wurde. Zudem müssen genetische Veränderungen nicht unbedingt eine Auswirkung auf die Proteinfunktionen haben.

In meiner Arbeit wurde das untersuchte Kolonkarzinom sehr detailliert in 68 Proben unterteilt. Das Schema der Vorgehensweise ist in den Ergebnissen dargestellt, siehe Abschnitt 3.1, Seite 29. In mehreren veröffentlichten Arbeiten wurde in kolorektalen Karzinomen Heterogenität auf morphologischer Ebene zwischen Tumorzentrum und -peripherie festgestellt [11, 18, 8]. Prall hat gezeigt, dass sich Zellen der Invasionsfront eines Tumors in ihrer Morphologie von denen im Zentrum unterscheiden können. Die Zellen der Invasionsfront machen oft eine epithelial-mesenchymale Transition durch und können in das umliegenden Stroma einwandern [8]. Brabletz et al. haben gezeigt, dass die Expression von β -Catenin und

E-Cadherin sich zwischen Tumorzentrum und Tumorperipherie unterscheiden [11]. Zusätzlich zu den morphologischen Unterschieden wurden auch Unterschiede in den genetischen Veränderungen zwischen Zentrum und Peripherie nachgewiesen. Kosmidou et al. haben u.a. die Verteilung von KRAS-Mutationen innerhalb von kolorektalen Karzinomen untersucht. Pro Tumor haben sie sowohl eine Probe des Tumorzentrums als auch eine Probe der Tumorperipherie ausgewählt. In 33 von 75 analysierten Tumoren (44 %) wurde eine Heterogenität von KRAS-Mutationen zwischen Zentrum und Peripherie detektiert [18].

Überraschenderweise zeigt der im Rahmen meiner Arbeit analysierte Tumor keine Heterogenität in den Hotspot-Mutationen. Mehrere potente Veränderungen sind ubiquitär im untersuchten Tumor vorhanden, so die Mutationen APC p.1367 und TP53 p.175, die Deletion von TP53 und die Amplifikationen von EDEM2 und GNAS. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen schon in einer gemeinsamen Vorläuferzelle des Tumors vorlagen. Die Vorläuferzelle war mit diesen Veränderungen möglicherweise so potent, dass sie sich gegenüber den Zellen, die diese Veränderungen nicht trugen, durchgesetzt hat. Dies passt zu anderen Untersuchungen in kolorektalen Karzinomen: Siegmund et al. haben festgestellt, dass die meisten kolorektalen Karzinome aus gemeinsamen Vorläuferklonen hervorgehen [53]. Die verschiedenen Proben des im Rahmen meiner Arbeit untersuchten Kolonkarzinom haben jedoch im Laufe der Zeit Unterschiede in den Kopienzahlen der Gene angehäuft. Es ist aber möglich, dass in dem untersuchten Tumor weitere heterogen verteilte Eigenschaften vorliegen, die aufgrund der gewählten Untersuchungsmethode nicht detektiert wurden. Zum einen wurden nur 100 Gene untersucht, zum anderen wurden weder Mutationen, die in Introns liegen, noch synonyme Mutationen in die Auswertung einbezogen.

4.2 Potentielle funktionelle Konsequenzen der beobachteten Veränderungen

Neben den beiden Mutationen in APC p.1367 und TP53 p.175 liegen in dem untersuchten Kolonkarzinom zudem heterozygote Deletionen in APC und TP53 vor. Die Deletion in APC wurde mittels qPCR, die in TP53 mittels FISH bestätigt. Diese Veränderungen sind typisch für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen [43]. Das Auftreten von zwei Veränderungen innerhalb eines Gens kommt, wie Lee et al. gezeigt haben, häufig in kolorektalen Karzinomen vor [54]. In dem untersuchten Tumor liegen sowohl die Mutationen als auch die Kopienzahl-Veränderungen von APC und TP53 klonal, also in allen Tumorproben, vor. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Veränderungen früh in der Tumorentwicklung entstanden sind [19].

Das APC-Gen ist ein Tumorsuppresorgen und Teil des Wnt-Signalweges [1]. Der Verlust des APC-Proteins führt dabei zur Akkumulation von β -Catenin, welches eine wichtige Rolle

bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen spielt [11]. Die meisten der APC-Mutationen führen zu einem Abbruch in der Synthese von APC [36]. Die APC-Mutation in meiner Arbeit erzeugt ebenfalls ein Stop-Kodon, was zu einem Abbruch der Translation führt. In sporadischen kolorektalen Karzinomen liegen gehäuft Mutationen in den Kodons 1309 und 1450 sowie in den Regionen um diese beiden herum vor; dies betrifft die Region der β -Catenin-Bindung [36]. Es wird ein APC-Protein erzeugt, dem die β -Catenin-Bindungsdomäne fehlt, so kann APC nicht mehr an β -Catenin binden. Es kommt folglich zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges. Der Verlust eines Allels von APC ist neben einer Mutation ebenfalls ein häufiges frühes Ereignis in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen [55]. Beide Allele von APC müssen verändert sein, damit es zu einem Funktionsausfall kommt (*two hit hypothesis*) [56].

TP53 ist ein Tumorsuppressorgen und in Karzinomen mit am häufigsten von Veränderungen betroffen. 1992 wurde p53 von Lane als Wächter des Genoms beschrieben [57]. P53 spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose sowie der DNA-Reparatur. Es müssen ebenfalls beide Allele von TP53 verändert sein, damit es zu einem kompletten Funktionsausfall kommt. Mutationen in TP53 kommen bei 40-60 % der kolorektalen Karzinome vor [58]. Das TP53-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) lokalisiert. Ein Verlust von 17p ist eine typische Veränderung in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen und kommt in ca. 80 % der Tumore vor [43]. Baker et al. gehen davon aus, dass der Verlust eines Allels von TP53 eine typische Folge von einer Mutation von TP53 ist [59]. In dem im Rahmen meiner Arbeit untersuchten Kolonkarzinom wurde gezeigt, dass TP53 sowohl von einer Mutation, als auch von einer Deletion betroffen ist. Die gefundene Mutation (TP53 p.175) ist eine Hotspot-Mutation von TP53 [54]. Es liegen somit in diesem Tumor Veränderungen vor, die typisch für die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen sind.

Neben dem TP53-Gen ist auch das MAP2K4-Gen in dem untersuchten Kolonkarzinom von einer Deletion betroffen. MAP2K4 ist eine Proteinkinase (MAP-Kinase-Kinase), die als Teil einer Signalkaskade auf extra- und intrazellulären Stress reagieren kann. MAP2K4 ist wichtig für Prozesse wie Apoptose, Inflammation und Tumorentstehung [60]. MAP2K4 phosphoryliert Proteine wie JNK und p38, die eine Rolle bei der Apoptose und dem Zellzyklusarrest spielen [61]. 1997 wurde MAP2K4 erstmals von Teng et al. als Tumorsuppressor beschrieben; in dieser Arbeit wurden in Tumorzelllinien sowohl Mutationen als auch Kopienzahl-Veränderungen in MAP2K4 gefunden [62]. MAP2K4 liegt ebenso wie TP53 auf dem kurzen Arm von Chromosom 17. Es ist somit möglich, dass größere Teile des Chromosoms deletiert vorliegen. Das Zentromer von Chromosom 17 liegt in den FISH-Untersuchungen von TP53 mit einer absoluten Häufigkeit von 2, also nicht vermindert, vor. In kolorektalen Karzinomen liegen neben den eben beschriebenen Deletionen zusätzlich Mutationen von MAP2K4 vor. Diese werden von Parson et al. mit einer Häufigkeit von 2,4 % angegeben [63].

Lee et al. haben zudem MAP2K4-Mutationen in kolorektalen Adenomen nachgewiesen, sodass eine Veränderung von MAP2K4 möglicherweise in einer frühen Phase der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen relevant ist [54]. In Prostata- und Ovarialkarzinomen spielt MAP2K4 eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung, wobei die Aktivierung von MAP2K4 mit einer reduzierten Bildung von Metastasen einhergeht [61]. Die Bedeutung einer Deletion des MAP2K4-Gens im kolorektalen Karzinom sowie die Auswirkung auf die Expression von MAP2K4 ist bisher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

SMAD4 ist, wie auch SMAD2, ein Effektor des TGF- β -Rezeptors. Beide Gene liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 18 (18q21) [38]. 18q21 ist in kolorektalen Karzinomen häufig von Deletionen betroffen. 1999 haben Jernvall et al. gezeigt, dass der Verlust von 18q21 mit einer erhöhten Rezidivrate und somit mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [64]. Bertagnoli et al. konnten dies 2011 nicht bestätigen und sehen Unterschiede in der Überlebenszeit und der krankheitsfreien Überlebenszeit von Patienten mit kolorektalen Karzinomen in dem Vorliegen von Mikrosatelliteninstabilität und nicht in dem Verlust von 18q [39]. Die prognostische Bedeutung einer Deletion von 18q ist somit nicht abschließend geklärt. Yan et al. konnten jedoch in über 1000 kolorektalen Karzinomen zeigen, dass die Häufigkeit einer Deletion von SMAD4 mit der Progression der Tumore korreliert; diese ist dabei mit einem schlechten Therapieerfolg assoziiert [65]. Ma et al. können dies bestätigen und zeigen, dass eine Deletion von SMAD4 in späten Stadien häufiger als in frühen Stadien vorliegt (63,6 bzw. 26,4 %) [66]. Die Analyse mittels CNVPanelizer und die qPCR zeigen, dass SMAD4 in dem untersuchten Kolonkarzinom vermindert vorliegt. Die durch den CNVPanelizer errechneten Kopienzahlen weisen für alle vier untersuchten Tumorproben etwas höhere Werte auf als die der qPCR, jedoch zeigen sich mit beiden Methoden ähnliche Unterschiede zwischen den Tumorproben. In meiner Arbeit wurde nicht untersucht, inwiefern eine Deletion des SMAD4-Gens die Expression von SMAD4 beeinflusst. Zhang et al. haben gezeigt, dass die Expression von SMAD4 mit zunehmendem Tumorstadium abnimmt [67]. Yan et al. haben in ihrer Arbeit gesehen, dass die Deletion von SMAD4 mit einer verminderten mRNA-Expression einhergeht [65]. SMAD4 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus und bei der Empfindlichkeit von kolorektalen Karzinomen gegenüber dem Standard-Therapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU); vermindertes SMAD4 führt dabei zu einer verminderten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber 5-FU [67]. Somit kann die Analyse von SMAD4 für die Therapie von kolorektalen Karzinomen entscheidend sein.

Neben den Deletionen von APC, TP53, MAP2K4 und SMAD4 wurden Amplifikationen der Gene MMP9, EDEM2, GNAS, EGFR, BRCA2, CARD11 und SOX9 beobachtet. Die Amplifikation von Genen ist ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von Tumoren [17]. Jedoch ist die funktionelle Auswirkung von Amplifikationen nicht immer klar, da nicht jede Veränderung zu einer erhöhten Expression führt [68]. Die Expression der Gene wurde im Rahmen meiner Arbeit nicht untersucht, sodass keine Aussage über die Folgen der Ampli-

fikationen getroffen werden kann. Für einige Gene wurde jedoch schon gezeigt, dass eine Amplifikation mit einer erhöhten Expression einhergehen kann. Camps et al. konnten für 17 kolorektale Karzinome eine signifikante Korrelation zwischen den Kopienzahl-Veränderungen und der Höhe der Proteinexpression feststellen [69]. Cheng et al. haben in Magenkarzinomen gezeigt, dass bei 133 der 163 untersuchten Gene die Kopienzahl-Veränderung mit der Gen-Expression korreliert [70]. Dies stimmt auch mit Daten aus Junnila et al. überein, die gezeigt haben, dass in Magenkarzinomen bei 7 von 13 untersuchten Genen die Kopienzahl-Veränderung mit einer Überexpression korreliert; unter diesen Genen befindet sich auch MMP9 [71].

In Kolonkarzinomen liegt der lange Arm von Chromosom 20 (20q) in ca. 70 % der Fälle vermehrt vor [72]. Tsafrir et al. haben gezeigt, dass dies mit einer erhöhten Expression der Gene, die auf 20q liegen, korreliert [68]. Auf dem langen Arm von Chromosom 20 liegen u.a. die Gene EDEM2, GNAS und MMP9. Alle drei Gene liegen in dem untersuchten Kolonkarzinom amplifiziert vor, sodass es möglich ist, dass auch hier größere Abschnitte des Arms vermehrt vorliegen. Die mittels CNVPanelizer detektierte Amplifikation der drei Gene wurde mittels qPCR und für MMP9 zusätzlich mittels FISH bestätigt. Die Analyse mittels FISH hat dabei jedoch gezeigt, dass das Zentromer von Chromosom 20 mit einer absoluten Häufigkeit von ca. 2, also nicht verändert, vorliegt.

Die Matrixmetalloprotease MMP9 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Karzinogenese und bei der Invasion von Tumorzellen in das umgebende Stroma [73]. MMP9 ist in kolorektalen Karzinomen häufig überexprimiert [74]. Daniel et al. konnten zeigen, dass die Höhe der MMP9-Expression in kolorektalen Karzinomen dabei mit steigendem Tumorstadium zunimmt [73]. Die Analyse mittels CNVPanelizer hat eine heterogene Verteilung der Amplifikation von MMP9 festgestellt. Die Kopienzahl-Veränderungen von MMP9 wurden sowohl mittels qPCR als auch mittels FISH überprüft. Beide Methoden bestätigen eine Amplifikation von MMP9, jedoch liegt die Veränderung homogen im Tumor verteilt vor. Es konnten geringe Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden: die absolute Kopienzahl in der qPCR liegt bei 3,4 bis 4 und in der FISH bei 2,5 bis 3. Es handelt sich um verschiedene Methoden, außerdem wurde unterschiedliches Ausgangsgewebe verwendet, was die Unterschiede erklären könnte. Es ist fraglich, welche Auswirkungen die Amplifikation von MMP9 hat. Junnila et al. konnten zeigen, dass die Amplifikation von MMP9 in Magenkarzinomen mit der Überexpression des Gens korreliert [71]. Für kolorektale Karzinome ist dies bisher noch nicht gezeigt worden.

Das EDEM2-Gen liegt laut der Analyse mittels CNVPanelizer in allen Tumorproben amplifiziert vor. Die Überprüfung von vier Tumorproben mittels qPCR kann eine Amplifikation bestätigen. Das EDEM2-Gen kodiert für ein Protein, das als Teil der Degradation von

Glykoproteinen durch das endoplasmatische Retikulum fungiert (*ER-associated degradation*, ERAD) [75]. Der ERAD-Prozess wird dabei durch Zellstress getriggert [76]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase der Zellen, da falsch gefaltete Glykoproteine erkannt und anschließend proteasomal abgebaut werden können [77]. Die Bedeutung von EDEM2 für die Entstehung von Tumoren im Allgemeinen und von kolorektalen Karzinomen im Speziellen ist bisher nicht untersucht worden. Außerdem kann keine Aussage über die Folge einer Amplifikation des EDEM2-Gens auf den ERAD-Prozess gemacht werden.

Die Analyse mittels CNVPanelizer zeigt für alle Tumorproben eine Amplifikation des GNAS-Gens. Die Überprüfung von vier Tumorproben mittels qPCR kann eine Amplifikation bestätigen. Das GNAS-Gen kodiert u.a. für die alpha-Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins, welches als Teil von Signalkaskaden eine Rolle im Hormon- und Knochenstoffwechsel spielt [78]. In Tumoren sind Veränderungen des GNAS-Gens schon häufig beschrieben worden. Eine wichtige Rolle scheinen GNAS-Mutationen in der Entstehung von Pankreaskarzinomen zu spielen. Lee et al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass GNAS-Mutationen mit 56 % häufig in intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien des Pankreas vorkommen [79]. Die Häufigkeit von GNAS-Mutationen in kolorektalen Karzinomen und ihren Vorläuferläsionen wird mit unterschiedlichen Zahlen angegeben. Laut Liu et al. liegt eine Mutation im GNAS-Gen in 2,0 % der kolorektalen Karzinome vor [80]. Hingegen konnten Lee et al. in 100 kolorektalen Karzinomen und 96 Polypen bzw. Adenomen keine GNAS-Mutation finden [81]. In einer anderen Arbeiten haben Lee et al. in einem von 12 untersuchten „high-grade“ Adenomen des Kolons eine GNAS-Mutation detektiert sowie in weiteren drei Adenomen eine Amplifikation des GNAS-Gens [54]. Ebenso konnten Han et al. eine Amplifikation von GNAS in kolorektalen Karzinomen beobachten. In 13 von 60 untersuchten Tumoren lag eine Amplifikation vor [82]. In den genannten Arbeiten kann jedoch keine Aussage über eine mögliche Folge der Amplifikation auf die Expression getroffen werden. Es ist somit nicht möglich, eine Aussage über die Bedeutung einer Amplifikation von GNAS im kolorektalen Karzinom zu treffen.

Für das EGFR-Gen bestätigt die Untersuchung mittels FISH die Ergebnisse der Analyse mittels CNVPanelizer. Die FISH wurde an 12 Tumorproben sowie einer Probe des Normalgewebes durchgeführt. In allen Tumorproben wurde eine Amplifikation nachgewiesen, die absolute Anzahl der EGFR-Kopien variiert zwischen 2,5 und 4,2 Kopien. EGFR ist eine membranständige Rezeptorproteinkinase und Teil des RAS-MAPK- sowie des PI3K-AKT-Signalweges; die Signalwege spielen eine entscheidende Rolle bei Zellwachstum und -proliferation [83]. In Tumoren ist häufig eine Komponente des RAS-MAPK-Signalweges mutiert oder EGFR amplifiziert, sodass es zur vermehrten Aktivität des Signalweges kommt. EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab und Panitumumab können bei metastasierten kolorektalen Karzinomen eingesetzt [84]. Die monoklonalen Antikörper binden dabei an den extrazellulären Anteil von EGFR und inhibieren so den Signalweg [83]. Klinisch relevant ist in die-

sem Signalweg besonders eine KRAS-Mutation, die die Ansprechrate von EGFR-Inhibitoren reduziert [85]. Ebenso ist die Amplifikation von EGFR im Rahmen dieses Signalweges entscheidend; sie kommt in bis zu 15 % der kolorektalen Karzinomen vor [86]. Die Amplifikation des Gens ist ein Mechanismus für die Überexpression von EGFR [87]. Jedoch korreliert laut Italiano et al. weder die mit FISH nachgewiesene Amplifikation von EGFR noch eine erhöhte Expression von EGFR in metastasierten kolorektalen Karzinomen mit der Ansprechrate einer Cetuximab-haltigen Therapie [86]. Park et al. haben für triple negative Mammakarzinome gezeigt, dass eine hohe Aneuploidie und eine Amplifikation von EGFR signifikant mit einer erhöhten Expression von EGFR korrelieren [87]. Italiano et al. haben für 31 metastasierte kolorektale Karzinome gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl des EGFR-Gens nicht mit einer erhöhten Expression einhergehen muss. So haben von den 31 kolorektalen Karzinomen 8 eine erhöhte Anzahl des EGFR-Gens gezeigt, von denen zeigten jedoch nur 3 auch eine hohe EGFR-Expression [86]. Im Rahmen meiner Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich die Kopienzahlen von EGFR zwischen den Zellen einer einzelnen Probe stark unterscheiden können. In den meisten der untersuchten Proben variieren die Kopienzahlen von mindestens 2 bis 5 Kopien. Es liegt somit Heterogenität innerhalb der Tumorproben vor. Heterogenität von EGFR-Amplifikationen wurde im kolorektalen Karzinomen bisher nicht untersucht. Stahl et al. konnten jedoch für Magenkarzinome eine heterogene Verteilung von EGFR-Kopien zeigen. In 7 von 109 untersuchten Tumoren zeigte sich eine EGFR-Amplifikation, in 5 der 7 Karzinome zeigte sich eine heterogene Verteilung. Das zeigt, dass eine Amplifikation in Magenkarzinomen selten ist, wenn sie vorliegt, jedoch häufig heterogen. Stahl et al. haben jedoch nicht untersucht, inwiefern die Amplifikation eine Auswirkung auf die Expression von EGFR hat [17]. Die Bedeutung einer Amplifikation von EGFR muss somit weiter untersucht werden.

Die Analyse mittels CNVPanelizer zeigt eine Amplifikation von BRCA2 auf, welche mittels FISH bestätigt wird. Es liegt neben intratumoraler Heterogenität außerdem Heterogenität zwischen den Zellen innerhalb der Tumorproben vor. Die Heterogenität ist innerhalb der einzelnen Tumorproben stark ausgeprägt, die Kopienzahlen variieren in den meisten Tumorproben von mind. 1 bis 6 Kopien, und erreichen einen maximalen Wert von 18 Kopien. BRCA2 ist wie auch BRCA1 ein Tumorsuppressorgen und u.a. involviert in die DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle [88]. Das Vorhandensein einer BRCA2-Mutation geht mit einer erhöhten Rate an Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Pankreaskarzinomen einher [89]. Laut Corre et al. haben Träger von BRCA1- und BRCA2-Mutationen ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [88]. Phelan et al. können das nur für BRCA1-Trägerinnen unter 50 Jahre und nicht für BRCA2-Trägerinnen bestätigen [90]. Die Rolle von Veränderungen von BRCA2 ist somit im kolorektalen Karzinom nicht abschließend bestätigt. Der Verlust beider BRCA2-Allele geht im Allgemeinen jedoch mit einer erhöhten Tumorraten einher [91]. Außerdem können Veränderungen in BRCA2 in kolorektalen Karzinomen regel-

mäßig beobachtet werden. So konnten Han et al. in 60 von ihnen untersuchten kolorektalen Karzinomen in einem Karzinom eine Mutation sowie in einem weiteren eine Deletion von BRCA2 feststellen [82]. Eine Mutation oder ein Verlust von BRCA1 bzw. BRCA2 kann dabei eine therapeutische Konsequenz haben, da die Veränderungen die Sensitivität von Platinhaltigen Chemotherapeutika und von Inhibitoren der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-Inhibitoren) erhöhen kann [92]. Im Rahmen meiner Arbeit wurde jedoch eine Amplifikation von BRCA2 festgestellt. Ob diese mit einer erhöhten Expression von BRCA2 einhergeht, bleibt unklar. Unsere eigenen Ergebnisse zeigen in gut 35 % der untersuchten kolorektalen Karzinome ebenfalls eine erhöhte Kopienzahl von BRCA2 [51]. Corre et al. konnten bei der Untersuchung von kolorektalen Karzinomen zeigen, dass die mRNA von BRCA2 im Vergleich zu Kolon-Normalgewebe vermehrt vorliegt [88]. Sie haben die Tumoren jedoch nicht auf Ebene der DNA untersucht, sodass sie keine Aussage über die Kopienzahl von BRCA2 treffen können. Die Bedeutung einer Amplifikation von BRCA2 in kolorektalen Karzinomen ist somit insgesamt noch unklar und es bedarf weiterer Untersuchungen. Dabei ist es nötig, sowohl weitere kolorektale Karzinome als auch weitere Aspekte, wie die Expression von BRCA2, zu betrachten.

Die Analyse mittels CNVPanelizer hat für CARD11 eine heterogen verteilte Amplifikation aufgezeigt, welche mittels FISH nicht bestätigt werden konnte. Die Überprüfung mittels FISH ergibt, dass sowohl im Normalgewebe als auch in den Tumorproben eine absolute Kopienzahl von 2 vorliegt. Jedoch zeigen sich zwischen den Zellen innerhalb der einzelnen Proben deutliche Unterschiede in der Höhe der Kopienzahlen. Die absoluten Kopienzahlen von CARD11 liegen im Großteil der Tumorproben bei 2 bis 4 Kopien, erreichen jedoch auch Werte von bis zu 6 Kopien. Die Heterogenität innerhalb der Tumorproben kann ein Grund sein, warum die beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse liefern, denn sie untersuchen unterschiedliches Ausgangsmaterial. CARD11 spielt eine Rolle bei der Aktivierung des NF-kappa-B-Signalweges [93]. Das Gerüstprotein verbindet dabei Membranrezeptoren mit Untereinheiten von NF-kappa-B [94]. CARD11 ist in Lymphomen häufig mutiert; Lohr et al. zeigen in 20 % der untersuchten diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome eine CARD11-Mutation [95], wie auch Wu et al. in 5,5 % der untersuchten Mantelzelllymphome [93]. Watt et al. zeigen, dass CARD11 in Plattenepithelkarzinomen der Haut mit einer Häufigkeit von 38 % ebenfalls oft mutiert ist. Dabei konnten sie zusätzlich feststellen, dass die Expression von CARD11 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe der Haut erhöht ist [94]. Wir haben eine Mutation in CARD11 in einer Lungenmetastase nach der Behandlung des kolorektalen Karzinoms mittels Chemotherapie detektiert, sowie Amplifikationen von CARD11 in über 40 % der untersuchten kolorektalen Karzinome [51]. Die Bedeutung von Veränderungen von CARD11 in kolorektalen Karzinomen ist bisher jedoch wenig erforscht. So bedarf auch die Auswirkung einer Amplifikation auf die Expression von CARD11 weiterer Untersuchungen.

Die Analyse mittels CNVPanelizers zeigt für SOX9 eine heterogen verteilte Amplifikation. Die qPCR konnte dies nicht eindeutig bestätigen. Für drei der untersuchten vier Proben zeigt die qPCR ähnliche Ergebnisse wie die Analyse mittels CNVPanelizer. Für die verbleibende Probe, Tumorprobe 3.2.3A, zeigt die qPCR eine Deletion statt einer Amplifikation an. Möglicherweise liegt bei dieser Probe ein technischer Fehler vor, allerdings zeigen die im Rahmen der qPCR erstellten Triplikate jeweils vergleichbare Ergebnisse. SOX9 ist mit weiteren Genen in die Regulation des Wnt-Signalweges involviert [55]. Dabei ist SOX9 sowohl ein Zielgen als auch ein Inhibitor des Signalweges [96]. Laut TCGA zeigen 4 bzw. 7 % der kolorektalen Karzinome SOX9-Mutationen (nicht-hypermutierte bzw. hypermutierte kolorektale Karzinome) [97]. Javier et al. zeigen mit 10,7 % eine etwas höhere Häufigkeit in den von ihnen untersuchten kolorektalen Karzinomen [98]. SOX9 wird wie andere Zielgene des Wnt-Signalweges in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe des Kolons vermehrt exprimiert [99]. Javier et al. zeigen, dass die Expression sowohl in kolorektalen Karzinomen mit einer SOX9-Mutation als auch in Wildtyp-Karzinomen erhöht sein kann [98]. Über das Vorliegen von Kopienzahl-Veränderungen des SOX9-Gens und über daraus resultierende Folgen ist bisher nichts bekannt. Mutationen von SOX9 liegen häufig in kolorektalen Karzinomen vor, die Bedeutung einer Amplifikation von SOX9 und die möglichen Folgen für die Expression müssen jedoch noch untersucht werden.

4.3 Bewertung des methodischen Ansatzes

4.3.1 Einteilung des Tumors

Der in meiner Arbeit untersuchte Tumor wurde in 68 Proben unterteilt. Die fünf Blöcke des Tumors wurden, wie in den Methoden beschrieben, dabei von oral nach aboral zunächst in 17 Gruppen eingeteilt. Jede dieser Gruppen wurde in vier Quadranten unterteilt. Dabei wurde der luminale Teil, die Invasionsfront sowie der rechte und linke Teil des Tumors jeweils als eine Probe verwendet. Die Einteilung der Quadranten basiert auf Beobachtungen, dass sich die Invasionsfront von den anderen Teilen des Tumors unterscheiden kann. So haben Jung et al. gezeigt, dass sich die Expression von nukleärem β -Catenin sowie die Proliferation der Zellen zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront unterscheiden [100]. Des Weiteren haben Kosmidou et al. in kolorektalen Karzinomen zwischen Zentrum und Peripherie Unterschiede in KRAS-Mutationen detektiert [18]. In meiner Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen den Quadranten festgestellt werden, die Invasionsfront unterscheidet sich nicht von den anderen Quadranten. Wichtig ist jedoch, dass durch die gewählte Probeneinteilung Unterschiede hätten detektiert werden können. Es wurde nur ein Tumor mit frühem Stadium sowie 100 ausgewählte Gene untersucht, sodass die Aussagekraft möglicherweise zu gering ist.

Die Analyse des gesamten Tumors, d.h. die Sequenzierung und Rekonstruktion der genetischen Alterationen als dreidimensionale Anordnung wie sie dem Tumor entspricht, ist eine Besonderheit meiner Arbeit. Die bisher gezeigte Heterogenität in Tumoren basiert darauf, dass einige Proben aus unterschiedlichen Regionen eines Tumors untersucht werden. So haben Kosmidou et al. im kolorektalen Karzinom zwei Proben pro Tumor untersucht, eine aus dem Zentrum des Tumors und eine aus der Peripherie [18]. Friemel et al. haben im hepatozellulären Karzinom pro Tumor drei Regionen untersucht [16]. Gerlinger et al. haben in den zwei zum Nierenzellkarzinom veröffentlichten Arbeiten bis zu elf Regionen pro Tumor untersucht [14]. In den drei gerade genannten Arbeiten konnte in 44 % (33/75 Tumoren), 22 % (5/23 Tumoren) bzw. 100 % (10/10 Tumoren) der Tumoren Heterogenität festgestellt werden [14, 16, 18]. In keinem Fall wurde eine aufeinanderfolgende Anordnung von Proben, die den gesamten Tumor einbezieht, analysiert. Die genannten Arbeiten zeigen, dass es auch möglich ist, mit wenigen untersuchten Regionen Heterogenität zu detektieren. Jedoch ist auch die Anzahl der untersuchten Veränderungen entscheidend, sodass die Arbeiten nicht direkt verglichen werden können. Gerlinger et al. stellen dar, dass die Detektion von heterogen verteilten Veränderungen mit der Anzahl der untersuchten Regionen steigen kann [14]. Sottoriva et al. haben in ihrer Arbeit neben größeren Tumorteilen auch einzelne Krypten von kolorektalen Karzinomen untersucht. Sie konnten dadurch Informationen zur Tumorentstehung gewinnen und gehen davon aus, dass die meisten kolorektalen Karzinome mittels verzweigter Entwicklung entstehen. Die Heterogenität innerhalb der kolorektalen Karzinome entstehe dabei früh in der Entwicklung der Tumoren [19]. Wie oben schon erläutert, ist es durchaus möglich, dass der im Rahmen meiner Arbeit analysierte Tumor Heterogenität von Mutationen beinhaltet und diese durch das gewählte Untersuchungsmethode nicht detektiert wurden.

4.3.2 Next Generation Sequencing mittels *PGM^m*

In meiner Arbeit wurde das Kolonkarzinom mittels gezielter Sequenzierung analysiert. Dabei wurden 100 ausgewählte Gene untersucht. Durch das Verwenden von gezielter Sequenzierung im Gegensatz zur Sequenzierung des gesamten Genoms oder Exoms kann die Tiefe der untersuchten Regionen erhöht werden [47]. Eine Besonderheit meiner Arbeit ist die sehr hohe Tiefe, die im Durchschnitt bei 1868 Reads liegt. In vergleichbaren Arbeiten zur Tumroheterogenität fällt die Tiefe deutlich geringer aus, so liegt sie z.B. bei Gerlinger et al. in den zwei untersuchten Nierenzellkarzinomen bei 61 bzw. 74 Reads [13]. Durch die hohe Tiefe ist es möglich, Mutationen mit einer geringen Häufigkeit sicher zu detektieren. Gleichzeitig wird bei der gezielten Sequenzierung jedoch nur eine begrenzte Auswahl an Genen untersucht, was die Aussagekraft bestimmter Analysen einschränken kann. Sottoriva et al. haben im Gegensatz dazu in ihrer Arbeit das gesamte Genom von kolorektalen Karzinomen sequenziert, was zusätzliche genetische Informationen bringt [19]. Neben der Tiefe werden alle Läufe der

Sequenzierung hinsichtlich weiterer Qualitätsmerkmale ausgewertet. Die sogenannten *Run Reports* geben dabei u.a. Aufschluss über die Leselänge, die Beladung der Sequenzier-Chips und die verwendbaren *Ion Sphere Particles*. Die analysierten Proben haben, wie in den Ergebnissen beschrieben, eine gute Qualität erreicht, sodass sie alle in die Auswertung einbezogen werden können, siehe Abschnitt 3.2.1, Seite 31.

In den verschiedenen Arbeiten zur Tumor-Heterogenität werden unterschiedliche NGS-Methoden und -Geräte mit unterschiedlichen Stärken und Schwächen verwendet. Ein Vorteil der *PGM™* ist ihre kurze Laufzeit, die bei ca. 2 Stunden liegt [47]. Die maximale Leselänge liegt aber mit 200 Basenpaaren im Mittelfeld [47]. Ein Nachteil von *PGM™* ist die Fehleranfälligkeit in homopolymeren Sequenzen [48]. Die Verifizierung der mittels *PGM™* detektierten Mutationen durch die Sanger-Sequenzierung ist sinnvoll [101] und zeigt, dass viele *single nucleotide variants* (SNVs) technische Artefakte der *PGM™*-Sequenzierung darstellen. Die Fehler der Sequenzierung mittels *PGM™* und Sanger sind unterschiedlicher Natur, sodass die Verifizierung von suspekten NGS-Ergebnissen mit Sanger möglich ist [29]. Durch die Detektion von falsch-positiven Mutationen werden so die Schwächen von *PGM™* aufgedeckt. Außerdem hat die Sanger-Sequenzierung ein Limit bezüglich der Sensitivität von Mutationen $< 10\%$. Mutationen mit einer geringeren Häufigkeit können hingegen durch die *PGM™* detektiert werden. In meiner Arbeit wurden durch die Sanger-Sequenzierung alle bis auf zwei Mutationen (APC p.1367 und TP53 p.175) widerlegt. Alle Mutationen, die nicht bestätigt werden konnten, liegen in homopolymeren Sequenzen. Sie wurden fälschlicherweise vor der Weiterverwendung der Quelldaten vom Variant Caller der Pipeline nicht herausgefiltert. Trotz des Wissens um ihre Lage in homopolymeren Sequenzen wurden sie sicherheits halber mit Sanger-Sequenzierung überprüft. Durch das systematische Widerlegen solcher Mutationen kann auf die Überprüfung in sich anschließenden Arbeiten verzichtet werden. Gleichzeitig war es durch den Variant Caller der Pipeline möglich, viele der SNVs, die im Rahmen der Sequenzierung mittels *PGM™* das erste Mal detektiert wurden, aufzudecken. So konnten diese vor der Weiterverwendung der Daten ausgeschlossen werden. Außerdem ist im Rahmen meiner Arbeit offensichtlich geworden, dass an den Rändern der Amplikons auch häufiger Fehler passieren, was eine weitere Schwäche der verwendeten Methoden darzustellen scheint.

4.3.3 CNVPanelizer - Kopienzahl-Veränderungen aus gezielter Sequenzierung

Die Analyse der Kopienzahlen mittels CNVPanelizer ist noch neu, es gibt bisher keine Erkenntnisse über ihre Genauigkeit. Deshalb wurden die Ergebnisse teilweise mittels qPCR sowie FISH überprüft. Die Überprüfung bestätigt für ausgewählte Gene die Analyse mittels CNVPanelizer, zeigt jedoch auch Unterschiede zwischen den Methoden auf. Bisher wurde die

Analyse von Kopienzahl-Veränderungen auf Basis von Sequenzierergebnissen v.a. des gesamten Exoms (*whole exome sequencing*) [102], oder auch des gesamten Genoms (*whole genome sequencing*) [103] durchgeführt. In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch mit gezielter Sequenzierung funktionieren kann. Problematisch ist hierbei, dass nur einzelne Abschnitte innerhalb der DNA untersucht werden, die jedoch nicht zusammenhängen. Die Amplifikation der untersuchten DNA-Abschnitte kann deshalb die Analyse von Kopienzahl-Veränderungen erschweren [47].

Die qPCR ist der Goldstandard in der Analyse von Genexpression. Die Methode ist kostengünstig und weit verbreitet [104]. Die Analyse von Kopienzahl-Veränderungen mittels qPCR ist noch nicht geläufig, findet aber immer wieder Verwendung. Sie wurde 2010 von D'haene et al. [22] sowie Weaver et al. beschrieben [23]. Die Planung des Versuches ist für eine erfolgreiche qPCR wichtig. Werden, wie in meiner Arbeit, für ein Gen mehrere Proben verglichen, sollten diese alle während eines Laufes analysiert werden. Denn nur so können Unterschiede eines Gens zwischen verschiedenen Läufen vermieden werden [104]. In meiner Arbeit wurde der Ansatz $2^{-\Delta\Delta Ct}$ zur Berechnung der relativen Änderung im Vergleich zum Normalgewebe verwendet [105].

FISH wird routinemäßig für die Diagnostik einiger Tumoren angewendet und ist ein gut etabliertes Verfahren. Sie zeigt als einzige hier verwendete Methoden die Veränderungen auf Zellniveau und kann somit auch Heterogenität zwischen Zellen innerhalb einer Probe aufzeigen. Zusätzlich kann überprüft werden, ob das Zentromer des Chromosoms, auf dem das zu untersuchende Gen liegt, ebenfalls verändert vorliegt. In mehreren Arbeiten wurde FISH zur Analyse von Kopienzahl-Veränderungen eingesetzt; so weisen Italiano et al. [86] sowie Han et al. [82] mittels FISH Amplifikationen in kolorektalen Karzinomen nach. Die Verwendung zur Detektion von intratumoraler Heterogenität ist noch selten, wurde jedoch u.a. von Stahl et al. für die Analyse von Magenkarzinomen [17] durchgeführt.

Meine Arbeit geht über die reine Detektion von Heterogenität hinaus. Das Untersuchen des gesamten Tumors lässt auch Rückschlüsse auf die Entstehung des Tumors zu. Durch das Projizieren der Ergebnisse der Kopienzahl-Veränderungen auf die eingescannten HE-Schnitte konnte eine dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors angefertigt werden. So konnte gezeigt werden, dass der Tumor sich aus zwei Clustern zusammensetzt, die sich entlang der oral-aboralen Achse erstrecken.

Die Untersuchung des Kolonkarzinomes mittels *PGM*[™] und CNVPanelizer hat gut funktioniert. Die beiden Methoden eignen sich somit zu Detektion von intratumoraler Heterogenität auf Ebene der Mutationen bzw. Kopienzahl-Veränderungen. Allerdings ist die Verifizierung mit weiteren, unabhängigen Methoden im Rahmen meiner Arbeit ein wichtiger Bestandteil gewesen. Es ist davon auszugehen, dass die Durchführung der Verifizierungen bei der Analyse weiterer Tumoren erneut nötig ist.

4.4 Ausblick

Im Rahmen meiner Arbeit wird ein Kolonkarzinom sehr detailliert in 68 Proben unterteilt. Diese Einteilung ist bisher einzigartig und erlaubt in Verbindung mit den HE-Schnitten der Proben eine dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors und der Ergebnisse. Der untersuchte Tumor zeigt zwei klonale Hotspot-Mutationen (APC p.1367 und TP53 p.175), klonale Kopienzahl-Veränderungen und heterogen verteilte Kopienzahl-Veränderungen. Der Tumor lässt sich anhand der Kopienzahl-Veränderungen in zwei Cluster einteilen, die sich in der 3D-Rekonstruktion als räumlich getrennt erweisen. Die Arbeit zeigt, dass Unterschiede der Kopienzahl-Veränderungen innerhalb eines Kolonkarzinoms vorliegen können. Die Ergebnisse heben sich jedoch von anderen Untersuchungen in kolorektalen Karzinomen ab, die deutlich mehr Heterogenität, auch in Hotspot-Mutationen, nachweisen konnten. Im Rahmen meiner Arbeit wird ein frühes Stadium eines Kolonkarzinoms untersucht, was eine Ursache für die geringe Heterogenität bieten kann. Deshalb wäre es sinnvoll, ein Kolonkarzinom eines späteren Stadiums auf die hier gezeigte Art und Weise zu untersuchen. Zusätzlich sollten weitere Aspekte wie die Morphologie und Gen-Expression untersucht werden. Zudem ist es möglich, bei späteren Stadien die dazugehörigen Metastasen zu untersuchen und somit ggf. Heterogenität zwischen den verschiedenen Tumorerläsionen zu detektieren. Auch andere Methoden der DNA-Gewinnung wie die *liquid biopsy* oder die Entnahme mehrerer Biopsien im Verlauf einer Erkrankung, besonders bei dem Auftreten eines Rezidives, sind Möglichkeiten, um weitere Informationen über die Entstehung von Tumor-Heterogenität zu erlangen.

Literaturverzeichnis

- [1] RA Burrell, N McGranahan, J Bartek, and C Swanton. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467):338–345, 2013.
- [2] M Jamal-Hanjani, SA Quezada, J Larkin, and C Swanton. Translational Implications of Tumor Heterogeneity. *Clin Cancer Res*, 21(6):1258–1266, 2015.
- [3] M Gerlinger and C Swanton. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*, 103(8):1139–1143, 2010.
- [4] B Vogelstein, N Papadopoulos, VE Velculescu, S Zhou, LA Jr. Diaz, and KW Kinzler. Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127):1546–1558, 2013.
- [5] UF Wellner, T Keck, and T Brabletz. Lebermetastasen. *Chirurg*, 81(6):551–556, 2010.
- [6] S Yachida, S Jones, I Bozic, T Antal, R Leary, B Fu, M Kamiyama, RH Hruban, JR Eshleman, MA Nowak, VE Velculescu, KW Kinzler, B Vogelstein, and CA Iacobuzio-Donahue. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467(7319):1114–1117, 2010.
- [7] RA Burrell and C Swanton. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol Oncol*, 8(6):1095–1111, 2014.
- [8] F Prall. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*, 50(1):151–162, 2007.
- [9] B Mitrovic, DF Schaeffer, RH Riddell, and R Kirsch. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*, 25(10):1315–1325, 2012.
- [10] T Kirchner and T Brabletz. Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am J Pathol*, 157(4):1113–1121, 2000.
- [11] T Brabletz, A Jung, S Reu, M Porzner, F Hlubek, LA Kunz-Schughart, R Knuechel, and T Kirchner. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(18):10356–10361, 2001.

- [12] F Hlubek, T Brabletz, J Budczies, S Pfeiffer, A Jung, and T Kirchner. Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *Int J Cancer*, 121(9):1941–1948, 2007.
- [13] M Gerlinger, AJ Rowan, S Horswell, J Larkin, D Endesfelder, E Gronroos, P Martinez, N Matthews, A Stewart, P Tarpey, I Varela, B Phillimore, S Begum, NQ McDonald, A Butler, D Jones, K Raine, C Latimer, CR Santos, M Nohadani, AC Eklund, B Spencer-Dene, G Clark, L Pickering, G Stamp, M Gore, Z Szallasi, J Downward, PA Futreal, and C Swanton. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366(10):883–892, 2012.
- [14] M Gerlinger, S Horswell, J Larkin, AJ Rowan, MP Salm, I Varela, R Fisher, N McGranahan, N Matthews, CR Santos, P Martinez, B Phillimore, S Begum, A Rabinowitz, B Spencer-Dene, S Gulati, PA Bates, G Stamp, L Pickering, M Gore, DL Nicol, S Hazell, PA Futreal, A Stewart, and C Swanton. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet*, 46(3):225–233, 2014.
- [15] LR Yates, M Gerstung, S Knappskog, C Desmedt, G Gundem, P Van Loo, T Aas, LB Alexandrov, D Larsimont, H Davies, Y Li, YS Ju, M Ramakrishna, HK Haugland, PK Lilleng, S Nik-Zainal, S McLaren, A Butler, S Martin, D Glodzik, A Menzies, K Raine, J Hinton, D Jones, LJ Mudie, B Jiang, D Vincent, A Greene-Colozzi, PY Adnet, A Fatima, M Maetens, M Ignatiadis, MR Stratton, C Sotiriou, AL Richardson, PE Lø nning, DC Wedge, and PJ Campbell. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med*, 21(7):751–759, 2015.
- [16] J Friemel, M Rechsteiner, L Frick, F Böhm, K Struckmann, M Egger, H Moch, M Heikenwalder, and A Weber. Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 21(8):1951–1962, 2015.
- [17] P Stahl, C Seeschaaf, P Lebok, As Kutup, M Bockhorn, JR Izbicki, C Bokemeyer, R Simon, G Sauter, and AH Marx. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*, 15(7), 2015.
- [18] V Kosmidou, E Oikonomou, M Vlassi, S Avlonitis, A Katseli, I Tsipras, D Mourtzoukou, G Kontogeorgos, G Zografos, and A Pintzas. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat*, 35(3):329–340, 2014.

- [19] A Sottoriva, H Kang, Z Ma, TA Graham, MP Salomon, J Zhao, P Marjoram, K Siegmund, MF Press, D Shibata, and C Curtis. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet*, 47(3):209–216, 2015.
- [20] YW Lu, HF Zhang, R Liang, ZR Xie, HY Luo, YJ Zeng, Y Xu, LM Wang, XY Kong, and KH Wang. Colorectal cancer genetic heterogeneity delineated by multi-region sequencing. *PLoS ONE*, 11(3), 2016.
- [21] R Bishop. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, 3(1):85–95, 2010.
- [22] B D’haene, J Vandesompele, and J Hellemans. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods*, 50(4):262–270, 2010.
- [23] S Weaver, S Dube, A Mir, J Qin, G Sun, R Ramakrishnan, RC Jones, and KJ Livak. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods*, 50(4):271–276, 2010.
- [24] PC Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260):23–28, 1976.
- [25] NC Turner and JS Reis-Filho. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol*, 13(4):e178–185, 2012.
- [26] M Greaves and CC Maley. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381):306–313, 2012.
- [27] D Hanahan and RA Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [28] P Deininger. Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *Ochsner J*, 1(4):206–209, 1999.
- [29] D Ulahannan, MB Kovac, PJ Mulholland, JB Cazier, and I Tomlinson. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer*, 109(4):827–835, 2013.
- [30] TA Yap, M Gerlinger, PA Futreal, L Pusztai, and C Swanton. Intratumor Heterogeneity: Seeing the Wood for the Trees. *Sci Transl Med*, 4(127):127ps10, 2012.
- [31] PL Bedard, AR Hansen, MJ Ratain, and LL Siu. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467):355–364, 2013.

- [32] CA Aktipis, VS Kwan, KA Johnson, SL Neuberg, and CC Maley. Overlooking evolution: a systematic analysis of cancer relapse and therapeutic resistance research. *PLoS One*, 6(11):e26100, 2011.
- [33] V Heinemann, JY Douillard, M Ducreux, and M Peeters. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer – An example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev*, 39(6):592–601, 2013.
- [34] I Bozic and MA Nowak. Timing and heterogeneity of mutations associated with drug resistance in metastatic cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(45):15964–15968, 2014.
- [35] D Tougeron, T Lecomte, JC Pagès, C Villalva, C Collin, A Ferru, JM Tourani, C Silvain, P Levillain, and L Karayan-Tapon. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 24(5):1267–1273, 2013.
- [36] ER Fearon. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 6:479–507, 2011.
- [37] C Kandoth, MD McLellan, F Vandin, K Ye, B Niu, C Lu, M Xie, Q Zhang, JF McMichael, MA Wyczalkowski, MD Leiserson, CA Miller, JS Welch, MJ Walter, MC Wendl, TJ Ley, RK Wilson, BJ Raphael, and L Ding. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471):333–339, 2013.
- [38] WM Grady and CC Pritchard. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol*, 42(1):124–139, 2014.
- [39] MM Bertagnolli, M Redston, CC Compton, D Niedzwiecki, RJ Mayer, RM Goldberg, TA Colacchio, LB Saltz, and RS Warren. Microsatellite Instability and Loss of Heterozygosity at Chromosomal Location 18q: Prospective Evaluation of Biomarkers for Stages II and III Colon Cancer – A Study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol*, 29(23):3153–3162, 2011.
- [40] M Kansikas, M Kasela, J Kantelinen, and M Nyström. Assessing how reduced expression levels of the mismatch repair genes MLH1, MSH2 and MSH6 affect repair efficiency. *Hum Mutat*, 35(9):1123–1127, 2014.
- [41] AK Rustgi. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21(20):2525–2538, 2007.
- [42] RR Huxley, A Ansary-Moghaddam, P Clifton, S Czernichow, CL Parr, and M Woodward. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*, 125(1):171–180, 2009.

- [43] ER Fearon and B Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):759–767, 1990.
- [44] F Sanger, S Nicklen, and AR Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12):5463–5467, 1977.
- [45] ML Metzker. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Gen*, 11(1):31–46, 2010.
- [46] C Meldrum, MA Doyle, and RW Tothill. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*, 32(4):177–195, 2011.
- [47] JM Rizzo and Michael J Buck. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5(7):887–900, 2012.
- [48] M Jessri and CS Farah. Next generation sequencing and its application in deciphering head and neck cancer. *Oral Oncol*, 50(4):247–253, 2014.
- [49] L Liu, Y Li, S Li, N Hu, Y He, R Pong, D Lin, L Lu, and M Law. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012:251364, 2012.
- [50] S Linnarsson. Recent advances in DNA sequencing methods - general principles of sample preparation. *Exp Cell Res*, 316(8):1339–1343, 2010.
- [51] S Mamlouk, LH Childs, D Aust, D Heim, F Melching, C Oliveira, T Wolf, P Durek, D Schumacher, H Bläker, M von Winterfeld, B Gastl, K Möhr, A Menne, S Zeugner, T Redmer, D Lenze, S Tierling, M Möbs, W Weichert, G Folprecht, E Blanc, D Beule, R Schäfer, M Morkel, F Klauschen, U Leser, and C Sers. DNA copy number changes define spatial patterns of heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun*, 8(14093), 2017.
- [52] F Janku. Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? *Ther Adv Med Oncol*, 6(2):43–51, 2014.
- [53] KD Siegmund, P Marjoram, S Tavaré, and D Shibata. Many colorectal cancers are “flat” clonal expansions. *Cell Cycle*, 8(14):2187–2193, 2009.
- [54] SH Lee, SH Jung, TM Kim, JK Rhee, HC Park, MS Kim, SS Kim, CH An, SH Lee, and Chung YJ. Whole-exome sequencing identified mutational profiles of high-grade colon adenomas. *Oncotarget*, 8(4):6579–6588, 2017.
- [55] MF Müller, AE Ibrahim, and MJ Arends. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469(2):125–134, 2016.

- [56] AG Knudson. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68(4):820–823, 1971.
- [57] DP Lane. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381).
- [58] G Lurje, W Zhang, and HJ Lenz. Molecular prognostic markers in locally advanced colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 6(10):683–690, 2007.
- [59] SJ Baker, AC Preisinger, JM Jessup, C Paraskeva, S Markowitz, JK Willson, S Hamilton, and B Vogelstein. p53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res*, 50(23):7717–7722, 1990.
- [60] P Geng, J Ou, G Xie, J Li, X Zhao, L Xiang, Y Liao, N Wang, and H Liang. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 Gene Polymorphism and Cancer Risk. *Medicine*, 94(44):e0938, 2015.
- [61] JL Taylor, RZ Szmulewitz, T Lotan, J Hickson, DV Griend, SD Yamada, K Macleod, and CW Rinker-Schaeffer. New paradigms for the function of JNKK1/MKK4 in controlling growth of disseminated cancer cells. *Cancer Lett*, 272(1):12–22, 2008.
- [62] DH Teng, WL Perry, JK Hogan, M Baumgard, R Bell, S Berry, T Davis, D Frank, C Frye, T Hattier, R Hu, S Jammulapati, T Janecki, A Leavitt, JT Mitchell, R Pero, D Sexton, M Schroeder, PH Su, B Swedlund, JM Kyriakis, J Avruch, P Bartel, AK Wong, A Oliphant, A Thomas, MH Skolnick, and SV Tavtigian. Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. *Cancer Res*, 57(19):4177–4182, 1997.
- [63] DW Parsons, TL Wang, Y Samuels, A Bardelli, JM Cummins, L DeLong, N Silliman, J Ptak, S Szabo, JK Willson, S Markowitz, KW Kinzler, B Vogelstein, C Lengauer, and VE Velculescu. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature*, 436(7052):792, 2005.
- [64] P Jernvall, MJ Mäkinen, TJ Karttunen, J Mäkelä, and P Vihko. Loss of heterozygosity at 18q21 is indicative of recurrence and therefore poor prognosis in a subset of colorectal cancers. *Br J Cancer*, 79(5-6):903–908, 1999.
- [65] P Yan, D Klingbiel, Z Saridaki, P Ceppia, M Curto, TA McKee, A Roth, S Tejpar, M Delorenzi, FT Bosman, and R Fiocca. Reduced Expression of SMAD4 Is Associated with Poor Survival in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*.
- [66] Y Ma, F Yan, L Li, L Liu, and J Sun. Deletion and down-regulation of SMAD4 gene in colorectal cancers in a Chinese population. *Chin J Cancer Res*, 26(5):525–531, 2014.

- [67] B Zhang, C Leng, C Wu, Z Zhang, L Dou, X Luo, B Zhang, and X Chen. Smad4 sensitizes colorectal cancer to 5-fluorouracil through cell cycle arrest by inhibiting the PI3K/Akt/CDC2/survivin cascade. *Oncol Rep*, 35(3):1807–1815, 2016.
- [68] D Tsafrir, M Bacolod, Z Selvanayagam, I Tsafrir, J Shia, Z Zeng, H Liu, C Krier, RF Stengel, F Barany, WL Gerald, PB Paty, E Domany, and DA Notterman. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66(4):2129–2137, 2006.
- [69] J Camps, M Grade, QT Nguyen, P Hörmann, S Becker, AB Hummon, V Rodriguez, S Chandrasekharappa, Y Chen, MJ Difilippantonio, H Becker, BM Ghadimi, and T Ried. Chromosomal Breakpoints in Primary Colon Cancer Cluster at Sites of Structural Variants in the Genome. *Cancer Res*, 68(5):1284–1295, 2008.
- [70] L Cheng, P Wang, S Yang, Y Yang, Q Zhang, W Zhang, H Xiao, H Gao, and Q Zhang. Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer. *BMC Med Genomics*, 5:14, 2012.
- [71] S Junnila, A Kokkola, ML Karjalainen-Lindsberg, P Puolakkainen, and O Monni. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines. *BMC Cancer*, 10:73, 2010.
- [72] Y Tabach, I Kogan-Sakin, Y Buganim, H Solomon, N Goldfinger, R Hovland, XS Ke, AM Oyan, KH Kalland, V Rotter, and E Domany. Amplification of the 20q chromosomal arm occurs early in tumorigenic transformation and may initiate cancer. *PLoS One*, 6(1), 2011.
- [73] P Daniel, M Wagrowska-Danilewicz, M Danilewicz, O Stasikowska, and E Malecka-Panas. Transforming growth factor beta 1 and metalloproteinase-9 overexpression in colorectal cancer (CC) and adenoma. *Int J Colorectal Dis*, 22(10):1165–1172, 2007.
- [74] Z Lorenc, D Waniczek, K Lorenc-Podgórska, W Krawczyk, M Domagała, M Majewski, and U Mazurek. Profile of Expression of Genes Encoding Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9), Matrix Metalloproteinase 28 (MMP28) and TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP1) in Colorectal Cancer: Assessment of the Role in Diagnosis and Prognostication. *Med Sci Monit*, 23:1305–1311, 2017.
- [75] S Olivari, C Galli, H Alanen, L Ruddock, and M Molinari. A novel stress-induced EDEM Variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem*, 280(4):2424–2428, 2005.

- [76] I Sokołowska, ES Piłka, K Sandvig, G Węgrzyn, and M Słomińska-Wojewódzka. Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells. *BMC Cell Biol*, 16:1, 2015.
- [77] S Olivari and M Molinari. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett*, 581(19):3658–3664, 2007.
- [78] B Zhang, N Sun, X Mu, L Zhi, L Zhai, Y Jiang, Z Fu, and Z Yao. G Protein Alpha S Subunit Promotes Cell Proliferation of Renal Cell Carcinoma with Involvement of Protein Kinase A Signaling. *DNA Cell Biol*, 36(3):237–242, 2017.
- [79] JH Lee, Y Kim, JW Choi, and YS Kim. KRAS, GNAS, and RNF43 mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: a meta-analysis. *SpringerPlus*, 5(1):1172, 2016.
- [80] C Liu, DM McKeone, NI Walker, Bettington ML, BA Leggett, and VL Whitehall. GNAS mutations are present in colorectal traditional serrated adenomas, serrated tubulovillous adenomas and serrated adenocarcinomas with adverse prognostic features. *Histopathology*, 2017.
- [81] H Lee, BM La, I Hwang, YN Kang, IJ Choi, and JH Lee. Absence of GNAS mutation in colorectal carcinogenesis. *Tumori*, 103(2):209–211, 2017.
- [82] SW Han, HP Kim, JY Shin, EG Jeong, WC Lee, KH Lee, JK Won, TY Kim, DY Oh, SA Im, YJ Bang, SY Jeong, KJ Park, JG Park, GH Kang, JS Seo, JI Kim, and TY Kim. Targeted sequencing of cancer-related genes in colorectal cancer using next-generation sequencing. *PloS One*, 8(5):e64271, 2013.
- [83] Y Miyamoto, K Suyama, and H Baba. Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 18(4):e752, 2017.
- [84] C Montagut, A Dalmases, B Bellosillo, M Crespo, S Pairet, M Iglesias, M Salido, M Gallen, S Marsters, SP Tsai, A Minoche, S Seshagiri, S Serrano, H Himmelbauer, J Bellmunt, A Rovira, J Settleman, F Bosch, and J Albanell. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med*, 18(2):221–223, 2012.
- [85] S Misale, R Yaeger, S Hobor, E Scala, M Janakiraman, D Liska, E Valtorta, R Schiavo, M Buscarino, G Siravegna, K Bencardino, A Cercek, CT Chen, S Veronese, C Zanon, A Sartore-Bianchi, M Gambacorta, M Gallicchio, E Vakiani, V Boscaro, E Medico, M Weiser, S Siena, F Di Nicolantonio, D Solit, and A Bardelli. Emergence of KRAS

-
- mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486(7404):532–536, 2012.
- [86] A Italiano, P Follana, FX Caroli, JL Badetti, D Benchimol, G Garnier, J Gugenheim, J Haudebourg, F Keslair, G Lesbats, G Lledo, JF Roussel, F Pedeutour, and E François. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number. *Ann Surg Oncol*, 15(2):649–654, 2008.
- [87] HS Park, MH Jang, EJ Kim, HJ Kim, HJ Lee, YJ Kim, JH Kim, E Kang, SW Kim, IA Kim, and SY Park. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol*, 27(9):1212–1222, 2014.
- [88] L Le Corre, C Vissac-Sabatier, N Chalabi, YJ Bignon, A Daver, A Chassevent, and DJ Bernard-Gallon. Quantitative Analysis of BRCA1, BRCA2 and Hmsh2 mRNA Expression in Colorectal Lieberkühnien Adenocarcinomas and Matched Normal Mucosa: Relationship with Cellular Proliferation. *Anticancer Res*, 25(3B):2009–2016, 2005.
- [89] J Mersch, M Jackson, M Park, D Nebgen, SK Peterson, C Singletary, BK Arun, and JK Litton. Cancers Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations other than Breast and Ovarian. *Cancer*, 121(2):269–275, 2015.
- [90] CM Phelan, J Iqbal, HT Lynch, J Lubinski, J Gronwald, P Moller, P Ghadirian, WD Foulkes, S Armel, A Eisen, SL Neuhausen, L Senter, CF Singer, P Ainsworth, C Kim-Sing, N Tung, M Llacuachaqui, G Chornokur, S Ping, and SA Narod. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*, 110(2):530–534, 2013.
- [91] B Tannenbaum, T Mofunanya, and AR Schoenfeld. DNA damage repair is unaffected by mimicked heterozygous levels of BRCA2 in HT-29 cells. *Int J Biol Sci*, 3(7):402–407, 2007.
- [92] SJ Diaz-Cano. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. *Int J Mol Sci*, 13(2):1951–2011, 2012.
- [93] C Wu, NFCC de Miranda, L Chen, AM Wasik, L Mansouri, W Jurczak, K Galazka, M Dlugosz-Danecka, M Machaczka, H Zhang, R Peng, RD Morin, R Rosenquist, B Sander, and Q Pan-Hammarström. Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations. *Oncotarget*, 7(25):38180–38190.

- [94] SA Watt, KJ Purdie, NY Den Breems, M Dimon, ST Arron, AT McHugh, DJ Xue, JH Dayal, CM Proby, CA Harwood, IM Leigh, and AP South. Novel CARD11 Mutations in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Lead to Aberrant NF- κ B Regulation. *Am J Pathol*, 185(9):2354–2363, 2015.
- [95] JG Lohr, P Stojanov, MS Lawrence, D Auclair, B Chapuy, C Sougnez, P Cruz-Gordillo, B Knoechel, YW Asmann, SL Slager, AJ Novak, A Dogan, SM Ansell, BK Link, L Zou, J Gould, G Saksena, N Stransky, C Rangel-Escareño, JC Fernandez-Lopez, A Hidalgo-Miranda, J Melendez-Zajgla, E Hernández-Lemus, A Schwarz-Cruz y Celis, I Imaz-Rosshandler, AI Ojesina, J Jung, CS Pedamallu, ES Lander, TM Habermann, JR Cerhan, MA Shipp, G Getz, and TR Golub. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(10):3879–3884, 2012.
- [96] C Prévostel, C Rammah-Bouazza, H Trauchessec, L Canterel-Thouennon, M Busson, M Ychou, and P Blache. SOX9 is an atypical intestinal tumor suppressor controlling the oncogenic Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget*, 7(50):82228–82243, 2016.
- [97] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407):330–337, 2012.
- [98] BM Javier, R Yaeger, L Wang, F Sanchez-Vega, A Zehir, S Middha, J Sadowska, E Vakiani, J Shia, D Klimstra, M Ladanyi, CA Iacobuzio-Donahue, and JF Hechtman. Recurrent, truncating SOX9 mutations are associated with SOX9 overexpression, KRAS mutation, and TP53 wild type status in colorectal carcinoma. *Oncotarget*, 7(32):50875–50882, 2016.
- [99] F Hlubek, S Pfeiffer, J Budczies, S Spaderna, A Jung, T Kirchner, and T Brabletz. Securin (hPPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma. *Br J Cancer*, 94(11):1672–1677, 2006.
- [100] A Jung, M Schrauder, U Oswald, C Knoll, P Sellberg, R Palmqvist, G Niedobitek, T Brabletz, and T Kirchner. The Invasion Front of Human Colorectal Adenocarcinomas Shows Co-Localization of Nuclear β -Catenin, Cyclin D1, and p16INK4A and Is a Region of Low Proliferation. *Am J Pathol*, 159(5):1613–1617, 2001.
- [101] NC Bennett and CS Farah. Next-Generation Sequencing in Clinical Oncology: Next Steps Towards Clinical Validation. *Cancers (Basel)*, 6(4):2296–2312, 2014.
- [102] I Scheinin, D Sie, H Bengtsson, MA Van de Wiel, AB Olshen, HF Van Thuijl, HF Van Essen, PP Eijk, F Rustenburg, GA Meijer, JC Reijneveld, P Wesseling, D Pinkel, DG Albertson, and B Ylstra. DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed

- specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly. *Genome Res*, 24(12):2022–2032, 2014.
- [103] H Jang, Y Hur, and H Lee. Identification of cancer-driver genes in focal genomic alterations from whole genome sequencing data. *Sci Rep*, 6:25582, 2016.
- [104] S Derveau, J Vandesompele, and J Hellemans. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4):227–230, 2010.
- [105] KJ Livak and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 25(4):402–408, 2001.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Friederike Wätzoldt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *Tumorheterogenität am Beispiel des Kolonkarzinoms* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 9. Januar 2020

Unterschrift der Doktorandin

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Friederike Wätzoldt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: S Mamlouk, LH Childs, D Aust, D Heim, F Melching, C Oliveira, T Wolf, P Durek, D Schumacher, H Bläker, M von Winterfeld, B Gastl, K Möhr, A Menne, S Zeugner, T Redmer, D Lenze, S Tierling, M Möbs, W Weichert, G Folprecht, E Blanc, D Beule, R Schäfer, M Morkel, F Klauschen, U Leser, and C Sers. DNA copy number changes define spatial patterns of heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun*, 2017.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Versuche und Datenerfassung über intratumorale Heterogenität; die Auswertung der Datenerfassung wurde in dem oben genannten Paper veröffentlicht und ist ebenfalls Bestandteil des Ergebnisteils dieser Arbeit.

Berlin, den 9. Januar 2020

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

S Mamlouk, LH Childs, D Aust, D Heim, F Melching, C Oliveira, T Wolf, P Durek, D Schumacher, H Bläker, M von Winterfeld, B Gastl, K Möhr, A Menne, S Zeugner, T Redmer, D Lenze, S Tierling, M Möbs, W Weichert, G Folprecht, E Blanc, D Beule, R Schäfer, M Morkel, F Klauschen, U Leser, and C Sers. DNA copy number changes define spatial patterns of heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun*, 8(14093), 2017.

Danksagung

Ich bedanke mich für die umfassende Unterstützung durch die AG Molekulare Tumorphologie. Besonders möchte ich mich für die fachliche Betreuung von Prof. Dr. Christine Sers und Dr. Soulafa Mamlouk bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem Kerstin Wanke-Möhr für die kompetente Anleitung in Tätigkeiten im Labor und die Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen sowie Andrea Menne und Stephanie Mende für die Unterstützung bei der Durchführung der FISH. Ich danke außerdem meiner Familie für ihren Rückhalt in den letzten Jahren.