

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

DISSERTATION

**Problemlösungen der Mutationsanalytik von Formalin
fixierten Gewebe in der Routinediagnostik**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Martin, geb. Büttner

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung	4
1.1. Die Bedeutung der Molekularpathologie in der personalisierten Medizin.....	4
1.2. Einfluss der Probenqualität und – quantität auf die molekularpathologische Routinediagnostik	5
1.3. Ziel der Arbeit	6
2. Material und Methodik	7
2.1. Material	7
2.1.1. Patientenkollektiv für <i>KRAS</i> -Mutationsanalysen	7
2.1.2. Patientenkollektiv für <i>EGFR</i> -Mutationsanalysen	7
2.2. Methoden.....	7
2.2.1. Sanger-Sequenzierung.....	7
2.2.2. NGS	9
3. Ergebnisse	10
3.1. Einfluss von muzinösem und nekrotischem Gewebe in Kolorektalkarzinom-Proben auf die <i>KRAS</i> -Mutationsanalyse.....	10
3.2. Intratumorale morphologische Heterogenität in Kolorektalkarzinomen kann ein Indikator für genetische Heterogenität sein	11
3.3. Klinische Relevanz von seltenen und Doppel-Mutationen des <i>EGFR</i> -Gens bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs.....	12
4. Diskussion	13
5. Literatur	16
Anlage: <i>EGFR</i>-Fragebogen	21
Eidesstaatliche Erklärung	22
Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen	23
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	24
Lebenslauf	49
Publikationsliste	51
Danksagung	52

Zusammenfassung

Der Fortschritt der personalisierten Medizin stellt besonders die Molekularpathologie vor immer größere Herausforderungen, denn mit steigender Anzahl an Biomarker-spezifischen Therapien erhöht sich auch die Anzahl an Mutationsanalysen. Primäres Ziel dieser Arbeit war es daher Problemlösungen für die Mutationsanalytik im Rahmen der Routinediagnostik zu finden. Wir untersuchten in dieser Studie drei verschiedene Probleme: i) den Einfluss von Mucin und Nekrose auf den Nachweis von möglichen Mutationen, ii) ob heterogene morphologische Pattern auch eine genetische Heterogenität aufweisen und iii) die klinische Relevanz seltener *EGFR*- (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) Mutationen.

Zum ersten angesprochenen Thema konnten wir beweisen, dass ein hoher Anteil muzinöser und nekrotischer Tumorareale im Untersuchungsmaterial keinen Einfluss auf das Ergebnis der Mutationsanalytik hat. Dabei ist es besonders nennenswert, dass in den stark muzinösen Tumorproben, trotz Vorhandensein von nur sehr wenigen Tumorzellen, die bereits bekannte Mutation mit zwei verschiedenen Methoden, der Sanger-Sequenzierung und dem Next Generation Sequencing (NGS) nachgewiesen werden konnte. Zum zweiten erwähnten Punkt haben wir zeigen können, dass eine intratumorale genetische Heterogenität sowohl in morphologisch heterogenen als auch in morphologisch homogenen Kolorektalkarzinomen (CRC) vorkommt. Dennoch wiesen zwei morphologisch heterogene CRCs in den unabhängig voneinander untersuchten Arealen ein jeweils unterschiedliches Genprofil auf. Die sich daraus ergebene klinische Relevanz führt dazu, dass morphologisch unterschiedliche Areale innerhalb eines CRC unabhängig voneinander untersucht werden sollten.

In der dritten Studie wurde die klinische Relevanz von seltenen *EGFR*-Mutationen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer seltenen *EGFR*-Mutation nicht auf die Therapie mit First-Generation TKI (Tyrosinkinaseinhibitor) ansprechen, mit Ausnahme eines Patienten mit der Mutation p.G874D. Patienten mit Doppelmutationen, bestehend aus einer seltenen und einer aktivierenden *EGFR*-Mutation, haben dagegen auf die Behandlung mit First- oder Second-Generation TKI angesprochen. Zusätzliche Literatur- und Datenbankrecherche zeigten, dass bisher nur wenige Daten zu klinischen Verläufen von Patienten mit seltenen *EGFR*-Mutationen vorliegen.

Zusammengefasst konnten die durchgeführten Untersuchungen drei wesentliche Ergebnisse für die Routinediagnostik und die klinische Relevanz herausarbeiten. Proben mit einem hohen Anteil an Mucin oder Nekrose eignen sich durchaus für weitere molekulare Untersuchungen, morphologisch heterogene Tumore sollten entsprechend der morphologischen Pattern getrennt voneinander untersucht werden und letztlich scheinen Patienten mit seltenen Mutationen eine schlechtere Prognose zu haben, als Patienten mit häufigen Mutationen oder einer Kombination aus beiden, wobei hierzu nur wenige klinische Daten vorliegen und weitere Studien zur Klärung dieser Situation nötig sind.

Abstract

The progress of personalized medicine poses a big challenge to molecular pathology, as the number of biomarker-based targeted therapies is growing rapidly with a concomitant increase in the number of mutational analyses. To that end, the primary goal of this study was to discover solutions for problems that occur during the detection of mutations in routine diagnostics. We investigated in this study three different issues: i) the influence of mucin and necrosis on mutational analysis, ii) whether the heterogeneous morphological pattern possesses genetic heterogeneity and iii) the clinical relevance of rare *EGFR*- (epidermal growth factor receptor) mutations.

Regarding the first topic mentioned above, we established that high proportions of mucin or necrosis in tumor samples have no influence on the detection of mutations. Moreover, we demonstrated that purely mucinous tumor samples still contain enough tumor cells to detect the known mutation with two different methods: Sanger sequencing and next generation sequencing (NGS).

Concerning the second stated challenge, we detected that intratumoral genetic heterogeneity is present in all colorectal cancer (CRC) samples, independent of both homogeneous and heterogeneous morphology. Moreover, in two samples with morphological heterogeneity, each identifiable tumor component showed a different genetic profile. This proven clinical relevance provides strong support for an individual analysis of each morphologically identifiable tumor component in CRC tumor samples.

In the third study, we investigated the clinical relevance of rare *EGFR* mutations. We demonstrated that patients with a single, rare *EGFR* mutation did not respond to first generation TKI (tyrosine kinase inhibitor) therapy, except for one patient harboring the mutation p.G874D. In contrast, patients with a compound mutation, consisting of a rare and sensitizing mutation, responded to the therapy with first or second generation TKI. Additional literature and database searches revealed that available data about the clinical course of patients with a rare *EGFR* mutation remains limited.

Overall, the investigations that were carried out, led to three essential results pertaining to both routine diagnostics and to the clinical relevance. Tumor samples with high proportions of mucin or necrosis were found to be suitable for molecular analyses, while in heterogeneous morphological tumor samples, it was established that each morphological pattern should be analyzed separately. Additionally, patients with rare mutations seem to have a worse prognosis compared to patients with common or compound mutations, although too little clinical data were available and additional studies are necessary to resolve this situation.

Abkürzungsverzeichnis

AF	Allelfrequenz
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
bp	base pairs / Basenpaare
CD20	Cluster of differentiation 20 / B-Lymphozytenantigen
CD30	Cluster of differentiation 30 / TNF-Rezeptor 8
CIVIC	Clinical Interpretations of Variants in Cancer
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CRC	Colorectal carcinoma / Kolorektalkarzinom
DNA	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DoCM	Database of Curated Mutations
EGFR	Epidermal growth factor receptor / epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
H&E	Hämatoxylin & Eosin
KRAS	Kirsten-Rat Sarcoma
NGS	Next Generation Sequencing
NRAS	Neuroblastoma-Ras
NSCLC	Non-small cell lung cancer / nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
PCR	Polymerase-chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor / Tyrosinkinase-Hemmer

1. Einführung

1.1. Die Bedeutung der Molekularpathologie in der personalisierten Medizin

Die personalisierte Medizin hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen. Dabei besteht das Grundprinzip darin, die Tumoren tiefer zu charakterisieren, indem spezielle Charakteristika auf Protein- oder molekularer Ebene identifiziert werden, die eine spezifische Therapie ermöglichen [1-5]. Es werden also sogenannte Biomarker eruiert, die bezogen auf die Pathologie immunhistologisch oder molekular nachgewiesen werden können. Beispiele hierfür sind auf Proteinebene PD-L1 (Programmed cell death ligand 1), CD20 (B-Lymphozytenantigen), CD30 (TNF-Rezeptor 8) u.a., molekulare Biomarker sind z.B. der Mutationsstatus in den *EGFR*- (epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder *KRAS*- (Kirsten-Rat Sarcoma) Genen. Ein idealer Biomarker gibt dabei Auskunft darüber, ob personalisierte Medikamente bei der Behandlung bestimmter Tumoren erfolgsversprechend sind.

Inzwischen gibt es eine große Anzahl an personalisierten Arzneimitteln. Eines der ersten Beispiele für sogenannte personalisierte Wirkstoffe sind Cetuximab oder Panitumumab. Beide Wirkstoffe sind monoklonale Antikörper gegen *EGFR* und werden seit 2008 bei Patienten mit fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom (CRC) und einem nachgewiesenen Wildtyp des *KRAS*-Gens eingesetzt. Dennoch haben Patienten mit einer Wildtyp-Sequenz des *KRAS*-Gens nicht gleich gut auf diese Medikation angesprochen. Offenbar reicht es nicht aus, nur ein Gen zu analysieren, um eine Vorhersage zum Ansprechen auf die Antikörper-basierende Therapie treffen zu können. Es war zunächst bekannt, dass 40% aller Patienten mit CRC eine Mutation im *KRAS*-Gen im Condon 12 oder 13 des Exons 2 aufweisen [6-10]. Im Laufe der Jahre wurde nachgewiesen, dass bei weiteren 5% eine Mutation im *NRAS*- (Neuroblastoma) Gen des Exons 2, 3 oder 4 und *KRAS*-Gen des Exons 3 und 4 vorhanden sein können. Bei weiteren 5-10% der Patienten mit CRC wurde zudem eine Mutation im *BRAF*- (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1-Gens) Gen beschrieben [11-17]. Somit schließt nicht nur eine Mutation im Exon 2 des *KRAS*-Gens, sondern jede weitere der genannten Mutationen ebenfalls das positive Ansprechen auf die Anti-*EGFR*-Therapie aus. Diese Entwicklung zeigt die Notwendigkeit diverse Gene auf Mutationen zu untersuchen, um die Zuverlässigkeit von Biomarkern zu verbessern.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Tumore ihr genetisches Profil während der Therapie im Sinne von Resistenzmutationen ändern können [18-20]. Auch eine mögliche genetische Heterogenität des Tumors stellt den behandelten Onkologen vor neue Herausforderungen. Zum einen kann das Genprofil des Primärtumors vom Genprofil der dazugehörigen Metastasen abweichen (intertumorale Heterogenität) und zum anderen kann der Primärtumor verschiedene genetische Subklone aufweisen (intratumorale Heterogenität). Es stellen sich daher in der Routinediagnostik unter anderem die Fragen:

- Gibt es morphologische Hinweise auf eine möglich vorhandene genetische Heterogenität?
- Haben seltene Mutationen eine klinische Bedeutung?

Da die Anzahl an molekularpathologischen Untersuchungen jährlich ansteigt und sich die Anforderungen an die molekularpathologische Routinediagnostik erhöhen, müssen die verwendeten Methoden valide sein, um dem behandelnden Arzt die für die Therapie relevanten Ergebnisse liefern zu können.

1.2. Einfluss der Probenqualität und – quantität auf die molekularpathologische Routinediagnostik

Um valide Ergebnisse zu erhalten, muss neben der Nachweismethode vor allem auch das Ausgangsmaterial eine hohe Qualität aufweisen. Für die molekularpathologischen Untersuchungen stellt die Desoxyribonukleinsäure (DNA) das Ausgangsmaterial dar, die zunächst aus den Tumorzellen gewonnen werden muss. In der Pathologie ist in den meisten Fällen formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe die Basis des Untersuchungsmaterials. Die Fixierung des Gewebes in 4%iger Formalinlösung, anschließendem Entwässern und Einbetten in Paraffin muss erfolgen, um die Gewebeproben haltbar zu machen. Bei dieser Fixierungsmethode hat jedoch vor allem die Einwirkdauer der Formalinlösung auf die Proben einen erheblichen Einfluss auf die DNA-Qualität [21-24]. Eine adäquate Fixierung des Gewebes ist für die konventionell-histologischen und immunhistologischen Untersuchungen unerlässlich, führt aber zu Desaminierung, Fragmentierung und Methylierung der DNA. Dies wiederum erschwert die molekularen Untersuchungen, denn durch starke Fragmentierung können nur kurze Genabschnitte bis maximal 350 Basenpaare (bp) sicher sequenziert werden.

Hinzu kommt, dass eine Probe mit nur sehr wenigen Tumorzellen, also mit geringer Tumor-DNA-Quantität ebenfalls eine valide Analyse unmöglich machen kann. Eine Mindest-Menge an Tumor-DNA ist notwendig, um eine mögliche Mutation sicher nachweisen zu können. Bei einer Biopsie wird beispielsweise nur wenig Material aus dem Körper entnommen und diese kann somit zu wenige Tumorzellen für den Mutationsnachweis enthalten. Außerdem besteht die Problematik, dass ein hoher Anteil an nicht-neoplastischer DNA im Verhältnis zur vorhandenen Tumor-DNA eine mögliche vorhandene Mutation stark verdünnen kann. Eine manuelle Mikrodissektion von möglichst vielen neoplastischen Zellen und möglichst wenigen nicht-neoplastischen Zellen ist für eine zuverlässige Analyse daher unabdingbar.

Weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Anzahl der Tumorzellen in einer Probe haben, sind die Morphologie des Tumors (z.B. weist ein muzinöser Tumor nur wenige Tumorzellen auf und ist von reichlich Schleim umgeben) oder Nekrosen (z.B. bedingt durch vorheriger

Chemo- oder Radio-Therapie). Es stellt sich daher die Frage, ob ein stark muzinöser oder ein stark nekrotischer Tumor ausreichend Tumor-DNA für eine valide Analyse enthält.

Der Gold-Standard für den Nachweis von möglichen Mutationen in den Tumorzellen war früher die Sequenzierung von PCR- (Polymerasekettenreaktion) Produkten nach Sanger. Inzwischen wurde die Sanger-Sequenzierung in den vielen Routine-Laboren durch NGS (Next Generation Sequencing) abgelöst. NGS ist deutlich empfindlicher als die Sanger-Sequenzierung und analysiert in der gleichen Zeit eine deutlich höhere Anzahl an potenziellen Genen auf klinisch relevante Mutationen. NGS wurde daher auch am Institut für Pathologie der Charité im Jahre 2014 eingeführt und ist die heutige Standardmethode für die Mutationsanalytik in der Routinediagnostik.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, für einige regelmäßig auftretende Probleme in der Routinediagnostik der Molekularpathologie Lösungen zu finden. Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- Kann man an Proben mit nur geringem Tumorzellgehalt eine valide Analyse durchführen? Haben in diesem Zusammenhang das Vorhandensein von viel Schleim (Mucin) oder nekrotischem Material einen Einfluss auf die Diagnostik? Bieten dabei Sanger-Sequenzierung und NGS gleich gute Ergebnisse?
- Spiegelt sich eine genetische Heterogenität des Tumors möglicherweise in der Morphologie wider?
- Welche klinische Relevanz haben bislang unbekannte oder seltene Mutationen? Können auch Patienten mit seltenen, klinisch bisher unbekanntem Mutationen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) von einer personalisierten Therapie profitieren?

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Patientenkollektiv für *KRAS*-Mutationsanalysen

Bei den durchgeführten *KRAS*-Mutationsanalysen wurde auf Probenmaterial von bereits untersuchten Patienten zurückgegriffen. Die Proben wurden im Rahmen der Routinediagnostik untersucht und es wurde bereits eine *KRAS*-Mutation im Exon 2 nachgewiesen. Die Untersuchung wurde im Rahmen der retrospektiven Studien teilweise wiederholt (siehe 3.1 und 3.2).

2.1.2. Patientenkollektiv für *EGFR*-Mutationsanalysen

Auch hier wurde Probenmaterial von bereits im Rahmen der Routinediagnostik untersuchten Patienten verwendet. Die Ergebnisse wurden bei diesem Probenkollektiv jedoch nicht erneut untersucht, da im Rahmen der bearbeiteten Fragestellung der klinische Verlauf der Patienten von Interesse war. Es wurden alle Proben, die am Institut für Pathologie der Charité im Zeitraum von Juni 2010 bis Juni 2017 auf Mutationen im *EGFR*-Gen untersucht wurden, auf seltene Mutationen im *EGFR*-Gen gescreent. Diese stellten im Anschluss das Probenkollektiv für die retrospektive Studie dar (siehe 3.3). Für die Gewinnung der für uns relevanten klinischen Daten haben wir den Klinikern einen Fragebogen übersandt, welcher als Anlage in dieser Arbeit aufgeführt ist.

2.2. Methoden

2.2.1. Sanger-Sequenzierung

2.2.1.1. Mikrodissektion der Tumorzellen

Die manuelle Mikrodissektion erfolgte an 3µm FFPE-Schnitten. Die Anzahl der verwendeten Schnitte variierte von 2 bis 12, in Abhängigkeit der Menge der Tumorzellen und der Größe des Areal, das im Rahmen der Mikrodissektion präpariert wurde. Dabei wurde das betreffende Areal vorab auf einem frisch erstellten HE- (Hämatoxylin & Eosin) Schnitt von einem Pathologen markiert.

2.2.1.2. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Standard-Protokoll. Das Elutionsvolumen betrug 50-100µl, ebenfalls in Abhängigkeit von der Größe des präparierten Areal, um eine mögliche hohe DNA-Menge in der Probe zu konzentrieren. Die DNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop™ Spectrophometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

2.2.1.3. PCR

Im Rahmen der durchgeführten Studien wurden folgende Exone untersucht: *KRAS* Exon 2, *EGFR* Exon 18, *EGFR* Exon 19 und *EGFR* Exon 21. Dafür wurden die nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführten Primer verwendet (wobei der *KRAS*-Forward-Primer einen T7-Universalprimer enthält):

Tabelle 1: Primersequenzen für die Generierung der PCR-Produkte

Gene	5' Forward 3'	5' Reverse 3'
<i>KRAS</i> Exon 2	GCGTAATACGACTCACTATAAGGC CTGCTGAAAATGACT	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA
<i>EGFR</i> Exon 18	GCTGAGGTGACCCTTGTCTC	ACAGCTTGCAAGGACTCTGG
<i>EGFR</i> Exon 19	ATGTGGCACCATCTCACAAATTGCC	CCACACAGCAAAGCAGAAACTCAC
<i>EGFR</i> Exon 21	GCAGAGCTTCTCCCATGATGA	GCTGACCTAAAGCCACCTCCT

Für jede PCR-Reaktion wurden 2,5µg DNA eingesetzt und die PCR wie folgt durchgeführt: Initiale Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C, anschließend 40 Zyklen á 1 Minute Annealing bei 60°C, Elongation für 1 Minute bei 72°C und Denaturierung für 1 Minute bei 94°C. Im Anschluss erfolgte ein finaler Elongationsschritt für 7 Minuten bei 72°C.

2.2.1.4. Aufbereitung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit dem MSB® Spin PCRapace (Strattec) oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und anschließend auf einem 3,3% Agarose-Gel aufgetragen. In Abhängigkeit der Bandenstärke auf dem Agarosegel wurden für die anschließende PCR-Reaktion für die Sequenzierung nach Sanger (siehe 2.2.1.5) 0.5µl – 5.0µl des PCR-Produkts eingesetzt.

2.2.1.5. Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierreaktion wurden bis auf den *KRAS*-Forward-Primer die gleichen Primer verwendet wie in Tabelle 1 angegeben. Die Sequenz des *KRAS*-Forward-Primers für die Sequenzierreaktion lautet: *KRAS*-F: 5'-GCGCGTAATACGACTCACTATA-3'.

Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt für alle PCR-Produkte identisch durchgeführt: Initiale Denaturierung für 1 Minute bei 96°C, 35 Zyklen á 10 Sekunden Denaturierung bei 96°C, 2 Minuten Annealing und Elongation bei 60°C. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der Proben mittels Alkohol / Natriumacetat-Präzipitation. Die Sequenzierung wurde mit dem ABI PRISM® 3100 AVANT Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Qualitätskontrolle der Sequenzdaten mit der Software Sequencing Analysis V5.1.1 (Applied Biosystems). Danach wurden sie mit SeqScape v2.1.1 oder v2.6 (Applied Biosystems) auf mögliche Mutationen analysiert.

2.2.2. NGS

2.2.2.1. Mikrodissektion der Tumorzellen

Die Mikrodissektion für die NGS-Analysen erfolgte wie für die Sanger-Sequenzierung bereits unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.2.2. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung für NGS wurde mit dem Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega) mit dem Maxwell 16 System Instrument nach Standard-Protokoll durchgeführt. Es wurde dabei, abhängig von der Größe des präparierten Proben-Areals, in 30-50µl eluiert und die DNA-Konzentration anschließend mit dem Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™) mit Hilfe des Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) bestimmt.

2.2.2.3. Sequenzierung mit NGS

Für die massive Parallelsequenzierung wurde das Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Panel Version 2 (Life Technologies) verwendet. Mit Hilfe dieses Panels können 22 Gene parallel untersucht werden. Für die Erstellung der Genbibliothek (Library) wurden 10ng DNA je Probe verwendet. Barcoding sowie Adapter-Ligation erfolgten laut Vorgaben des Herstellers. Die Genbibliothek wurde anschließend mit Hilfe der AmPureXPBeads (Beckmann Coulter™ Genomics) aufgereinigt und die Konzentration mit dem Ion Library TaqMan® Quantification Kit (Life Technologies) bestimmt. Die Genbibliothek wurde auf 35pM verdünnt und mit den Ion Sphere™ Partikeln auf dem IonChef Instrument (Life Technologies) klonal amplifiziert. Im Anschluss wurden die Proben auf einen Ion 316 Chip geladen und mit dem Ion Torrent™ PGM Sequencer (Life Technologies) sequenziert.

Die Auswertung der generierten Sequenzen erfolgte mit der Torrent Suite Software v3.6.2 (Life Technologies) und SequencePilot Software v4.2 (JSI medical systems).

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von muzinösem und nekrotischem Gewebe in Kolorektalkarzinom-Proben auf die *KRAS*-Mutationsanalyse

Büttner J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Dietel M and Jöhrens K. Influence of mucinous and necrotic tissue in colorectal cancer samples on *KRAS* mutation analysis. 2017 Jun;213(6):606-611

Bei 10-15% aller Kolorektalkarzinome handelt es sich um muzinöse Adenokarzinome [25]. Diese Gruppe von Karzinomen weisen neben wenigen Tumorzellen einen besonders hohen Anteil an Schleim auf. Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, ob die geringe Anzahl an Tumorzellen in muzinösen CRC ausreichend für eine valide Mutationsanalyse ist. Auch enthalten Tumorproben nach vorheriger Chemotherapie häufig einen hohen Anteil an Nekrose. Es galt hier zu klären, ob die Zellfragmente einen Einfluss auf die *KRAS*-Analyse haben. Dafür wurden jeweils 10 muzinöse CRC-Proben und 10 stark nekrotische CRC-Proben mit einer bereits bekannten *KRAS*-Mutation nachuntersucht. Während der Routinediagnostik wurden bei der Mikrodissektion Areale mit möglichst vielen vitalen Tumorzellen präpariert. Bei der Re-Evaluierung wurden stattdessen vorzugsweise Areale mit viel Mucin, beziehungsweise viel Nekrose und nur wenigen vitalen Tumorzellen für die Mikrodissektion verwendet. Alle 20 Proben wurden sowohl mittels Sanger als auch mittels NGS sequenziert. Wir konnten bei 18 von 20 Proben die *KRAS*-Mutation, die im Rahmen der Routinediagnostik evaluiert wurde, mit beiden Methoden auch in den Bereichen mit nur wenigen vitalen Tumorzellen nachweisen. Bei einer Probe wurde im Rahmen der Routinediagnostik eine andere *KRAS*-Mutation nachgewiesen, als in der Nachuntersuchung des besonders muzinreichen Areals. Eine Wiederholung beider untersuchten Areale der Probe bestätigte zwei unterschiedliche Mutationen innerhalb des Tumors. Bei einer weiteren Probe war es uns mit der Sanger-Sequenzierung nicht mehr möglich die Mutation nachzuweisen. In der Tiefe eines FFPE-Gewebeblocks kann der Tumorzellgehalt abnehmen und mit jedem angefertigten Schnitt für weitere Untersuchungen der Anteil an Tumorzellen in der Probe sinken. Für die zweite Re-Evaluierung mit Sanger-Sequenzierung waren somit keine vitalen Tumorzellen mehr in den verwendeten FFPE-Schnitten vorhanden.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse unserer Studie, dass muzinöse oder stark nekrotische Areale für eine valide Mutationsanalyse nicht gemieden werden müssen. Auch in diesen Proben kann eine mögliche vorhandene Mutation sicher nachgewiesen werden. Dabei lieferten beide verwendete Methoden, Sanger-Sequenzierung und NGS, gleich gute Ergebnisse. Allerdings muss beachtet werden, dass bei Proben mit nur sehr wenigen Tumorzellen die Anzahl der zu verwendeten FFPE-Schnitte für die Mikrodissektion erhöht und das Volumen, in dem die DNA eluiert wird, verringert werden sollte, um die DNA-Menge für die anschließende Analyse bestmöglich zu konzentrieren.

3.2. Intratumorale morphologische Heterogenität in Kolorektalkarzinomen kann ein Indikator für genetische Heterogenität sein

Büttner J, Jöhrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W and Lehmann A. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. Exp Mol Pathol. 2018 Feb;104(1):76-81

Die Tatsache, dass ein Primärtumor und deren Fernmetastase ein unterschiedliches Genprofil aufweisen können, ist hinlänglich bekannt [18, 26-29]. Mit der Beschreibung des „Big Bang Models“ wurde deutlich, dass bei CRCs auch innerhalb des Primärtumors verschiedene genetische Subklone existieren können [30-32]. Ziel unserer Studie war es daher zu überprüfen, ob bei CRCs eine heterogene Morphologie ein Hinweis für eine mögliche intratumorale genetische Heterogenität sein könnte. 20-25% der CRC oder deren Fernmetastasen weisen mehrere morphologisch unterschiedliche Subtypen auf [33-34]. Wir untersuchten im Rahmen dieser Studie 13 CRCs mit einem homogenen morphologischen Subtyp und 6 CRCs mit zwei unterschiedlichen histologischen Wachstumsmustern. Bei den Tumoren mit heterogener Morphologie wurde für beide vorhandenen Wachstumsmuster jeweils eine Probe separat voneinander untersucht. Bei den 13 Proben mit nur einem histologischen Subtyp wurde entsprechend nur eine Probe je Tumor für die Analyse verwendet. Um eine Aussage bezüglich einer möglichen intratumoralen genetischen Heterogenität bei morphologisch homogenen Proben machen zu können, haben wir uns auf Proben beschränkt, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik bereits zwei Mutationen nachgewiesen wurden. Wenn beide Mutationen im selben Exon eines Gens vorhanden waren und beide Mutationen mit NGS in denselben Reads nachgewiesen wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Mutationen in einem Subklon koexistieren. Schwieriger ist es, wenn beide Mutationen in unterschiedlichen Genen vorhanden sind. Dann kann man lediglich deren Allelfrequenz (AF) miteinander vergleichen. Weichen diese stark voneinander ab, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer genetischen Heterogenität ausgehen [35]. Bei 9 der 13 Proben mit homogenem morphologischem Wachstumsmuster waren somit höchstwahrscheinlich mehr als ein genetischer Subklon vorhanden. Bei den 6 Proben mit heterogener Morphologie konnte in 2 der 6 untersuchten Proben in den unabhängig voneinander untersuchten Arealen ein unterschiedliches Genprofil nachgewiesen werden. Intratumorale genetische Heterogenität kommt also sowohl in CRC mit homogener als auch mit heterogener Morphologie vor. Da aber bei morphologisch heterogenen CRC nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass in den Arealen mit unterschiedlich histologischem Wachstumsmuster ein unterschiedliches Genprofil vorhanden ist, sollten alle Areale unabhängig voneinander untersucht werden, um eine primäre Resistenz gegenüber einer Anti-EGFR-Therapie auszuschließen.

3.3. Klinische Relevanz von seltenen und Doppel-Mutationen des *EGFR*-Gens bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs.

Martin J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Grohé C, Tessmer A, Gottschalk J, Schmidt B, Pau HW, Witt C, Moegling S, Kromminga R and Jöhrens K. [Clinical impact of rare and compound mutations of epidermal growth factor receptor in patients with non-small cell lung cancer](#), Clin Lung Cancer. 2019 Sep;20(5):350-362.e4.

Ein Therapieansatz für Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und einer nachgewiesenen aktivierenden Mutation im *EGFR*-Gen ist die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI). Leider weisen nur 10-15% der NSCLC in der europäischen Bevölkerung solch eine Mutation auf. Deletionen im Exon 19 sowie die Punktmutation p.L858R im Exon 21 stellen die beiden häufigsten vorkommenden aktivierenden Mutationen im *EGFR*-Gen dar [36-40]. Für einige seltene Mutationen, wie beispielsweise die Punktmutation p.G719X im Exon 18 oder p.L861Q im Exon 21 ist bekannt, dass diese ebenfalls auf eine TKI-Therapie mit Erlotinib oder Gefitinib ansprechen [41-44]. Inzwischen sind bereits Second- and Third-Generation TKI auf dem Markt. Besonders Osimertinib, ein Third-Generation TKI, ist hier von Bedeutung, da dieses Medikament vorrangig bei Patienten, mit der immer häufiger vorkommenden Resistenz-Mutation p.T790M im Exon 20, zum Einsatz kommt [45-46].

In unserer Studie wurden 2906 Proben auf eine mögliche Mutation im *EGFR*-Gen im Zeitraum von 06/2010 bis 06/2017 im Rahmen der Routine-Diagnostik untersucht. In 408 Proben (14%) konnte eine Mutation nachgewiesen werden, wovon 41 Patienten eine seltene Mutation und 22 Patienten zwei unterschiedliche Mutationen im *EGFR*-Gen aufwiesen. Insgesamt konnten wir 56 verschiedene, seltene Mutationen bei diesen 63 Patienten nachweisen. Im Rahmen der Studie erhielten wir für 37 Patienten eine Rückmeldung bezüglich des anschließenden klinischen Verlaufs. Von diesen 37 Patienten wurden 16 Patienten mit TKI behandelt. Ein Patient mit der seltenen *EGFR*-Mutation p.G874D sprach in unserer Studie auf die TKI-Behandlung an. Alle anderen Patienten konnten von der zielgerichteten Behandlung nicht profitieren. Die Patienten mit zwei Mutationen (bestehend aus einer seltenen und einer aktivierenden *EGFR*-Mutation) sprachen dagegen alle positiv auf die TKI-Therapie an. Des Weiteren konnten wir im Rahmen unserer Studie durch eine umfangreiche Literaturrecherche nachweisen, dass Daten über den klinischen Verlauf nach einer TKI-Therapie bei Patienten mit einer seltenen *EGFR*-Mutation immer noch zu wenig publiziert werden und nur vier, der in unserer Studie detektierten seltenen *EGFR*-Mutationen, vermehrt auf eine Therapie mit First- oder Second-Generation TKI innerhalb anderer Studien angesprochen haben.

4. Diskussion

Die Anzahl der Untersuchungen auf mögliche Mutationen hat sich auch in der Routinediagnostik der Molekularpathologie am Institut für Pathologie der Charité in den letzten Jahren stark erhöht und steigt weiter stetig an. Grund dafür ist, dass die Analyse immer mehr tumorrelevanter Gene Voraussetzung für eine zielgerichtete Therapie in der Onkologie ist.

Die verwendete Nachweismethode im Rahmen der molekularpathologischen Routinediagnostik der Charité war bis Ende 2014 die Sequenzierung nach Sanger. Die Methode wurde durch NGS mit dem Ion Torrent-System ersetzt. Die Sanger-Sequenzierung war für die Analysen von wenigen Proben und vor allem von wenigen Genen einer Probe ideal und damals der „Gold-Standard“ für Genanalysen [47-48]. Mit NGS können jedoch in einer einzigen Untersuchung viele Gene gleichzeitig analysiert werden, was eine enorme Zeit-, Kosten- und Gewebeersparnis darstellt.

In unserer ersten Studie haben wir dennoch beide Methoden genutzt und miteinander verglichen [49]. Wir konnten in dieser nachweisen, dass beide Methoden gleich gute Ergebnisse liefern. Lediglich bei einer von 20 Proben konnten wir bei der Nachuntersuchung mit Sanger-Sequenzierung die Mutation nicht mehr nachweisen. Das lag bewiesenermaßen daran, dass in der Tiefe des FFPE-Blocks keine Tumorzellen mehr in der Probe enthalten waren und nicht an der Methodik als solche. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass der Nachweis einer Mutation auch bei Proben mit weniger als 50 Tumorzellen möglich ist. Dies wurde bisher nur mittels Laser-Mikrodissektion in einer weiteren Studie erreicht [50]. Wir haben dafür allerdings die DNA der wenigen Tumorzellen durch erhöhte Anzahl an FFPE-Leerschnitten für die manuelle Mikrodissektion und durch Einsatz eines deutlich niedrigeren Volumens an Elutionspuffer angereichert. Insgesamt konnten wir in der Studie zeigen, dass Mucin und Nekrose keinen negativen Einfluss auf die Mutationsanalyse haben und dass auch Proben mit wenigen Tumorzellen für die Routinediagnostik geeignet sind. Allerdings wurden wir im Rahmen unserer ersten Studie auf das Phänomen der intratumoralen genetischen Heterogenität aufmerksam. So wurde bei einer Probe im Rahmen der Routinediagnostik ein Areal mit einem soliden Tumor für die Analyse verwendet und innerhalb der Studie ein Areal mit einem muzinösen Tumoranteil. Beide morphologisch heterogenen Tumoranteile wiesen einen unterschiedlichen genetischen Subtyp auf. Auf Grundlage dieses Ergebnisses untersuchten wir in unserer zweiten Studie, ob ein morphologisch heterogenes Erscheinungsbild ein Hinweis für das Vorhandensein von einer intratumoralen genetischen Heterogenität sein kann [51]. Die Existenz der intratumoralen genetischen Heterogenität wurde besonders in den letzten Jahren bekannt und viel diskutiert [18, 31-33, 52-54]. Wir konnten in unserer Studie nachweisen, dass eine vorhandene heterogene Morphologie kein Hinweis auf eine mögliche intratumorale genetische Heterogenität sein muss, sondern diese vielmehr auch in morphologisch

homogenen Tumoren vorkommt. Dennoch konnten wir in einem Karzinom sogar nachweisen, dass in dem Tumoranteil mit dem soliden Wachstumsmuster eine *KRAS*-Mutation und in dem Anteil mit muzinösen Wachstumsmuster ein *KRAS*-Wildtyp vorlag. Grundsätzlich zeigen die Daten der Studie also, dass man bei einem morphologisch heterogenen Tumor alle unterschiedlichen Tumoranteile untersuchen sollte, um falsch negative bzw. falsch positive Versuchsergebnisse sicher auszuschließen. Dies kann natürlich für jeden Subtyp einzeln erfolgen, aber auch ein Pool der morphologisch unterschiedlichen Tumore wäre denkbar. Das hat den Vorteil, dass die Kosten für die Analyse geringgehalten werden, aber den Nachteil, dass eine Mutation mit geringer AF durch die Anwesenheit von Tumorzellen mit einem Wildtyp herunterverdünnt wird und die Mutation dann gegebenenfalls nicht mehr nachgewiesen werden kann [52]. Doch auch wenn eine technisch valide Untersuchung gewährleistet werden kann, sollte in weiteren Studien untersucht werden, inwiefern ein Subklon mit einer Mutation, der nur einen geringen Anteil des Gesamttumors ausmacht, eine klinische Relevanz hat. In einigen Studien wurde deren Bedeutung bereits untersucht und es ist immer noch unklar, ob auch kleine Subpopulationen mit einer klinisch relevanten Mutation eine Bedeutung für die anschließende Behandlung haben [55-57]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch Patienten mit einer *KRAS*-Mutation mit geringer AF unter Umständen auf eine Anti-*EGFR*-Therapie ansprechen [13, 58-59].

Nicht nur die Fragestellung, ob Mutationen mit einer geringen AF im Verhältnis zum Tumorzellgehalt der untersuchten Probe eine klinische Relevanz haben, sondern auch ob seltene Mutationen eine klinische Bedeutung haben, ist teilweise immer noch unbeantwortet. So haben wir in der dritten Studie untersucht, ob seltene Mutationen im *EGFR*-Gen für Patienten mit NSCLC eine therapeutische Bedeutung haben [60]. Wir konnten nachweisen, dass Patienten mit Doppel-Mutationen, bestehend aus einer seltenen und einer aktivierenden *EGFR*-Mutation auf die Therapie mit First- oder Second-Generation TKI ansprechen. Dieses Ergebnis deckt sich auch größtenteils mit anderen Studien [61-65]. Lediglich eine Studie zeigte hier divergierende Ergebnisse [66]. Insgesamt haben aber auch in dieser Studie die Patienten auf die Therapie mit TKI angesprochen, wiesen jedoch eine schlechtere Überlebensrate auf, als Patienten mit nur einer einzelnen aktivierenden *EGFR*-Mutation. Bei den einzelnen seltenen Mutationen hat in unserem Probenkollektiv nur ein Patient auf die TKI-Therapie angesprochen. Bei diesem Patienten wurde die Mutation p.G874D nachgewiesen. Diese wurde bisher noch in keiner anderen Studie beschrieben. Schlussfolgerungen ob es sich bei dieser Mutation, um eine aktivierende *EGFR*-Mutation handelt, können daher nicht gezogen werden. Die Ergebnisse unserer Studie und die Ergebnisse unserer umfassenden Literaturrecherche, die wir im Rahmen dieser Studie durchgeführt haben, bestätigen, dass nur sehr wenige Patienten mit seltenen *EGFR*-Mutationen auf eine Behandlung mit First- oder Second-Generation TKI ansprechen. Die neue Third Generation der *EGFR*-TKI und Kombinationen aus mehreren *EGFR*-TKIs könnten

aber eine Alternative für Patienten mit diesen Mutationen darstellen [45]. Der klinische Verlauf sollte daher besonders für seltene *EGFR*-Mutationen bei entsprechender Behandlung freizugänglich für alle dokumentiert werden. Leider gibt es bislang keine zentrale Datenbank, in der diese Informationen strukturiert hinterlegt werden können, so dass Informationen über den klinischen Verlauf von Patienten mit seltenen *EGFR*-Mutationen nur über eine aufwändige Recherche in zahlreichen öffentlichen Datenbanken gewonnen werden können. Wir haben für die Literaturrecherche drei verschiedene Datenbanken genutzt: CIVIC (Clinical Interpretations of Variants In Cancer), DoCM (Database of Curated Mutations) und COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer). Dabei enthielt die COSMIC-Datenbank die meisten Einträge, allerdings wird hier lediglich erwähnt, ob der Patient mit der entsprechenden Mutation mit TKI behandelt wurde und ein Link führt zu der entsprechenden Publikation. In der CIVIC-Datenbank erhält man dagegen eine kurze Zusammenfassung zur klinischen Relevanz der Mutation, auf Grundlage von unterschiedlichen Studien. Leider enthält diese Datenbank aber noch sehr wenige Einträge. Vorteil ist jedoch, dass jeder in der CIVIC-Datenbank publizieren kann und diese somit schnell wachsen könnte, wenn diese mehr genutzt würde. Die DoCM-Datenbank enthielt die wenigsten Daten und wurde seit 2013 nicht mehr aktualisiert. Insgesamt ist es sehr wichtig, dass eine zentrale Datenbank alle klinisch relevanten Daten für alle möglichen Mutationen, die für die personalisierte, onkologische Medizin von Bedeutung sind, aufbereitet darstellt. Die Recherche der klinischen Relevanz von seltenen Mutationen ist momentan noch sehr zeitaufwändig und meist nur wenig zufriedenstellend.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Proben mit viel Mucin oder viel Nekrose valide Ergebnisse in der Mutationsanalyse liefern und diese Areale nicht im Rahmen der molekularpathologischen Routinediagnostik gemieden werden müssen. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass eine intratumorale genetische Heterogenität nicht im Zusammenhang mit einer morphologischen Heterogenität bei CRC steht, aber durchaus zwei morphologisch unterschiedliche Areale in einem Tumor zwei unterschiedliche Genprofile aufweisen können und daher unabhängig voneinander untersucht werden sollten, um falsch negative Ergebnisse sicher ausschließen zu können. Auch konnten wir nachweisen, dass Patienten mit einer seltenen *EGFR*-Mutation in Kombination mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation von der Behandlung mit *EGFR*-TKI profitieren und das einzelne seltene *EGFR*-Mutation nur bedingt auf TKI der First-Generation ansprechen. Die klinische Relevanz der meisten seltenen *EGFR*-Mutationen ist nach wie vor unklar und jede mögliche Behandlung dieser Patienten sollte bestenfalls zentral dokumentiert werden, um die Daten allen Klinikern zur Verfügung zu stellen.

5. Literatur

1. Senft D, Leiserson MDM, Ruppin E, Ronai ZA. Precision Oncology: The Road Ahead. *Trends Mol Med*. 2017,23:874-898.
2. Sanchez NS, Mills GB, Mills Shaw KR. Precision oncology: neither a silver bullet nor a dream. *Pharmacogenomics*. 2017,18:1525-1539.
3. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. 2015,137:262-266.
4. Dietel M. Molecular Pathology: A Requirement for Precision Medicine in Cancer. *Oncol Res Treat*. 2016,39:804-810.
5. Friedman AA, Letai A, Fisher DE, Flaherty KT. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nat Rev Cancer*. 2015,15:747-756.
6. Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol*. 1992,1:275-282.
7. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008,26:1626-1634.
8. Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2011,154:37-49.
9. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012,18:5171-5180.
10. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov*. 2014,4:1269-1280.
11. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, Greenman C, Davies H, Dalglish G, Forbes S, Hunter C, Smith R, Stephens P, Goldstraw P, Nicholson A, Chan TL, Velculescu VE, Yuen ST, Leung SY, Stratton MR, Futreal PA. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2006,5:928-932.
12. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009,101:715-721.
13. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeris KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M, Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010,11:753-762.
14. Irahara N, Baba Y, Nosho K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, Iafrate AJ, Fuchs CS, Haigis KM, Ogino S. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2010,19:157-163.
15. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011,12:594-603.

16. Tie J, Desai J. Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies. *Target Oncol.* 2011,10:179-188.
17. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, Roma C, Troiani T, Rizzi D, Tatangelo F, Botti G, Maiello E, Colucci G, Ciardiello F. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol.* 2015,26:1710-1714.
18. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res.* 2010,16:790-799.
19. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature.* 2012,486:537-540.
20. Pietrantonio F, Vernieri C, Siravegna G, Mennitto A, Berenato R, Perrone F, Gloghini A, Tamborini E, Lonardi S, Morano F, Piccioni B, Busico A, Volpi CC, Martinetti A, Battaglin F, Bossi I, Pellegrinelli A, Milione M, Cremolini C, Di Bartolomeo M, Bardelli A, de Braud F. Heterogeneity of Acquired Resistance to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017,23:2414-2422.
21. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 1991,39:351-354.
22. Wong SQ, Li J, Tan AY, Vedururu R, Pang JM, Do H, Ellul J, Doig K, Bell A, MacArthur GA, Fox SB, Thomas DM, Fellowes A, Parisot JP, Dobrovic A. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics.* 2014,7:23.
23. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015,61:64-71.
24. Okayama N, Nishioka M, Hazama S, Sakai K, Suehiro Y, Maekawa M, Sakamoto J, Iwamoto S, Kato T, Mishima H, Oka M, Hinoda Y. The importance of evaluation of DNA amplifiability in KRAS mutation testing with dideoxy sequencing using formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal cancer tissues. *Jpn J Clin Oncol.* 2011,41:165-171.
25. Hugen N, van Beek JJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Insight into mucinous colorectal carcinoma: clues from etiology. *Ann Surg Oncol.* 2014,21:2963-2970.
26. Vermaat JS, Nijman IJ, Koudijs MJ, Gerritse FL, Scherer SJ, Mokry M, Roessingh WM, Lansu N, de Bruijn E, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Cuppen E, Voest EE. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res.* 2011,18:688-699.
27. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Shibuya H, Eshima K. Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2011,54:1170-1178.
28. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008,26:4217-4219.
29. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, Cercek A, Kemeny N, D'Angelica M, Viale A, Heguy A, Paty P, Chan TA, Saltz LB, Weiser M, Solit DB. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol.* 2012,30:2956-2962.

30. Kang H, Salomon MP, Sottoriva A, Zhao J, Toy M, Press MF, Curtis C, Marjoram P, Siegmund K, Shibata D. Many private mutations originate from the first few divisions of a human colorectal adenoma. *J Pathol.* 2015,237:355-362.
31. Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, Marjoram P, Siegmund K, Press MF, Shibata D, Curtis C. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet.* 2015,47:209-216.
32. Amaro A, Chiara S, Pfeffer U. Molecular evolution of colorectal cancer: from multistep carcinogenesis to the big bang. *Cancer Metastasis Rev.* 2016,35:63-74.
33. Nielsen K, Rolff HC, Eefsen RL, Vainer B. The morphological growth patterns of colorectal liver metastases are prognostic for overall survival. *Mod Pathol.* 2014,27:1641-1648.
34. Braxton DR, Zhang R, Morrisette JD, Loaiza-Bonilla A, Furth EE. Clinicopathogenomic analysis of mismatch repair proficient colorectal adenocarcinoma uncovers novel prognostic subgroups with differing patterns of genetic evolution. *Int J Cancer.* 2016,139:1546-1556.
35. Haley L, Tseng LH, Zheng G, Dudley J, Anderson DA, Azad NS, Gocke CD, Eshleman JR, Lin MT. Performance characteristics of next-generation sequencing in clinical mutation detection of colorectal cancers. *Mod Pathol.* 2015,28:1390-1399.
36. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014,25:282-303.
37. Gahr S, Stoehr R, Geissinger E, Ficker JH, Brueckl WM, Gschwendtner A, Gattenloehner S, Fuchs FS, Schulz C, Rieker RJ, Hartmann A, Ruemmele P, Dietmaier W. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer.* 2013,109:1821-1828.
38. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004,350:2129-2139.
39. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007,7:169-181.
40. Locatelli-Sanchez M, Couraud S, Arpin D, Riou R, Bringuier PP, Souquet PJ. Routine EGFR molecular analysis in non-small-cell lung cancer patients is feasible: exons 18-21 sequencing results of 753 patients and subsequent clinical outcomes. *Lung.* 2013,191:491-499.
41. Li K, Yang M, Liang N, Li S. Determining EGFR-TKI sensitivity of G719X and other uncommon EGFR mutations in non-small cell lung cancer: Perplexity and solution (Review). *Oncol Rep.* 2017,37:1347-1358.
42. Chiu CH, Yang CT, Shih JY, Huang MS, Su WC, Lai RS, Wang CC, Hsiao SH, Lin YC, Ho CL, Hsia TC, Wu MF, Lai CL, Lee KY, Lin CB, Yu-Wung Yeh D, Chuang CY, Chang FK, Tsai CM, Perng RP, Chih-Hsin Yang J. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Response in Advanced Lung Adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I Mutations. *J Thorac Oncol.* 2015,10:793-799.
43. Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, Isobe H, Harada M, Ishii Y, Gemma A, Hagiwara K, Kobayashi K. Effectiveness of gefitinib against non-small-cell lung cancer with the uncommon EGFR mutations G719X and L861Q. *J Thorac Oncol.* 2014,9:189-194.
44. Ong M, Kwan K, Kamel-Reid S, Vincent M. Neoadjuvant erlotinib and surgical resection of a stage IIIa papillary adenocarcinoma of the lung with an L861Q activating EGFR mutation. *Curr Oncol.* 2012,19:e222-226.

45. Girard N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: which tyrosine kinase inhibitor and when? *Future Oncol.* 2018, 14(11):1117-1132
46. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S, Papadimitrakopoulou VA. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016,376:629-640.
47. McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ, Hamilton P, O'Sullivan JM, Salto-Tellez M. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *PLoS One.* 2013,8:e69604.
48. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev.* 2011,32:177-195.
49. Büttner J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Dietel M, Johrens K. Influence of mucinous and necrotic tissue in colorectal cancer samples on KRAS mutation analysis. *Pathol Res Pract.* 2017,213:606-611.
50. Chowdhuri SR, Xi L, Pham TH, Hanson J, Rodriguez-Canales J, Berman A, Rajan A, Giaccone G, Emmert-Buck M, Raffeld M, Filie AC. EGFR and KRAS mutation analysis in cytologic samples of lung adenocarcinoma enabled by laser capture microdissection. *Mod Pathol.* 2011,25:548-555.
51. Büttner J, Johrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W, Lehmann A. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. *Exp Mol Pathol.* 2018,104:76-81.
52. Richman SD, Chambers P, Seymour MT, Daly C, Grant S, Hemmings G, Quirke P. Intratumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011,34:61-66.
53. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis.* 2005,26:916-922.
54. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2001,93:346-352.
55. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012,486:532-536.
56. Bando H, Yoshino T, Yuki S, Shinozaki E, Nishina T, Kadowaki S, Yamazaki K, Kajiura S, Tsuchihara K, Fujii S, Yamanaka T, Ohtsu A. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan. *Jpn J Clin Oncol.* 2012,42:1146-1151.
57. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, Movilia A, Luoni M, Boldorini R, Alabiso O, Girlando S, Soini B, Spitale A, Di Nicolantonio F, Saletti P, Crippa S, Mazzucchelli L, Marchetti A, Bardelli A, Frattini M. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2011,17:4901-4914.
58. Freeman DJ, Juan T, Reiner M, Hecht JR, Meropol NJ, Berlin J, Mitchell E, Sarosi I, Radinsky R, Amado RG. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer.* 2008,7:184-190.

59. Mancuso A, Sollami R, Recine F, Cerbone L, Macciomei MC, Leone A. Patient with colorectal cancer with heterogeneous KRAS molecular status responding to cetuximab-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010,28:e756-758.
60. Martin J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Grohe C, Tessmer A, Gottschalk J, Schmidt B, Pau HW, Witt C, Moegling S, Kromminga R, Johrens K. Clinical Impact of Rare and Compound Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2019,20(5):350-362.e4.
61. O'Kane GM, Bradbury PA, Feld R, Leighl NB, Liu G, Pisters KM, Kamel-Reid S, Tsao MS, Shepherd FA. Uncommon EGFR mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017,109:137-144.
62. Wu SG, Chang YL, Hsu YC, Wu JY, Yang CH, Yu CJ, Tsai MF, Shih JY, Yang PC. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma of complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations with the classical mutation pattern. *Oncologist*. 2008,13:1276-1284.
63. Kobayashi S, Canepa HM, Bailey AS, Nakayama S, Yamaguchi N, Goldstein MA, Huberman MS, Costa DB. Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol*. 2013,8:45-51.
64. Peng L, Song Z, Jiao S. Comparison of uncommon EGFR exon 21 L858R compound mutations with single mutation. *Onco Targets Ther*. 2015,8:905-910.
65. Peng L, Song ZG, Jiao SC. Efficacy analysis of tyrosine kinase inhibitors on rare non-small cell lung cancer patients harboring complex EGFR mutations. *Sci Rep*. 2014,4:6104.
66. Kim EY, Cho EN, Park HS, Hong JY, Lim S, Youn JP, Hwang SY, Chang YS. Compound EGFR mutation is frequently detected with co-mutations of actionable genes and associated with poor clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2016,17:237-245.

Anlage: EGFR-Fragebogen

Fragenbogen zur Ermittlung der therapeutischen und klinischen Relevanz von seltenen Mutationen im EGFR-Gen

Patient/in: _____ geboren am: _____

Mutation: _____

Status Rauchverhalten:

- Nichtraucher
- Gelegenheitsraucher ggf. Angabe: Anzahl _____ Zigaretten / Woche
- Raucher ggf. Angabe: Anzahl _____ Zigaretten / Tag
- Exraucher ggf. Angabe: Anzahl _____ Zigaretten / Tag

Behandlung mit EGFR TKIs:

Der Patient / die Patientin wurde auf Grundlage der o.g. Mutation behandelt mit:

- Erlotinib Gefinitib Neratinib Afatinib
- Dacomitinib Osimertinib Rociletinib _____
- wurde nicht mit EGFR TKIs behandelt

Durchschnittliche Dosis EGFR TKIs:

_____mg/ Tag ab _____(Monat / Jahr) bis _____(Monat / Jahr)

Response:

Veränderung des Tumors auf Grundlage der radiologischen Untersuchungen ab Behandlung:

- _____% + _____%

„Progression free time“: _____Monate

Patient ist bereits verstorben: Nein Ja, in _____ (Monat / Jahr)

Überlebenszeit des Patienten ab Behandlung: _____Monate

Einschätzung Response-Verhalten:

- Responder Partial Response Non-Responder keine Angabe mgl.

Ggf. Ergänzungen zum Therapieverlauf:

Einverständnis Veröffentlichung der Daten (pseudoanonymisiert): Ja Nein

Datum / Unterschrift behandelter Arzt des o.g. Patienten

Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Juliane Martin, geb. Büttner, versichere an Eides durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „ Problemlösungen der Mutationsanalytik von Formalin fixierten Gewebe in der Routine-Diagnostik“ 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 den ausgewählten Publikationen 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 eidesstaatlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstaatlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Juliane Martin (geb. Büttner) hat folgenden Anteil an den genannten Publikationen:

Publikation 1

Büttner J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Dietel M, Johrens K. Influence of mucinous and necrotic tissue in colorectal cancer samples on KRAS mutation analysis. Pathol Res Pract. 2017,213:606-611.

Impact Factor: 1,794

Anteil: Planung und teilweise Durchführung der Versuche (Sanger Sequenzierung), Auswertung der Sanger-Sequenzdaten, Erstellung der Fotos in den Abbildungen 1 & 2, Erstellen der Tabellen 1 bis 3 und der „Supplementary“ Tabellen 1 & 2 und Verfassen des Manuskripts

Publikation 2

Büttner J, Jöhrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W and Lehmann A. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. Exp Mol Pathol. 2018,104(1):76-81

Impact Factor: 2,35

Anteil: Idee der Studie, Zusammenstellen des Probenkollektivs, Planung der Versuche, Auswertung der Sanger-Sequenzdaten, Erstellung der Fotos in den Abbildungen 1 & 2, Erstellung der Tabelle 1 und Verfassen des Manuskripts

Publikation 3

Martin J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Grohe C, Tessmer A, Gottschalk J, Schmidt B, Pau HW, Witt C, Moegling S, Kromminga R, Johrens K. Clinical Impact of Rare and Compound Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2019,20(5):350-362.e4

Impact Factor: 4,204

Anteil: Idee der Studie, Erstellung des Fragebogens, Durchführung der Datenbank- und Literaturrecherche, Erstellung der Abbildung 1, Erstellung der Tabelle 1 bis 6 und der „Supplementary“ Tabellen 1 bis 4 und Verfassen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel
der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1

Büttner J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Dietel M, Johrens K. Influence of mucinous and necrotic tissue in colorectal cancer samples on KRAS mutation analysis. Pathol Res Pract. 2017,213:606-611.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.04.028>

Publikation 2

Büttner J, Jöhrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W and Lehmann A. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. Exp Mol Pathol. 2018,104(1):76-81

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.007>

Publikation 3

Martin J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Grohe C, Tessmer A, Gottschalk J, Schmidt B, Pau HW, Witt C, Moegling S, Kromminga R, Johrens K. Clinical Impact of Rare and Compound Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2019,20(5):350-362.e4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.04.012>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Büttner J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Dietel M and Jöhrens K. Influence of mucinous and necrotic tissue in colorectal cancer samples on KRAS mutation analysis. Pathol Res Pract. 2017 Jun;213(6):606-611
2. Büttner J, Jöhrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W and Lehmann A. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. Exp Mol Pathol. 2018 Feb;104(1):76-81
3. Martin J, Lehmann A, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Grohé C, Tessmer A, Gottschalk J, Schmidt B, Pau HW, Witt C, Moegling S, Kromminga R and Jöhrens K. Clinical impact of rare and compound mutations of epidermal growth factor receptor in patients with non-small cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2019 Sep; 20(5): 350-362.e4

Danksagung

Als erstes möchte ich mich natürlich bei meiner Betreuerin PD Dr. Korinna Jöhrens bedanken. Ihre fachliche Unterstützung, konstruktive Kritik und ihre geopferte Zeit, die ich immer wieder auch mit kleineren Fragen und Bitten in Anspruch genommen habe, haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Dr. Annika Lehmann und Prof. Dr. Frederick Klauschen, die mich ebenfalls mit konstruktiver Kritik, fachlicher Expertise und anregenden Gesprächen jederzeit bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Auch möchte ich mich herzlich bei den technischen Mitarbeitern der Molekularpathologie bedanken, besonders bei Mirko Rizello und Nicole Deutschmann, die es immer geschafft haben, trotz des erhöhten Probenaufkommens, meine Proben zeitnah dazwischen zu schieben.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Dietel, dass er mir die Möglichkeit eingeräumt hat, am Institut für Pathologie der Charité zu forschen. Auch danke ich Prof. Dr. Michael Hummel und Dr. Dido Lenze für ihre fachliche Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Dr. Manrico Paulitschke danke ich herzlich dafür, dass er es mir überhaupt ermöglicht hat, meine Promotionsarbeit neben meiner normalen beruflichen Tätigkeit auszuüben.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets dabei unterstützen meine Ziele zu verwirklichen und mir immer den Rücken stärken.

Zu guter letzte bedanke ich mich besonders bei meinem Mann für seinen Rückhalt und seiner Liebe.