

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

aus dem  
Dr. Senckenbergischen Institut  
für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter J. Wild

betreut am  
Medizinischen Versorgungszentrum für klinische Pathologie  
an der Klinikum Darmstadt GmbH

**Peritumorales Budding bei kolorektalen Karzinomen  
Analyse morphologischer Veränderungen an der  
Invasionsfront**

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

vorgelegt von  
Florian Steinwandter

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Gerhard Mall
Korreferent/in:	Prof. Dr. Claus Michael Rödel
Tag der mündlichen Prüfung:	16.12.2019

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. med. Gerhard Mall für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und seine Hilfsbereitschaft bedanken.

Besonders herzlichen Dank an Herrn Dr. med. Roland Heyny-von Haußen für die stetige und richtungsweisende Unterstützung während der Dissertation.

Auch bei meiner Familie möchte ich mich ebenso für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Vorwort</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	Epidemiologie .....	2
2.2	Inzidenz .....	2
2.3	Mortalität .....	3
2.4	Lokalisation .....	4
2.5	Ätiologie .....	4
2.5.1	Ernährung und Lebensgewohnheiten .....	4
2.5.2	Familiäre Häufung.....	5
2.5.3	Erbliche (hereditäre) Formen des kolorektalen Karzinoms.....	5
2.5.4	Pharmakologische und hormonelle Faktoren .....	6
2.6	Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.....	7
2.6.1	TNM-Klassifikation .....	7
2.6.2	Tumorstadieneinteilung nach UICC .....	8
2.7	Histologische Typen des kolorektalen Karzinoms .....	10
2.8	Grading – Histologische Differenzierung .....	11
2.9	Tumor Budding .....	11
2.10	Karzinogenese .....	13
2.10.1	Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein (Chromosomale Instabilität und Tumorsuppressor-Phänotyp) .....	16
2.10.2	Serratierter Karzinogeneseweg.....	18

2.10.3	Der alternative Karzinogenese-Weg .....	19
2.11	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasierung.....	19
2.12	Signaltransduktionswege in kolorektalen Karzinomen.....	21
2.12.1	Mitogenaktivierende Kinase (MAPK) System .....	22
2.12.2	Rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS).....	23
2.12.3	Rapid accelerated fibrosarcoma bzw. rat fibrosarcoma (RAF) .....	24
2.13	Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms .....	26
<b>3</b>	<b>Patientenkollektiv .....</b>	<b>29</b>
3.1	Alter .....	29
3.2	Lage.....	29
3.3	Grading .....	30
3.4	Histologischer Subtyp .....	31
3.5	Klassifikation UICC-Stadium.....	31
3.6	Morphologische Veränderung der Tumorepithelien innerhalb des Tumors und an der Invasionsfront.....	32
3.7	Veränderungen der nicht epithelialen Gewebekomponenten an der Invasionsfront – Stromareaktion/Umgebungsreaktion.....	33
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>38</b>
4.1	Materialien .....	38
4.1.1	Geräte .....	38
4.1.2	Software.....	40
4.1.3	Gebrauchswaren.....	40
4.1.4	Reagenzien.....	42

4.1.5 Kits .....	44
4.1.6 Primer .....	44
4.2 Methoden.....	45
4.2.1 DNA-Extraktion .....	45
4.2.1.1 Entparaffinierung von paraffineingebettetem Tumorgewebe .....	45
4.2.1.2 Entparaffinierung von in Objektträgern aufgezogenem Tumorgewebe .....	46
4.2.1.3 DNA-Extraktion aus unterschiedlichen Probenmaterialien mit dem Qiagen Biosprint 15.....	47
4.2.1.4 Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) und der DNA-Qualität.....	48
4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction).....	49
4.2.2.1 PCR-Protokoll für das KRAS-Gen Codon 12 und 13.....	50
4.2.2.2 PCR-Protokoll für BRAF Exon 15 .....	51
4.2.3 Gelelektrophorese.....	52
4.2.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	54
4.2.4.1 Aufreinigung des PCR-Produktes mit ExoSap-it PCR clean up Kit.....	54
4.2.4.2 Synthesereaktion: Cycle Sequencing .....	55
4.2.4.3 Centri-Sep-Säulen-Aufreinigung der Syntheseprodukte.....	56
4.2.4.4 Analyse des aufgereinigten Amplifikats mittels Kapillarelektrophorese, Laser-Scan und Auswertung der Fluoreszenz im ABI PRISM ® 310 Genetic Analyzer .....	56
4.2.5 Pyrosequenzierung mit dem PyroMark Q24 .....	57
4.2.5.1 Design des PCR-Programms zur Pyrosequenzierung von Codon 12 und Codon 13 des KRAS-Gens .....	59

4.2.5.2 Design des PCR-Programms zur Pyrosequenzierung von Codon 600 des BRAF-Gens (der Mutation BRAFV600E auf Exon 15 des BRAF-Gens) .....	65
4.2.6 Statistische Datenanalyse.....	69
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
5.1 Methodenvergleich von Sanger- und Pyrosequenzierung unter Verwendung identischer Primer der KRAS-Mutation.....	70
5.2 Pyrosequenzierung und Detektion von BRAF-Mutation .....	76
5.3 Ergebnisse der morphologischen Analyse von Tumorzellbudding .....	79
5.4 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Art der Invasionsfront ...	82
5.5 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion .....	84
5.5.1 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungs- reaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/makrophagen- dominant und fibroblastenreich/plasmazell dominant .....	87
5.5.2 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungs- reaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/plasmazell- dominant und fibroblastenarm/lymphozytendominant .....	90
5.5.3 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungs- reaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/makrophagen- dominant und fibroblastenarm/lymphozytendominant .....	92
5.5.4 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungs- reaktion in Kombination mit Tumor Budding .....	93
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>95</b>
6.1 Patientenkollektiv .....	95
6.2 Mutationsanalyse.....	97
6.2.1 KRAS-Mutation .....	97
6.2.2 BRAF-Mutation .....	99

6.3 Tumor Budding und morphologische Veränderungen an der Invasionsfront .....	101
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>8 Summary .....</b>	<b>110</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>10 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>11 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>12 Anhang zur Übersicht des Patientenkollektives.....</b>	<b>128</b>
<b>13 Schriftliche Erklärung .....</b>	<b>132</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AFAP	Attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ADP (ATP)	Adenosindiphosphat (Adenosintriphosphat)
BMI	Body Mass Index
C	Cytosin
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
cm	Zentimeter
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRC	Kolorektales Karzinom
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
Fib1	Fibroblastenreicher Typ mit geringer Immunreaktion
Fib2	Fibroblastenreicher Typ mit hoher Immunreaktion
G	Guanin
GDP (GTP)	Guanosindiphosphat (Guanosintriphosphat)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HNPPC	Hereditäres, nicht Polyposis assoziiertes kolorektales Karzinom
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme

IMLY	Hohe lymphozytäre Infiltration mit geringer Fibroblastenreaktion
(K)RAS	(Kirsten) Rat sarcoma
LOH	Loss of Heterozygosity
m	Männlich
MAP(K)	Mitogen-activated protein (Kinase)
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MMR	Missmatch-Repair-Gene
MSI	Mikrosatelliteninstabil
MSS	Mikrosatellitenstabil
n	Anzahl
nm	Nanometer
NSAR	Nicht steroidale Antiphlogistika
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Picomolar
PPi	Pyrophosphat
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RR	Relatives Risiko
sec	Sekunde
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SP	Serratierte Polyposis
T	Thymin
Taq-Polymerase	Hitzestabile Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus
TCF4	Transkriptionsfaktor 4
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett

V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPT	Vacuum Prep Tool
w	Weiblich
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

# 1 Vorwort

## **Peritumorales Budding bei kolorektalen Karzinomen. Analyse morphologischer Veränderungen an der Invasionsfront.**

Kolorektale Karzinome zeigen teilweise morphologische Veränderungen wie peritumorales und intratumorales Abknospen (Budding) von kleinen Tumorzellverbänden und Tumoreinzelnzellen. Diese Veränderungen finden sich insbesondere an der Invasionsfront der kolorektalen Karzinome. Ein Kollektiv von 195 Darmresektaten mit einem kolorektalen Karzinom aus dem Einsendegut des Instituts für Pathologie am Klinikum Darmstadt wurde daraufhin untersucht,

- a) ob peritumorales Budding an der Invasionsfront mit dem Vorhandensein von Metastasen assoziiert ist,
- b) ob unterschiedliche Formen der Gewebsreaktion auf die Tumorinvasion oder
- c) ob ein Zusammenhang des KRAS- bzw. BRAF-Mutationsstatus der Karzinome mit der Morphologie an der Invasionsfront besteht.

Hierzu werden die anonymisierten Gewebeproben am tiefsten Punkt der Invasionsfront morphologisch im Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Schnitt analysiert, die DNA aus weiteren Paraffinschnitten dieser Region extrahiert und der KRAS-Status mittels Sangersequenzierung und Pyrosequenzierung erhoben.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Epidemiologie**

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit eine der häufigsten Tumorerkrankungen. Die Inzidenz steigt ab dem 45. Lebensjahr fast exponentiell mit dem Lebensalter an und findet ihren Häufigkeitsgipfel zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt. Vor dem 55. Lebensjahr entstehen etwa 10 % der kolorektalen Karzinome.<sup>1</sup> Kommen CRC vor dem 40. Lebensjahr vor, muss an eine genetische Prädisposition, wie dem Lynch-Syndrom, (früher hereditäres, nicht Polyposis assoziiertes kolorektales Karzinom, HNPCC) oder der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) gedacht werden. Im Jahr 2012 erkrankten weltweit mehr als 1,3 Millionen Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen. Weltweit ist das kolorektale Karzinom nach Lungen- und Brustkrebs mit 9,7 % der dritthäufigste maligne Tumor.<sup>2</sup>

### **2.2 Inzidenz**

2012 waren in Deutschland laut IARC (International Agency for Research on Cancer) 493.780 Menschen an Krebs erkrankt, davon 63.572 an einem kolorektalen Karzinom. 36.567 Männer erkrankten an einem kolorektalen Karzinom, das entspricht 13,5 % aller Tumoren bei Männern; bei Frauen hingegen kam es zu 27.005 Krebsneuerkrankungen, was 12,1 % aller Tumoren bei Frauen entspricht. Mit einer Inzidenz von 12,9 % ist das kolorektale Karzinom in Deutschland somit der dritthäufigste Tumor.<sup>2</sup>

In den USA gab es 2012 laut IARC 134.349 Neuerkrankungen mit kolorektalen Karzinomen (8,4 % aller Tumorerkrankungen), davon 65.304 (8,4 %) Frauen und 69.045 (8,4 %) Männer. Somit war es nach Brust-, Lungen- und Prostatakarzinomen der vierthäufigste Tumor. Jemal et al. unterschieden dabei zusätzlich zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen. Dabei erkrankten neu ca. 110.000 Menschen an einem Kolonkarzinom und 41.000 an einem Rektumkar-

zinom. Im Gegensatz zu den Kolonkarzinomen traten die Rektumkarzinome vermehrt bei Männern auf.<sup>3</sup>

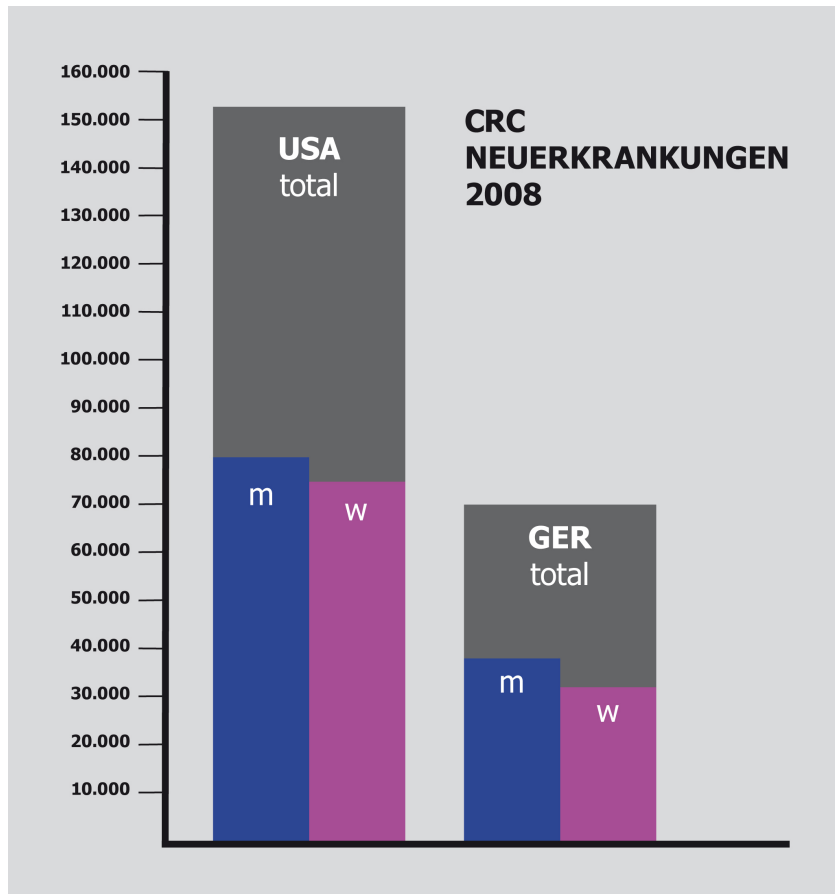


Abb. 1: Übersicht über die Neuerkrankungen durch kolorektale Karzinome im Jahre 2012 in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Deutschland (GER), w: Frauen, m: Männer<sup>2</sup>

### 2.3 Mortalität

2012 starben weltweit 693.933 Menschen (320.294 Frauen und 373.639 Männer) an einem kolorektalen Karzinom. Dies entspricht einer Mortalität von 8,5 %. In Deutschland zeigte sich 2012 eine höhere Mortalitätsrate. Es starben insgesamt 25.473 der Patienten (13.464 Männer und 12.009 Frauen) an einem kolorektalen Karzinom, entsprechend einer Mortalität von 11,7 %. In den USA starben 55.259 Menschen an einem kolorektalen Karzinom (28.740 Männer und 26.519 Frauen), entsprechend einer Mortalitätsrate von 9,0 %.<sup>2</sup>

## **2.4 Lokalisation**

Am häufigsten finden sich die kolorektalen Karzinome mit ca. 29 % im Rektum, gefolgt von Karzinomen des Colon sigmoideum mit 18 %. In absteigender Reihenfolge kommen Dickdarmkarzinome im Coecum (13 %), dem Colon transversum (11 %), dem Colon ascendens (9 %) und dem Colon descendens (6 %) vor.<sup>4</sup> In den letzten Jahrzehnten konnte ein Inzidenzanstieg rechtsseitig gelegener Darmtumore bei gleichzeitiger Inzidenzabnahme rektosigmoidaler Tumore gesehen werden. Dies wird vor allem der Zunahme an Vorsorgeuntersuchungen zugesprochen.<sup>5</sup>

## **2.5 Ätiologie**

Viele umfangreiche genetische, epidemiologische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Entstehung von kolorektalen Karzinomen multifaktoriell bedingt ist. Neben endogenen Faktoren müssen auch exogene Einflüsse wie Umwelt oder Ernährung als Ursache bzw. als Risikofaktor in die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms einbezogen werden. Andererseits gibt es auch protektive Faktoren, die dem kolorektalen Karzinom bei seiner Entstehung entgegenwirken.

### **2.5.1 Ernährung und Lebensgewohnheiten**

Mehrere wichtige Risikofaktoren, die an der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms beteiligt sind, werden unter dem Begriff des „westlichen Lebensstils“ (WHO: Western-type-lifestyle) zusammengefasst. Darunter fallen unter anderem bestimmte Essgewohnheiten, Rauchen, Alkoholtrinken sowie die Umweltfaktoren in Industrienationen. So zeigen u. a. Migrationsstatistiken eine Risikoanpassung von Menschen, die von Entwicklungsländern in Industrieländer auswandern. Parallel dazu konnte bei solchen Einwanderern die Übernahme der Ernährungsgewohnheiten des Gastlandes mit vermehrter Kalorienaufnahme sowie vermehrter Zufuhr an Fett und Cholesterin festgestellt werden.<sup>6</sup>

Im Gegensatz dazu wird durch eine ausgewogene vegetarische Ernährung das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken gesenkt.<sup>7-9</sup> Choe et al. konnten zeigen, dass sich das relative Risiko (RR) an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, bei täglicher Aufnahme von 30 bis 45 g Alkohol geschlechtsunabhängig auf 1,16 erhöht. Bei einem Konsum von mehr als 45 g/d steigt das RR auf 1,41.<sup>10</sup> Rauchen erhöht ebenfalls das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.<sup>11,12</sup> Martinez et al. konnten nachweisen, dass ein Body Mass Index (BMI) von 29 bei Frauen das RR an kolorektalen Karzinom zu erkranken, auf 1,45 erhöht.<sup>13,14</sup> Körperliche Aktivität hingegen zeigte in mehreren Studien eine protektive Wirkung.<sup>15, 16</sup>

### **2.5.2 Familiäre Häufung**

Etwa 30 % der Dickdarmkarzinome zeigen eine familiäre Häufung und haben eine polygenetische Ursache. Das mittlere Risiko, selbst an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, ist bei Verwandten ersten Grades auf das ca. 2,5 fache erhöht.<sup>17</sup> Untersuchungen des National Cancer Institute zeigen in den Surveillance Epidemiology and End Results (SEER)-Krebsstatistiken einen Unterschied der Inzidenz bezogen auf die ethnische Gruppe. Aus verschiedenen Daten, die in den USA u.a. für kolorektale Karzinome erhoben wurden, besteht ein erhöhtes Risiko vor allem für afrikanischstämmige Amerikaner. Seltener dagegen ist das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms bei weißen Amerikanern bzw. mit hispanischem Hintergrund.<sup>18</sup>

### **2.5.3 Erbliche (hereditäre) Formen des kolorektalen Karzinoms**

Hereditäre kolorektale Karzinome machen 5-10 % aller kolorektalen Karzinome aus. Das Lynch-Syndrom ist mit 2-3 % die größte Gruppe der hereditären kolorektalen Karzinome. Dieses zeigt einen autosomal dominanten Erbgang. Eine Diagnose ist anamnestisch, immunhistologisch oder molekularpathologisch zu sichern.<sup>19</sup> Das Lynch-Syndrom ist charakterisiert durch einen Funktionsverlust der Mismatch-Repair-Gene (MMR-Gene), die Fehler während der DNA-Replikation beseitigen. Die Mikrosatelliteninstabilität beim Lynchsyndrom ba-



siert auf einer Keimbahnmutation in den MMR-Genen.<sup>20, 21</sup> Inzwischen sind sechs Gene identifiziert worden, deren Mutation zu einem Lynch-Syndrom führen können: MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2. Am häufigsten (etwa 90 % der Fälle) sind die Gene MLH1 und MSH2 betroffen.<sup>22</sup>

Die FAP (familiäre adenomatöse Polypose) ist die zweithäufigste erbliche Form des kolorektalen Karzinoms und zeigt ebenso einen autosomal dominanten Erbgang. Die FAP ist im Gegensatz zum Lynch-Syndrom in der Regel klinisch-endoskopisch zu diagnostizieren. Kennzeichnend ist das Auftreten von hundert (100-5000) Polypen in Kolon und Rektum mit Prädominanz eines rechtsseitigen Kolonbefalls. Bereits vor dem 20. Lebensjahr auftretende Adenome gehen unbehandelt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr in Karzinome über. Die Penetranz beträgt 100 %. Die Ursache ist eine APC (adenomatous-polyposis-coli) Genmutation.<sup>19</sup> Weitere erbliche CRC sind seltenere adenomatöse Polyposissyndrome wie das AFAP und MAP, eigenständige erbliche CRC wie die serratierte Polyposis (SP) oder hamartöse Polyposissyndrome (Peutz-Jeghers-Syndrom, Juvenile Polyposis, Cowden-Syndrom).<sup>19,23</sup>

#### **2.5.4 Pharmakologische und hormonelle Faktoren**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass nicht steroidale Antiphlogistika (NSAR) und COX-2-Hemmer die Inzidenz von Kolon-Adenomen senken. Jedoch wurde für keines dieser Medikamente ein positiver Effekt hinsichtlich des Entstehens eines kolorektalen Karzinoms nachgewiesen.<sup>24-27</sup> Des Weiteren haben weibliche Hormone eine protektive Wirkung auf die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. So zeigen verschiedene Forschergruppen, dass Östrogen zusammen mit Progesteron die Inzidenz von CRC an postmenopausalen Frauen senkt.<sup>28-30</sup>

## 2.6 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

### 2.6.1 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation beschreibt in Form einer Facettenklassifikation verschiedene Eigenschaften von malignen Tumoren und erlaubt Aussagen über das voraussichtliche Verhalten von Tumorerkrankungen. Für kolorektale Tumore gilt nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) 2017 folgende TNM-Klassifikation:

---

<b>T</b>	<b>Eindringtiefe des Primärtumors</b>
T1	Submukosa
T2	Muskularis propria
T3	Subserosa, perikolisches bzw. perirektales Gewebe
T4a	Viszerales Peritoneum
T4b	Infiltration direkt in andere Organe

---

<b>N</b>	<b>Befall der regionären Lymphknoten mit Primärtumor</b>
N1a	1 Lymphknoten
N1b	2-3 Lymphknoten
N1c	Satellitenläsionen ohne regionalen Lymphknotenbefall
N2a	4-6 Lymphknoten
N2b	≥ 7 Lymphknoten

---

<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M1a	1 Organ
M1b	≥ 2 Organe oder Peritoneum
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

---

Weitere Eigenschaften, die in die TNM-Formel, jedoch nicht in die UICC- Klassifikation einfließen, sind:

<b>R</b>	<b>Resttumorgewebe nach Operation</b>
R0	Kein Resttumor
R1	Mikroskopisch sichtbare Tumorreste
R2	Makroskopisch sichtbare Tumorreste
<b>L</b>	<b>Lymphgefäßinvasion des Tumors</b>
L0	Keine Tumorzellen in Lymphbahn eingebrochen
L1	Tumorzellen in Lymphbahn eingebrochen
<b>V</b>	<b>Veneninvasion des Tumors</b>
V0	Kein Einbruch des Tumors in Venen
V1	Mikroskopisch sichtbarer Einbruch des Tumors in Venen
V2	Makroskopisch sichtbarer Einbruch des Tumors in Venen
<b>Pn</b>	<b>Perineurale Invasion des Tumors</b>
Pn1	Tumorzellen befallen auch das Gewebe, das Nerven umgibt
Pn1	Tumorzellen befallen auch das Gewebe, das Nerven umgibt
<b>X</b>	<b>keine Angaben möglich</b>

### 2.6.2 Tumorstadieneinteilung nach UICC

Durch die UICC werden verschiedene TNM-Stadien zusammengefasst, wodurch eine standardisierte Therapie nach spezifischen Schemata erfolgen kann. Im Vergleich die ältere, früher in angloamerikanischen Ländern angewandte Dukes-Klassifikation:

<b>UICC</b>	<b>TNM-System</b>			<b>Dukes-Einteilung</b>
<b>Stadium 0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>	
<b>Stadium I</b>	<b>T1, T2</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>	<b>A</b>
<b>Stadium II</b>	<b>T3, T4</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>	<b>B</b>
Stadium IIA	T3	N0	M0	
Stadium IIB	T4a	N0	M0	
Stadium IIC	T4b	N0	M0	
<b>Stadium III</b>	<b>Jedes T</b>	<b>N1, N2</b>	<b>M0</b>	<b>C</b>
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0	
	T1	N2a	M0	
Stadium IIIB	T1, T2	N2b	M0	
	T2, T3	N2a	M0	
	T3, T4a	N1	M0	
Stadium IIIC	T3, T4a	N2b	M0	
	T4a	N2a	M0	
	T4b	N1, N2	M0	

<b>Stadium IV</b>	<b>Jedes T</b>	<b>Jedes N</b>	<b>M1</b>	<b>D</b>
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a	
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b	
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1c	

Tabelle 1: UICC-Klassifikation und Dukes-Einteilung<sup>31, 32</sup>

## 2.7 Histologische Typen des kolorektalen Karzinoms

Die histologischen Typen der WHO-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms von 2010 zeigt Tabelle 2. Die häufigste Form ist das „organtypische“ Adenokarzinom, meist als Adenokarzinom vom kolorektalen Typ bezeichnet, das etwa 90 Prozent der kolorektalen Karzinome ausmacht. Am zweithäufigsten kommen verschleimende (muzinöse) Karzinome vor. Zwar können auch Adenokarzinome vom kolorektalen Typ muzinöse Anteile aufweisen, aber erst wenn mehr als 50 Prozent des Tumors eine extrazelluläre Verschleimung aufweisen, spricht man von einem muzinösen Karzinom. Ca. 8-10 % der kolorektalen Karzinome sind verschleimende Adenokarzinome. Eine Sonderform der verschleimenden Karzinome sind mit 1-2 % die Siegelringzellkarzinome, bei denen mehr als 50 Prozent der Tumorzellen intrazellulär gebildetes Muzin beinhalten. Alle weiteren möglichen histologischen Typen kommen seltener vor, wobei generell jede histologische Tumorvariante möglich ist. In weniger als einem Prozent zählt die WHO kleinzellige Karzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome, medulläre Karzinome und undifferenzierte Karzinome auf.<sup>33</sup>

<b>Histopathologie</b>	<b>ICD-O</b>
Adenokarzinom	8140/3
Cribriform comedo-type Karzinom	8201/3
Medulläres Karzinom	8510/3
Mikropapilläres Karzinom	8265/3
Muzinöses Adenokarzinom	8480/3
Serratiertes Adenokarzinom	8213/3
Siegelringzellkarzinom	8490/3
Adenosquamöses Karzinom	8560/3
Spindelzellkarzinom	8032/3
Plattenepithelkarzinom	8070/3
Undifferenziertes Karzinom	8020/3

Tabelle 2: Vorkommen der histologischen Subtypen des kolorektalen Karzinoms<sup>3</sup>

## 2.8 Grading – Histologische Differenzierung

Das Grading für den histologischen Haupttyp des „organtypischen“ Adenokarzinoms vom kolorektalen Typ erfolgt auf der Basis des Vorhandenseins oder Fehlens drüsiger (glandulärer) Zellformationen. Die nachfolgende Tabelle zeigt nach WHO-Einteilung die unterschiedlichen Differenzierungsgrade:

Kriterien	Differenzierungsgrad	Grading
> 95 % glanduläre Zellformationen	hochdifferenziert	1
50-95 % glanduläre Zellformationen	mäßig differenziert	2
5-49 % glanduläre Zellformationen	schlecht differenziert	3
< 5 % glanduläre Zellformationen	undifferenziert	4

Tabelle 3: Grading des kolorektalen Adenokarzinoms<sup>33</sup>

Die meisten Adenokarzinome sind mit 70 % mäßig differenzierte, 10 % sind gut differenziert (G1) und 20 % sind schlecht differenzierte bzw. undifferenzierte Tumore.<sup>34</sup>

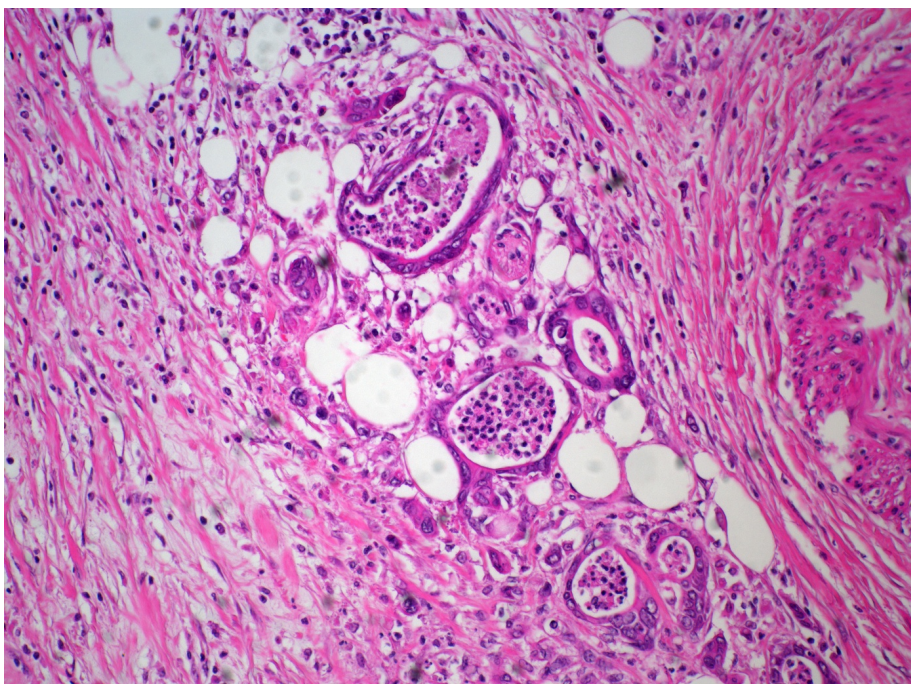
Das Grading des nicht organtypischem kolorektalen Karzinoms, also die Klassifizierung muzinöser, siegelringzelliger und medullärer Karzinome, erfolgt nach der WHO-Klassifikation auf der Basis molekularpathologischer Kriterien. Mikrosatellitenstabile (MSS) Karzinome werden als high grade Karzinome, mikrosatelliteninstabile Karzinome (MSI-H) als low grade Karzinome klassifiziert.

## 2.9 Tumor Budding

An der Invasionsfront kolorektaler Karzinome finden sich unterschiedliche Wachstumsmuster der Tumorzellen. Es gibt Tumore, die eine breite Invasionsfront aufweisen, aber auch Tumore mit Tumoreinzelzellen, das sogenannte Budding. Dieses Tumor Budding wurde erstmals von Imasi 1949 beschrieben. Allerdings nannte er diese Beobachtung an der Invasionsfront nicht Budding

sondern „Sprouting“. Der Begriff Budding wurde erstmals von Hase et al. in Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen benutzt. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Budding und der Rezidivrate sowie dem Überleben von Patienten.[35] Mehrere Studien zeigten, dass es größere prognostische Validität als das allgemeine Grading haben könnte.<sup>35</sup>

Dem morphologischen Bild des Buddings liegt ein embryonales Zellprogramm der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zugrunde.<sup>36</sup> EMT ist eine Abfolge von Zellveränderungen, die einer Epithelzelle erlaubt, seinen durch starke interzelluläre Verbindungen charakterisierten epithelialen Zellverband zu verlassen und sich in eine unabhängige fibroblastenartige Zelle mit migrativen Eigenschaften zu verwandeln und so in die extrazelluläre Matrix einzudringen. Dieser Prozess erlaubt es, während der Embryonalperiode aus einem einschichtigen Epithel der Keimscheibe die komplexen Gewebsstrukturen eines Embryos zu entwickeln. EMT, dieser hochkomplexe, kontrolliert ablaufende Prozess, der von einer Vielzahl verschiedener Transkriptionsregulator-Familien unter Mitwirkung verschiedener Signaltransduktionswege kontrolliert wird, ist in den meisten ausgereiften Geweben stark restringiert.<sup>37</sup>



*Abb. 2a: Mikroskopischer Schnitt mit Tumor Budding aus dem von uns ausgewähltem Kollektiv*

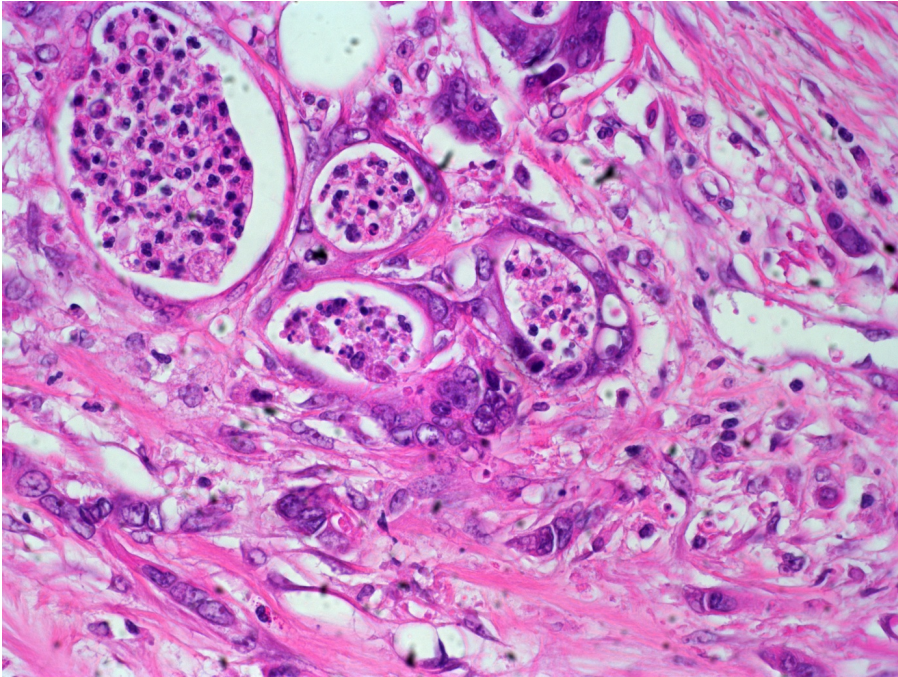


Abb. 2b: Mikroskopischer Schnitt mit Tumor Budding aus dem von uns ausgewähltem Kollektiv

## 2.10 Karzinogenese

Die Reifung des normalen Oberflächenepithels des Darmes, ausgehend von der Stammzelle an der Kryptenbasis, bis zur Oberfläche dauert 3 bis 4 Tage und unterliegt einer strengen spatiotemporalen Regulation.

Die Stammzellen des Kryptenepithels sind durch einen embryonalen Methylierungsstatus gekennzeichnet und werden von den die Krypten umgebenden Stromazellen, den perikryptischen Myofibroblasten<sup>38</sup> mit Wnt-Signalweg-Liganden versorgt. Diese Liganden können über einen negativen Rückkopplungsmechanismus (methylierte APC-Promotoren) das APC-Gen unterdrücken und so zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin-Konzentration im Zytoplasma führen. Die Tochterzelle wird dann entlang der Längsachse des Tubulus durch fortwährende nachfolgende Teilungen zur Oberfläche transportiert und reift aufgrund des Wegfalls der Wnt-Signale, der am Boden der Krypten zurückbleibenden Stromazellen, unter strikter Kontrolle des  $\beta$ -Catenin-Spiegels durch das APC-Gen aus. Durch den Wegfall der Wnt-Signale wird das APC-Gen aktiviert, was zu einem Abbau von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma der sich entwickelnden Zelle führt. Der embryonale Methylierungsstatus der Tochterzelle ändert sich ebenfalls.



Bei der multifaktoriellen Karzinogenese hin zum kolorektalen Karzinom wird nun dieser physiologische Prozess durchbrochen. Dies kann zum einen durch einen Verlust der Heterozygotität (LOH) durch Mutation des APC-Gens oder des  $\beta$ -Catenin-Gens erfolgen, zum anderen, dass die Tochterzelle im Methylierungsstatus der Kryptenstammzelle verharrt. Das erhöht deren Empfindlichkeit zum Erwerb verschiedener weiterer Mutation in anderen Genen, die bei der Ausreifung der Epithelzelle beteiligt sind, denn die Mutation eines Gens allein reicht nicht zur Entwicklung eines Karzinoms aus. Hier müssen mehrere weitere genetische Veränderungen hinzukommen.

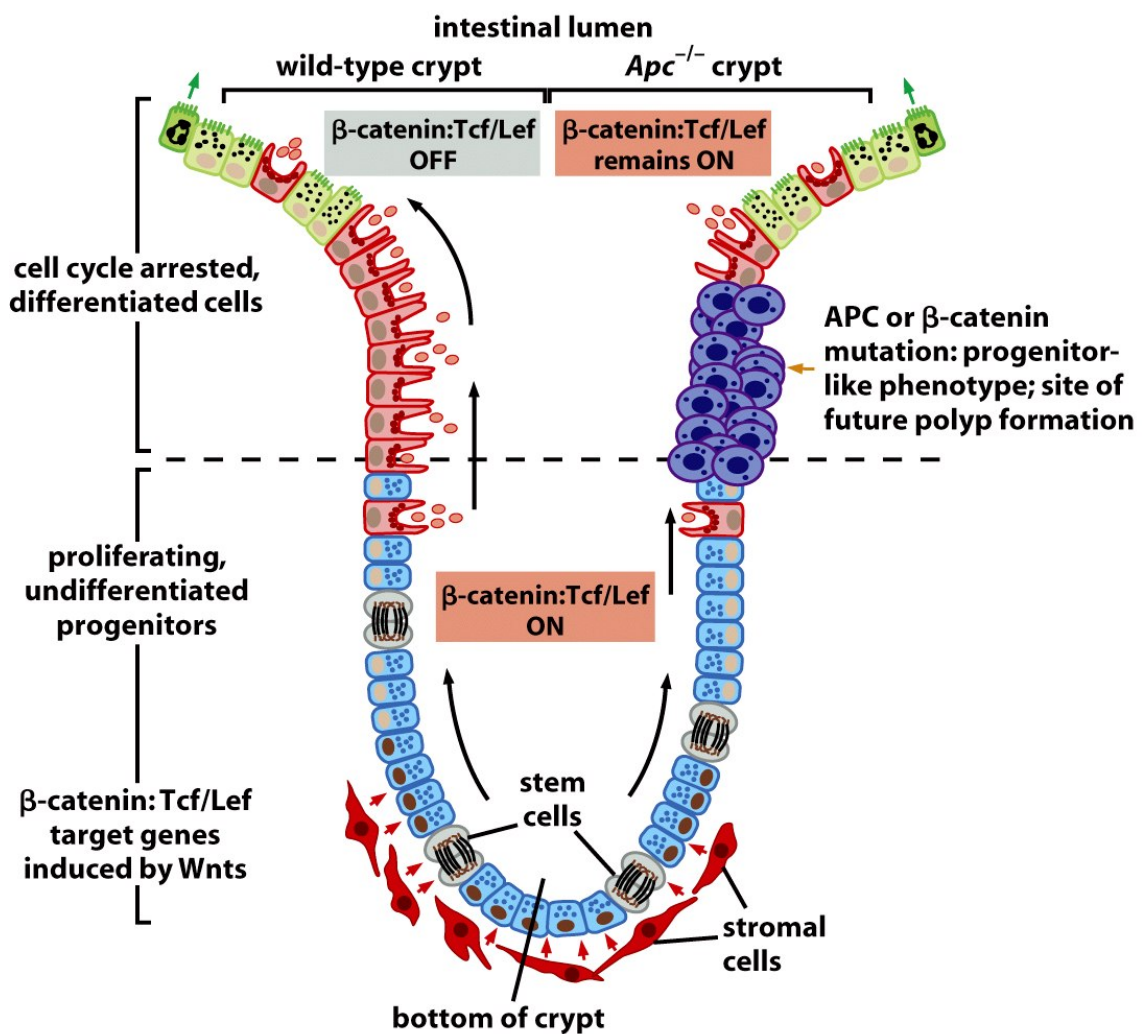


Abb. 3: Die Karzinogenese beim CRC geht von Stammzellen am Kryptenboden aus<sup>39</sup>

Basierend auf diesen Zusammenhängen können nun drei Entwicklungswege des sporadischen kolorektalen Karzinoms abgegrenzt werden, an denen u.a. folgende molekulare Mechanismen beteiligt sind:

- a) Chromosomale Instabilität (CIN),
- b) Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen (p16, p53, APC, KRAS, BRAF, Beta-Catenin), Wnt-Signalweg, Mikrosatelliteninstabilität (MSI),
- c) Änderung des Status der Methylierung von Genen mit Ausbildung des CpG island methylator phenotype (CIMP).<sup>40</sup>

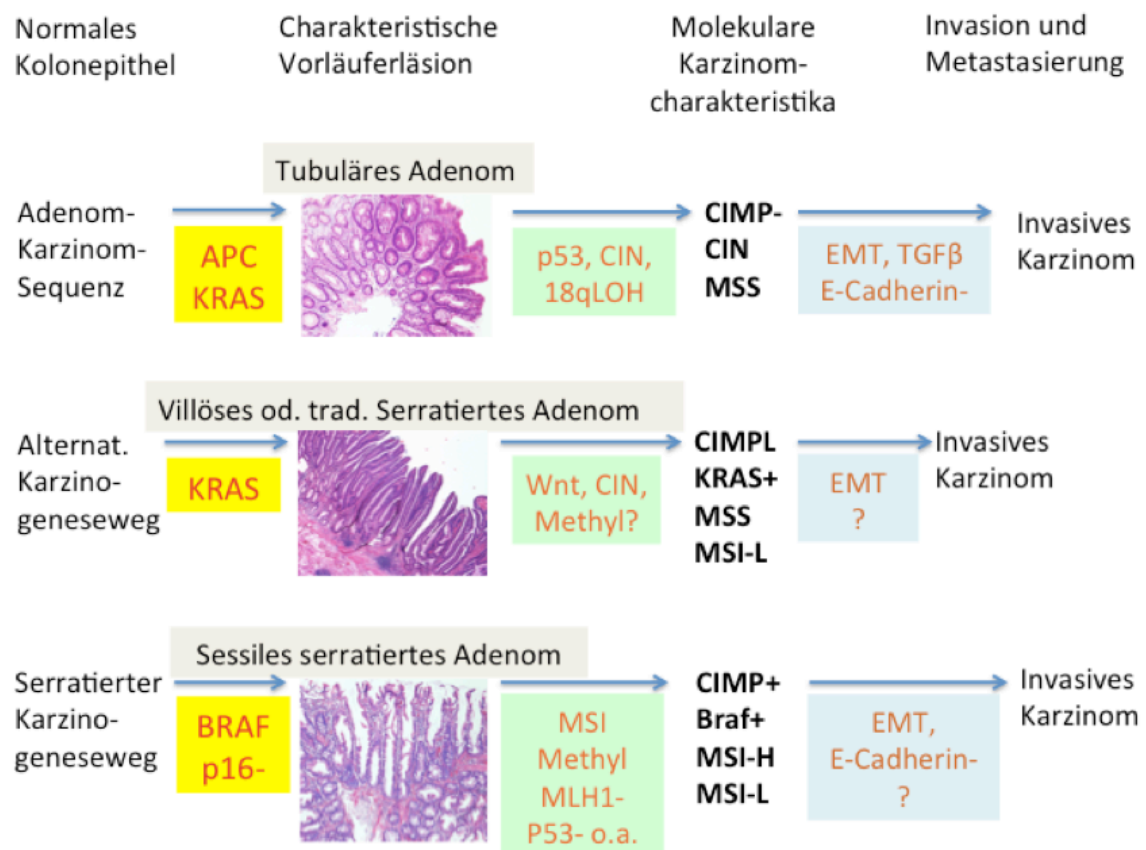


Abb. 4: Die Karzinogenesewege des kolorektalen Karzinoms<sup>50, 94</sup> (Gelb: primäre Mutationen der Adenomentsstehung; grün: zusätzlich erworbene genetische Veränderungen zur Karzinomentsstehung; blau: notwendige Veränderung für Invasion und Metastasierung. EMT = epithelial-mesenchymale Transition)

### **2.10.1 Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein (Chromosomale Instabilität und Tumorsuppressor-Phänotyp)**

Etwa 60 Prozent der sporadischen kolorektalen Karzinome zeigen eine chromosomale Instabilität (CIN) des Tumorsuppressor-Phänotyps. Muto et al. zeigten 1975 auf der Basis morphologischer Analysen für das kolorektale Karzinom die Adenom-Karzinom-Sequenz, ausgehend von einer normalen Mukosa, die Entstehung eines tubulären Adenoms aus einem aberranten Kryptenfokus über schwergradige Dysplasien zum Karzinom. Vogelstein et al. konnten 1990 die zugrunde liegenden verschiedenen genetischen Mutationen entschlüsseln. So konnte ein erstes molekulares Tumorprogressionsmodell für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen formuliert werden.<sup>41</sup> Dieses Modell ist auch heute noch für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), sowie die Mehrzahl der sporadischen kolorektalen Karzinome anerkannt.

In Vogelsteins Modell steht am Anfang die Mutation des Tumorsuppressorgens APC auf Chromosom 5. Physiologischerweise reguliert APC die zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Konzentration indem es mit zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin eine Bindung eingeht. Das APC-gebundene  $\beta$ -Catenin wird phosphoryliert und im Proteasom abgebaut. Fehlt APC, bindet sich  $\beta$ -Catenin fälschlicherweise an den Transkriptionsfaktor 4 (TCF4). Der  $\beta$ -Catenin-TCF4-Komplex führt nach Verlagerung in den Zellkern zu einer Genaktivierung. APC bewirkt somit eine Blockade des genaktivierenden Wnt-Signalwegs, einem physiologischen Prozess während der Entwicklung von der Stammzelle zur reifen Epithelzelle. Erst der Verlust des zweiten Allels des APC-Gens (Verlust der Heterozygotie) führt jedoch zu dessen Funktionsverlust. Rund 60 % der kolorektalen Karzinome und 63 % der Adenome haben eine Mutation im APC-Gen. Bei FAP ist diese Mutation obligat, bei der Mehrzahl der sporadischen kolorektalen Karzinome ist dieser Weg an der Entstehung beteiligt.<sup>41-48</sup>

Eine weitere wichtige frühe genetische Veränderung in der Genese des kolorektalen Karzinoms sind Mutationen im KRAS-Gen (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) oder im NRAS-Gen (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog). RAS sind Protoonkogene (Gene, die durch Mutationen in Onkogene

umgewandelt werden können) und haben wichtige Funktionen u. a. im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung über den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg.<sup>49</sup> Kommt es in empfangsbereiten Zellen zu KRAS-Mutationen, führt dies zu einer erhöhten Proliferationsaktivität.<sup>49-51</sup> Bei KRAS-Mutationen von kolorektalen Karzinomen finden sich am häufigsten Mutationen im Codon 12 und Codon 13. Adenome zeigen in 12-75 % eine KRAS-Mutation, wobei diese umso häufiger vorkommt, je größer das Adenom ist. Adenome kleiner als 1 cm haben meist keine KRAS-Mutation.<sup>41,51,52</sup> Laut Vogelstein et al. folgt die KRAS-Mutation dabei meist der APC-Mutation; aus heutiger Sicht ist diese zeitliche Komponente allerdings zu vernachlässigen.

Funktionsverlust von APC und Mutation des KRAS-Gens führen zu einer erhöhten proliferativen Aktivität des betroffenen Kolonepithels dessen morphologisches Korrelat das Adenom darstellt. Die molekularen und morphologischen Charakteristika eines malignen Tumors werden jedoch durch Mutationen in diesen Genen nicht erreicht. Sie legen vielmehr auf der Basis einer erhöhten proliferativen Aktivität den Grundstein für eine erhöhte Empfindlichkeit weitere Mutationen zu akquirieren.

Im nächsten Schritt hin zum Karzinom spielen im Vogelsteinmodell das Tumorsuppressorgen p53 (Protein 53) auf Chromosom 17 (17p12-13) und Genverluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 18 (18q, hier finden sich unter anderem die Gene DCC (deleted in colorectal Carcinoma), SMAD2 und SMAD4) eine wichtige Rolle. Physiologisch ist p53 u. a. an der Einleitung des programmierten Zelltodes in Folge von DNA-Schäden beteiligt. p53 ist ein wichtiger Kontrollpunkt in der Interphase, des Überganges von der G1-Phase in die Synthesephase. Bei Ausfall dieses Kontrollmechanismus kann eine fehlerfreie Vermehrung der DNA nicht mehr gewährleistet werden; fehlerhafte DNA wird dann an die Tochterzellen weitergegeben.<sup>53</sup> Neben Mutationen im p53-Gen (meist handelt es sich um Punktmutationen) sind strukturelle Allelverluste für den Verlust der Heterozygotie verantwortlich.<sup>54</sup> p53-Mutationen sind in weniger als 10 % der Adenome und in 31-78 % der CRC zu finden. Das DCC, ein weiteres Tumorsuppressorgen, liegt auf Chromosom 18q21-22. Bei ca. 4 % der kolorektalen Karzinome wurde diese Mutation nachgewiesen.<sup>41,55</sup>

Der Einfluss der oben beschriebenen genetischen Veränderung führt zu einem charakteristischen Phänotyp mit struktureller Chromosomenveränderung (Polyploidie, Aneuploidie, Deletion und Vermehrung von Chromosomenabschnitten) den sogenannten CIN-Phänotyp oder Tumorsuppressorphänotyp.<sup>56</sup> Diese Tumore sind mikrosatellitenstabil (MSS) und zeigen keine Störungen des Methylierungsstatus ihrer Gene (CIMP-negativ).

### **2.10.2 Serrierter Karzinogeneseweg**

Als Ausgangsläsion wird der hyperplastische Polyp angesehen. Am Anfang stehen hier Mutationen des BRAF-Gens und Verluste der Funktion von p16. Das morphologische Korrelat ist dann das sessile serratierte Adenom. Diese initialen Mutationen führen zu einer Störung der Apoptose und zur Überalterung der Zellen mit der Konsequenz eines hypermethylierten Genoms u.a. in GC-reichen Promotorabschnitten der DNA. Toyota et al. postulierten 1999 für eine Untergruppe der kolorektalen Karzinome diesen Mechanismus der Karzinomentstehung (CIMP), charakterisiert durch eine ausgedehnte Methylierung sieben Cytosin-Guanin-reicher Genabschnitte (die sogenannten MINT = Methylierung in Tumor). Häufig hypermethylierte Gene sind CDKN2A (p16) und das Mismatch-Repairgen (MMR-Gen) MLH1.

Insgesamt finden sich sieben MMR-Gene: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 und PMS2. Diese Proteine können Fehlpaarungen in DNA-Doppelsträngen erkennen und herausschneiden.<sup>57,58</sup> Vor allem repetitive Gensequenzen, das sind DNA-Abschnitte mit sich wiederholenden Mono- bzw. Dinukleotiden, die Mikrosatelliten, sind empfindlich für Mutationen. Diese repetitiven Sequenzen sind häufig in genregulatorischen Promotorregionen vor den die Gene kodierenden DNA-Abschnitten gelegen. Der Methylierungsstatus (hypo- oder hypermethyliert) der betroffenen Promotorregion entscheidet darüber, ob das nachgeschaltete Gen abgelesen wird oder nicht. Handelt es sich um Tumorsuppressorgene oder Onkogene, hat das einen direkten Einfluss auf deren Funktion, die dann je nach Methylierungsstatus an- oder abgeschaltet wird. Eine Hypermethylierung der genregulatorischen DNA-Abschnitte im Bereich der

MMR-Gene führt letztendlich über das Ausbleiben der Synthese der zugehörigen MMR-Proteine zu einem Ausfall dieses DNA-Reparaturmechanismus<sup>59</sup> und zur Akkumulation weiterer Mutationen, u.a. dem Ausfall von p53. Je nach Anzahl der betroffenen MMR-Gene wird zwischen hochmikrosatelliteninstabilen MSI-H und niedrigmikrosatelliteninstabilen MSI-L Karzinomen unterschieden.

Die molekularen Charakteristika der Karzinome des serratierten Karzinogenese-Weges sind somit eine BRAF-Mutation, CIMP mit hypermethylierten DNA-Abschnitten und eine konsekutiv erworbene Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L oder MSI-H).

### **2.10.3 Der alternative Karzinogenese-Weg**

Die initiale genetische Veränderung des alternativen Karzinogeneseweges ist eine Mutation im KRAS-Gen, die zu den morphologischen Vorläuferläsionen eines villösen Adenoms oder eines traditionellen serratierten Adenoms führen. Erst im zweiten Schritt treten Veränderungen im WNT-Signalweg hinzu. Der Methylierungsstatus der Gene ist ebenfalls verändert, jedoch in einem geringeren Ausmaß (als CIMP-L bezeichnet) als beim serratierten Karzinogeneseweg. Chromosomale Instabilität kommt vor. Die molekularen Charakteristika dieses Subtyps sind eine KRAS-Mutation, ein gering veränderter Methylierungsstatus (CIMP-L), eine Mikrosatellitenstabilität (MSS) oder eine geringe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L).<sup>56</sup>

## **2.11 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasierung**

Das Vorliegen von Fernmetastasen ist der entscheidende unabhängige Marker für die Prognose eines kolorektalen Karzinoms. Die den oben beschriebenen morphologischen und molekularen Charakteristika einer dynamischen Tumorphprogression und eines autonomen Tumorwachstums zugrunde liegenden Mechanismen haben in der Adenom-Karzinom-Sequenz ihr morphologisches Korrelat. Trotz Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, Methylierung, chromosomaler Instabilität und Mikrosatelliteninstabilität sind die Tumor-

zellen noch durch Interzellularkontakte verbunden und bilden tubuläre Strukturen. An der Invasionsfront hingegen zeigt sich ein abweichendes morphologisches Bild. Die Tumorepithelien zeigen einen Verlust des Zellzusammenhangs, dissoziieren in die Umgebung und bilden Tumoreinzelzellen oder kleine Tumorzellverbände. Morphologisches Korrelat ist das Tumorzellbudding. Die Tumorzellen verlieren morphologisch und molekulargenetisch die für Epithelzellen typischen Eigenschaften. Sie ähneln morphologisch mesenchymalen Zellen. Dieser als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnete Prozess ist vorübergehend und kann sich in der Metastase umkehren in die Form einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET).<sup>60</sup> Basis der EMT ist ein aberrantes WNT-Signaling mit  $\beta$ -Catenin-Akkumulation im Zellkern der Tumorzellen an der Invasionsfront im Gegensatz zu den Zellen im Tumorzentrum mit membranöser  $\beta$ -Catenin-Expression.  $\beta$ -Catenin ist eines der Hauptproteine im Cadherin-Catenin-Komplex von Zell-Zellverbindungen.<sup>61</sup> Die intrazelluläre Verteilung des  $\beta$ -Catenins (nukleär versus membranös) und somit der Tumorzellphänotyp (differenziert im Tumorzentrum versus EMT mit Budding an der Invasionsfront) werden maßgeblich von den Zellen in der Umgebung des Tumors, dem Tumormilieu oder Tumormikroenvironment beeinflusst.

Durch die vom Tumormikroenvironment mittels Zytokinen (TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , TFF, IGF, EGF, HGF) über Tyrosinkinase induzierte Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins führt zu dessen nukleärer Akkumulation.

Zu den durch  $\beta$ -Catenin beeinflussten nukleären Zielgenen zählen Proliferationsgene (c-myc, cyclin-D1), onkogene Transkriptionsfaktoren (c-jun, efs2, fra-1, ITF1), Tumorsuppressorgene (conductin/axin-2, Tcf-1), trophische (Gastrin, PPARdelta) und morphogenetische Faktoren (BMP-4, ephrinB2/B3). Zudem werden Gene, die EMT und Metastasierung ermöglichen, von einer nukleären  $\beta$ -Catenin-Akkumulation beeinflusst. Dazu zählen Gene, die Stammzeleigenschaften (MDR, survivin) und Differenzierungsverlust (Cdx1, Id2, Enc-1) induzieren, bzw. für die ein direkter Zusammenhang als EMT-Inducer (slug) gezeigt werden konnte. Weiterhin sind Einflüsse des  $\beta$ -Catenins auf die Angiogenese (V-EGF), die Degradation von extrazellulären Matrixproteinen (MMP-7, MMP-

26, MT1-MMP und UPA-R), die Migration fördernden Gene (laminin, fibronectin) und CD44 beschrieben.

EMT wird zusätzlich von Tumormilieuaktoren durch Aktivierung von EMT-Inducern (snail, slug, ZEB1) beeinflusst. Das Tumormikroenvironment hat über MMPs zudem Einfluss auf die E-Cadherin-Funktion.<sup>62</sup>

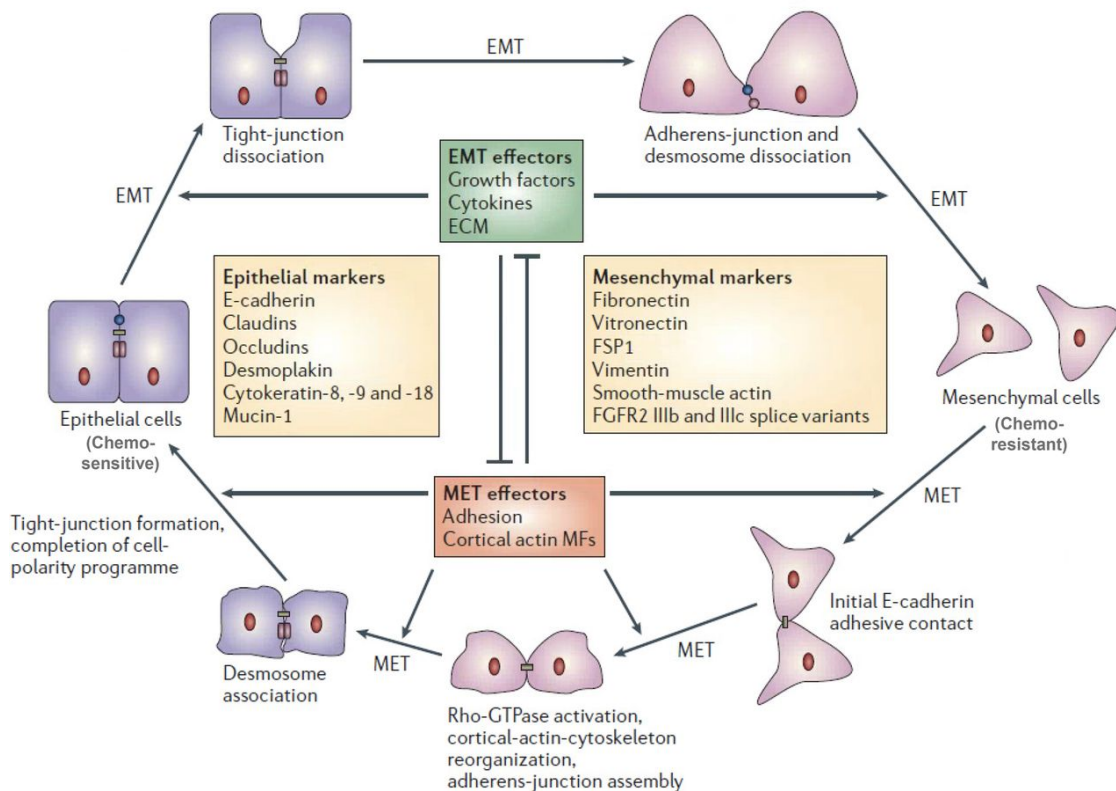


Abb. 5: Schematische Darstellung der EMT und MET<sup>60</sup>

## 2.12 Signaltransduktionswege in kolorektalen Karzinomen

Signaltransduktoren sind rezeptorgekoppelte Moleküle (Proteine), die nach Anbinden des Signalmoleküls an den Rezeptor in einen aktivierten Zustand versetzt werden und nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die unterschiedlichste, zellspezifische Funktionen aktivieren, aber auch eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Zellproliferation, Überleben und auch Apoptose spielen.



Hierzu zählen membranassoziierte G-Proteine, die zytoplasmatisch nahe der Zellmembran lokalisiert sind und die guaninhaltige Nucleotide (GTP und GDP) binden können. Hierzu zählen RAS-Proteine und das Mitogenaktivierende Proteinkinasesystem (MAPK-System). Zytoplasmatisch lokalisierte Serin-Threonin-Proteinkinasen werden unter dem Einfluss von Mitogenen aktiviert, z.B. Proteinkinase C. Sie phosphorylieren weitere Proteine und versetzen diese damit ebenfalls in einen aktiven Zustand. Einige Tumorpromotoren werden darüber aktiviert.

### 2.12.1 Mitogenaktivierende Kinase (MAPK) System

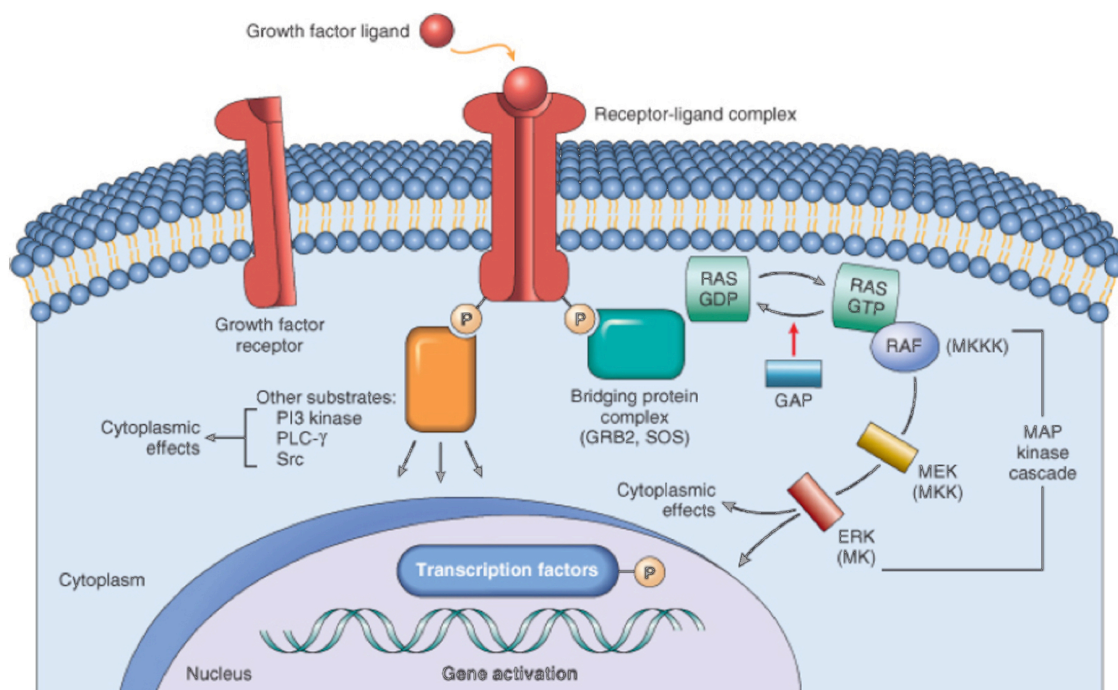


Abb. 6: MAPK-Signaltransduktionsweg<sup>63</sup>

Wenn sich ein extrazellulärer Ligand an den EGF-Rezeptor bindet, wird der MAPK-Signalweg über eine nachgeschaltete aufeinander folgende aktivierende Kaskade aus Proteinkinasen (KRAS, BRAF, MEK, ERK) aktiviert (Abbildung 6). So werden über intrazelluläre Wege unter anderem Zellproliferation, Angiogenese, Migration und das Zellüberleben beeinflusst. Bei Tumoren kann eine Mu-

tation in einem der Teile des MAPK-Systems zu einem unkontrollierten Wachstum führen.

Häufige Mutationen im MAPK-System bei kolorektalen Karzinomen betreffen das KRAS- und das BRAF-Gen. KRAS-Mutation in Codon 12 oder Codon 13 von Exon 2 bzw. Codon 61 von Exon 3 oder die V600E-Mutation im BRAF-Gen sind hierbei die häufigsten Mutationen.<sup>64</sup> RAS-Mutationen führen zu einer unkontrollierten Aktivierung der nachfolgenden Proteinkinasen, die nicht durch eine Blockierung der vorgeschalteten Kinasen oder des EGF-Rezeptors unterbrochen werden kann. Eine Anti-EGFR-Therapie kommt deshalb nur bei Wildtyp-Tumoren zum Einsatz.

### **2.12.2 Rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS)**

RAS-Proteine gehören zur Gruppe der kleinen GTPasen mit einer Molekülmasse von 20-40 Kilodalton.<sup>65,66</sup> RAS-Proteine sind onkogene Signaltransduktoren (membranassoziierte G-Proteine) mit stimulierender Wirkung auf den Zellzyklus und einer hemmenden Wirkung auf die Apoptose. Durch ein extrazelluläres Signal wird ein Tyrosinkinaserzeptor autophosphoryliert. Dadurch kommt es zu einer Protein-Protein-Komplexbildung der RAS-Proteine mit guaninhaltigen Nucleotiden, die entweder inaktivierend (GDP) oder aktivierend (GTP) wirken. Aktiviertes RAS stimuliert weitere Proteine und mündet in das MAPK-System. RAS-Proteine können zum einen in der inaktiven GDP-gebundenen Konformation oder der aktiven GTP-gebundenen Form vorliegen.<sup>67,68</sup> Mutationen im RAS-Onkogen bewirken, dass RAS überwiegend in seiner aktivierten GTP-gebundenen Form vorliegt.<sup>69,70</sup> Bis heute wurden mehr als 100 weitere G-Proteine entdeckt.<sup>67,68</sup>

Große Bedeutung beim kolorektalen Karzinom hat vor allem KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). KRAS ist bei ca. 30 % aller Tumoren mutiert, dabei findet sich die höchste Prävalenz bei Pankreastumoren (90 %).<sup>71</sup> In kolorektalen Karzinomen werden in der Literatur 30-50 % KRAS-Mutationen erwähnt.<sup>51,72-76</sup> Dabei treten die Mutationen vorwiegend in Codon 12 und 13 von Exon 2 und in Codon 61 von Exon 3 und sowohl im Primärtumor als auch

in Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen auf.<sup>50,77-79</sup> Unabhängige Studien zeigen, dass eine KRAS-Mutation mit einer schlechteren Prognose korreliert.<sup>72,75,80</sup>

2010 präsentierte die American Society of Clinical Oncology (ASCO)-Gruppe eine großangelegte KRAS Untersuchung. Dabei wurden mehr als 16.000 kolorektale Karzinome untersucht. Sie zeigten, dass mehr als 75 % der Mutationen die Punktmutationen G12D und G12V und G13D in Exon 2 betreffen.<sup>81</sup>

Mutation	Neumann et al <sup>5</sup>	Chan et al <sup>82</sup>	Codon
c.35G>A (G12D)	14,1 % (36,0 %)	33,5-34,4 %	12
c.35G>T (G12V)	8,5 % (21,8 %)	21,9-24,4 %	
c.34G>T (G12C)	3,1 % (8 %)	7,9 %	
c.34G>A (G12S)	2,6 % (6,5 %)	4,9-5,7 %	
c.35G>C (G12A)	2,4 % (6,0 %)	6,2-6,6 %	
c.34G>C (G12R)	0,5 % (1,3 %)	1,2-1,4 %	
c.34G>T; c.35G>T (G12F)	0,2 % (0,5 %)	0 %	
c.34G>A; c.35G>T (G12I)	0,1 % (0,3 %)	0 %	
c.38G>A (G13D)	7,3 % (18,8 %)	18,9-19,2 %	13
c.37G>T (G13C)	0,3 % (0,8 %)	<1 %	
c.37G>C (G13R)	0,1 % (0,3 %)	<1 %	
c.38G>T (G13V)	0 % (0 %)	<1 %	
c.37 G>A (G13S)	0 % (0 %)	<1 %	

*Tabelle 4: Häufigkeitsverteilungen von KRAS-Mutationen in Codon 12 und 13 von Exon 2 bei CRC<sup>5, 80</sup>*

### 2.12.3 Rapid accelerated fibrosarcoma bzw. rat fibrosarcoma (RAF)

Die RAF-Proteine sind in drei Genen, ARAF, BRAF und RAF-1 kodiert.<sup>83</sup> Die aktivierten RAF-Proteine phosphorylieren und aktivieren ihrerseits MEK-Kinasen. Dabei sind diese drei Proteine nicht gleichermaßen befähigt in der Ak-

tivierung der MEK-Kinase. In verschiedenen Studien ist BRAF der stärkste MEK-Aktivator unter den RAF-Proteinen.<sup>84–88</sup> BRAF zeigt eine höhere Affinität zu MEK sowie eine höhere Phosphorylierungsrate.<sup>83,89</sup> Im BRAF-Gen sind bis zu 30 Mutationen bekannt. Die häufigste BRAF-Mutation in menschlichen Tumoren betrifft die Punktmutation von Thymin zu Alanin im Exon 15, die eine Änderung der Aminosäuresequenz Valin zu Glutamat an der Position 600 im BRAF-Protein (V600E) zur Folge hat. BRAF-Mutationen treten in 5-15 % bei CRC auf und sind mit MSI assoziiert. Kolorektale Karzinome mit BRAF-Mutationen zeigen morphologisch einen niedrigeren Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Das gemeinsame Auftreten von KRAS- und BRAF-Mutationen in einem Tumor ist eine Rarität.<sup>90–92</sup>

In den letzten Jahren konnten durch molekularpathologische Forschungen die Wichtigkeit weiterer Mutationen aufgezeigt werden. So konnte man in retrospektiven Untersuchungen anhand der OPUS-Studie zeigen, dass zusätzlich Mutationen des KRAS-Gens sowie des NRAS-Gens im Exon 3 (Codon 59 und 61) und Exon 4 (Codon 117 und 146) bzw. des NRAS-Gens im Exon 2 (Codon 12 und 13) ebenso wichtig für den Einsatz einer Antikörpertherapie sind.<sup>93</sup>

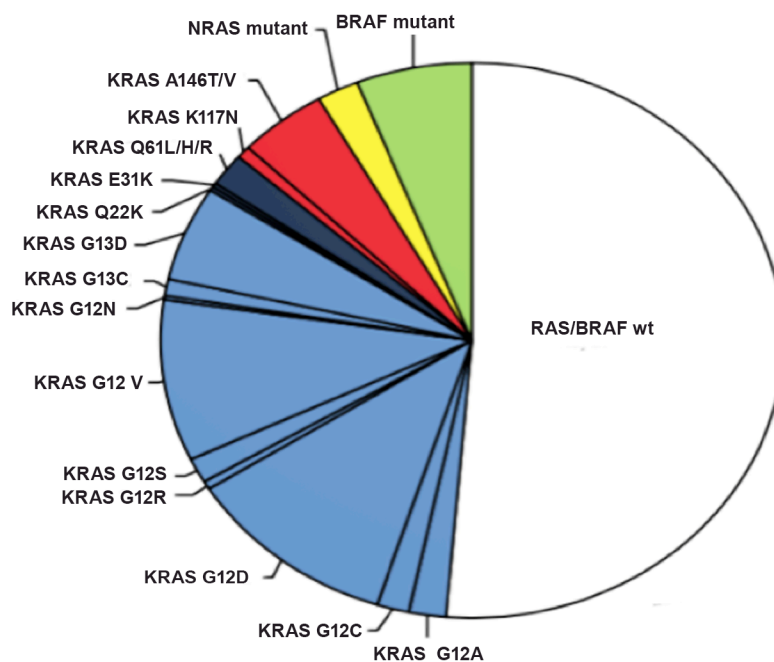


Abb. 7: Häufigkeit von KRAS, NRAS und BRAF Mutationen in CRC<sup>9</sup> (Marineblau: Exon 2 KRAS; Dunkelblau: Exon 3 KRAS; Rot: Exon 4 KRAS; Gelb: NRAS Mutation; grün: BRAF Mutationen; weiß: Wildtypen in CRC)

### 2.13 Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Die oben beschriebenen Erkenntnisse über molekulare Veränderungen in kolorektalen Karzinomen ermöglichen nach Haydon und Jass<sup>94</sup> eine molekulare Klassifikation dieser Tumoren. Hierbei werden auf der Basis eines Vorhandenseins eines Methylatorphenotyps (CIMP) fünf Gruppen unterschieden.

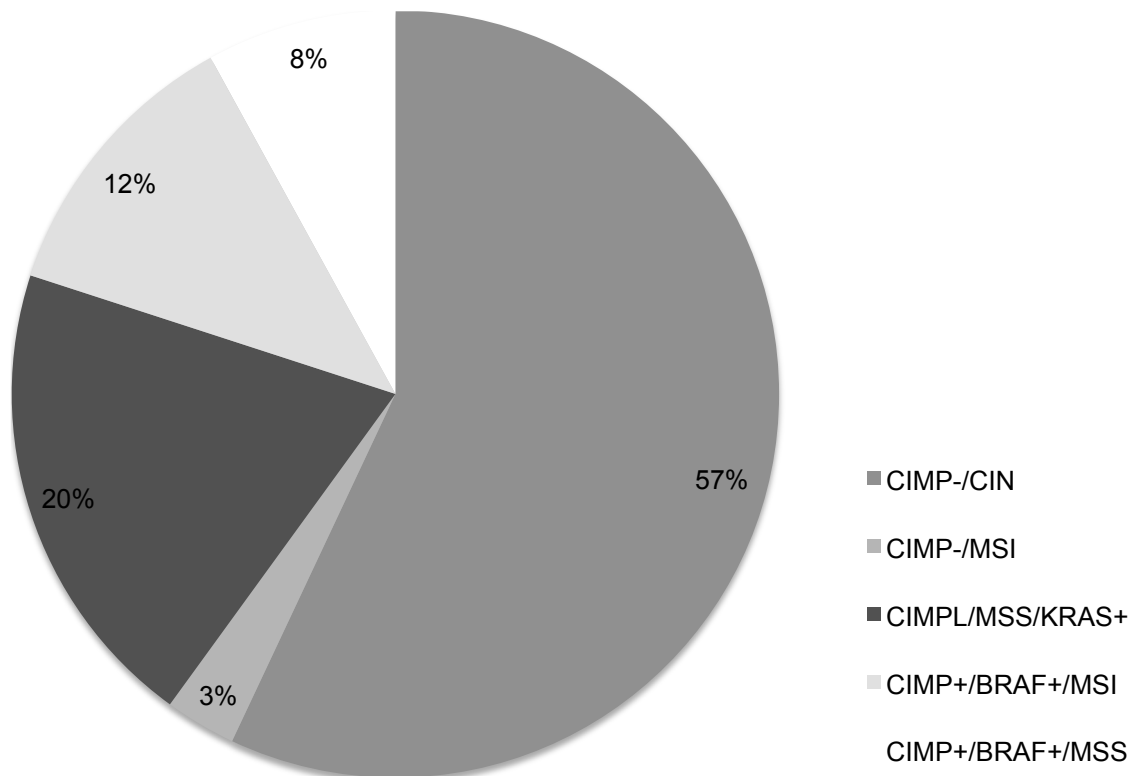


Abb. 8: Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach Haydon und Jass<sup>94</sup>

Typ 1 und 2 sind CIMP-positiv mit Mutationen im BRAF-Gen und unterscheiden sich durch eine Mikrosatelliteninstabilität bzw. stabile Mikrosatelliten. Typ 4 und 5 mit Fehlen eines Methylatorphenotyps (CIMP-), die sich durch eine chromosomale Instabilität bzw. Mikrosatelliteninstabilität unterscheiden. Dazwischen liegt Typ 3 mit einer niedriggradigen CIMP (CIMPL), mit KRAS-Mutationen und stabilen Mikrosatelliten.

Kirchner und Jung klassifizieren die kolorektalen Karzinome auf der Basis des Vorhandenseins einer Mikrosatelliteninstabilität.<sup>95</sup>

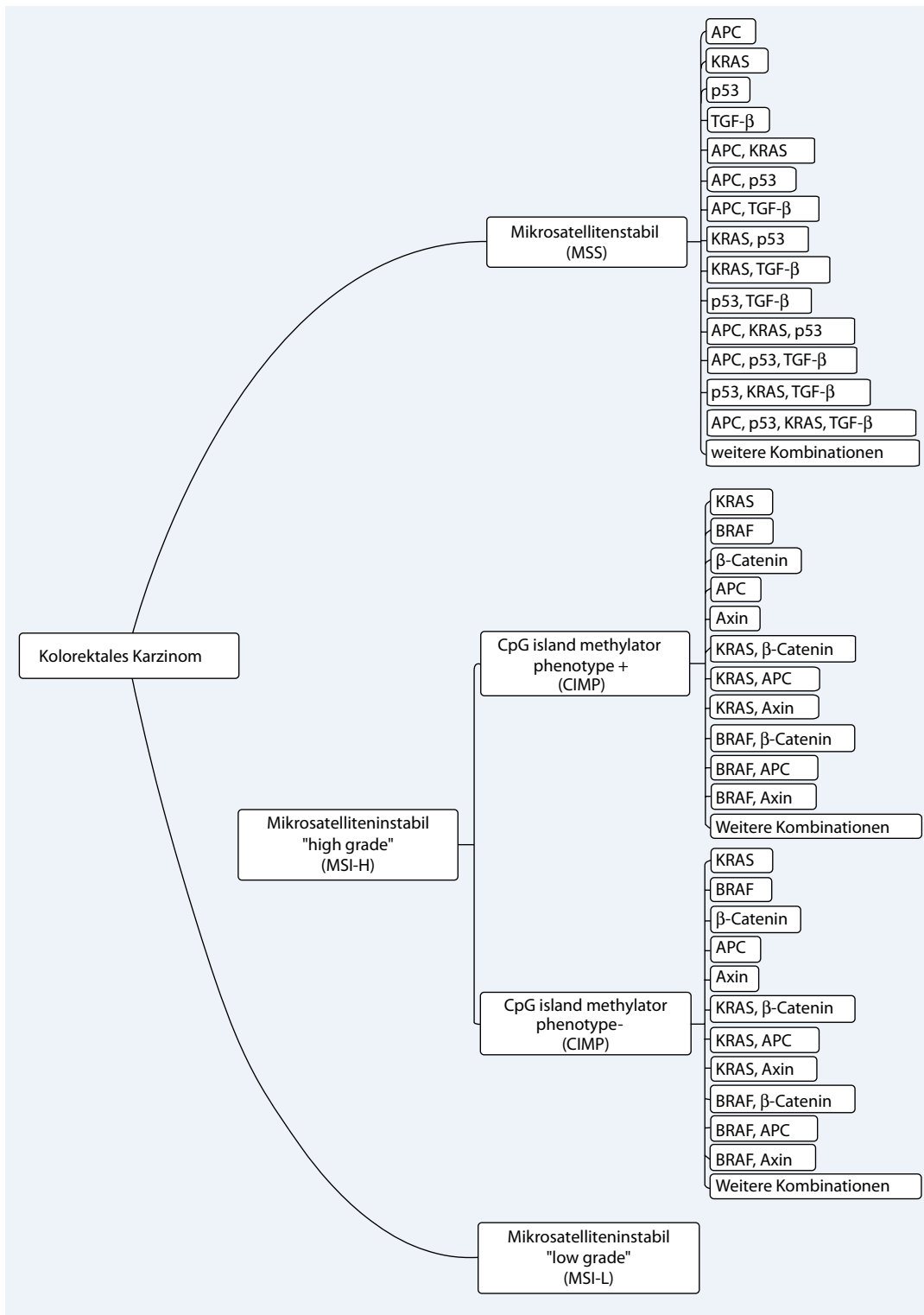


Abb. 9: Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach Kirchner und Jung<sup>95</sup>

Weitere molekulare und transkriptomische Klassifikationen wie die der großen Arbeitsgruppe des Cancer Genom Atlas<sup>96</sup> und weiterer Gruppen haben zu einer integrierten molekularen Konsensus-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms geführt.<sup>97</sup>

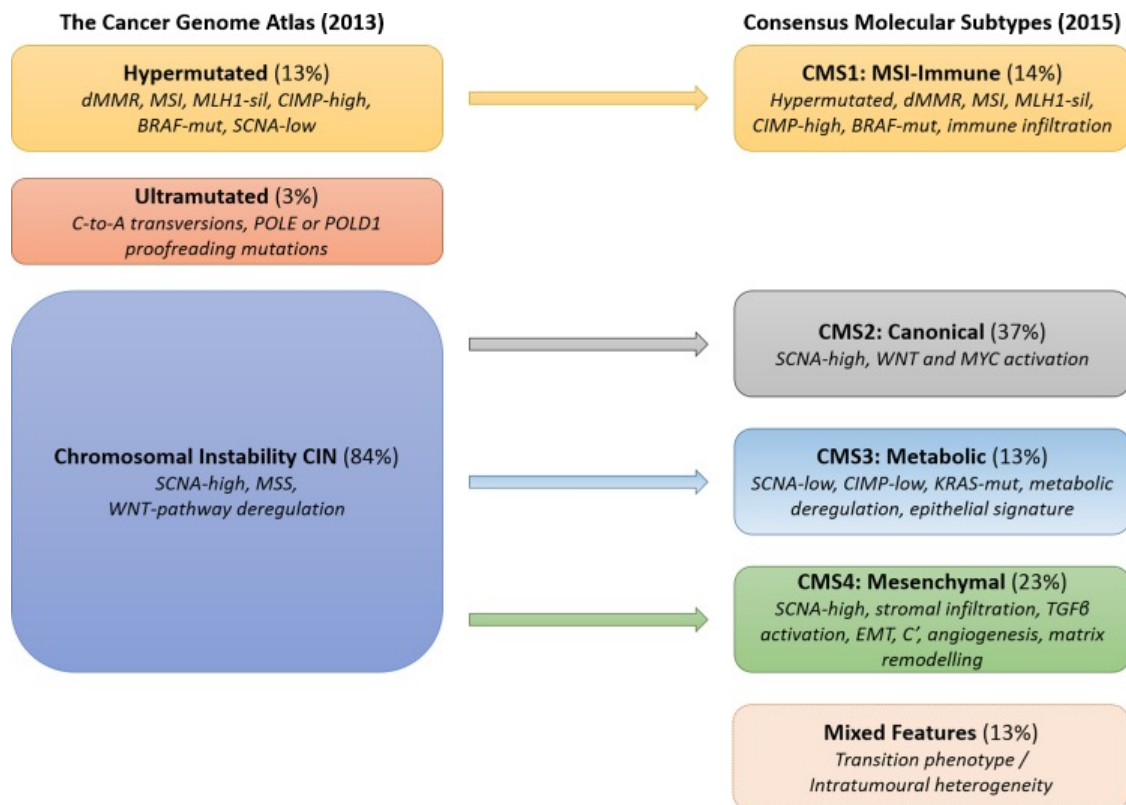


Abb. 10: Integrierte molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms<sup>99</sup>

### 3 Patientenkollektiv

#### 3.1 Alter

In der vorliegenden Arbeit wurden 195 Dickdarm- und Rektumresektate von 195 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom untersucht, 81 (42 %) Dickdarmresektate von Frauen und 114 (58 %) von Männern. Das mittlere Patientenalter betrug 66,2 Jahre, die Altersspanne reichte vom 24. bis zum 88. Lebensjahr.

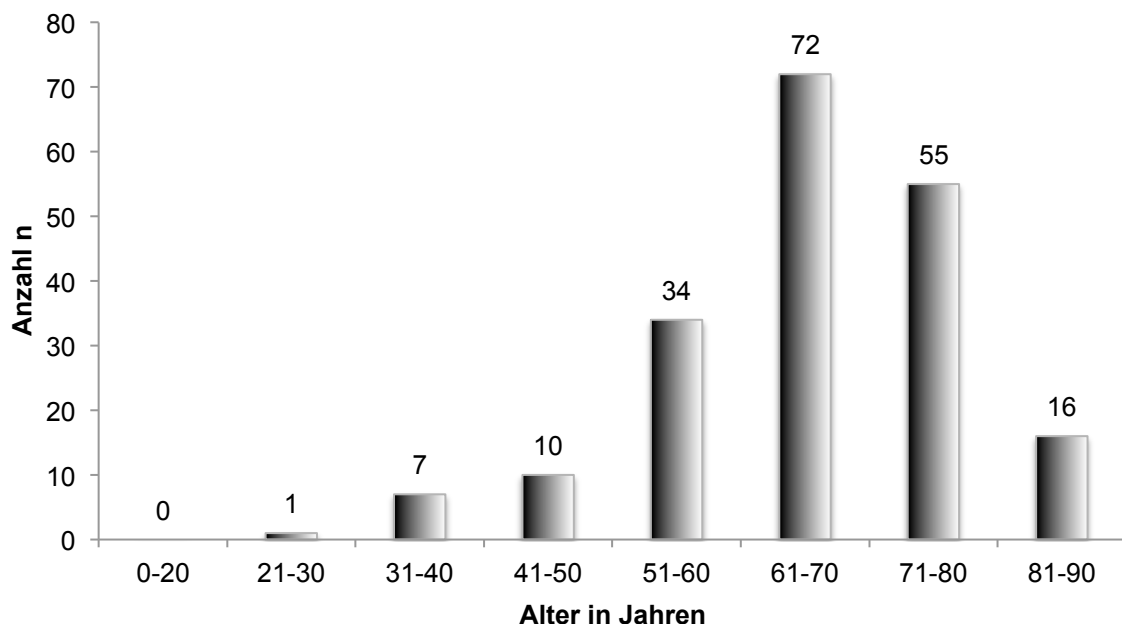


Abb. 11: Altersspanne des ausgewerteten Patientenkollektives

#### 3.2 Lage

Die meisten Tumore fanden sich im Rektum (50/195, 26 %), gefolgt von Coecum (41/195, 21 %) und Colon sigmoideum (40/195, 20 %). Weniger häufig waren Tumore im Bereich des Colon ascendens (21/195, 11 %) sowie dem Colon descendens und am rektosigmoidalen Übergang zu finden (jeweils 15/195, 8 %). Am seltensten fanden sich Karzinome im Colon transversum (11/195, 6 %). Somit fanden sich deutlich häufiger Tumoren linkskolisch 131/195 (67 %) als rechtskolisch 64/195 (33 %).



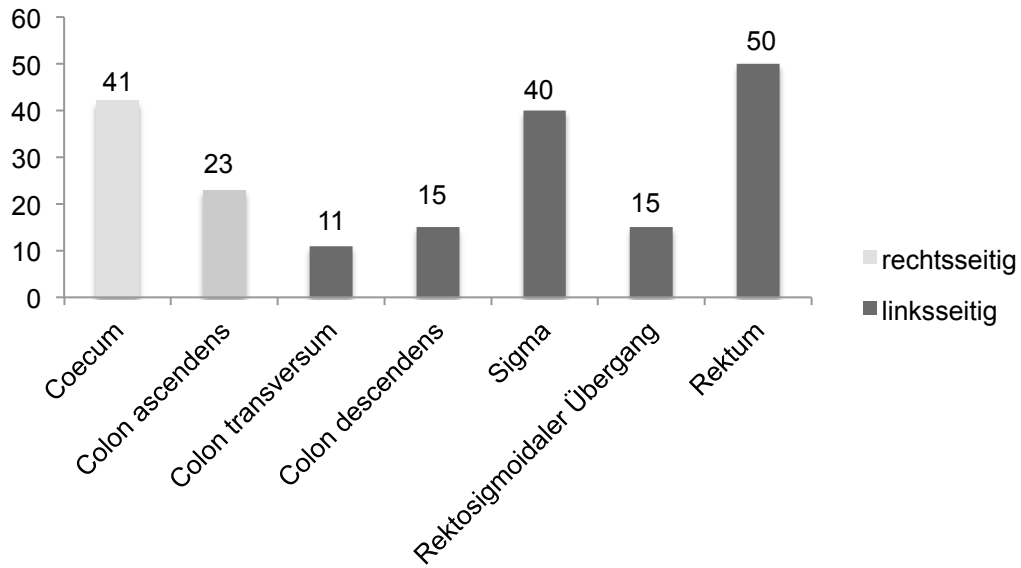


Abb. 12: Lokalisation der kolorektalen Karzinome des Patientenkollektives

### 3.3 Grading

Das Grading erfolgte gemäß der WHO-Einteilung in vier Graduierungsstufen.<sup>33</sup> Mäßig differenzierte (G2) Tumore fanden sich mit 71 % (139/195) am häufigsten, gefolgt von 27 % (52/195) gering differenzierten (G3) kolorektalen Karzinomen. Selten fanden sich gut differenzierte (G1) bzw. undifferenzierte Karzinome (G4) in jeweils 1 % der Patienten (je 2/195).

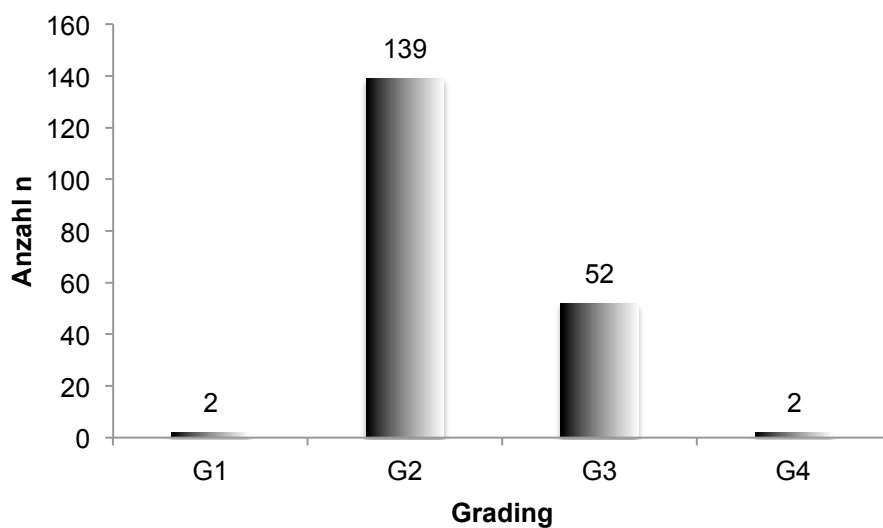


Abb. 13: Differenzierungsgrade der kolorektalen Karzinome des vorliegenden Patientenkollektives

### 3.4 Histologischer Subtyp

Am häufigsten fand sich als histologischer Subtyp das typische Adenokarzinom des Kolorektums mit 91 % (178/195), gefolgt vom muzinösen Adenokarzinom mit 8 % (16/195). Lediglich ein Patient zeigte ein kleinzelliges Karzinom.



Abb. 14: Histologische Subtypen der kolorektalen Karzinome des vorliegenden Patientenkollektives

### 3.5 Klassifikation UICC-Stadium

Patienten in fortgeschrittenen UICC-Tumorstadien (IV A und IV B) waren mit 37 % (72/195 Fälle) am häufigsten zu finden. 32 % der Patienten (63/195), eingeteilt in die Untergruppen III A-C, hatten alleinige Lymphknotenmetastasen. 31 Prozent der Patienten (60/195) hatten lediglich einen Primärtumor unterschiedlicher Eindringtiefe ohne Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen.

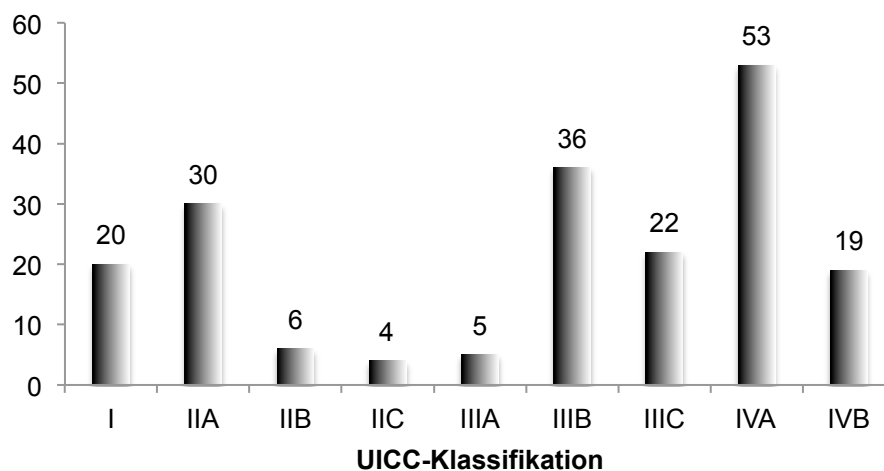


Abb. 15: UICC-Stadien der CRC des vorliegenden Patientenkollektives

### 3.6 Morphologische Veränderung der Tumorepithelien innerhalb des Tumors und an der Invasionsfront

An der Invasionsfront wurden in der hier vorgestellten Arbeit einerseits das Abknospen von Tumoreinzellen (Budding) untersucht. Tumor Budding fand innerhalb des Tumors (intratumorales Budding) oder an der Invasionsfront statt. Neben dem Abknospen von Tumoreinzellen wurden in der hier vorliegenden Untersuchung weitere morphologische Veränderungen analysiert. Die Art der Ausbreitung der Tumorzellkomplexe an der Invasionsfront wurde in zwei Grundmuster (Pattern) eingeteilt: Der Tumor dehnt sich breitflächig, gleichmäßig begrenzt, in Form großer plumper Tumorzellkomplexe mit relativ scharf begrenzter Invasionsfront (Pattern breit) aus (Abbildung 16). Oder der Tumor breitet sich nicht breitflächig, mit unregelmäßig geformter, nicht glatt begrenzter Invasionsfront und relativ kleinen Tumorzellkomplexen (Pattern nicht breit) aus (Abbildung 17).

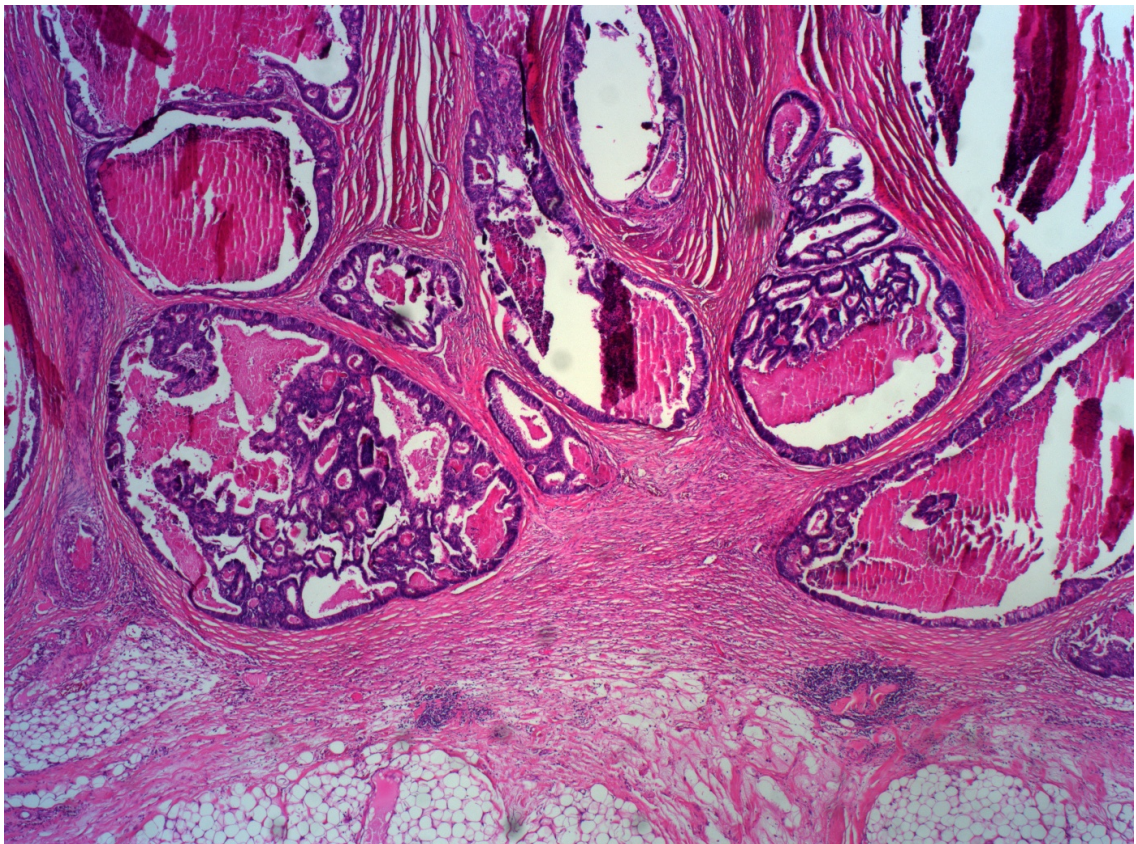


Abb. 16: Beispielhaft ein kolorektales Karzinom mit großen Tumorzellkomplexen und breiter Invasionsfront

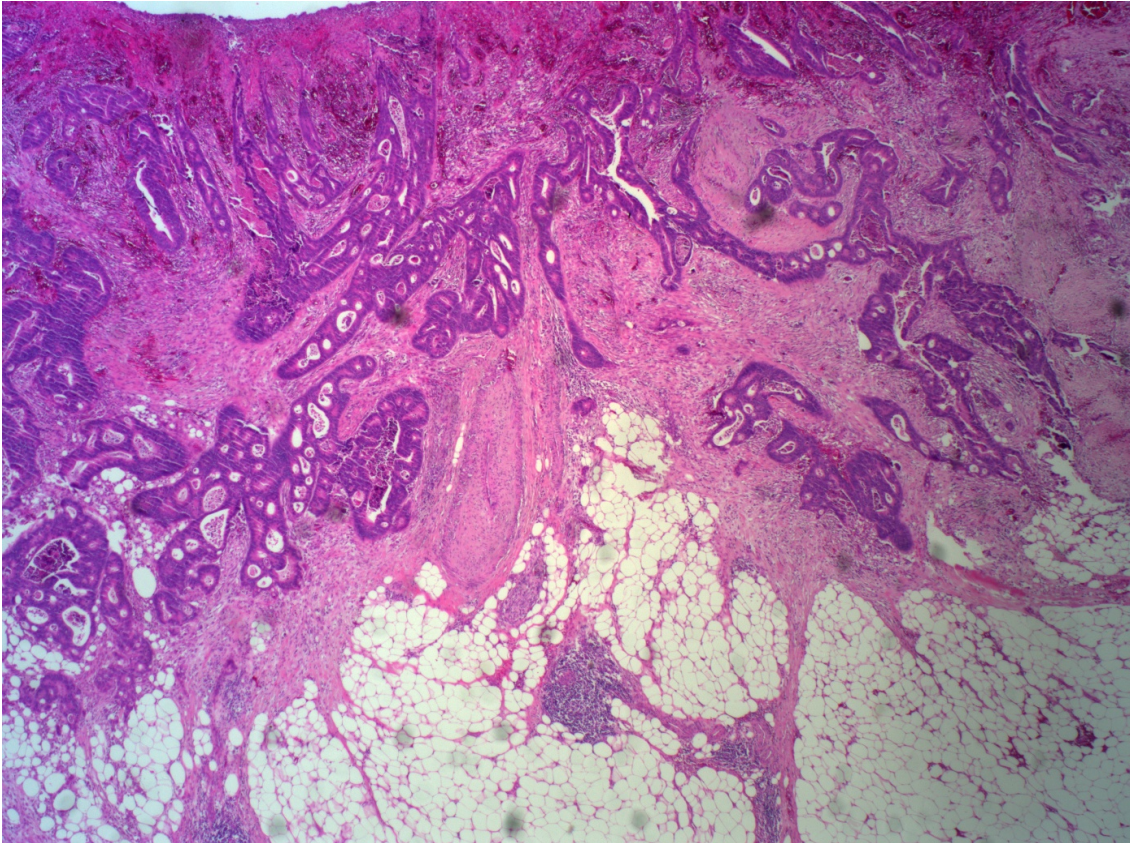
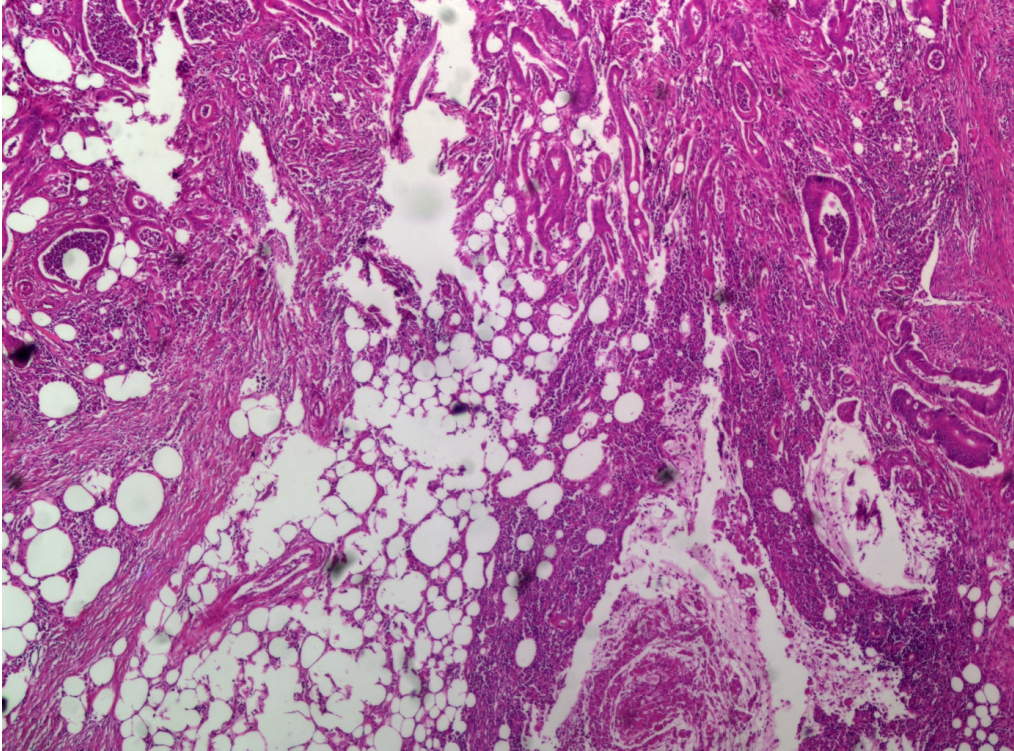


Abb. 17: Beispielhaft ein kolorektales Karzinom mit kleinen Tumorzellkomplexen und unregelmäßiger Invasionsfront

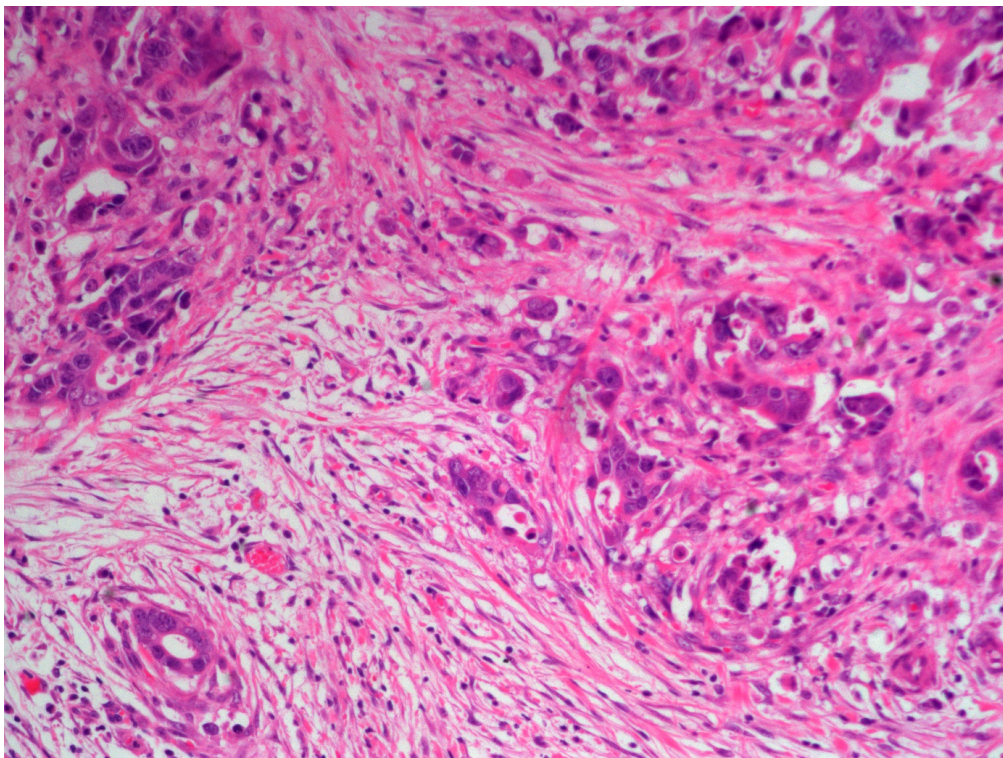
### 3.7 Veränderungen der nicht epithelialen Gewebekomponenten an der Invasionsfront – Stromareaktion/Umgebungsreaktion

In der hier vorgelegten Arbeit wurden zwei grundsätzliche Gewebsreaktionsmuster in der Tumorumgebung unterschieden. Zum einen eine Gewebsreaktion, die durch eine Dominanz von Fibroblastenproliferaten gekennzeichnet war (fibroblastenreicher Typ, Abbildung 18.1 und 18.3). Zum anderen eine Gewebsreaktion, die durch eine morphologisch prominente Infiltration von Immunzellen, insbesondere einer dichten Infiltration von Lymphozyten (IMLY, Abbildung 18.2) charakterisiert war und kaum eine fibroblastäre Reaktion zeigte. Bei der fibroblastendominanten Umgebungsreaktion des den Tumor umgebenden Stroma wurde zwischen einer Gruppe mit geringer Immunreaktion und wenigen tumorassoziierten Makrophagen (TAM) (Fib1, Abbildung 18.1) und einer fibroblastenreichen Gewebsreaktion mit relativer starker Immunreaktion mit vielen TAMs, Granulozyten und Plasmazellen (Fib2, Abbildung 18.3) unterschieden.

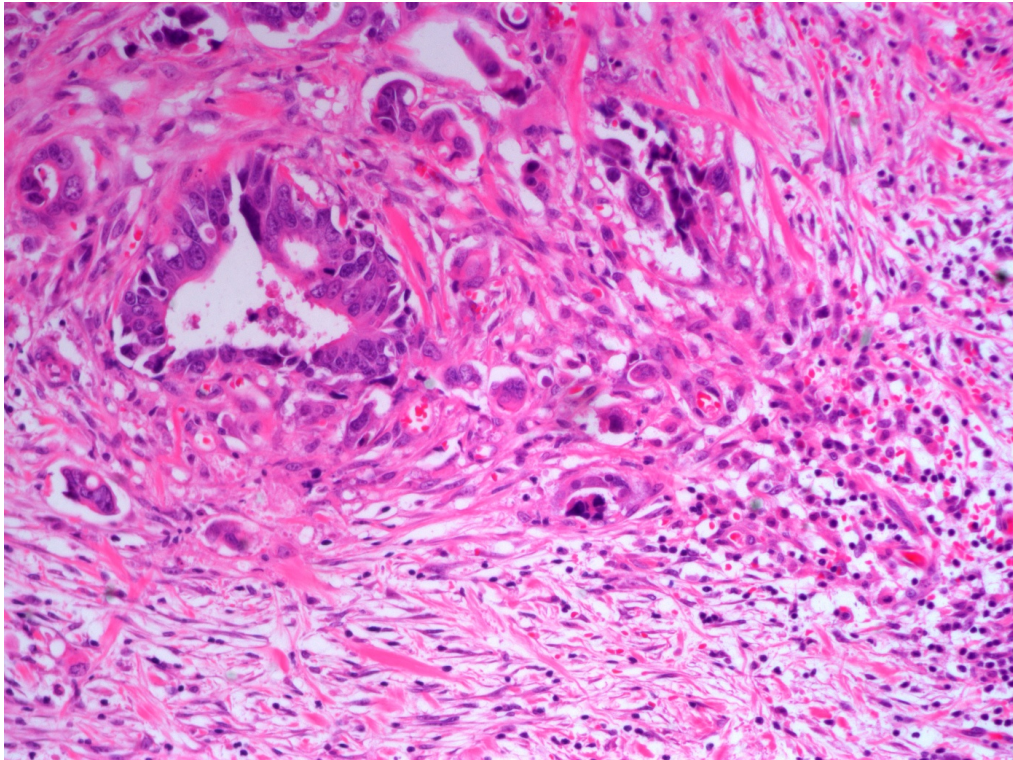
Die folgenden Abbildungen 18.1.a-c zeigen eine fibroblastendominante Umgebungsreaktion mit geringer Immunreaktion und wenigen tumorassoziierten Makrophagen (TAM):



*Abb. 18.1.a*

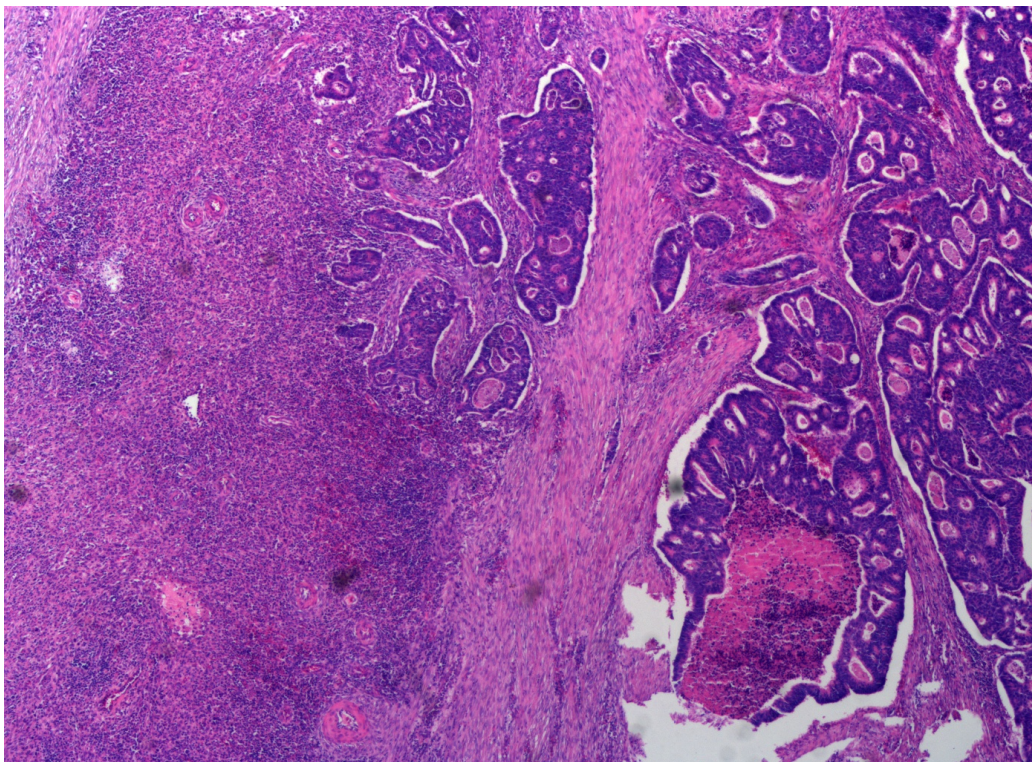


*Abb. 18.1.b*



*Abb. 18.1.c*

Die Abbildungen 18.2.a und b zeigen lymphozytenreiche Umgebungsreaktionen mit wenig fibroblastären Reaktionen:



*Abb. 18.2.a*

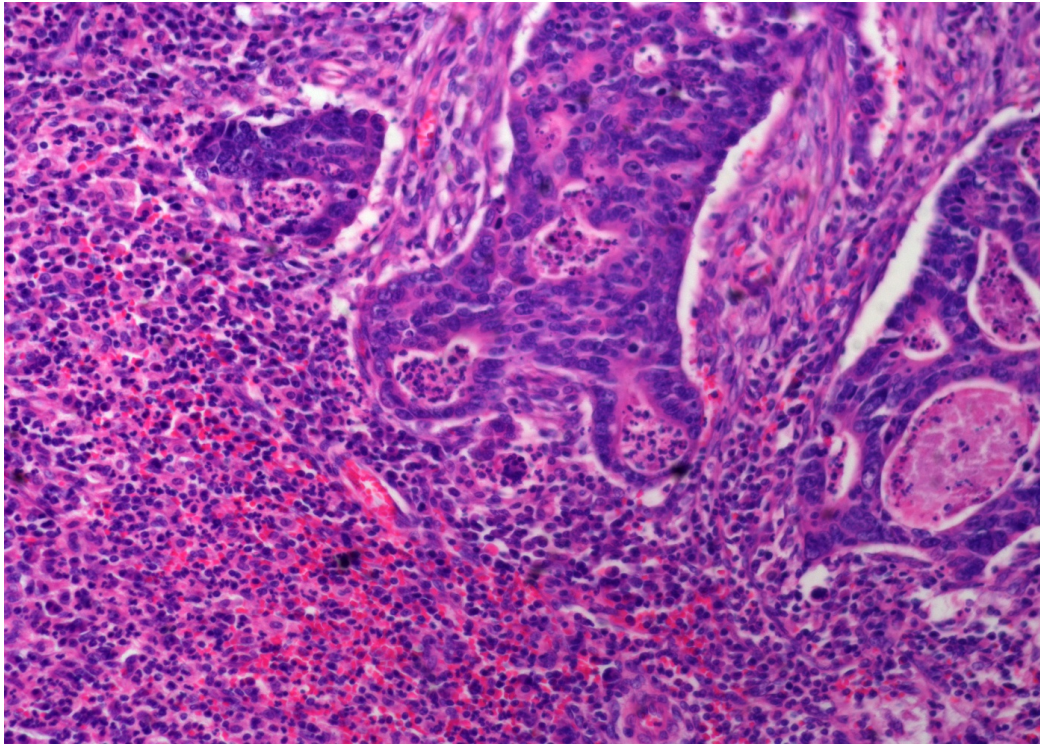


Abb. 18.2.b

Die Abbildungen 18.3.a-c zeigen fibroblastendominante Umgebungsreaktionen mit Plasmazellen dominierter Begleitinfiltration und fibroblastenreiche Gewebsreaktionen mit starker Immunreaktion (TAMs, Granulozyten und Plasmazellen):

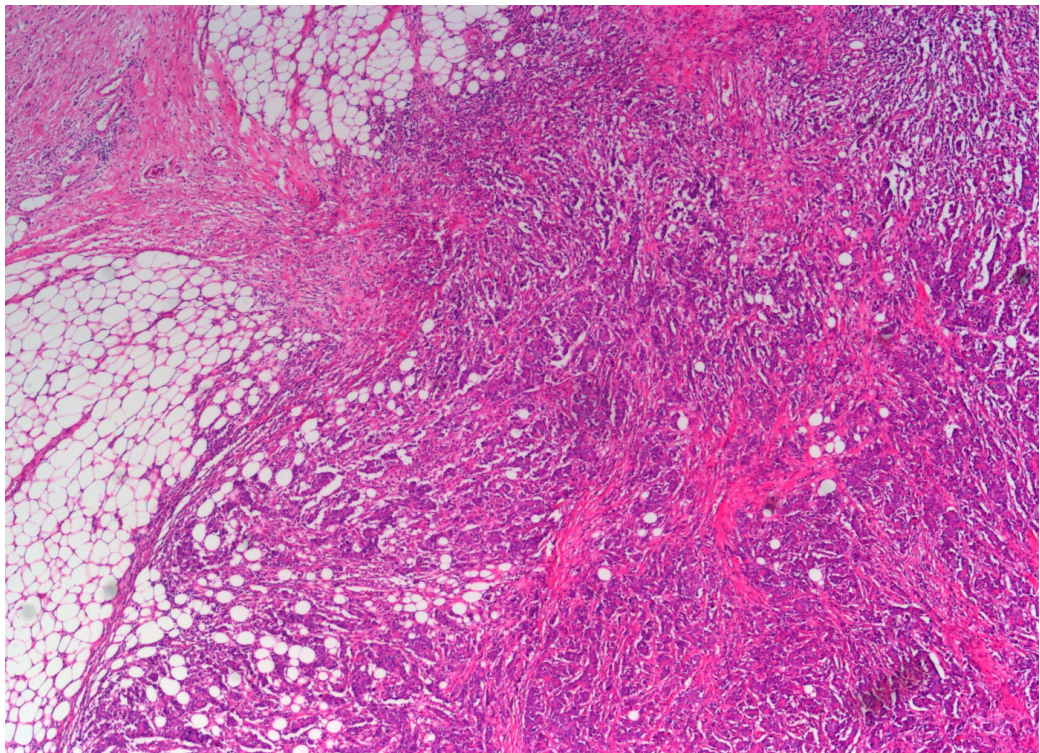
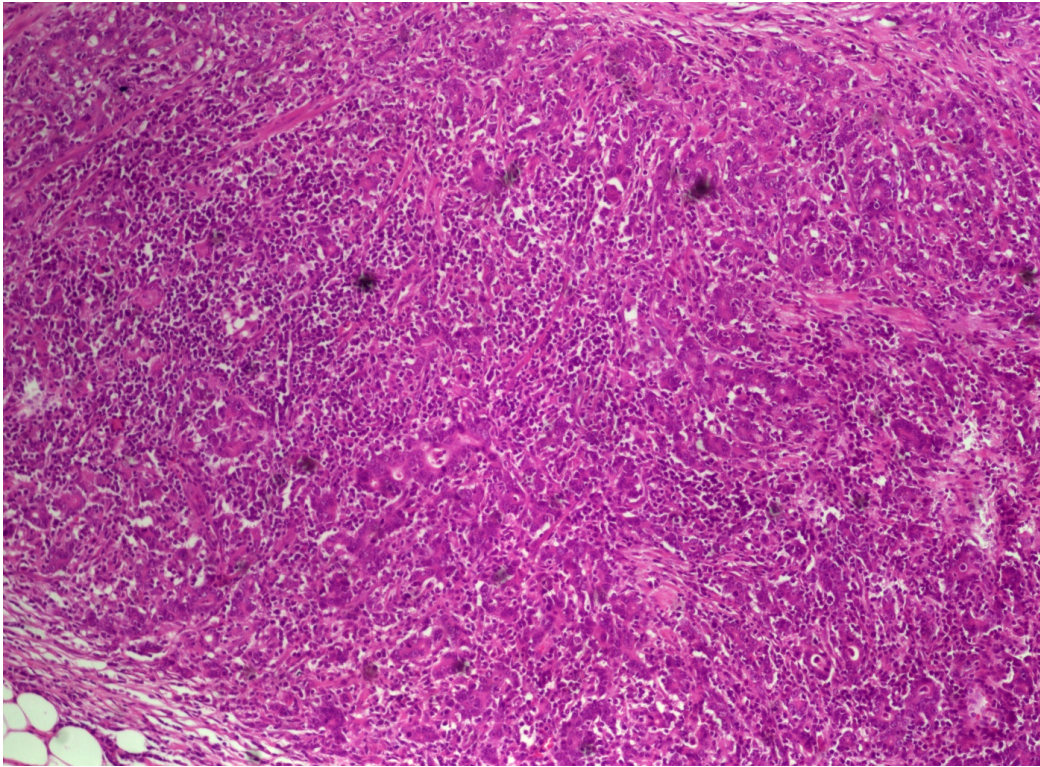
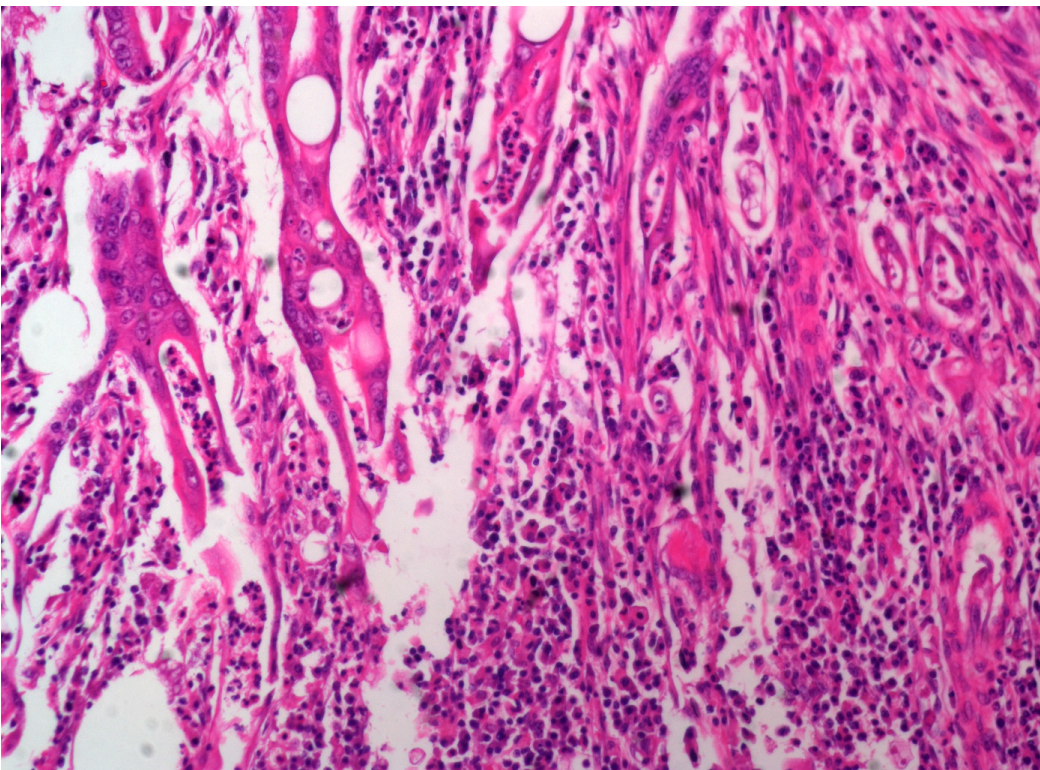


Abb. 18.3.a



*Abb. 18.3.b*



*Abb. 18.3.c*



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Name	Hersteller
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Assistent Reamix 2789	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biosprint Work Station 15	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
GelDoc 2000 Fotoausrüstung	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizplatte	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mikroskop Axioskop 50	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
MJ Mini™ Personal Thermal Cycler	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference® 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PyroMark Q24 Cartridge	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Q24 Instrument	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Q24 Plate	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

PyroMark Q24 Vacuum Prep Tool Filter Probe	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 300	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sub-Cell GT Elektrophorese- kammer	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermocycler, T personal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Video Graphic Printer UP-895CE	Sony Corporation, Tokyo, Japan
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc, New York, USA
Vortexer Lab dancer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 13	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

#### 4.1.2 Software

ImageAccess Software	Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz
PyroMark Q24 Software	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Software QuantityOne	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland

#### 4.1.3 Gebrauchswaren

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
5-Tube Strip	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
5-Rod Cover	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Polyethylen Abdeckfolie für PCR	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
Centri Sep Spin Columns	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA ExitusPlus IF™	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA Remover™ 250 ml Sprühflasche	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
DNA Remover Refill Bottle 4 x 500 ml	DNA Remover Refill Bottle 4 x 500 ml
Einmal-Kunststoffhülsen für BioSprint	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Genetic Analyzer Sample Septa	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Genetic Analyzer Sample Tubes	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
High Density Printing Paper Type II UPP-110 HD	Sony Corporation, Tokyo, Japan
Kapillaren ABI, 47 cm	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Microseal B-Film 100	Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Latex Handschuhe Rotiprotect®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
PCR Gefäße 0,2 ml	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
PCR-Gefäß 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen ratiolab®, aroject® tips: 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
Plastibrand® PD-Tips für Mehrfachdispenser	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
QIAquick spin column	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sample Tubes für ABI PRISM® 310	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
Septa für Sample Tubes	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotiprotect® – Latex Handschuhe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rührspatel 120 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Thermo-Fast 24 PCR-Platte	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Transaflex® -Nitril Handschuhe	Handelsgesellschaft Stolpe & Co. GmbH, Werheim, Deutschland
Transporter für PyroMark 24-Plate	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Uvetten 220-1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vacuum Prep Tool Filter Probes	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

#### 4.1.4 Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
ABI cycle sequencing Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
AE-Puffer (elution), pH 9,0	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AL-Puffer (lysis)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
ATL-Puffer (tissue lysis), pH 8,3	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AW1-Puffer (wash)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AW2-Puffer (wash)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Big Dye ABI Mix	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Big Dye 5 x Sequencing Puffer	ABI Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Blue Juice Gelladepuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland

DNA Molecular Weight Standard 174-DNA Hae III	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
dNTP (5 x 20 µmol)	Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut reinst	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid Solution 0,07 %, 15 ml	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hi-Di™ Formamide	ABI Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Hot Start Taq Plus Polymerase 1000 U	Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
MagAttract® Suspension G	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Puffer pH 4,006 PI4, pH 6,865 PL7, pH 9,180 PL9	Wissenschaftlich Technische Werk- stätten GmbH, Weilheim, Deutschland
PyroMark® Validation Oligo	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Control Oligo	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Gold Q24 Reagents	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pyromark® Gold Q96 Reagents	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Annealing Buffets	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark® Wash Buffer, 10 x	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiagen Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Streptavidin Beads	GE Healthcare, Bio-Sciences, München, Deutschland
TBE-Puffer, 10 x	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ultra Pure Water steril	Seromed Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Xylol reinst	PathoMed. Logistik GmbH, Viersen, Deutschland

#### 4.1.5 Kits

Name	Hersteller
BigDye™ Terminator v1.1 Reaction Kit	ABI Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Biosprint 15 DNA Blood Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
ExoSap-it PCR Clean-up Kit	USB Corporation, Cleveland, USA
QIAquick PCR Purifikation Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

#### 4.1.6 Primer

Name	Hersteller
BRAF BioPrimer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
BRAF15 Forward, Reverse	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland

BRAF Sequenzierprimer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS BioPrimer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS 12 Primer Forward, Reverse	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS 13 Primer Forward, Reverse	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS Sequenzierprimer	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 DNA-Extraktion

#### 4.2.1.1 Entparaffinierung von paraffineingebettetem Tumorgewebe

Je nach Gewebsmenge und Größe des in Paraffin eingebetteten Materials wurden für jeden Fall unterschiedlich viele Schnitte mit einer Dicke von 10 µm hergestellt. War das eingebettete Tumorgewebe unter 0,5 cm Durchmesser groß, wurden ca. dreißig Schnitte hergestellt. War das zu untersuchende Material zwischen 0,5 cm und 1 cm Durchmesser groß, wurden zwischen 10 und 20 Schnitte angefertigt. Bei einem Durchmesser größer 1 cm maximal 10 Schnitte. Die Paraffinschnitte wurden via Rührspatel in ein 1,5 ml großes Eppendorfgefäß überführt. Die Entparaffinierung begann durch Zugabe von 1000 µl Xylol in das Eppendorfgefäß. Anschließend wurde die Probe auf dem Vortexer für 15 Sekunden gemischt. Auf einem Rotationsheizblock wurde das Lysat bei 37°C bei 700 rpm für 10 Minuten inkubiert, darauf folgend bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abpipettiert.

Das Gewebe wurde im nächsten Schritt mit 1000 µl Ethanol gewaschen. Nachdem Alkohol hinzu pipettiert wurde, wurde wieder für 15 Sekunden gemischt und für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Auch nach diesem Schritt wurde



der Überstand abpipettiert. Der Alkohol wurde durch erneutes Zentrifugieren bei 13.000 rpm und Abpipettieren, sowie Erhitzen für 15 min auf einem Heizblock bei 37°C mit offenem Deckel bei 700 rpm vollständig entfernt. Nach der Entparaffinierung erfolgte die DNA-Extraktion mittels Biosprint 15.

Das entparaffinierte Gewebe wurde mit 200 µl ATL-Puffer und im nächsten Schritt mit 20 µl Proteinase K versetzt und für 15 Sekunden gemischt. Inkubation des Eppendorfgefäß auf einem Rotationsheizblock bei 56°C und 700 rpm. Der Erfolg des Proteinase-K-Verdau wurde anhand der Viskosität der Reaktionslösung am darauf folgenden Tag beurteilt. Lag kein vollständiger Verdau vor, gab man weitere 20 µl Proteinase K dazu und ließ erneut bei 56°C und einem Rotationsmix von 700 rpm inkubieren.

Bei ausreichendem Verdau Zugabe von 200 µl eines AL-Puffers und 15 Sekunden vortexen. Die Proben wurden daraufhin für zehn Minuten auf dem Rotationsheizblock, diesmal bei 70°C und 300 rpm Rotation, inkubiert. Nach zusätzlicher Gabe von 200 µl reinstem Ethanol wurde erneut 15 Sekunden geschüttelt. Das erneute Mischen musste bei diesem Schritt sofort geschehen. Die 600 µl Lysat wurden im Qiagen Biosprint 15 weiterbearbeitet.

#### *4.2.1.2 Entparaffinierung von in Objektträgern aufgezogenem Tumorgewebe*

Verwendete man gefärbte Objektträger, so legte man 200 µl AL-Puffer und 20 µl Proteinase K in einem Eppendorfgefäß vor. Von diesen nahm man 20 µl, die dann auf den gefärbten Objektträger pipettiert und verteilt wurden. Das so gelöste Material wurde abgekratzt und in das Eppendorfgefäß gegeben, indem sich die restlichen 200 µl Lösung befand. Die weiteren Schritte glichen den oben bereits beschriebenen.

#### 4.2.1.3 DNA-Extraktion aus unterschiedlichen Probenmaterialien mit dem Qiagen Biosprint 15

Für die Probenextraktion wurde die MagAttract-Magnet-Partikel-Technologie (MPT) verwendet. Bei der MPT werden Schnelligkeit und Effektivität der Silica-basierten DNA-Extraktion mit den Vorteilen des Gebrauchs von Magnetpartikeln kombiniert. DNA wird in Anwesenheit chaotroper Salze an Silica-beschichtete Magnetpartikel gebunden und durch Waschschriffe mit geeigneten Puffern von Begleitmaterial befreit. Abschließend wurde die Nukleinsäure unter Verwendung eines definierten Puffers eluiert. Der erste Schritt bestand darin, die Reagenzgefäßstreifen zu befüllen. Dabei war darauf zu achten, dass das breite Schild nach links zeigte, um eine Orientierung von 1 (links) nach 5 (rechts) der Gefäße zu bekommen. Die Reagenzgefäßhalter wurden auf der breiten Seite beschriftet. Als nächstes befüllte man die Reagenzgefäße wie folgt:

<b>Gefäßnummer</b>	<b>Menge in µl</b>	<b>Reagenz</b>
1	30	MagAttract-Suspension G
1	600	Lysat
2	750	AW1 Puffer
3	500	AW2 Puffer
4	500	AW2 Puffer
5	75	AE Puffer

In das erste Reagenzgefäß wurden die 600 µl Lysat vorgelegt. Bevor die MagAttract Suspension G in das erste Reagenzgefäß hinzu pipettiert werden konnte, mussten sie ca. eine Minute geschüttelt werden. Die Magnetstäbe des Biosprint 15-Gerätes wurden nun mit Einmal-Kunststoffhülsen überzogen, danach überführte man die beschichteten Reagenzstreifen in die Biosprint Work Station. Nun startete man das Programm BS15 DNA Blood 100. Nachdem der Lauf beendet war, überführte man das Eluat, ca. 40-60 µl, in beschriftete Eppendorfgefäße. Die DNA war nun für weitere Analysen gereinigt.

#### 4.2.1.4 *Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) und der DNA-Qualität*

Die photometrische Bestimmung der optischen Dichte wurde im Bio-Photometer durchgeführt. Durch unterschiedliche Absorptionsmaxima von DNA (260 nm) und Proteinen (280 nm) konnte so über den Quotienten beider optischer Dichten (260 nm/280 nm) eine Aussage über die Reinheit des Amplifikats getroffen werden. Der Bereich zwischen 1,60-2,00 der photometrisch gemessenen optischen Dichte wurde als ausreichende DNA-Qualität festgelegt.

Um den DNA-Gehalt des extrahierten Gewebes zu bestimmen, wurden 50 µl destilliertes Wasser in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und 10 µl von der im Biosprint 15 gereinigten DNA dazu pipettiert. Damit der Bio-Photometer die Verdünnung der DNA mit Wasser bei der Berechnung von OD und Ratio berücksichtigen konnte, musste man die Verdünnung unter dem Hinweispunkt Dilution festhalten. Bevor man die optische Dichte bzw. die Ratio der DNA überprüfen konnte, war weiterhin eine Leerwertmessung notwendig. Hierfür wurde einmalig in einer Küvette 60 µl reinstes Wasser gemessen. Nachdem die Vorbereitung abgeschlossen war, konnten die 60 µl Wasser/DNA in Küvetten gemessen werden. Die Ergebnisse wurden auf vorgefertigten Protokollen festgehalten.

Bezüglich der DNA-Menge wurde eine Konzentration im Bereich zwischen 150 und 200 ng/µl angestrebt. War die DNA-Konzentration höher als 200 ng/µl, so verdünnte man das Eluat mit einer entsprechenden Menge X(µl) an AE-Puffer, nach folgender Formel berechnet:

$$X(\mu\text{l}) = \text{OD} \times \text{Faktor } 0,2 - 40$$

War die DNA-Konzentration niedriger als 150 ng/µl, so wurde das entsprechende Eppendorfgefäß markiert, um im nachfolgenden PCR-Ansatz 4 µl der gereinigten DNA einzusetzen. Lag der DNA-Gehalt im Bereich 150-200 ng/µl, wurde er mit der oben beschriebenen Formel verdünnt. Beim PCR-Ansatz wurden 2 µl der aufgereinigten DNA eingesetzt.

#### 4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. (1987) können mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase definierte DNA-Abschnitte in vitro exponentiell vervielfältigt werden. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz. Auf diese Weise können Primer designt werden, die an einem der komplementären Stränge anbinden können und somit Startpunkt und Endpunkt des zu synthetisierenden Amplifikats festlegen. Man erhält damit DNA-Produkte mit der jeweiligen Basensequenz und der gewünschten Fragmentlänge. Die PCR besteht aus einer definierten Anzahl von Zyklen.

Für die PCR wurden 40 bis 45 Zyklen festgelegt. Somit wurde theoretisch eine  $2^{40}$  fache bzw.  $2^{45}$  fache Vermehrung des DNA-Produktes möglich. Der erste Reaktionsschritt einer PCR ist essentiell für eine gute Aufspaltung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge. Durch einen verlängerten Initialisierungsschritt ist eine komplette Auftrennung der DNA gewährleistet. Bei der Initialisierung wurde die DNA bis zu  $96^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Stränge zu trennen. Darauf folgend startete ein Zyklus bestehend aus drei Reaktionsschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Beim Annealing wurde die Temperatur auf  $50^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, um den Primern ein Anlagern an die DNA zu erlauben. Die PCR konnte so starten. Während der Elongation synthetisierte die DNA-Polymerase vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende. Die hier verwendete Taq-Polymerase war am aktivsten bei einer Temperatur von  $72^{\circ}\text{C}$ . Beim letzten Zyklus erfolgte ein verlängerter Elongationsschritt bei  $72^{\circ}$ . Nachdem der letzte zur PCR gehörende Zyklus beendet war, wurde der Thermocycler auf  $6^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, um die Taq-Polymerase zu inaktivieren.

#### 4.2.2.1 PCR-Protokoll für das KRAS-Gen Codon 12 und 13

Die eingesetzten Primer der Genabschnitte KRAS Exon 12 und 13:

---

Primer	Sequenz
KRAS 12 FW	5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3'
KRAS 12/13 RV	5'-ACT CAT GAA AAT GGT CAG AGA AAC CTT TAT-3
KRAS NESTED	5'-TCA AAG AAT GGT CCT GCA CC-3'

---

Das erwartete DNA-Produkt von 192 Basenpaaren:

---

**KRAS 12 FW** Codon12/ 13  
**ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG**  
TGACTTATATTTGAACACCATCAACCTGGACCACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTGC

ATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCT  
TATGTCGATTAAGTCTTAGTAAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATCTCCATTTAGA

TGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTC  
ACAAAATTATACGTATAATGACCACGTCCTGGTAAGAACTATGTCTATTTCCAAGAG

NESTED Primer

TGACCATTTTCATGAGT  
ACTGGTAAAAGTACTCA  
KRAS 12/13 RV

---

Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde der Ansatz der KRAS-PCR im Reinraum hergestellt. Der Ansatz einer PCR-Reaktion der KRAS-PCR war wie folgt:

- 
- 38,80 µl Ultra pure H2O
  - 2 µl dNTP
  - 5 µl Gelladepuffer
  - 1 µl KRAS-Primer (20pmol)
  - 1 µl KRAS-Primer (20pmol)
  - 0,25 µl Taq-Polymerase
-

Je nach OD wurden in den Ansatz 2 bzw. 4 µl DNA eingesetzt (siehe 4.2.1.4.). Die Amplifikation von KRAS Exon 12 und 13 erfolgte nach folgendem Cyclerprogramm (die Gesamtdauer des Programms betrug 3 h 23 min):

Schritt	Temperatur °C	Zeit	Zyklen
Initialisierung	95	5 min	1
Denaturation	95	1 min	40
Annealing	50	1 min	40
Elongation	72	2 min	40
Termination	72	5 min	1

#### 4.2.2.2 PCR-Protokoll für BRAF Exon 15

Hierbei wurde mit den eingesetzten Primern der Genabschnitt BRAF Exon 15 untersucht:

Primer	Sequenz
BRAF15 FW	5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3
BRAF15 RV	5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'

Das erwartete DNA-Produkt von 224 Basenpaaren:

#### BRAF 15 FW

TCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACAGG  
AGTATTACGAACGAGACTATCCTTTTACTCTAGATGACAAAAGGAAATGAATGATGTCC

TCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAG  
AGTCTATATAAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCATTTTTATCCACTAAAACCAGATCGATC

#### Codon 600

AGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTG  
TCACTTTAGAGCTACCTCACCCAGGGTAGTCAAACCTTGCAACAGACCTAGGTAAC

TGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCC  
ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAAGGTGACTAATTTAAAAACCGG

#### BRAF 15 RV

Um Kontamination zu vermeiden, wurde der Ansatz der BRAF-PCR im Reinraum hergestellt. Der Ansatz einer PCR-Reaktion der BRAF-PCR war wie folgt:

- 
- 38,80 µl Ultra pure H<sub>2</sub>O
  - 2 µl dNTP
  - 5 µl Gelladepuffer
  - 1 µl BRAF 15-Forward-Primer (20pmol)
  - 1 µl BRAF 15-Reverse-Primer (20pmol)
  - 0,25 µl Taq-Polymerase
- 

Je nach OD wurden in den Ansatz 2 bzw. 4 µl DNA eingesetzt (siehe 4.2.1.4). Die Amplifikation von BRAF erfolgte nach folgendem Cyclerprogramm (die Gesamtdauer des Programms betrug 2 h 19 min.):

---

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Initialisierung	94	5 min	1
Denaturation	94	45 sec	45
Annealing	60	45 sec	45
Elongation	72	45 sec	45
Termination	72	5 min	1

---

#### **4.2.3 Gelelektrophorese**

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wanderte die DNA entsprechend ihrer Größe entlang eines elektrischen Feldes unterschiedlich schnell durch eine dreidimensionale Matrix aus Agarose. Dabei liefen kürzere Fragmente schneller im Agarosegel als längere. Die PCR-Produkte wurden mittels geeigneter fluoreszierender Substanzen, in der hier vorgestellten Arbeit mit Ethidiumbromid, sichtbar gemacht. Um eine Gelmatrix herzustellen, wurden 1,75 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE Puffer in einem Eppendorfgemäß aufgelöst und für 2 Minuten und 20 Sekunden bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Erhitzen wurden 5 µl einer 0,07 % Ethidiumbromidlösung dazu getropft und durch Schwenken ver-

mischt. Danach wurde der Ansatz in eine Elektrophoresekammer gegossen. Durch einen in das noch flüssige Gel eingelegten Kamm wurden Taschen hergestellt. Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze an den Rand gezogen und entfernt. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt. Im Anschluss wurde die Elektrophoresekammer mit 0,5 x TBE-Pufferlösung aufgefüllt, so dass die Gelmatrix vollständig bedeckt war. In die Taschen wurden nun 15 µl des Amplifikats pipettiert. In eine der Geltaschen wurde der DNA-Längenstandard DNA Hae III aufgetragen. Nach Befüllen der Taschen wurde ein elektrisches Feld bei 125 Volt und 400 mA für 50 Minuten zur Auftrennung der PCR-Produkte aufrecht erhalten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Banden in einem UV-Transilluminator ausgewertet. Die Fragmentlänge wurde durch einen mitgeführten DNA-Längenstandard bestimmt.

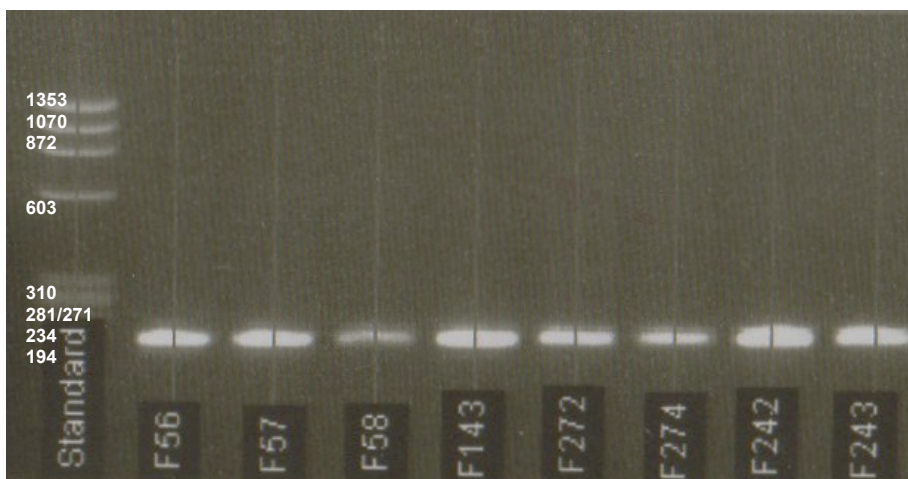


Abb. 19: Amplifikationsbande der KRAS-PCR mit Patientenummer und Längenstandard

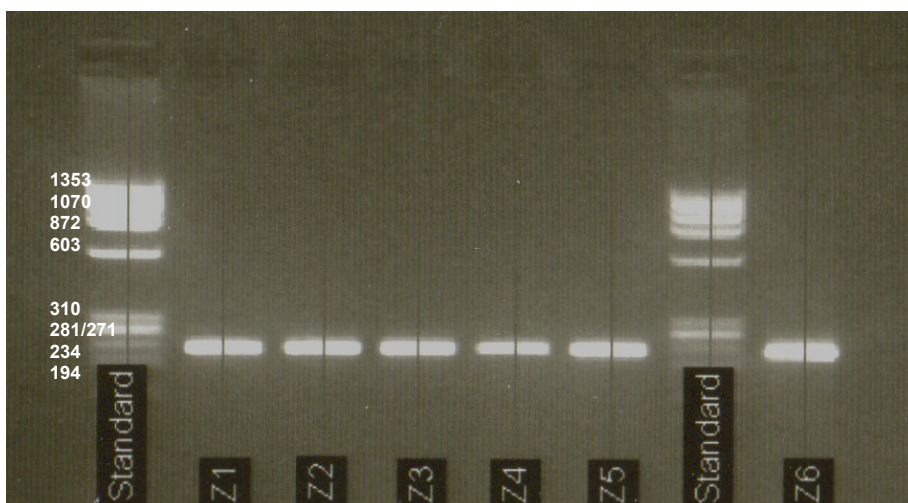


Abb. 20: Amplifikationsbande der BRAF-PCR mit Patientenummer und Längenstandard



#### 4.2.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sanger-Sequenzierung ist eine der ältesten Sequenzierungsmethoden. 1975 entwickelt, konnte das erste Genom 1977 mit dieser Methode entschlüsselt werden. Nach Denaturierung der Doppelstränge wurde ein Primer an eine bekannte Sequenz hybridisiert. Daraufhin verlängerte eine DNA-Polymerase den komplementären Strang mit dem passenden Nukleotid. Zusätzlich zu den vier dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphat) wurden vier mit jeweils vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphat) in geringer Menge eingesetzt. Durch den Einbau dieser fluoreszenzmarkierten ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphat) kam es nach dem Zufallsprinzip zum Kettenabbruch, denn diese Nukleotide besitzen keine 3'Hydroxygruppe und die DNA-Polymerase kann kein weiteres Nukleotid anbauen. Dadurch kam es zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Nach Größentrennung der Fragmente mittels Kapillar-Gelelektrophorese konnte das jeweils eingebaute fluoreszenzmarkierte Nukleotid am Ende jedes der neusynthetisierten Stränge abgelesen werden.

##### 4.2.4.1 Aufreinigung des PCR-Produktes mit ExoSap-it PCR clean up Kit

Zuerst wurde ein Ansatz aus 5 µl PCR-Amplifikat und 2 µl mit ExoSap-it PCR clean up Kit (USB Corporation, Cleveland, USA) hergestellt. Im Reinraum wurde der ExoSap-it PCR clean up Kit in ein 0,2 ml Tube vorgelegt, im Cyclerraum dann das PCR-Produkt hinzu pipettiert. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler wie folgt inkubiert und inaktiviert.

Schritt	Zeit	Temperatur
Hydrolyse	15 min	37°C
Inaktivierung	15 min	80°C

Während der Hydrolyse wurden freie Nukleotide durch die Shrimp-Alkaline-Phosphatase zerstört und Primer mittels Exonuklease verdaut. Bei 80°C wird das ExoSap-it inaktiviert. Des Weiteren wurde die Probe im Thermocycler auf 8°C abgekühlt. In einer Zentrifuge wurden bei 4°C und 3000 rpm überschüssige

Nukleotide und Primer abzentrifugiert. Das gereinigte PCR-Produkt lag nun den Feststoffen auf und konnte abpipettiert werden.

#### 4.2.4.2 Synthesereaktion: Cycle Sequencing

Im Reinraum wurde für das *Cycle Sequencing* folgender Mix hergestellt:

- 
- 8 µl BigDye™ Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit
    - dieser enthält
      - AmpliTaq DNA Polymerase
      - die vier dNTP
      - die vier ddNTP
  - 7 µl 5 x Sequenzierungs-Puffer
  - 1 µl Antisense Primer (10pmol)
- 

---

KRAS12/13 FW

Codon12/ 13

ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG  
TGACTTATATTTGAACACCATCAACCTGGACCACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTGC

ATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCT  
TATGTGCGATTAAGTCTTAGTAAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATCTCCATTTAGA

TGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTC  
ACAAAATTATACGTATAATGACCACGTCCTGGTAAGAACTATGTCTTATTTCCAAGAG

TGACCATTTTCATGAGT

ACTGGTAAAAGTACTCA

KRAS 13 RV

---

Der Ansatz von 20 µl wurde im Thermocycler mit folgendem Cycle-Sequencing Programm gestartet:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur in °C</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Initialisierung	98	5 min	1
Denaturierung	96	20 sec	34
Annealing	50	20 sec	34
Extensionsschritt	60	4 min	1

Nach Beendigung des Laufes kühlte der Thermocycler die Proben auf 6°C herunter.

#### 4.2.4.3 *Centri-Sept-Säulen-Aufreinigung der Syntheseprodukte*

Die Säulen wurden mit 750 µl Ultra Pure Water blasenfrei beschichtet und kurz gemischt. Danach ließ man die Säulenmatrix für 60 Minuten bei Raumtemperatur aufquellen. Die Säulen wurden anschließend in der Zentrifuge bei 3000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und in Eppendorfgeläße platziert. Die 20 µl Amplifikat wurden auf die jeweilige Säule pipettiert. Erneut wurden die Säulen bei 3000 rpm 2 Minuten zentrifugiert. Die Eluate wurden daraufhin für weitere Analysen verwendet, die Säulen verworfen.

#### 4.2.4.4 *Analyse des aufgereinigten Amplifikats mittels Kapillarelektrophorese, Laser-Scan und Auswertung der Fluoreszenz im ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer*

Mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer wurde eine Längenfragment-Kapillar-Gelelektrophorese durchgeführt. Ein Probenansatz beinhaltete 16 µl HI-DI™ Puffer und 4 µl des aufgereinigten Eluates in einem ABI sample tube. Pro Lauf konnten maximal 48 Proben durch die anwendungsspezifische Auswertungs-Software des ABI PRISM 310 analysiert werden. Die detektierten Emissionspeaks wurden in eine Basenabfolge übersetzt und das Ergebnis anschließend mit der Datenbank COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) des Sanger Institute verglichen.<sup>98</sup>

Abbildungen 21 und 22 zeigen Sequenzen des KRAS-Gens Codon 12 und 13, jeweils mit Nachweis von Mutationen:

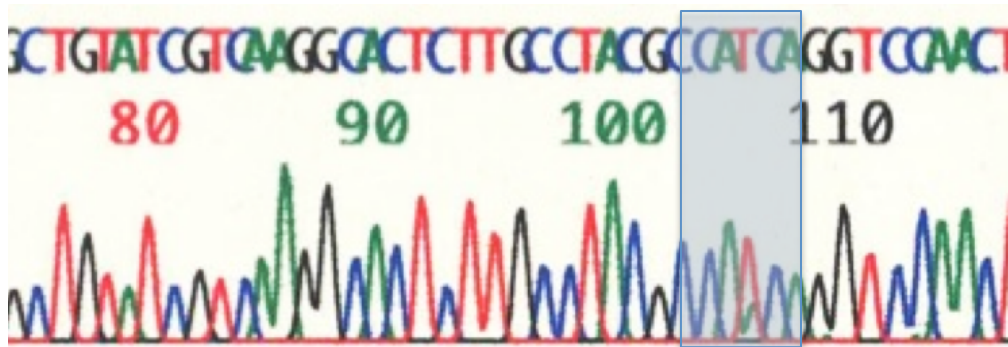


Abb. 21: Kolorektales Karzinom, Sangersequenzierung, c.35G>A (GGT > AGT), Mutation im Codon 12

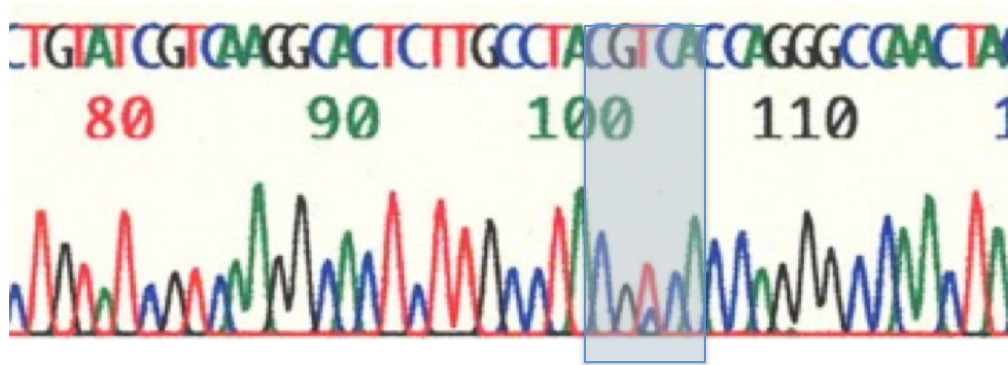


Abb. 22: Kolorektales Karzinom, Sangersequenzierung, c.38G>A (CGT > AGT), Mutation im Codon 13

#### 4.2.5 Pyrosequenzierung mit dem PyroMark Q24

Die Pyrosequenzierung ist eine Sequenzierungsmethode, die besonders zur schnellen Analyse kurzer DNA-Fragmente (<100 Bp) geeignet ist. Für die Pyrosequenzierung ist im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung einzelsträngige DNA notwendig. Die Pyrosequenzierung wurde 1996 von dem Schweden Pal Nyren entwickelt. Dabei wurde ein Sequenzierungsprimer an gereinigte denaturierte DNA-Fragmente hybridisiert. Durch eine DNA-Polymerase wurde der Strang dann Nukleotid für Nukleotid verlängert. Nacheinander wurden die vier Nukleotide (dNTP) Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytosintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat oder Desoxythymidintriphosphat der Reaktion zu-

geführt. War das zugegebene Nukleotid komplementär zur Base des Template-Stranges, wurde es von der DNA-Polymerase an den Primer angefügt und zur Vervollständigung des Doppelstranges eingebaut. Dabei wurde eine Enzymkaskade ausgelöst, wodurch am Ende der Reaktion eine Lichtemission entstand (Abb. 23).

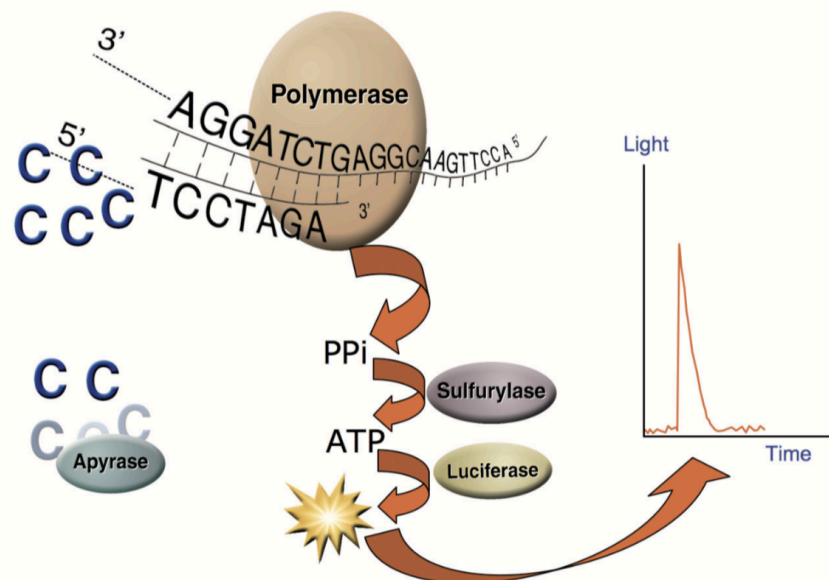


Abb. 23: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung beim Einbau eines Nukleotids

Wurde also ein passendes Nukleotid durch die DNA-Polymerase eingebaut, wird Pyrophosphat freigesetzt. Das Enzym ATP-Sulfurylase setzt bei Vorhandensein von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) das freigesetzte PPi quantitativ in ATP um. Das energiereiche ATP führte dazu, dass das Enzym Luciferase die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin beginnen kann. Das bei dieser Reaktion erzeugte Licht, ist in seiner Intensität proportional zur Menge des ATP.

War ein eingespritztes Nukleotid nicht komplementär zur nächsten Base, wurde es ohne Lichtemission abgebaut. Für diesen Schritt ist Apyrase im Enzym-Mix enthalten. Die Apyrase baut nicht eingebaute Nukleotide und überschüssiges ATP kontinuierlich ab. Erst nach Abschluss des Abbauvorgangs erfolgte die Zugabe des nächsten Nukleotids. Mit jedem folgenden Nukleotid liefen die beschriebenen Reaktionsschritte in identischer Weise ab. So wurde der DNA-Komplementärstrang aufgebaut und die Nukleotidsequenz konnte im Py-

rogramm anhand der den Nukleotiden zugeordneten Signalpeaks abgelesen werden.

Als Ersatz für das natürliche Nukleotid dATP wird Desoxyadenosinalphathiotriphosphat (dATP $\alpha$ S) verwendet, das von der DNA-Polymerase genutzt, von der Luciferase jedoch nicht erkannt wird.

Das von der Luciferase produzierte Licht wird von CCD-Kameras aufgefangen und via Pyrogramm als Peak dargestellt, der in Beziehung zum zugefügten Nukleotid gesetzt wird. Auf der x-Achse wird die zeitliche Reihenfolge der eingebauten Nukleotide dargestellt. Auf der y-Achse wird die absolut gemessene Lichtstärke festgehalten.

#### 4.2.5.1 *Design des PCR-Programms zur Pyrosequenzierung von Codon 12 und Codon 13 des KRAS-Gens*

Das PCR-Programm im AQ- und SQA-Modus zur Durchführung der KRAS-Pyrosequenzierung wurde mit dem Programm PyromarkQ24 2.0.6 erstellt.

#### Pyrosequenzierung KRAS Codon 12 und Codon 13 Amplifikation eines biotinylierten PCR-Produktes

Um die DNA mittels Pyrosequenzierung analysieren zu können, wurden PCR-Amplifikate mit biotinylierten Primern hergestellt.

---

#### **Primer**

KRAS1	5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3'
KRAS3 Bio	5'-Biotin-ACT CAT GAA AAT GGT CAG AGA AAC CTT TAT-3'

---

Die Ansätze und Laufbedingungen im Thermo-Cycler entsprachen dabei denen der KRAS-PCR in Kapitel 4.2.2.1. Auch dieser Ansatz wurde wieder im Reinraum vorbereitet um Kontaminationen zu vermeiden. Dagegen wurden von der in der ersten PCR vervielfältigten DNA 4  $\mu$ l in die biotinylierte PCR eingesetzt. Auf eine Gel-Elektrophorese wurde verzichtet.

Der Ansatz für eine Reaktion:

---

Menge in µl	Reagenzien
38,8	H2O
0,25	Taq Polymerase
2	dNTP
5	Gelladepuffer
1	20 pmol 1-Primer
1	20 pmol 3-Bio-Primer

---

Hierbei wurde mit den eingesetzten Primern folgendes biotinyliertes PCR-Produkt von 192 Basenpaaren erwartet:

---

KRAS1

Codon 12/13

ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG  
TGACTTATATTTGAACACCATCAACCTGGACCACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTGC

ATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCT  
TATGTCGATTAAGTCTTAGTAAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATCTCCATTTAGA

TGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTC  
ACAAAATTATACGTATAATGACCACGTCCTGGTAAGAAACTATGTCTATTTTCCAAGAG

TGACCATTTTCATGAGT

ACTGGTAAAAGTACTCA-Biotin

KRAS3Bio

---

Aufreinigung der biotinylierten einzelsträngigen DNA in der PyromarkQ24-Vacuum-WorkStation

Über eine Vakuumpumpe konnte die einzelsträngige DNA von den restlichen Bestandteilen des PCR-Ansatzes gereinigt werden. Hierfür wurde die biotinylierte dsDNA an Streptavidin-beladene Beads gebunden.

Für eine Reaktion wurden 2 µl Streptavidin, 40 µl PyroMark Binding Puffer und 28 µl HPLC Wasser gemischt und pro Well vorgelegt. Dazu wurden 60 µl Streptavidin, 1200 µl PyroMark Binding Puffer und 840 µl HPLC Wasser gemischt. Zu jedem Ansatz wurden je Well 10 µl PCR-Produkt pipettiert. Die Arbeitsplatte wurde anschließend mit einer Folie verschlossen und für 10 min bei 1400 UpM gemischt. Im nächsten Schritt wurden die Proben gewaschen und auf eine PyroMarkQ24-Platte übertragen.

- 
1. 70 % Ethanol
  2. Denaturation Solution
  3. Washing Buffer
  4. Ultra Pure Water
  5. Ultra Pure Water
  6. Parkposition für das VPT
- 

Der Ansatz für den Sequenzierprimer: 25 µl Annealing Puffer für ein bzw. 726 µl Annealing Puffer für eine komplette PyromarkQ24 Plate mit 24 Wells und 1 bzw. 30 µl 1-Primer (10 pmol).

---

### ***Pyrosequenzierungs-PCR mit dem Sequenzierprimer KRAS1***

KRAS1 5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3

---

### ***Einzelsträngige biotinylierte DNA mit Sequenzierprimer:***

---

Primer KRAS1

**ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT**

TGACTTATATTT GAACACCATCAACCTGGAC**CCACCG**CATCCGTTCTCACGGAAGTGC

komplementärer Basen: **Codon 12 /13**

TATGTCGATTAAGTCTTAGTAAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATCTCCATTTAGA

ACAAAATTATACGTATAATGACCACGTCCTGGTAAGAACTATGTCTATTTCCAAAGAG

ACTGGTAAAAGTACTCA-Biotin

---



Eine Heizplatte wurde mit einem Plattenhalter beladen und auf 80°C vorgeheizt. Die auf dem Schüttler befindliche PCR-Platte wurde anschließend auf die vorgesehene Stelle der Arbeitsstation positioniert. Das Vacuum-Prep-Tool (VPT) wurde mit seinen 24 Stäbchen für ca. 15 Sekunden in die PCR-Platte eingetaucht, bis die Flüssigkeit mit der DNA vollständig aufgesaugt war. Wichtig war, dass die Schritte „Platte-vom-Schüttler-nehmen“ und „Eintauchen des VPT“ nicht länger als eine Minute dauerten, da sonst die Gefahr bestand, dass sich die Beads von der DNA lösten. Das VPT durchlief jetzt die Arbeitsstationen. In den Stationen eins und zwei wurde das Prep-Tool für fünf Sekunden eingetaucht, in die dritte Station für zehn Sekunden. Darauf folgend wurde der Kopf der Arbeitsstation senkrecht in einem 90° Winkel gehalten. In Position zwei erfolgte die Denaturierung der dsDNA in ssDNA. Das einsträngige, gereinigte Amplifikat wurde über die Q24-Platte gebracht und der Kopf abgeschaltet. Ungefähr für 10 Sekunden wurde der Kopf innerhalb der Q24-Platte hin und her bewegt und so mit dem vorgelegten Sequenzierungs-Primer und dem Annealing-Puffer gemischt. Weiterhin wurde das VPT in den Stationen 4 und 5 der Arbeitsstation gereinigt. Die Anlagerung des Primers an die DNA erfolgte in der vorbereiteten Q24-Platte. Die Q24-Platte wurde nun für 2 Minuten auf den auf 80°C erhitzten Halter gestellt und auf die Heizplatte gebracht. Nach 2 Minuten wurde die Q24-Platte auf einen nicht erhitzten Halter (Raumtemperatur) gesetzt und für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt abgekühlt. Die zur Pyrosequenzierung notwendigen Enzyme, das Substrat und die Nukleotide wurden in die entsprechende Position der Kartusche, entsprechend der mit der Software des PyroMark24 am PC ermittelten Menge befüllt. Die abgekühlte Q24-Platte wurde anschließend in den PyromarkQ24 gestellt. Der Lauf wurde anschließend mit den entsprechenden Nukleotidzugabebefehlen entsprechend mit den in der PyromarkQ24-Software programmierten Laufbedingungen gestartet. Hierbei wurden zwei verschiedene Sequenzanalysemethoden verwendet: der SQA-Modus in dem die unbekannte Sequenz wie bei der Sangersequenzierung durch base-calling ermittelt wurde und der AQ-Modus in dem eine Quantifizierung von SNPs möglich war. Die Analyse des Pyrosequenzierungslaufes erfolgte anschließend mit der Software Q24. Die entsprechende Dispensationsorder für die einzelnen Pyrosequenzierungsprotokolle zeigt die nachstehende Tabelle:

Name	Modus	Dispensationsorder
KRASFLO1	SQA	GACTGATCTGATCGATCCG
KRAS34FLO1	AQ	ACTGTGCGT
KRAS35FLO1	AQ	CGACTGCGTA
KRAS37FLO1	AQ	CGTACGCGTA
KRAS38FLO1	AQ	TGCTGATCGTA

### Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit der Q24-Software. Hierbei zeigt die x-Achse die vorprogrammierte Dispensationsorder der Nukleotide, auf der y-Achse zeigt die Peak-Höhe die Stärke des Lichtsignals, entsprechend der beim Einbau eines Nukleotides in das Amplifikats freigesetzten Menge Pyrophosphats. Die Abbildungen 24 bis 28 zeigen exemplarisch das Ergebnis der Pyrosequenzierung für einen KRAS-Wildtyp.

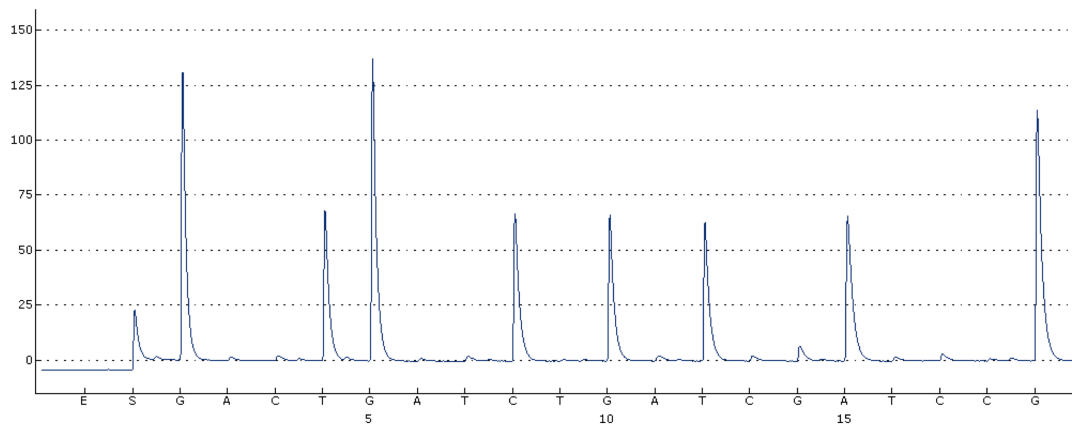


Abb. 24: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC)

In der quantitativen Sequenzanalyse (AQ) wurde ein Peak bei einer Frequenz von 10 % als wirklicher Basenaustausch gewertet und ist in den folgenden Abbildungen 25 bis 28 dargestellt:

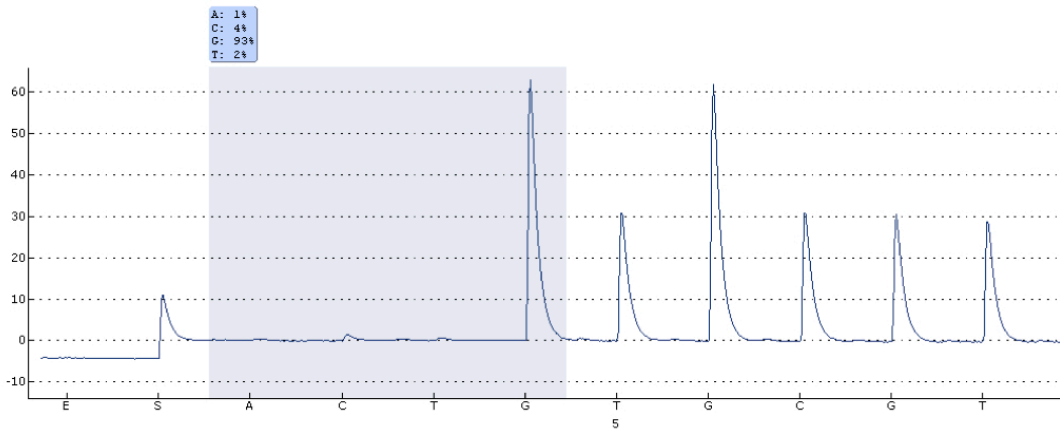


Abb. 25: Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 34

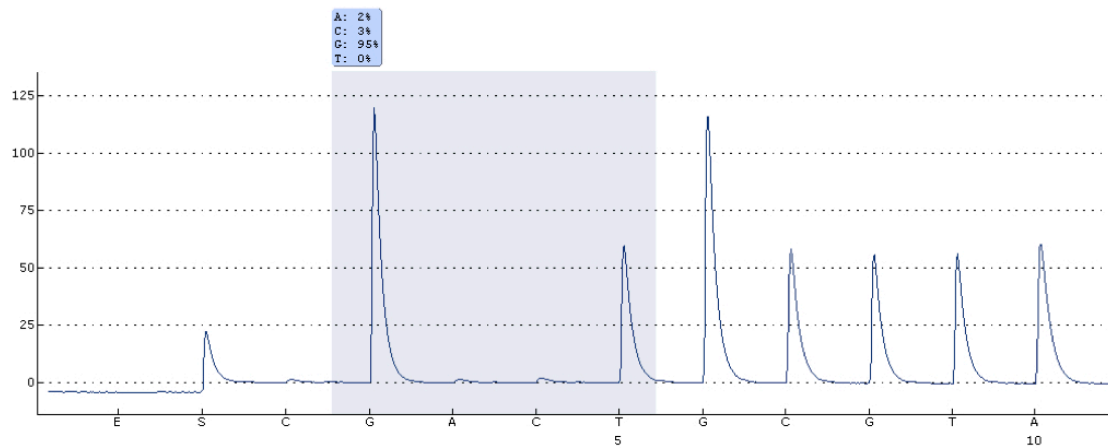


Abb. 26: Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 35

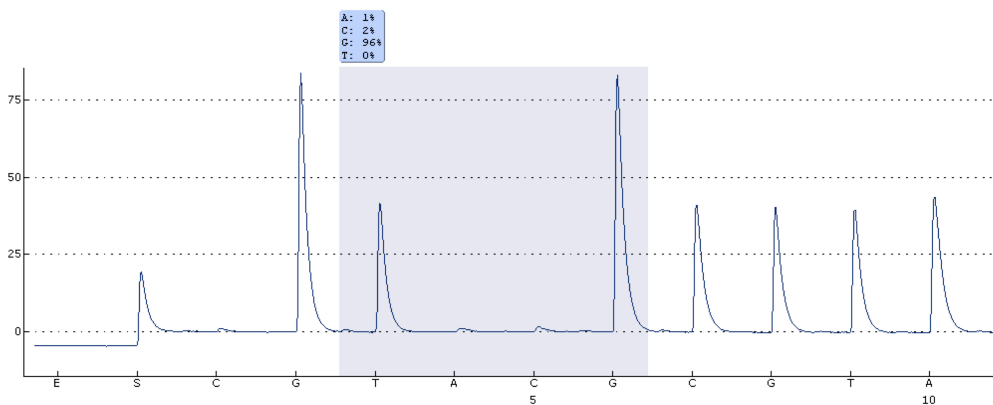


Abb. 27: Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC) quantitative Analyse für Position 37

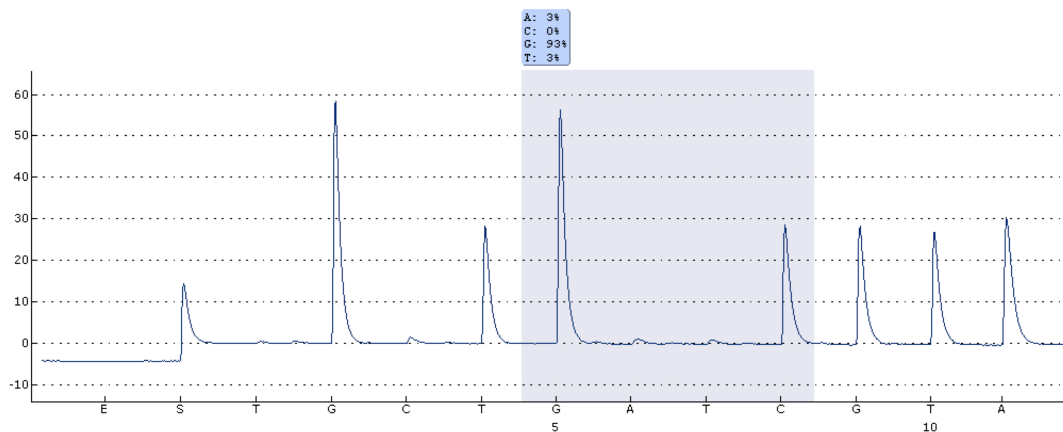


Abb. 28: Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 38

#### 4.2.5.2 Design des PCR-Programms zur Pyrosequenzierung von Codon 600 des BRAF-Gens (der Mutation BRAFV600E auf Exon 15 des BRAF-Gens)

Die PCR-Programme im AQ- und SQA-Modus zur Durchführung der BRAF-Pyrosequenzierung wurden mit dem Programm PyromarkQ24 2.0.6 erstellt.

#### Pyrosequenzierung BRAF Codon 600 Amplifikation eines biotinylierten PCR-Produktes

Um die DNA mittels Pyrosequenzierung analysieren zu können, wurden zuerst PCR-Amplifikate mit biotinylierten Primern hergestellt.

---

#### Primer

BRAF-15-Forward 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA- 3'

BRAF-15-Bio Biotin-5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'

---

Die Ansätze und Laufbedingungen im Thermo-Cycler entsprachen dabei denen der BRAF-PCR in Kapitel 4.2.2.2. Auch dieser Ansatz wurde wieder im Reinraum vorbereitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Dagegen wurden von der in der ersten PCR vervielfältigten DNA 4 µl in die biotinylierte PCR eingesetzt. Auf eine Gel-Elektrophorese wurde dagegen verzichtet.

Der Ansatz für ein Tube:

---

Menge in µl	Reagenzien
38,8	H2O
0,25	Taq Polymerase
2	dNTP
5	Gelladepuffer
1	20 pmol BRAF15-Forward-Primer
1	20 pmol BRAF15-Bio-Primer

---

Hierbei wurde mit den eingesetzten Primern folgendes biotinyliertes PCR-Produkt von 224 Basenpaaren erwartet:

---

**BRAF 15 FW**

**TCATAATGCTTGCTCTGA**TAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACACC  
AGTATTACGAACGAGACTATCCTTTTACTCTAGATGACAAAAGGAAATGAATGATGTGG

TCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAG  
AGTCTATATAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCATTTTATCCACTAAAACCAGATCGATC

Codon 600

AG**TG**AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTG  
TCACTTTAGAGCTACCTCACCCAGGGTAGTCAAACCTGTCAACAGACCTAGGTAAAAC

TGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCC

ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAA**GGTGACTAATTTAAAAACCGG-Biotin**

**BRAF5 Bio**

---

#### Aufreinigung der biotinylierten einzelsträngigen DNA-in der PyromarkQ24-Vacuum- WorkStation

Der Aufbau ist unter Punkt 4.2.5.1 nachzulesen. Ebenso wurde der Ansatz eines Sequenzierprimers vorbereitet. Dabei wurde 25 µl Annealing Puffer für ein bzw. 726 µl Annealing Puffer für eine komplette PyromarkQ24 Plate mit 24 Wells und 1 bzw. 30 µl 1 µl BRAF15-Sequenzierprimer (20 pmol) vorgelegt.

Dieser wurde dann in die PyromarkQ24 Plate pipettiert, die dann an die vorge-sehene Position der Arbeitsstation gestellt wurde:

---

**Pyrosequenzierungs-PCR mit dem Primer BRAF15-Sequenzierprimer**

BRAF15-Sequenzierprimer **GGTGATTTTGGTCTAGCTAG**

---

**Einzelsträngige biotinylierte DNA mit Sequenzierungsprimer**

---

**BRAF 15 FW**

**TCATAATGCTTGCTCTGA**TAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACACC  
AGTATTACGAACGAGACTATCCTTTTACTCTAGATGACAAAAGGAAATGAATGATGTGG

**BRAF Sequenzierprimer**

TCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATA**GGTGATTTTGGTCTAGCTAG**  
AGTCTATATAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCAATTTTATCCACTAAAACCGATCGATC

**Codon 600**

AG**TG**AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTG  
TCACTTTAGAGCTACCTCACCCAGGGTAGTCAAAGTTGTCAACAGACCTAGGTAAC

TGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCC

ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAAGGTGACTAATTTAAAAACCGG-Biotin

---

Der Ablauf kann ebenso unter Punkt 4.2.5.1 nachgelesen werden. Anschließend wurde der Lauf mit den Nukleotidzugabebefehlen entsprechend der im PyromarkQ24-Software programmierten Bedingungen gestartet. Hierbei wurden zwei verschiedene Sequenzanalysemethoden verwendet: der SQA-Modus in dem die unbekannte Sequenz wie bei der Sangersequenzierung durch base-calling ermittelt wurde und der AQ-Modus in dem eine Quantifizierung von SNPs möglich war. Die Analyse des Pyrosequenzierungslaufes erfolgte anschließend mit der Software Q24. Die entsprechende Dispensationsorder für die einzelnen Pyrosequenzierungsprotokolle zeigt die nachfolgende Tabelle:

Name	Modus	Dispensationsorder
BRAFV600E	SQA	GACTAGCTAGAT
BRAFV600E2	AQ	GACACGATGA

## Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit der Q24-Software. Hierbei zeigt die x-Achse die vorprogrammierte Dispensationsorder, auf der y-Achse zeigt die Peak-Höhe die Stärke des Lichtsignals, entsprechend der beim Einbau eines Nukleotides in das Amplifikat freigesetzten Menge. Die Abbildungen 29 bis 31 zeigen exemplarisch das Ergebnis der Pyrosequenzierung für einen BRAF-Wildtyp.

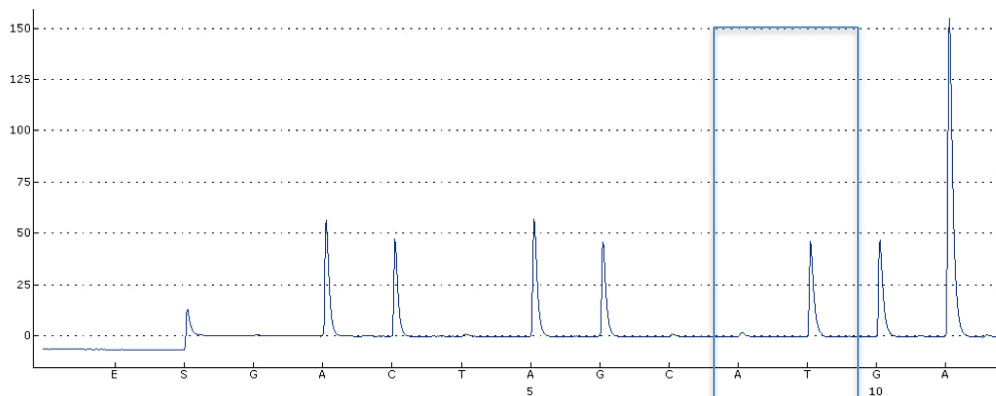


Abb. 29: Dispensationsorder 1. Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im SQ-Modus, BRAF Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG)

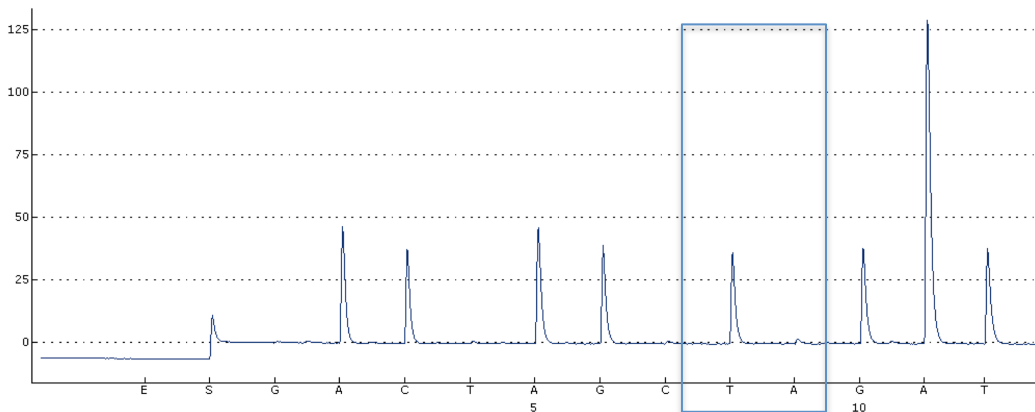


Abb. 30: Dispensationsorder 2. Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im SQ-Modus, BRAF Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG)

In der quantitativen Sequenzanalyse (AQ) wurde ein Peak bei einer Frequenz von 10% als wirklicher Basenaustausch gewertet und ist in Abbildung 31 dargestellt:

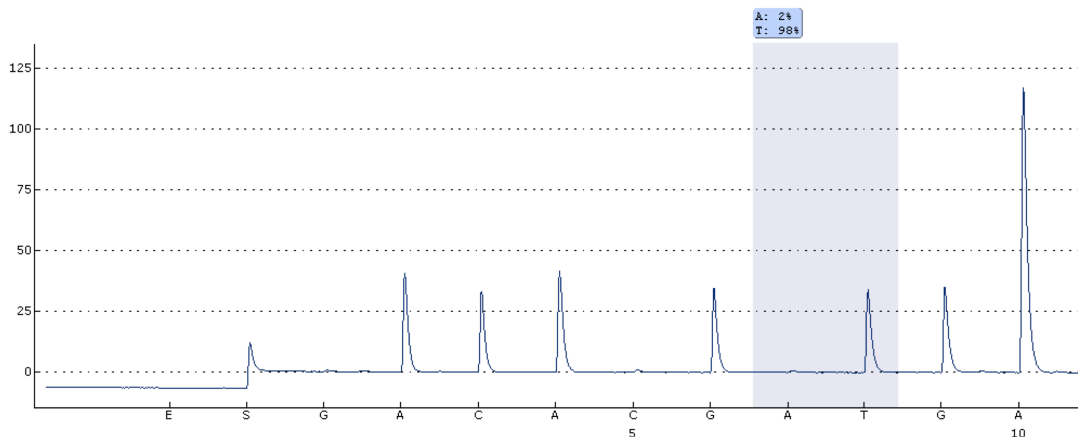


Abb. 31: Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im AQ-Modus, BRAF-Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG), quantitative Analyse für Position 1799

#### 4.2.6 Statistische Datenanalyse

Die erhobenen Daten wurden unter Verwendung der Statistiksoftware Programm R Version 2.12.1 ausgewertet. Im Anhang sind die Rechenanweisung für den exakten Fisher-Test und den Chi-Quadrat-Test mit Korrektur angefügt. Die Parameter für die statistische Berechnung wurden in Form von Kontingenztafeln dargestellt. Für die statistische Auswertung der Daten wurde eine Mindestanzahl von  $n > 5$  vorausgesetzt. War  $n < 5$ , so wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  für alle Tests akzeptiert.

Der Cohen-kappa-Test wurde ebenfalls mit dem Programm R Version 2.12.1 durchgeführt. Bezüglich des Übereinstimmungsgrades der verschiedenen eingesetzten Sequenziermethoden wurde Tabelle 5 zugrunde gelegt.

$\kappa$	Übereinstimmungen
$< 0$	keine
0,10 – 0,40	schwach
0,41 – 0,60	deutlich
0,61 – 0,80	stark
0,81 – 1,00	fast vollständig

Tabelle 5: Cohen's Kappa-Maß ( $\kappa$ ) und assoziierter Übereinstimmungsgrad zweier Methoden



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Methodenvergleich von Sanger- und Pyrosequenzierung unter Verwendung identischer Primer der KRAS-Mutation

In der hier vorgelegten Untersuchung wurden insgesamt 195 kolorektale Karzino-  
me auf das Vorliegen einer Mutation in Codon 12 und 13 von Exon 2 des  
KRAS-Gens mittels Pyrosequenzierung und Sequenzierung nach Sanger un-  
tersucht und die Ergebnisse verglichen. Mit der Sequenzierungsmethode nach  
Sanger wurde bei 68 (35 %) Patienten, mit der Pyrosequenzierung bei 57 (29  
%) Patienten eine KRAS-Mutation nachgewiesen (siehe Patientenkollektiv im  
Anhang).

n=195		Pyrosequenzierung			
		wildtyp	mutiert	n.d.	
Sanger	wildtyp	110	5	9	124
	mutiert	6	51	11	68
	n.d.	1	1	1	3
		117	57	21	<b>195</b>

n.d.: kein auswertbares Sequenzierergebnis

*Tabelle 6: Auswertung der Pyro- und Sangersequenzierung*

Unterschiedliche Ergebnisse konnten bei zwei Proben festgestellt werden. So  
zeigte sich einmal eine c.34G>T-Mutation in der Sangersequenzierung, dage-  
gen in der Pyrosequenzierung eine c.35G>A-Mutation. Bei einer weiteren Un-  
tersuchung konnte eine c.34G>A-Mutation in der Sanger-, und eine c34G>T-  
Mutation in der Pyrosequenzierung nachgewiesen werden. Weiterhin ist zu er-  
wähnen, dass von den 21 Proben der Pyrosequenzierung 18 Fälle auf Grund  
fehlender bzw. zu geringer Mengen an DNA nicht überprüft werden konnten.

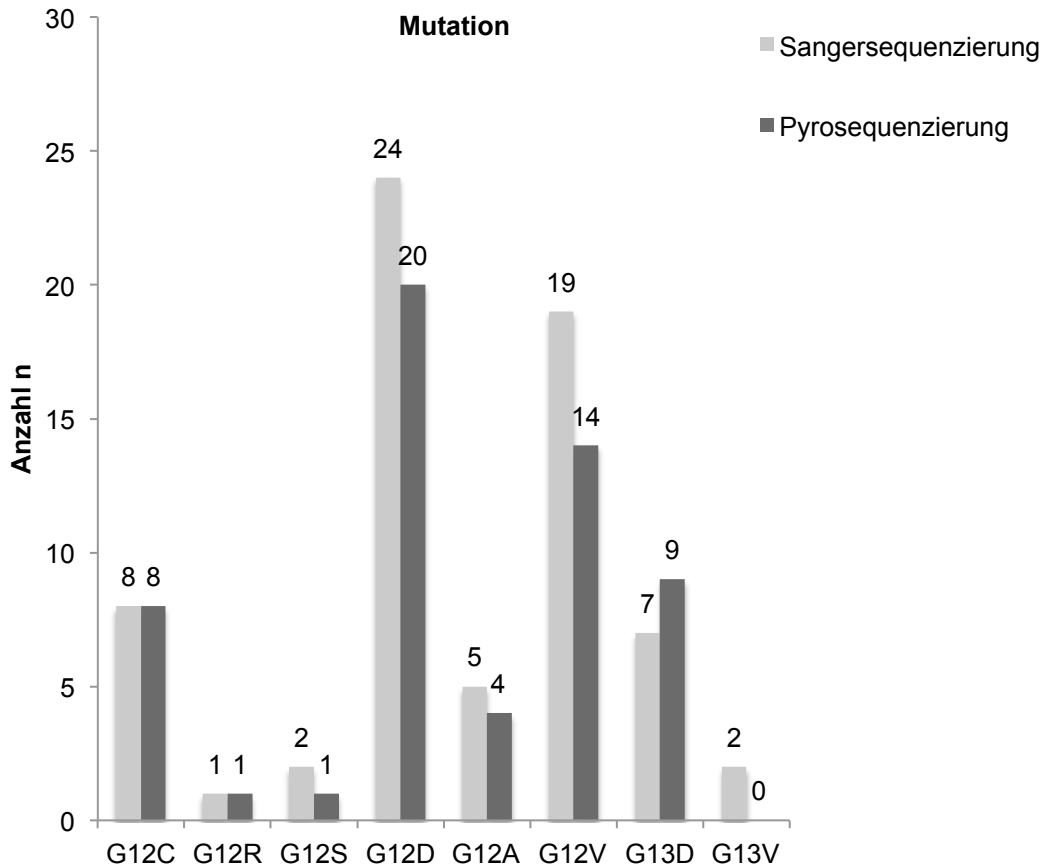


Abb. 32: Diagramm der detektierten KRAS-Mutationen mittels Pyro- und Sangersequenzierung

Nachfolgend sind in den Abbildungen 33 und 34 beispielhaft detektierte Mutationen mittels Sangersequenzierung dargestellt:

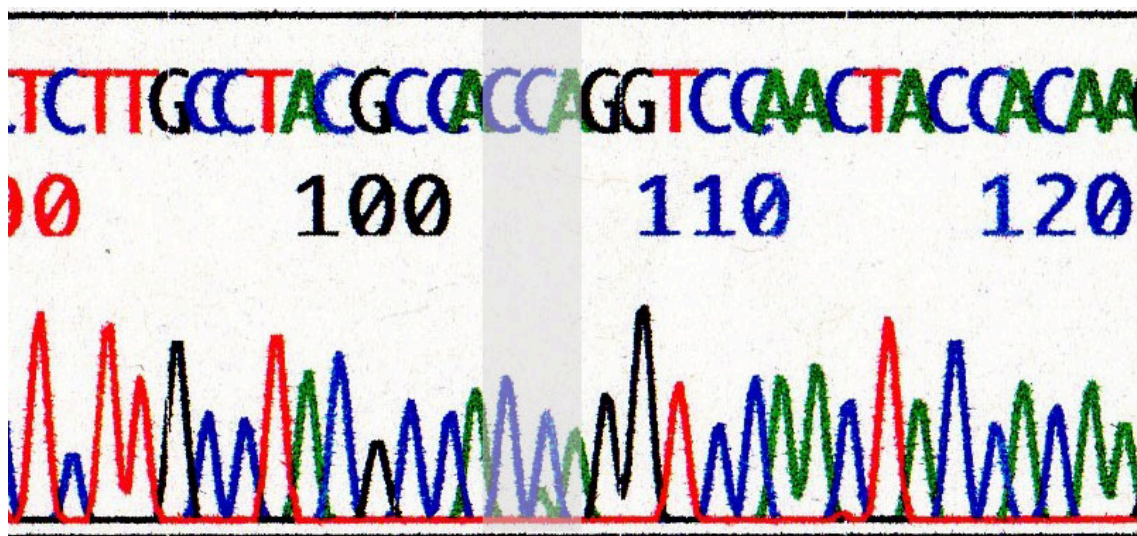


Abb. 33: Kolorektales Karzinom mit p.G12C Mutation, Basensubstitution G>C in Position 34 in Codon 12 Exon 2 des KRAS-Gens, Sequenzierungsmethode nach Sanger

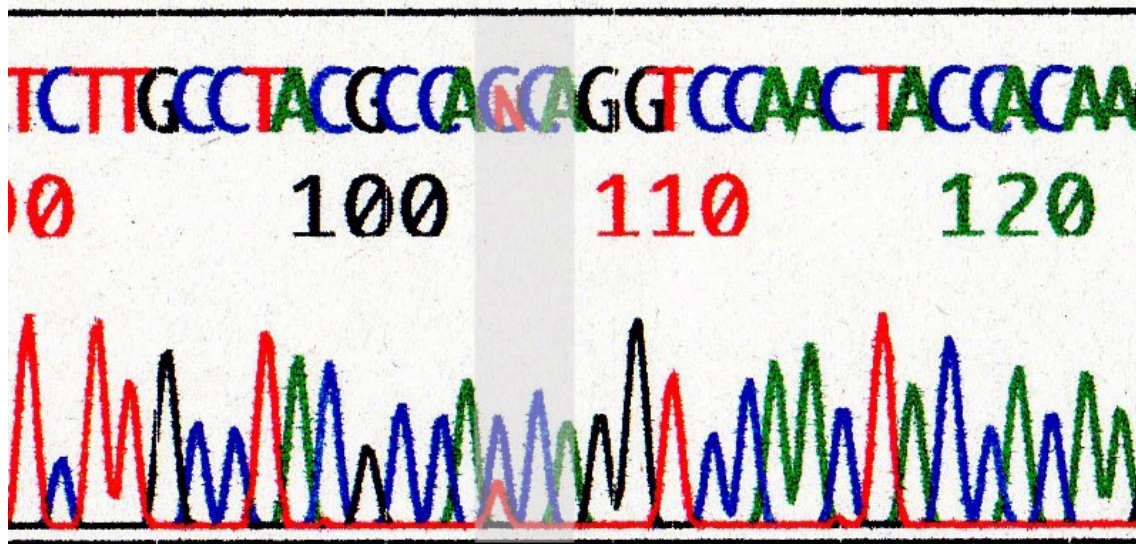


Abb. 34: Kolorektales Karzinom mit p.G12D Mutation, Basensubstitution G>A in Position 35 in Codon 12 Exon 2 des KRAS-Gens, Sequenzierungsmethode nach Sanger

In den folgenden Abbildungen 35 a-e sind detektierte Mutationen mittels Pyrosequenzierung im SQA-Modus dargestellt. Von oben nach unten sind beispielhaft ein KRAS Wildtyp, eine c.34G>T Mutation, eine c.34G>C Mutation, eine c.37G>C Mutation und eine c.38G>T Mutation aufgezeigt. Mittels SQA-Modus ist lediglich erkennbar, dass ein Guanidin-Nukleotid an Position 34 oder 35, bzw. 37 oder 38 ersetzt wurde. Die Pyrosequenzierung kann im SQA-Modus nicht unterscheiden, ob eine c.35G>T oder eine c.34G>C Mutation bzw. eine c.37G>T oder eine c.38G>C Mutation vorliegt.

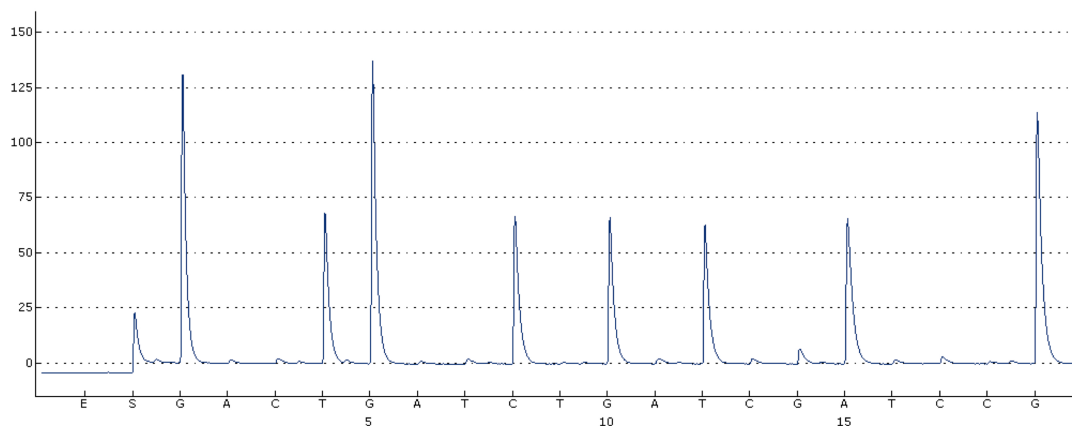


Abb. 35.a: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, Wildtyp

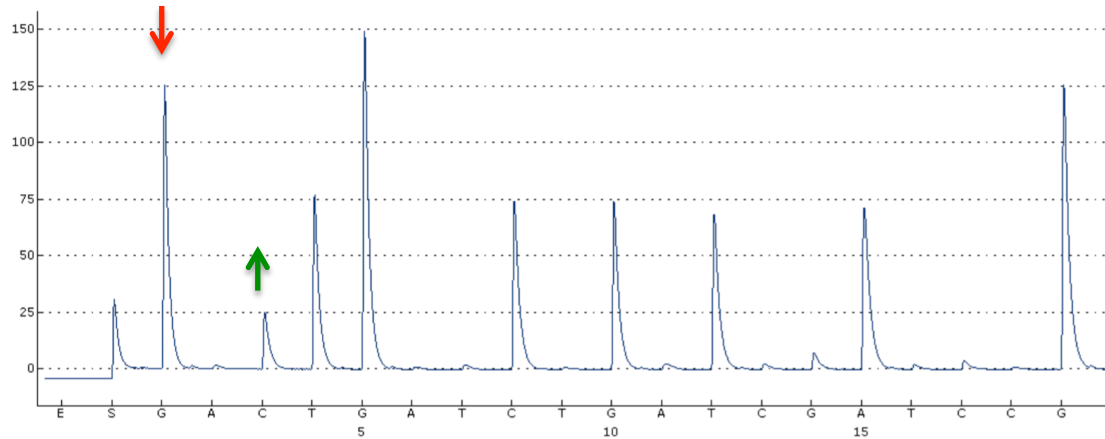


Abb. 35.b: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>C oder c.35G>C Mutation

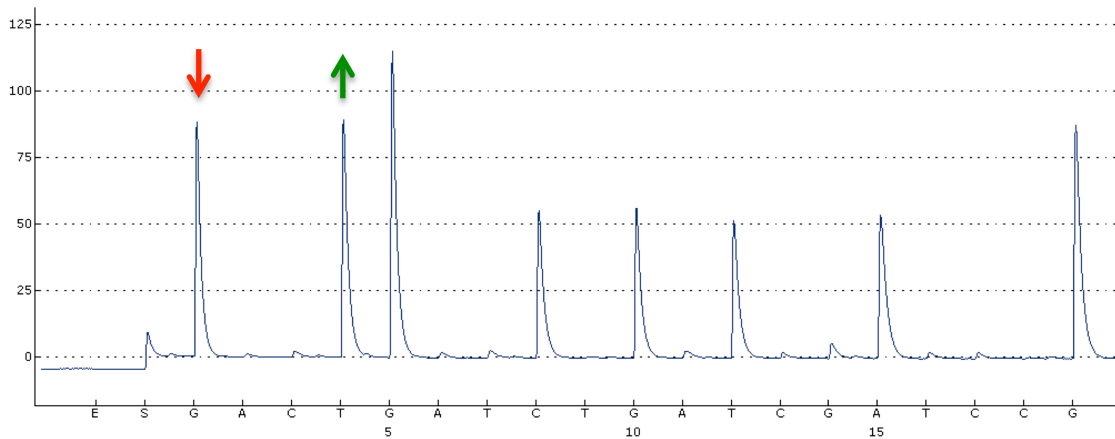


Abb. 35.c: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>T oder c.35G>T Mutation

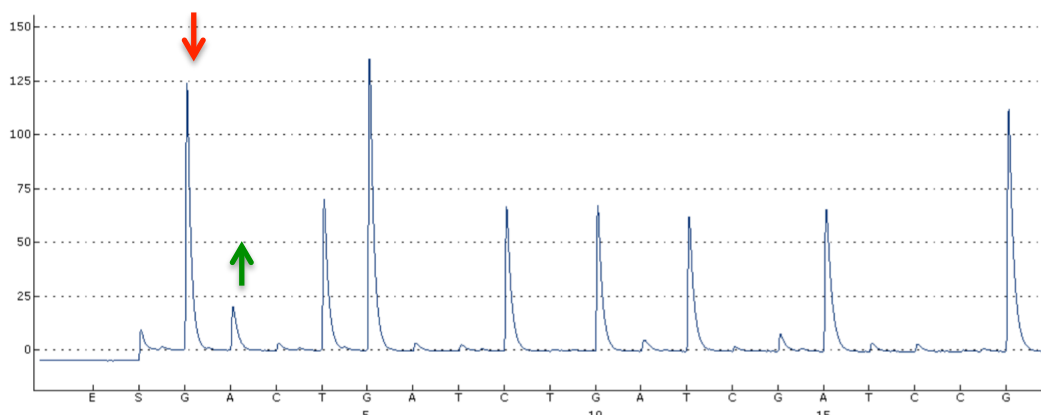


Abb. 35.d: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>A oder c.35G>A Mutation

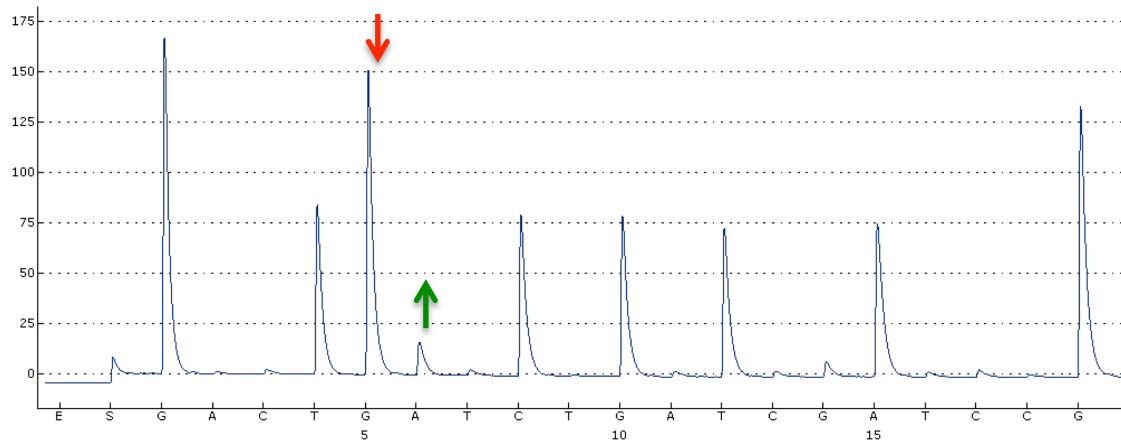


Abb. 35.e: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.37G>A oder c.38G>A Mutation

Die Pyrosequenzierung im AQ-Modus kann hingegen nicht nur die einzelnen Nukleotidaustausche an den jeweiligen Positionen Codon 12 und Codon 13 unterscheiden, sondern zudem auch quantifizieren. Ausgewählte Beispiele zeigen die Abbildungen 36 a. bis 38.b :

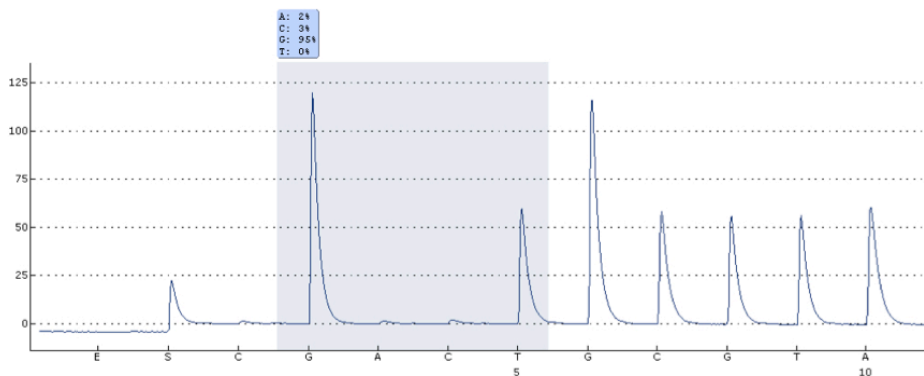


Abb. 36.a: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS35FLO1: KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 35

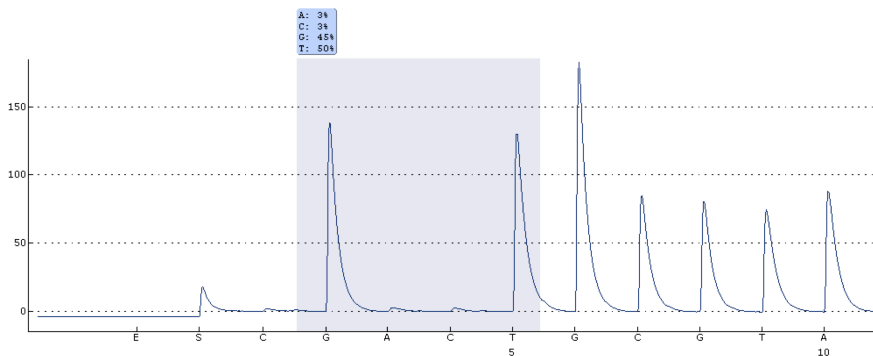


Abb. 36.b: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS35FLO1: c.35G>T Mutation an Position 35. 50 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Thymidin-Nukleotide ersetzt

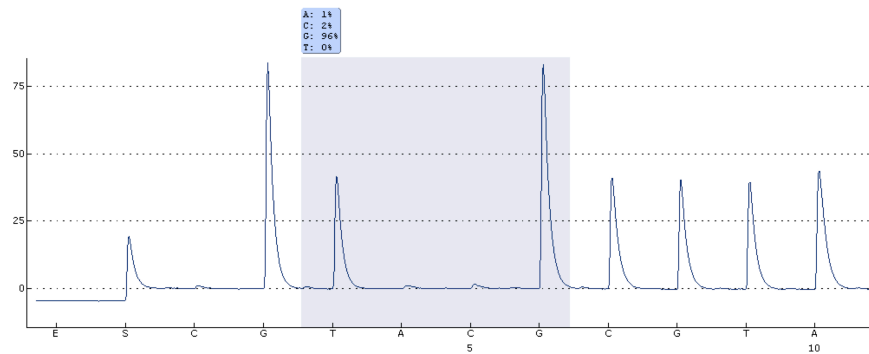


Abb. 37.a: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS37FLO1. KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 37

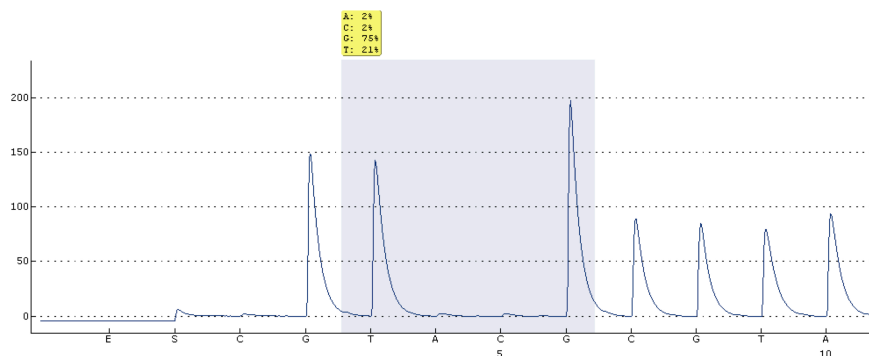


Abb. 37.b: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS37FLO1: c.37G>T Mutation an Position 37. 21 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Thymidin-Nukleotide ersetzt

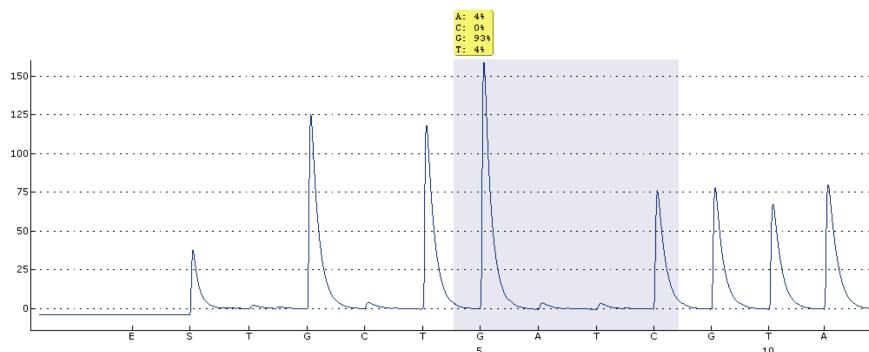


Abb. 38.a: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS38FLO1: KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 38

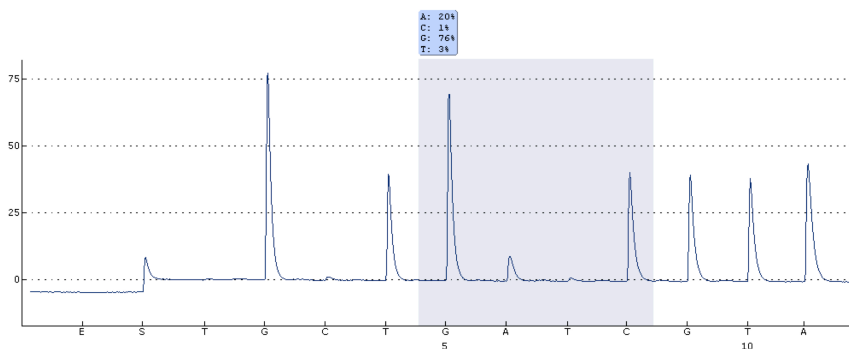


Abb. 38.b: Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS38FLO1: c.38G>A Mutation an Position 38. 20 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Adenosin-Nukleotide ersetzt

Die Ergebnisse zeigen einen hohen Grad an Übereinstimmung der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden. Der Kappa-Koeffizient von  $\kappa = 0,86$ , asymptotischer Standardfehler = 0,041 ( $k_w = 0,86$ , asymptotischer Standardfehler = 0,096) zeigt eine sehr gute Stärke der Übereinstimmung für die Methoden Sangersequenzierung und Pyrosequenzierung im SQA-Modus bezüglich der Mutationsanalyse des Exon 2 des Gens. Für den Vergleich zwischen Sangersequenzierung und Pyrosequenzierung im AQ-Modus ergab sich ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung der Mutationsanalyse des Exon 2 des Gens bei einem Kappa-Koeffizienten mit einem Wert von  $\kappa = 0,83$ , asymptotischer Standardfehler = 0,045 ( $k_w = 0,83$ , asymptotischer Standardfehler = 0,091).

## 5.2 Pyrosequenzierung und Detektion von BRAF-Mutation

Die BRAF-Mutation wurde ausschließlich mit der Pyrosequenzierungsmethode untersucht. Dabei wurden 189 kolorektale Karzinome untersucht, bei denen in 20 Fällen BRAF-Mutationen (11 %) nachweisbar waren. Die anderen 169 Fälle (89 %) zeigten keine Mutation im BRAF-Gen. In den folgenden Pyrogrammen (Abbildung 39.a und 39.b) sieht man beispielhaft eine V600E-Mutation im BRAF-Gen im SQA-Modus. Im Gegensatz zum Wildtyp sieht man neben dem Thymidin-Nukleotid den Peak des Adenosin-Nukleotids der Mutation c.1799T>A. Im AQ-Modus (Abbildung 40) wird zusätzlich zur Höhe der Peaks der prozentuale Anteil der in der Probe ausgetauschten Nukleotide angegeben.

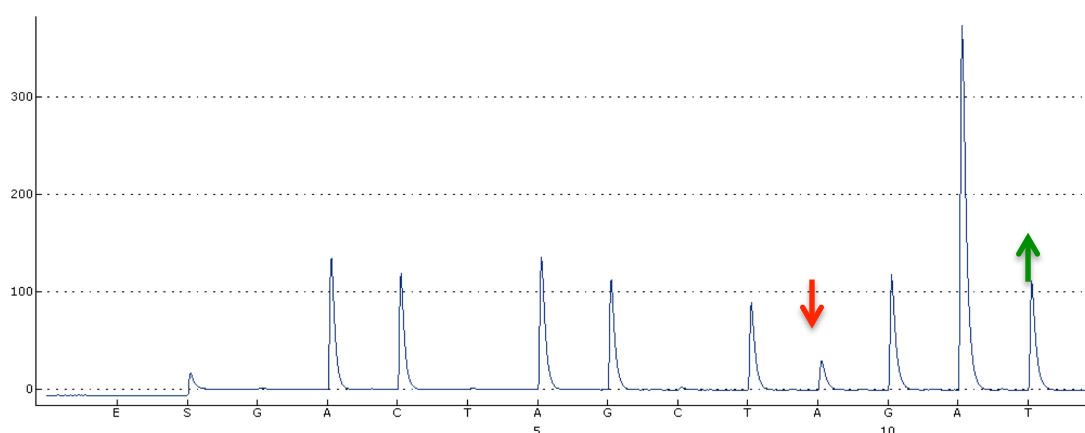


Abb. 39.a: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus. Dispensationsorder BRAF1. BRAF V600E-Mutation mit einem Basenaustausch an Position 1799

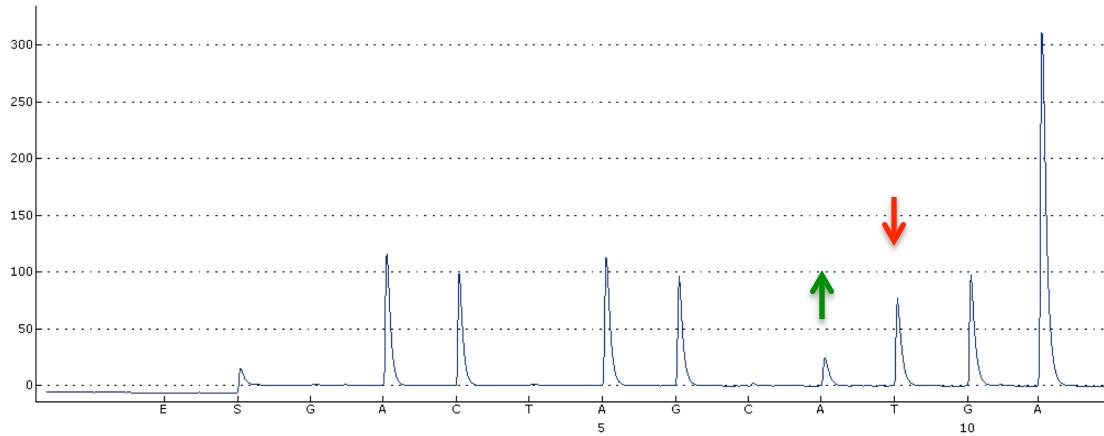


Abb. 39.b: Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus. Dispensationsorder BRAF2. BRAF V600E-Mutation mit einem Basenaustausch an Position 1799

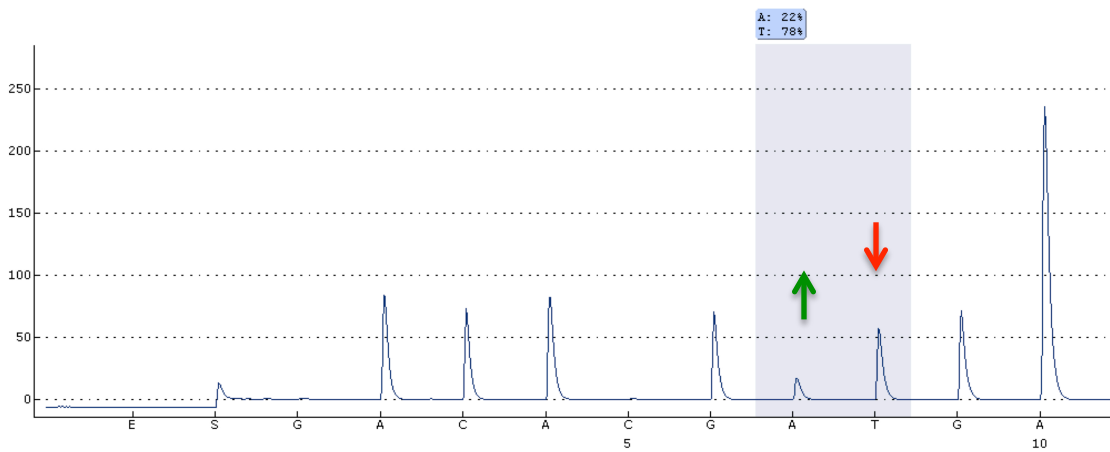


Abb. 40: Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder BRAF3. Quantifizierung im AQ-Modus die Mutation c.1799T>A bei der 22 % der Thymidin-Nukleotide durch Adenosin-Nukleotide ersetzt sind



BRAF-Mutationen zeigten sich signifikant häufiger bei Tumoren mit niedrigem Differenzierungsgrad. So fand sich keine BRAF-Mutation bei G1-Tumoren. In 9 von 135 (7 %) G2-Tumoren bzw. in 10 von 51 (20 %) G3-Tumoren und 1 von 2 (50 %) G4-Tumoren fand sich jeweils eine BRAF-Mutation (Abbildung 41).

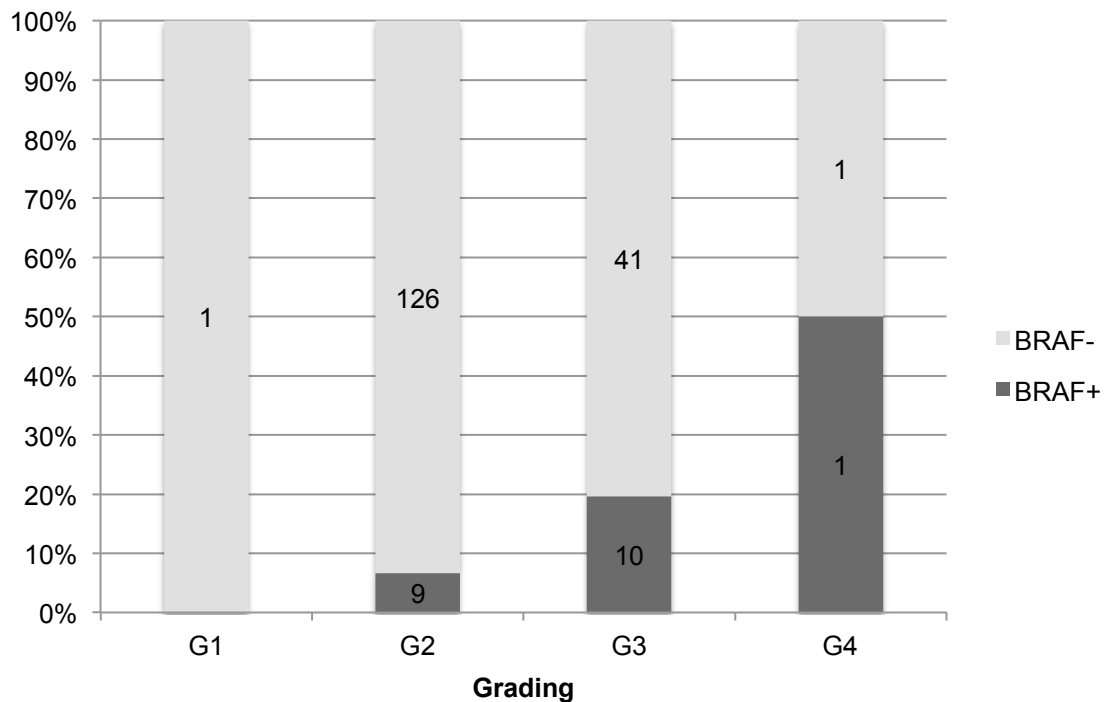


Abb. 41: BRAF-Mutation im Vergleich zum Grading

Die BRAF-mutierten kolorektalen Karzinome in dem hier vorgestellten Kollektiv zeigten signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen (exakter Test nach Fisher- $p=0,043$ ). Ebenfalls ein überdurchschnittlicher Zusammenhang fand sich zwischen dem Vorhandensein einer BRAF-Mutation und der Lage des Tumors im Kolonrahmen (rechts > links,  $p=0,030$ , exakter Test nach Fisher). Kein überzufälliger Zusammenhang zeigte sich jeweils zwischen BRAF-Mutation und der Eindringtiefe des Tumors in die Kolonwandung, Fernmetastasen, dem Alter sowie dem Tumor Budding (Tabelle 7).

Untersuchte Größe		BRAF		P-Wert	
		n=189 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		positiv 20 (11 %)	negativ 169 (89 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi-squared test mit Yates' correction
<b>Eindringtiefe</b>	T1/T2 T3/T4	2 (10) 18 (90)	33 (20) 136 (80)	0,24	0,46 <sup>2</sup>
<b>Lymphknotenstatus<sup>1</sup></b>	N+ N-	16 (80) 4 (20)	97 (58) 71 (42)	<b>0,043</b>	0,093 <sup>2</sup>
<b>Fernmetastasen</b>	M+ M-	5 (25) 15 (75)	56 (33) 113 (67)	0,32	0,63
<b>Grading</b>	1./2. 3./4.	9 (45) 11 (55)	127 (75) 42 (25)	<b>0,0068</b>	<b>0,01</b>
<b>Lokalisation</b>	rechtsseitig linksseitig	11 (55) 9 (45)	52 (31) 117 (69)	<b>0,030</b>	0,055
<b>Alter</b>	< 50 LJ > 50 LJ	0 (<0,1) 20 (100)	17 (10) 152 (90)	0,14	0,28 <sup>2</sup>
<b>Geschlecht</b>	männlich weiblich	10 (9) 10 (91)	100 (13) 69 (87)	0,29	0,58
<b>Budding</b>	ja nein	10 (50) 10 (50)	74 (44) 95 (56)	0,78	0,77

<sup>1</sup>: 188 Fälle / <sup>2</sup>: Kann inkorrekt sein wegen zu niedriger Fallzahlen

Tabelle 7: Signifikanzbestimmung des BRAF-Status im Vergleich mit den erhobenen Daten

### 5.3 Ergebnisse der morphologischen Analyse von Tumorzellbudding

195 Fälle wurden auf ein Tumor Budding an der Invasionsfront untersucht. In 87 von 195 (45 %) der CRC fand sich histologisch ein Tumorzellbudding an der Invasionsfront. 108 von 195 Fällen (55 %) zeigten große Zellkomplexe an der Invasionsfront ohne Abknospung von Tumoreinzellen oder kleinen Tumorzellverbänden. Tumorzellbudding fand sich signifikant häufiger bei Tumoren mit fortgeschrittener Tiefeninfiltration (höhere pT-Stadien), Lymphknoten- oder Fernmetastasen bzw. in UICC-Stadien III/IV.

Kein überzufälliger Zusammenhang zeigte sich jeweils zwischen Tumorzellbud-  
ding und Differenzierungsgrad, der Lokalisation des Tumors im Kolonrahmen  
sowie dem Alter der Patienten, wie in Tabelle 8 ersichtlich.

Untersuchte Größe		Budding		P-Wert	
		n=195 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		ja 87 (44 %)	nein 108 (55 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi- squared test mit Yates' correction
<b>Eindringtiefe</b>	T1/T2	9 (25)	27 (75)	<b>0,0066</b>	<b>0,015</b>
	T3/T4	78 (49)	81 (51)		
<b>Lymphknoten- status <sup>1</sup></b>	N+	61 (53)	55 (47)	<b>0,0061</b>	<b>0,013</b>
	N-	26 (33)	52 (67)		
<b>Fernmetastasen</b>	M+	39 (60)	26(40)	<b>0,0016</b>	<b>0,0037</b>
	M-	48 (37)	82(63)		
<b>UICC- Klassifikation</b>	I./II.	16 (26)	44 (74)	<b>0,0004</b>	<b>0,0009</b>
	III./IV.	71 (53)	64 (47)		
<b>Grading</b>	1./2.	62 (44)	79 (56)	0,68	0,90
	3./4.	25 (46)	29 (64)		
<b>Lokalisation</b>	rechts	27 (42)	37 (58)	0,37	0,75
	links	60 (46)	71 (54)		
<b>Geschlecht</b>	männlich	54 (47)	60 (53)	0,068	0,14
	weiblich	48 (59)	33 (41)		
<b>Alter</b>	< 50 LJ	6 (33)	12 (67)	0,22	0,45
	> 50 LJ	81 (46)	96 (54)		

<sup>1</sup>:194 Fälle

Tabelle 8: Signifikanzbestimmung des Tumor Budding im Vergleich mit den erhobenen Daten

Bei pT1 Tumoren fanden sich in einem Fall, bei pT2-Tumoren acht Karzinome mit Tumor Budding. Hingegen zeigte sich bei Patienten mit pT3-Tumoren in 62 von 130 Karzinomen ein Budding von Tumoreinzelnzellen und bei pT4-Tumoren in 16 von 30 Karzinomen.

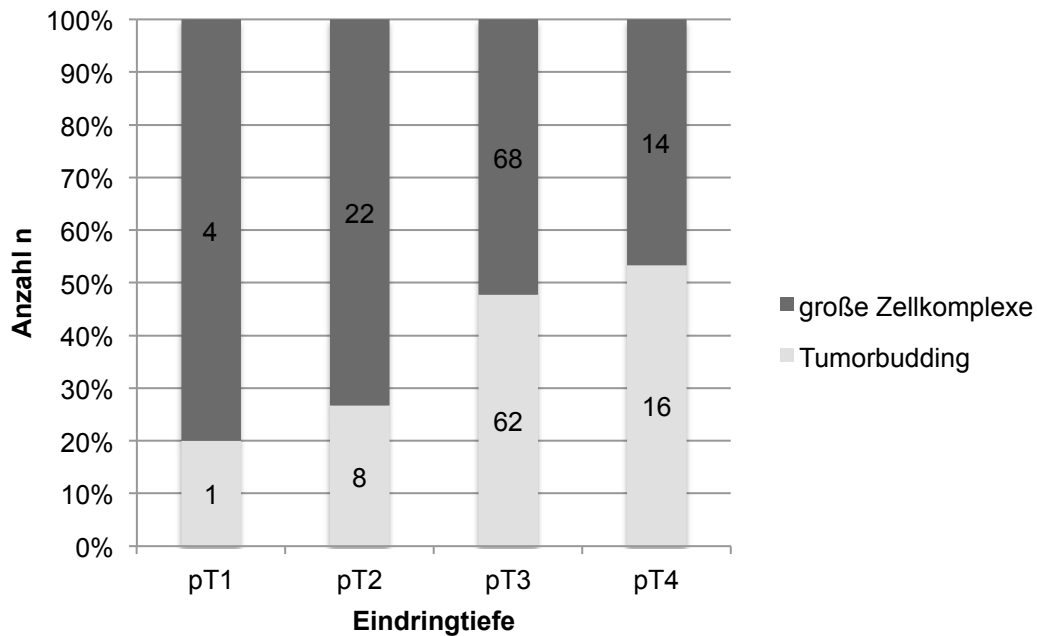


Abb. 42: Vergleich Tumor Budding mit der Tumoreindringtiefe

Entsprechend zeigten Tumore mit höheren UICC-Stadien häufiger ein Tumoreinzelnzellbudding. 5 von 20 Tumoren im Stadium I, 11 von 29 Tumoren des Stadiums II, 27 von 63 Tumoren im Stadium III und 44 von 72 Tumoren im Stadium IV zeigten jeweils ein Tumor Budding.

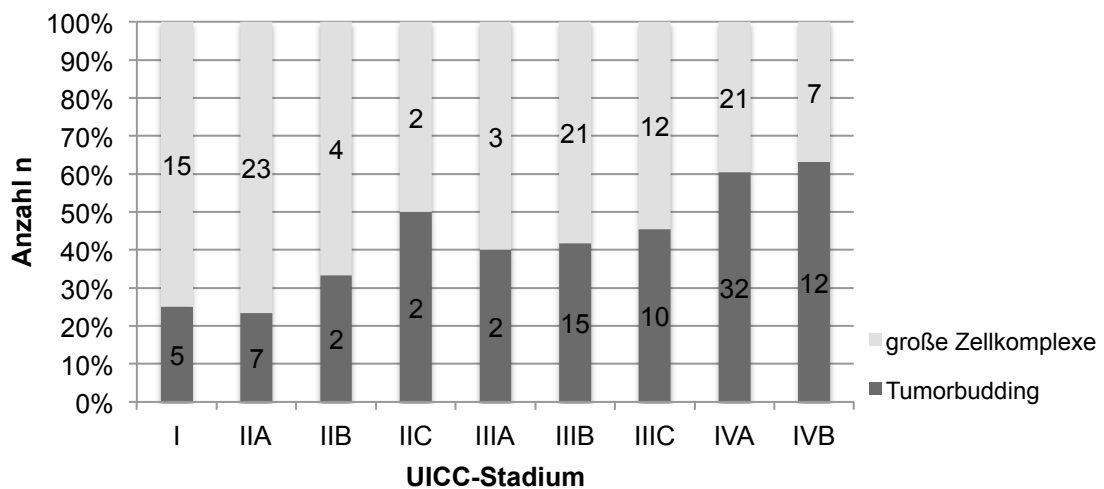


Abb. 43: Vergleich Tumor Budding mit den UICC-Stadien

## 5.4 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Art der Invasionsfront

Bei 190 Fällen wurden in Bezug auf die Art der Invasionsfront zwei histologische Muster unterschieden: große plumpe Tumorzellverbände mit Ausbildung einer breiten, relativ scharf begrenzten Invasionsfront (Pattern breit) versus einem Wachstum mit relativ kleinen unregelmäßig geformten Tumorzellverbänden mit Aufspaltung an der Invasionsfront (Pattern nicht breit). In 163 von 190 Fällen (86 %) fand sich histologisch eine breite Invasionsfront, in 27 der 190 kolorektaler Karzinome (14 %) nicht. Überzufällig häufig fand sich eine nicht breite Invasionsfront bei Tumoren mit fortgeschrittenen pT-Stadien und fortgeschrittene UICC-Stadien, entsprechend Tumoren mit Fern- oder Lymphknotenmetastasen. Zudem zeigte sich signifikant häufiger eine breite Invasionsfront bei rechtsseitigen Tumoren.

Untersuchte Größe		Invasionsfront		P-Wert	
		n=190 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		breit 163 (85,8 %)	nicht breit 27 (14,2 %)	Fisher's Test	Pearson's Chisquared test mit Yates' correction
<b>Eindringtiefe</b>	T1/T2	35 (100)	0 (<0,01)	<b>0,0026</b>	<b>0,017</b>
	T3/T4	128 (83)	27 (27)		
<b>Lymphknoten- status</b> <sup>1</sup>	N+	91 (81)	21 (19)	<b>0,026</b>	<b>0,057</b>
	N-	71 (92)	6 (8)		
<b>Fernmetastasen</b>	M+	48 (76)	15 (24)	<b>0,0084</b>	<b>0,014</b>
	M-	115 (91)	12 (9)		
<b>UICC- Klassifikation</b>	I./II.	57 (97)	2 (3)	<b>0,0021</b>	<b>0,0082</b>
	III./IV.	106 (81)	25 (19)		
<b>Grading</b>	1./2.	115 (84)	22 (16)	0,10	0,21
	3./4.	48 (91)	5 (9)		
<b>Geschlecht</b> <sup>2</sup>	männlich	94 (82)	20 (18)	0,29	0,58
	weiblich	70 (86)	11 (14)		
<b>Lokalisation</b>	rechts	69 (92)	6 (8)	<b>0,036</b>	<b>0,077</b>
	links	94 (82)	21 (18)		

<sup>1</sup>: 189 Fälle / <sup>2</sup>:195 Fälle

Tabelle 9: Signifikanzbestimmung der Invasionsfront im Vergleich mit den erhobenen Daten

Bei pT1- sowie bei pT2-Tumoren zeigte sich in unserem Kollektiv ausnahmslos eine breite Invasionsfront. Dagegen zeigte sich bei Patienten mit pT3-Tumoren in 25 von 126 (20 %) der kolorektalen Karzinome und bei 2 von 29 (7 %) der pT4-Karzinome eine nicht breite Invasionsfront.

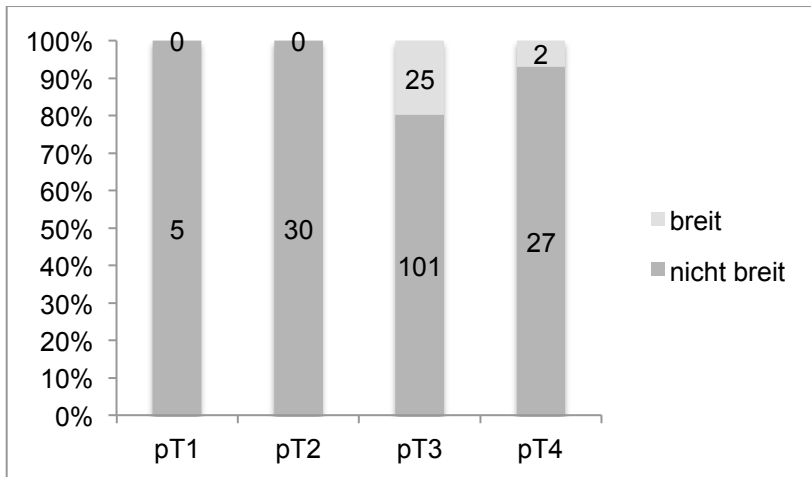


Abb. 44: Vergleich Invasionsfront mit der Tumoreindringtiefe

Entsprechend zeigten Tumoren höherer UICC-Stadien häufiger keine breite Invasionsfront. Alle 20 Tumoren im Stadium I wiesen eine breite Invasionsfront auf. Im Stadium II zeigten 2 der 39 (5 %) Tumoren, im Stadium III 9 von 60 (15 %) und im Stadium IV 16 von 70 (23 %) kolorektalen Karzinomen bereits keine breite Invasionsfront mehr.

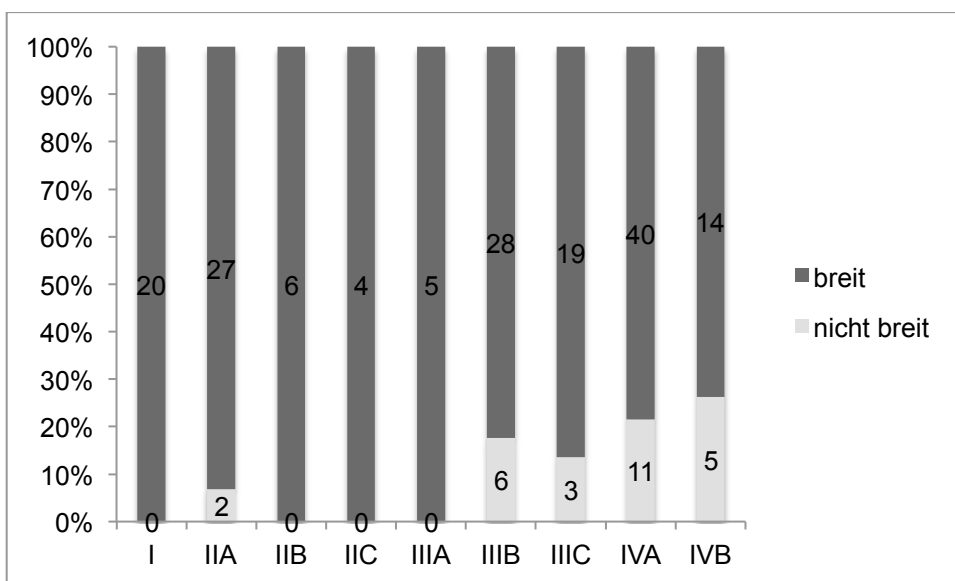


Abb. 45: Vergleich Invasionsfront mit den UICC-Stadien

## 5.5 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion

Untersuchte Größe		Umgebungsreaktion		P-Wert	
		n=185 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		Fib1/Fib2 157 (85 %)	IMLY 28 (15 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi-squared test mit Yates' correction
Eindringtiefe	T1/T2 T3/T4	23 (15) 134 (85)	12 (43) 16 (57)	0,10	<b>0,0012</b>
Lymphknoten- status	N+ N-	104 (66) 53 (34)	6 (21) 22 (79)	<b>0,000013</b>	<b>0,000028</b>
Fernmetastasen	M+ M-	54 (34) 103 (66)	4 (14) 24 (86)	<b>0,025</b>	0,059 <sup>3</sup>
UICC- Klassifikation	I./II. III./IV.	39 (33) 118 (67)	20 (71) 8 (29)	<b>0,0000034</b>	<b>0,0000028</b>
Grading	1./2. 3./4.	109 (69) 48 (31)	24 (86) 4 (14)	0,057	0,12 <sup>3</sup>
Lokalisation	rechts links	63 (40) 94 (60)	10 (36) 18 (64)	0,41	0,82
Budding	ja nein	72 (46) 85 (54)	10 (36) 18 (64)	0,22	0,43
Umgebung <sup>1</sup>	breit nicht breit	132(85) 24(15)	25(89) 3(11)	0,38	0,72 <sup>3</sup>
KRAS <sup>1</sup>	positiv negativ	62(40) 94(60)	7(25) 21(75)	0,10	0,20
Geschlecht	männlich weiblich	96(90) 61(78)	11(10) 17(22)	<b>0,026</b>	0,051
BRAF <sup>2</sup>	positiv negativ	18(12) 134(88)	1(4) 27(96)	0,17	0,33 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>: 184 Fälle / <sup>2</sup>: 180 Fälle / <sup>3</sup>: kann inkorrekt sein wegen zu niedriger Fallzahlen

Tabelle 10: Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten

Bei 185 Fällen wurde die Umgebungsreaktion des Bindegewebes und der Zellen des Immunsystems auf den Tumor morphologisch analysiert. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf Fibroblastenproliferate (Fib1 und Fib2) und auf die Reaktion des Immunsystems, insbesondere Lymphozyten (IMLY) gelegt. In 157 von 185 Fällen (85 %) fand sich eine fibroblastenreiche Umgebungsreaktion an der Invasionsfront, 28 von 185 Patienten (15 %) mit kolorektalen Karzinomen zeigten eine Umgebungsreaktion mit vielen Lymphozyten und wenig Fibroblasten. Eine fibroblastenreiche Umgebungsreaktion fand sich signifikant häufiger bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, sowie in fortgeschrittenen UICC-Stadien. Die Zusammenhänge zwischen Umgebungsreaktion, Eindringtiefe und Fernmetastasen zeigt Tabelle 10.

Bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen zeigten 104 von 110 Fällen (95 %) eine fibroblastenreiche Reaktion, nur 6 von 110 Fällen (5 %) mit Lymphknotenmetastasen zeigten eine lymphozytenreiche und fibroblastenarme Reaktion. Bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen zeigten sich 53 von 75 Fällen (71 %) mit fibroblastenreicher Umgebungsreaktion, 22 von 75 Fällen (29 %) eine lymphozytenreiche Reaktion.

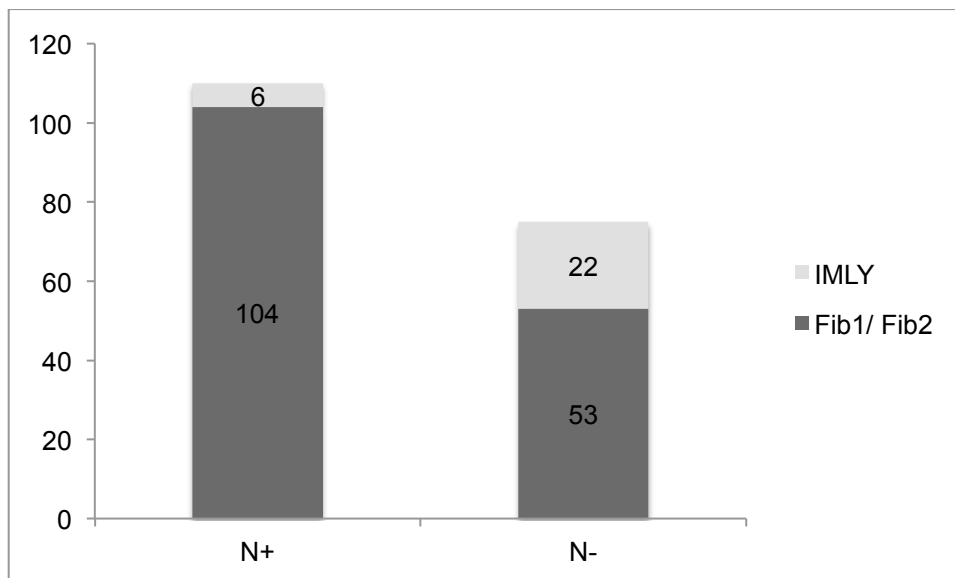


Abb. 46: Vergleich Umgebungsreaktion mit dem Lymphknotenstatus



Tumoren höherer UICC-Stadien zeigten häufiger eine fibroblastenreiche Umgebungsreaktion. Eine fibroblastenreiche Reaktion zeigten 12 von 20 Tumoren im Stadium I, 27 von 39 im Stadium II, 58 von 61 Tumoren im Stadium III und 60 von 65 Tumoren im Stadium IV. Dagegen zeigten umgekehrt 8 von 20 Tumoren im Stadium I, 12 von 39 im Stadium II, 3 von 61 im Stadium III und 5 von 65 im Stadium IV eine lymphozytenreiche Umgebungsreaktion.

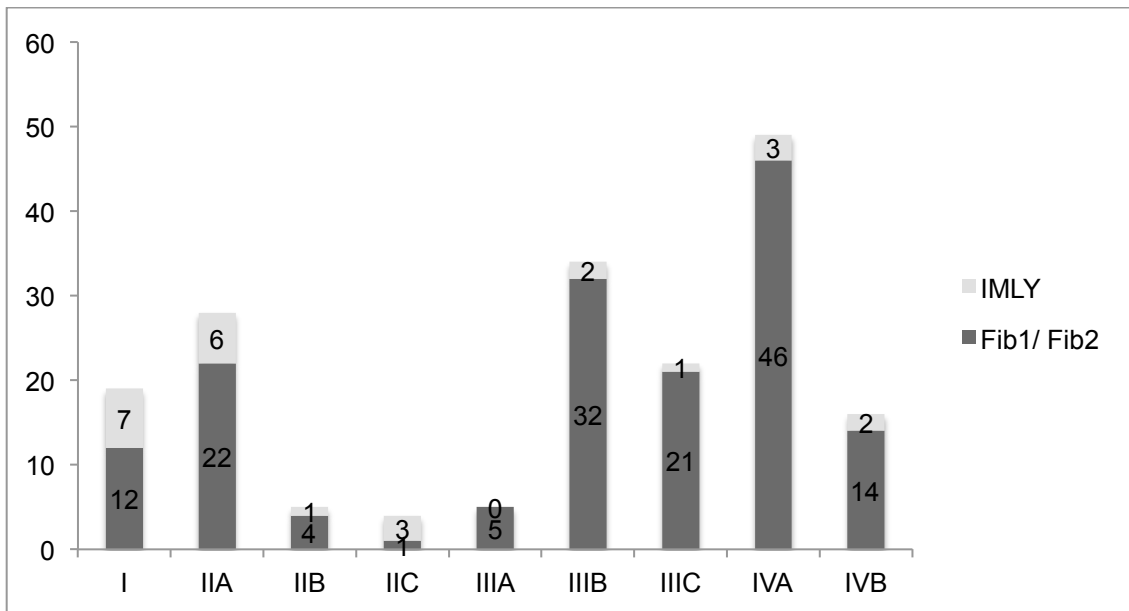


Abb. 47: Vergleich Umgebungsreaktion mit den UICC-Stadien

Zwischen der Art der Veränderungen im umgebenden Gewebe und der Eindringtiefe zeigte der Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,0012$ ), dagegen fand sich im Fisher-Test keine Signifikanz ( $p=0,10$ ). Bei dem Vergleich Umgebungsreaktion mit Fernmetastasen zeigte sich im Fisher-Test ein überdurchschnittlicher Zusammenhang ( $p=0,025$ ), dagegen im Chi-Quadrat-Test ( $p=0,059$ ) kein überzufälliger Zusammenhang (nur vier Fälle).

Auch beim Vergleich der Umgebungsreaktion mit dem Geschlecht zeigte sich im Fisher-Test für die fibroblastenreiche Reaktion ein signifikanter Zusammenhang (Fisher-Test  $p=0,026$ ). Kein überzufälliger Zusammenhang zeigte sich jeweils zwischen Umgebungsreaktion und Lokalisation im Kolonrahmen, Budding, Invasionsbreite, KRAS- oder BRAF-Mutation.

### 5.5.1 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/makrophagen-dominant und fibroblastenreich/plasmazell-dominant

Untersuchte Größe		Umgebungsreaktion		P-Wert	
		n=157 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		Fib1 120 (76 %)	Fib2 37 (24 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi-squared test mit Yates' correction
<b>Lymphknoten- status</b>	N+ N-	85 (71) 35 (29)	19 (51) 18 (49)	<b>0,025</b>	<b>0,046</b>
<b>Fernmetastasen</b>	M+ M-	45 (38) 75 (62)	9 (24) 28 (76)	0,10	0,20
<b>UICC- Klassifikation</b>	I./II. III./IV.	24 (20) 96 (80)	15 (41) 22 (59)	0,10	<b>0,021</b>
<b>Grading</b>	1./2. 3./4.	92 (77) 28 (23)	17 (46) 20 (54)	<b>0,00060</b>	<b>0,00080</b>
<b>Budding</b>	ja nein	66 (55) 54 (45)	6 (16) 31 (84)	<b>0,000021</b>	<b>0,000078</b>

Tabelle 11: Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit anderen erhobenen Daten

Insgesamt wurden die 157 Fälle mit einer fibroblastendominanten Umgebungsreaktion im Bereich des den Tumor umgebenden Stromas weiter untersucht. Hierbei wurde zwischen einer makrophagendominierten Reaktion und einem plasmazellreichen Infiltrat unterschieden. In 120 von 157 Fällen (76 %) fand sich eine fibroblastenreiche und makrophagendominante Umgebungsreaktion (Fib1) an der Invasionsfront, bei 37 von 157 Patienten (24 %) mit kolorektalen Karzinomen fanden sich fibroblastenreiche und plasmazell-dominante Reaktionen (Fib2). Eine fibroblasten- und makrophagenreiche Umgebungsreaktion fand sich signifikant häufiger bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, hohem Differenzierungsgrad und Tumor Budding. Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich beim Vergleich der Umgebungsreaktion und UICC-Klassifikation. Dabei

zeigte der Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,021$ ), dagegen fand sich im Fisher-Test keine Signifikanz ( $p=0,10$ ). Kein überzufälliger Zusammenhang zeigte sich bei Fernmetastasen (Tabelle 11).

Bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen zeigten sich in 85 von 104 Fällen (82 Prozent) eine fibroblastenreiche und makrophagendominante Reaktion, nur in 19 der 104 Fällen (18 %) zeigte sich mit Lymphknotenmetastasen eine fibroblastenreiche und plasmadominante Reaktion. Bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen zeigten sich 35 von 53 Fälle (66 %) fibroblasten- und makrophagenreich, 18 Fälle (34 %) fibroblasten- und plasmazellreich (Abbildung 48).

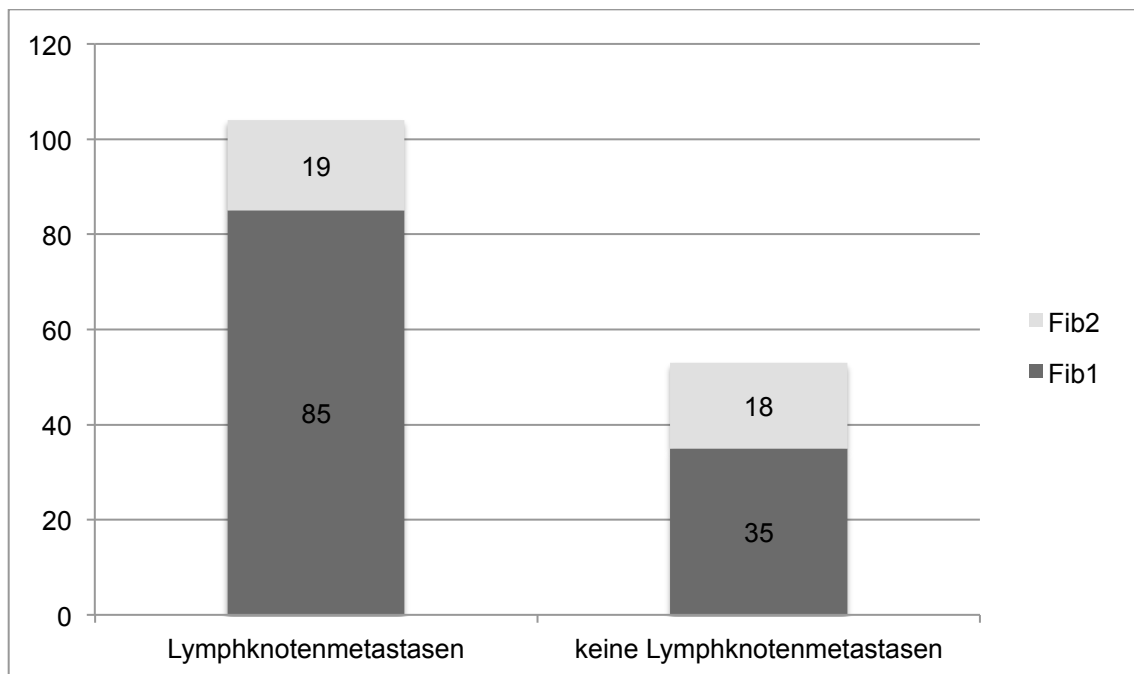


Abb. 48: Umgebungsreaktion im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus

66 von 72 Patienten (92 %) mit Tumor Budding hatten ein fibroblasten- und makrophagenreiches Reaktionsmuster, nur 6 Patienten (8 %) mit Tumor Budding hatten das plasmazelldominante Reaktionsmuster. Dagegen hatten mit histologisch großen Zellkomplexen 54 von 85 Patienten (64 %) ein fibroblasten- und makrophagenreiches Reaktionsmuster, sowie 31 Patienten (36 %) mit großen Zellkomplexen einen plasmazelldominanten Reaktionstyp (Abbildung 49).

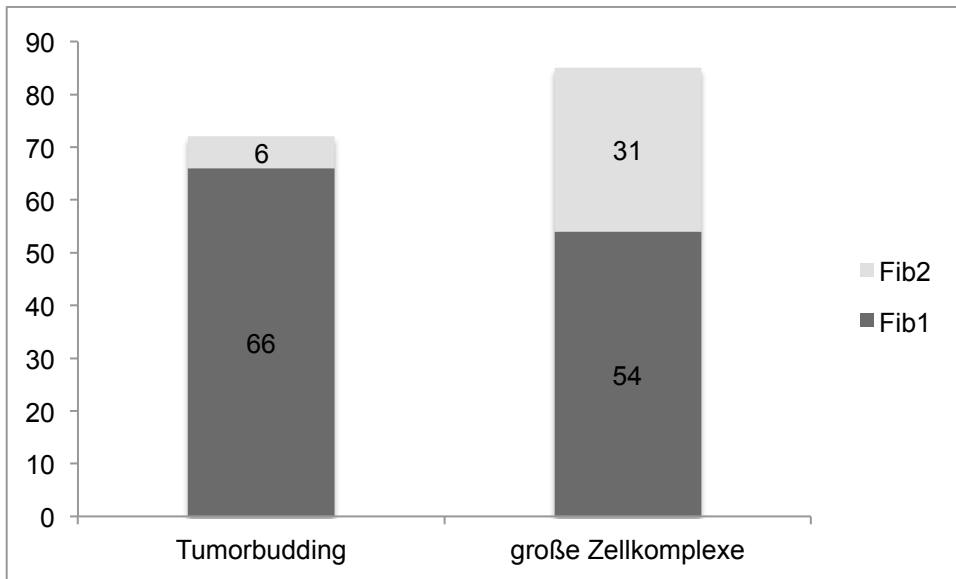


Abb. 49: Umgebungsreaktion an der Invasionsfront im Vergleich mit dem Tumor Budding

Fibroblasten- und makrophagendominante Tumoren sah man histologisch bei einem von zwei Patienten mit Differenzierungsgrad G1, bei 91 von 107 Patienten mit Differenzierungsgrad G2, bei 27 von 47 Patienten mit Differenzierungsgrad G3 und einem Patienten mit einem undifferenzierten Tumor G4. Fibroblasten- und plasmazelldominante Tumoren fanden sich folglich bei einem von zwei Patienten mit Differenzierungsgrad G1, 16 von 107 mit Differenzierungsgrad G2, 20 von 47 mit Differenzierungsgrad G3 (Abbildung 50).

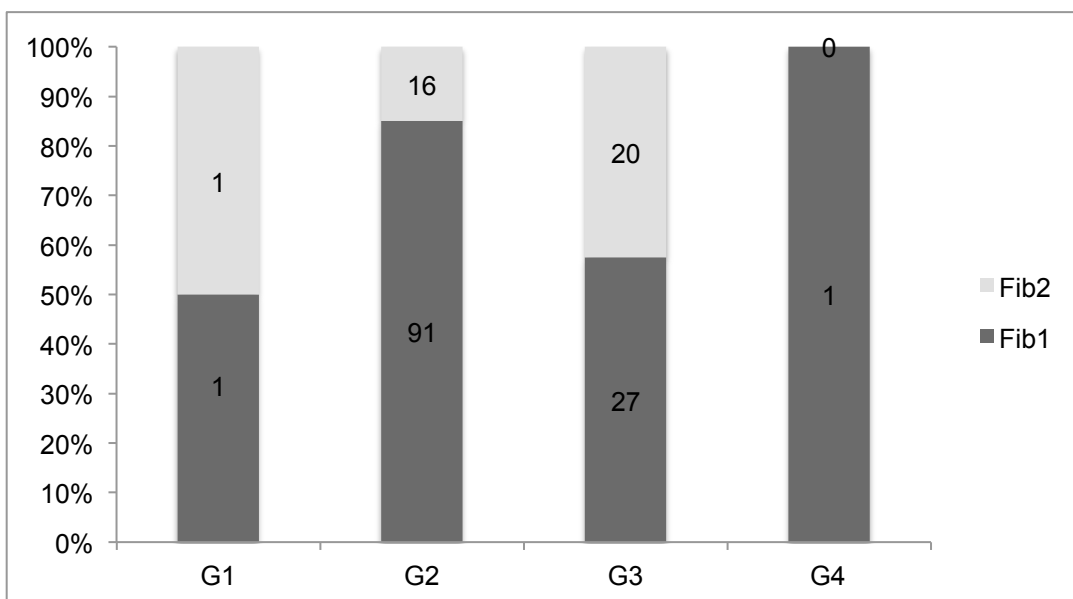


Abb. 50: Umgebungsreaktion im Vergleich mit dem Grading

### 5.5.2 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/plasmazell dominant und fibroblastenarm/lymphozytendominant

In 37 von 65 Fällen (57 %) zeigte sich eine fibroblastenreiche und plasmazell-dominante Umgebungsreaktion an der Invasionsfront, 28 von 65 Fällen (43 %) mit kolorektalen Karzinomen zeigten eine Umgebungsreaktion mit vielen Lymphozyten und wenig Fibroblasten. Eine fibroblastenreiche Umgebungsreaktion fand sich signifikant häufiger bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, sowie im fortgeschrittenen UICC-Stadium. Kein überzufälliger Zusammenhang zeigte sich beim Vergleich mit Tumor Budding (Tabelle 12).

Untersuchte Größe		Umgebungsreaktion		P-Wert	
		n=65 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
		Fib1/ Fib2 37 (57 %)	IMLY 28 (43 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi- squared test mit Yates' correction
<b>Lymphknoten- status</b>	N+	19 (51)	6 (21)	<b>0,013</b>	<b>0,028</b>
	N-	18 (49)	22 (79)		
<b>UICC- Klassifikation</b>	I./II.	15 (41)	20 (71)	<b>0,013</b>	<b>0,026</b>
	III./IV.	22 (59)	8 (29)		
<b>Budding</b>	positiv	6 (16)	10 (36)	0,065	0,13
	negativ	31 (84)	18 (64)		

Tabelle 12: Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten

Bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen zeigten sich in 19 von 25 Fällen fibroblastenreiche und plasmazell-dominante Umgebungsreaktionen. Sechs der 25 Fälle mit Lymphknotenmetastasen wiesen eine lymphozytenreiche Umgebungsreaktion auf. Bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen fand man bei 18 von 40 Patienten eine fibroblastenreiche und plasmazell-dominante Umgebungsreaktion, 22 der 40 Fälle waren vorwiegend lymphozytär geprägt (Abbildung 51).

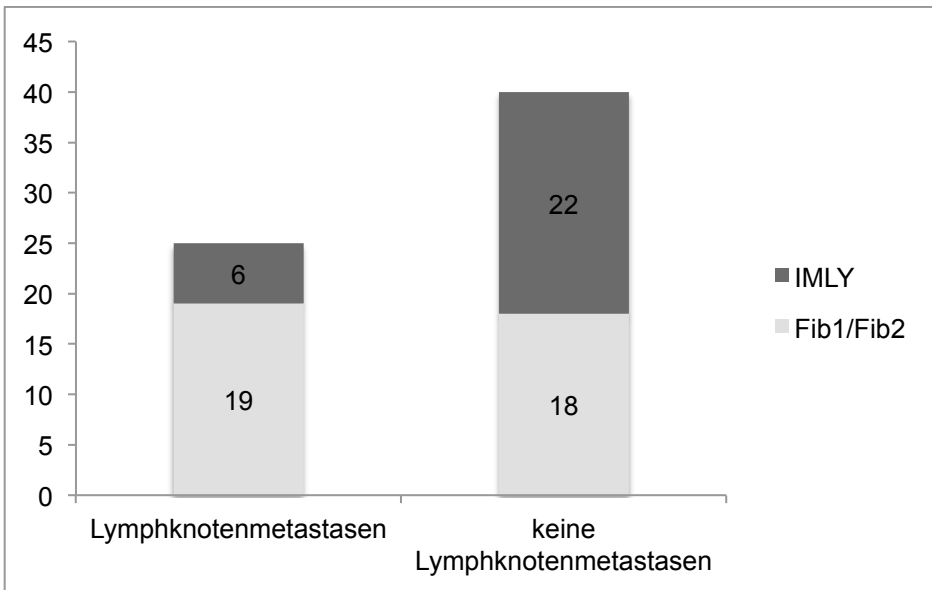


Abb. 51: Umgebungsreaktion im Vergleich mit Lymphknotenmetastasen

Bei Tumoren höherer UICC-Stadien fand man häufiger eine fibroblastenreiche und plasmazellreiche Umgebungsreaktion. Eine fibroblastenreiche und plasmazellreiche Reaktion zeigten 7 von 15 Tumoren im Stadium I. Im Stadium II waren es 8 von 20 Fälle, im Stadium III waren es 13 von 17 Tumoren und im Stadium IV 9 von 14 Tumoren. Dagegen wiesen umgekehrt 8 von 15 Tumoren im Stadium I, 12 von 20 im Stadium II, 3 von 17 im Stadium III und 5 von 14 im Stadium IV eine lymphozytenreiche Umgebungsreaktion auf.

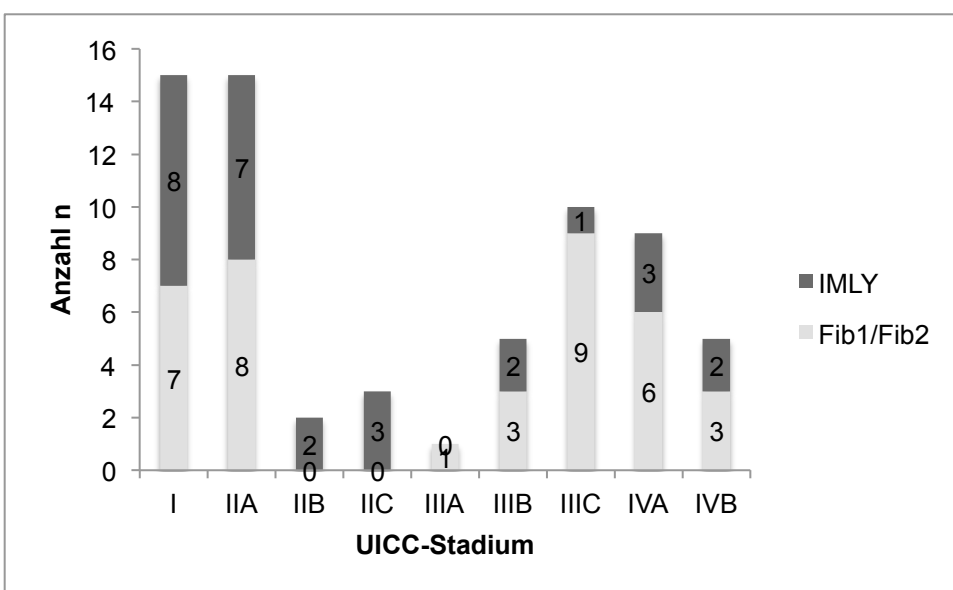


Abb. 52: Anzahl der Umgebungsreaktionen im Vergleich mit den UICC-Stadien

### 5.5.3 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion - Unterscheidung fibroblastenreich/makrophagen-dominant und fibroblastenarm/lymphozytendominant

Untersuchte Größe	Umgebungsreaktion		P-Wert		
	n=145 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95		
	Fib1/Fib2 120 (83 %)	IMLY 25 (17 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi- squared test mit Yates' correction	
Grading	1./2. 3./4.	92 (77) 28 (23)	22 (88) 3 (12)	0,16	0,32
Budding	positiv negativ	66 (55) 54 (45)	7 (28) 18 (72)	<b>0,012</b>	<b>0,025</b>

Tabelle 13: Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten

Beim Vergleich der fibroblasten- und makrophagendominanten Umgebungsreaktion mit Umgebungsreaktionen, bei denen vorwiegend Lymphozyten vorkamen, fand sich ein überzufälliger Zusammenhang mit Tumor Budding. Dabei wurden nur Fälle ohne Nekrosen einbezogen. Bei Tumoren mit fibroblastenreicher und makrophagendominanter Reaktion wiesen 66 von 120 Fällen ein Tumor Budding auf, 54 der 120 Fälle hatten größere Zellkomplexe an der Invasionsfront. Bei Tumoren mit lymphozytendominanter Reaktion zeigten 7 von 25 Patienten ein Tumor Budding, 18 der 25 Fälle hatten große Zellkomplexe an der Invasionsfront.

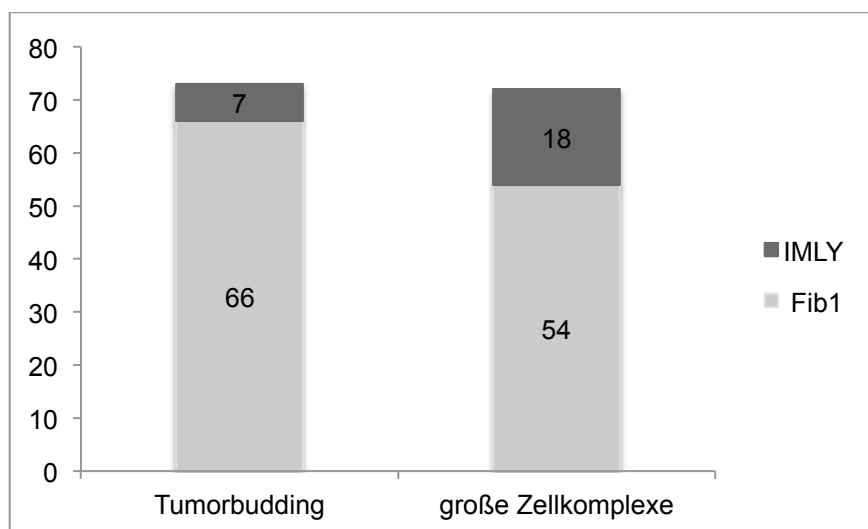


Abb. 53: Vergleich der Umgebungsreaktion mit dem Tumor Budding

### 5.5.4 Ergebnisse der morphologischen Analyse der Umgebungsreaktion in Kombination mit Tumor Budding

Die Ergebnisse der Umgebungsreaktion mit dem Tumor Budding wurden in Bezug auf Lymphknotenstatus und dem UICC-Stadium verglichen. Dabei fand sich signifikant häufiger eine fibroblastenreiche Reaktion in Kombination mit einem Tumor Budding als eine lymphozytendominante Reaktion in Kombination mit Tumor Budding bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen bzw. hohem UICC-Stadium (Tabelle 14).

Untersuchte Größe	Umgebungsreaktion/Budding		P-Wert	
	n=82 (100 %)		Konfidenzintervall=0,95	
	Budding und Fib1/Fib2 72 (88 %)	Budding und IMLY 10 (12 %)	Fisher's Test	Pearson's Chi-squared test mit Yates' correction
Lymphknotenstatus	N+ 57 (79)	2 (20)	<b>0,0042</b>	<b>0,00095<sup>1</sup></b>
	N- 15 (21)	8 (80)		
UICC-Klassifikation	I./II. 8 (11)	7 (70)	<b>0,00074</b>	<b>0,000019<sup>1</sup></b>
	III./IV. 64(89)	3 (30)		

<sup>1</sup>: kann inkorrekt sein wegen zu niedriger Fallzahlen

Tabelle 14: Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion/Budding im Vergleich mit anderen erhobenen Daten

Bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen kam es an der Invasionsfront in 57 von 59 Fällen zu Tumor Budding in Kombination mit einer fibroblastendominanten Umgebungsreaktion. Dagegen fand sich dieser Reaktionstyp bei 15 von 23 Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen. Im Gegensatz dazu fand sich eine lymphozytendominante Umgebungsreaktion kombiniert mit Tumor Budding nur bei zwei von 59 Fällen mit Lymphknotenmetastasen, jedoch im Verhältnis häufiger bei insgesamt acht von 23 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen.



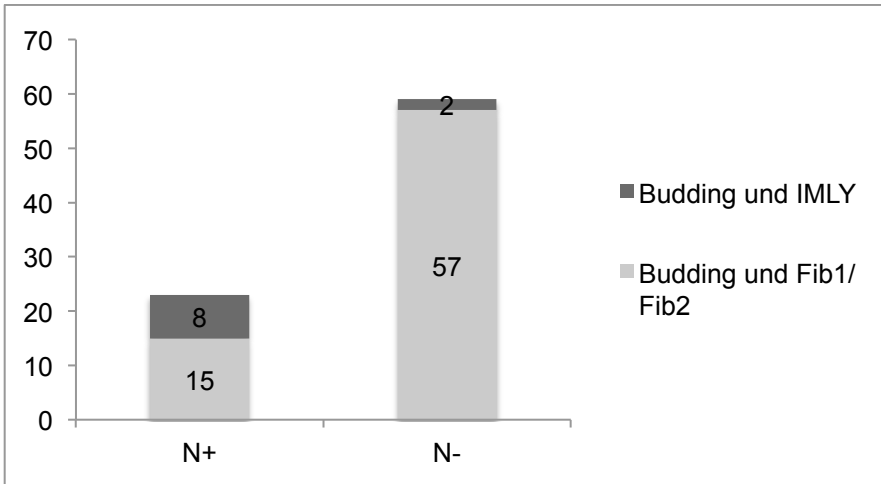


Abb. 54: Vergleich der Umgebungsreaktion in Kombination mit dem Tumor Budding und dem Lymphknotenstatus

Der Vergleich fibroblastenreiche Umgebungsreaktion und Tumor Budding mit dem UICC-Stadium zeigte bei 11 % ein UICC Stadium I und II, dagegen bei 89 % ein UICC-Stadium III oder IV. Hingegen zeigte sich im Verhältnis häufiger eine lymphozytendominante Reaktion mit Tumor Budding bei Tumoren des UICC-Stadium I oder II (7 von 10 Fällen, 70 %), im Gegensatz zu UICC-Stadien III und IV (3 von 10 Fällen, 30 %).

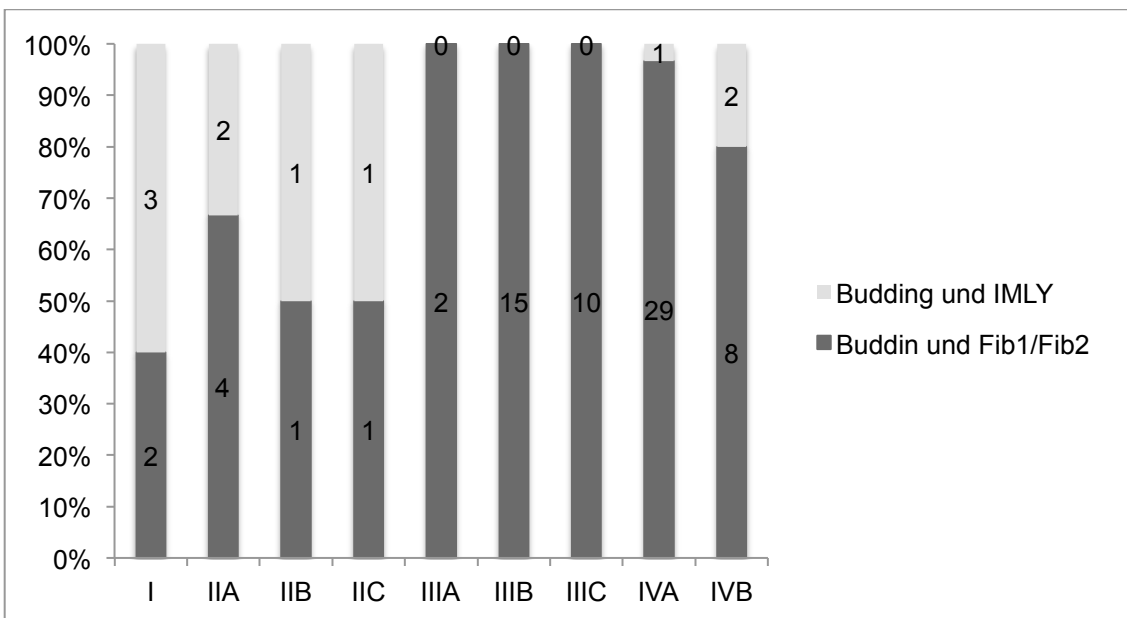


Abb. 55: Vergleich der Umgebungsreaktion in Kombination mit dem Tumor Budding im Vergleich zum UICC-Stadium

## 6 Diskussion

Die Diagnose des kolorektalen Karzinoms und die sich daraus ableitenden therapeutischen Konsequenzen erfolgten mittels histopathologischer Untersuchung von Biopsien oder Operationspräparaten an paraffineingebettetem Material. Morphologische Kategorien zur Therapieentscheidung waren jedoch nicht mehr ausreichend. Für bestimmte morphologische Phänotypen konnten in den letzten Jahren die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, was zu einer Erweiterung der morphologischen Klassifikation um molekulare Eigenschaften der Tumoren geführt hat.<sup>99</sup> Die bereits aufgedeckten molekularen Mechanismen betrafen viele frühe Stadien der Tumorentwicklung. Für weitere Veränderungen wie dem Übergang hin zu einem aggressiven Tumor, insbesondere die Tiefeninfiltration und die Ausbildung von Metastasen sind beim kolorektalen Karzinom noch viele Fragen offen. Hier spielt das morphologisch schon seit einiger Zeit bekannte Phänomen des Tumor Budding<sup>100</sup> und dessen molekulares Pendant die EMT<sup>101</sup> wohl eine bedeutende Rolle. In der hier vorgestellten Arbeit wurde untersucht, ob weitere morphologische Veränderungen an der Invasionsfront kolorektaler Karzinome hierbei eine Rolle spielen könnten.

### 6.1 Patientenkollektiv

Kolorektale Karzinome fanden sich laut Literatur mit 29 % am häufigsten im Rektum lokalisiert, 20 % im Colon ascendens und Coecum, je 4 % im Colon transversum und im Colon descendens, sowie 18 % im Sigma.<sup>102</sup> Eine vergleichbare Verteilung innerhalb des Kolonrahmens konnte in dem hier untersuchten Kollektiv gefunden werden: Am häufigsten fanden sich ebenfalls Tumore im Rektum mit 32 %. Im Colon sigmoideum waren in dem hier vorgestellten Kollektiv 20 %, im Coecum 21 %, im Colon ascendens 11 %, im Colon transversum 6 % sowie im Colon descendens 8 % lokalisiert. In den aktuellen Statistiken zeigte sich eine Umverteilung bzw. ein Inzidenzanstieg rechtsseitig gelegener Darmtumoren bei gleichzeitiger Inzidenzabnahme rektosigmoidaler Tu-

more.<sup>103</sup> Dies ist möglicherweise auf eine verstärkte Inanspruchnahme von Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen. Im Gegensatz zu Angaben in der Literatur fanden sich in unserem Kollektiv vor allem kolorektale Karzinome mit hohen UICC-Stadien, was möglicherweise auf eine gewisse Selektion der Fälle durch die Untersuchung von Kollektiven von Maximalversorgern und Tumorzentren begründet lag.

Das durchschnittliche Alter des hier vorgestellten Patientenkollektivs lag bei 66 Jahren mit einer Altersspanne von 24 bis 88 Lebensjahren. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen mittleren Erkrankungsalter.<sup>104,105</sup> Wie in der Literatur beschrieben, waren bei dem hier vorgestellten Patientenkollektiv überdurchschnittlich häufiger Männer (58 %) als Frauen (42 %) betroffen. So zeigten unter anderem die GLOBOCAN-Daten aus dem Jahr 2012, dass weltweit 55 % Männer und 45 % Frauen an einem kolorektalen Karzinom erkrankten.<sup>2</sup> Entsprechend fanden sich mikroskopisch nicht-verschleimende Adenokarzinome bei 90-95 % der kolorektalen Karzinome, verschleimende Adenokarzinome in ca. 10-15 % und Siegelringzellkarzinome mit einer Häufigkeit von 1-2 %. Alle weiteren Tumorhistologien sind Raritäten.<sup>106</sup> In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv fanden sich 92 % nicht-verschleimende Adenokarzinome und 8 % verschleimende Adenokarzinome und in einem Fall ein kleinzelliges Karzinom.

71 % der Tumoren in der hier vorgestellten Arbeit zeigten am häufigsten einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2), in 27 % zeigten sich schlecht differenzierte Tumore (G3) und zu je 1 % zeigten sich hochdifferenzierte (G1) bzw. undifferenzierte Tumore (G4). In der Literatur fand sich ebenfalls der größte Anteil bei den G2-klassifizierten Tumoren (70 %), jedoch mit 10 % deutlich mehr hochdifferenzierte Tumore (G1). Schlecht- bzw. undifferenzierte Tumore (G4) wurden in den Vergleichsdaten zusammengefasst und machten anteilig 20 % aus.<sup>34</sup> Diese Abweichung ist möglicherweise ebenfalls der oben bereits erwähnten Selektion von Kollektiven mit Tumoren höherer Tumorstadien in Schwerpunktzentren geschuldet, was auch den Umstand erklären würde, dass in dem hier untersuchten Patientenkollektiv fortgeschrittene UICC-Tumorstadien (IVA und IVB) mit 37 % am häufigsten vertreten waren, bei 32 % UICC-Stadium III und 31 % ein UICC I- bzw. UICC II-Stadium.

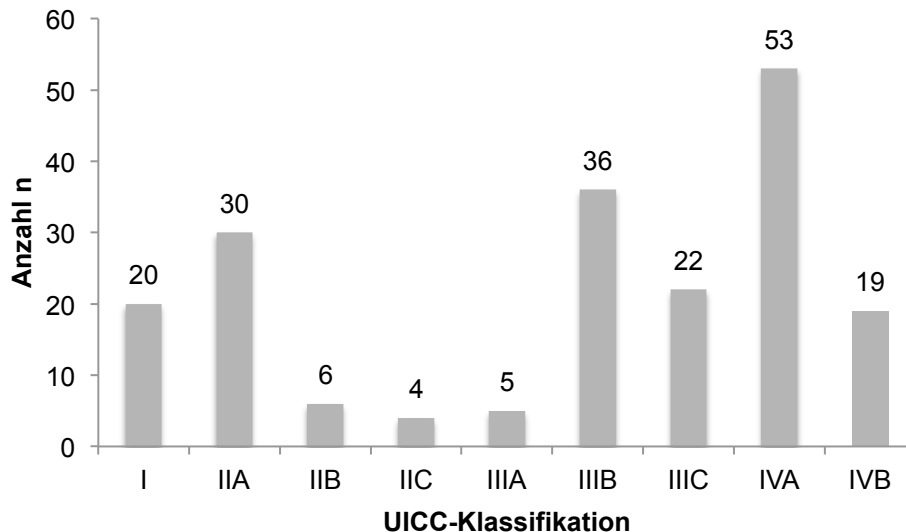


Abb. 56: UICC-Klassifikation des Patientenkollektives am Klinikum Darmstadt

Allgemein scheinen die UICC-Stadien schwer vergleichbar zu sein. So indizierte meist schon die Fragestellung, welches Tumorstadium vorwiegend vorkommen wird. So erwartet man bei Studien zu Vorsorgeuntersuchungen am ehesten Tumorstadien oder Tumore in einem niedrigen TNM-Stadium. Entsprechende Daten lieferte unter anderem eine Arbeit von Schmiegel et al., in der 25.893 kolorektale Karzinome im Rahmen von Vorsorgekoloskopien detektiert wurden. Am häufigsten fanden sich hierbei kolorektale Karzinome im UICC-Stadium I (47,3 %), gefolgt von Tumoren im Stadium II (22,3 %), im Stadium III (20,7 %) und im Stadium IV (9,6 %).<sup>107</sup>

## 6.2 Mutationsanalyse

### 6.2.1 KRAS-Mutation

In dem hier vorgestellten Kollektiv fanden sich bei 195 kolorektalen Karzinomen 68 KRAS-Mutationen, insgesamt 34,9 %. Somit befand sich die ermittelte Häufigkeit an KRAS-Mutationen im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen Werte. Dabei ergab sich eine Ergebnisspanne an KRAS-Mutationen in den repräsentativen Studien von 35-45 %. Die unterschiedlichen Häufigkeiten resultierten aus abweichenden Analyseverfahren und Patientenkollektiven. Interessanterweise fanden wir in unserem Kollektiv bei vier unterschiedlichen Fällen eine G13V-Mutation im Codon 13.

In der folgenden Tabelle wurden die von uns diagnostizierten Mutationen Mutationsanalysen anderer Studien gegenübergestellt:

<b>Codon</b>	<b>Mutation</b>	<b>Klinikum Darmstadt</b>	<b>Neumann et al. <sup>5</sup></b>	<b>COSMIC</b>
12	c.35G>A (G12D)	12,3 %	14,1 % (36,0 %)	33,5-34,4 %
	c.35G>T (G12V)	9,7 %	8,5 % (21,8 %)	21,9-24,4 %
	c.34G>T (G12C)	4,1 %	3,1 % (8 %)	7,9 %
	c.34G>A (G12S)	1,0 %	2,6 % (6,5 %)	4,9-5,7 %
	c.35G>C (G12A)	2,5 %	2,4 % (6,0 %)	6,2-6,6 %
	c.34G>C (G12R)	0,5 %	0,5 % (1,3 %)	1,2-1,4 %
	c.34G>T; c.35G>T (G12F)	0 %	0,2 % (0,5 %)	0 %
13	c.34G>A; c.35G>T (G12I)	0 %	0,1 % (0,3 %)	0 %
	c.38G>A (G13D)	3,8 %	7,3 % (18,8 %)	18,9-19,2 %
	c.37G>T (G13C)	0 %	0,3 % (0,8 %)	< 1 %
	c.37G>C (G13R)	0 %	0,1 % (0,3 %)	< 1 %
	c.38G>T (G13V)	2 %	0 % (0 %)	< 1 %
	c.37 G>A (G13S)	0 %	0 % (0 %)	< 1 %
Wildtyp	65,1 %	60,7 %	50 %	

*Tabelle 15: KRAS-Mutationen im Vergleich mit unserem Patientenkollektiv*

Die Unterschiede in der Verteilung, vor allem der seltenen Mutationen, resultieren dabei am ehesten aus dem bereits oben beschriebenen Grund, dass das hier untersuchte Kollektiv aus höheren UICC-Stadien zusammengesetzt war, was auch die hohe Übereinstimmung der Mutationsverteilungen zur Studie von Neumann et al. belegt. Beide Studien wurden an einem Kollektiv mit hohem UICC-Stadium durchgeführt. Dementsprechend fanden wir leichte Abweichungen der prozentuellen Mutationen zu den COSMIC-Daten (Catalogue Of Soma-

tic Mutations In Cancer). Möglicherweise spielten hierbei lokale Faktoren eine Rolle, da bei der COSMIC-Studie weltweite KRAS-Mutationen einbezogen wurden.

Neuere Forschungsergebnisse hinsichtlich KRAS-Mutationen im Exon 3 und 4 bezogen wir bewusst nicht in die vorgelegte Arbeit mit ein. Der Anteil der RAS-Mutationen, die nicht auf dem Exon 2 liegen, ist im Verhältnis deutlich geringer als RAS-Mutationen, die sich auf dem Exon 2 befinden. Für die hier vorgestellte Fragestellung hinsichtlich morphologischer Veränderungen an der Invasionsfront sind diese Mutationen nicht ausschlaggebend. Zudem ist in der Literatur kein Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus des RAS-Gens und einer assoziierten morphologischen Veränderung in kolorektalen Karzinomen beschrieben. In der hier vorgestellten Arbeit fanden sich ebenfalls keine Assoziationen mit bestimmten morphologischen Veränderungen und dem RAS-Mutationsstatus.

Neben der Frage nach der Häufigkeit von Mutationen im KRAS-Gen wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden der Sequenzanalyse, die Sequenziermethode nach Sanger und die Pyrosequenzierung, verglichen. Dabei ergaben sich in 13 Fällen voneinander abweichende Ergebnisse. In fünf Fällen konnte mittels Pyrosequenzierung eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden, dagegen zeigte sich in der Sangersequenzierung keine Mutation. Umgekehrt fanden sich mit der Sangersequenzierung sechs KRAS-Mutationen, die in der Pyrosequenzierung nicht zu detektieren waren. Bei zwei Fällen wurden unterschiedliche Mutationen in beiden Sequenzierungsformen diagnostiziert. Zwischen den beiden Sequenzierungsmethoden konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (Cohens kappa:  $\kappa = 0,86$ ) nachgewiesen werden.

### **6.2.2 BRAF-Mutation**

In dem von uns untersuchten Kollektiv wurde bei 189 Fällen der BRAF-Status im Exon 15 erhoben. Dabei konnte in 20 Fällen eine V600E-Mutation nachgewiesen werden. Die ermittelte Prävalenz der BRAF-Mutation in dem hier unter-

suchten Karzinomkollektiv lag mit 11 % im mittleren Bereich der in der Literatur beschriebenen Verteilung. Die Häufigkeiten von BRAF-Mutationen bei CRC lagen in der Literatur zwischen 5-15 %.<sup>108,109</sup> Die in diesen Arbeiten erhobenen Daten betrafen dabei ausschließlich die BRAF-Mutation V600E, die mit mehr als 96 % die häufigste BRAF-Mutation darstellt. Alle weiteren beim kolorektalen Karzinom vorkommenden BRAF-Mutationen haben somit zusammen einen Anteil von maximal 4 %.<sup>110</sup> Die vorgefundenen unterschiedlichen Häufigkeiten resultierten dabei aus abweichenden Analyseverfahren und/oder der Zusammensetzung der Patientenkollektive. In der folgenden Tabelle sind die Daten des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs im Vergleich zu den Häufigkeiten für die BRAF-Mutation in kolorektalen Karzinomen in der Literatur aufgelistet.

	<b>p-Wert Signifikant</b>			
	<b>Klinikum Darmstadt</b>	<b>Kalady et al.<sup>103</sup></b>	<b>Yokota et al.<sup>104</sup></b>	<b>Roth et al.<sup>105</sup></b>
BRAF-Mutation	20 von 189 (10,6 %)	56 von 475 (11,8 %)	15 von 319 (4,7 %)	103 von 1307 (7,9 %)
UICC	Nicht relevant	0,75	Nicht relevant	0,9 <sup>1</sup>
T	0,24	-	-	-
N	<b>0,043</b>	-	0,49	-
M	0,32	-	0,40	-
Grading	<b>0,0068</b>	<b>&lt;0,014</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;10<sup>-10</sup></b>
Lokalisation (rechts vs. links)	<b>0,030</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,0391</b>	<b>&lt;10<sup>-10</sup></b>
Geschlecht (w > m)	0,29	<b>&lt;0,001</b>	0,11	<b>0,037</b>

<sup>1</sup>: nur UICC-Stadien II und III einbezogen

*Tabelle 16: Vergleich der ausgewerteten BRAF-Daten unseres Patientenkollektivs mit der Literatur<sup>111-113</sup>*

In der hier vorgelegten Arbeit fanden sich signifikante Zusammenhänge zwischen der BRAF-Mutation, dem Differenzierungsgrad (Grading), der Lage des Tumors im Kolonrahmen und dem Lebensalter bei Erstmanifestation. Im Gegensatz zu Roth et al. (p=0,037) und Kallady et al. (p=<0,001) fanden wir, ebenso wie Yokota et al. (p=0,11), keinen geschlechtsspezifischen Zusammen-

hang. Möglicherweise war der Unterschied der Zusammensetzung der Kollektive geschuldet.

Einen Vergleich mit den TNM-Stadien bzw. der daraus resultierenden UICC-Klassifikation konnte nur annähernd vorgenommen werden, mit allerdings nahezu gleichem Ergebnis. So war in der vorgelegten Untersuchung lediglich im Lymphknotenstatus ein überzufälliger Zusammenhang zu finden ( $p=0,043$ ). Wie in vergleichbaren Studien ergab sich kein überzufälliger Zusammenhang zwischen BRAF-Mutation, dem TNM-Stadium bzw. dem UICC-Stadium. Im Vergleich von BRAF-Mutationen mit dem Tumor Budding zeigte sich ebenfalls kein überdurchschnittlicher Zusammenhang. Ebenso konnte beim Vergleich mit der Umgebungsreaktion des wachsenden Tumors kein Zusammenhang abgeleitet werden.

### **6.3 Tumor Budding und morphologische Veränderungen an der Invasionsfront**

In dem hier untersuchten Kollektiv fand sich Tumor Budding bei niedrigen UICC-Stadien nur selten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen dem Vorhandensein von Tumor Budding und der Eindringtiefe sowie dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen ein signifikanter Zusammenhang besteht. Am deutlichsten zeigte sich die Signifikanz von Tumor Budding bei Fernmetastasen ( $p=0,003$ , im Pearson's Chi-squared test mit Yates' correction) bzw. einem hohem UICC-Stadium. Dies entsprach den Ergebnissen von Hase et al.,<sup>114</sup> die bei 663 Resektaten von kolorektalen Karzinomen das Tumor Budding untersuchten. Patienten mit Tumor Budding hatten hier signifikant häufiger Rezidive und eine signifikant schlechtere Fünfjahresüberlebensrate. Beim Vergleich der Fünfjahresüberlebensraten von Tumoren im früher gängigen Tumorstadium Dukes B (entsprechend UICC II-Stadium) mit Tumor Budding war ein geringeres Überleben mit 29,1 % zu finden als bei einem Tumor im Stadium Dukes C (entsprechend UICC > III) ohne Tumor Budding mit 66,2 %. Insbesondere in niedrigen UICC-Stadien I/II schien ein Nachweis von Budding eine große prognostische Bedeutung zu besitzen. So zeigten Ueno et al schon 2004, dass bei



kolorektalen Karzinomen, die die Submukosa penetrieren, Tumor Budding mit dem Tumorgrading und der Lymphgefäßinvasion zusammen die wichtigsten Faktoren für eine systemische Tumorausbreitung sind.<sup>115</sup>

Verschiedene Arbeitsgruppen (Morodomi et al., Lugli et al.) haben ermittelt, dass Tumor Budding nicht nur an der Invasionsfront, sondern auch intratumoral vorkommt. Letztlich korreliert intratumorales Budding mit dem Budding an der Invasionsfront und führte ebenso zu Lymphknotenmetastasen.<sup>116</sup> Das galt für die Assoziation mit lymphknotenpositiven Tumoren, höheren TNM-Stadien, Gefäßinvasion und schlechtem Outcome. Giger et al. stützten diese Aussagen, die die Spezifität von intratumoralem Budding für peritumorales Budding und Lymphknotenmetastasen in korrespondierenden Resektionen aufzeigten.<sup>117</sup> Auch dieser Zusammenhang konnte in dem hier vorgelegten Kollektiv nachvollzogen werden.

Lugli et al. legten nahe, Tumor Budding als einfach zu erhebenden unabhängigen Marker für Tumorwachstum und Prognose zu nutzen.<sup>118</sup> Grizzi et al. fordern hingegen ohne genaue Validierungskriterien Tumor Budding in der Routinediagnostik nicht zu nutzen.<sup>119</sup> In der hier vorgestellten Untersuchung konnten wir allerdings zeigen, dass die morphologische Analyse des Tumor Budding im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik nach einer kurzen Lernphase gut durchführbar war, wenn man als diagnostisches Kriterium für Tumor Budding isolierte Einzelzellen oder Zellcluster mit weniger als fünf Zellen anwendet. Eben dieses Kriterium wurde 2016 während der International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) mit einer hohen Evidenz gewertet.<sup>120</sup>

Dem morphologischen Muster des Tumor Budding lag das molekulare Korrelat der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zugrunde. Die EMT führte zum Verlust bestimmter Zelleigenschaften mit einem Verlust der Adhäsion der Zellen untereinander und steuerte somit das Ausbreiten des Tumors. Das Absondern einzelner Tumorzellen, also das Budding, wurde als einer der ersten Vorgänge bei der lokalen zur systemischen Ausbreitung beobachtet und hat so prognostische Relevanz.<sup>114</sup> Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit legen den Schluss nahe, sobald Tumor Budding in der H.E.-Histologie der Routinedi-

agnostik sichtbar ist, davon auszugehen, dass es dem Tumor gelungen ist, sich systemisch auszubreiten. Das bestätigte die Arbeit von Shinto et al., die mittels Anti-Cytokeratin Antikörpern „zytoplasmatische Pseudofragmente“ detektierten, die in der Nähe und auch teilweise mit Tumorbudds verbunden sind.<sup>121</sup>

Aktuell geht man davon aus, dass Tumor Budding auf der Basis zweier Prozesse entsteht: Betrachtet man die Mikrostrukturen von Tumorbudds, so zeigt sich ein Verlust von zellulären und zellulär-matrikalen Verbindungsmolekülen, den Desmosomen bei den Zell-Matrix-Kontakten und Adhäsionsmoleküle wie die E-Cadherine bei den Zell-Zell-Kontakten. So ist es den Budds möglich, sich aus dem Zellverband zu lösen und infiltrativ in das Gewebe vorzudringen. Eine ausführliche Beschreibung der bisher bekannten molekularen Zusammenhänge wurde von Dawson et al. dargelegt.<sup>100</sup>

Dass Tumor Budding kein auf das kolorektale Karzinom beschränktes Phänomen in Rahmen der Tumorausbreitung ist und ein allgemein wichtiges Kriterium für die Tumorentwicklung bzw. Aggressivität zu sein scheint, zeigten Lugli et al. bei Pankreastumoren. Sie haben auch hier einen prognostischen Zusammenhang von Tumor Budding mit dem Gesamtüberleben abgeleitet. Denn auch bei Pankreastumoren findet sich unter anderem eine Assoziation von Tumorbudds mit Lymphgefäßinvasion.<sup>122</sup>

In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Tumor Budding bei einem metastasierten kolorektalen Karzinom mit einem schlechten Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie assoziiert ist.<sup>123</sup> Die Konsequenz daraus wäre neben molekularen Markern auch morphologisch erfassbare Marker, wie Tumor Budding und deren molekulare Veränderungen in die Überlegung zur Therapie des kolorektalen Karzinoms mit einzubeziehen, um diese zu optimieren. Ein Gen, das für die epithelial-mesenchymale Transition von kolorektalen Karzinomen wichtig erscheint, ist das MACC1 (Metastasis-associated in colon cancer protein 1). So zeigten Koelzer et al., dass ein Vorkommen von MACC1 zu einer aggressiven Tumorausbreitung und einem Nachweis von Tumor Budding kommt; ein vermehrter Nachweis an der Invasionsfront war mit einem deutlich aggressiveren Verlauf assoziiert.<sup>124, 125</sup>

Für unsere Fragestellung hinsichtlich morphologischer Veränderungen an der Invasionsfront kolorektaler Karzinome waren spezifische Mutationen nicht ausschlaggebend. Sicherlich sind Mutationen für weitere Therapieansätze unerlässlich, aber es Bedarf weiterer Studien und Grundlagenforschungen.

Lugli et al. entwickelten einen Index aus Tumor Budding und dem immunhistologischen Nachweis von CD8-positiven Lymphozyten. So fanden sie eine umgekehrte Korrelation zwischen Tumorbudds und CD8-positiven Lymphozyten.<sup>126</sup> Auf dieser Arbeit aufbauend, folgten weitere Untersuchungen hinsichtlich einer Verbindung von Tumor Budding und dem Ausmaß der lokalen Immunantwort. Für eine effektive Immunabwehr müssen Tumorzellantigene durch den MHC-I-Proteinkomplex präsentiert werden, so dass T-Lymphozyten mit ihren CD-8-Rezeptoren diese erkennen und als fremd einstufen können. So kann letztlich die Zerstörung der Tumorzellen über die Bildung toxischer Moleküle wie TIA1 eingeleitet werden. Letztlich konnten Koelzer et al. bestätigen, dass Tumore deutlich weniger aggressiv sind, wenn dieses Abwehrsystem funktioniert und eine umgekehrte Korrelation zu Tumor Budding besteht. Es fand sich keine MHC-I-Expression im Bereich von Tumorbudds an der Invasionsfront.<sup>127</sup> Ebenso gibt es deutliche Hinweise für eine Assoziation zwischen CD8-positiven Lymphozyten und der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen, niedrigem Tumorigrad und längerem Überleben. Der EMT-Mechanismus als molekulares Korrelat des Tumor Budding ist jedoch bisher nicht vollends verstanden. So finden sich charakteristische molekulare Veränderungen der EMT an den Tumorbudds des Primärtumors, die aber in den Metastasen nicht mehr nachweisbar sind. Somit scheinen die Umgebungsfaktoren der jeweiligen Tumormikro Umgebung in der Ausbildung der EMT am Primärtumor und der Rückbildung in der Metastase im Sinne einer MET (mesenchymalen-epithelialen-Transition) eine Rolle zu spielen.<sup>128,129</sup>

In der hier vorgelegten Arbeit wurde deshalb die Invasionsfront kolorektaler Karzinome nach weiteren morphologischen Gewebsveränderungen und Gewebsreaktionen im Bereich der Tumorumgebung dahin gehend untersucht, die möglicherweise mit dem Auftreten von Tumor Budding in Zusammenhang stehen könnten. Es konnte gezeigt werden, dass ein überzufällig häufiger Zusam-

menhang besteht zwischen der Art des Tumorgewebswachstumsmusters (in dieser Arbeit Invasionsfront Pattern breit versus nicht breit genannt) und der Lage der Tumoren im Kolonrahmen, dem TNM-Stadium, dem Auftreten von Fernmetastasen und somit dem UICC-Stadium. Hingegen zeigte sich im Vergleich zu Lymphknotenmetastasen nur im Fisher-Test ein signifikanter Zusammenhang, im Chi-Quadrat Test jedoch kein signifikanter Zusammenhang. Interessanterweise fand sich in pT2-Tumoren kein nicht breites Wachstumsmuster. Das Durchdringen der Mucularis propria erfolgte in großen breiten Verbänden. Dieses Phänomen fand sich auch bei Tumoren, die im Fettgewebe oder der Subserosa dort ein nicht breites Pattern zeigten.

Zudem wurden in der hier vorgelegte Arbeit auf der Basis der Gewebsreaktion an der Invasionsfront verschiedene Muster unterschieden: Eine fibroblastenreiche und eine fibroblastenarme Gewebsreaktion, sowie eine überwiegend von Immunzellen charakterisierte Gewebsreaktion. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der fibroblastenreichen Gewebsreaktion an der Invasionsfront, dem TNM-Stadium, dem Lymphknotenstatus, dem Auftreten von Fernmetastasen und somit dem UICC-Stadium. Halvorsen et al. verglichen schon 1989 die Umgebungsreaktion von Tumoren in Bezug auf das damals gängige Tumorstadium nach Dukes. Hierbei wurde u.a. das Wachstum an der Tumorgrenze, das Vorkommen von Entzündungsreaktionen und Entzündungszellen sowie die Desmoplasie, also die Bildung vom tumorassoziiertem fibrösem Gewebe untersucht. Sie konnten zeigen, dass Tumoren niedrigerer Dukes-Stadien mit einer gut definierten Tumorgrenze, einer hohen Anzahl an Entzündungszellen und dem Fehlen eines tumorassoziierten fibrösen Gewebes einhergingen.<sup>130</sup> Auch in anderen Studien wurde auf die Bedeutung der Stromareaktion im Bereich des Tumors hingewiesen. Es zeichnete sich zunehmend ab, dass das Tumorstroma mit Fibroblasten, Entzündungszellen und Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt.<sup>131–134</sup>

In verschiedenen Tumoren wurden peritumorale und karzinomassoziierte Myofibroblasten, innerhalb des Tumorstromas nachgewiesen und waren mit einer schlechteren Prognose assoziiert.<sup>135–137</sup> Ueno et al. zeigten bei Rektumkarzinomen mit einem unreifem Stroma und einer herunterregulierten Immunantwort

einen aggressiveren Verlauf.<sup>138</sup> Cui et al. konnte bereits in kolorektalen Adenomen vermehrt Myofibroblasten nachweisen.<sup>139</sup> De Wever et al. konnten nachweisen, dass Myofibroblasten eine proinvasive Funktion haben. Sie zeigten, dass isolierte Tumorzellen in Zellkulturen Kollagen nur mit Hilfe von Myofibroblasten durchdringen können.<sup>140</sup>

Das Zusammenspiel von Fibroblast und Tumorzelle stellte das zentrale Kennzeichen der EMT und somit die Entwicklung eines malignen Phänotyps epithelialer Tumoren dar.<sup>101</sup> Ebenso konnte gezeigt werden, dass für eine große Gruppe von kolorektalen Karzinomen neben dem Tumor Budding ein weiteres morphologisches Korrelat existiert, dass die Fibroblasten-Tumorzellen-Interaktion zu fördern schien.<sup>100</sup> Der in der hier vorgestellten Arbeit gezeigte signifikante häufigere Nachweis von Tumor Budding in der Gruppe des fibroblastenreichen Phänotyps mit spärlicher begleitender Immunreaktion und wenigen tumorassoziierten Makrophagen (TAM) sprach ebenfalls für diese Annahme. Dies entsprach auch den Ergebnissen von Koelzer et al., die ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen niedriger TAM-Anzahl und häufigerem Auftreten von Tumor Budding nachweisen konnten.<sup>141</sup> Das erklärt zudem die Ergebnisse von Cavnar et al., die zeigen konnten, dass eine hohe Anzahl TAM in kolorektalen Karzinomen mit einer besseren Prognose assoziiert ist.<sup>142</sup> Die Gruppe der fibroblastenreichen kolorektalen Karzinome mit starker Makrophageninfiltration zeigte nicht nur einen signifikanten Unterschied bezüglich des Vorhandenseins von Tumor Budding gegenüber der TAM-armen Gruppe, sondern es fanden sich zudem signifikant seltener Lymphknotenmetastasen, ein niedrigeres Tumorstadium und ein höherer Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Diese Gruppe zeigte zudem ein dichteres Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten und Plasmazellen. Es bestanden jedoch für diese Tumore weiterhin überzufällig häufig ein vermehrter Nachweis von Lymphknotenmetastasen und ein fortgeschritteneres Tumorstadium als die Gruppe mit geringer fibroblastärer Gewebsreaktion und dichten lymphozytären Infiltraten, jedoch kein signifikant vermehrter Nachweis von Tumor Budding, wie dies für die TAM-arme Gruppe der Fall war.

Zwei morphologische Charakteristika an der Invasionsfront kolorektaler Karzine sind in dieser Arbeit signifikant häufiger mit einem vermehrten Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen und somit einem höheren Tumorstadium assoziiert, Tumor Budding und eine fibroblastenreiche Gewebsreaktion mit wenigen tumorinfiltrierenden Makrophagen und spärlicher Immunreaktion.

Morphologische Kriterien sind für die Charakterisierung des kolorektalen Karzinoms sicher nicht ausreichend, liegen doch unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrunde, was zu einer eigenständigen molekularen Klassifikation geführt hat. Die morphologischen Veränderungen können jedoch Hinweise auf molekulare Zusammenhänge geben, die weiterer Untersuchungen bedürfen. In dieser Arbeit konnte die Bedeutung bestimmter Fibroblasten-assoziiierter Veränderung für die Progression des kolorektalen Karzinoms gezeigt werden. Auffällig war hierbei die Assoziation von Tumor Budding und geringer Immunreaktion in der Tumorumgebung. Möglicherweise liegt im Mechanismus der EMT mit Aktivierung embryonaler Signalwege einer der Schlüssel für die eingeschränkte Erkennbarkeit der Tumorzellen für das Immunsystem.

## 7 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eine der am häufigsten vorkommenden Tumorerkrankung weltweit. In den letzten Jahren wurden viele molekulare Zusammenhänge in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms entdeckt. Aus diesen Erkenntnissen konnten neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Aktuell werden im europäischen Raum die UICC-Stadien zur Einschätzung der Tumorigressivität angewandt um die bestmöglichen Therapieoptionen zu gewährleisten.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte bei einem Kollektiv von 195 Patienten mit kolorektalen Karzinomen gezeigt werden, dass an H.E.-Schnitten morphologische Phänomene wie Tumor Budding und bestimmte morphologisch fassbare Veränderungen in der Tumorumgebung (Mikroenvironment, epithelial-mesenchymale Transition) signifikant und zuverlässig diagnostiziert werden können und davon abgeleitet die Aggressivität eines kolorektalen Karzinoms eingeschätzt werden kann.

Hierbei wurden alle Fälle, bei denen eine Tumoreinzelzelle bzw. ein Zellcluster mit weniger als fünf Zellen mikroskopiert werden konnte, in die Gruppe der Tumorbudds aufgenommen. Der Nachweis von Tumorbudds war ein unabhängiger Marker auf eine systemische Tumorausbreitung.

Es fand sich überdurchschnittlich häufig ein Zusammenhang zwischen Tumor Budding und schlechteren Überlebensraten sowie einer fortgeschrittenen Tiefeninfiltration (höhere pT-Stadien), Lymphknoten- oder Fernmetastasen bzw. hohen UICC-Stadien III/IV.

Ein weiteres Hauptaugenmerk wurde auf morphologische Veränderungen des Mikroenvironments und hierbei insbesondere auf die Fibroblasten des den Tumor umgebenden Bindegewebes sowie Zellen des Immunsystems, u.a. Lymphozyten und Makrophagen gelegt. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang einer fibroblastenreichen Umgebungsreaktion mit wenigen Makrophagen und

Lymphozyten und einem positiven Lymphknotenstatus oder hohen UICC Stadien III/IV gezeigt werden.

Beim Vergleich der Umgebungsreaktion mit dem Tumor Budding wurden in Bezug auf den Lymphknotenstatus und dem UICC-Stadium signifikant häufiger eine fibroblastenreiche Reaktion in Kombination mit einem Tumor Budding als eine Gewebsreaktion in Kombination mit Tumor Budding bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen bzw. hohen UICC-Stadien III/IV nachgewiesen.

Vergleichende Untersuchungen zwischen den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen und Mutationen des Exon 2 im KRAS-Gen blieben ohne eine statistische Signifikanz. Der Vergleich der Sequenziermethode nach Sanger mit der Pyrosequenzierung ergab eine geringfügig höhere Sensitivität für die Sangersequenzierung, wenngleich ohne statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit bestätigen die hohe Wertigkeit des Tumor Buddings und der Umgebungsreaktion des Tumors für die Einschätzung der Tumoraggressivität. Die Veränderungen sind einfach an H.E.-Routineschnitten zu diagnostizieren. Diese morphologischen Veränderungen spiegeln wahrscheinlich den entscheidenden Übergang eines lokal aggressiv wachsenden Tumors in einen Tumor mit Lymphknoten- und Fernmetastasierung wieder. Möglicherweise spielt die Interaktion zwischen Fibrozyten/blasten und ortsständigen oder eingewanderten Makrophagen eine wichtigere Rolle in der körpereigenen Tumorabwehr als bisher angenommen.



## 8 Summary

Colorectal carcinoma is one of the most common tumour diseases worldwide. Numerous molecular relationships in the development of colorectal carcinoma have been discovered in recent years – findings that have enabled new treatment options to be developed. In Europe, the UICC stages are currently used to assess tumour aggressiveness, in order to ensure the best possible treatment options.

Based on a collective of 195 patients with colorectal carcinoma, the work presented here demonstrates that HE sections can be used to significantly and reliably diagnose morphological phenomena such as tumour budding and certain morphologically-identifiable changes in the tumour environment (microenvironment, epithelial-mesenchymal transition) and, as a result, to assess the aggressiveness of a colorectal carcinoma.

All cases in which a single tumour cell or a cell cluster with fewer than five cells could be viewed under a microscope were included in the group of tumour buds. Tumour buds were detected using an independent marker on a systematic tumour spread.

More frequently than average, a connection was found between tumour budding and both poorer survival rates and advanced depth infiltration (later pT stages), lymph node or remote metastases and high UICC stages III/IV.

Another key focus was on morphological changes to the microenvironment and, in particular, the fibroblast cells of the connective tissue surrounding the tumour and cells of the immune system, such as lymphocytes and macrophages. A significant connection was demonstrated between a fibroblast-rich surrounding tissue reaction with few macrophages and lymphocytes, and a positive lymph node status or high UICC stage III/IV.

When the surrounding tissue reaction was compared with the tumour budding, in relation to the lymph node status and the UICC stage, a fibroblast-rich reac-

tion in combination with tumour budding was found significantly more frequently than a tissue reaction in combination with tumour budding in tumours with lymph node metastases and high UICC stages III/IV.

Comparative investigations between the morphological changes described above and mutations of Exon 2 in the KRAS gene revealed no statistical significance. Comparing Sanger's sequencing method with pyrosequencing showed slightly higher sensitivity in the Sanger sequencing, albeit without statistical significance.

The results of the work presented here confirm the great significance of tumour budding and the surrounding tissue reaction of the tumour for assessing tumour aggressiveness. The changes are easy to diagnose using routine HE sections. These morphological changes probably reflect the crucial transition from a localised tumour with aggressive growth to a tumour with lymph node and remote metastasis. The interaction between fibrocytes/fibroblasts and autochthonous or immigrated macrophages may play a more significant role in the body's own defence against tumours than previously thought.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Krebsregister. Darmkrebs. 2012.  
[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html).
2. The International Agency for Research on Cancer. 2015;(11):2015.  
<http://www.iarc.fr/>. Accessed May 26, 2015.
3. Baydin AG, Pearlmutter BA, Siskind JM. Tricks from Deep Learning. *CA Cancer J Clin.* 2016;58(2):71-96.
4. Schalhorn A, Siebeck M, Bumm R, Gross M, Günther B, Heiss MM, Huber FT, Lamerz R, Lau- Werner U, Lersch C, Roder JD, Sackmann M, Sander R, Stieber P, Waldner H, Weber B WB and ZW. *Manual Gastrointestinale Tumoren. Empfehlung Zur Diagnostik, Therapie Und Nachsorge.* Vol 6. München: W. Zuckschwerdt Verlag; 2001.
5. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2009;205(12):858-862.
6. Thomas DB, Karagas MR. Cancer in First and Second Generation Americans. *Cancer Res.* 1987;47(21):5771-5776.
7. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(19):1471-1483.
8. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 2002;62(18):5196-5203.
9. Adriaenssens N, Vinh-hung V, Miedema G, et al. Early contralateral Shoulder-arm morbidity in breast cancer patients enrolled in a randomized trial of post-surgery radiation therapy. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2012;6(1):79-93.
10. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: A pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(13):1015-1022.
11. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2008;300(23):2765-2778.
12. Chao A. Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Mortality in the Cancer Prevention Study II. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(23):1888-1896.
13. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med.* 1995;122(5):327-334.
14. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1625-1638.

15. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA. Physical activity and risk of colon adenoma: A meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;104(5):882-885.
16. De Verdier MG, Steineck G, Hagman U, Rieger Å, Norell SE. Physical activity and colon cancer: A case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer*. 1990;46(6):985-989.
17. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A Prospective Study of Family History and the Risk of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 1994;331(25):1669-1674.
18. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://. 2015;\(April\):2068.](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/)  
[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/). Accessed November 17, 2015.
19. Warchol S, Roszkowska-Blaim M, Sieniawska M. Swan neck presternal peritoneal dialysis catheter: Five-year experience in children. *Perit Dial Int*. 1998;18(2):183-187.
20. Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, et al. Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res*. 1994;54(7):1645-1648.
21. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-170.
22. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic Instability in Colorectal Cancer: Relationship to Clinicopathological Variables and Family History. *Cancer Res*. 1993;53(24):5849-5852.
23. Pistorius S, Schackert HK, Saeger HD. [Hereditary colorectal carcinomas - reflection on preventive surgery]. *Onkologie*. 2001;24 Suppl 5(Suppl. 5):4-8.
24. Denisova AY, Sergeev VV. Using GIS data to identify linear observation model on remote sensing images in case of spatial mismatch of input image and vector map. *CEUR Workshop Proc*. 2016;1638(5):296-303.
25. Dubé C, Rostom A, Lewin G, et al. The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: A systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2007;146(5):365-375.
26. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, et al. Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomatous Polyps. *N Engl J Med*. 2006;355(9):885-895.
27. Solomon SD, McMurray JJV, Pfeffer MA, et al. Cardiovascular Risk Associated with Celecoxib in a Clinical Trial for Colorectal Adenoma Prevention. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1071-1080.
28. Willis DB, Calle EE, Miracle-McMahill HL, Heath CW. Estrogen replacement therapy and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of postmenopausal women in the United States. *Cancer Causes Control*. 1996;7(4):449-457.
29. Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus Progestin and Colorectal Cancer in Postmenopausal Women. *N Engl J Med*. 2004;350(10):991-1004.

30. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: Scientific review. *J Am Med Assoc.* 2002;288(7):872-881.
31. Wittekind C, Wagner G, (Universität Leipzig/Pathologie), Photonics S. *TNM - Klassifikation Maligner Tumore.* Vol 7th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 1997.
32. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *Dis Colon Rectum.* 1980;23(8):605-611.
33. Boman FT, Carneiro F, Hruban RH TN. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Edn.* Vol (Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N, eds.). Lyon: IARC Press; 2010.
34. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-173.
35. Compton C. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2002;2(3):149-160.
36. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract.* 2015;211(8):557-569.
37. Zhu Q-C, Gao R-Y, Wu W, Qin H-L. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(5):2689-2698.
38. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1999;277(2):C183-201.
39. Yin X, Zhang J, Wang X. *Sequential Injection Analysis System for the Determination of Arsenic by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry.* Vol 32. 1st ed. New York: Garland Science; 2004.
40. Noffsinger AE. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2009;4(1):343-364.
41. Boon EMJ, Van der Neut R, Van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2002;62(18):5126-5128.
42. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 1991;66(3):589-600.
43. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell.* 1991;66(3):601-613.
44. Mori Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: Mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* 1992;1(4):229-233.
45. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC adenomatous polyposis coli gene. *Hum Mutat.* 1993;2(6):425-434.

46. Legendre AM. Disophenol toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1973;163(2):149-150.
47. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (80- ).* 1991;253(5020):665-669.
48. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992;359(6392):235-237.
49. Barbacid M. Ras Genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
50. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-767.
51. Bos JL. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-4689.
52. Forrester K, Allmoguera C, Perucho M, Han K, Grizzle WE. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature.* 1987;327(6120):298-303.
53. Ananiev J, Tchernev G, Patterson JW, Gulubova M, Ganchev G. p53 - "The Guardian of Genome." *Acta Medica Bulg.* 2011;38(2):72-82.
54. Takada N, Ozaki T, Ichimiya S, Todo S, Nakagawara A. Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 1999;59(12):2810-2814.
55. Inoue M, Enomoto T, Fujita M, et al. A Frequent Alteration of p53 Gene in Carcinoma in Adenoma of Colon. *Cancer Res.* 1994;54(17):4798-4804.
56. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50(1):113-130.
57. Modrich P. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem.* 1989;264(12):6597-6600.
58. Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids.* 2010;2010.
59. Miyaki M, Iijima T, Shiba K, et al. Alterations of repeated sequences in 5' upstream and coding regions in colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer and Turcot syndrome. *Oncogene.* 2001;20(37):5215-5218.
60. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-142.
61. Geiger B, Volk T, Volberg T. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J Cell Biol.* 1985;101(4):1523-1531.
62. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2007;91:21-28.
63. Hoda SA, Hoda RS. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* Vol 12. 7th ed. Elsevier; 2005.

64. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5705-5712.
65. Chien YH, Verma IM, Duesberg PH, Davidson N. Heteroduplex analysis of the RNA of clone 3 Moloney murine sarcoma virus. *J Virol*. 1979;32(3):1028-1032.
66. Shih TY, Williams DR, Weeks MO, Maryak JM, Vass WC, Scolnick EM. Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J Virol*. 1978;27(1):45-55.
67. Hall A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*. 1990;249(4969):635-640.
68. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: A conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990;348(6297):125-132.
69. Noda M, Ko M, Ogura A, et al. Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*. 1985;318(6041):73-75.
70. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, et al. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. 1997;385(6616):544-548.
71. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465.
72. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The "RASCAL II" study. *Br J Cancer*. 2001;85(5):692-696.
73. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 2007;67(6):2643-2648.
74. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007;96(8):1166-1169.
75. Esteller M, González S, Risques RA, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):299-304.
76. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66(8):3992-3995.
77. Cejas P, López-Gómez M, Aguayo C, et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: A potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One*. 2009;4(12):e8199.
78. Mariani P, Lae M, Degeorges A, et al. Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis. *Anticancer Res*. 2010;30(10):4229-4235.

79. Santini D, Spoto C, Loupakis F, et al. High concordance of BRAF status between primary colorectal tumours and related metastatic sites: Implications for clinical practice. *Ann Oncol.* 2010;21(7):1565.
80. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(13):981-989.
81. Cancer Res Mutations in Human Cancer Genomic and Biological Characterization of Exon 4 K-RAS Updated Version Citing Articles | Manickam Janakiraman - Academia.edu.  
[http://www.academia.edu/5412611/Cancer\\_Res\\_Mutations\\_in\\_Human\\_Cancer\\_Genomic\\_and\\_Biological\\_Characterization\\_of\\_Exon\\_4\\_KRAS\\_Updated\\_Version\\_Citing\\_Articles](http://www.academia.edu/5412611/Cancer_Res_Mutations_in_Human_Cancer_Genomic_and_Biological_Characterization_of_Exon_4_KRAS_Updated_Version_Citing_Articles). Accessed May 25, 2015.
82. Chan E. No K-RAS and No N-RAS Mutation Detected in Colorectal Cancer. My Cancer Genome. 2014.  
<http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/kras/44/>. Accessed November 18, 2015.
83. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène A. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J Biol Chem.* 1998;273(38):24939-24947.
84. Mikula M, Schreiber M, Husak Z, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J.* 2001;20(8):1952-1962.
85. Jaiswal RK, Moodie S a, Wolfman a, Landreth GE. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol.* 1994;14(10):6944-6953.
86. Catling AD, Reuter CWM, Cox ME, Parsons SJ, Weber MJ. Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol Chem.* 1994;269(47):30014-30021.
87. Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J.* 2001;20(8):1940-1951.
88. Reuter CWM, Catling AD, Jelinek T, Weber MJ. Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7644-7655.
89. Papin C, Denouel A, Calothy G, Eychene A. Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene.* 1996;12(10):2213-2221.
90. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954.
91. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002;418(6901):934.



92. Yuen ST, Davies H, Chan TL, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res.* 2002;62(22):6451-6455.
93. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2015;51(10):1243-1252.
94. Haydon AMM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol.* 2002;3(2):83-88.
95. Jung A. Malignisierungspotenzial von Vorläuferläsionen: Bestimmung mithilfe molekularer Marker. *Pathologe.* 2011;32(SUPPL.2):188-194.
96. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-337.
97. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-1356.
98. Sanger Institut. COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer - Home Page. 2017. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. Accessed June 3, 2015.
99. Paz-Cabezas M, Calvo-López T, Pérez-Villamil B. New molecular classification of colorectal cancer. *Cancer Chemother Rev.* 2016;11(2):66-72.
100. Dawson H, Lugli A. Molecular and Pathogenetic Aspects of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Med.* 2015;2:11.
101. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428.
102. Bruns CJ, Angele MK, Auernhammer CJ, et al. *Manual Gastrointestinale Tumoren: Empfehlungen Zur Diagnostik, Therapie Und Nachsorge.* Vol 6. München: Zuckschwerdt; 2013.
103. München T. *Empfehlung Zur Diagnostik, Therapie Und Nachsorge.* Vol 8. Auflage. (Bruns CJ, Auernhammer CJ, Ebert M, et al., eds.). München; 2004.
104. Marusch F, Koch A, Schmidt U, et al. Prospektive multizenterstudie kolon-/rektum karzinome (primärtumor)" - Überblick über den jahrgang 2000. *Zentralbl Chir.* 2002;127(4):332-349.
105. Marusch F, Koch A, Schmidt U, et al. Impact of age on the short-term postoperative outcome of patients undergoing surgery for colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2002;17(3):177-184.
106. Cisco. Forecast and Methodology, 2015-2020. *Cisco Vis Netw Index.* 2015;17 (Pt 1):2015-2020.
107. Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeier A, Stillfried D Von, Schmiegel W. Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2012;142(7):1460-1467.

108. De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: Focus on colorectal cancer. *Mol Diagnosis Ther.* 2009;13(2):103-114.
109. Rizzo S, Bronte G, Fanale D, et al. Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: Is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? *Cancer Treat Rev.* 2010;36(SUPPL. 3):S56-61.
110. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene.* 2004;23(44):7436-7440.
111. Kalady MF, DeJulius KL, Sanchez JA, et al. BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum.* 2012;55(2):128-133.
112. Yokota T, Ura T, Shibata N, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011;104(5):856-862.
113. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):466-474.
114. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993;36(7):627-635.
115. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(2):385-394.
116. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer.* 1989;63(3):539-543.
117. Giger OT, Comtesse SCM, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2012;25(7):1048-1053.
118. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: A promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(11):1713-1717.
119. Grizzi F, Celesti G, Basso G, Laghi L. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? *World J Gastroenterol.* 2012;18(45):6532-6536.
120. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299-1311.

121. Shinto E, Mochizuki H, Ueno H, Matsubara O, Jass JR. A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci. *Histopathology*. 2005;47(1):25-31.
122. Karamitopoulou E, Zlobec I, Born D, et al. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49(5):1032-1039.
123. Zlobec I, Molinari F, Martin V, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2010;16(38):4823-4831.
124. Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med*. 2009;15(1):59-67.
125. Koelzer VH, Herrmann P, Zlobec I, Karamitopoulou E, Lugli A, Stein U. Heterogeneity analysis of Metastasis Associated in Colon Cancer 1 (MACC1) for survival prognosis of colorectal cancer patients: A retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2015;15(1):160.
126. Lugli A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, et al. CD8+ lymphocytes/tumour-budding index: An independent prognostic factor representing a pro-/anti-tumour approach to tumour host interaction in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(8):1382-1392.
127. Koelzer VH, Dawson H, Andersson E, et al. Active immunosurveillance in the tumor microenvironment of colorectal cancer is associated with low frequency tumor budding and improved outcome. *Transl Res*. 2015;166(2):207-217.
128. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1429-1437.
129. Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(18):10356-10361.
130. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1989;42(2):162-166.
131. Sugar LM. Inflammation and prostate cancer. *Can J Urol*. 2006;13 Suppl 1(6917):46-47.
132. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(1):54-59.
133. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: Induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*. 2002;8(9):2912-2923.
134. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008;123(10):2229-2238.

135. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2082-2090.
136. Kellermann MG, Sobral LM, Da Silva SD, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis [3]. *Histopathology.* 2007;51(6):849-853.
137. Surowiak P, Murawa D, Materna V, et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res.* 2007;27(4 C):2917-2924.
138. Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut.* 2004;53(4):581-586.
139. Cui G, Yuan A, Vonen B, Florholmen J. Progressive cellular response in the lamina propria of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Histopathology.* 2009;54(5):550-560.
140. De Wever O, Ngueyen QD, Van Hoorde L, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004;18(9):1016-1018.
141. Koelzer VH, Canonica K, Dawson H, et al. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. *Oncoimmunology.* 2016;5(4).
142. Cavnar MJ, Turcotte S, Katz SC, et al. Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer Liver Metastases is Associated With Better Outcome. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(7):1835-1842.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht über die Neuerkrankungen durch kolorektale Karzinome im Jahre 2012 in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Deutschland (GER) <sup>2</sup> .....	3
Abb. 2a:	Mikroskopischer Schnitt mit Tumor Budding aus dem von uns ausgewähltem Kollektiv .....	12
Abb. 2b:	Mikroskopischer Schnitt mit Tumor Budding aus dem von uns ausgewähltem Kollektiv .....	13
Abb. 3:	Die Karzinogese beim CRC geht von Stammzellen am Kryptenboden aus <sup>39</sup> .....	14
Abb. 4:	Die Karzinogenesewege des kolorektalen Karzinoms <sup>50, 94</sup> .....	15
Abb. 5:	Schematische Darstellung der EMT und MET <sup>60</sup> .....	21
Abb. 6:	MAPK-Signaltransduktionsweg <sup>63</sup> .....	22
Abb. 7:	Häufigkeit von KRAS, NRAS und BRAF Mutationen in CRC <sup>9</sup> .....	25
Abb. 8:	Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach Haydon und Jass <sup>94</sup> .....	26
Abb. 9:	Molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach Kirchner und Jung <sup>95</sup> .....	27
Abb. 10:	Integrierte molekulare Klassifikation des kolorektalen Karzinoms <sup>99</sup> .....	28
Abb. 11:	Altersspanne des ausgewerteten Patientenkollektives.....	29
Abb. 12:	Lokalisation der kolorektalen Karzinome des Patientenkollektives .....	30
Abb. 13:	Differenzierungsgrade der kolorektalen Karzinome des vorliegenden Patientenkollektives.....	30
Abb. 14:	Histologische Subtypen der kolorektalen Karzinome des vorliegenden Patientenkollektives.....	31
Abb. 15:	UICC-Stadien der CRC des vorliegenden Patientenkollektives ..	31
Abb. 16:	Beispielhaft ein kolorektales Karzinom mit großen Tumorzellkomplexen und breiter Invasionsfront.....	32

Abb. 17:	Beispielhaft ein kolorektales Karzinom mit kleinen Tumorzellkomplexen und unregelmäßiger Invasionsfront.....	33
Abb. 18.1.a-c:	fibroblastendominante Umgebungsreaktionen mit geringer Immunreaktion und wenigen tumorassoziierten Makrophagen (TAM).....	34
Abb. 18.2.a-b:	lymphozytenreiche Umgebungsreaktionen mit wenig fibroblastären Reaktionen .....	35
Abb. 18.3.a-c:	fibroblastendominante Umgebungsreaktionen mit Plasmazellen dominierter Begleitinfiltration und fibroblastenreiche Gewebsreaktionen mit starker Immunreaktion (TAMs, Granulozyten und Plasmazellen).....	37
Abb. 19:	Amplifikationsbande der KRAS-PCR mit Patientenummer und Längenstandard .....	53
Abb. 20:	Amplifikationsbande der BRAF-PCR mit Patientenummer und Längenstandard .....	53
Abb. 21:	Kolorektales Karzinom, Sangersequenzierung, c.35G>A (GGT > AGT), Mutation im Codon 12. ....	57
Abb. 22:	Kolorektales Karzinom, Sangersequenzierung, c.38G>A (CGT > AGT), Mutation im Codon 13. ....	57
Abb. 23:	Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung beim Einbau eines Nukleotids.....	58
Abb. 24:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC).....	63
Abb. 25:	Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 34 .....	64
Abb. 26:	Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 35 .....	64
Abb. 27:	Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC) quantitative Analyse für Position 37 .....	64
Abb. 28:	Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus, Wildtyp KRAS Exon 2 Codon 12/13 (GGTGGC), quantitative Analyse für Position 38.....	65

Abb. 29:	Dispensationsorder 1. Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im SQ-Modus, BRAF Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG) .....	68
Abb. 30:	Dispensationsorder 2. Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im SQ-Modus, BRAF Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG) .....	68
Abb. 31:	Kolorektales Karzinom, Pyrogramm im AQ-Modus, BRAF-Wildtyp, Exon 15 Codon 600 (GTG), quantitative Analyse für Position 1799 .....	69
Abb. 32:	Diagramm der detektierten KRAS-Mutationen mittels Pyro- und Sangersequenzierung.....	71
Abb. 33:	Kolorektales Karzinom mit p.G12C Mutation, Basensubstitution G>C in Position 34 in Codon 12 Exon 2 des KRAS-Gens, Sequenzierungsmethode nach Sanger .....	71
Abb. 34:	Kolorektales Karzinom mit p.G12D Mutation, Basensubstitution G>A in Position 35 in Codon 12 Exon 2 des KRAS-Gens, Sequenzierungsmethode nach Sanger .....	72
Abb. 35.a:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, Wildtyp .....	72
Abb. 35.b:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>C oder c.35G>C Mutation.....	73
Abb. 35.c:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>T oder c.35G>T Mutation .....	73
Abb. 35.d:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.34G>A oder c.35G>A Mutation.....	73
Abb. 35.e:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus, c.37G>A oder c.38G>A Mutation.....	74
Abb. 36.a:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS35FLO1: KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 35.....	74
Abb. 36.b:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS35FLO1: c.35G>T Mutation an Position 35. 50 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Thymin-Nukleotide ersetzt .....	74
Abb. 37.a:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS37FLO1. KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 37.....	75

Abb. 37.b:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS37FLO1: c.37G>T Mutation an Position 37. 21 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Thymidin-Nukleotide ersetzt .....	75
Abb. 38.a:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS38FLO1: KRAS Wildtyp keine Mutation an Position 38.....	75
Abb. 38.b:	Kolorektales Karzinom, Pyrosequenzierung, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder KRAS38FLO1: c.38G>A Mutation an Position 38. 20 % der Guanidin-Nukleotide sind durch Adenosin-Nukleotide ersetzt .....	75
Abb. 39.a:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus. Dispensationsorder BRAF1. BRAF V600E-Mutation mit einem Basenaustausch an Position 1799.....	76
Abb. 39.b:	Kolorektales Karzinom, Programm im SQA-Modus. Dispensationsorder BRAF2. BRAF V600E-Mutation mit einem Basenaustausch an Position 1799.....	77
Abb. 40:	Kolorektales Karzinom, Programm im AQ-Modus. Dispensationsorder BRAF3. Quantifizierung im AQ-Modus die Mutation c.1799T>A bei der 22 % der Thymidin-Nukleotide durch Adenosin-Nukleotide ersetzt sind .....	77
Abb. 41:	BRAF-Mutation im Vergleich zum Grading .....	78
Abb. 42:	Vergleich Tumor Budding mit der Tumoreindringtiefe .....	81
Abb. 43:	Vergleich Tumor Budding mit den UICC-Stadien .....	81
Abb. 44:	Vergleich Invasionsfront mit der Tumoreindringtiefe.....	83
Abb. 45:	Vergleich Invasionsfront mit den UICC-Stadien.....	83
Abb. 46:	Vergleich Umgebungsreaktion mit dem Lymphknotenstatus.....	85
Abb. 47:	Vergleich Umgebungsreaktion mit den UICC-Stadien.....	86
Abb. 48:	Umgebungsreaktion im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus..	88
Abb. 49:	Umgebungsreaktion an der Invasionsfront im Vergleich mit dem Tumor Budding .....	89
Abb. 50:	Umgebungsreaktion im Vergleich mit dem Grading .....	89
Abb. 51:	Umgebungsreaktion im Vergleich mit Lymphknotenmetastasen .....	91



Abb. 52:	Anzahl der Umgebungsreaktionen im Vergleich mit den UICC-Stadien.....	91
Abb. 53:	Vergleich der Umgebungsreaktion mit dem Tumor Budding .....	92
Abb. 54:	Vergleich der Umgebungsreaktion in Kombination mit dem Tumor Budding und dem Lymphknotenstatus .....	94
Abb. 55:	Vergleich der Umgebungsreaktion in Kombination mit dem Tumor Budding im Vergleich zum UICC-Stadium.....	94
Abb. 56:	UICC-Klassifikation des Patientenkollektives am Klinikum Darmstadt .....	97

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	UICC-Klassifikation und Dukes-Einteilung <sup>31, 32</sup> .....	9
Tabelle 2:	Vorkommen der histologischen Subtypen des kolorektalen Karzinoms <sup>3</sup> .....	10
Tabelle 3:	Grading des kolorektalen Adenokarzinoms <sup>33</sup> .....	11
Tabelle 4:	Häufigkeitsverteilungen von KRAS-Mutationen in Codon 12 und 13 von Exon 2 bei CRC <sup>5, 80</sup> .....	24
Tabelle 5:	Cohen´s Kappa-Maß ( $\kappa$ ) und assoziierter Übereinstimmungsgrad zweier Methoden .....	69
Tabelle 6:	Auswertung der Pyro- und Sangersequenzierung .....	70
Tabelle 7:	Signifikanzbestimmung des BRAF-Status im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	79
Tabelle 8:	Signifikanzbestimmung des Tumor Buddings im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	80
Tabelle 9:	Signifikanzbestimmung der Invasionsfront im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	82
Tabelle 10:	Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	84
Tabelle 11:	Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit anderen erhobenen Daten .....	87
Tabelle 12:	Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	90
Tabelle 13:	Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion im Vergleich mit den erhobenen Daten .....	92
Tabelle 14:	Signifikanzbestimmung der Umgebungsreaktion/Budding im Vergleich mit anderen erhobenen Daten .....	93
Tabelle 15:	KRAS-Mutationen im Vergleich mit unserem Patientenkollektiv..	98
Tabelle 16:	Vergleich der ausgewerteten BRAF-Daten unseres Kollektives mit der Literatur <sup>109–111</sup> .....	100

## 12 Anhang zur Übersicht des Patientenkollektives

Fall	m/w	Alter	Lage	UICC	Grading	ICD	KRAS	BRAF
1	m	61	C. ascendens	I	2	8480	0	+
2	m	72	Rektosigmoid	I	3	8480	0	0
3	m	73	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
4	w	72	Coecum	IIA	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
5	m	70	C. ascendens	IIA	3	8140	0	0
6	m	68	Sigma	IIA	2	8140	0	0
7	w	63	Rektosigmoid	I	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
8	m	83	C. descendens	I	3	8140	c.38G>A (G13D)	0
9	w	81	C. transversum	IIIB	2	8140	0	0
10	m	85	Coecum	IVA	2	8140	0	0
11	m	71	C. ascendens	IIIB	2	8140	0	0
12	m	72	C. ascendens	I	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
13	m	75	Coecum	IVA	3	8140	c.34G>T (G12C)	0
14	m	75	Rektum	II	2	8140	c.35G>A (G12D)	+
15	w	40	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
16	m	73	C. descendens	IIIB	2	8140	0	0
17	m	69	C. ascendens	IIIA	3	8140	c.34G>C (G12R)	0
18	w	69	Rektum	IIIC	3	8480	0	0
19	w	57	Rektum	IVA	3	8140	c.35G>A (G12D)	0
20	m	69	Sigma	IVA	2	8140	0	0
21	m	66	Coecum	IIIB	3	8480	0	+
22	w	63	Rektum	IVA	2	8140	0	0
23	w	40	Sigma	IIIC	2	8140	0	0
24	m	57	Coecum	IIIC	2	8140	0	0
25	w	24	C. transversum	IIIC	3	8480	0	0
26	m	66	Rektosigmoid	IVB	2	8140	0	0
27	m	68	Rektosigmoid	IVB	2	8140	0	n.d.
28	m	57	Rektum	IVA	2	8140	0	0
29	m	68	Coecum	IVB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
30	m	66	Rektum	IVA	2	8140	0	0
31	w	71	Sigma	IIIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
32	m	68	Rektum	IIIB	2	8140	c.38G>T	0
33	m	67	Sigma	IVB	3	8140	0	0
34	w	57	Sigma	IIA	2	8140	0	0
35	m	54	C. descendens	IIIB	2	8140	c.34G>T (G12C)	+
36	m	62	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
37	w	67	Coecum	IIIB	2	8140	0	+
38	w	82	C. ascendens	I	2	8140	0	0
39	m	57	Rektum	IVB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
40	m	57	Sigma	IVB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
41	m	65	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
42	w	68	Coecum	IIIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
43	w	68	C. ascendens	IIIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
44	w	79	Coecum	I	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
45	w	79	Coecum	IIA	3	8140	0	+
46	m	60	Sigma	IIA	1	8140	0	0
47	w	82	C. ascendens	I	3	8140	c.35G>C (G12A)	0
48	w	61	C. descendens	IVA	2	8140	0	0
49	m	70	Sigma	IIA	2	8140	c.34G>T (G12C)	0

50	m	65	Rektum	IVB	3	8140	c.34G>T (G12C)	0
51	w	70	C. ascendens	I	2	8140	0	0
52	w	54	C. transversum	IIIC	3	8140	0	0
53	m	56	Rektum	I	2	8140	0	0
54	m	60	Rektum	IVB	3	8140	0	0
55	m	61	Rektum	IIA	2	8140	0	0
56	m	86	C. ascendens	IIA	3	8140	0	0
57	m	67	Sigma	IVA	2	8140	0	0
58	m	71	Rektosigmoid	IIA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
59	m	71	Rektosigmoid	IIB	2	8140	c.35G>C (G12A)	0
60	w	59	Rektum	IIIB	3	8140	c.35G>T (G12V)	0
61	m	62	Rektum	IVA	2	8140	0	0
62	m	41	Rektosigmoid	IIIB	2	8140	0	0
63	m	64	Sigma	IVA	2	8140	0	0
64	w	85	Coecum	IIIC	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
65	w	74	Rektum	IIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
66	m	59	Rektum	IVB	2	8140	0	0
67	m	59	Rektum	I	2	8480	0	0
68	m	80	C. transversum	IIIB	2	8140	0	0
69	m	79	Sigma	I	2	8140	0	0
70	w	63	Rektum	Iva	2	8140	0	0
71	m	70	Coecum	IIIA	3	8140	0	+
72	m	77	C. ascendens	IIA	2	8140	0	0
73	m	72	Rektum	IVB	3	8140	c.35G>A (G12D)	0
74	w	69	Coecum	I	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
75	w	74	Sigma	IIC	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
76	m	47	C. ascendens	IIA	4	8140	0	0
77	m	68	Coecum	IIIC	3	8140	0	0
78	m	39	C. ascendens	IIB	3	8480	c.38G>A (G13D)	0
79	m	49	Rektum	IVA	2	8140	0	0
80	m	59	Rektosigmoid	IIIC	3	8140	0	0
81	m	79	Sigma	IIIC	2	8140	0	0
82	w	76	Sigma	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
83	m	74	Rektum	IVA	3	8140	0	0
84	m	33	Sigma	IVA	1	8140	0	n.d.
85	w	77	C. transversum	IIIB	2	8140	0	+
86	w	49	Sigma	IIA	2	8140	0	0
87	w	66	Rektum	IVA	2	8140	0	0
88	m	39	Coecum	IVB	3	8480	c.35G>A (G12D)	0
89	m	75	C. transversum	IVB	2	8140	0	0
90	m	68	Rektum	I	2	8140	0	0
91	w	76	C. descendens	IIA	2	8140	0	0
92	m	46	C. descendens	IVA	2	8140	0	0
93	m	73	C. transversum	IIIC	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
94	w	73	Coecum	IVB	3	8140	0	0
95	w	88	Coecum	IIIB	2	8480	0	0
96	w	59	Sigma	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
97	w	75	Rektum	IIIC	2	8140	0	0
98	m	45	Rektum	IVA	3	8140	0	0
99	m	65	Rektum	IVA	3	8140	c.35G>T (G12V)	0
100	m	74	Coecum	IIIC	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
101	m	75	Rektum	IIIC	3	8140	0	0
102	w	73	C. ascendens	IIIC	3	8140	0	+

103	m	59	C. descendens	IIIB	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
104	m	63	Rektosigmoid	IVA	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
105	m	61	Sigma	IVB	2	8140	0	n.d.
106	w	39	C. transversum	IVA	2	8140	0	0
107	w	39	C. ascendens	IVA	2	8140	0	0
108	m	65	Sigma	IVA	3	8140	0	0
109	w	87	C. ascendens	IIIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
110	w	63	Coecum	IVB	2	8140	c.34G>T (G12C)	0
111	m	71	Rektum	IIA	2	8140	c.35G>C (G12A)	0
112	w	67	Rektum	IVA	2	8140	0	0
113	w	61	Rektum	IIIA	3	8140	0	0
114	w	67	Coecum	IVA	2	8140	c.38G>A (G13D)	0
115	w	79	Rektum	IVA	4	8140	0	+
116	m	65	Rektosigmoid	IIIB	3	8140	c.35G>A (G12D)	0
117	m	78	Sigma	IIIB	2	8140	c.35G>A (G12D)	+
118	m	62	Sigma	IVB	2	8140	c.34G>T (G12C)	+
119	w	58	Coecum	IVA	3	8140	0	0
120	m	62	C. descendens	IIA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
121	m	70	Sigma	IVA	2	8140	0	0
122	w	65	Coecum	IIC	3	8140	0	+
123	m	81	Coecum	IVA	3	8140	c.35G>A (G12D)	0
124	w	55	Rektum	IIB	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
125	m	76	C. descendens	IIIA	3	8140	0	0
126	m	75	C. ascendens	IVA	3	8480	0	+
127	m	75	C. ascendens	IVA	2	8140	0	+
128	w	66	Rektum	IIIB	2	8140	c.35G>C (G12A)	0
129	w	69	Sigma	IIIB	2	8140	0	0
130	m	55	Rektum	IVB	2	8140	0	0
131	w	64	Sigma	IIA	2	8140	0	0
132	w	66	C. descendens	IVA	3	8140	c.35G>A (G12D)	0
133	w	58	C. ascendens	IIIB	2	8140	C.35G>T (G12V)	0
134	m	61	Sigma	IVA	3	8140	0	+
135	w	66	Rektum	IVA	2	8140	0	0
136	w	67	C. ascendens	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
137	m	70	Coecum	IVA	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
138	m	75	Sigma	IIIA	2	8140	0	0
139	m	61	Coecum	IIIC	3	8140	c.38G>T	0
140	m	68	Rektum	IVA	2	8140	0	0
141	m	80	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
142	m	85	Rektosigmoid	IIIB	2	8140	c.38G>A (G13D)	+
143	m	56	Rektum	IIIB	2	8140	c.34G>A (G12S)	0
144	w	71	Coecum	IVA	3	8140	0	0
145	w	55	Sigma	IVA	2	8140	0	0
146	m	77	C. descendens	IIIB	2	8140	0	0
147	w	63	Rektosigmoid	IIA	2	8140	0	0
148	m	53	C. descendens	IVA	2	8140	0	0
149	w	53	Coecum	IIC	2	8140	c.35G>T (G12V)	+
150	w	67	Coecum	IVB	3	8041	c.35G>T (G12V)	0
151	m	55	Coecum	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
152	m	70	Sigma	IIIC	2	8140	0	0
153	w	69	Sigma	IIA	2	8140	0	0
154	m	48	C. ascendens	IIIB	2	8140	c.34G>T (G12C)	0
155	w	59	Coecum	IIIC	3	8140	0	+

156	m	57	Rektum	IVA	2	8140	c.34G>A (G12S)	0
157	m	69	Rektum	IIA	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
158	w	70	Coecum	IIIC	3	8140	0	+
159	m	70	C. ascendens	IIA	2	8140	0	0
160	w	71	Rektum	IIB	2	8140	0	0
161	w	57	C. descendens	IIIB	3	8140	0	+
162	w	81	Coecum	IIA	2	8140	c.34G>T (G12C)	0
163	m	84	Rektum	IIIB	2	8140	0	0
164	m	71	Sigma	IIA	2	8140	0	0
165	w	76	Sigma	IVA	2	8140	0	0
166	m	45	Sigma	IIIC	3	8140	0	0
167	m	58	Sigma	IIB	2	8140	c.34G>A (G12S)	0
168	w	78	C. transversum	IIIB	2	8480	c.35G>T (G12V)	0
169	m	70	Coecum	IIIC	3	8140	c.35G>T (G12V)	0
170	w	72	Coecum	I	3	8140	0	0
171	m	70	Sigma	IVA	2	8140	0	0
172	m	68	C. descendens	IIA	3	8140	0	0
173	m	70	Coecum	IIIB	2	8480	0	0
174	w	50	Sigma	IIC	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
175	m	71	Sigma	IVA	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
176	w	73	Coecum	IVA	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
177	m	58	Sigma	IVB	2	8140	c.35G>A (G12D)	0
178	w	84	Rektosigmoid	IIA	2	8140	0	0
179	m	74	Rektosigmoid	I	2	8140	0	0
180	w	66	Rektum	IIA	2	8140	0	n.d.
182	w	53	Sigma	IVA	2	8140	c.35G>C (G12A)	0
183	w	50	Coecum	IIA	2	8140	0	0
184	m	61	C. transversum	IIA	3	8480	0	0
185	w	64	C. transversum	IIIC	3	8140	0	n.d.
186	w	76	C. ascendens	IIIC	3	8480	0	0
187	m	80	Coecum	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	n.d.
188	m	83	Coecum	I	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
189	w	77	Rektum	IIA	2	8140	0	0
190	w	72	Sigma	IIIB	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
191	m	60	Coecum	IVA	2	8480	0	0
192	m	74	Rektum	IIA	2	8140	n.d.	0
193	m	63	Rektum	I	2	8140	0	0
194	w	52	Rektosigmoid	IVA	2	8140	c.35G>T (G12V)	0
195	w	72	Coecum	IVA	2	8140	0	0

### 13 Schriftliche Erklärung

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

Peritumorales Budding bei kolorektalen Karzinomen. Analyse morphologischer Veränderungen an der Invasionsfront.

in dem MVZ für klinische Pathologie an der Klinikum Darmstadt GmbH unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Gerhard Mall mit Unterstützung durch Dr. Roland Heyny-von Haußen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

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

---

(Ort, Datum)

(Unterschrift)