

Aus der
„Georgius Agricola Stiftung Ruhr“
Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum
am Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil
Direktorin: Prof. Dr. med. Andrea Tannapfel

Analyse onkogener Fusionen und deren Bedeutung hinsichtlich Mutationen
und Mikrosatelliteninstabilität in der Genese kolorektaler Karzinome

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Georg Raschewski
aus Essen
2023

Dekanin: Prof. Dr. med. Andrea Tannapfel

Referentin: Prof. Dr. med. Andrea Tannapfel

Korreferent: Prof. Dr. med. Dirk Strumberg

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2024

Abstrakt

Raschewski

Georg

Analyse onkogener Fusionen und deren Bedeutung hinsichtlich Mutationen und Mikrosatelliteninstabilität in der Genese kolorektaler Karzinome

Einleitung: In der molekularen Diagnostik des kolorektalen Karzinoms (KRK) spielt die Detektion von Genfusionen eine wichtige Rolle, da diese einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Tumorthherapie markieren können. So können Tumore mit *NTRK*-Fusion bereits mittels TRK-Inhibitoren behandelt werden. Da Genfusionen beim KRK allerdings relativ selten vorkommen und die molekulare Diagnostik mit hohen Kosten verbunden ist, ist es wichtig, die Eigenschaften von KRK mit Genfusion zu kennen, um gezielt Patienten mit diesen Tumoreigenschaften auf Genfusionen screenen zu können. Es ist bekannt, dass Genfusionen vermehrt bei MSI-high-Tumoren vorkommen und es wird vermutet, dass Genfusionen auf der einen und Mutationen in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* auf der anderen Seite sich gegenseitig ausschließen. Diese Vermutung sollte in dieser Arbeit geprüft werden. Dazu sollten MSI-high-Kolonkarzinome auf *NTRK*-Fusionen gescreent werden, um die klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion zu untersuchen.

Methoden: 411 MSI-high- und 98 MSS-Kolonkarzinome aus dem ColoPredict-2.0-Register am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum wurden mittels pan-TRK-IHC auf *NTRK*-Fusionen gescreent. Zusätzlich wurde ein Screening auf *ALK*-Fusionen mittels ALK-IHC bei 186 MSI-high-Kolonkarzinomen getestet. Pan-TRK-positive Tumore wurden mittels NGS-basierter RNA-Sequenzierung bestätigt. Bei einer Diskrepanz zwischen IHC und NGS wurde eine FISH-Analyse durchgeführt. MSI-high-KRK mit *NTRK*-Fusion wurden zusätzlich auf eine Methylierung des *MLH1*-Promotors mittels Pyrosequenzierung, eine Expression von PD-L1 und eine Infiltration durch T-Lymphozyten mittels PD-L1-, CD3-, CD4- und CD8-IHC untersucht und die Genexpression zwischen MSI-high-KRK mit und ohne *NTRK*-Fusion verglichen. Bereits vorhandene Daten aus dem Register wurden ausgewertet. Abschließend wurde anhand der Ergebnisse nach weiteren Genfusionen in MSI-high-KRK direkt mittels NGS gesucht.

Ergebnisse: Es wurden 12 *NTRK*-Fusionen (2,92 %) in 411 MSI-high-Kolonkarzinomen und keine *NTRK*-Fusion in den 98 MSS-Kolonkarzinomen detektiert. Von den 12 *NTRK*-Fusionen waren 11 *NTRK1*-Fusionen und 1 *NTRK3*-Fusion. Es wurde keine *ALK*-Fusion mittels ALK-IHC detektiert. MSI-high-KRK mit *NTRK*-Fusion waren signifikant mit dem Wildtyp in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA*, sowie linksseitiger Tumorlokalisation assoziiert ($p < 0,001$). *NTRK*-Fusionen in MSI-high-KRK kamen nicht zusammen mit Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* vor. Alle 12 *NTRK*-positiven Tumore waren sporadische Kolonkarzinome mit Methylierung des *MLH1*-Promotors. Der Großteil ($n = 11/12$, 91,67 %) der *NTRK*-positiven MSI-high-KRK zeigte eine PD-L1-Expression. Insgesamt zeigten sich hohe Zahlen an T-Lymphozyten in der Tumormikroumgebung *NTRK*-positiver MSI-high-KRK. In der Genexpressionsanalyse der *NTRK*-positiven MSI-high-KRK war das *NTRK1*-Gen um das 116-fache und die Gene *KRAS* und *BRAF* um das Dreifache gegenüber den *NTRK*-negativen MSI-high-KRK signifikant erhöht. In 16 *NTRK*-negativen MSI-high-KRK mit dem Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA*, linksseitiger Tumorlokalisation und T3-Stadium wurden 5 (31,25 %) weitere Genfusionen (2 *ALK*- und 2 *RET*-Fusionen, 1 *TFG-ADGRG7*-Fusion) detektiert.

Diskussion: *NTRK*-Fusionen auf der einen und Mutationen in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* auf der anderen Seite schlossen sich in MSI-high-KRK gegenseitig aus, was sich durch die gemeinsamen Signalwege MAPK und PI3K/AKT erklären lässt. *NTRK*-Fusionen sind in MSI-high-KRK als primärer onkogener Treiber zumindest im MAPK-Signalweg ausreichend, sodass für die Karzinogenese keine weiteren Mutationen in diesem Signalweg nötig werden. Gestützt wird die Rolle der *NTRK*-Fusion als onkogener Treiber durch die deutlich erhöhte Genexpression des *NTRK1*-Gens, sowie die erhöhte Genexpression von *KRAS* und *BRAF* ohne korrespondierende Alteration in diesen Genen. *NTRK*-Fusionen sind aufgrund der nach distal abnehmenden Häufigkeit von Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* mit MSI-high-KRK im linken Hemikolon assoziiert. MSI-high-KRK mit *NTRK*-Fusion sollten zusätzlich auf eine PD-L1-Expression getestet werden, da Patienten bei einer PD-L1-Expression ihres Tumors zusätzlich zu einer Therapie mit TRK-Inhibitoren von einer Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren profitieren könnten. Auch weitere Genfusionen sind häufig in MSI-high-KRK mit dem Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufzufinden, vor allem wenn der Tumor zusätzlich im linken Hemikolon liegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen den Vorschlag, MSI-high-KRK mit *BRAF*/*RAS*-Wildtyp einem direkten Screening auf Genfusionen zu unterziehen. Patienten, die an einem Tumor mit einer Genfusion leiden, könnten so mit hoher Wahrscheinlichkeit entdeckt werden und in Zukunft von einer zielgerichteten Tumorthherapie profitieren.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	7
1.1 Darmkrebs.....	7
1.2 Einteilung des Kolonkarzinoms	8
1.3 Genese des Kolonkarzinoms	10
1.3.1 Chromosomale Instabilität (CIN)	11
1.3.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	13
1.4 Tumormikroumgebung und immunpathologische Eigenschaften	14
1.5 Therapie und Prognose des lokal begrenzten Kolonkarzinoms	18
1.6 Genfusionen	19
1.7 <i>NTRK</i> -Gene und <i>NTRK</i> -Genfusionen.....	21
2. ZIELSTELLUNG	25
3. METHODEN	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Antikörper, Sonden und Primer.....	26
3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Nukleotide und Beads	27
3.1.3 Kits und Systeme	27
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.5 Geräte und Hilfsmittel	28
3.1.6 Software	29
3.2 Allgemeines Vorgehen.....	30
3.3 Patientenkollektiv	31
3.4 Immunhistochemie (IHC)	33
3.4.1 Pan-TRK	34
3.4.2 ALK.....	35
3.4.3 PD-L1	35
3.4.4 CD3, CD4 und CD8	35
3.5 Next Generation Sequencing	36
3.5.1 RNA-Isolierung.....	36
3.5.2 Messung der Konzentration der Start-RNA	37
3.5.3 Erstellung von DNA-Bibliotheken	37
3.5.3.1 Synthese des ersten Strangs cDNA	39
3.5.3.2 Synthese des zweiten Strangs DNA.....	40
3.5.3.3 End-Repair/dA-Tailing	40
3.5.3.4 Adapter Ligation.....	41
3.5.3.5 Aufreinigung 1.....	41
3.5.3.6 SPE-Target-Enrichment	42

3.5.3.7 Aufreinigung 2	43
3.5.3.8 Universal-PCR-Amplifikation	44
3.5.3.9 Aufreinigung 3	45
3.5.4 Messung der finalen Konzentrationen und Fragmentlängen	45
3.5.5 Vorbereitung und Start der Sequenzierung	46
3.6 Genexpressionsanalyse	47
3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	47
3.8 Pyrosequenzierung	49
3.8.1 DNA-Isolierung	49
3.8.2 Messung der Konzentration der DNA.....	50
3.8.3 Bisulfitkonvertierung	50
3.8.4 <i>MLH1</i> -PCR.....	52
3.8.5 Pyrosequenzierung mit Vorbereitung und Auswertung.....	53
3.9 Statistik	54
4. ERGEBNISSE	55
4.1 <i>NTRK</i>-Genfusionen	55
4.1.1 Detektion von <i>NTRK</i> -Genfusionen.....	55
4.1.2 Klinische und molekularpathologische Eigenschaften	60
4.1.3 Genexpressionsanalyse	65
4.1.4 Analyse des <i>MLH1</i> -Promotors	67
4.1.5 PD-L1-Expression und Tumormikroumgebung.....	68
4.2 Weitere Genfusionen.....	73
5. DISKUSSION	77
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
7. LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADGRG7	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BCR	Breakpoint cluster region
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
CCDC6	Coiled-Coil Domain Containing 6
CD3	Cluster of differentiation 3
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
cDNA	Komplementäre DNA
CIN	Chromosomale Instabilität
DAB2IP	DAB2 Interacting Protein
DFS	Disease-free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EML4	Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
ETV6	ETS Variant Transcription Factor 6
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
GCC2	GRIP And Coiled-Coil Domain Containing 2
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Hitzeinduziertes-Epitop-Retrieval
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HPF	High-Power-Field
ICH-GCP	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - Good Clinical Practice
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRF2BP2	Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma
KRK	Kolorektales Karzinom
LMNA	Lamin A/C
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase

MHC-I	Major histocompatibility complex class 1
MHC-II	Major histocompatibility complex class 2
MLH1	MutL protein homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NCOA4	Nuclear Receptor Coactivator 4
NGS	Next-Generation-Sequencing
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma
NTRK	Neurotrophe Tyrosin-Rezeptor-Kinase
OAS	Overall survival
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PMS2	PMS1 homolog 2
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RET	Rearranged during transfection proto-oncogene
RFS	Relapse-free survival
RNA	Ribonukleinsäure
ROS1	ROS Proto-Oncogene 1
RSPO	R-spondin
SCYL3	SCY1 Like Pseudokinase 3
SOS	Son of Sevenless
SPE	Single Primer Extension
STRN	Striatin
TFG	Trafficking From ER To Golgi Regulator
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TP53	Tumor Protein p53
TPM3	Tropomyosin 3
TPR	Translocated Promoter Region
TPS	Tumor Proportion Score
TRK	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase
UDI	Unique dual index
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Adenom-Karzinom-Sequenz.....	12
Abbildung 2:	Einfluss des PD-1/PD-L1-Systems auf die Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle und Ansatz der Immuntherapie.....	17
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Entstehungsmechanismen von Genfusionen...	20
Abbildung 4:	Signalwege des TRK-Rezeptors	23
Abbildung 5:	Leicht positive pan-TRK-Färbung eines Adenokarzinoms des Kolons.....	55
Abbildung 6:	Stark positive pan-TRK-Färbung eines Adenokarzinoms des Kolons	56
Abbildung 7:	Tumorzelle mit chromosomalem Bruch des <i>NTRK1</i> -Gens in der FISH.....	57
Abbildung 8:	pan-TRK-IHC des Tumors von Patient 136/B0007.....	58
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der <i>LMNA-NTRK1</i> -Fusion von Patient 17/F0027	59
Abbildung 10:	Lokalisation von MSI-high-Tumoren mit <i>NTRK</i> -Fusion in Bezug auf alle MSI-high-Tumore im Kolon.....	63
Abbildung 11:	Vergleich der Überlebenszeit von Patienten mit und ohne <i>NTRK</i> -Fusion	64
Abbildung 12:	Genexpression <i>NTRK</i> -positiver MSI-high-Tumore im Vergleich zu <i>NTRK</i> -negativen MSI-high-Tumoren	66
Abbildung 13:	Methylierter <i>MLH1</i> -Promotor von Patient 7/M0022	68
Abbildung 14:	PD-L1-Expression <i>NTRK</i> -positiver MSI-high-Kolonkarzinome	69
Abbildung 15:	Boxplots der Verteilung von CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten im Zentrum <i>NTRK</i> -positiver MSI-high-Kolonkarzinome	70
Abbildung 16:	Korrelation zwischen CD3 ⁺ -/CD8 ⁺ -, CD3 ⁺ -/CD4 ⁺ - und CD4 ⁺ -/CD8 ⁺ -T-Lymphozyten im Zentrum <i>NTRK</i> -positiver MSI-high-Kolonkarzinome	71
Abbildung 17:	CD3-, CD4- und CD8-IHC <i>NTRK</i> -positiver MSI-high-Kolonkarzinome.....	72
Abbildung 18:	ALK-IHC des Tumors von Patient 13/S0024	74
Abbildung 19:	Tumorzellen mit chromosomalem Bruch des <i>ALK</i> -Gens.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms	9
Tabelle 2:	UICC-Stadien des Kolonkarzinoms	10
Tabelle 3:	Antikörper für die Immunhistochemie.....	26
Tabelle 4:	Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	26
Tabelle 5:	Primersequenzen für die Analyse des <i>MLH1</i> -Promotors	26
Tabelle 6:	Chemikalien, Enzyme, Nukleotide und Beads.....	27
Tabelle 7:	Kits und Systeme	27
Tabelle 8:	Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 9:	Geräte und Hilfsmittel.....	28
Tabelle 10:	Software	29
Tabelle 11:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Synthese des ersten Strangs cDNA.....	39
Tabelle 12:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Synthese des zweiten Strangs cDNA	40
Tabelle 13:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für das End-repair/dA-Tailing	41
Tabelle 14:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Adapter-Ligation.....	41
Tabelle 15:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die SPE-Target-Enrichment-PCR	43
Tabelle 16:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Universal-PCR	44
Tabelle 17:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Bisulfitkonvertierung.....	51
Tabelle 18:	Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die <i>MLH1</i> -PCR...	53
Tabelle 19:	Übersicht der RNA-Sequenzierung mittels NGS mit 12 detektierten <i>NTRK</i> -Fusionen	59
Tabelle 20:	Ergebnisse der pan-TRK-IHC, der RNA-Sequenzierung und <i>NTRK</i> -FISH der 13 pan-TRK-positiven Patienten.....	60
Tabelle 21:	Klinische Daten der 12 <i>NTRK</i> -positiven MSI-high-Patienten.....	61
Tabelle 22:	Histologische und molekularpathologische Eigenschaften der 12 <i>NTRK</i> -positiven MSI-high-Tumoren.....	61
Tabelle 23:	PD-L1-Expression und Tumormikroumgebung der 12 <i>NTRK</i> -positiven MSI-high-Kolonkarzinome	71
Tabelle 24:	Übersicht der RNA-Sequenzierung mittels NGS mit 5 detektierten Genfusionen	73
Tabelle 25:	Klinische Daten der 5 Fusions-positiven MSI-high-Patienten	76
Tabelle 26:	Histologische und molekularpathologische Eigenschaften der 5 Fusions-positiven MSI-high-Tumore.....	76

1. Einleitung

1.1 Darmkrebs

Darmkrebs ist laut des Zentrums für Krebsregisterdaten deutschlandweit mit insgesamt ca. 60.000 neuen Diagnosen pro Jahr nach dem Mammakarzinom der zweithäufigste maligne Tumor bei Frauen und nach dem Prostata- und dem Lungenkarzinom der dritthäufigste Tumor bei Männern [1, 2]. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen und der Altersgipfel liegt bei beiden Geschlechtern zusammen zwischen 75 und 79 Jahren [3]. 2020 sind in Deutschland 24.000 Menschen in der Folge dieser Erkrankung gestorben, wobei die Mortalität hierzulande in den letzten Jahren stetig rückläufig ist [4]. Dies ist zum einen auf vermehrte Vorsorgeuntersuchungen und zum anderen auf eine verbesserte Diagnostik und neue Therapiestrategien zurückzuführen. Im Zuge dessen spielt die molekulare Diagnostik und die Etablierung neuer Biomarker und Therapieangriffspunkte eine zunehmend größere Rolle. Anhand spezifischer Tumormerkmale ist es möglich, Darmkrebs mittels zielgerichteter Medikamente zu therapieren. Eine individuelle, zielgerichtete Therapie ist gegenüber einer Chemotherapie oftmals effektiver und nebenwirkungsärmer [5, 6].

Jedoch ist die dafür nötige molekulare Diagnostik mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden, weshalb es nicht sinnvoll ist, jeden Tumor auf jeden Biomarker bzw. Therapieangriffspunkt zu testen. Die Kenntnis über Tumoreigenschaften, die für das Vorhandensein bestimmter Biomarker und Therapiezielstrukturen sprechen, ist somit äußerst relevant. In dieser Arbeit sollen die Eigenschaften von Darmkrebs mit Genfusionen, welche eine Gruppe solcher Biomarker darstellen, analysiert werden. Wie im weiteren Verlauf erläutert wird, kann eine Genfusion mit einer vermehrten Expression eines Wachstumsrezeptors einhergehen, in deren Folge durch enthemmtes Zellwachstum die Karzinogenese gefördert wird. Durch die medikamentöse Inhibition dieses Wachstumsrezeptors kann das Zellwachstum an dieser Stelle gestoppt werden. Somit stellen Genfusionen Biomarker dar, die für das Vorhandensein eines dysregulierten Wachstumsrezeptors und damit einer möglichen Therapiezielstruktur sprechen können.

Darmkrebs, auch kolorektales Karzinom (KRK) genannt, ist der Oberbegriff für zwei Krebsarten, das Kolonkarzinom und das Rektumkarzinom, die sich sehr ähnlich sind, welche aber aufgrund der unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten getrennt voneinander betrachtet werden [7]. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf dem Kolonkarzinom.

1.2 Einteilung des Kolonkarzinoms

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Kolonkarzinom einzuteilen. Man spricht von einem Kolonkarzinom bei einem malignen Tumor, der zwischen der Ileozökalklappe am Übergang zum Dünndarm und mehr als 16 cm vor der Anokutanlinie liegt. Bei einem geringeren Abstand zur Anokutanlinie spricht man von einem Rektumkarzinom [8].

Eine erste Einteilung von Kolonkarzinomen erfolgt nach der Lokalisation des Tumors im Darm in rechtsseitige und linksseitige Kolonkarzinome. Die Häufigkeit von Kolonkarzinomen steigt von oral nach aboral an, wobei zuletzt ein Rückgang bei den linksseitigen, aboralen Tumoren festgestellt wurde und zunehmend mehr rechtsseitige Tumoren diagnostiziert werden [9, 10]. Diese Einteilung in linksseitige und rechtsseitige Kolonkarzinome wird aufgrund der unterschiedlichen Genese und der molekularpathologischen Eigenschaften vorgenommen, die in Kapitel „1.3 Genese des Kolonkarzinoms“ genauer erläutert werden. Zu den rechtsseitigen Kolonkarzinomen zählen Tumore des Zökums, des Colon ascendens, der rechten Colonflexur und der proximalen zwei Drittel des Colon transversum, während zu den linksseitigen Kolonkarzinomen Tumore des distalen Drittels des Colon transversum, der linken Colonflexur, des Colon descendens und des Colon sigmoideum gehören [11]. In einigen Studien wird das gesamte Colon transversum, also auch das distale Drittel, zum rechtsseitigen Kolon gezählt [12, 13]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls das gesamte Colon transversum den rechtsseitigen Kolonkarzinomen zugeordnet.

Des Weiteren kann das Kolonkarzinom anhand seiner Histologie eingeteilt werden. Mit ca. 90 % ist das Adenokarzinom mit Abstand der häufigste maligne Tumor des Kolons [14, 15]. Weitere histologische Typen sind Sonderformen wie das muzinöse Adenokarzinom, welches sich durch extrazelluläre Schleimbildung auszeichnet und das Siegelringzellkarzinom mit intrazellulärer Schleimbildung. Daneben existieren auch noch sehr seltene histologische Formen des Kolonkarzinoms wie das adenosquamöse, das kleinzellige, das medulläre oder das serratierte Karzinom [15].

Ebenfalls zur histologischen Einteilung gehört der Differenzierungsgrad des Tumors (Grading). Der Tumor ist entweder gut differenziert (G1), d.h. er ähnelt histologisch normalem Kolongewebe, oder mäßig differenziert (G2) oder schlecht differenziert (G3), d.h. ohne große Ähnlichkeit zum ursprünglichen Kolongewebe [15].

Die gängigste Stadieneinteilung ist die der „Union Internationale Contre le Cancer“, kurz UICC, mit ihrer TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation ist der wichtigste Bestandteil der Ausbreitungsdiagnostik (Staging) von Kolonkarzinomen. Sie besteht aus den drei Kriterien Infiltrationstiefe des Tumors in die Darmwand (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M). Die TNM-Klassifikation wird in vier UICC-Stadien zusammengefasst. In Tabelle 1 ist die TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms dargestellt, während Tabelle 2 die UICC-Stadien zeigt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms

Diese Tabelle beruht auf der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC [16]

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

Tabelle 2: UICC-Stadien des Kolonkarzinoms

Diese Tabelle beruht auf der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC [16]

UICC-Stadium	TNM-Stadium
0	Tis (Carcinoma in situ)
I	Bis T2, N0, M0
IIA	T3, N0, M0
II IIB	T4a, N0, M0
II IIC	T4b, N0, M0
III IIA	Bis T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
III IIB	T3/T4, N1, M0 oder T2/T3, N2a, M0 oder T1/T2, N2b, M0
III IIC	T4a, N2a, M0 oder T3/T4a, N2b, M0 oder T4b, N1/N2, M0
IV IVA	Jedes T, jedes N, M1a
IV IVB	Jedes T, jedes N, M1b
IV IVC	Jedes T, jedes N, M1c

1.3 Genese des Kolonkarzinoms

Es gibt einige Risikofaktoren, welche die Entstehung eines Kolonkarzinoms begünstigen. Eine Gruppe von Risikofaktoren betrifft den Lebensstil [15]. Dabei erhöhen eine ballaststoffarme und fettreiche Ernährung, Alkohol-, Fleisch- oder Tabakkonsum, sowie Bewegungsmangel das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Eine andere Gruppe von Risikofaktoren betrifft Vorerkrankungen [15]. Dabei erhöhen vor allem chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa maßgeblich das Karzinomrisiko. Daneben erhöht auch eine genetische Disposition das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken.

Das Kolonkarzinom tritt in 70 % der Fälle sporadisch auf [17]. Des Weiteren kann es auch familiär gehäuft ohne Vererbungsmuster oder in weniger als 10 % der Fälle hereditär mit eindeutigen Vererbungsmustern auftreten [18, 19]. Zu diesen hereditären Erkrankungen zählen das Lynch-Syndrom und die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP).

Während das sporadische Kolonkarzinom auf somatische Genveränderungen zurückzuführen ist, liegen den hereditären Kolonkarzinomen genetische Veränderungen der Keimbahn zugrunde [19].

Das Lynch-Syndrom, im klinischen Alltag synonym auch als HNPCC (hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom) bezeichnet, ist am häufigsten ursächlich für das hereditäre Kolonkarzinom. Es handelt sich beim Lynch-Syndrom um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, bei der es ursächlich durch eine Keimbahnmutation in einem für das DNA-Reparatursystem wichtigen Gen (s.u.) zu einem gehäuften Auftreten

von Karzinomen kommt [15]. Typisch für das Lynch-Syndrom ist das Auftreten von Kolonkarzinomen, aber auch das Auftreten von weiteren Karzinomen wie dem Endometrium- und dem Ovariakarzinom ist häufig [19]. Im Gegensatz zum sporadischen Kolonkarzinom, das häufig bei älteren Patienten über 70 Jahren auftritt und mit Tumoren im linksseitigen Kolon assoziiert ist, tritt das Lynch-Syndrom bereits in jüngeren Jahren und dazu typischerweise im rechtsseitigen Kolon auf [15, 20].

Auf genetischer Ebene sind verschiedene Entstehungswege des Kolonkarzinoms bekannt, wobei die zwei wichtigsten Mechanismen der Weg der chromosomalen Instabilität (CIN) und der Weg der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) sind [15].

1.3.1 Chromosomale Instabilität (CIN)

Der Weg der chromosomalen Instabilität ist mit bis zu 75 % der häufigste Entstehungsmechanismus des sporadischen Kolonkarzinoms [15]. Er ist typisch für linksseitige Kolonkarzinome und ist gekennzeichnet durch eine Anhäufung von chromosomalen Veränderungen, zu denen Allelverluste, Amplifikationen, Translokationen und DNA-Aneuploidie gehören [15, 21]. Diese chromosomalen Veränderungen sind dafür verantwortlich, dass sich aus gesundem Kolongewebe zunächst ein gutartiger Tumor entwickelt, der durch weitere solcher Veränderungen schließlich in einen malignen Tumor übergeht. Dieses Prinzip wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und wurde 1988 von Fearon und Vogelstein erstmals beschrieben [22]. Die chromosomalen Veränderungen betreffen in der Regel Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Beide Klassen steuern normalerweise Zellwachstumsprozesse; während Protoonkogene aktivierend auf diese Prozesse wirken, werden sie von Tumorsuppressorgenen gehemmt. Durch die Veränderungen in diesen Genen werden Protoonkogene übermäßig aktiviert und damit zu onkogenen Treibern, während Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, wodurch es ebenfalls zu einer übermäßigen Aktivierung der Wachstumsprozesse kommt.

Fearon und Vogelstein sprechen von 4 bis 5 verschiedenen Genen, die sich verändern müssen, damit ein Karzinom entsteht. Es gibt zwar bestimmte Gene, die mit der Entstehung des Karzinoms in Verbindung stehen, aber letztendlich kommt es mehr auf die Gesamtanzahl der Veränderungen als auf die Lokalisation der einzelnen Veränderung an [23]. Die primäre Mutation ist eine Mutation im APC-Gen. Darauf folgen weitere

Mutationen in verschiedenen Genen. Die schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein ist in Abbildung 1 dargestellt.

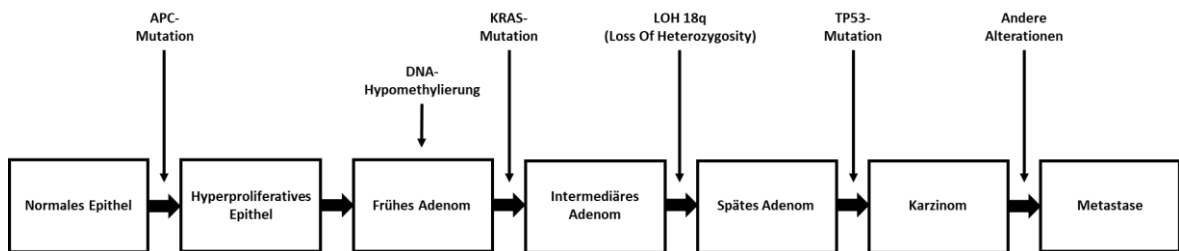


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz

Die APC-Mutation stellt den ersten Schritt der Karzinogenese dar und führt zum Übergang des normalen Kolonepithels zu hyperproliferativem Epithel. Danach folgen weitere chromosomale Veränderungen, die zunächst zu einem Adenom und darauffolgend zu einem invasiven Karzinom führen. Entscheidend dafür ist die Aktivierung von Protoonkogenen wie KRAS und der Ausfall von Tumorsuppressorgenen wie TP53. Zusätzlich spielen DNA-Hypomethylierung und der Funktionsverlust von Genen durch Loss Of Heterozygosity (LOH) eine Rolle. Die exakte Reihenfolge dieser Ereignisse hat eine untergeordnete Relevanz, da sie variabel ist. Abbildung modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990 [23]

Besonders hervorzuheben sind Mutationen, die die Gene *BRAF*, *PIK3CA* und die *RAS*-Gene *KRAS* und *NRAS* betreffen.

BRAF codiert für eine Serin-Threonin-Protein-Kinase, die den MAPK-Signalweg reguliert und die innerhalb dieser Signalkaskade den RAS-Proteinen nachgeschaltet ist [24]. Mutationen in *BRAF* treten in 10 % der Kolonkarzinome auf, wobei die Frequenz bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren (s.u.) auf bis zu 40 % erhöht ist [25]. Eine Mutation führt zur übermäßigen Aktivierung des MAPK-Signalwegs, der unter anderem die Zellproliferation und das Überleben der Zelle begünstigt [26].

Die beiden RAS-Proteine *KRAS* und *NRAS*, die von den gleichnamigen Genen codiert werden, sind GTPasen, welche - wie auch *BRAF* - im MAPK-Signalweg für die Weiterleitung der Signale verantwortlich sind. Somit wird durch eine Mutation in einem der *RAS*-Gene ebenfalls die Proliferation und das Überleben der Zellen gefördert. *KRAS*-Mutationen treten in 40 % der Kolonkarzinome auf, während *NRAS*-Mutationen in ca. 5 % der Fälle aufzufinden sind [26]. Mutationen in *KRAS* und *BRAF* treten nur in sehr seltenen Fällen zusammen auf [26].

PIK3CA codiert für eine katalytische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Dieser wirkt unterstützend auf die Zellproliferation. Ein zu *PIK3CA* synergistischer Einfluss der Gene *BRAF* und *KRAS* wird im PI3K/AKT-Signalweg angenommen, da *PIK3CA*-Mutationen auch zusätzlich zu Mutationen

in *KRAS* und *BRAF* vorkommen können [27]. Die *PIK3CA*-Mutation stellt mit einer Frequenz von 10 - 20 % die häufigste Mutation innerhalb dieses Signalwegs in Kolonkarzinomen dar und bewirkt eine übermäßige Zellproliferation [28, 29].

1.3.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Der zweitwichtigste Entstehungsmechanismus ist der Weg der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), der in bis zu 15 % der Fälle ursächlich für das Kolonkarzinom und bei nahezu allen Patienten mit Lynch-Syndrom nachzuweisen ist [15, 30]. Dennoch handelt es sich bei dem Großteil der MSI-Tumore um sporadische Kolonkarzinome und nur ein kleiner Teil der Patienten ist vom Lynch-Syndrom betroffen [31]. MSI ist gekennzeichnet durch Fehler im Mismatch-Reparatur-System (MMR-System). Das MMR-System dient der Fehlerminimierung bei der DNA-Replikation. Es kann normalerweise falsch eingebaute oder fehlende Basen bei der DNA-Replikation erkennen und diese durch die richtige Base ersetzen bzw. ergänzen. Ist dieser Mechanismus gestört, häufen sich Mutationen während der Replikation, die die Entstehung von Krebs begünstigen [32].

Mikrosatelliten sind kurze, sich wiederholende DNA-Sequenzen von einer bis vier Basen Länge [33]. Diese befinden sich sowohl in codierender als auch in nicht-codierender DNA. Aufgrund der sich wiederholenden Sequenzen sind Mikrosatelliten bei der Replikation besonders fehleranfällig, da die DNA-Polymerase nur schwer an diese binden kann [21]. Diese Fehler werden normalerweise vom MMR-System repariert. Wichtige MMR-Gene sind *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* [30]. Fällt das MMR-System aus, so können Defekte in der DNA nicht mehr repariert werden und in der Folge die mutierten DNA-Sequenzen mit jeder weiteren Replikation vermehrt werden (Hypermutation) [21]. Diese Anhäufung von Mutationen führt schließlich zur Entstehung eines Karzinoms. Der Ausfall des MMR-Systems kann durch zwei verschiedene Mechanismen entstehen. Beim sporadischen Kolonkarzinom kommt es zu einer somatischen Inaktivierung beider Allele eines MMR-Gens, hauptsächlich des *MLH1*-Gens [21, 30]. Dies geschieht durch Methylierung von Cytosin im Bereich des *MLH1*-Promoters, wodurch das Gen inaktiviert wird [31]. Die Methylierung erfolgt vor allem im Bereich der sogenannten CpG-Inseln, also wenn in einer DNA-Sequenz auf ein Cytosin ein Guanin folgt [33].

Beim zweiten Mechanismus entsteht der Defekt des MMR-Gens durch eine Keimbahnmutation. Die Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene ist ein obligates

Kriterium für das Lynch-Syndrom [30]. Somit kann bei MSI-Tumoren durch Testung des *MLH1*-Promoters bzw. durch Testung auf eine Keimbahnmutation in den MMR-Genen zwischen einem sporadischen Kolonkarzinom und einem Lynch-Syndrom unterschieden werden. Daneben stellt die häufigste *BRAF*-Mutation beim Kolonkarzinom - die *BRAF*^{V600E}-Mutation - einen Marker für sporadische MSI-Tumore dar, da diese Mutation positiv mit sporadischen MSI-Kolonkarzinomen und negativ mit dem Lynch-Syndrom assoziiert ist [25, 34, 35].

Der Mikrosatellitenstatus wird heutzutage in zwei Kategorien unterteilt. Zum einen gibt es mikrosatelliteninstabile (MSI) Tumore, wobei darunter hochgradig mikrosatelliteninstabile (MSI-high) Tumore verstanden werden [37]. Man spricht von MSI-high-Tumoren, wenn in $\geq 30\%$ der für MSI typischen Regionen eine Mutation vorliegt, die zu einer Verschiebung des Leserasters geführt hat („Frameshift-Mutation“) [21, 36]. Zum anderen spricht man von mikrosatellitenstabilen (MSS) Tumoren, wenn in den typischen Regionen keine Mutationen und somit auch keine Instabilität vorliegt.

MSI-Tumore zeichnen sich durch ihren im Vergleich zu CIN-Tumoren schnelleren Progress aus und sind im Gegensatz zu CIN-Tumoren überwiegend im rechtsseitigen Kolon lokalisiert [21, 30]. Trotz des schnelleren Progresses haben Patienten mit MSI im nicht-metastasierten Stadium eine bessere Prognose als Patienten ohne MSI [38–40]. Eine Erklärung dafür ist das geringere Metastasierungspotential von MSI-Tumoren [40, 41].

Klinisch relevant ist die Bestimmung von MSI für die Bestimmung der Prognose des Kolonkarzinoms und für die Diagnosestellung des Lynch-Syndroms, aber auch als prädiktiver Marker für die adjuvante Chemotherapie und für die Immuntherapie (s.u.). Während die Immuntherapie bei MSI-Tumoren ein erhöhtes Ansprechen im Vergleich zu MSS-Tumoren zeigt [36, 38, 39, 42], ist die adjuvante Chemotherapie bei MSI-Tumoren im UICC-Stadium II mit keinem zusätzlichen Nutzen verbunden [43, 44].

1.4 Tumormikroumgebung und immunpathologische Eigenschaften

Entscheidend für die Progression eines Tumors ist neben den Eigenschaften der Tumorzellen auch die Tumormikroumgebung, zu der die Infiltration des Tumors durch Immunzellen des Patienten gehört. In den letzten Jahren hat die Immunzellinfiltration eines Tumors - insbesondere durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) - für die Klassifizierung und Prognose von Kolonkarzinomen an Bedeutung gewonnen und wird als

aussagekräftige Ergänzung zu den gängigen Klassifizierungen wie UICC- bzw. TNM-Stadium, MSI-Status und Differenzierungsgrad des Tumors (Grading) angesehen [45]. In der Tumormikroumgebung sind unterschiedliche Subgruppen der TILs von Bedeutung, wobei die wichtigsten die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen und die CD4⁺-T-Helferzellen sind [46–48]. Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen zu zerstören, indem sie deren Apoptose herbeiführen. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche das Protein CD8, welches ihnen ermöglicht, Antigene zu erkennen, welche ihnen über den MHC-I-Komplex (engl.: major histocompatibility complex class 1) präsentiert werden, der auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert wird. Auch Tumorzellen besitzen den MHC-I-Komplex und präsentieren darüber ihre Antigene. Da Tumorzellen häufig genetische Aberrationen aufweisen und damit Veränderungen in den Antigenen entstehen können, erkennen die zytotoxischen T-Zellen die Tumorzellen als fremd [49, 50]. Nachdem der T-Zell-Rezeptor das Antigen durch Unterstützung des CD8/MHC-I-Komplexes und weiteren Co-Rezeptoren gebunden hat, wird der T-Zell-Rezeptor aktiviert. Dadurch veranlasst, schüttet die zytotoxische T-Zelle Substanzen wie Granzyme und Perforine aus, welche die gebundene Tumorzelle zerstören [50–52].

T-Helferzellen haben eine unterstützende Funktion bei der Zerstörung von Tumorzellen. Sie bekommen Antigene über den MHC-II-Komplex (engl.: major histocompatibility complex class 2) präsentiert, der sich auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen oder Makrophagen befindet. Die Bindung des über den MHC-II-Komplex präsentierten Antigens an den T-Zell-Rezeptor wird durch das Oberflächenprotein CD4 auf der Oberfläche von T-Helferzellen unterstützt [49, 53]. Die T-Helferzelle wird durch die Bindung des Antigens aktiviert und unterstützt die Immunantwort je nach ihrer Subgruppe auf unterschiedliche Weise. Auf der einen Seite gibt es Th1-T-Helferzellen, welche die zelluläre Immunantwort unterstützen, indem sie Zytokine ausschütten. Ein wichtiges Zytokin der Th1-T-Helferzellen ist Interleukin-2, welches für die Vermehrung der zytotoxischen T-Zellen benötigt wird [49, 54, 55]. Auf der anderen Seite gibt es Th2-T-Helferzellen, welche die nicht-zelluläre (humorale) Immunantwort unterstützen, indem sie ebenfalls Zytokine ausschütten. Durch die Zytokine der Th2-T-Helferzellen, zu denen unter anderem Interleukin-4 und Interleukin-13 zählen, werden B-Zellen in der Bildung von Antikörpern unterstützt [49].

Alle T-Lymphozyten, sowohl CD4-positive als auch CD8-positive, exprimieren das Protein CD3 auf ihrer Oberfläche, welches mit dem T-Zellrezeptor assoziiert ist und die Signaltransduktion nach der Antigenbindung unterstützt [56].

Der Einfluss der T-Lymphozyten in der Mikroumgebung eines Kolonkarzinoms auf die Progression des Tumors wurde in den vergangenen Jahren eingehend untersucht. Es wurde festgestellt, dass eine hohe Dichte an zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten mit einer guten Prognose korreliert, was den obengenannten tumorsuppressiven Eigenschaften von zytotoxischen T-Lymphozyten zugrunde liegt [45, 57, 58]. Der Einfluss der CD4⁺-T-Lymphozyten auf die Prognose von Kolonkarzinomen wird dagegen noch nicht gut verstanden, da die verschiedenen Subgruppen von CD4⁺-T-Lymphozyten unterschiedliche Eigenschaften mit sich bringen, welche teilweise auch tumorproliferativ wirken [45, 59]. Dennoch konnte ein positiver Einfluss von CD4⁺-T-Helferzellen in der Tumormikroumgebung auf die Prognose von Kolonkarzinomen bereits gezeigt werden [60]. Im Zuge dieser Beobachtungen wurde von Pagès, Galon et al. der Immunoscore[®] entwickelt, der sich in vielen Studien als zuverlässiger Prognosefaktor beim Kolonkarzinom erwiesen hat [45, 61–63]. Beim Immunoscore[®] wird die Dichte der gesamten T-Lymphozyten (CD3⁺) und die Dichte der zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8⁺) einmal im Zentrum des Tumors und einmal im invasiven Randbereich mittels Immunhistochemie bestimmt. Ein hoher Immunoscore[®], gleichbedeutend mit einer hohen Dichte an CD3⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in der Mikroumgebung des Tumors, ist mit einer guten Prognose assoziiert, während Tumore mit einem niedrigen Immunoscore[®] eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen [45].

Im vorigen Abschnitt wurde beschrieben, wie das Immunsystem des Patienten Tumorzellen bekämpft und dass TILs einen maßgeblichen Einfluss auf die Progression eines Tumors haben. Auf der anderen Seite sind Tumorzellen in der Lage, sich gegen das Immunsystem des Patienten zu verteidigen. Hierbei spielt das PD-1/PD-L1-System eine entscheidende Rolle [64]. Das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) ist ein regulatorisch wichtiges Oberflächenprotein auf aktivierten T-Lymphozyten, welches inhibitorisch auf deren Funktionen wirkt und eine überschießende Immunantwort verhindern soll [64, 65]. PD-1 wird aktiviert, indem der Programmed Cell Death Protein Ligand 1 (PD-L1) an PD-1 bindet. Physiologisch befindet sich PD-L1 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen [66]. Tumorzellen sind in der Lage, ebenfalls PD-L1 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und

durch Bindung an PD-1 auf T-Lymphozyten deren Immunantwort zu unterdrücken [64, 65, 67].

Diese Eigenschaft von Tumoren stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt für eine zielgerichtete Immuntherapie von Kolonkarzinomen dar. Exprimiert ein Tumor PD-L1 auf der Oberfläche seiner Zellen, kann ein Antikörper gegen PD-L1 (z.B. Atezolizumab) oder gegen PD-1 (z.B. Pembrolizumab) eingesetzt werden, der die Bindung von PD-1 und PD-L1 verhindert und dadurch den inhibitorischen Einfluss auf die T-Lymphozyten aufhebt [68]. Der Mechanismus des PD-1/PD-L1-Systems und dessen therapeutischer Ansatzpunkt ist in Abbildung 2 dargestellt.

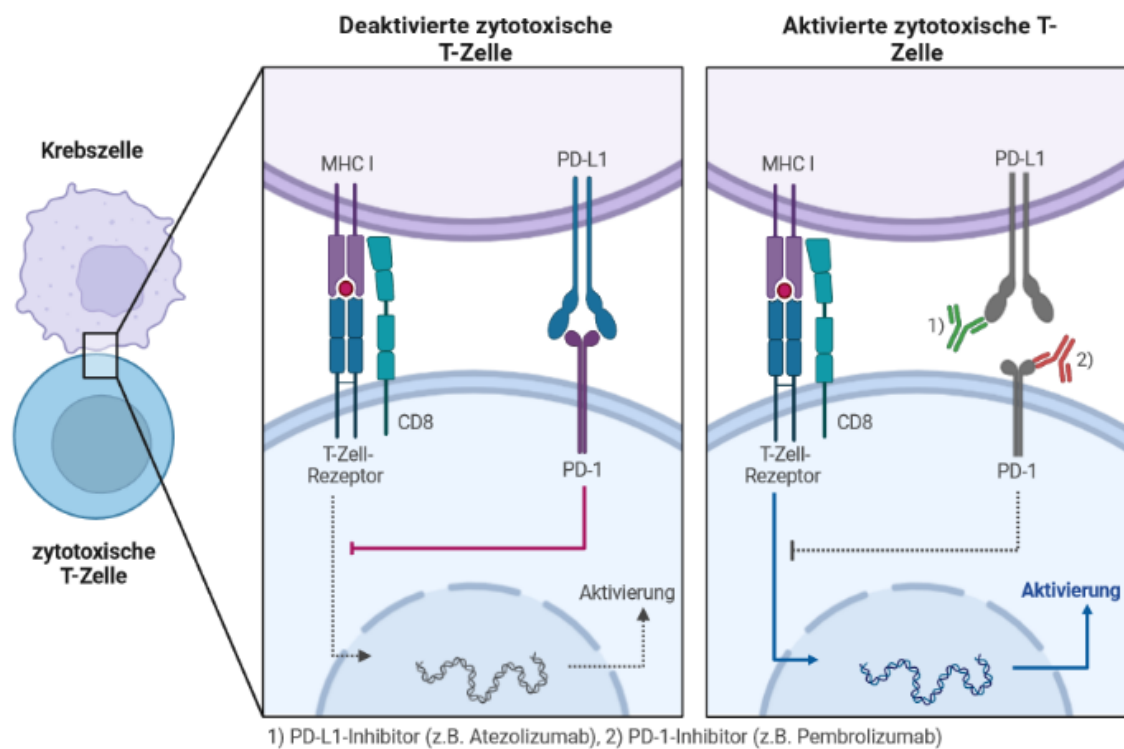


Abbildung 2: Einfluss des PD-1/PD-L1-Systems auf die Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle und Ansatz der Immuntherapie

Die Darstellung „Deaktivierte zytotoxische T-Zelle“ zeigt den Mechanismus, wie die Krebszelle die Aktivierung der T-Zelle verhindert: Die Krebszelle präsentiert der zytotoxischen T-Zelle ein Antigen (roter Punkt) über MHC-I. Die T-Zelle bindet das Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor mit Unterstützung durch CD8. Die Krebszelle exprimiert zudem PD-L1 auf ihrer Oberfläche. PD-L1 wird von PD-1 auf der Oberfläche der T-Zelle gebunden, wodurch die Signalkaskade des T-Zell-Rezeptors inhibiert wird. Die Darstellung „Aktivierte zytotoxische T-Zelle“ zeigt den Effekt der Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren. Durch diese PD-1- bzw. PD-L1-Inhibitoren wird die Inhibition der T-Zell-Aktivierung aufgehoben und die Immunantwort gefördert. Abbildung modifiziert nach der Vorlage „T-cell Deactivation vs. Activation“ von BioRender.com basierend auf der Publikation von Seidel, Otsuka et al., 2018 [69].

1.5 Therapie und Prognose des lokal begrenzten Kolonkarzinoms

Grundsätzlich basiert die Therapie des lokal begrenzten Kolonkarzinoms im UICC-Stadium I - III auf einer Operation mit ggf. adjuvanter Chemotherapie und hat einen kurativen Anspruch. Die „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“ [70] empfiehlt vereinfacht folgendes Vorgehen:

Im Stadium I erfolgt zunächst die chirurgische Resektion des Primärtumors mit zentralem Absetzen der Gefäße inklusive der Lymphadenektomie des entsprechenden Darmabschnitts. In diesem Stadium ist eine adjuvante Chemotherapie nicht indiziert, da sie die Prognose nicht verbessert.

Im Stadium II erfolgt ebenfalls die chirurgische Resektion des Primärtumors inklusive der Gefäße. Darauf folgend kann eine adjuvante Chemotherapie in Form einer Monotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) die Prognose verbessern. Wichtig für die Entscheidungsfindung über eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II ist der MSI-Status des Tumors. Während Patienten mit MSS-Tumoren von einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-FU profitieren, hat diese bei MSI-Tumoren keinen zusätzlichen Nutzen [43, 44].

Im Stadium III sollte nach der chirurgischen Resektion des Primärtumors in jedem Fall eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Hierbei ist das gängigste Therapieschema die Kombinationstherapie „FOLFOX“ bestehend aus 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin.

Beim lokal begrenzten Kolonkarzinom wird der Einsatz von zielgerichteten Therapeutika wie Immuncheckpoint-Inhibitoren oder BRAF-Inhibitoren in der S3-Leitlinie bislang nicht empfohlen [70].

Die Prognose von Darmkrebs ist abhängig vom jeweiligen Stadium. Laut den Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten betrug die relative 5-Jahres-Überlebensrate im Jahr 2018 beim kolorektalen Karzinom insgesamt 65 % bei den Frauen und 63 % bei den Männern [4]. Während Darmkrebs im lokal begrenzten Stadium (UICC I - III) noch eine gute Prognose aufweist, ist die Prognose im metastasierten Stadium IV weiterhin schlecht. Im Jahr 2018 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I 92 - 95 %, im Stadium II 83 - 85 %, im Stadium III ca. 69 % und im Stadium IV ca. 16 % [71].

1.6 Genfusionen

Die Entdeckung des „Philadelphia-Chromosoms“ und dessen Zusammenhang mit der Entstehung der chronisch-myeloischen Leukämie legte den Grundstein für die Erforschung von chromosomalen Anomalien als Ursache für Krebs [72]. Beim „Philadelphia-Chromosom“ handelt es sich um eine Translokation, also einen Austausch eines Chromosomenabschnitts (s.u.) zwischen Chromosom 9 und 22 [73]. Man fand heraus, dass sich an der Bruchstelle von Chromosom 9 das Gen *ABL* befindet und an der Bruchstelle von Chromosom 22 das Gen *BCR* [74, 75]. Diese beiden Gene werden durch die Translokation aneinandergesetzt, sodass eine *BCR-ABL*-Genfusion entsteht. Genfusionen entstehen also aufgrund einer Neuordnung der DNA, meist nachdem diese beschädigt wurde, sodass das 5'-Ende eines Gens mit dem 3'-Ende eines anderen Gens fusioniert. Es gibt mehrere Mechanismen, wie durch diese Neuordnung eine Genfusion entstehen kann. Dazu zählen die inter- und intrachromosomale Translokation, die Insertion, die Deletion, die Tandem Duplikation, die Inversion und die Chromothripsis (siehe Abbildung 3) [76]. Bei der Translokation, die wie oben erwähnt Ursache des „Philadelphia-Chromosoms“ bzw. der *BCR-ABL*-Genfusion ist, entsteht die Genfusion durch Austausch von DNA-Sequenzen innerhalb eines Chromosoms oder zwischen zwei Chromosomen. Während bei der Insertion ein DNA-Fragment aus einer Region an eine andere Region angehängt wird und ein Fusionsgen bildet, bedeutet eine Deletion, dass durch den Verlust eines DNA-Fragments zwei ursprünglich voneinander getrennte Gene fusionieren. Bei der Tandem Duplikation kommt es zu einer Duplikation einer DNA-Region, welche zu einem Fusionsgen an der ursprünglichen Stelle führt. Die Inversion stellt einen Austausch von DNA-Sequenzen dar, bei der die eine Sequenz invertiert zu ihrer ursprünglichen Abfolge mit der anderen Sequenz fusioniert. Zuletzt ist die Chromothripsis zu nennen, bei der eine Region eines Chromosoms in viele Fragmente zersplittert. Dadurch kommt es zu einer inakkuraten Wiederanordnung der einzelnen Fragmente, die zu einem Fusionsgen führt.

Der Mechanismus ist abhängig von der jeweiligen Fusion, wobei eine Fusion wiederum auch durch verschiedene Mechanismen entstehen kann [76].

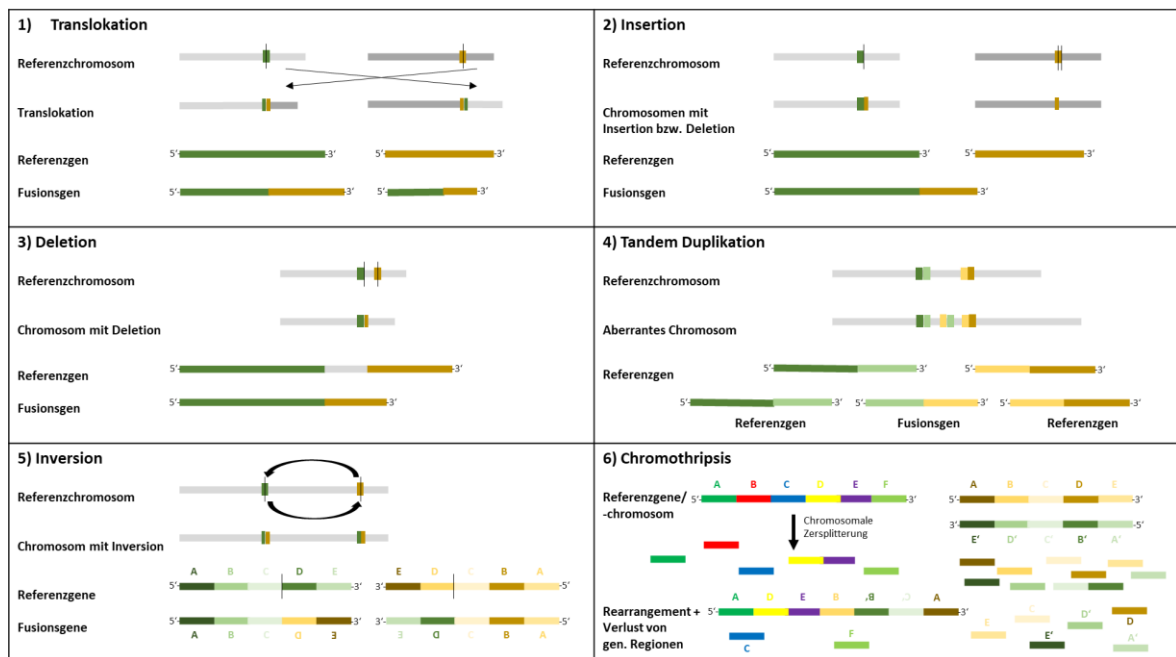


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entstehungsmechanismen von Genfusionen

1) Translokation, 2) Insertion, 3) Deletion, 4) Tandem Duplikation, 5) Inversion, 6) Chromothripsis; Abbildung modifiziert nach Tuna, Amos und Mills, 2019 [76]

Das Protein, welches als Produkt des Fusionsgens entsteht, ist in seiner Expression und/oder Funktion verändert. Es kann entweder aktiviert oder supprimiert werden oder seine Funktion komplett verlieren [77]. Hinsichtlich der Genese eines Karzinoms ist es problematisch, wenn eine solche Funktionsänderung Proteine betrifft, die entweder das Zellwachstum oder den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren. Durch die fehlende Regulation werden Zellen ungebremst vermehrt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie eine Genfusion die Biologie der Zelle verändern kann. Eine Möglichkeit ist, dass physiologisch aktive Transkriptionsfaktoren oder Promoter an ein physiologisch nicht aktives Gen gekoppelt werden, sodass dieses überexprimiert wird [76]. Auf der anderen Seite können durch eine Fusion DNA-Bindungsstellen für negativ regulierende microRNA verloren gehen, was sich ebenfalls in einer Überexpression manifestiert [76].

Während es bei den beiden erstgenannten Möglichkeiten zu einer Überexpression des betreffenden Fusionsproteins kommt, kann ein Fusionsprotein auch in seiner Funktion verändert werden - bei normaler Expression [76]. So werden betroffene Rezeptoren durch Änderung der Struktur oder durch Verlust von inhibitorischen Domänen des Rezeptors dauerhaft aktiviert. Ein Beispiel für diesen Mechanismus stellt das Fusionsprotein der *BCR-ABL*-Fusion dar, bei der die *ABL*-Tyrosinkinase unter dem Einfluss von *BCR* dauerhaft

aktiviert wird und durch ungebremstes Zellwachstum die chronisch-myeloische Leukämie auslöst [76, 78].

Auch beim Kolonkarzinom wurde in den vergangenen Jahren mit Hilfe neuerer Methoden wie dem Next-Generation-Sequencing (NGS) eine Vielzahl an Genfusionen entdeckt. Diese Genfusionen sind wahrscheinlich nicht alleinig für die Entstehung eines Kolonkarzinoms verantwortlich, führen aber ebenso wie Mutationen zu chromosomaler Instabilität [21, 79]. Zu den wichtigsten Fusionen bei Kolonkarzinomen gehören *NTRK*-, *ALK*-, *ROS1*-, *RET*-, *RSPO*- und *BRAF*-Fusionen [80]. Diese Fusionen wurden bereits auch in anderen Karzinomen entdeckt. Trotz der Vielzahl an verschiedenen Fusionen ist deren Häufigkeit in Kolonkarzinomen mit 0,9 % - 2,5 % insgesamt sehr gering [81, 82]. Betrachtet man allerdings ausschließlich MSI-high-Tumore, so treten Fusionen in 5 % aller Fälle auf. Fehlen daneben noch onkogene Treibermutationen in den *RAS/BRAF*-Genen, steigt die Häufigkeit von Fusionen auf bis zu 15 % [82, 83]. Das gleichzeitige Auftreten von Mutationen in *BRAF* oder *KRAS* auf der einen und Genfusionen auf der anderen Seite wird nicht beobachtet, sodass vermutet wird, dass diese sich gegenseitig ausschließen [80–82, 84].

Weitere, vor allem klinische Eigenschaften von Kolonkarzinomen mit Genfusion wurden bislang nicht eindeutig ermittelt. Es herrscht größtenteils Konsens darüber, dass Kolonkarzinome mit Genfusion mit höherem Alter, rechtsseitiger Tumorlokalisation und geringgradiger Differenzierung des Tumors assoziiert sind. Außerdem treten sie in allen UICC-Stadien und gleichermaßen bei Männern und Frauen auf [81, 85–87]. Daneben wurde beim Kolonkarzinom mit Genfusion das häufigere Auftreten von Lymphknotenmetastasen und eine schlechtere Prognose beschrieben [87], auch wenn dies in einer anderen Studie nicht beobachtet werden konnte [86].

Die Identifizierung von Genfusionen beim Kolonkarzinom ist relevant, da diese, wenn auch nur für eine geringe Anzahl an Patienten, eine Möglichkeit zur zielgerichteten Therapie bieten. Diesbezüglich zeigten Tests von *ALK*- und *TRK*-Inhibitoren bereits ein gutes Ansprechen [88–90].

1.7 *NTRK*-Gene und *NTRK*-Genfusionen

NTRK-Genfusionen sind sehr häufig in seltenen Tumorentitäten wie dem Infantilen Fibrosarkom (ca. 90 %) zu finden [91]. Beim Kolonkarzinom treten *NTRK*-Genfusionen mit

einer Häufigkeit von 0,23 % - 0,31 % [91–93] auf; innerhalb der Gruppe von MSI-high-Tumoren kommen *NTRK*-Genfusionen häufiger vor [94–96].

Es gibt drei verschiedene *NTRK*-Gene: *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3*. Sie kodieren für die drei Tropomyosin-Rezeptor-Kinasen TRKA, TRKB und TRKC. Dabei handelt es sich um Transmembranproteine bzw. Rezeptoren, die jeweils aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranären Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne bestehen [97]. TRK-Rezeptoren werden physiologisch hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert [97, 98]. An die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren können Neurotrophine binden, die dazu führen, dass der Rezeptor mit seiner intrazellulären Kinasedomäne verschiedene Signalkaskaden aktiviert [99, 100]. Neurotrophine sind während der Entwicklung von Nerven daran beteiligt, dass die Nerven in Richtung ihres Zielortes wachsen. Außerdem unterstützen sie die Regeneration beschädigter Nerven.

Die beiden wichtigsten Signalwege der TRK-Rezeptoren sind der MAPK- und der PI3K/AKT-Signalweg. Über diese Signalwege wird die Zellproliferation und das Zellüberleben gefördert [97, 100]. Der TRK-Rezeptor liegt im inaktiven Zustand als Monomer vor. Bindet ein Neurotrophin an diesen Rezeptor, so formiert er sich zu einem Dimer zusammen und phosphoryliert sich selbst. Dadurch wird der Rezeptor aktiviert und ermöglicht es Adapterproteinen, an den Rezeptor zu binden. Dabei wird unter anderem der MAPK- und der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert.

Der MAPK-Signalweg startet mit der Bindung des Adaptermoleküls Grb2 an den aktivierten Rezeptor. Grb2 bildet mit dem Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor SOS einen Komplex. Dieser katalysiert die Reaktion von RAS-GDP zu RAS-GTP, wodurch RAS aktiviert wird. RAS wiederum aktiviert die Serin-/Threoninkinase RAF, welche ihrerseits die MEK-Proteine aktiviert. RAS kann abgesehen davon auch das Enzym PI3K aktivieren und damit den PI3K/AKT-Signalweg induzieren [101]. Schließlich aktivieren die MEK-Proteine die ERK-Proteine, wodurch diese vom Zytoplasma in den Zellkern transferieren und dort Transkriptionsfaktoren induzieren. Die Transkriptionsfaktoren führen dazu, dass Gene exprimiert werden, die das Überleben der Zelle fördern [102].

Der PI3K/AKT-Signalweg startet mit der Bindung der Kinase PI3K an den aktivierten TRK-Rezeptor [103]. Dadurch katalysiert PI3K an der Zellmembran die Reaktion von PIP₂ zu PIP₃. PIP₃ veranlasst die Aktivierung der Kinase AKT durch die Kinase PDK1. AKT ist ein entscheidendes Protein in diesem Signalweg und löst eine Vielzahl von zellulären Prozessen aus. Über die Aktivierung des Proteins mTOR werden Transkriptionsfaktoren induziert, die

wiederm dazu führen, dass die Genexpression zellproliferativer Gene gefördert wird [103]. Abbildung 4 zeigt eine graphische Darstellung der beiden Signalwege.

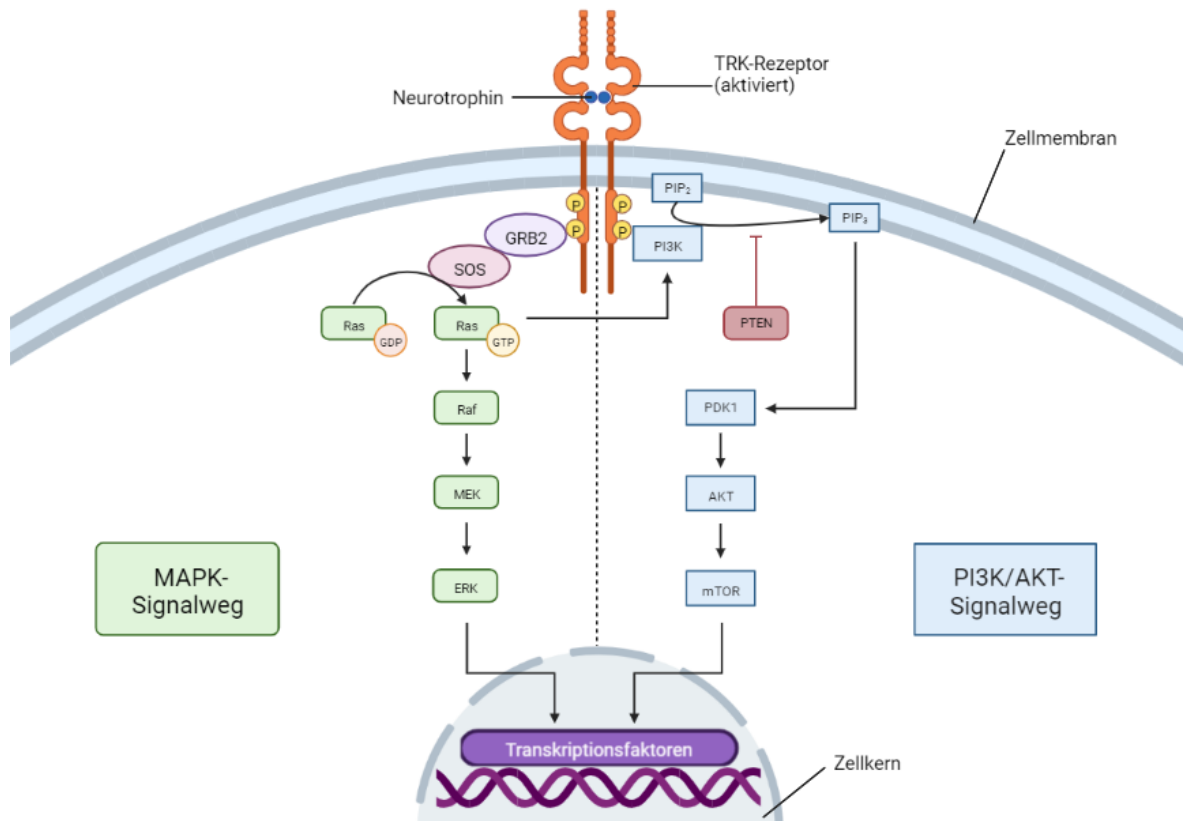


Abbildung 4: Signalwege des TRK-Rezeptors

Modifiziert nach Amatu, Sartore-Bianchi et al., 2019, Castel, Toska et al., 2014 und Guo, Pan et al., 2020 [97, 102, 104], Abbildung kreiert mit BioRender.com.

Bei der *NTRK*-Fusion fusioniert das 3'-Ende eines *NTRK*-Gens mit dem 5'-Ende eines anderen Gens. Das dadurch entstehende Fusionsprotein besitzt den C-Terminus mit der Kinasedomäne des TRK-Rezeptors und den N-Terminus des Partnerproteins. Der TRK-Rezeptor wird durch den Einfluss des 5'-Fusionspartners vermehrt exprimiert [97]. So wird der TRK-Rezeptor im Kolongewebe exprimiert und bewirkt dadurch eine unphysiologische Zellproliferation, welche die Karzinogenese fördert.

Es sind zahlreiche unterschiedliche Fusionspartner der *NTRK*-Gene beim Kolonkarzinom bekannt. Das *NTRK1*-Gen fusioniert dabei häufig mit den Genen *TPM3*, *LMNA*, *SCYL3* oder *TPR*, das *NTRK2*-Gen fusioniert häufig mit *LMNA* oder *DAB2IP* und das *NTRK3*-Gen fusioniert häufig mit *ETV6* oder *EML4* [80, 97, 105].

Patienten, welche ein Kolonkarzinom mit einer *NTRK*-Fusion aufweisen, sind typischerweise weiblich, über 60 Jahre alt und haben einen Tumor im rechtsseitigen Kolon

[87]. Letzteres ergibt sich daraus, dass *NTRK*-Fusionen - wie auch viele andere Genfusionen - beim Kolonkarzinom mit MSI assoziiert sind. Ebenso wie die meisten anderen Genfusionen sind *NTRK*-Fusionen mit dem Wildtyp in den Genen *BRAF* und *RAS* assoziiert [80, 87].

In der Diagnostik von *NTRK*-Genfusionen macht man sich die Eigenschaft von TRK-Rezeptoren, hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert zu werden, zu Nutze. Im Gegensatz zu den meisten anderen Genfusionen eignet sich dadurch die Immunhistochemie (IHC) für das Screening auf *NTRK*-Genfusionen. Wird der TRK-Rezeptor im Kolongewebe exprimiert, kann man davon ausgehen, dass es sich um eine unphysiologische Expression handelt. Die pan-TRK-Immunhistochemie hat für die Detektion von *NTRK*-Genfusionen eine Spezifität von 81,1 % - 100 % und eine Sensitivität von 75 % - 95,2 % [92, 106–108]. In jedem Fall muss eine positive pan-TRK-IHC durch ein weiteres Verfahren wie Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) oder NGS bestätigt werden [92, 109]. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil die pan-TRK-IHC weder zwischen den drei Subtypen des TRK-Rezeptors unterscheiden, noch den Fusionspartner detektieren kann.

Therapeutisch ist das Auffinden von *NTRK*-Genfusionen bedeutsam, da diese einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie bieten. Der TRK-Inhibitor Larotrectinib ist seit 2019 von der Europäischen Gesundheitsbehörde EMA für die Behandlung solider Tumore mit *NTRK*-Genfusion zugelassen [110]. In einer Studie von Drilon et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren und *NTRK*-Genfusion auf Larotrectinib eine Ansprechrate von 75 % aufwiesen [88].

2. Zielstellung

Diese Arbeit hat das Ziel, die klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusionen zu untersuchen und deren Bedeutung im Kontext der Genese und Progression von Kolonkarzinomen einzuordnen. Zusätzlich soll bewertet werden, bei welchen Tumoreigenschaften ein Screening auf Genfusionen sinnvoll sein kann. Bisherige Studien haben *NTRK*-Fusionen im Kolonkarzinom insgesamt, also in MSI- und MSS-Tumoren zusammen, untersucht. Durch die gesonderte Untersuchung der *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Tumoren sollen Unterschiede in dieser Subgruppe des Kolonkarzinoms festgestellt werden.

Im Mittelpunkt steht die Frage, ob *NTRK*-Fusionen auf der einen und Mutationen in den Genen *BRAF*, *KRAS/NRAS* und *PIK3CA* auf der anderen Seite sich gegenseitig ausschließen.

Daneben sollen weitere Hypothesen geprüft werden:

1. Kommen *NTRK*-Fusionen tatsächlich in bis zu 5 % der MSI-high-Kolonkarzinome vor?
2. Verschlechtern *NTRK*-Fusionen die Prognose von MSI-high-Kolonkarzinomen?
3. Sind *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Tumoren mit dem sporadischen Kolonkarzinom oder mit dem hereditären Kolonkarzinom im Rahmen des Lynch-Syndroms assoziiert?
4. Werden die *NTRK*-Gene in MSI-high-Tumoren mit *NTRK*-Fusion im Vergleich zu MSI-high-Tumoren ohne *NTRK*-Fusion vermehrt exprimiert?
5. Neigen *NTRK*-positive MSI-high-Tumore dazu, sich mittels PD-L1-Expression vor dem Immunsystem des Patienten zu schützen?
6. Werden *NTRK*-positive MSI-high-Tumore von CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten infiltriert?

Außerdem sollen die klinischen Patientendaten von *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren zusammengetragen und mit den Daten bisheriger Studien verglichen werden.

Abschließend sollen die Daten der *NTRK*-positiven MSI-high-Tumore genutzt werden, um weitere Genfusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen zu detektieren.

3. Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper, Sonden und Primer

Tabelle 3: Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
ALK	OTI1A4	Maus-IgG	1:50	dako	GA785
CD3	F7.2.38	Maus-IgG	1:50	dako	M7254
CD4	4B12	Maus-IgG	1:500	Leica Biosystems	NCL-L-CD4-368
CD8	4B11	Maus-IgG	1:100	Leica Biosystems	NCL-L-CD8-4B11
pan-TRK	EPR17341	Kaninchen-IgG	1:200	Zytomed Systems	RBK069
PD-L1	73-10	Kaninchen-IgG	unverdünnt	Leica Biosystems	PA0832

Tabelle 4: Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Sonde	Hersteller	Artikelnummer
Zytolight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe	Zytovision	Z-2124
Zytolight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe	Zytovision	Z-2167
Zytolight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe	Zytovision	Z-2205
Zytolight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe	Zytovision	Z-2206

Tabelle 5: Primersequenzen für die Analyse des MLH1-Promotors

Primer	Bezeichnung	Sequenz
MLH1 forward	SL386 F	GGTATTTTTGTTTTATTGGTTGGATAT
MLH1 reverse	SL386 R	Biotin-ACTCTATAAATTACTAAATCTCTT
MLH1 Sequenzierprimer	SL386 S	TAAAAYGAATTAATAGGAA

3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Nukleotide und Beads

Tabelle 6: Chemikalien, Enzyme, Nukleotide und Beads

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Annealing Buffer	Qiagen	979009
Binding-Puffer	Qiagen	979006
Citrat-Puffer, pH6	Leica	-
Clearene	Leica Biosystems	3803600E
Coral Load, 10x (aus therascreen EGFR Kit)	Qiagen	971480
Denaturation Solution	Qiagen	979007
Destilliertes Wasser	-	-
dNTP Mix, 10 mM	ThermoFisher	R0192
EDTA-Puffer, pH9	Leica	-
Ethanol	Carl Roth	9065
Formaldehyd, 37%	Sigma-Aldrich	252549-1 L
GoTaq Amplifikation-Puffer, 5x	Promega	M7921
GoTaq G2 DNA-Polymerase	Promega	M7848
Magnesiumchlorid, 25 mM	Promega	A3511
NaOH, 200 mM	Sigma-Aldrich	-
Nuklease-freies Wasser	Qiagen	-
PBS-Puffer, 10x	Carl Roth	-
QIASeq Beads (aus QIASeq Multimodal Custom Panel (96))	Qiagen	333955
Streptavidin Sepharose High Performance Beads	GE Healthcare	17-5113-01
TRIS-HCl, 200 mM	Sigma-Aldrich	-
Wash Buffer	Qiagen	979008
Xylol	Carl Roth	-

3.1.3 Kits und Systeme

Tabelle 7: Kits und Systeme

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
BOND Polymer Refine Red Detection System	Leica Biosystems	DS9390
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen	59824
Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit	Promega	AS1135
Maxwell RSC RNA FFPE Kit	Promega	AS1260
NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 Zyklen)	Illumina	20024910
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen	970802
QIASeq 96-Unique Dual Index Set A (384)	Qiagen	333725
QIAseq RNA Fusion XP Human Solid Tumor Panel	Qiagen	-
QIAxcel DNA High-Sensitivity Kit	Qiagen	929012
QuantiFluor ONE dsDNA System	Promega	E4871
QuantiFluor RNA System	Promega	E3310
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	ThermoFisher	Q33231
ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit	Zytovision	Z-2028

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Deckgläser, 24 x 50 mm	-	Carl Roth
Diamantstift	-	-
Fixogum	Klebstoff	Marabu
Küvetten mit Schraubdeckel	-	Carl Roth
Mikroreaktionsgefäße	-	Eppendorf
Parafilm	Abdeckfolie	Bemis
PCR-Streifen und Deckel	-	Eppendorf
PyroMark Q24 Plate	Primerplatte	Qiagen
R35 Mikrotomklingen	Mikrotomklingen	Feather
Skalpellklingen Nr. 15	Skalpellklingen	Feather
Superfrost Plus Adhesion 25x75x1 mm	Objektträger	epredia
SurPhob Spitzen	Pipettenspitzen	Biozym
Thermowell PCR 96 Well Plates	Mikrotiterplatte	Sigma-Aldrich

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 9: Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Typ	Hersteller
BOND-III Vollautomatisches IHC- und ISH-Färbesystem	Roboter	Leica
Dynamag2	Magnetständer	ThermoFisher
Eppendorf 5418 Zentrifuge	Zentrifuge	Eppendorf
Kühlblock	-	-
Leica DME Mikroskop	Mikroskop	Leica Microsystems
Maxwell 16 MX3031	Roboter	Promega
Mixing Block MB-101	Heizblock	Bioer
Mixing Block MB-102	Heizblock	Bioer
NextSeq 550 Sequencing System	Sequenzierautomat	Illumina
Ofen	-	Melag
Olympus BX63	Fluoreszenzmikroskop	Olympus
OTS40 Stretching Table	Heizplatte	Medite
pfm Cooling Plate 4100	Kühlplatte	pfm medical
pfm Slide 2003	Schlittenmikrotom	pfm medical
pfm Slide 4004 M	Schlittenmikrotom	pfm medical
pfm Stretching Table 1100	Heizplatte	pfm medical
Pinzel	-	-
Pinzetten	-	-
Pipetten	-	Eppendorf
Pyromark Q24 Cartridge	Reagenzienkartusche	Qiagen
PyroMark Q24 MDx	Sequenzierautomat	Qiagen

PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs	Plastiktröge	Qiagen
PyroMark Q24 Workstation	Workstation	Qiagen
QIAxcel Advanced	Elektrophoresegerät	Qiagen
Quantus	Fluorometer	Promega
Qubit4	Fluorometer	Invitrogen
Skalpell-Griff Nr. 3	Skalpell	Feather
StripSpin12	Zentrifuge	Benchmark
ThermoBrite StatSpin	Heizplatte	Leica Biosystems
Thermoshaker TS-100	Heizblock	biosan
Trio Thermocycler	Thermocycler	Biometra
Vortex RS-VA 10	Vortexer	Phoenix-Instrument
Wasserbad Typ 1052	Wasserbad	GFL

3.1.6 Software

Tabelle 10: Software

Name	Version	Verwendung	Firma
Allegro Plus Scanning System	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	BioView
biorender.com	-	Erstellung von Grafiken	BioRender
CLC Genomics Workbench	22	Next-Generation-Sequencing	Qiagen
Excel	2016	Datenverwaltung	Microsoft
ImageJ	1.53k	Bildbearbeitung	-
IPA	-	Genexpressionsanalyse	Qiagen
PyroMarkQ24	2.0.7	Pyrosequenzierung	Qiagen
QIAxcel ScreenGel Software	-	Fragmentlängenanalyse	Qiagen
R	4.2.1	Statistik	-
R-Studio	2022.02.3	Statistik	-
SPSS	29	Statistik	IBM

3.2 Allgemeines Vorgehen

Es gibt drei verschiedene Verfahren, mit denen Tumore in dieser Arbeit auf Genfusionen untersucht werden sollten. Diese Verfahren sind die Immunhistochemie (IHC), die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) und die RNA-Sequenzierung mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) [109]. Die IHC ist ein kostengünstiges und schnelles Verfahren, durch das spezifische Zellproteine nachgewiesen werden können. Dadurch wird indirekt die Expression des zugehörigen Gens bestimmt, wobei nicht unterschieden werden kann, ob es sich bei dem Gen um ein Wildtyp-Gen oder um ein Fusionsgen handelt. Deshalb bietet sich die IHC zur Detektion von Genfusionen bei Kolonkarzinomen nur für Gene wie *NTRK1/2/3* an, die physiologisch nicht im Kolongewebe exprimiert werden [92, 108, 109]. Die Sensitivität für die Detektion von *NTRK*-Genfusionen liegt bei der pan-TRK-IHC bei 75 % - 95,2 % [92, 106–108], allerdings kann bei dieser Methode der Fusionspartner nicht ermittelt werden.

Die FISH ist ebenfalls ein schnelles und etabliertes Verfahren, bei dem durch eine fluoreszenzmarkierte RNA-Sonde der chromosomale Bruch eines Gens dargestellt und damit die Genfusion indirekt nachgewiesen wird. Ein Nachteil dieser Methode ist einerseits, dass - wie auch bei der IHC - der Fusionspartner nicht nachgewiesen wird. Andererseits kann die FISH auch nicht nachweisen, ob das betroffene Gen tatsächlich transkribiert wird und ein Fusionsprotein entsteht. [108, 109]

Als dritte Methode steht die RNA-Sequenzierung mittels NGS zur Verfügung. Im Gegensatz zur IHC und FISH kann hierbei die Position der Genfusion exakt bestimmt werden und die Bestimmung des Fusionspartners ist ebenfalls möglich. Außerdem kann mittels NGS in nur einer Untersuchung nach Genfusionen in einer Vielzahl von Genen gesucht werden. Nachteile dieser Methode stellen die aufwendige Prozessierung jeder Probe und die hohen Kosten dar. [109, 111]

In dieser Arbeit sollte - wie auch bei vorhergehenden Studien empfohlen - ein Screening auf *NTRK*-Genfusionen mittels pan-TRK-IHC durchgeführt werden [106, 108, 109, 111]. Anschließend sollten pan-TRK-positive Tumore mittels RNA-Sequenzierung überprüft werden. Testweise wurde auch ein Screening mittels ALK-IHC durchgeführt, bei dem ALK-positive Tumore ebenfalls mit Hilfe der RNA-Sequenzierung überprüft werden sollten. Für den Fall einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der IHC und der RNA-Sequenzierung mittels NGS wurde als dritte Methode die FISH durchgeführt.

Im Anschluss wurden weitere molekularpathologische Untersuchungen bei *NTRK*-positiven Tumoren vorgenommen. Dazu gehörte die Sequenzierung des *MLH1*-Promotors mittels Pyrosequenzierung, der PD-L1-Status des Tumors mittels IHC und die Quantifizierung der den Tumor infiltrierenden CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten ebenfalls mittels IHC. Außerdem wurde die Genexpression *NTRK*-positiver und *NTRK*-negativer Tumore verglichen.

Nach Auswertung der Eigenschaften von Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Genfusion sollten abschließend Kolonkarzinome ohne *NTRK*-Genfusion, aber mit ähnlichen Eigenschaften, direkt mittels RNA-Sequenzierung untersucht werden. Dies beruhte auf der Annahme, dass diese Tumore aufgrund ihrer Eigenschaften möglicherweise eine andere Genfusion aufwiesen.

3.3 Patientenkollektiv

Die Patienten entstammten dem Studienregister der ColoPredict-Plus-2.0-Studie am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum. Dabei handelt es sich um eine retro- und prospektive Studie, die Patienten mit lokal begrenztem Kolonkarzinom im Stadium I, II und III erfasst und deren Versorgung über 5 Jahre dokumentiert und analysiert. Das primäre Studienziel ist die Bestimmung der Rolle einer Mikrosatelliteninstabilität in Kombination mit einer *KRAS*-Mutation bei Kolonkarzinomen im Stadium II ohne klinische Risikofaktoren. Das nicht-interventionelle, multizentrische Register beinhaltet bereits klinische und molekularbiologische Patientendaten.

In die ColoPredict-Plus-2.0-Studie eingeschlossen werden männliche oder weibliche Patienten mit der Diagnose eines Kolonkarzinoms im UICC-Stadium I bis III mit einem Alter ≥ 18 Jahre, welche fähig sind, die Anforderungen der Studie und die Aufklärung dazu zu verstehen, zu hinterfragen und zu bemessen. Des Weiteren gehört zu den Voraussetzungen die Bereitschaft der zugehörigen Pathologie, Gewebeproben für die wissenschaftlichen Analysen zur Verfügung zu stellen und eine gemäß ICH-GCP unterschriebene Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie. Außerdem ist eine vom Patienten unterschriebene Schweigepflichtentbindung der behandelnden Ärzte für die Zwecke der Studierhebungen notwendig.

Sämtliche Patientendaten liegen pseudonymisiert ohne Angabe von Initialen und Geburtsdatum vor.

Folgende klinische und molekularbiologische Patientendaten waren zu Beginn dieser Arbeit bereits in dem Register vorhanden:

1. Alter zum Zeitpunkt des Einschlusses
2. BRAF-Status
3. Geburtsjahr
4. Geschlecht
5. Histologischer Subtyp
6. Infiltrationstiefe des Tumors (T-Stadium)
7. Krankheitsfreies Überleben in Monaten (DFS)
8. KRAS-Status
9. Lokalisation des Tumors
10. Lymphknotenbefall (N-Stadium)
11. MSI-Status
12. NRAS-Status
13. OP-Verfahren
14. PIK3CA-Status
15. Rezidivfreies Überleben in Monaten (RFS)
16. Tumorstadium nach UICC
17. Überleben in Monaten (OAS)
18. Vorliegen einer weiteren Krebsart
19. Vorliegen eines Zweittumors im Darm

Aus dem Register wurde ein Kollektiv von 509 Patienten auf Genfusionen untersucht. 411 dieser Patienten hatten MSI-high-Tumore und 98 Patienten hatten MSS-Tumore. Dies hatte den Grund, dass Genfusionen in MSI-high-Tumoren untersucht werden sollten, weil bei diesen das Auftreten von Genfusionen wahrscheinlicher ist, und dass die MSS-Tumore als Vergleichsgruppe dienen sollten. Die MSI-Kohorte stellte eine Stichprobe aller Patienten mit MSI-high-Tumoren im gesamten Studienregister dar, genauso wie die MSS-Kohorte eine Stichprobe aller Patienten mit MSS-Tumoren darstellte. Lediglich in der Kategorie „Infiltrationstiefe des Tumors (T-Stadium)“ wurde in beiden Kohorten eine gleichmäßigere Verteilung angestrebt, um ein repräsentatives Bild über alle T-Stadien zu erhalten. Eine Übersicht der MSI-Kohorte im Vergleich zu allen MSI-high-Tumoren und der MSS-Kohorte im Vergleich zu allen MSS-Tumoren im Studienregister befindet sich im Anhang (A1 und A2).

Die Patienten sind zwischen Juni 2010 und Dezember 2020 in das ColoPredict-Plus-2.0-Register aufgenommen worden.

Das Tumorgewebe dieser Patienten liegt am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum als formalinfizierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebekblock vor.

3.4 Immunhistochemie (IHC)

Für das Screening auf *NTRK*-Genfusionen wurde eine pan-TRK-Immunhistochemie bei allen 411 MSI-Tumoren und bei allen 98 MSS-Tumoren durchgeführt. Außerdem wurde bei den *NTRK*-positiven Tumoren eine PD-L1-, CD3-, CD4- und CD8-Immunhistochemie durchgeführt.

Zusätzlich wurde ein Screening auf *ALK*-Genfusionen mittels ALK-Immunhistochemie durchgeführt; dieses Verfahren wurde nach 186 gescreenten MSI-Tumoren aufgrund mangelnder Sensitivität beendet.

Zunächst wurden zur Vorbereitung für die immunhistochemische Färbung pro Patienten fünf Leerschnitte von 1 µm Dicke von dem jeweiligen FFPE-Gewebeblock angefertigt. Dazu wurde der FFPE-Gewebeblock auf einer Eisplatte gekühlt, um das Paraffin zu erhärten und somit eine bessere Schnittqualität zu erreichen, und anschließend am Mikrotom geschnitten. Jeder der Schnitte wurde im Wasserbad bei 55 °C entfaltet und umgehend auf einen Adhäsions-Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und vor der Färbung für 10 min. bei 90 °C im Ofen dehydriert. Es erfolgte die Entparaffinierung des Gewebes durch Xylol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung.

Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte auf dem Bond-III-vollautomatisierten Färbeautomaten von Leica Biosystems mit Hilfe des BOND Polymer Refine Red Detection System von Leica Biosystems.

Da durch die Fixierung des Gewebes die Proteine untereinander vernetzt waren, waren die Antigene zunächst maskiert. Es bedurfte also zuerst einer Auflösung dieser Vernetzung, um die Antigene für die Antigen-/Antikörper-Reaktion zugänglich zu machen. Der erste Schritt auf dem Färbeautomaten stellte dementsprechend die Antigendemaskierung dar. Dafür wurde das hitzeinduzierte-Epitop-Retrieval (HIER) durchgeführt, welches je nach Primärantikörper unter verschiedenen Bedingungen erfolgte (s.u.).

Im Folgenden wurden der Primärantikörper und die beiden Sekundärantikörper nacheinander hinzugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte immer ein Waschschriff, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Als erstes erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper (pan-TRK-, ALK-, PD-L1-, CD3-, CD4- oder CD8-Antikörper) für 20 Minuten. Danach wurde der Sekundärantikörper Post-Primary-Antikörper (Post-Primary-AP Kaninchen-Anti-Maus-IgG von Leica Biosystems)

hinzugegeben und für 20 min. inkubiert. Schließlich kam der Sekundärantikörper Polymer-AP-Antikörper (Poly-AP-Anti-Kaninchen-IgG von Leica Biosystems) dazu, welcher ebenfalls 20 min. inkubiert wurde.

Beide Sekundärantikörper enthielten das Enzym Alkalische Phosphatase, welches für die anschließende Färbung von Bedeutung war.

Nun wurde die Antigen-/Antikörper-Bindung gefärbt. Dazu wurde das Chromogen Fast Red (aus dem BOND Polymer Refine Red Detection System von Leica Biosystems) hinzugegeben, für 5 min. inkubiert und danach gewaschen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Fast Red Chromogen ist ein Substrat der Alkalischen Phosphatase und reagiert mit den an den Sekundärantikörpern befindlichen Molekülen dieses Enzyms. Durch die Umsetzung des Substrats durch die Alkalische Phosphatase wurde die Antigen-/Antikörper-Bindung rot gefärbt.

Als letzter Schritt im Färbeautomaten erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Abschließend wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Danach wurde das Präparat unter dem Mikroskop beurteilt.

3.4.1 Pan-TRK

Bei der pan-TRK-IHC wurde die Antigendemaskierung durch eine Hitzevorbehandlung in Citrat-Puffer bei pH 6 und 100 °C für 10 min. durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale pan-TRK-Kaninchen-IgG Antikörper EPR17341 von Zytomed Systems mit der Verdünnung 1:200 eingesetzt.

Aufgrund der hohen Sensitivität der pan-TRK-IHC wurde bei der Auswertung wie bei Solomon, Linkov et al. die eindeutige zytoplasmatische, membranöse oder nukleäre Färbung jeglicher Intensität in ≥ 1 % der Tumorzellen als positiv gewertet [92].

3.4.2 ALK

Bei der ALK-IHC wurde die Antigendemaskierung durch eine Hitzevorbehandlung in EDTA-Puffer bei pH 9 und 100 °C für 30 min. durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale ALK-Maus-IgG-Antikörper OTI1A4 von dako mit der Verdünnung 1:50 eingesetzt.

Bei der Auswertung wurde wie auch bei Houang, Toon et al. und Lee, Hong et al. ausschließlich eine starke zytoplasmatische Färbung als ALK-positiv gewertet [112, 113].

3.4.3 PD-L1

Bei der PD-L1-IHC wurde die Antigendemaskierung durch eine Hitzevorbehandlung in EDTA-Puffer bei pH 9 und 100 °C für 30 min. durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale PD-L1-Kaninchen-IgG-Antikörper 73-10 von Leica Biosystems unverdünnt eingesetzt.

Für die Auswertung wurde der Tumor Proportion Score (TPS) genutzt. Dieser stellt das Verhältnis der Anzahl der PD-L1-positiven Tumorzellen zur Gesamtanzahl aller vitalen Tumorzellen dar:

$$TPS = \frac{\text{Anzahl PD-L1 positiver Tumorzellen}}{\text{Gesamtanzahl aller vitalen Tumorzellen}} \times 100$$

Der TPS wurde dabei in Prozent angegeben. Es wurde die partielle oder komplette Färbung der Tumorzellmembran jeglicher Intensität als PD-L1-positiv gewertet, während die zytoplasmatische Färbung nicht berücksichtigt wurde. Das Ergebnis des Scores wurde in drei Kategorien eingeteilt: keine PD-L1-Expression (< 1 %), moderate PD-L1-Expression (1 - 49 %) und starke PD-L1-Expression (≥ 50 %). Ein Score von ≥ 1 % wurde als PD-L1-positiv gewertet. [114, 115]

3.4.4 CD3, CD4 und CD8

Bei der CD3-, CD4- und CD8-IHC wurde die Antigendemaskierung jeweils durch eine Hitzevorbehandlung in EDTA-Puffer bei pH 9 und 100 °C für 30 min. durchgeführt. Als

Primärantikörper wurden der monoklonale CD3-Maus-IgG-Antikörper F7.2.38 von dako mit der Verdünnung 1:50, der monoklonale CD4-Maus-IgG-Antikörper 4B12 von Leica Biosystems mit der Verdünnung 1:500 und der monoklonale CD8-Maus-IgG-Antikörper 4B11 von Leica Biosystems mit der Verdünnung 1:100 eingesetzt.

Bei der Auswertung wurde der vitale Tumorbereich mit der größten Dichte an CD3⁺, CD4⁺- bzw. CD8⁺- Immunzellen auf dem Präparat gesucht. Anschließend wurden jeweils die CD3⁺, CD4⁺- bzw. CD8⁺-Immunzellen pro High-Power-Field (HPF) manuell mit Hilfe von ImageJ ausgezählt. Das HPF stellt einen Ausschnitt des Präparats bei 400-facher Vergrößerung (Objektiv 40:1 und Okular 10x) dar. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurde zusätzlich die Lymphozytenzahl in Lymphozyten/mm² umgerechnet.

3.5 Next Generation Sequencing

3.5.1 RNA-Isolierung

Der erste Schritt der RNA-Sequenzierung mittels Next-Generation-Sequencing stellte die Gewinnung von RNA aus dem Tumor des Patienten dar. Dazu wurden als erstes von jedem FFPE-Gewebeblock am Mikrotom unter RNase-freien Bedingungen 6 - 8 Schnitte à 10 µm Dicke angefertigt und auf Adhäsions-Objektträgern, welche mit Nuklease-freiem Wasser benetzt wurden und sich auf einer 50 °C warmen Heizplatte befanden, entfaltet. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die weiteren Schritte wurde mit dem Maxwell RSC RNA FFPE Kit von Promega gearbeitet.

Das Tumorgewebe wurde von jedem der 6 - 8 Objektträger mit einem sterilen Skalpell heruntergekratzt und in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) mit bereits vorgelegten 400 µl Mineralöl gegeben. Um ausschließlich Tumorgewebe zu erhalten, wurde der jeweilige Leerschnitt vor den zugehörigen HE-Schnitt gehalten, auf dem die Grenzen des Tumorgewebes eingezeichnet waren. Im Anschluss wurde das Gefäß für 10 Sekunden gevortext und für 2 Minuten bei 80 °C im Heizblock inkubiert. Für die Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Zellen wurde pro Probe ein Mix bestehend aus 224 µl Lyse-Puffer und 25 µl Proteinase K zu den Proben gegeben. Zusätzlich wurde 1 µl Blue Dye dazu gegeben, um für die weiteren Schritte die wässrige Phase farblich hervorzuheben. Nach kurzem Vortexen für 5 Sekunden und anschließendem Zentrifugieren bei 10000 g für 20

Sekunden, bei dem die Phasen aufgetrennt wurden, wurden die Proben auf dem Heizblock zunächst bei 56 °C für 30 Minuten und danach bei 80 °C für 2 Stunden inkubiert.

Darauf erfolgte der DNase-Verdau, um die DNA zu entfernen und ausschließlich RNA zu behalten. Für den Verdau wurden jeweils 26 µl MnCl₂ 0,09 M und 14 µl DNase-Puffer und 10 µl DNase I zu den Proben gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (16873 g) runterzentrifugiert und umgehend in den Maxwell überführt. Nach der Isolierung im Maxwell wurden die Proben nochmals anzentrifugiert und das fertige Isolat bei - 25 °C gelagert.

3.5.2 Messung der Konzentration der Start-RNA

Für die Sequenzierung sollte eine RNA-Menge von 200 ng eingesetzt werden. Um das benötigte Volumen von der isolierten RNA zu ermitteln, wurde eine Konzentrationsmessung mit Hilfe des QuantiFluor RNA System von Promega durchgeführt. Es wurde dem Protokoll des QuantiFluor Dye System für „RNA, high-concentration standard curve“ gefolgt. Dabei wurde der QuantiFluor Farbstoff im Verhältnis 1:400 mit 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl mit 1 mM EDTA-Na₂) verdünnt, der eine Suspendierung der RNA gewährleistete. Anschließend wurden 195 µl dieses Ansatzes mit 5 µl Probe-RNA versetzt, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte die Messung mit dem Quantus Fluorometer. Der Standard hatte eine Konzentration von 100 ng/µl.

3.5.3 Erstellung von DNA-Bibliotheken

Um die Proben für die Sequenzierung vorzubereiten, wurde für jede Probe eine sogenannte DNA-Bibliothek erstellt. Dieser Prozess beinhaltet folgende Schritte: Zunächst wird die isolierte RNA in eine doppelsträngige DNA überschrieben. Entscheidend für diesen Schritt ist das Enzym Reverse Transkriptase, welche eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Sie kann, nachdem ein Primer an die RNA hybridisiert wurde, einen zum RNA-Strang komplementären DNA-Strang (cDNA) synthetisieren. Am Ende dieses Vorgangs wird die Reverse Transkriptase gestoppt, indem sie durch Hitze zerstört wird.

Dann erfolgt die Synthese des zweiten DNA-Strangs, für den eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate als Substrat benötigt werden. Außerdem wird eine RNase hinzugefügt, um sicherzustellen, dass verbliebene RNA nun abgebaut wird. Nachdem nun doppelsträngige DNA-Stränge vorliegen, erfolgt das sogenannte End-Repair und dA-Tailing. Nach der reversen Transkription sind die DNA-Fragmente an den Enden unterschiedlich lang, sodass einige Basen ungepaart vorliegen. Dieser Zustand muss aufgehoben werden, weil sich ungepaarte Basen eines Strangs mit ungepaarten Basen eines weiteren Strangs schnell paaren, was es zu vermeiden gilt. Im Zuge des End-Repair werden die fehlenden komplementären Basen an die Enden angebaut, sodass schließlich beide Stränge gleich lang sind und glatt enden. Sobald die Enden glatt sind, kann an die 3'-Enden der beiden Stränge jeweils ein Adenin angehängt werden (dA-Tailing). Dieses Adenin ermöglicht im darauffolgenden Schritt die Bindung des Adapters, der seinerseits ein Thymin am 3'-Ende besitzt, sodass sich diese komplementären Basen binden [116]. Das Anfügen von Adaptoren an die beiden Enden des DNA-Strangs hat mehrere Gründe. Der Adapter dient zum einen als Bindungsstelle für die Primer, die später verwendet werden. Der Vorteil ist, dass dadurch, dass sämtliche DNA-Stränge mit derselben Adaptersequenz versehen sind, nur ein Primer für alle DNA-Stränge verwendet werden kann. Abgesehen davon ist an den Adaptoren ein Barcode angehängt, also eine spezielle, individuelle DNA-Sequenz, anhand der mehrere Proben voneinander unterschieden werden können. Neben dem Barcode, der bei jeder Probe anders ist, enthält der Adapter auch noch die Unique Molecular Indices (UMIs), welche für jedes einzelne DNA-Fragment einmalig sind. Für die spätere Sequenzierung ist noch wichtig, dass DNA-Stränge mithilfe des Adapters an die Flow Cell im Sequencer binden können. Nach einer ersten Aufreinigung erfolgt das Single Primer Extension (SPE) Target Enrichment. Hier wird das Panel hinzugefügt, sodass später nur die Gene sequenziert werden, welche im Panel enthalten sind. Auch nach diesem Schritt erfolgt eine Aufreinigung, an welche dann die Universal-PCR angeschlossen wird, um die vorhandenen DNA-Fragmente zu amplifizieren. Zuletzt wird die amplifizierte DNA nochmals aufgereinigt. Danach können die fertigen DNA-Bibliotheken für ca. 3 Monate bei - 20 °C gelagert werden.

Die Erstellung der DNA-Bibliotheken erfolgte nach dem Protokoll des QIAseq RNA Fusion XP Panel von Qiagen. Es wurden die Reagenzien des QIAseq RNA Fusion XP Human Solid Tumor Panel und des QIAseq 96-Unique Dual Index Set A (384) von Qiagen verwendet. Es

wurden 200 ng RNA eingesetzt, weshalb vorab eine Verdünnung gemäß den zuvor gemessenen Konzentrationen mit Nuklease-freiem Wasser erfolgte. Von der Verdünnung wurden 5 µl eingesetzt.

3.5.3.1 Synthese des ersten Strangs cDNA

Die Synthese des ersten Strangs cDNA bestand aus zwei Zwischenschritten (s. Tabelle 11). Im ersten Schritt wurde ein Primer an die RNA gebunden. Dazu wurden 5 µl der zuvor verdünnten RNA-Probe in einen im Kühlblock befindlichen PCR-Streifen überführt und mit 1 µl RP Primer II versetzt. Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und kurz an zentrifugiert. Dann erfolgte eine Inkubation bei 65 °C für 5 min. im Thermocycler. Im Anschluss wurde die Probe sofort für 2 min. im Kühlblock gekühlt, um das Priming zu stoppen.

Danach erfolgte als zweiter Schritt die reverse Transkription. Für jede Probe wurden 2 µl BC3-Puffer (5x), 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl EZ Reverse Transkriptase benötigt. Dazu wurde ein Mastermix angefertigt, der die genannten Reagenzien entsprechend der Probenanzahl enthielt. Jeweils 4 µl des Mastermix wurden zu jeder Probe im PCR-Streifen gegeben, durch Pipettieren gemischt und kurz an zentrifugiert. Danach erfolgte die reverse Transkription im Thermocycler entsprechend des Protokolls aus Tabelle 11. Im Anschluss wurde der PCR-Streifen kurz an zentrifugiert und für den nächsten Schritt im Kühlblock gelagert.

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Synthese des ersten Strangs cDNA

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler			
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
Priming	Probe RNA (verdünnt s.o.)	5	1	65	5	103
	RP Primer II	1				
	Total	6				
Reverse Transkription	Probe RNA (nach zufälligem Priming aus dem vorherigen Schritt)	6	1	25	10	103
	BC3 Puffer, 5x	2	2	42	30	
	RNase Inhibitor	1	3	70	15	
	EZ Reverse Transkriptase	1	4	4	halten	
	Total	10				

3.5.3.2 Synthese des zweiten Strangs DNA

Für die Synthese des zweiten Strangs wurde erneut ein Mastermix angesetzt. Dazu wurden pro Probe 5 µl Nuklease-freies Wasser, 2 µl BLU-Puffer, 1 µl RH RNase, 1 µl dNTP II und 1 µl POL-Enzym gemixt. Je 10 µl Mastermix wurden zu den 10 µl Probe im PCR-Streifen gegeben, durch Pipettieren gemixt und kurz an zentrifugiert. Danach wurde der PCR-Lauf mit den Einstellungen gemäß Tabelle 12 durchgeführt. Nach dem Lauf wurde der PCR-Streifen kurz an zentrifugiert und dann für den nächsten Schritt im Kühlblock gelagert.

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Synthese des zweiten Strangs cDNA

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler			
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
Synthese des zweiten Strangs	Probe cDNA (aus vorherigem Schritt)	10	1	37	7	103
			2	65	10	
	Nuklease-freies Wasser	5	3	80	10	
	BLU Puffer	2	4	4	halten	
	RH RNase	1				
	dNTP II	1				
	POL Enzym	1				
	Total	20				

3.5.3.3 End-Repair/dA-Tailing

Für das End-Repair/dA-Tailing wurde wieder ein Mastermix angesetzt. Dieser bestand aus 5 µl ERA-Puffer (10x), 10 µl ERA-Enzym und 15 µl Nuklease-freiem Wasser pro Probe. Da dieser Mix viskös war und dadurch ein Volumenverlust zu erwarten war, wurde von jedem Reagenz ein um 10 % höheres Volumen eingesetzt. Zudem war es bei diesem Schritt wichtig, dass der Mastermix im Kühlblock angesetzt wurde. Von dem Mastermix wurden 30 µl zu den 20 µl Probe gegeben, durch Pipettieren gemixt und an zentrifugiert. Danach wurde der PCR-Lauf mit den Einstellungen aus Tabelle 13 durchgeführt. Schließlich wurde der PCR-Streifen für die Adapter-Ligation wieder im Kühlblock gelagert.

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für das End-repair/dA-Tailing

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler			
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
End Repair/dA-Tailing	Probe DNA (aus vorherigem Schritt)	20	1	4	1	70
			2	20	30	
	ERA Puffer, 10x	5	3	65	30	
	Nuklease-freies Wasser	15	4	4	halten	
	ERA Enzym, 5x	10				
	Total	50				

3.5.3.4 Adapter Ligation

Es wurde zunächst ein Mastermix aus 20 µl Ligation-Puffer (5x), 10 µl DNA-Ligase und 15 µl Nuklease-freiem Wasser pro Probe angesetzt. Auch hier wurde 10 % mehr Volumen pro Reagenz angesetzt, da der Mix viskös war. Um Verwechslungen an dieser Stelle zu vermeiden, wurde nun zunächst notiert, welcher i7-Adapter zu welcher Probe gehören sollte. Anschließend wurden 5 µl des jeweiligen i7-Adapters zur zugehörigen Probe im PCR-Streifen gegeben. Dann wurden 45 µl Mastermix zur Probe mit dem i7-Adapter hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde für 15 min. bei 20 °C im Thermocycler inkubiert (s. Tabelle 14). Danach wurde direkt mit der ersten Aufreinigung fortgefahren.

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Adapter-Ligation

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler			
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
Adapter Ligation	Probe DNA (aus vorherigem Schritt)	50	1	4	bis START	aus
			2	20	15	
	i7-Adapter und Index	5	3	4	halten	
	Ligation-Puffer, 5x	20				
	DNA Ligase	10				
	Nuklease-freies Wasser	15				
	Total	100				

3.5.3.5 Aufreinigung 1

Nach der Adapter-Ligation fand eine erste Aufreinigung statt, um überschüssige DNA auszuwaschen und die verbliebenen Enzyme zu entfernen.

Zur Vorbereitung für die Aufreinigung wurde 80%-iges Ethanol angesetzt und die QIAseq Beads, welche magnetisch sind und DNA binden können, gemischt. Das Ethanol (EtOH)

konnte auch für die weiteren Aufreinigungen verwendet werden, sofern diese am gleichen Tag anstanden. Andernfalls wurde das Ethanol neu angesetzt.

Die 100 µl Probe aus der Adapter-Ligation wurden in ein 1,5 µl Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 80 µl QIAseq Beads durch pipettieren gemixt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit, in der die DNA an die Beads binden konnte, wurden die Proben auf einem Magnetständer platziert. So wurden die Beads, die nun die DNA-Fragmente gebunden hatten, separiert. Sobald die Lösung klar war, konnte der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen werden.

Nun erfolgte der erste Waschschrift mit 220 µl EtOH 80 %. Dabei wurde das Mikroreaktionsgefäß dreimal auf dem Magnetständer rotiert, um so die Beads durch das EtOH zu waschen. Danach wurde eine Minute gewartet und das EtOH wieder entfernt und verworfen. Dieser Waschschrift erfolgte darauf ein zweites Mal. Nachdem auch hier das EtOH wieder verworfen worden ist, wurden die Beads solange getrocknet, bis Risse sichtbar waren. Dadurch wurde sichergestellt, dass das Ethanol komplett verdunstet war.

Nun erfolgte der dritte Waschschrift. Dafür wurden die getrockneten Beads in 50 µl Wasser eluiert und danach mit weiteren 55 µl QIAseq Beads gemixt. Erneut wurden die Proben nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf dem Magnetständer platziert und sobald die Lösung klar war, wurde der Überstand entfernt. Es wurden wieder 220 µl EtOH 80 % hinzugefügt, das Mikroreaktionsgefäß wurde dreimal auf dem Magnetständer rotiert und nach einer Minute wurde der Überstand entfernt. Der gesamte Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt, sodass insgesamt vier Waschschriffe während dieser Aufreinigung erfolgten.

Nach dem vierten Waschschrift wurden die Beads wieder getrocknet und, sobald das Ethanol komplett verdunstet war, in 12,4 µl Wasser eluiert. Dadurch wurde die DNA wieder von den Beads gelöst. Das Mikroreaktionsgefäß wurde auf den Magnetständer gestellt, um die im Wasser gelöste DNA von den Beads zu trennen. 10,4 µl DNA wurden dann in einen neuen PCR-Streifen übertragen. Damit war die Aufreinigung abgeschlossen und es konnte mit dem SPE Target Enrichment fortgefahren werden.

3.5.3.6 SPE-Target-Enrichment

Für die SPE-Target-Enrichment-PCR wurde ein Mastermix angesetzt. Dazu wurden pro Probe 4 µl TEPCR-Puffer (5x), 4 µl QIAseq RNA Fusion XP Panel, 0,8 µl IL-Forward Primer

und 0,8 µl HotStarTaq-DNA-Polymerase eingesetzt. Es wurde erneut pro Reagenz ein um 10 % höheres Volumen gewählt. 10,4 µl Probe wurden mit 9,6 µl Mastermix gemischt und anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die PCR gemäß den Einstellungen aus Tabelle 15. Nach der PCR wurden die Proben vor der zweiten Aufreinigung im Kühlblock gelagert.

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die SPE-Target-Enrichment-PCR

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler				
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
SPE Target Enrichment	Probe DNA (aufgereinigt)	10,4	1	1	95	13	103
	TEPCR-Puffer, 5x	4	2	8	98	0,25	
	QIAseq RNA Fusion XP Panel	4	3	1	72	2	
	IL-Forward Primer	0,8			4	halten	
	HotStarTaq DNA Polymerase	0,8					
	Total	20					

3.5.3.7 Aufreinigung 2

Nachdem die SPE-Target-Enrichment-PCR beendet war, erfolgte sofort die zweite Aufreinigung. Im Gegensatz zur ersten Aufreinigung bestand die zweite Aufreinigung nur aus zwei anstatt aus vier Waschschritten. Diese zwei Waschschrritte waren identisch zu den ersten beiden Schritten aus der ersten Aufreinigung.

Zunächst wurden im PCR-Streifen die 20 µl mit der Probe aus der vorherigen PCR mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Die 50 µl wurden in ein 1,5 µl Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 55 µl QIAseq Beads durch Pipettieren gemixt.

Ab jetzt erfolgten die Waschschrritte nach dem Programm aus der ersten Aufreinigung: Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurden die Proben auf einem Magnetständer platziert. Sobald die Lösung klar war, konnte der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen werden.

Im ersten Waschschrritt wurden 220 µl EtOH 80 % hinzugefügt und anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß dreimal auf dem Magnetständer rotiert, um so die Beads durch das

EtOH zu waschen. Danach wurde eine Minute gewartet und das EtOH wieder entfernt und verworfen. Dieser Waschschrift erfolgte darauf ein zweites Mal. Nachdem auch hier das EtOH wieder verworfen worden ist, wurden die Beads solange getrocknet, bis Risse sichtbar waren.

Dann wurden die Beads in 15,4 µl sterilem Wasser eluiert und auf den Magnetständer gegeben. Nachdem die DNA von den Beads separiert worden ist, wurden 13,4 µl eluierte DNA in einen neuen PCR-Streifen überführt.

3.5.3.8 Universal-PCR-Amplifikation

Für die Universal-PCR-Amplifikation wurde ein Mastermix aus 4 µl RNA-Puffer II (5x), 1,8 µl Nuklease-freiem Wasser und 0,8 µl TaqIt Plus Enzym pro Probe erstellt. 13,4 µl Probe wurden mit 6,6 µl Mastermix versetzt und durch Pipettieren gemischt. Nun mussten für die PCR noch die lyophilisierten UDI Index Primer hinzugefügt werden. Der UDI Index Primer musste zu dem jeweiligen Adapter aus der Adapter Ligation passen. Um den lyophilisierten UDI Index Primer zu lösen, wurde die Probe mit dem Mastermix zu dem jeweils passenden Primer pipettiert und dadurch gelöst. Anschließend wurde das gesamte Volumen, welches nun auch den UDI Index Primer enthielt, in einen neuen PCR-Streifen gegeben und kurz anzentrifugiert. Dann erfolgte die PCR nach den Einstellungen aus Tabelle 16. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben vor der dritten Aufreinigung im Kühlblock gelagert.

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Universal-PCR

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler				
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
Universal-PCR	Probe DNA (aufgereinigt)	13,4	1	1	95	2	103
	RNA-Puffer II, 5x	4	2	28	95	0,25	
	Nuklease-freies Wasser	1,8			60	1	
	TaqIt Plus Enzym	0,8	3	1	72	1	
	Total	20			4	halten	

3.5.3.9 Aufreinigung 3

Direkt im Anschluss an die Universal-PCR erfolgte die dritte und letzte Aufreinigung. Diese war identisch zur zweiten Aufreinigung, weshalb diese hier nicht nochmal explizit erläutert ist.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads in 25 µl sterilem Wasser eluiert und auf den Magnetständer gegeben. Nachdem die DNA von den Beads separiert worden war, wurden 21 µl eluierte DNA in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt.

Damit war die DNA-Bibliothek fertig erstellt. Die DNA-Bibliothek wurde bis zur Sequenzierung bei - 20 °C gelagert.

3.5.4 Messung der finalen Konzentrationen und Fragmentlängen

Bevor mit der Vorbereitung zur Sequenzierung begonnen werden konnte, erfolgte eine Qualitätskontrolle, bei der die finalen Konzentrationen und die Fragmentlängen der DNA-Fragmente in den Proben gemessen wurden. Dies war notwendig, um die für die Sequenzierung einzusetzende DNA-Menge zu bestimmen.

Die Messung der finalen Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit von ThermoFisher. Dazu wurden zunächst die beiden Standards vorbereitet. In zwei 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße wurden je 190 µl dsDNA HS Assay vorgelegt. Dazu wurden jeweils 10 µl Qubit Standard gegeben, und zwar einmal Standard S1 und einmal Standard S2. Anschließend wurden pro Probe 198 µl dsDNA HS Assay in ein 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und mit 2 µl Probe versetzt. Nun wurden die beiden Standards und die Proben gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die DNA-Messung auf dem Qubit Fluorometer erfolgen.

Die Fragmentlängenanalyse erfolgte auf dem QIAxcel Advanced mit den entsprechenden Reagenzien des QIAxcel DNA High-Sensitivity Kit von Qiagen. Hierzu wurden in einem 12er PCR-Streifen zunächst 8 µl QIAxcel Dilution Puffer vorgelegt. Dazu wurden 2 µl Probe gegeben. Wurden weniger als 12 Proben in einem Lauf gemessen, wurden die Wells im Streifen, die keine Probe enthielten, mit 10 µl QIAxcel Dilution Puffer befüllt. Danach wurde der QIAxcel beladen. Der QIAxcel wurde zuvor schon mit dem Alignment Marker und dem Size Marker, die zur Kalibrierung bzw. als Referenz dienten, sowie mit QX Waschpuffer und QX Separation-Puffer beladen. Nun konnte die Messung der Fragmentlängen erfolgen.

3.5.5 Vorbereitung und Start der Sequenzierung

Zur Vorbereitung auf die Sequenzierung wurden alle Proben nach Bestimmung der finalen Konzentrationen und Fragmentlängen mit Nuklease-freiem Wasser auf je 4 nM verdünnt, gevortext und runterzentrifugiert. Im Anschluss daran konnten die verdünnten DNA-Bibliotheken für die Sequenzierung zusammengegeben werden. Dieser Schritt wird als Pooling bezeichnet. Durch die individuellen Barcodes konnten die Proben weiterhin auseinandergehalten werden, obwohl sich nun alle Proben in einem Reagenz befanden. Nachdem 20 µl der gepoolten Bibliotheken mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser auf 2 nM verdünnt worden waren, erfolgte die Denaturierung der DNA, um diese für die Sequenzierung zugänglich zu machen. Dazu wurden 10 µl der 2 nM gepoolten Bibliotheken mit 10 µl 200 mM NaOH versetzt, gevortext, für 45 Sekunden bei 0,8 rpm zentrifugiert und schließlich für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Denaturierung gestoppt, indem 10 µl 200 mM Tris-HCl hinzugegeben, erneut gevortext und für 45 Sekunden bei 0,8 rpm zentrifugiert wurde.

Ab diesem Schritt wurden die denaturierten DNA-Bibliotheken im Kühlblock weiterverarbeitet, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern.

Es erfolgten mehrere Verdünnungen mit HT1-Puffer aus dem NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 von Promega, um die denaturierte DNA auf die finale Konzentration von 0,6 pM zu verdünnen.

Die Verdünnungen wurden wie folgt durchgeführt: Zunächst erfolgte eine Verdünnung auf 20 pM, indem 30 µl denaturierte DNA mit 970 µl HT1 versetzt wurde. Dann wurde 500 µl 20 pM denaturierte DNA mit 500 µl HT1 auf 10 pM verdünnt, davon 100 µl mit 900 µl HT1 auf 1 pM verdünnt und schließlich 900 µl 1 pM denaturierte DNA mit 600 µl HT1 auf 0,6 pM verdünnt.

Nun konnte die eigentliche Beladung des NextSeq-550-Sequencers erfolgen. Dafür wurde die zum Sequencer passende Reagenzienkartusche, eine Pufferkartusche und eine Flow Cell benötigt, welche im NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 von Promega enthalten waren. Die Reagenzienkartusche beinhaltet verschiedene für die Sequenzierung relevante Reagenzien und besitzt sowohl einen Behälter für die gepoolten und denaturierten DNA-Bibliotheken, als auch einen Behälter für den benötigten Primer. Die Pufferkartusche enthält verschiedene Waschpuffer bzw. -lösungen. Auf der Flow Cell findet die Sequenzierung statt. Die Kartusche des NextSeq 550, die bei - 25 °C gelagert wurde, wurde

eine Stunde im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und ab 30 min. vor der Sequenzierung bei Raumtemperatur außerhalb des Wasserbads gelagert. Die Flow Cell wurde bei 4 °C gelagert und wurde ebenfalls ab 30 min. vor der Sequenzierung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Reagenzienkartusche wurde mit 2 ml 0,3 µM QIAseq Read 1 Custom Primer I aus dem QIAseq 96-Unique Dual Index Set A (384) von Qiagen und mit 1,3 ml der gepoolten und denaturierten DNA-Bibliotheken jeweils an der dafür vorgesehenen Position befüllt.

Nun wurde die Reagenzien- und die Pufferkartusche, sowie die Flow Cell in den Sequencer geladen.

Es wurde eine Paired-End-Sequenzierung mit einer Read-Länge von 2 x 149 Basenpaaren durchgeführt. Die Verarbeitung und Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mit Hilfe der Software CLC Genomics Workbench 22.

3.6 Genexpressionsanalyse

Nach Auswertung aller Sequenzierdaten wurde die Genexpression in MSI-Tumoren mit *NTRK*-Genfusion im Vergleich zu MSI-Tumoren ohne *NTRK*-Genfusion analysiert. Dies erfolgte mittels der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) von Qiagen, welche die Sequenzierdaten aus der CLC Genomics Workbench nutzte. Es wurde die Genexpression von insgesamt 54309 Genen analysiert. Nach dem Herausfiltern von ausschließlich proteincodierenden Genen verblieben 19834 Gene. Da nur statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression mit einem p-Wert $\leq 0,05$ relevant waren, blieben 187 Gene übrig. Zuletzt wurde ein Unterschied in der Genexpression in den beiden Gruppen nur als relevant angesehen, wenn die Genexpression in einer Gruppe mindestens um das Doppelte erhöht bzw. mindestens um die Hälfte erniedrigt war. Dies entspricht einer \log_2 FoldChange von ≥ 1 bzw. ≤ -1 . Somit blieben schließlich 178 relevante Gene übrig, deren Expression innerhalb der beiden Gruppen verglichen wurde.

3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden die Reagenzien des ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit von Zytovision genutzt. Nicht in diesem Kit enthaltene

Reagenzien sind unter „3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Nukleotide und Beads“ expliziert aufgeführt. Zuerst wurde von dem FFPE-Gewebeblock ein Schnitt von 3 µm Dicke angefertigt und auf einen Objektträger gezogen. Das Präparat wurde über Nacht bei 60 °C im Ofen inkubiert. Dann erfolgte die Entparaffinierung des Gewebes. Dazu wurde das Präparat für 2 x 10 min. in 100 % Clearene inkubiert und über eine absteigende Alkoholreihe in destilliertes Wasser überführt. Das Präparat wurde in einer Plastikkuvette mit Heat Pretreatment Solution verschlossen und für 20 min. bei 96 °C im Wasserbad inkubiert. Vor dem Pepsin-Verdau wurde das Präparat für 3 min. erneut in destilliertes Wasser platziert. Durch den Pepsin-Verdau wurden die Zellen auf dem Schnitt zersetzt und für die DNA zugänglich gemacht. Dazu wurde auf das Präparat Pepsin getropft und auf dem Gewebe verteilt. Dann erfolgte der Verdau für 15 min. bei 37 °C im Thermobrite.

Der Verdau wurde anschließend durch 100 % Ethanol gestoppt und in 2x SSC-Waschpuffer bei Raumtemperatur für 5 min. gewaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Fixierung des Gewebes. Dazu wurden zuerst 20 ml Formaldehyd 37 % mit 180 ml phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS-Puffer, 10x) gemischt. Der PBS-Puffer bestand aus 87,5 g NaCl, 2,75 g KH₂PO₄ und 2 g KCl aufgefüllt mit 1000 ml destilliertem Wasser. Dann wurde das Präparat für 10 min. in das gepufferte Formaldehyd gegeben, anschließend 10 min. in 2x SSC-Waschpuffer gewaschen und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Nachdem das Präparat getrocknet war, wurde mit einem Diamantstift auf der Rückseite des Objektträgers der Tumorbereich eingekratzt, um diesen später unter dem Mikroskop besser lokalisieren zu können.

Nun erfolgte die Hybridisierung der Sonde. Bei dieser Arbeit kamen die NTRK1-Sonde (Zytolight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe von Zytovision), die NTRK2-Sonde (Zytolight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe von Zytovision), die NTRK3-Sonde (Zytolight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe von Zytovision) und die ALK-Sonde (SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe von Zytovision) zum Einsatz. Die jeweilige Sonde wurde unverdünnt auf das Präparat getropft, mit einem Deckgläschen versehen und mit Fixogum versiegelt. Dann erfolgte auf dem Thermobrite zuerst die Denaturierung bei 76 °C für 10 min. und danach die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Am nächsten Tag erfolgte ein letzter Waschschrift. Dazu wurde das Fixogum und das Deckgläschen vom Präparat entfernt und das Präparat in eine Kuvette mit 25x Waschpuffer A gegeben. Nun wurde die Kuvette für 2 x 5 min. bei 37 °C in das Wasserbad gestellt.

Zuletzt wurde das Präparat durch eine weitere aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit 10 µl DAPI Ultra zur Gegenfärbung und einem Deckgläschen versehen.

Danach wurde das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Auswertung der FISH erfolgte mit Hilfe der Software von BioView. Es wurden mindestens 100 Zellen aus verschiedenen Bereichen des Tumors untersucht. Das Signal der Sonde war proximal des jeweiligen Gens grün und distal des Gens orange. Bei einer normalen Zelle ohne Genfusion waren deshalb zwei grün-orange Signale zu erkennen. Eine Zelle mit Genfusion wies entweder ein separates grünes und ein separates oranges Signal auf oder nur ein einzelnes oranges Signal. Letzteres beruhte auf einer Deletion proximal der Bruchstelle oder einer unbalancierten Translokation. Ein grün-oranges Signal galt als separiert, wenn mehr als eine Signalstärke Abstand zwischen dem grünen und dem orangen Signal vorlag. Wiesen von den mindestens 100 untersuchten Zellen über 10 % eine Genfusion auf, so wurde das Präparat als positiv hinsichtlich einer Genfusion gewertet. [117]

3.8 Pyrosequenzierung

Das *MLH1*-Gen ist bei sporadischen Kolonkarzinomen durch eine Methylierung des *MLH1*-Promotors inaktiviert. Durch die Pyrosequenzierung kann ermittelt werden, ob der *MLH1*-Promotor methyliert ist. Vor der Sequenzierung muss die DNA präpariert werden. Als erstes wird die Bisulfit-Konvertierung durchgeführt. Durch diese wird unmethyliertes Cytosin in der DNA in Uracil umgewandelt, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Das Uracil wird in der anschließenden PCR durch Thymin ersetzt. Nun wird eine bestimmte Sequenz des *MLH1*-Promotors sequenziert und mit der normalen Sequenz des Promotors verglichen. Da unmethyliertes Cytosin durch Thymin ersetzt wurde, wird an diesen Stellen kein Cytosin detektiert. Wird dennoch Cytosin detektiert, so muss es sich um methyliertes Cytosin handeln, da dieses unverändert geblieben ist. [118]

3.8.1 DNA-Isolierung

Für die Bestimmung des *MLH1*-Promotors mittels Pyrosequenzierung musste zunächst die DNA des Probanden gewonnen werden. Dazu wurden - wie auch schon bei der RNA-Isolierung - von jedem FFPE-Gewebeblock am Mikrotom unter RNase-freien Bedingungen

6 - 8 Schnitte à 10 µm Dicke angefertigt und auf Adhäsions-Objektträgern, welche mit Nuklease-freiem Wasser benetzt wurden und sich auf einer 50 °C warmen Heizplatte befanden, entfaltet. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Für die weiteren Schritte wurde mit dem Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit von Promega gearbeitet. Das Tumorgewebe wurde von jedem der 6 - 8 Objektträger mit einem sterilen Skalpell heruntergekratzt und in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) mit bereits vorgelegten 180 µl Inkubationspuffer gegeben. Für den Zellverdau wurden 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Danach wurde die Probe über Nacht bei 70 °C im Heizblock bei 400 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 400 µl Lyse-Puffer zu der Probe gegeben und anschließend wurde die Probe in den Maxwell überführt. Nach der DNA-Isolierung im Maxwell wurde das Isolat anzentrifugiert und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

3.8.2 Messung der Konzentration der DNA

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des QuantiFluor ONE dsDNA System von Promega. Dabei wurden 199 µl QuantiFluor ONE dsDNA Dye mit 1 µl Probe-DNA versetzt, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte die Messung mit dem Quantus Fluorometer. Der Standard hatte eine Konzentration von 400 ng/µl.

3.8.3 Bisulfitkonvertierung

Die DNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 15 ng/µl verdünnt und 20 µl verdünnte DNA wurden in einen PCR-Streifen vorgelegt. Alle für die Bisulfitkonvertierung benötigten Reagenzien mit Ausnahme des Ethanol waren im EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit von Qiagen enthalten. Ebenfalls im Kit enthalten waren die Waschsäulen und Auffangröhrchen. Zuerst wurde ein Mastermix hergestellt, der pro Probe 85 µl Bisulfite Mix und 35 µl DNA Protect Puffer enthielt. Zu jeder vorgelegten Probe wurden 120 µl Mastermix in den PCR-Streifen pipettiert und gemischt. Dann erfolgte die PCR im Thermocycler mit dem Programm aus Tabelle 17.

Tabelle 17: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die Bisulfitkonvertierung

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler			
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Temp. (°C)	Zeit (min.)	Temp. Deckel (°C)
Bisulfit-Konvertierung	Probe DNA	20	1	95	5	99
	Bisulfite Mix	85	2	60	10	
	DNA Protect Puffer	35	3	95	5	
	Total	140	4	60	10	
			5	20	halten	

Nach der Konvertierung im Thermocycler wurde die DNA aufgereinigt. Hierfür wurde die DNA an die Membran einer Waschsäule gebunden und mit verschiedenen Puffern bearbeitet.

Dazu wurde die Probe zuerst in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Zu jeder Probe wurden 310 µl BL-Puffer und 3,1 µl Carrier-RNA pipettiert, damit die DNA später besser an die Membran der Waschsäule binden konnte. Der Ansatz wurde gevortext und anzentrifugiert und danach wurden 250 µl 100 % Ethanol dazugegeben. Dieses Mal wurde der Ansatz für 15 Sekunden pulsartig gevortext und anzentrifugiert.

Nun wurde zuerst eine Waschsäule in ein passendes Auffangröhrchen gesteckt. Danach wurde der gesamte Ansatz aus dem Mikroreaktionsgefäß auf die Waschsäule pipettiert und für 1 min. bei 15000 g zentrifugiert. Der Durchfluss im Auffangröhrchen wurde verworfen und die Waschsäule wieder in das Auffangröhrchen gesteckt.

Nun erfolgten mehrere Schritte, bei denen jeweils ein Puffer auf die Waschsäule gegeben, die Säule 1 min. bei 15000 g zentrifugiert und der Durchfluss danach verworfen wurde.

Als Erstes wurden 500 µl BW-Puffer auf die Waschsäule gegeben. Dieser entfernte die verbliebene Bisulfit-Lösung von der DNA. Die Waschsäule wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Als Zweites wurden 500 µl BD-Puffer auf die Waschsäule gegeben und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Waschsäule zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Im dritten Schritt wurden wieder 500 µl BW-Puffer auf die Waschsäule gegeben, die Waschsäule zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Als Letztes wurden 250 µl 100 % Ethanol auf die Waschsäule gegeben. Die Waschsäule wurde zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und danach wurde die Waschsäule für 5 min. bei 60 °C in den Heizblock gestellt. Dadurch wurden verbliebene Reste an Ethanol entfernt.

Die Waschsäule wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) gesteckt und 15 µl EB-Puffer wurden auf das Zentrum der Membran in der Waschsäule pipettiert. Der EB-Puffer wurde 1 min. inkubiert, damit die DNA wieder von der Membran gelöst wurde. Die Waschsäule wurde dann für 1 min. bei 15000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Waschsäule verworfen und der Durchfluss im Mikroreaktionsgefäß enthielt nun die aufgereinigte DNA, welche danach für die PCR verwendet werden konnte.

3.8.4 *MLH1*-PCR

Bei dieser PCR wurde wie auch bei Pineda, Mur et al. die Sequenz des C-Bereichs vom *MLH1*-Promotor vervielfältigt [119]. Es wurde der *MLH1*-SL386-Forward- und Reverse-Primer verwendet.

Zuerst wurde ein Mastermix angesetzt, der pro Probe 7,8 µl Nuklease-freies Wasser, 5 µl 5x GoTaq Amplifikation-Puffer, 1,5 µl 10x Coral Load, 3,5 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10x *MLH1*-SL386-Forward- und Reverse-Primer und 0,2 µl GoTaq DNA-Polymerase G2 enthielt.

Danach wurden 20 µl Mastermix in einen PCR-Streifen mit 5 µl bisulfitkonvertierter Probe-DNA gegeben und gemischt. Zusätzlich wurden 20 µl Mastermix zu jeweils 5 µl einer Negativ- und einer Positivkontrolle in den PCR-Streifen pipettiert. Nun erfolgte die PCR mit dem Protokoll aus Tabelle 18.

Tabelle 18: Verbrauchsmaterialien und Thermocycler-Einstellungen für die *MLH1*-PCR

Schritt	Mastermix (pro Probe)		Cycler				
	Reagenz	Vol. (µl)	Schritt	Zyklen	Temp. (°C)	Zeit	Temp. Deckel (°C)
MLH1-PCR	Probe DNA (bisulfitkonvertiert)	5	1	1	95	3 min.	99
	Nuklease-freies Wasser	7,8	2	40	95	40 sek.	
	5x GoTaq Amplifikation-Puffer	5			54	40 sek.	
	10x Coral Load	1,5	3	1	72	5 min.	
	Magnesiumchlorid (25 mM)	3,5	4	1	15	halten	
	dNTPs (10 mM)	1					
	10x MLH1-SL386-Forward- und Reverse-Primer	1					
	GoTaq DNA-Polymerase G2	0,2					
	Total	25					

3.8.5 Pyrosequenzierung mit Vorbereitung und Auswertung

Nach der *MLH1*-PCR konnte die Pyrosequenzierung vorbereitet werden. Zuerst musste das PCR-Produkt an Sepharose-Beads gekoppelt werden. Dazu wurde pro Probe ein Binding Mix aus 1 µl Sepharose-Beads, 40 µl Binding-Puffer und 31 µl destilliertem Wasser hergestellt. 72 µl Binding Mix wurden mit 8 µl PCR-Produkt in einer Mikrotiterplatte gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min. im Heizblock bei Raumtemperatur und 1400 rpm geschüttelt.

Die Kartusche mit den Reagenzien für den Sequencer aus dem PyroMark Gold Q24 Reagents Kit von Qiagen wurde im Sequencer platziert.

Als nächstes wurde die Sequenzierplatte vorbereitet. Dazu wurden pro Probe 25 µl MLH1-SL386-Sequenzierprimer vorgelegt. Die Mikrotiterplatte mit dem PCR-Produkt und die Sequenzierplatte wurden in der PyroMark Q24 Workstation platziert. In dieser wurden die Beads mit dem PCR-Produkt in Ethanol, Denaturation Solution und Wash Buffer gewaschen und anschließend auf die Sequenzierplatte überführt.

Nun wurde die Primerhybridisierung für 2 min. bei 80 °C auf der Heizplatte durchgeführt. Danach kühlte die Sequenzierplatte für 15 min. bei Raumtemperatur ab. Schließlich wurde die Sequenzierplatte in den Sequencer geladen und die Sequenzierung gestartet. Es wurde folgende DNA-Sequenz analysiert:

GAGYGGATAGYGATTTTTAAYGYGTAAGYGTATATTTTTTTAGGTAG

Nach Abschluss der Sequenzierung wurde der Lauf mit Hilfe des Programms PyroMarkQ24 ausgewertet. Wenn in allen 5 CpG-Inseln des *MLH1*-Promotors methyliertes Cytosin einen Anteil von mehr als 10 % ausmachte, wurde der Promotor als methyliert gewertet.

3.9 Statistik

Für die Verwaltung der bereits vorliegenden und der erhobenen Daten wurde das Programm Microsoft Excel 2016 verwendet. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit R 4.2.1, R-Studio 2022.02.3 und SPSS Statistics 29. Die Unabhängigkeit von zwei kategorialen Variablen wurde mit Hilfe des Fisher's-Exact-Tests überprüft. Dieser wurde dem Chi-Quadrat-Test vorgezogen, da nicht alle zu erwarteten Häufigkeiten > 5 waren [120].

Die Analyse der Überlebenszeit und der rezidivfreien Zeit wurde mit dem Kaplan-Meier-Schätzer bestimmt. Als Hypothesentest wurde danach der Log-Rank-Test angewandt. Die deskriptive Statistik der Auswertung der CD3-, CD4- und CD8-IHC erfolgte unter Berechnung des Mittelwerts, des Medians, des Minimums, des Maximums und des Interquartilsabstands. Für die visuelle Darstellung wurden Boxplots erstellt. Die Korrelation zwischen den TIL-Subgruppen (CD3⁺/CD4⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ bzw. CD4⁺/CD8⁺) wurde mit Hilfe des Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt.

Für den Fisher's Exact-Test, den Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten und für den Log-Rank-Test wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 *NTRK*-Genfusionen

4.1.1 Detektion von *NTRK*-Genfusionen

Für die Detektion von *NTRK*-Genfusionen wurde eine pan-TRK-IHC bei 411 MSI-high-Kolonkarzinomen und bei 98 MSS-Kolonkarzinomen durchgeführt. Von den 411 MSI-high-Tumoren zeigten 13 Tumore (3,16 %) eine zytoplasmatische Färbung, welche als pan-TRK-positiv bewertet wurde. In allen Fällen war der Großteil aller Tumorzellen angefärbt und es erschien ein homogenes Verteilungsmuster der gefärbten Zellen innerhalb des Tumors.

Die Intensität der Färbung wurde bei 3/13 Tumoren (23,08 %) als leicht und bei 10/13 Tumoren (76,92 %) als stark eingestuft.

Abbildung 5 zeigt einen Tumor mit leicht positiver pan-TRK-Färbung und Abbildung 6 einen Tumor mit stark positiver pan-TRK-Färbung.

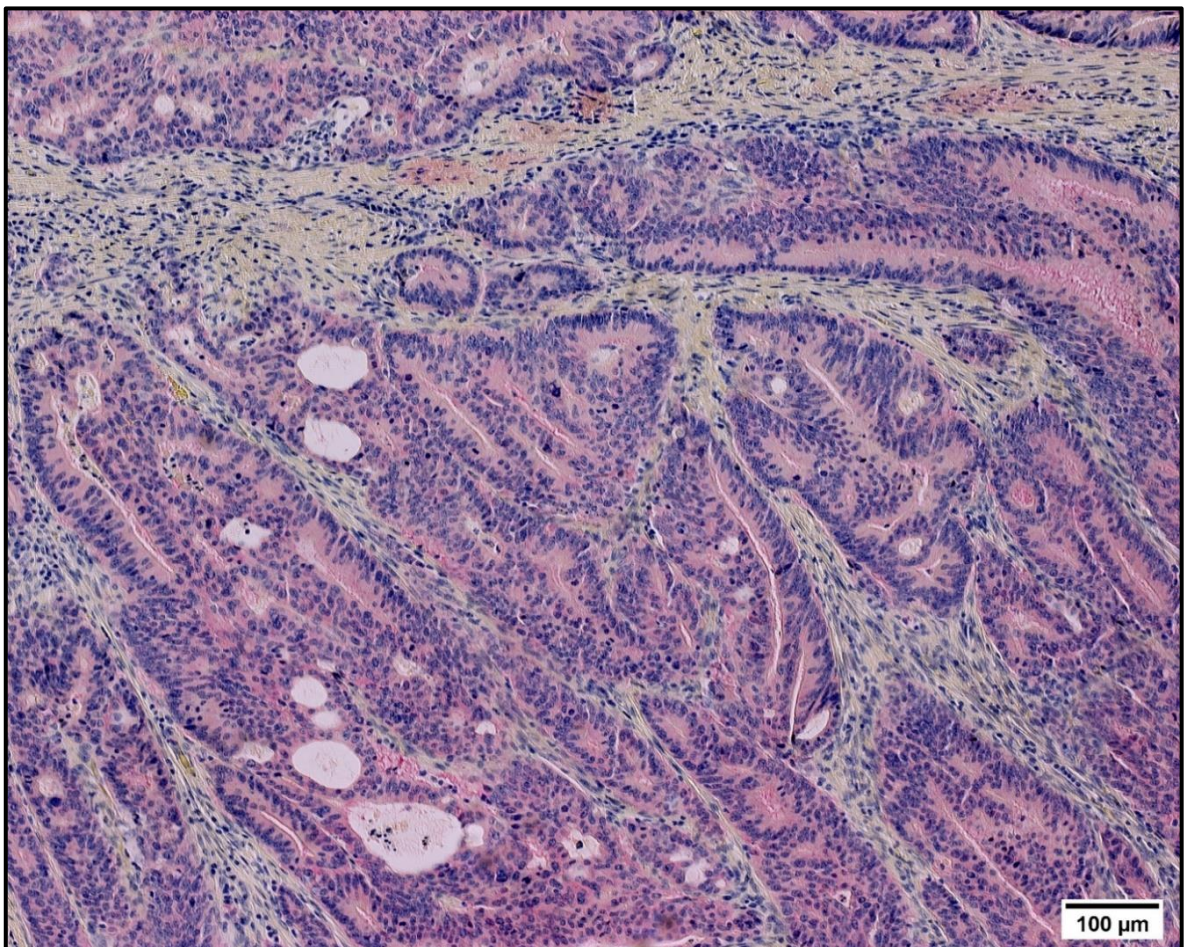


Abbildung 5: Leicht positive pan-TRK-Färbung eines Adenokarzinoms des Kolons

Die Abbildung zeigt die leichtgradige, zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen, während das umgebende Stroma nicht gefärbt ist. Pan-TRK-IHC des Patienten 54/N0094 mit einer *EML4-NTRK3*-Fusion

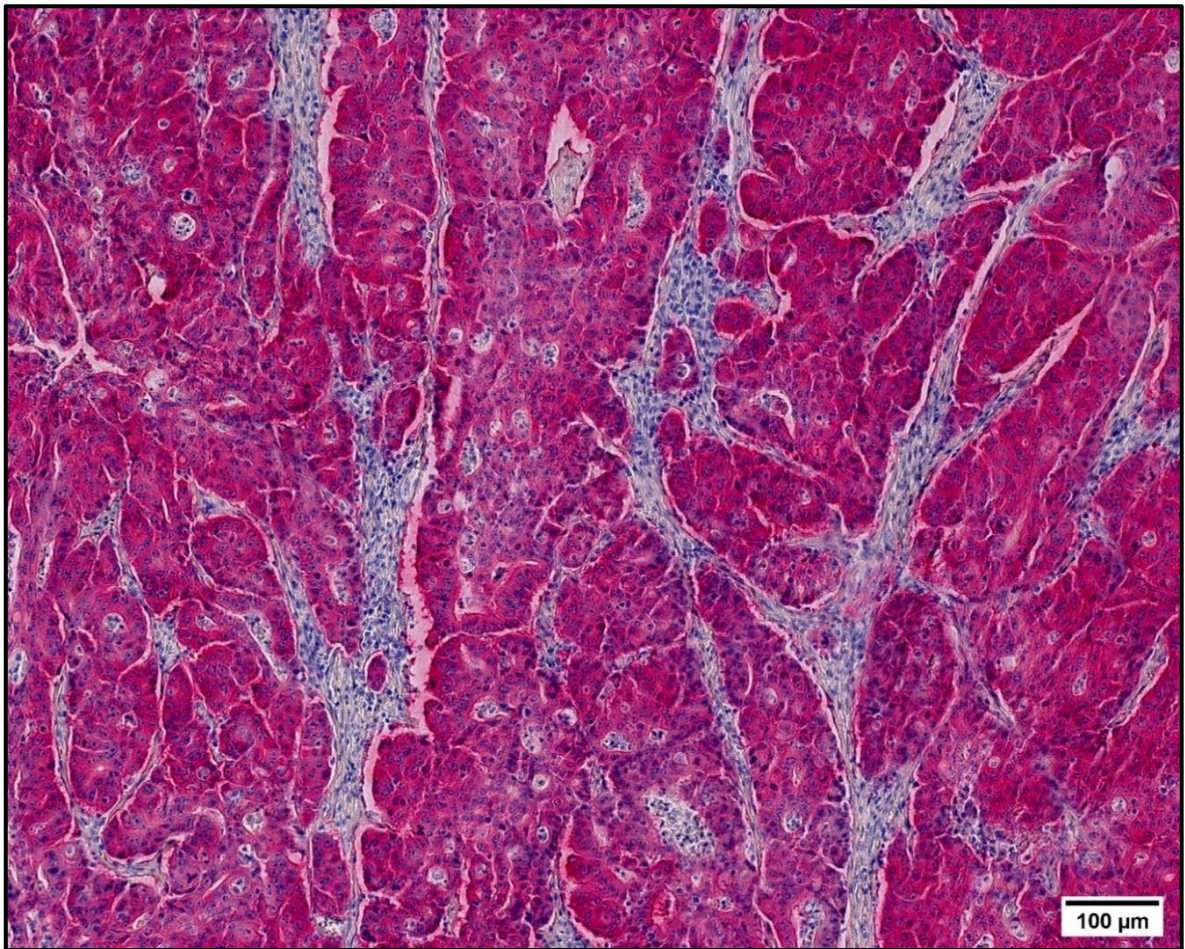


Abbildung 6: Stark positive pan-TRK-Färbung eines Adenokarzinoms des Kolons

Die Abbildung zeigt die starke, zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen, während das umgebende Stroma nicht gefärbt ist. Pan-TRK-IHC des Patienten 17/F0027 mit einer *LMNA-NTRK1*-Fusion

Von den 98 MSS-Tumoren zeigte kein Tumor eine zytoplasmatische, membranöse oder nukleäre Färbung, sodass alle MSS-Tumoren als pan-TRK-negativ beurteilt wurden.

Bei den 13 pan-TRK-positiven Tumoren wurde eine RNA-Sequenzierung mittels NGS durchgeführt, um die *NTRK*-Fusion zu bestätigen und den Fusionspartner zu ermitteln. Hierbei wurde bei 12 von 13 Tumoren eine *NTRK*-Fusion detektiert.

In einem pan-TRK-positiven Tumor (Patient 136/B0007) konnte auch nach Wiederholung der Sequenzierung keine *NTRK*-Fusion detektiert werden, sodass in diesem Fall die FISH als dritte Methode durchgeführt wurde. Die FISH wurde für jedes der drei *NTRK*-Gene einzeln mit einer *NTRK1*-Sonde, einer *NTRK2*-Sonde und einer *NTRK3*-Sonde durchgeführt.

Bei der Auswertung der *NTRK1*-Sonde wurden insgesamt 190 Zellen ausgezählt. Von denen wiesen 18 Zellen (9,47 %) einen chromosomalen Bruch des *NTRK1*-Gens auf, während 172

Zellen (90,53 %) keinen chromosomalen Bruch zeigten. Damit ein Tumor als Fusions-positiv eingestuft wurde, mussten mindestens 10 % der Tumorzellen einen chromosomalen Bruch aufweisen. Da bei der *NTRK1*-Sonde trotz Erhöhung der Stichprobe von 100 auf 190 Zellen mit 9,47 % positiven Tumorzellen der Grenzwert von 10 % nicht erreicht wurde, wurde der Tumor als *NTRK1*-negativ gewertet. Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine Aufnahme der *NTRK1*-FISH, welche sowohl Zellen mit als auch ohne chromosomalen Bruch des *NTRK1*-Gens aufweist. Abbildung 8 zeigt die pan-TRK-IHC dieses Tumors.

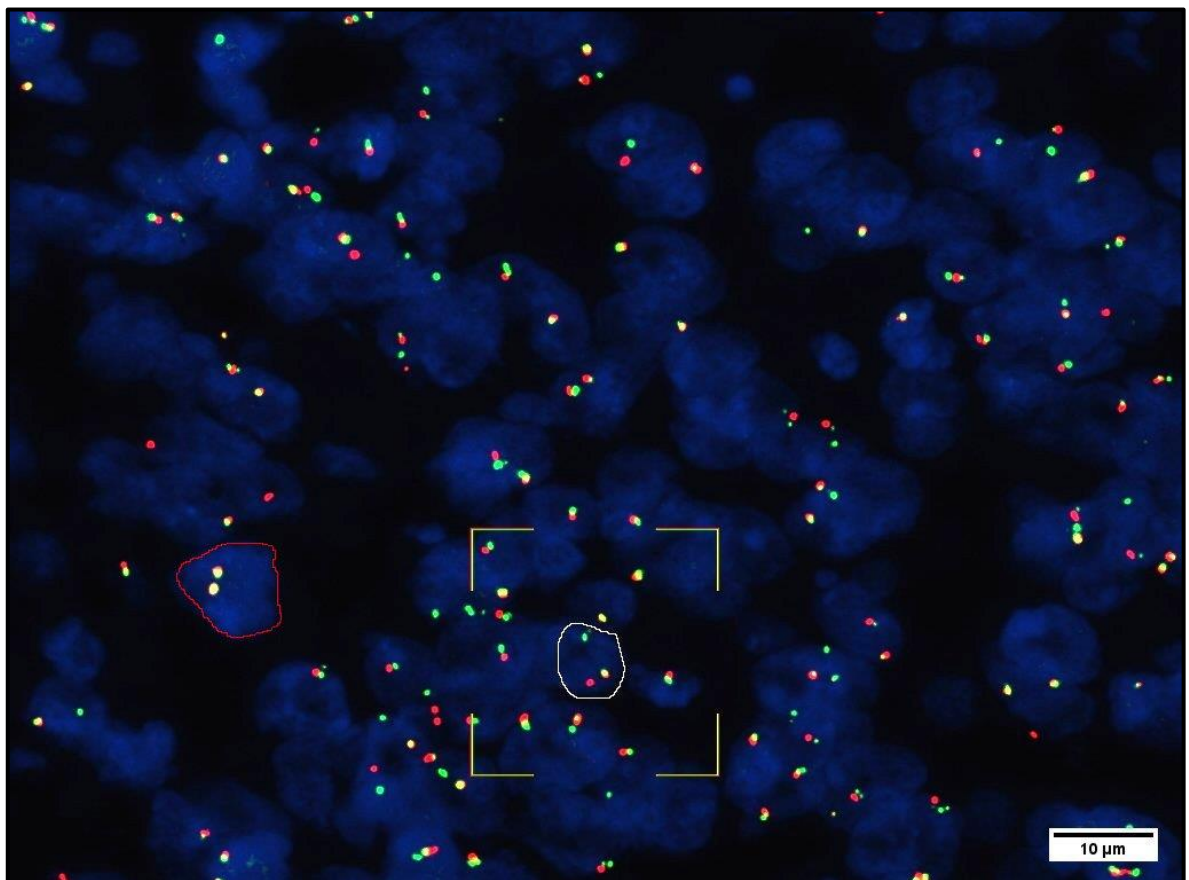


Abbildung 7: Tumorzelle mit chromosomalem Bruch des *NTRK1*-Gens in der FISH

Der gelbe Rahmen markiert den Bereich einer Tumorzelle (weißer Umriss), welche sowohl ein grün-oranges Signal als auch ein einzelnes oranges und ein einzelnes grünes Signal aufweist. Die beiden einzelnen Signale weisen einen Abstand von mehr als einer Signalstärke auf, weshalb in dieser Zelle ein chromosomaler Bruch des *NTRK1*-Gens vorliegt. Im Vergleich dazu weist die in Rot umrandete Zelle zwei grün-orange Signale auf. Die grün-orangen Signale entstehen dadurch, dass sich das Signal der proximalen Sonde des *NTRK1*-Gens mit dem Signal der distalen Sonde des *NTRK1*-Gens überlagert, weil kein chromosomaler Bruch des *NTRK1*-Gens in dieser Tumorzelle vorliegt.

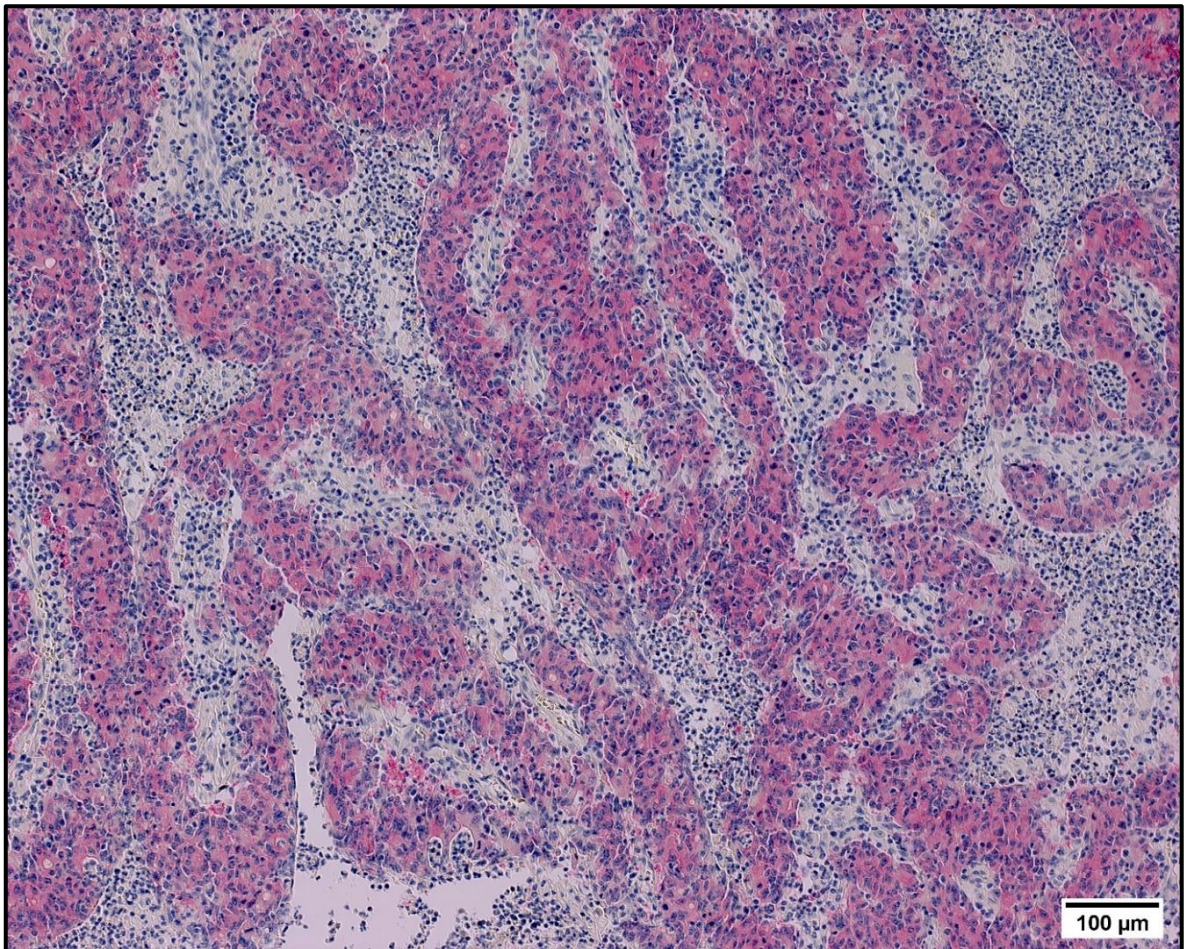


Abbildung 8: pan-TRK-IHC des Tumors von Patient 136/B0007

In der pan-TRK-IHC dieses Patienten ist eine positive zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen zu erkennen. In der FISH und in der RNA-Sequenzierung mittels NGS ließ sich keine *NTRK*-Fusion nachweisen.

Bei der *NTRK2*-Sonde wurden insgesamt 100 Zellen ausgezählt. Von denen wiesen alle 100 Zellen (100 %) keinen chromosomalen Bruch des *NTRK2*-Gens auf. Der Tumor wurde als *NTRK2*-negativ gewertet.

Bei der *NTRK3*-Sonde wurden insgesamt 112 Zellen ausgezählt. Von denen wiesen alle 112 Zellen (100 %) keinen chromosomalen Bruch des *NTRK3*-Gens auf. Der Tumor wurde als *NTRK3*-negativ gewertet.

Insgesamt konnte also in der FISH genauso wie bei der RNA-Sequenzierung keine Genfusion in einem der *NTRK*-Gene festgestellt werden, sodass der Tumor als negativ hinsichtlich einer *NTRK*-Fusion gewertet wurde. Das Ergebnis aus der pan-TRK-IHC wurde als falsch-positiv gewertet.

Von den 12 durch RNA-Sequenzierung bestätigten *NTRK*-Genfusionen waren 11 *NTRK1*-Fusionen und 1 *NTRK3*-Fusion. Von den 11 *NTRK1*-Fusionen gab es 5 *TPM3-NTRK1*-, 2 *LMNA-NTRK1*-, 1 *TPR-NTRK1*-, 1 *TFG-NTRK1*-, 1 *SCYL3-NTRK1*- und 1 *IRF2BP2-NTRK1*-

Fusionen. Die eine *NTRK3*-Fusion war eine *EML4-NTRK3*-Fusion. Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein Schema der *LMNA-NTRK1*-Fusion von Patient 17/F0027. Tabelle 19 zeigt die Daten der RNA-Sequenzierung. Dabei ist pro Fusionspartner das Gen, das Chromosom, auf dem das betroffene Gen liegt, das Exon innerhalb des betroffenen Gens und die exakte Position der Bruchstelle (Breakpoint) angegeben. Tabelle 20 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der pan-TRK-IHC, der RNA-Sequenzierung und der *NTRK*-FISH von den 13 pan-TRK-positiven Patienten.

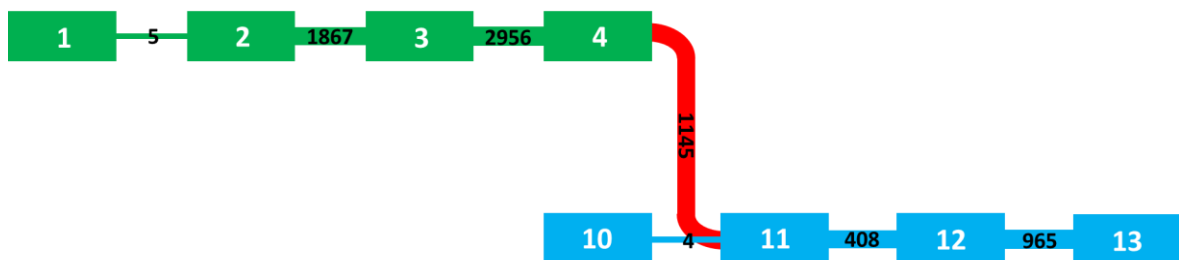


Abbildung 9: Schematische Darstellung der *LMNA-NTRK1*-Fusion von Patient 17/F0027

Die Abbildung zeigt einen schematischen Ausschnitt des *LMNA*-Gens (grün) und des *NTRK1*-Gens (blau). Die Kästen mit den weißen Zahlen kennzeichnen die Exons (*LMNA*-Gen: Exon 1 – 4 und *NTRK1*-Gen: Exon 10 – 13). Die schwarzen Zahlen kennzeichnen die Anzahl der Reads, welche angeben, wie oft die betreffende DNA-Sequenz detektiert wurde. Bei 1145 Reads folgte auf die Sequenz von Exon 4 des *LMNA*-Gens die Sequenz von Exon 11 des *NTRK1*-Gens (rote Markierung). An dieser Stelle sind die beiden Gene fusioniert. Abbildung modifiziert nach dem Fusionsreport der CLC Genomics Workbench von Qiagen.

Tabelle 19: Übersicht der RNA-Sequenzierung mittels NGS mit 12 detektierten *NTRK*-Fusionen

Chrom. = Chromosom

Patient	5'-Fusionspartner				3'-Fusionspartner			
	Gen	Chrom.	Exon	Breakpoint	Gen	Chrom.	Exon	Breakpoint
3/E0124	TPR	1	36	186.334.471	NTRK1	1	12	156.875.519
7/M0022	TFG	3	6	100.736.716	NTRK1	1	10	156.874.570
17/F0027	LMNA	1	4	156.134.975	NTRK1	1	11	156.874.905
33/W0046	LMNA	1	12	156.139.843	NTRK1	1	10	156.874.589
47/S0043	TPM3	1	7	154.170.399	NTRK1	1	10	156.874.570
49/W0010	IRF2BP2	1	1	234.608.494	NTRK1	1	10	156.874.570
52/R0026	TPM3	1	7	154.170.399	NTRK1	1	6	156.868.578
54/N0094	EML4	2	2	42.245.687	NTRK3	15	14	88.033.045
85/M0030	TPM3	1	7	154.170.399	NTRK1	1	10	156.874.570
140/L0009	TPM3	1	7	154.170.399	NTRK1	1	10	156.874.570
156/L0001	SCYL3	1	11	169.859.040	NTRK1	1	12	156.875.519
163/W0008	TPM3	1	7	154.170.399	NTRK1	1	10	156.874.570

Tabelle 20: Ergebnisse der pan-TRK-IHC, der RNA-Sequenzierung und NTRK-FISH der 13 pan-TRK-positiven Patienten
 Ein + bedeutet eine leicht positive pan-TRK-Färbung, ein ++ bedeutet eine stark positive pan-TRK-Färbung.

	Patient	pan-TRK-IHC	RNA-Sequenzierung	FISH
1	3/E0124	++	TPR-NTRK1	nicht durchgeführt
2	7/M0022	++	TFG-NTRK1	nicht durchgeführt
3	17/F0027	++	LMNA-NTRK1	nicht durchgeführt
4	33/W0046	++	LMNA-NTRK1	nicht durchgeführt
5	47/S0043	++	TPM3-NTRK1	nicht durchgeführt
6	49/W0010	++	IRF2BP2-NTRK1	nicht durchgeführt
7	52/R0026	++	TPM3-NTRK1	nicht durchgeführt
8	54/N0094	+	EML4-NTRK3	nicht durchgeführt
9	85/M0030	++	TPM3-NTRK1	nicht durchgeführt
10	136/B0007	+	negativ	negativ
11	140/L0009	++	TPM3-NTRK1	nicht durchgeführt
12	156/L0001	+	SCYL3-NTRK1	nicht durchgeführt
13	163/W0008	++	TPM3-NTRK1	nicht durchgeführt

Insgesamt konnten somit in 411 MSI-high-Tumoren 12 *NTRK*-Fusionen detektiert werden, was einem Anteil von 2,92 % entspricht.

4.1.2 Klinische und molekularpathologische Eigenschaften

Im Folgenden werden die klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften von Patienten mit MSI-high-Kolonkarzinomen und *NTRK*-Genfusion (*NTRK*-positive Kohorte) betrachtet und mit den Eigenschaften von Patienten mit MSI-high-Kolonkarzinomen ohne *NTRK*-Genfusion (*NTRK*-negative Kohorte) verglichen. Eine detaillierte Übersichtstabelle über die Eigenschaften der *NTRK*-positiven und *NTRK*-negativen MSI-high-Kohorte befindet sich im Anhang (A3).

In Tabelle 21 sind die klinischen und in Tabelle 22 die histologischen und molekularpathologischen Eigenschaften der Patienten mit *NTRK*-Fusion zusammengefasst.

Tabelle 21: Klinische Daten der 12 NTRK-positiven MSI-high-Patienten

m = männlich, w = weiblich, li. = links, re. = rechts, C. desc. = Colon descendens, C. sigm. = Colon sigmoideum, C. asc. = Colon ascendens, Lin. Flex. = Linke Colonflexur, RFS = relapse-free survival, OAS = overall survival

Patient	Geschlecht	Alter	T-Stadium	N-Stadium	UICC-Stadium	Lokalisation	Lokalisation führender Tumor	Zweitumor Darm	Weiterer Tumor	Rezidiv	Tod	RFS in Monaten	OAS in Monaten
156/L0001	w	76	T3	N0	IIa	li.	C. desc.	-	-	nein	nein	3	3
17/F0027	w	73	T3c	N1a	IIIb	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	35,1	35,1
3/E0124	m	81	T3	N0	IIa	li.	C. desc.	-	-	nein	ja	2,3	2,3
33/W0046	m	58	T3	N0	II	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	25,7	25,7
47/S0043	m	57	T3	N2a	IIIb	li.	Lin. Flex.	-	-	nein	ja	19,1	19,1
49/W0010	w	65	T3	N0	IIa	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	17	17
52/R0026	w	83	T3	N0	IIa	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	19,9	19,9
54/N0094	w	80	T1	N0	I	re.	C. asc.	-	-	nein	nein	12	12
7/M0022	w	65	T3	N0	IIa	li.	C. desc.	-	-	nein	nein	77,4	77,4
85/M0030	w	78	T4b	N1c	IIIc	re.	C. asc.	-	Mamma	nein	nein	10,3	10,3
140/L0009	m	63	T3	N0	IIa	li.	Lin. Flex.	-	-	ja	nein	2,7	6,8
163/W0008	m	73	T3	N0	IIa	li.	C. sigm.	-	Prostata	nein	nein	13,1	13,1

Tabelle 22: Histologische und molekularpathologische Eigenschaften der 12 NTRK-positiven MSI-high-Tumoren

wt = Wildtyp

Die Expression der 4 MMR-Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 wurde mittels Immunhistochemie bestimmt. Eine Expression in < 10 % der Tumorzellen wurde als Defekt angesehen.

Patient	Histologischer Subtyp	BRAF	KRAS	NRAS	PIK3CA	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
156/L0001	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
17/F0027	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
3/E0124	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
33/W0046	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
47/S0043	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
49/W0010	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
52/R0026	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
54/N0094	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
7/M0022	Adenokarzinom in tubulovillösem Adenom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
85/M0030	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
140/L0009	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
163/W0008	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt

Das Durchschnittsalter der *NTRK*-positiven Kohorte betrug 71 Jahre und lag somit nur geringfügig unter dem Durchschnittsalter von 72 Jahren in der *NTRK*-negativen Kohorte. Die Patienten mit *NTRK*-Fusion waren zwischen 57 und 83 Jahren alt. Das Geschlechterverhältnis der *NTRK*-positiven Kohorte war ausgeglichen. Von den 12 Patienten mit *NTRK*-Genfusion waren 7 (58,33 %) weiblich und 5 (41,67 %) männlich. Insgesamt wiesen 3,50 % der Männer und 2,62 % der Frauen mit MSI-high-Kolonkarzinomen eine *NTRK*-Genfusion auf. Dieses Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,760$).

NTRK-Genfusionen kamen in allen lokal begrenzten Tumorstadien nach UICC (I - III) vor. 1 von 12 (8,33 %) Tumoren mit *NTRK*-Fusion war im Stadium I. Dies entsprach 1,12 % aller MSI-high-Tumore mit dem Stadium I. Im Stadium II waren 8 von 12 (66,67 %) der *NTRK*-positiven Tumore und 4,76 % der MSI-high-Tumore im Stadium II hatten eine *NTRK*-Fusion. Im Stadium III waren 3 von 12 (25 %) der *NTRK*-positiven Tumore. Dies entsprach 1,95 % aller MSI-high-Tumore im Stadium III. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,224$).

Bei der Infiltrationstiefe des Tumors waren 10 von 12 (83,33 %) *NTRK*-positive Tumore im Stadium T3, während 1 *NTRK*-positiver Tumor (8,33 %) im Stadium T1 und 1 *NTRK*-positiver Tumor (8,33 %) im Stadium T4 war. 3,85 % der MSI-high-Tumore im Stadium T1 hatten eine *NTRK*-Fusion und 0,8 % der MSI-high-Tumore im Stadium T4 hatten eine *NTRK*-Fusion. Im Stadium T3 hatten 5,38 % der MSI-high-Tumore eine *NTRK*-Fusion. Dieses Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,066$).

Die meisten *NTRK*-positiven Tumore (9 von 12; 75 %) wiesen keine Lymphknotenmetastasen auf (Stadium N0). Von den 3 *NTRK*-positiven Tumoren mit Lymphknotenmetastasen waren 2 von 12 (16,67 %) im Stadium N1 und 1 von 12 (8,33 %) im Stadium N2. Es gab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,848$) zwischen den Lymphknotenstadien. 3,49 % der MSI-high-Tumore im Stadium N0 wiesen eine *NTRK*-Fusion auf, im Stadium N1 waren es 2,47 % und im Stadium N2 waren es 1,43 %.

NTRK-Fusionen in MSI-high-Tumoren traten signifikant häufiger im linksseitigen Kolon auf ($p < 0,001$). Von den 12 *NTRK*-positiven Tumoren waren 10 Tumore (83,33 %) im linksseitigen Kolon und 2 (16,67 %) im rechtsseitigen Kolon lokalisiert. Während *NTRK*-positive Tumore nur 0,6 % aller rechtsseitigen MSI-high-Kolonkarzinome ausmachten, waren es 12,66 % aller linksseitigen MSI-high-Kolonkarzinome. Von den linksseitigen

Tumoren waren 5 im Colon sigmoideum, 3 im Colon descendens und 2 in der linken Colonflexur lokalisiert. Die 2 rechtsseitigen Tumore befanden sich im Colon ascendens. Eine Darstellung der Lokalisation von Tumoren mit *NTRK*-Fusion wird in Abbildung 10 gezeigt.

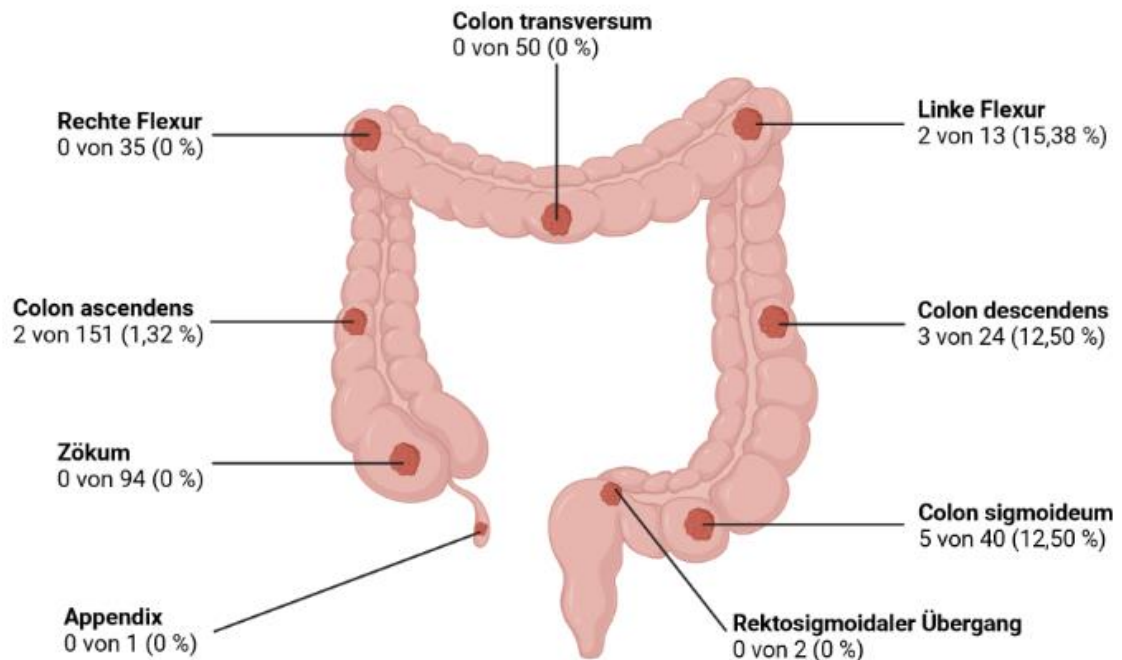


Abbildung 10: Lokalisation von MSI-high-Tumoren mit *NTRK*-Fusion in Bezug auf alle MSI-high-Tumore im Kolon
Abbildung kreiert mit BioRender.com

Keiner der Patienten mit *NTRK*-Fusion wies einen Zweittumor im Darm auf, allerdings hatten 2 von 12 (16,67 %) ein weiteres Karzinom: Eine Patientin hatte zusätzlich ein Mammakarzinom und ein Patient hatte zusätzlich ein Prostatakarzinom. 3,33 % aller Patienten mit MSI-high-Kolonkarzinom und einem weiteren Karzinom hatten eine *NTRK*-Fusion. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,690$).

Histologisch waren 11 von 12 (91,67 %) Tumoren mit *NTRK*-Fusion Adenokarzinome und 1 von 12 (8,33 %) Tumoren war ein Adenokarzinom in tubulovillösem Adenom. Von allen MSI-high-Adenokarzinomen hatten 3,24 % eine *NTRK*-Fusion. Von den 2 MSI-high-Adenokarzinomen in tubulovillösem Adenom aus dem MSI-high-Kollektiv wies 1 Tumor (50 %) eine *NTRK*-Fusion auf. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,243$).

Bezüglich des Follow-Ups konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren und *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren festgestellt werden.

Hierbei ist zu beachten, dass die Aussagekraft aufgrund der geringen Zahl an *NTRK*-positiven Patienten begrenzt ist. 10 von 12 (83,33 %) Patienten mit *NTRK*-Fusion lebten zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung, die anderen beiden (16,67 %) waren bereits verstorben. In der Kohorte ohne *NTRK*-Fusion lebten zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung noch 79,70 % der Patienten, während 20,30 % bereits verstorben waren. Die geschätzte durchschnittliche Überlebenszeit betrug in der *NTRK*-positiven Kohorte 60,45 Monate (95%-Konfidenzintervall: 39,25 - 81,66 Monate) und in der *NTRK*-negativen Kohorte 83,99 Monate (95%-Konfidenzintervall: 74,08 - 93,91 Monate). Der mediane Wert der Überlebenszeit der beiden Kohorten konnte nicht angegeben werden, da sowohl in der *NTRK*-positiven als auch in der *NTRK*-negativen Kohorte noch mehr als 50 % aller Patientinnen und Patienten lebten. Der Unterschied in der Überlebenszeit zwischen Patienten mit und ohne *NTRK*-Fusion war nicht signifikant ($p = 0,941$). In Abbildung 11 ist die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

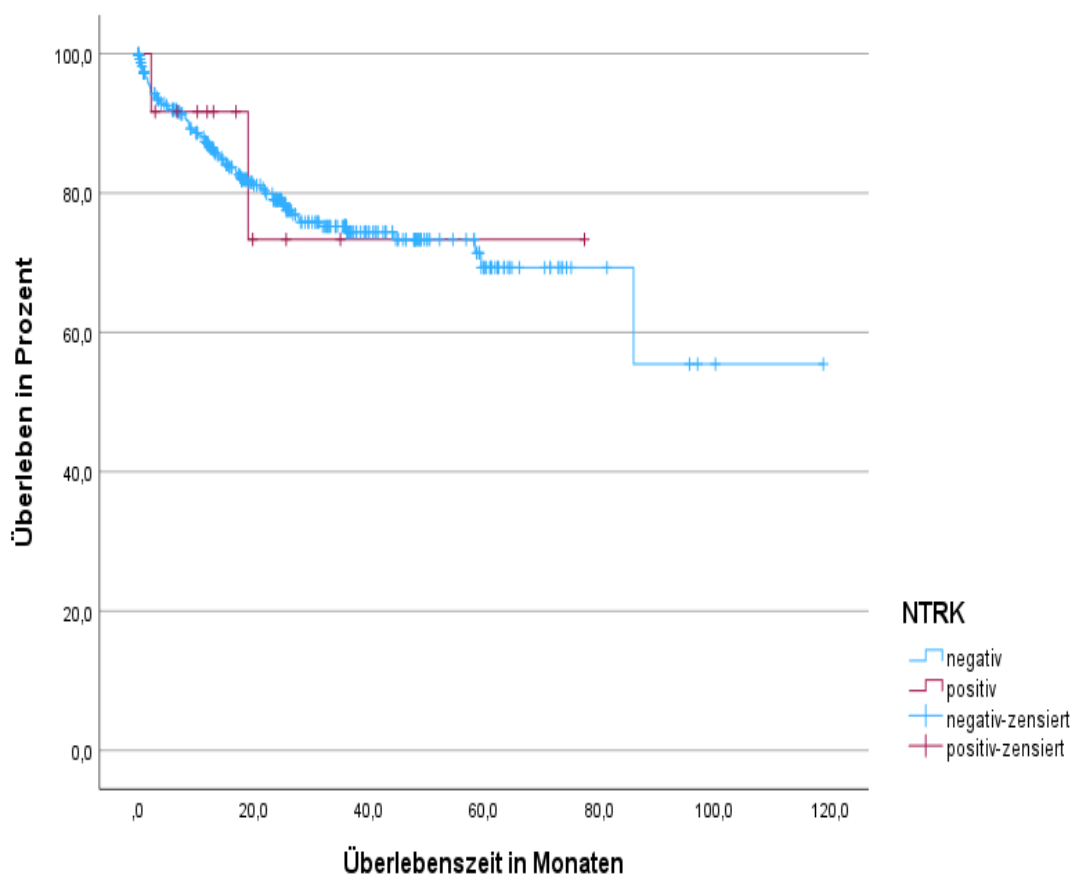


Abbildung 11: Vergleich der Überlebenszeit von Patienten mit und ohne *NTRK*-Fusion

Die Abbildung zeigt eine Kaplan-Meier-Kurve, die das kumulative Überleben (Überleben in Prozent) der *NTRK*-positiven und der *NTRK*-negativen Kohorte in Abhängigkeit von der Überlebenszeit in Monaten darstellt. Patienten, bei denen der Tod nicht eintrat, wurden an der Stelle ihrer Überlebenszeit in Monaten nach der letzten Datenerhebung zensiert.

Ein Rezidiv trat bei 1 von 12 (8,33 %) der *NTRK*-positiven MSI-high-Patienten und bei 11,11 % der *NTRK*-negativen MSI-high-Patienten auf. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 1$).

Im Hinblick auf den Ausfall des MMR-Systems wiesen alle 12 *NTRK*-positiven MSI-high-Tumore einen Ausfall der MMR-Proteine MLH1 und PMS2 auf, während die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 bei allen 12 Tumoren nicht ausgefallen waren. Von allen MSI-high-Tumoren mit Ausfall des MLH1-Proteins hatten die *NTRK*-positiven Tumore einen Anteil von 3,47 % ($p = 0,532$). Ähnlich war es beim Ausfall des PMS2-Proteins, bei dem die *NTRK*-positiven Tumore einen Anteil von 3,38 % an allen MSI-high-Tumoren ausmachten ($p = 0,551$). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass im MSI-high-Kollektiv der Ausfall von MLH1 ($n = 346$) und der Ausfall von PMS2 ($n = 355$) erheblich häufiger auftrat als der Ausfall von MSH2 ($n = 27$) und MSH6 ($n = 48$).

NTRK-positive Tumore waren signifikant assoziiert mit dem gleichzeitigen Vorliegen des Wildtyps in allen vier onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA*. Keiner der 12 *NTRK*-positiven Tumore wies eine Mutation in einem dieser Gene auf. 13,79 % aller MSI-high-Tumore, die den Wildtyp in allen vier onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* zugleich hatten, wiesen eine *NTRK*-Fusion auf ($p < 0,001$).

Im Speziellen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen *NTRK*-Fusionen und dem *BRAF*-Wildtyp ($p < 0,001$), sowie zwischen *NTRK*-Fusionen und dem *PIK3CA*-Wildtyp ($p = 0,022$) nachgewiesen werden. Zwischen *NTRK*-Fusionen und dem *KRAS*-Wildtyp, sowie zwischen *NTRK*-Fusionen und dem *NRAS*-Wildtyp konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (*KRAS*: $p = 0,228$, *NRAS*: $p = 1$). Allerdings traten *KRAS*-Mutationen ($n = 61$) und *NRAS*-Mutationen ($n = 10$) im Gegensatz zu *BRAF*-Mutationen ($n = 235$) und *PIK3CA*-Mutationen ($n = 118$) in diesem Kollektiv auch insgesamt seltener auf.

NTRK-positive Tumore waren 6,82 % aller *BRAF*-, 3,43 % aller *KRAS*-, 2,99 % aller *NRAS*- und 4,10 % aller *PIK3CA*-Wildtyp MSI-high-Tumore.

4.1.3 Genexpressionsanalyse

Um herauszufinden, inwiefern sich die Genexpression von *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren von der *NTRK*-negativer MSI-high-Tumore unterscheidet, wurden die Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung genutzt. Dazu wurden die 12 *NTRK*-positiven MSI-high-Tumore

mit 12 *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren verglichen, welche ebenfalls mittels NGS sequenziert wurden. Nachdem nur proteincodierende Gene, welche eine signifikante Änderung aufwiesen und mindestens um das Doppelte erhöht oder um mindestens die Hälfte erniedrigt waren, herausgefiltert wurden, verblieben 178 Gene. Die veränderte Genexpression *NTRK*-positiver MSI-high-Tumore im Vergleich zu *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren ist in Abbildung 12 dargestellt.

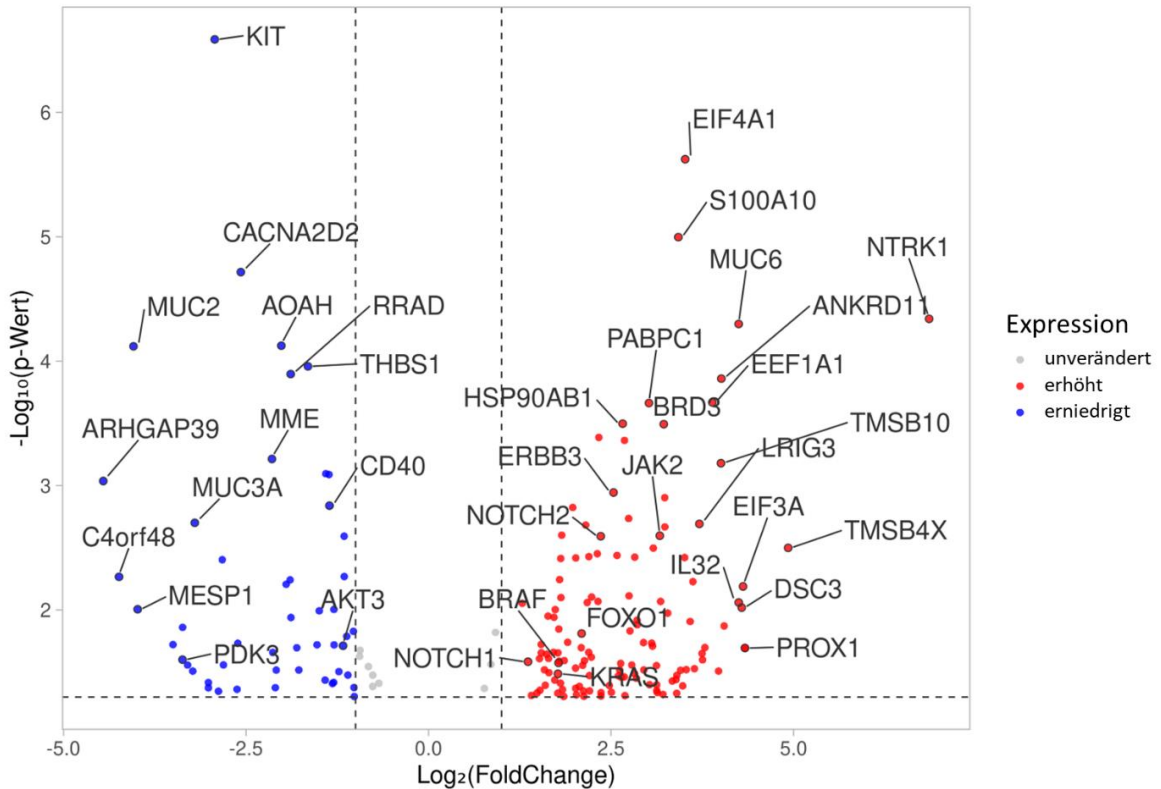


Abbildung 12: Genexpression *NTRK*-positiver MSI-high-Tumore im Vergleich zu *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren
 Die Abbildung zeigt, welche Gene bei *NTRK*-positiven Tumoren vermehrt exprimiert wurden (rote Punkte) und welche Gene verringert exprimiert wurden (blaue Punkte). Auf der x-Achse ist die Stärke der Änderung in der Genexpression, auch Fold Change genannt, dargestellt. Die $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ dient der besseren grafischen Darstellung der Fold Change. Die beiden vertikalen gestrichelten Linien markieren die Grenzwerte, ab der die Genexpression um mehr als die Hälfte verringert (entspricht einer $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ von < -1), bzw. um mehr als das Doppelte erhöht ist (entspricht einer $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ von > 1). Auf der y-Achse ist der p-Wert dargestellt, auch hier aus dem Grund der verbesserten grafischen Darstellung als $-\text{Log}_{10}(\text{p-Wert})$. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ ist signifikant, was einem $-\text{Log}_{10}(\text{p-Wert})$ von gerundet $\geq 1,30$ entspricht. Dieser Grenzwert ist durch die horizontale gestrichelte Linie dargestellt. Diese Abbildung wurde kreiert mit VolcanoSeR [121].

Das Gen mit der stärksten Erhöhung der Genexpression in der *NTRK*-positiven Kohorte betraf das *NTRK1*-Gen. Die Fold Change betrug 115,93 ($\text{Log}_2\text{FoldChange} = 6,86$; $p < 0,0001$), was bedeutet, dass die Expression von *NTRK1* in der *NTRK*-positiven Kohorte fast 116-Mal höher war als in der *NTRK*-negativen Kohorte. Die Expression des *NTRK2*-Gens und die des *NTRK3*-Gens unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (*NTRK2*: $p = 0,789$;

NTRK3: $p = 0,721$). Dabei ist zu berücksichtigen, dass von den 12 Tumoren mit *NTRK*-Fusion 11 Tumore eine *NTRK1*-Fusion aufwiesen, ein Tumor eine *NTRK3*-Fusion und kein Tumor eine *NTRK2*-Fusion.

Bei Betrachtung der beiden wichtigsten Signalwege der TRK-Rezeptoren - MAPK und PI3K/AKT - fiel auf, dass die Genexpression von *KRAS* und *BRAF* im MAPK-Signalweg in *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren ebenfalls signifikant erhöht war. *KRAS* wies eine mehr als dreifache Erhöhung der Genexpression auf (Fold Change = 3,42; $\text{Log}_2\text{FoldChange} = 1,77$; $p = 0,033$) und *BRAF* wies ebenfalls eine mehr als dreifache Erhöhung der Genexpression auf (Fold Change = 3,44; $\text{Log}_2\text{FoldChange} = 1,78$; $p = 0,027$).

4.1.4 Analyse des *MLH1*-Promotors

In diesem Schritt sollte untersucht werden, ob es sich bei den *NTRK*-positiven Tumoren um sporadische Kolonkarzinome oder um Kolonkarzinome im Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom handelte.

Alle *NTRK*-positiven Tumore wiesen einen Ausfall der *MLH1*-Expression auf. Um nun festzustellen, ob der Ausfall durch eine Methylierung des *MLH1*-Promotors zustande gekommen ist, wurde der *MLH1*-Promotor mittels Pyrosequenzierung analysiert. Im Falle einer Methylierung des *MLH1*-Promotors handelte es sich um ein sporadisches Kolonkarzinom. Wenn keine Methylierung des *MLH1*-Promotors vorlag, musste das *MLH1*-Gen auf eine Mutation untersucht werden. Eine Mutation im *MLH1*-Gen sprach für das Vorliegen eines Lynch-Syndroms.

Alle 12 *NTRK*-positive Tumore wiesen eine Methylierung des *MLH1*-Promotors auf. Demnach waren alle *NTRK*-positive Tumore sporadische MSI-high-Kolonkarzinome.

In Abbildung 13 ist exemplarisch die Analyse des *MLH1*-Promotors von Patient 7/M0022 gezeigt.

Well: A3
 Assay: MLH1 Promotor MetOHpaper
 Sample ID: 7_M0022
 Sequence to analyze: GAGYGGATAGYGATTTTTAAAYGYGTAAGYGTATATTTTTTTAGGTAG

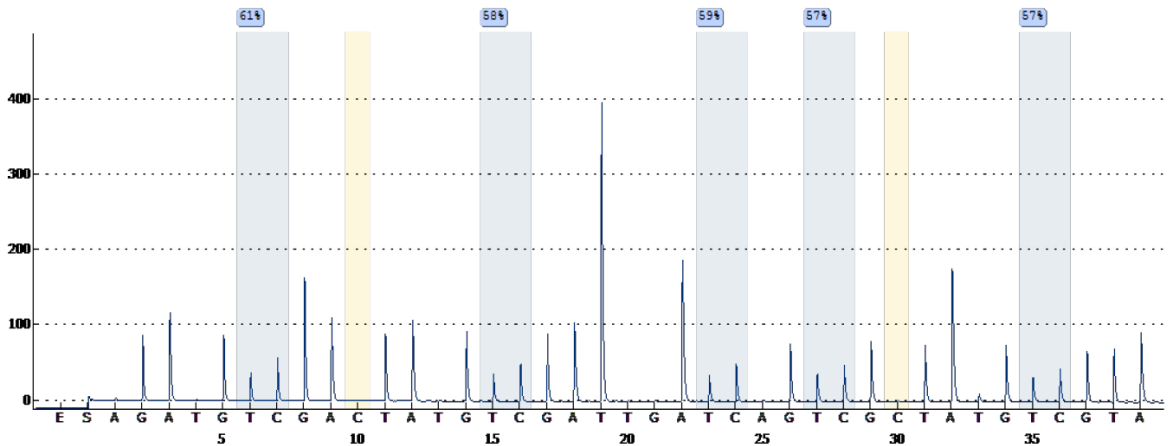


Abbildung 13: Methylierter *MLH1*-Promotor von Patient 7/M0022

Zu erkennen ist die Sequenz des *MLH1*-Promotors mit den 5 CpG-Inseln, also Bereichen der DNA, in denen auf ein Cytosin ein Guanin folgt (blau hinterlegte Flächen). An diesen Stellen wurde bei der Sequenzierung sowohl ein Thymin als auch ein Cytosin getestet. Dies hatte den Grund, dass unmethyliertes Cytosin in der Vorbereitung auf die Sequenzierung in Thymin umgewandelt worden ist, während methyliertes Cytosin unverändert war. Die Prozentangabe über der CpG-Insel gibt an, zu welchem Anteil Cytosin (d.h. methyliertes Cytosin) an der jeweiligen Stelle detektiert wurde. Im Falle dieses *MLH1*-Promotors liegt der Anteil des methylierten Cytosins in allen 5 CpG-Inseln bei mindestens 57 % und damit deutlich über dem Grenzwert von 10 %. Damit ist dieser *MLH1*-Promotor methyliert. Die gelben Flächen markieren 2 Cytosin-Basen, welche nicht Teil einer CpG-Insel sind. Diese Cytosin-Basen wurden nicht detektiert, was bedeutet, dass es sich um unmethylierte Cytosin-Basen handelt. Diese dienen zur Kontrolle. Abbildung aus dem CpG-Pyrogramm-Report der Software PyroMarkQ24 von Qiagen.

4.1.5 PD-L1-Expression und Tumormikroumgebung

In diesem Schritt wurden die immunpathologischen Eigenschaften von *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren und deren Mikroumgebung untersucht. Dazu sollte zum einen getestet werden, ob die Tumorzellen PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wodurch sie sich vor dem Immunsystem des Patienten schützen können. Zum anderen wurden die den Tumor infiltrierenden CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten im Zentrum des Tumors ermittelt. Für PD-L1, CD3, CD4 und CD8 wurde jeweils eine IHC durchgeführt.

PD-L1 wurde auf der Oberfläche von 11 von 12 (91,67 %) *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinomen exprimiert. 3 von 12 (25 %) Tumoren wiesen eine starke PD-L1-Expression (TPS \geq 50 %) der Tumorzellen auf, 8 von 12 (66,67 %) Tumoren wiesen eine moderate PD-L1-Expression (TPS 1 – 49 %) der Tumorzellen auf und 1 von 12 (8,33 %) Tumoren wies keine PD-L1-Expression (TPS < 1 %) der Tumorzellen auf. In Abbildung 14 ist jeweils ein Tumor mit starker, ein Tumor mit moderater und ein Tumor ohne PD-L1-Expression dargestellt.

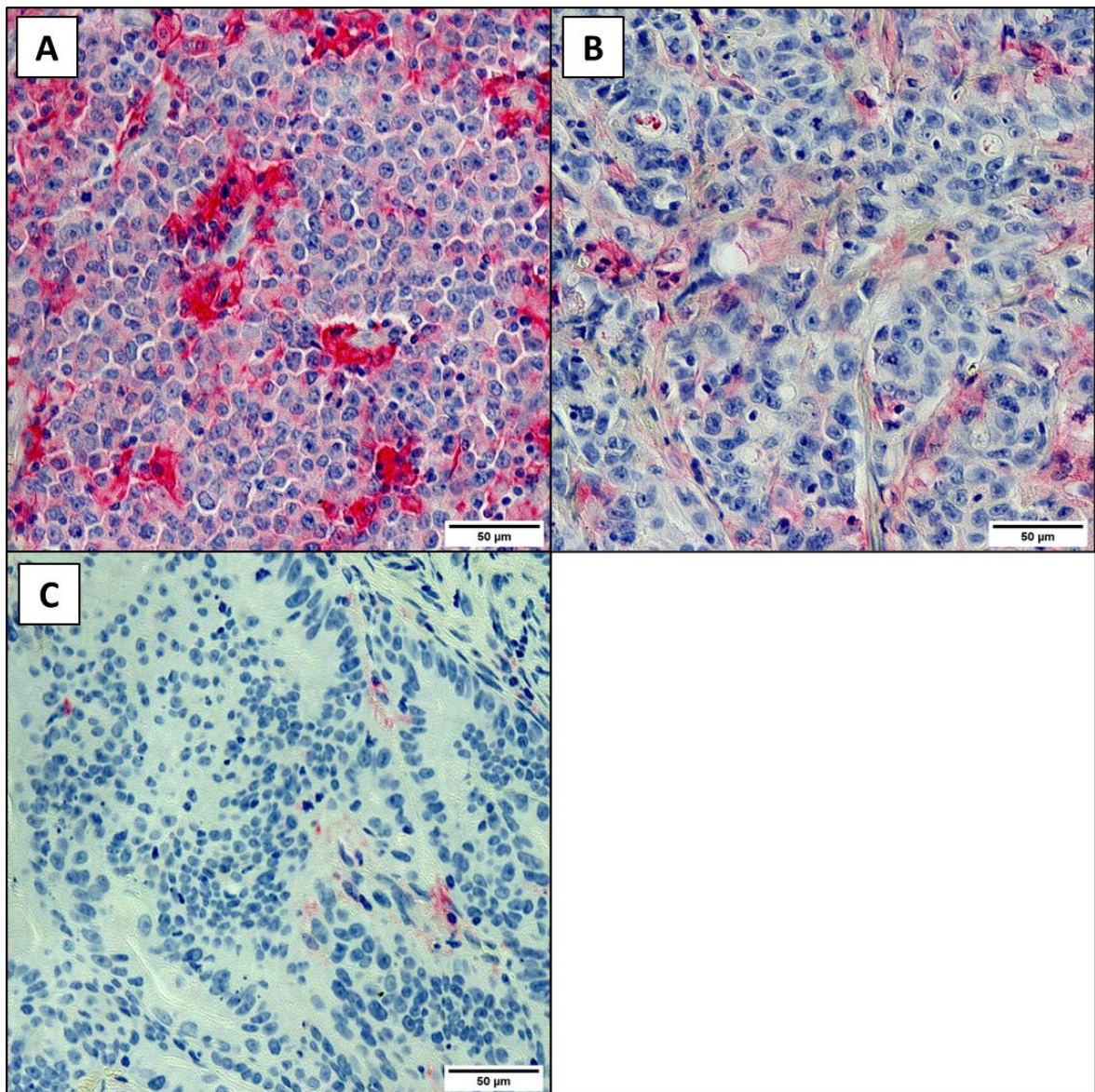


Abbildung 14: PD-L1-Expression *NTRK*-positiver MSI-high-Kolonkarzinome

A: Tumor mit starker ($\geq 50\%$) PD-L1-Expression, **B:** Tumor mit moderater (1 – 49 %) PD-L1-Expression, **C:** Tumor ohne (< 1 %) PD-L1-Expression

Alle 12 MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion wurden im Zentrum des Tumors von CD8⁺-T-Lymphozyten infiltriert.

Bei der CD3-IHC konnte ein Tumor (156/L0001) nicht beurteilt werden, da für die CD3-IHC zu wenig Restgewebe vorhanden war. Die übrigen 11 *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinome wurden im Zentrum des Tumors von CD3⁺-T-Lymphozyten infiltriert.

Bei der CD4-IHC konnte ebenfalls ein Tumor (156/L0001) nicht beurteilt werden, da für die CD4-IHC zu wenig Restgewebe vorhanden war. Von den übrigen 11 *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinomen wurden 10 von 11 (90,91 %) Tumoren im Zentrum von CD4⁺-T-Lymphozyten infiltriert. Die CD4-IHC zeigte auch bei mehrfacher Wiederholung aller

Proben teilweise nur eine sehr geringe Intensität der Färbung, wodurch die Beurteilbarkeit eingeschränkt wird und die Aussagekraft dieser Auszählung reduziert ist.

Der Mittelwert der Anzahl an TILs betrug bei den CD3⁺-T-Lymphozyten 82/HPF bzw. 1033/mm², bei den CD4⁺-T-Lymphozyten 52/HPF bzw. 657/mm² und bei den CD8⁺-T-Lymphozyten 68/HPF bzw. 856/mm². Bei allen drei TIL-Subgruppen zeigte sich unter den Tumoren eine große Varianz in der Infiltration (siehe Abbildung 15).

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration der einzelnen TIL-Subgruppen (CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ bzw. CD4⁺/CD8⁺) im Zentrum eines Tumors festgestellt werden (siehe Abbildung 16).

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der PD-L1-Expression der Tumorzellen und die Infiltration des Tumors mit TILs zusammengefasst. Abbildung 17 zeigt je einen Tumor mit geringer Infiltration von TILs im Zentrum und einen Tumor mit hoher Infiltration von TILs im Zentrum.

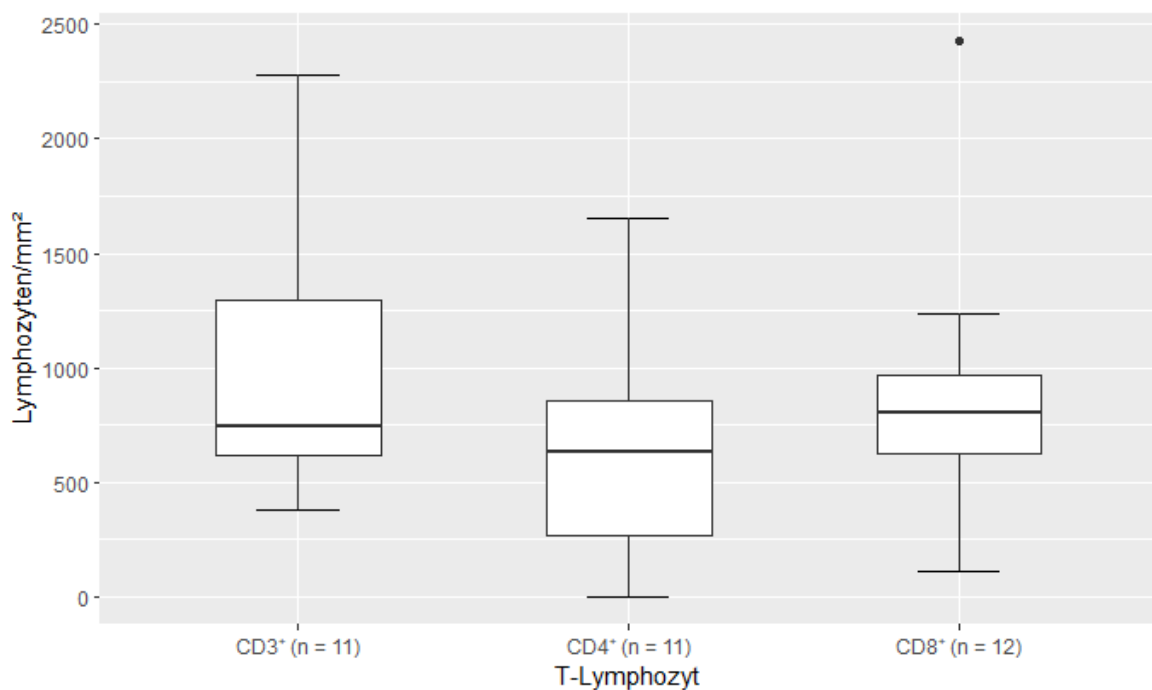


Abbildung 15: Boxplots der Verteilung von CD3⁺, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten im Zentrum *NTRK*-positiver MSI-high-Kolonkarzinome

CD3⁺: Mittelwert: 1033 TILs/mm², Median: 746 TILs/mm², Minimum: 379 TILs/mm², Maximum: 2275 TILs/mm², Interquartilsabstand: 619 - 1295 TILs/mm²

CD4⁺: Mittelwert: 657 TILs/mm², Median: 632 TILs/mm², Minimum: 0 TILs/mm², Maximum: 1656 TILs/mm², Interquartilsabstand: 265 - 859 TILs/mm²

CD8⁺: Mittelwert: 856 TILs/mm², Median: 803 TILs/mm², Minimum: 114 TILs/mm², Maximum: 2426 TILs/mm², Interquartilsabstand: 622 - 967 TILs/mm²

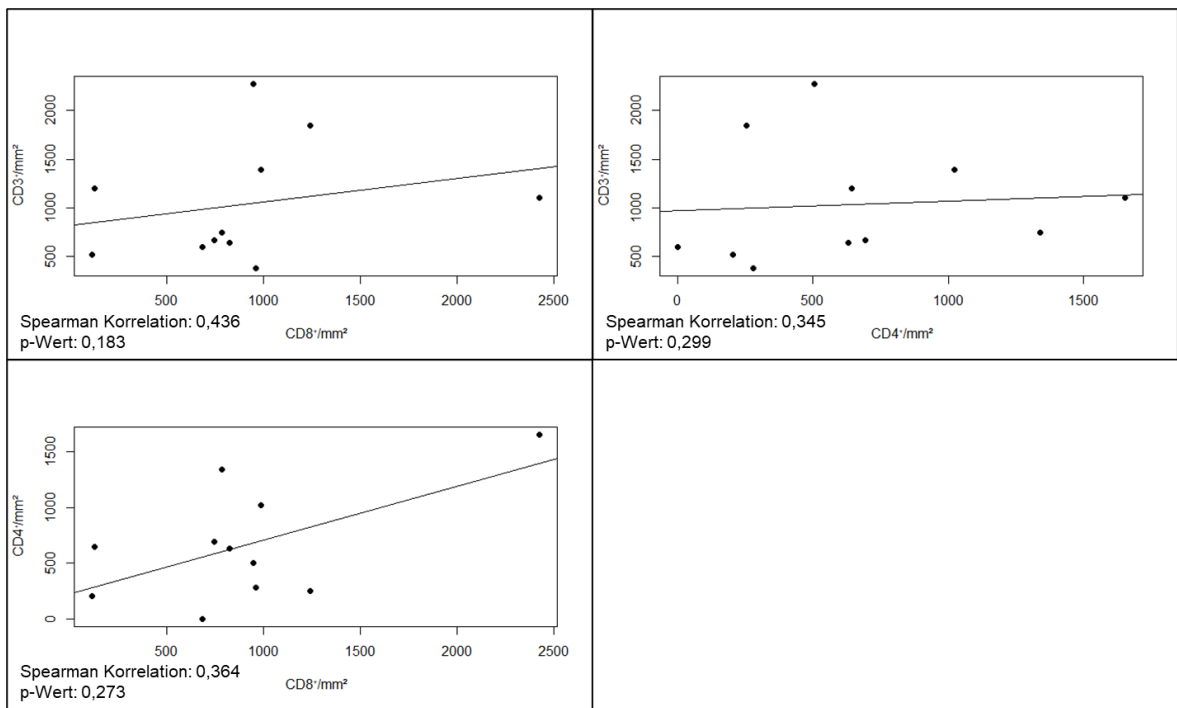


Abbildung 16: Korrelation zwischen CD3⁺/CD8⁺-, CD3⁺/CD4⁺- und CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten im Zentrum *NTRK*-positiver MSI-high-Kolonkarzinome

Tabelle 23: PD-L1-Expression und Tumormikroumgebung der 12 *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinome

Grad der PD-L1-Expression: ++ starke Expression (TPS ≥ 50 %), + moderate Expression (TPS 1 – 49 %), - keine Expression (TPS < 1 %)

Infiltration von T-Lymphozyten im Zentrum des Tumors: ●●● ≥ 75 TILs/HPF (≥ 948 TILs/mm²), ●● 25-74 TILs/HPF (316-947 TILs/mm²), ● < 25 TILs/HPF (< 316 TILs/mm²), - keine Infiltration

Patient	PD-L1	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
3/E0124	++	●●●	●●	●●●
7/M0022	+	●●	-	●●
17/F0027	++	●●●	●●	●
33/W0046	+	●●	●	●●●
47/S0043	+	●●	●	●
49/W0010	-	●●	●●	●●
52/R0026	+	●●●	●	●●●
54/N0094	+	●●	●●	●●
85/M0030	+	●●●	●●●	●●●
140/L0009	++	●●	●●●	●●
156/L0001	+	keine Angabe	keine Angabe	●●
163/W0008	+	●●●	●●●	●●●

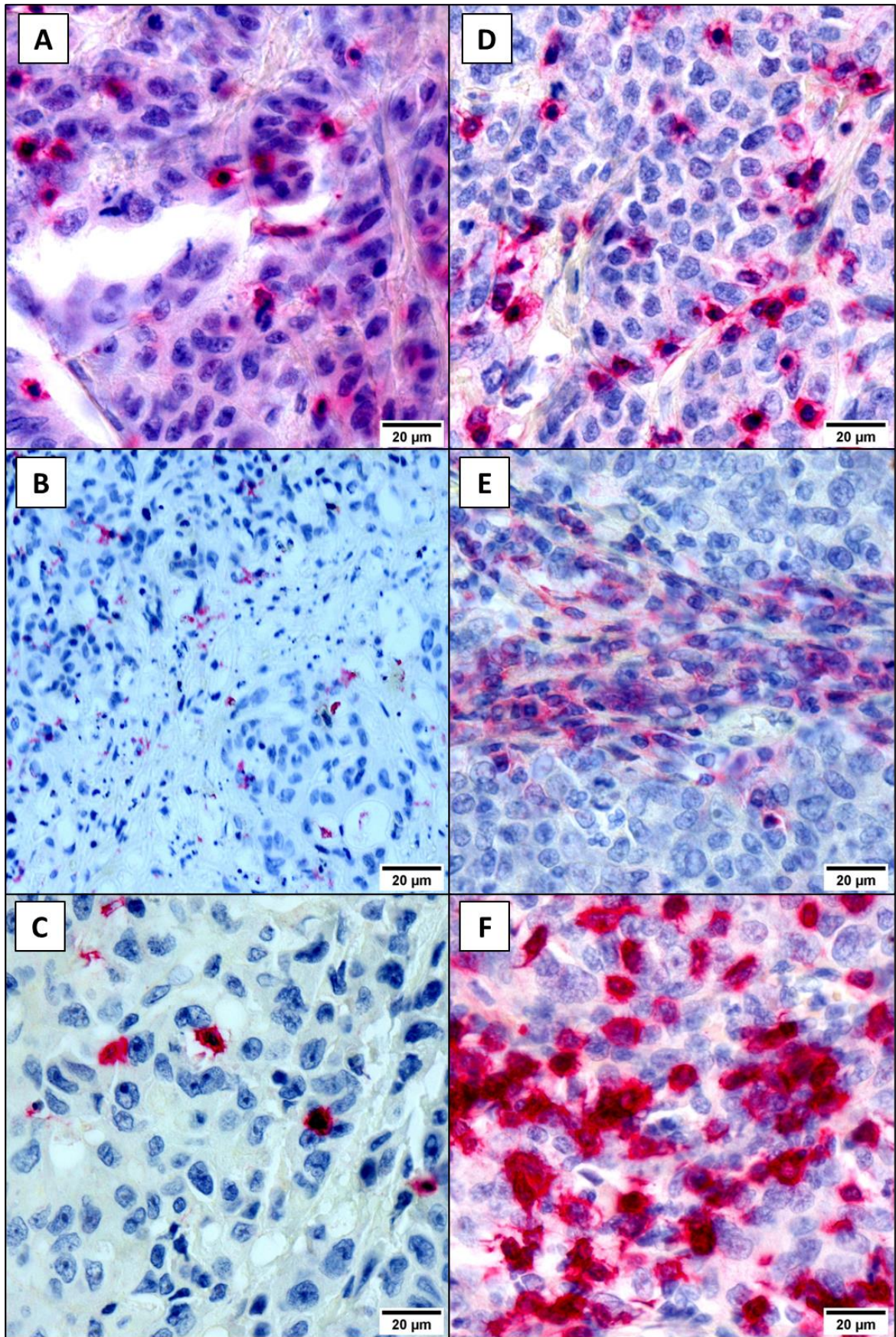


Abbildung 17: CD3-, CD4- und CD8-IHC *NTRK*-positiver MSI-high-Kolonkarzinome

A - C: Patient 47/S0043 mit geringer Infiltration von CD3⁺- (**A**), CD4⁺- (**B**) und CD8⁺-T-Lymphozyten (**C**) im Zentrum des Tumors

D - F: Patient 85/M0030 mit hoher Infiltration von CD3⁺- (**D**), CD4⁺- (**E**) und CD8⁺-T-Lymphozyten (**F**) im Zentrum des Tumors

4.2 Weitere Genfusionen

Abgesehen von *NTRK*-Fusionen sollte in dem MSI-high-Kollektiv nach weiteren Genfusionen gesucht werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine ALK-Immunhistochemie bei 186 der 411 MSI-high-Tumore durchgeführt. Keiner der 186 Tumore wies eine ALK-positive Färbung in der IHC auf.

Da das Screening mittels ALK-IHC bis zu diesem Punkt nicht erfolgreich war und die IHC für das Screening auf andere Fusionen in Genen wie z.B. *RET* oder *ROS1* nicht sensitiv genug ist, sollten nun MSI-high-Tumore im Kollektiv direkt mittels NGS sequenziert werden.

Um eine erfolgsversprechende Auswahl an Tumorproben zu erhalten, wurden die Ergebnisse der Eigenschaften von *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren hinzugezogen.

Demnach wurden die 399 *NTRK*-negativen MSI-high-Tumore nach den Eigenschaften weiter gefiltert, bei denen *NTRK*-Fusionen besonders häufig vorkamen. Dies betraf Tumore im linksseitigen Kolon ($p < 0,001$), die den Wildtyp in den vier onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* ($p < 0,001$) und das T3-Stadium ($p = 0,066$) aufwiesen. Diese Kriterien erfüllten 21 *NTRK*-negative MSI-high-Tumore im Kollektiv. Es wurde eine RNA-Sequenzierung mittels NGS von 16 dieser 21 Tumore durchgeführt.

In den 16 Tumoren wurden 5 Tumore (31,25 %) mit einer Genfusion detektiert. Davon waren 2 *ALK*-Fusionen (*GCC2-ALK* und *STRN-ALK*), 2 *RET*-Fusionen (*CCDC6-RET* und *NCOA4-RET*) und 1 *TFG-ADGRG7*-Fusion (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht der RNA-Sequenzierung mittels NGS mit 5 detektierten Genfusionen

Chrom. = Chromosom

Patient	5'-Fusionspartner				3'-Fusionspartner			
	Gen	Chrom.	Exon	Breakpoint	Gen	Chrom.	Exon	Breakpoint
13/S0024	GCC2	2	7	108.472.899	ALK	2	20	29.223.528
15/I0084	NCOA4	10	10	46.009.410	RET	10	12	43.116.583
74/B0079	TFG	3	3	100.720.058	ADGRG7	3	2	100.629.597
96/N0015	CCDC6	10	1	59.906.121	RET	10	12	43.116.583
140/L0006	STRN	2	3	36.916.077	ALK	2	20	29.223.528

Der Tumor von Patient 13/S0024 mit der *GCC2-ALK*-Fusion ist in der zuvor durchgeführten ALK-IHC negativ gewesen. Abbildung 18 zeigt die negative ALK-IHC dieses Patienten.

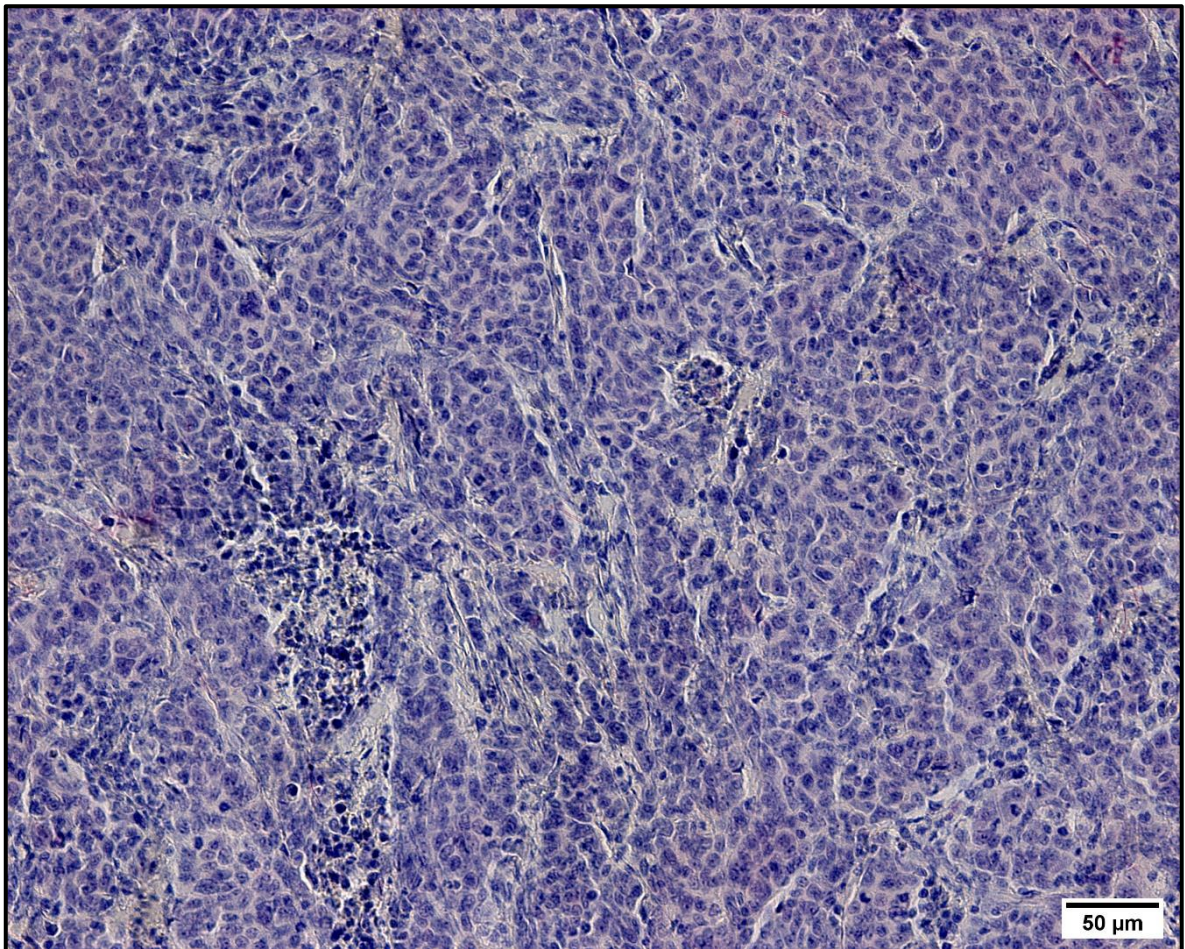


Abbildung 18: ALK-IHC des Tumors von Patient 13/S0024

In der ALK-IHC dieses Patienten ist keine zytoplasmatische, membranöse oder nukleäre Färbung der Tumorzellen zu erkennen. Die ALK-IHC wurde als negativ gewertet.

Da bei diesem Patienten eine Diskrepanz zwischen der RNA-Sequenzierung mittels NGS und der ALK-IHC vorlag, wurde hier als dritte Methode die *ALK*-FISH hinzugezogen.

Bei der Auswertung der *ALK*-FISH wurden insgesamt 193 Zellen ausgezählt. Von denen wiesen 110 Zellen (56,99 %) einen chromosomalen Bruch des *ALK*-Gens auf, während 83 Zellen (43,01 %) keinen chromosomalen Bruch zeigten. Damit wurde die *ALK*-FISH dieses Tumors als positiv gewertet. Die ALK-IHC wurde als falsch-negativ beurteilt. Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt aus der *ALK*-FISH dieses Patienten.

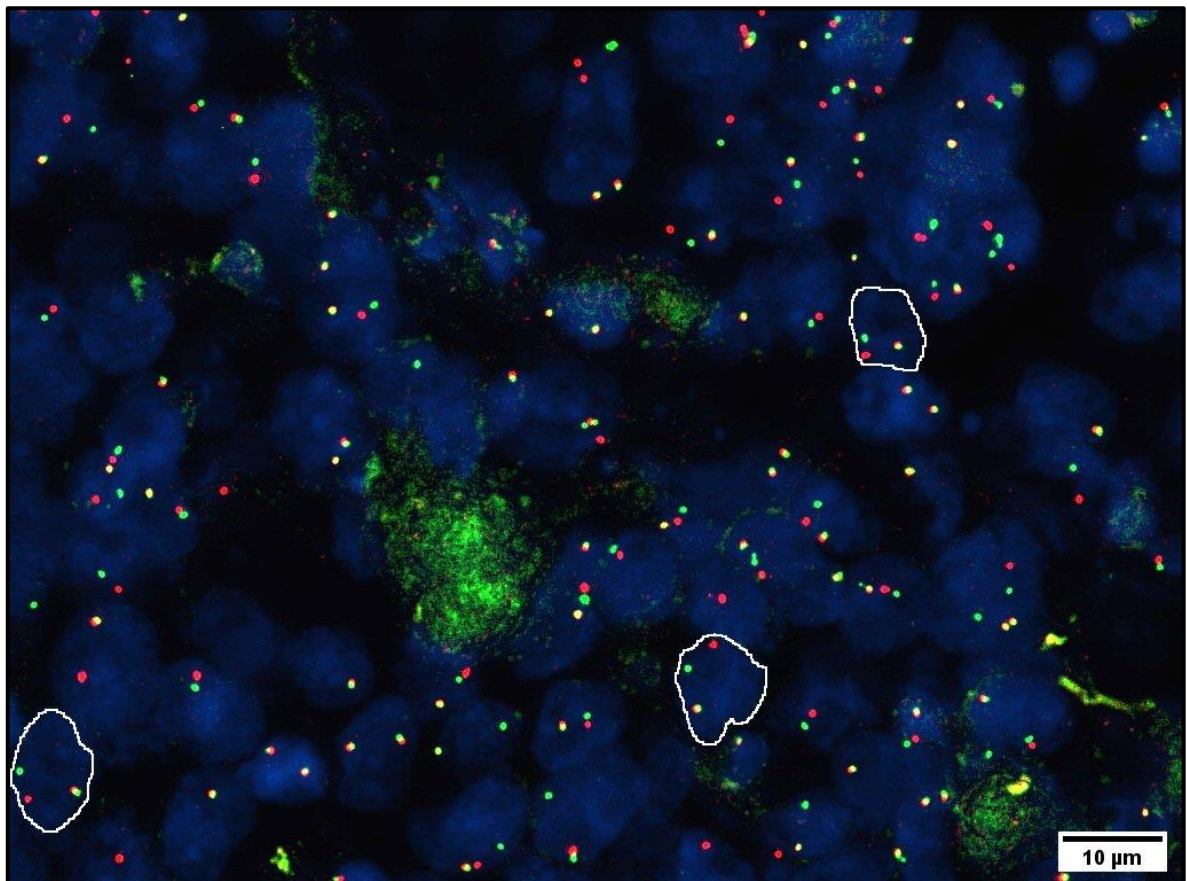


Abbildung 19: Tumorzellen mit chromosomalem Bruch des *ALK*-Gens
 Exemplarisch sind in diesem Bildausschnitt 3 Tumorzellen mit chromosomalem Bruch des *ALK*-Gens markiert (weiße Umrandung).

Abgesehen von den 3 Kriterien, nach denen die Tumore zuvor herausgefiltert worden waren (linksseitige Tumorlokalisierung, Wildtyp in allen vier onkogenen Treibergenen und T3-Stadium) wiesen die 5 Fusions-positiven Tumore folgende Eigenschaften auf:

Von den 5 Patienten waren 4 (80 %) weiblich und 1 (20 %) männlich. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 76 Jahre.

Lymphknotenmetastasen hatten bereits 3 der 5 Patienten, wobei 2 (40 %) im Stadium N1 und 1 im Stadium N2 (20 %) waren. 2 Patienten (40 %) wiesen keine Lymphknotenmetastasen auf (Stadium N0).

Dadurch, dass alle Tumore im T3-Stadium waren, wurden entsprechend die 3 Patienten mit Lymphknotenmetastasen dem UICC-Stadium III und die beiden Patienten ohne Lymphknotenmetastasen dem UICC-Stadium II zugeordnet.

Alle 5 Tumore waren Adenokarzinome und alle befanden sich im Colon sigmoideum.

Keiner der 5 Patienten wies einen Zweittumor im Darm auf, aber die Patientin mit der *CCDC6-RET*-Fusion hatte zusätzlich ein Lungenkarzinom.

Im Hinblick auf das MMR-System wiesen 4 von 5 Tumoren einen Ausfall der MMR-Proteine MLH1 und PMS2 auf, während MSH2 und MSH6 intakt waren. Bei 1 von 5 Tumoren waren umgekehrt die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 ausgefallen, während MLH1 und PMS2 intakt waren.

Keiner der Patienten hatte zum Zeitpunkt der Datenerhebung ein Rezidiv oder war verstorben.

In Tabelle 25 sind die klinischen und in Tabelle 26 die histologischen und molekularpathologischen Eigenschaften der 5 Fusions-positiven Tumore zusammengefasst.

Tabelle 25: Klinische Daten der 5 Fusions-positiven MSI-high-Patienten

m = männlich, w = weiblich, li. = links, C. sigm. = Colon sigmoideum

Die Eigenschaften, nach denen die Tumore zuvor herausgefiltert wurden, sind in grauer Schrift markiert.

Patient	Geschlecht	Alter	T-Stadium	N-Stadium	UICC-Stadium	Lokalisation	Lokalisation führender Tumor	Zweittumor Darm	Weiterer Tumor	Rezidiv	Tod	RFS in Monaten	OAS in Monaten
13/S0024	w	85	T3d	N1b	IIIb	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	74,3	74,3
15/I0084	w	75	T3	N0	IIa	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	10,3	10,3
74/B0079	w	77	T3	N2a	IIIb	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	24,0	24,0
96/N0015	w	65	T3	N0	IIa	li.	C. sigm.	-	Lunge	nein	nein	0,2	0,2
140/L0006	m	76	T3	N1a	III	li.	C. sigm.	-	-	nein	nein	13,3	13,3

Tabelle 26: Histologische und molekularpathologische Eigenschaften der 5 Fusions-positiven MSI-high-Tumore

wt = Wildtyp

Die Expression der 4 MMR-Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 wurde mittels Immunhistochemie bestimmt. Eine Expression in < 10 % der Tumorzellen wurde als Defekt angesehen. Die Eigenschaften, nach denen die Tumore zuvor herausgefiltert wurden, sind in grauer Schrift markiert.

Patient	Histologischer Subtyp	BRAF	KRAS	NRAS	PIK3CA	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
13/S0024	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
15/I0084	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
74/B0079	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
96/N0015	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	defekt	intakt	intakt	defekt
140/L0006	Adenokarzinom	wt	wt	wt	wt	intakt	defekt	defekt	intakt

5. Diskussion

In dieser Arbeit sollten die klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusionen untersucht werden.

Dabei war die erste Hypothese, dass *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Tumoren in bis zu 5 % der Kolonkarzinome vorkommen. In dieser Arbeit wurden 411 Patienten mit einem MSI-high-Kolonkarzinom mittels pan-TRK-IHC auf *NTRK*-Fusionen gescreent und durch RNA-Sequenzierung mittels NGS bestätigt. Dabei konnte bei 12 von 411 Patienten eine *NTRK*-Fusion nachgewiesen werden, was einem Anteil von 2,92 % entspricht. Dieser Anteil ist geringer als in anderen Studien beobachtet wurde. In einer Studie von Wang, Li et al. [122] wurden *NTRK*-Fusionen in ca. 6 % ($n = 13/207$), bei Guo, Guo et al. [94] in ca. 7 % ($n = 4/55$), bei Yaeger, Chatila et al. [96] in ca. 8 % ($n = 3/39$) und bei Ukkola, Nummela et al. [123] in ca. 11 % ($n = 7/62$) aller MSI-high-Kolonkarzinome detektiert. Im Vergleich zu diesen Studien wurde in dieser Arbeit eine deutlich größere Kohorte an MSI-high-Kolonkarzinomen untersucht. Zudem ist das Patientenkollektiv im ColoPredict-2.0-Register unselektiert, sodass die Versorgungsrealität besser abgebildet wird als in den meisten klinischen Studien. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die Prävalenz von *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen niedriger ist als in den vorigen Studien beobachtet wurde.

Methodisch muss allerdings berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit ausschließlich pan-TRK-IHC-positive Tumore durch die RNA-Sequenzierung bestätigt wurden. Die Sensitivität der pan-TRK-IHC ist mit bis zu 95 % insgesamt zwar relativ hoch [92, 108], aber dennoch könnte es noch mehr Tumore in der Kohorte geben, die eine *NTRK*-Fusion aufweisen, welche aber in der pan-TRK-IHC fälschlicherweise als negativ detektiert wurden. Gerade für die *NTRK3*-Fusionen wurde eine geringere Sensitivität der pan-TRK-IHC festgestellt. Solomon, Linkov et al. hatten in ihrer Studie eine Sensitivität der pan-TRK-IHC bei *NTRK3*-Fusionen von 79,4 % festgestellt [92] und auch Bocciarelli, Caumont et al. beschrieben, dass bei einigen *NTRK3*-positiven Tumoren die pan-TRK-IHC negativ war [83]. Zudem beschrieben Lasota, Chlopek et al. eine geringere Intensität der pan-TRK-IHC bei *NTRK3*-Fusionen im Vergleich zu *NTRK1*-Fusionen [93]. Dies konnte im Fall der einen *NTRK3*-Fusion in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden, wobei auch eine der 11 *NTRK1*-Fusionen nur eine geringe Intensität in der pan-TRK-IHC zeigte.

Auf der anderen Seite wurde in dieser Arbeit ein Fall eines pan-TRK-positiven Tumors beobachtet, bei dem sich sowohl bei der RNA-Sequenzierung als auch bei der *NTRK1/2/3*-FISH keine *NTRK*-Fusion nachweisen ließ und der folglich als falsch-positiv gewertet wurde. Die Spezifität der pan-TRK-IHC liegt somit in dieser Arbeit unter 100 %. Im Gegensatz dazu haben Solomon, Linkov et al. und auch Hechtman, Benayed et al. eine Spezifität von 100 % für die Detektion von *NTRK*-Fusionen mittels pan-TRK-IHC bei kolorektalen Karzinomen beobachtet [92, 108].

Insgesamt gab es von den 12 *NTRK*-Fusionen in dieser Arbeit 11 *NTRK1*-Fusionen und 1 *NTRK3*-Fusion. Eine *NTRK2*-Fusion wurde nicht detektiert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien, bei denen ebenfalls größtenteils *NTRK1*-Fusionen und einige *NTRK3*-Fusionen, aber keine *NTRK2*-Fusionen detektiert wurden [94, 122, 124]. *NTRK2*-Fusionen werden nur vereinzelt bei Kolonkarzinomen beschrieben [105, 125]. Bei den 12 *NTRK*-Fusionen handelte es sich um 5 *TPM3-NTRK1*- und 2 *LMNA-NTRK1*-Fusionen, sowie 1 *TPR-NTRK1*-, 1 *TFG-NTRK1*-, 1 *SCYL3-NTRK1*-, 1 *IRF2BP2-NTRK1*- und 1 *EML4-NTRK3*-Fusion. Dass die *TPM3-NTRK1*-Fusion die häufigste *NTRK*-Fusion bei Kolonkarzinomen ist, konnte auch bei vielen vorherigen Studien beobachtet werden [93, 122, 124, 126]. Fast alle anderen *NTRK*-Fusionen wurden ebenfalls bereits beim Kolonkarzinom beschrieben: *LMNA-NTRK1* [122–125], *TPR-NTRK1* [124, 125], *SCYL3-NTRK1* [127], *IRF2BP2-NTRK1* [123] und *EML4-NTRK3* [81, 82, 124]. Einzig die *TFG-NTRK1*-Fusion wurde bislang bei Schilddrüsenkarzinomen, aber nicht beim Kolonkarzinom, berichtet [128].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Hypothese, dass sich *NTRK*-Fusionen auf der einen und Mutationen in den onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* auf der anderen Seite gegenseitig ausschließen. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Keines der 12 MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion wies zusätzlich eine Mutation in einem der vier onkogenen Treibergene auf und es konnte eine signifikante Assoziation mit dem Wildtyp aller vier Treibergene festgestellt werden ($p < 0,001$). Die Häufigkeit von *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen mit *BRAF*-, *KRAS*-, *NRAS*- und *PIK3CA*-Wildtyp lag in dieser Arbeit bei 13,79 % und war damit im Vergleich zu den 2,92 % in MSI-high-Kolonkarzinomen insgesamt deutlich erhöht. Die Beobachtung, dass *NTRK*-Fusionen - aber auch andere Genfusionen - auf der einen und Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* oder *PIK3CA*

auf der anderen Seite sich gegenseitig ausschließen, konnte bereits mehrfach bestätigt werden [81–84, 92, 124].

Der naheliegendste Grund dafür liegt darin, dass sowohl die *NTRK*-Gene als auch die Gene *BRAF*, *KRAS* und *NRAS* in den MAPK-Signalweg involviert sind. Eine *NTRK*-Fusion in diesem Signalweg kann für einen malignen Aktivierungsprozess desselbigen ausreichen, ohne dass zusätzliche Mutationen im MAPK-Signalweg nötig werden. Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, auf welche an anderer Stelle detailliert eingegangen wird. In der Genexpressionsanalyse wiesen die Gene *BRAF* und *KRAS* eine signifikante Erhöhung der Genexpression in *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren gegenüber *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren auf, obwohl alle in der Analyse mit einbezogenen Tumore den *BRAF*- und *KRAS*-Wildtyp aufwiesen. Da die Überexpression von *BRAF* und *KRAS* nicht durch korrespondierende Mutationen hervorgerufen wurde, wird diese auf die Überaktivierung des MAPK-Signalwegs durch den Einfluss der *NTRK*-Fusion zurückzuführen sein. Somit ist die durch die *NTRK*-Fusion bedingte Aktivierung des TRK-Rezeptors stark genug, sodass auch die dem TRK-Rezeptor nachgeschalteten Proteine, wie *BRAF* und *KRAS*, eine erhöhte Aktivität aufweisen und deren zugehörigen Gene vermehrt exprimiert werden.

Zusätzlich ließe sich in diesem Zusammenhang auch erklären, weshalb Koexistenzen von Mutationen mit *NTRK*-Fusionen in anderen onkogenen Signalwegen wie p53 oder Wnt/ β -Catenin, welche beim Weg der chromosomalen Instabilität (CIN) des Kolonkarzinoms eine Rolle spielen, vorkommen können [85, 93, 122]. Diese Signalwege werden durch die Effekte einer *NTRK*-Fusion nicht direkt beeinflusst.

Etwas anders scheint der Effekt von *NTRK*-Fusionen im PI3K/AKT-Signalweg zu sein. Zwar schlossen sich in dieser Arbeit *NTRK*-Fusionen und Mutationen in *PIK3CA* gegenseitig aus, jedoch wurde in vorigen Studien eine Koexistenz von *NTRK*-Fusionen mit anderen Mutationen im PI3K/AKT-Signalweg beobachtet, die nicht *PIK3CA* betrafen [85, 93]. Wang, Li et al. folgerten daraus, dass der PI3K/AKT-Signalweg im Gegensatz zum MAPK-Signalweg möglicherweise durch den Effekt einer *NTRK*-Fusion nicht ausreichend aktiviert wird, um einen malignen Aktivierungsprozess in Gang zu setzen [85].

Trotz der zahlreichen Studien, die das gleichzeitige Vorkommen von *NTRK*-Fusionen mit Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* ausschließen, konnte in seltenen Fällen eine Koexistenz beobachtet werden. So identifizierten Wang, Li et al. die Koexistenz einer *RUNX1-NTRK3*-Fusion mit einer *KRAS*-Mutation [122]. Bei diesem Patienten handelte es

sich allerdings um ein MSS-Rektumkarzinom. Ebenso entdeckten Ukkola, Nummela et al. eine *TPM3-NTRK1*-Fusion mit einer *KRAS*-Mutation in einem MSS-Kolonkarzinom [123]. Dies lässt vermuten, dass in den weniger häufigen Fällen von *NTRK*-positiven MSS-KRK eine zusätzliche Mutation im MAPK-Signalweg nötig sein kann, um diesen Signalweg für die Karzinogenese ausreichend zu aktivieren. Im Gegensatz dazu ist die *NTRK*-Fusion im MSI-high-KRK als primärer onkogener Treiber des MAPK-Signalwegs wahrscheinlich ausreichend, weshalb keine weiteren Mutationen in diesem zu erwarten sind [93].

Im Hinblick auf die Mikrosatelliteninstabilität wiesen alle 12 *NTRK*-positiven Tumore einen Ausfall der MMR-Proteine MLH1 und PMS2 auf, während die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 bei allen 12 Tumoren nicht ausgefallen waren. Da MSI-high-Kolonkarzinome mit einem Ausfall von MLH1/PMS2 deutlich häufiger sind als solche mit einem Ausfall von MSH2/MSH6, ist dies weniger relevant, auch wenn in einigen Studien betont wird, dass insbesondere Tumore mit einem Ausfall von MLH1 besonders viele Genfusionen aufweisen [123, 129].

Insgesamt sollten MSI-high-Kolonkarzinome unabhängig davon, welche MMR-Proteine ausgefallen sind, auf *NTRK*-Fusionen untersucht werden, wenn sie zusätzlich den Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufweisen. In diesem Fall ist Häufigkeit von *NTRK*-Fusionen deutlich erhöht. In MSI-high-Kolonkarzinomen schließen sich *NTRK*-Fusionen und Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* gegenseitig aus, sodass davon auszugehen ist, dass die *NTRK*-Fusion hierbei als primärer onkogener Treiber des MAPK-Signalwegs fungiert.

Im Folgenden werden zunächst die klinischen Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion diskutiert. Das Durchschnittsalter der Patienten mit *NTRK*-positivem MSI-high-Kolonkarzinom betrug in dieser Arbeit 71 Jahre und wich damit nur geringfügig vom Durchschnittsalter der Patienten ohne *NTRK*-Fusion (72 Jahre) ab. *NTRK*-Fusionen kommen beim Kolonkarzinom im fortgeschrittenem Lebensalter vor, allerdings tritt das Kolonkarzinom in der Altersgruppe der 70- bis 79-Jährigen auch am häufigsten auf, sodass das fortgeschrittene Lebensalter kein signifikantes Merkmal von Patienten mit *NTRK*-Fusion darstellt [3]. Der jüngste Patient mit einer *NTRK*-Fusion war in dieser Arbeit 57 Jahre alt und auch in anderen Studien wurde beobachtet, dass *NTRK*-Fusionen beim Kolonkarzinom ab einem Alter von 50 Jahren auftreten, wobei das Durchschnittsalter um die 70 Jahre liegt [93, 122].

NTRK-Fusionen kommen bei weiblichen und männlichen Patienten vor. Zwar wurden in dieser Arbeit mehr Frauen ($n = 7$) als Männer ($n = 5$) mit einer *NTRK*-Fusion detektiert, jedoch waren Männer in Relation häufiger betroffen (3,50 % vs. 2,62 %), wenn auch nicht signifikant. Die verbreitete Beobachtung, dass *NTRK*-Fusionen bei Frauen häufiger vorkommen, wird in dieser Arbeit nicht geteilt [87, 93, 130]. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte darin liegen, dass hier, im Gegensatz zu den anderen Studien, ein reines MSI-Kollektiv betrachtet wurde. Sowohl Genfusionen als auch das weibliche Geschlecht sind mit MSI-high-Tumoren assoziiert [39, 82]. Folglich werden in einem gemischten Kollektiv aus MSI- und MSS-Tumoren Genfusionen vermehrt bei MSI-Tumoren und damit vermehrt bei Frauen beobachtet. Dies ist in einem reinen MSI-Kollektiv nicht der Fall. Insgesamt ist der Unterschied zwischen den Geschlechtern in jedem Fall nur gering und *NTRK*-Fusionen treten bei beiden Geschlechtern relativ ausgeglichen auf.

NTRK-Fusionen treten in allen lokal-begrenzten Tumorstadien nach UICC (I - III) auf und sind nicht signifikant mit einem UICC-Stadium assoziiert ($p = 0,224$), auch wenn die meisten *NTRK*-Fusionen ($n = 8/12$) in diesem Kollektiv im UICC-Stadium II auftraten. Sie können also, wie alle Genfusionen, schon ein frühes Ereignis in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms darstellen, was Yang, Wang et al. in ihrer Studie anhand einer Ganzgenomsequenzierung von 63 kolorektalen Karzinomen bereits zeigen konnten [131].

Bei genauerer Betrachtung der TNM-Klassifikation fiel interessanterweise auf, dass in dieser Arbeit 10 von 12 Tumoren (83,33 %) mit *NTRK*-Fusion das T-Stadium T3 aufwiesen, was einer lokalen Infiltration des Tumors bis in die Subserosa bzw. bis in das perikolische Fettgewebe entspricht. *NTRK*-Fusionen waren in dieser Arbeit zwar nicht signifikant mit dem T3-Stadium assoziiert ($p = 0,066$), scheinen allerdings in diesem Stadium häufiger aufzutreten. Lasota, Chlopek et al. konnten diese Beobachtung in ihrem Kollektiv ebenfalls feststellen [93]. Weshalb *NTRK*-Fusionen im weiter fortgeschrittenen Stadium T4 weniger häufig auftreten, ist bislang nicht geklärt. Möglicherweise ist ein Grund dafür, dass bis zum Stadium T4 bereits andere DNA-Alterationen wie Mutationen aufgetreten sind, die wiederum das Auftreten von Genfusionen in diesem Stadium unwahrscheinlicher werden lassen [81, 123]. Dafür spricht, dass in diesem Kollektiv von den 186 MSI-high-Kolonkarzinomen im Stadium T3 49 (26,34 %) den Wildtyp in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufwiesen, während es von den 125 MSI-high-Kolonkarzinomen im Stadium T4 nur 18 (14,4 %) waren.

Es gibt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen *NTRK*-Fusionen und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,848$). Dies gilt zumindest für lokal begrenzte Kolonkarzinome, was durch weitere Studien mit der gleichen Beobachtung gestützt wird [123, 132]. Beim metastasierten Kolonkarzinom konnte in der Vergangenheit dagegen ein Zusammenhang von *NTRK*-Fusionen mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden [87].

Im Hinblick auf die Lokalisation von Karzinomen mit *NTRK*-Fusion im Darm wurde in dieser Arbeit entgegen der Erwartung keine Assoziation mit rechtsseitigen Kolonkarzinomen beobachtet. Interessanterweise wurde im Gegenteil festgestellt, dass die Karzinome mit *NTRK*-Fusion signifikant mit einer Lokalisation des Tumors im linksseitigen Kolon assoziiert waren ($p < 0,001$). 12,66 % ($n = 10/79$) der linksseitigen MSI-high-Kolonkarzinome wiesen eine *NTRK*-Fusion auf. Die meisten Studien zu Kolonkarzinomen mit Genfusionen allgemein und *NTRK*-Fusionen im Speziellen haben eine Assoziation zu rechtsseitiger Tumorlokalisierung herstellen können [82, 87, 93, 125, 130] und in einige Studien konnte gar keine Assoziation beobachtet werden [123, 132]. Dass aber *NTRK*-Fusionen mit linksseitigen Kolonkarzinomen assoziiert sind, ist eine neue Beobachtung. Die Ursache für diese Diskrepanz liegt ebenfalls darin, dass in dieser Arbeit ein Kollektiv einzig bestehend aus MSI-high-Kolonkarzinomen betrachtet wurde. In bisherigen Studien wurde meist ein gemischtes Kollektiv aus MSI- und MSS-Kolonkarzinomen betrachtet. Dabei wurde beobachtet, dass Genfusionen rechtsseitig häufiger vorkommen, da rechtsseitige Kolonkarzinome viel häufiger MSI aufweisen als linksseitige, wodurch das Auftreten von Genfusionen dort wahrscheinlicher wird [82, 83]. Auch in dieser Arbeit waren von den 411 MSI-high-Kolonkarzinomen 331 im rechtsseitigen Kolon lokalisiert, während nur 79 im linksseitigen Kolon lokalisiert waren (zusätzlich gab es einen Tumor mit unbekannter Lokalisation). Man muss zusätzlich berücksichtigen, dass Genfusionen, wie hier und auch in früheren Studien gezeigt werden konnte, mit dem Wildtyp in den Treibergen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* assoziiert sind [81, 82]. Von den 331 rechtsseitigen Kolonkarzinomen in diesem Kollektiv wiesen nur 14,2 % ($n = 47$) den Wildtyp in allen vier Treibergen auf, während von den 79 linksseitigen Kolonkarzinomen 50,6 % ($n = 40$) den Wildtyp in allen vier Treibergen aufwiesen. Linksseitige Kolonkarzinome weisen relativ gesehen also deutlich häufiger den Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* auf, während rechtsseitige Kolonkarzinome vermehrt Mutationen in diesen Genen aufweisen [133–136].

Dadurch besteht innerhalb der Gruppe der MSI-high-Kolonkarzinome eine Assoziation zwischen *NTRK*-Fusionen und linksseitiger Tumorlokalisation.

Nichtsdestotrotz wäre eine größere Zahl an *NTRK*-Fusionen auch bei den rechtsseitigen Tumoren zu erwarten gewesen, da der oben beschriebenen Argumentation nach ein annähernd gleiches Verhältnis von *NTRK*-Fusionen in linksseitigen und rechtsseitigen Kolonkarzinomen vorkommen müsste, sofern sie MSI-high sind und den Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufweisen. Tatsächlich wiesen aber von den MSI-high-Tumoren mit dem Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* linksseitig $n = 10/40$ (25 %) eine *NTRK*-Fusion auf, während rechtsseitig nur $n = 2/47$ (4,26 %) der MSI-high-Tumore mit dem Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* eine *NTRK*-Fusion aufwiesen. Als mögliche Ursachen für diese deutlich geringere Zahl an *NTRK*-Fusionen bei rechtsseitigen MSI-high-Tumoren mit dem Wildtyp in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* müssen weitere molekularpathologische Einflussfaktoren und auch falsch-negative Ergebnisse in der pan-TRK-IHC in Betracht gezogen werden.

Neben dem Zusammenhang zwischen *NTRK*-Fusionen und linksseitiger Tumorlokalisation in MSI-high-Kolonkarzinomen sollte auch ein genauerer Blick auf die spezifische Lokalisation der *NTRK*-positiven Tumore geworfen werden. Loree, Pereira et al. haben diesbezüglich festgestellt, dass die pauschale Einteilung in rechts- und linksseitige Kolonkarzinome die molekularpathologischen Subgruppen von Kolonkarzinomen nicht ausreichend berücksichtigt [137]. Betrachtet man die spezifische Lokalisation von *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren, so lässt sich feststellen, dass diese im gesamten linken Hemikolon vorkommen. In der linken Kolonflexur hatten 15,38 % ($n = 2/13$), im Colon descendens 12,50 % ($n = 3/24$) und im Colon sigmoideum ebenfalls 12,50 % ($n = 5/40$) der MSI-high-Tumore eine *NTRK*-Fusion. Im rechten Hemikolon waren die beiden *NTRK*-Fusionen im Colon ascendens lokalisiert und machten dort einen Anteil von 1,32 % ($n = 2/151$) aus. Somit lässt sich keine spezifische Lokalisation von Tumoren mit *NTRK*-Fusion feststellen. Dennoch ist anzumerken, dass Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion auch an unüblichen Lokalisationen, wie zum Beispiel der linken Kolonflexur, vorkommen, was Lasota, Chlopek et al. ebenfalls beobachten konnten [93].

NTRK-positive MSI-high-Tumore sind nicht mit dem zusätzlichen Auftreten eines weiteren Karzinoms im Darm und auch nicht mit dem Auftreten eines anderen Karzinoms assoziiert, wobei es in dieser Arbeit einen Patienten gab, der zusätzlich zu einem *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinom ein Prostatakarzinom hatte und eine Patientin, die zusätzlich ein

Mammakarzinom aufwies. Bislang sind keine Daten zum Zusammenhang von *NTRK*-positiven Tumoren mit dem Auftreten von weiteren Tumoren veröffentlicht worden. Lediglich Yamashiro, Kurihara et al. berichten in ihrer Studie von einem Patienten, der neben einem *NTRK*-positiven Kolonkarzinom einen weiteren Tumor, in diesem Fall ein Thymom, aufwies [138].

Histologisch handelt es sich bei Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusionen um Adenokarzinome des Kolons, was sowohl in dieser Arbeit als auch in vorherigen Studien belegt wurde [122, 138]. Das Adenokarzinom stellt allerdings auch den mit Abstand häufigsten malignen Tumor des Kolons dar, weshalb Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion nicht signifikant mit diesem histologischen Subtyp assoziiert sind [14, 15]. Ob ein bestimmter Subtyp des Adenokarzinoms mit dem Auftreten von *NTRK*-Fusionen zusammenhängt, konnte bislang nicht eindeutig ermittelt werden. Lasota, Chlopek et al. berichten in ihrer Studie davon, dass *NTRK*-positive Kolonkarzinome zum Großteil muzinöse Adenokarzinome sind und dass sie zudem ein Siegelringezellkarzinom mit einer *NTRK*-Fusion in ihrem Kollektiv entdeckt haben [93]. Auch Yamashiro, Kurihara et al. haben in ihrer Studie eine *NTRK*-Fusion in einem muzinösen Adenokarzinom entdeckt [138]. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit und der Studie von Pietrantonio, Di Nicolantonio et al., bei der ebenfalls kein Adenokarzinom eine muzinöse Komponente aufwies [87]. Ebenso konnten Bang, Lee et al. keine besonderen histologischen Subgruppen des Adenokarzinoms mit dem Auftreten von *NTRK*-Fusionen in Verbindung bringen [126]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den unterschiedlichen Ergebnissen der zitierten Studien lässt sich schließen, dass *NTRK*-Fusionen bei verschiedenen Subtypen des Adenokarzinoms des Kolons auftreten können und mit keinem Subtyp signifikant assoziiert sind.

Als Nächstes sollte die Hypothese geprüft werden, dass *NTRK*-Fusionen die Prognose von MSI-high-Kolonkarzinomen verschlechtern. Dazu wurden die Follow-Up-Daten zum Überleben und zum Auftreten von Rezidiven ausgewertet. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Patienten mit *NTRK*-positivem MSI-high-Kolonkarzinom und *NTRK*-negativen MSI-high-Kolonkarzinom festgestellt werden ($p = 0,941$). In beiden Gruppen lebten zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung relativ noch annähernd gleich viele Patienten (*NTRK*-positive: 83,33 % vs. *NTRK*-negative: 79,70 %). Die mediane Überlebenszeit konnte nicht angegeben werden, da in beiden Gruppen noch mehr als 50 % der Patienten lebten. Die geschätzte mittlere Überlebenszeit lag bei der

NTRK-positiven Kohorte bei 60,45 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 39,25 - 81,66 Monate) und in der *NTRK*-negativen Kohorte bei 83,99 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 74,08 - 93,91 Monate). Aus zwei Gründen ist die Aussagekraft dieser geschätzten mittleren Überlebenszeiten sehr begrenzt: Zum einen wird die mittlere Überlebenszeit maßgeblich von den Zensierungen beeinflusst und zum anderen ist die Fallzahl in der *NTRK*-positiven Kohorte sehr gering, sodass ein weites 95%-Konfidenzintervall entsteht [139]. Da die mediane Überlebenszeit als robusterer Wert nicht berechnet werden konnte, kann hier kein aussagekräftiger Vergleich der Überlebenszeiten zwischen der *NTRK*-positiven und der *NTRK*-negativen Kohorte hergestellt werden. Es bleibt lediglich festzuhalten, dass sich das Gesamtüberleben zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterscheidet.

Ebenso wie beim Gesamtüberleben verhält es sich beim Auftreten von Rezidiven. In dieser Arbeit unterschied sich die Häufigkeit eines Lokalrezidivs in der *NTRK*-positiven und in der *NTRK*-negativen Kohorte nicht signifikant ($p = 1$). In beiden Gruppen ist zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung bei einem annähernd gleich hohen Anteil von Patienten ein Lokalrezidiv aufgetreten (*NTRK*-positive: 8,33 % vs. *NTRK*-negative: 11,11 %).

Bislang gibt es wenige Daten bezüglich des Einflusses von *NTRK*-Fusionen auf die Prognose von Kolonkarzinomen, was hauptsächlich der geringen Anzahl von entsprechenden Patienten geschuldet ist. Pietrantonio, Di Nicolantonio et al. haben in ihrer Studie zu *ALK*-, *ROS1*- und *NTRK*-Fusionen beim Kolonkarzinom eine signifikant schlechtere Prognose - auch unabhängig vom MSI-Status - bei Fusions-positiven Tumoren festgestellt [87]. Allerdings wurde in der genannten Studie das metastasierte und nicht das lokal begrenzte Kolonkarzinom untersucht. Drei andere Studien haben die Prognose von *NTRK*-Fusionen in verschiedenen soliden Tumoren insgesamt untersucht, bei der die meisten *NTRK*-Fusionen jeweils in der Gruppe der kolorektalen Karzinome ($n = 7/27$, $n = 9/38$ bzw. $n = 9/28$) vorkamen. In allen drei Studien konnte kein signifikanter Unterschied in der Prognose von *NTRK*-positiven und *NTRK*-negativen soliden Tumoren festgestellt werden [140–142]. Choi, Kwon et al. haben lokal begrenzte Kolonkarzinome mit verschiedenen Genfusionen, darunter auch *NTRK*-Fusionen, bezüglich deren Prognose untersucht und konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu Kolonkarzinomen ohne Fusion feststellen [86].

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der genannten Studien deuten darauf hin, dass *NTRK*-Fusionen zumindest im lokal begrenzten Stadium weder einen negativen noch einen positiven prognostischen Einfluss auf das Kolonkarzinom haben. Insgesamt sind sowohl diese Arbeit als auch die zitierten Studien in ihrer Aussagekraft limitiert, da sie nur relativ

geringe Fallzahlen von *NTRK*-positiven Karzinomen aufweisen und auch der Beobachtungszeitraum nicht ausreichend lang ist. Es sind Studien mit größeren Fallzahlen und längeren Follow-Up-Zeiten von *NTRK*-positiven Kolonkarzinomen nötig, um deren Einfluss auf die Prognose zuverlässig bestimmen zu können.

Da Patienten mit einem hereditären Kolonkarzinom im Rahmen des Lynch-Syndroms charakteristisch ein MSI-high-Kolonkarzinom aufweisen, sollte geprüft werden, ob Tumore mit *NTRK*-Fusion bei Patienten mit einem hereditären MSI-high-Kolonkarzinom im Rahmen des Lynch-Syndroms oder bei Patienten mit einem sporadischen MSI-high-Kolonkarzinom häufiger sind. In dieser Arbeit waren alle Tumore mit *NTRK*-Fusion ($n = 12/12$) sporadische MSI-high-Kolonkarzinome, da sie alle eine Methylierung des *MLH1*-Promotors aufwiesen. Diese Beobachtung wird in der Literatur genauso geteilt und trifft auch auf andere Genfusionen zu [82, 84, 85, 143]. Lediglich Svrcek, Colle et al. berichten über zwei *NTRK*-Fusionen, die beim metastasierten Kolonkarzinom im Rahmen des Lynch-Syndroms detektiert wurden [95]. Insgesamt treten *NTRK*-Fusionen also fast ausschließlich beim sporadischen MSI-high-Kolonkarzinom auf.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse sollte nun untersucht werden, ob *NTRK*-Fusionen tatsächlich auch mit einer vermehrten Expression der *NTRK*-Gene *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* einhergehen. Der Vergleich der Genexpression der 12 MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion mit 12 MSI-high-Kolonkarzinomen ohne *NTRK*-Fusion zeigte eine signifikant erhöhte Expression des *NTRK1*-Gens in der Kohorte mit *NTRK*-Fusion um das 116-fache der negativen Kohorte ($p < 0,0001$), während die Gene *NTRK2* und *NTRK3* nicht signifikant vermehrt exprimiert wurden. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass 11 der 12 *NTRK*-positiven Tumore eine *NTRK1*-Fusion hatten, während nur ein Tumor mit einer *NTRK3*-Fusion und kein Tumor mit einer *NTRK2*-Fusion detektiert wurde. Okamura, Boichard et al. haben diesbezüglich die *NTRK*-Expression in verschiedenen adulten Tumorentitäten insgesamt untersucht [144]. Sie konnten anhand von 31 *NTRK*-positiven Tumoren feststellen, dass die Genexpression von allen drei *NTRK*-Genen gegenüber *NTRK*-negativen Tumoren signifikant erhöht war. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Gene *NTRK2* und *NTRK3* ebenfalls überexprimiert werden, sofern eine *NTRK2*- bzw. *NTRK3*-Fusion vorliegt, auch wenn dies in dieser Arbeit aufgrund der mangelnden Fallzahl dieser Fusionen nicht nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits zu Beginn der Diskussion erwähnt, wurde bei Betrachtung der Gene, die in die Signalkaskaden der TRK-Rezeptoren involviert sind, eine signifikante Erhöhung von *KRAS* und *BRAF* aus dem MAPK-Signalweg um mehr als das Dreifache in *NTRK*-positiven MSI-high-Tumoren beobachtet. Sowohl alle 12 *NTRK*-positiven als auch alle 12 *NTRK*-negativen MSI-high-Kolonkarzinome, die in die Genexpressionsanalyse mit einbezogen wurden, wiesen den Wildtyp in den Genen *KRAS* und *BRAF* auf, sodass eine vermehrte Expression aufgrund einer Mutation in diesen Genen ausgeschlossen werden konnte. Demnach steht die erhöhte Genexpression von *KRAS* und *BRAF* wahrscheinlich in Zusammenhang mit der durch die *NTRK*-Fusion bedingten gesteigerten Aktivität im MAPK-Signalweg.

Insgesamt bekräftigen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, dass *NTRK*-Fusionen tatsächlich zu einer vermehrten Expression von TRK-Rezeptoren führen, wodurch die nachgeschalteten Signalwege übermäßig aktiviert werden und durch vermehrte Zellproliferation die Entstehung eines Karzinoms begünstigt wird.

Im Zuge der zielgerichteten Therapie von Kolonkarzinomen spielen auch Immuncheckpoint-Inhibitoren eine zunehmend größere Rolle. Um herauszufinden, ob MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion von einer solchen Therapie zusätzlich profitieren könnten, wurde die PD-L1-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen bestimmt. In dieser Arbeit wiesen 11 von 12 Tumoren (91,67 %) mit *NTRK*-Fusion eine PD-L1-Expression der Tumorzellen auf. Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen von Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion wurde auch in anderen Studien beobachtet. Lasota, Chlopek et al. konnten in ihrer Studie zu kolorektalen Karzinomen bei den meisten *NTRK*-positiven Tumoren eine PD-L1-Expression der Tumorzellen beobachten, auch wenn diese zum Großteil nur schwach und fokal war [93]. Weniger häufig detektierten Gatalica, Xiu et al. die Expression von PD-L1 in ihrer Studie zu *NTRK*-Fusionen in verschiedenen Tumorentitäten (n = 7/30, 23 %) [107]. Tatsächlich konnten Wang, Yi et al. eine PD-L1-Expression in MSI-high-Kolonkarzinomen mit Genfusion in 5 von 11 Tumoren (46 %) beobachten, sodass die PD-L1-Expression im Vergleich zu MSI-high-Kolonkarzinomen ohne Genfusion signifikant erhöht war ($p < 0,001$) [129]. Diese Beobachtung ist interessant, wenn man bedenkt, dass die PD-L1-Expression in MSI-high-Kolonkarzinomen insgesamt bereits erhöht ist [115, 145–147]. Da in dieser Arbeit die PD-L1-Expression von MSI-high-Tumoren ohne Genfusion nicht getestet wurde, kann hier nicht bestätigt werden, dass Genfusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen signifikant mit einer Expression von PD-L1 assoziiert sind.

Dennoch weisen MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion häufig auch eine PD-L1-Expression auf, sodass die PD-L1-Expression in diesen Fällen ebenfalls mitbestimmt werden sollte. Patienten mit *NTRK*-Fusion und PD-L1-Expression könnten zusätzlich zu einer Therapie mit TRK-Inhibitoren auch von einer Therapie mit PD-L1-Inhibitoren profitieren [122]. Diesbezüglich sind klinische Studien nötig, um den Nutzen einer solchen Kombinationstherapie zu untersuchen.

Im Rahmen der Untersuchung der Tumormikroumgebung von *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinomen wurde geprüft, in welchem Ausmaß diese Karzinome tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TILs) aufweisen. In dieser Arbeit lag die Dichte von TILs im Zentrum *NTRK*-positiver MSI-high-Tumore durchschnittlich bei 1033 CD3⁺-T-Lymphozyten/mm², bei 657 CD4⁺-T-Lymphozyten/mm² und bei 856 CD8⁺-T-Lymphozyten/mm². Wie bereits in vorigen Studien zu TILs in kolorektalen Karzinomen berichtet worden ist, war die Varianz in der Anzahl der TILs auch in dieser Arbeit groß [45, 148]. Im Vergleich zu anderen Studien, in denen TILs in Kolonkarzinomen insgesamt untersucht worden sind, war der Mittelwert der TILs im Zentrum der *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinome in dieser Arbeit erhöht. So betrug der Mittelwert der TILs im Zentrum des Tumors in einer Studie von Pagès, Mlecnik et al., in welcher 3539 Kolonkarzinome untersucht worden sind, 693 CD3⁺-T-Lymphozyten/mm² bzw. 241 CD8⁺-T-Lymphozyten/mm² [45]. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie von Glaire, Domingo et al. mit 1137 kolorektalen Karzinomen, wobei der Mittelwert der TILs im Zentrum des Tumors bei 596 CD3⁺-T-Lymphozyten/mm² bzw. 232 CD8⁺-T-Lymphozyten/mm² lag [57]. Allerdings sind die Mittelwerte der TILs in dieser Arbeit in ihrer Aussagekraft limitiert. Dies liegt zum einen methodisch an der manuellen Auszählung der Zellen, wodurch die Objektivität begrenzt wird. Zum anderen ist in dieser Arbeit im Vergleich zu den genannten Studien nur ein sehr kleines Kollektiv untersucht worden, in dem zusätzlich eine große Varianz in der Anzahl der TILs vorlag. Trotzdem haben auch Lasota, Chlopek et al. über hohe Zahlen an CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinomen berichtet [93]. Dabei waren die CD4⁺-T-Lymphozyten - passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit - weniger präsent als die CD8⁺-T-Lymphozyten. Hohe Zahlen an TILs - insbesondere an CD3⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten - werden mit einer guten Prognose in Zusammenhang gebracht [45, 149, 150]. In vorigen Studien wurden hohe Zahlen an TILs vor allem in MSI-high-Kolonkarzinomen beobachtet, während MSS-Kolonkarzinome eine geringere Zahl an TILs aufwiesen [149, 151–153]. Dies ist

wahrscheinlich neben dem geringeren Metastasierungspotential ein weiterer Faktor, weshalb MSI-high-Tumore gegenüber MSS-Tumoren eine bessere Prognose aufweisen [38–41]. Zusammenfassend weisen *NTRK*-positive MSI-high-Kolonkarzinome, wie die meisten MSI-high-Kolonkarzinome, eine hohe Infiltration von T-Lymphozyten auf, weshalb sie möglicherweise zumindest gegenüber MSS-Kolonkarzinomen prognostisch günstiger sein könnten.

Zuletzt wurde im MSI-Kollektiv nach weiteren Genfusionen gesucht. Dass zu diesem Zweck die Immunhistochemie im Gegensatz zur pan-TRK-IHC bei *NTRK*-Fusionen unzuverlässig ist, wurde bereits in mehreren Studien festgestellt. So wurde zum Beispiel belegt, dass die Sensitivität der RET-IHC zur Detektion von *RET*-Fusionen erheblich durch den Fusionspartner beeinflusst wird [154]. Auch die ALK-IHC kann zwar für die Detektion von *ALK*-Fusionen beim kolorektalen Karzinom verwendet werden, weist aber häufig falsch-negative Ergebnisse auf [155–158]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine *GCC2-ALK*-Fusion mittels RNA-Sequenzierung detektiert, welche in der ALK-IHC keine Färbung zeigte.

Durch Zuhilfenahme der Beobachtungen von *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen wurden schließlich Genfusionen mittels RNA-Sequenzierung in 5 von 16 (31,25 %) *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren detektiert, welche im linksseitigen Kolon lokalisiert waren sowie das T-Stadium T3 und den Wildtyp in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufwiesen.

Auch wenn in dieser Arbeit nur ein kleines Kollektiv von 16 *NTRK*-negativen MSI-high-Kolonkarzinomen mit ähnlichen Eigenschaften zu *NTRK*-positiven MSI-high-Kolonkarzinomen auf weitere Genfusionen untersucht wurde, wird deutlich, dass diese Eigenschaften auch auf MSI-high-Kolonkarzinome mit anderen Genfusionen zutreffen. Dies wird durch den Unterschied in den Prävalenzen verdeutlicht: Während Genfusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen insgesamt eine Prävalenz von ca. 5 % aufweisen, ist die Prävalenz in MSI-high-Kolonkarzinomen mit den oben genannten Eigenschaften auf über 30 % erhöht [82, 83].

Es wurden 2 *ALK*-Fusionen (*GCC2-ALK* und *STRN-ALK*), 2 *RET*-Fusionen (*CCDC6-RET* und *NCOA4-RET*) und eine *TFG-ADGRG7*-Fusion detektiert. Einige dieser Fusionen sind bereits beim Kolonkarzinom berichtet worden: *STRN-ALK* [156, 159], *CCDC6-RET* [160, 161] und *NCOA4-RET* [160, 161]. Dagegen wurde die *GCC2-ALK*-Fusion bislang beim Kolonkarzinom nicht berichtet, dafür aber beim Lungenkarzinom [162, 163]. Genauso wurde die *TFG*-

ADGRG7-Fusion bislang bei Lymphomen und beim Medulloblastom, aber nicht beim Kolonkarzinom beschrieben [164, 165].

Genfusionen kommen häufig bei MSI-high-Kolonkarzinomen vor, die den Wildtyp in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufweisen. Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit bei linksseitiger Tumorlokalisation und dem T-Stadium T3. Da ein Screening auf Genfusionen mittels NGS aktuell noch mit hohen Kosten verbunden ist, könnten diese Tumoreigenschaften eine bessere Prognose erlauben, ob solch ein Screening bei entsprechenden Patienten erfolgsversprechend wäre. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen den von Cocco, Benhamida et al. vorgeschlagenen Algorithmus, MSI-high-Kolonkarzinome mit *BRAF/RAS*-Wildtyp einem direkten Screening auf Genfusionen zu unterziehen, da diese von einer zielgerichteten Therapie profitieren könnten [82].

6. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren entwickeln sich die medikamentösen Therapieansätze maligner Tumore weg von den klassischen Chemotherapeutika, welche nicht zielgerichtet sind und starke Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus aufweisen, hin zu zielgerichteten Medikamenten, welche anhand der individuellen Tumormerkmale eines Patienten ausgewählt werden, wodurch der Tumor effektiver und nebenwirkungsärmer therapiert werden kann. Im Zuge dessen wird es zunehmend wichtiger, die molekularpathologischen Eigenschaften eines Tumors individuell zu bestimmen und diesen auf bestimmte Biomarker zu untersuchen, um Patienten die bestmögliche Therapie ihres Tumors zu ermöglichen. Eine Gruppe dieser Biomarker stellen die Genfusionen dar, welche häufig zu einer übermäßigen Expression von Rezeptoren in Tumorzellen führen, die wiederum maligne, proliferative Wachstumsprozesse in Gang setzen. In diesem Fall kann eine medikamentöse Blockade dieser Rezeptoren das Tumorwachstum stoppen.

Beim Kolonkarzinom stellen insbesondere *NTRK*-Fusionen, die vor allem in MSI-high-Kolonkarzinomen vorkommen, eine wichtige Subgruppe dar. Da *NTRK*-Fusionen insgesamt relativ selten auftreten und die molekulare Diagnostik mit hohen Kosten verbunden ist, ist es wichtig, die molekularpathologischen Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion zu kennen, um ein gezieltes Screening auf diese durchführen zu können. Das

Ziel dieser Arbeit war es, diese Eigenschaften von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion zu untersuchen.

In 411 MSI-high-Kolonkarzinomen wurden in dieser Arbeit 12 *NTRK*-Fusionen (2,92 %) detektiert, von denen eine Fusion (*TFG-NTRK1*) beim Kolonkarzinom noch nicht beschrieben worden ist. Damit war das Auftreten von *NTRK*-Fusionen in MSI-high-Kolonkarzinomen gegenüber allen Kolonkarzinomen erwartungsgemäß erhöht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion signifikant mit dem Wildtyp in den vier onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* assoziiert sind. Bei den MSI-high-Kolonkarzinomen schließen sich *NTRK*-Fusionen auf der einen und Mutationen in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* auf der anderen Seite gegenseitig aus. Die Expression des *NTRK1*-Gens war in MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion gegenüber MSI-high-Kolonkarzinomen ohne *NTRK*-Fusion signifikant erhöht, ebenso wie die Expression von *BRAF* und *KRAS*. Dadurch wird belegt, dass *NTRK*-Fusionen tatsächlich zu einer vermehrten Expression von TRK-Rezeptoren führen und nachgeschaltete Proteine und deren Gene ebenfalls vermehrt exprimiert und aktiviert werden. Im MAPK-Signalweg fungiert die *NTRK*-Fusion somit als primärer onkogener Treiber, sodass keine zusätzlichen Mutationen in diesem Signalweg nötig werden, um einen malignen Aktivierungsprozess in Gang zu setzen.

Außerdem wurde festgestellt, dass *NTRK*-Fusionen innerhalb der Gruppe der MSI-high-Kolonkarzinome signifikant mit Tumoren im linksseitigen Hemikolon assoziiert sind. Ursächlich dafür ist die nach distal zunehmende Häufigkeit des Wildtyps in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA*, wodurch dort die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von *NTRK*-Fusionen erhöht ist.

Bei allen MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion handelte es sich um sporadische Kolonkarzinome mit Methylierung des *MLH1*-Promotors, während keines dieser Karzinome hereditär im Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom auftrat.

Prognostisch konnte kein signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben und das Auftreten eines Rezidivs zwischen MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion und MSI-high-Kolonkarzinomen ohne *NTRK*-Fusion festgestellt werden, wobei die Aussagekraft aufgrund der geringen Anzahl von Tumoren mit *NTRK*-Fusion begrenzt war. Diesbezüglich sind Studien mit größeren Fallzahlen von Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion nötig, um den prognostischen Einfluss von *NTRK*-Fusionen zu ermitteln.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die meisten MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren und durch CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten infiltriert werden. Durch die Expression von PD-L1 könnten Patienten mit MSI-high-Kolonkarzinomen und *NTRK*-Fusion von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitieren. Die die MSI-high-Kolonkarzinome mit *NTRK*-Fusion infiltrierenden T-Lymphozyten sind als prognostisch günstiger Faktor zu werten.

Zuletzt wurden anhand der Merkmale von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion 16 MSI-high-Kolonkarzinome auf weitere Genfusionen gescreent. Dabei wurden fünf weitere Genfusionen (31,25 %) detektiert. Darunter waren zwei Fusionen (*GCC2-ALK* und *TFG-ADGRG7*), welche bislang beim Kolonkarzinom nicht berichtet worden sind. Andere Genfusionen kommen also ebenfalls häufig bei MSI-high-Kolonkarzinomen vor, die den Wildtyp in den Genen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufweisen und sich im linken Hemikolon befinden.

Zusammenfassend sollten MSI-high-Kolonkarzinome, die den Wildtyp in den vier onkogenen Treibergenen *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* und *PIK3CA* aufweisen, auf Genfusionen gescreent werden, vor allem wenn sie sich zusätzlich im linken Hemikolon befinden. Bei diesen Karzinomen ist das Auftreten von Genfusionen, wie z.B. *NTRK*-Fusionen, deutlich erhöht. Zusätzlich sollte der PD-L1-Status von MSI-high-Kolonkarzinomen mit *NTRK*-Fusion bestimmt werden, da diese Tumore häufig auch PD-L1 exprimieren, wodurch betroffene Patienten neben einer Therapie mit TRK-Inhibitoren wie Larotrectinib auch von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Atezolizumab profitieren könnten. Der Nutzen einer solchen Kombinationstherapie sollte in klinischen Studien untersucht werden. Auch wenn die Patienten mit MSI-high-Kolonkarzinom und Genfusion nur eine kleine Subgruppe der Darmkrebspatienten darstellen, so könnten diese Patienten in Zukunft von einer zielgerichteten Therapie ihres Tumors profitieren.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Krebsarten - Zentrum für Krebsregisterdaten (29.11.2021) (Zugriff vom 04.02.2023). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html;jsessionid=65C25E6ADB804E94FC6C99E53A595790.internet091
- [2] Cardoso R, Zhu A, Guo F, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H (2021) Incidence and Mortality of Proximal and Distal Colorectal Cancer in Germany—Trends in the Era of Screening Colonoscopy. *Dtsch Arztebl Int* 118:281–287
- [3] Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (2022) Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten Epi2021_1, verfügbare Diagnosejahre bis 2019. ZfKD – German Center for Cancer Registry Data at the RKI
- [4] Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (2020) Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten Epi2020_1, verfügbare Diagnosejahre bis 2018. ZfKD – German Center for Cancer Registry Data at the RKI
- [5] Luyao Guan, Yuan Lu (2018) New Developments in Molecular Targeted Therapy of Ovarian Cancer. *Discovery Medicine* 26:219–229
- [6] Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y (2020) Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Sig Transduct Target Ther* 5:22
- [7] Tamas K, Walenkamp AME, Vries EGE de, van Vugt MATM, Beets-Tan RG, van Etten B, Groot DJA de, Hospers GAP (2015) Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treatment Reviews* 41:671–679
- [8] Paschke S, Jafarov S, Staib L, Kreuser E-D, Maulbecker-Armstrong C, Roitman M, Holm T, Harris CC, Link K-H, Kornmann M (2018) Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 19:2577
- [9] Topdagi O, Timuroglu A (2018) Eighteen Years' Retrospective Review of Colorectal Cancer Cases in Eastern Population. *The Eurasian Journal of Medicine* 50:19–22
- [10] Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N (2008) Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Annals of surgical oncology* 15:2388–2394

- [11] Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y (2018) Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res* 11:264–273
- [12] Mukund K, Syulyukina N, Ramamoorthy S, Subramaniam S (2020) Right and left-sided colon cancers - specificity of molecular mechanisms in tumorigenesis and progression. *BMC Cancer* 20:317
- [13] Mik M, Berut M, Dziki L, Trzcinski R, Dziki A (2017) Right- and left-sided colon cancer - clinical and pathological differences of the disease entity in one organ. *Arch Med Sci* 13:157–162
- [14] Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012) Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3:153–173
- [15] Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg) (2019) *Pathologie. Das Lehrbuch*. Elsevier: München, Deutschland
- [16] Brierley JD (2017) *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons, Incorporated: Chicester
- [17] Souglakos J (2007) Genetic alterations in sporadic and hereditary colorectal cancer: implementations for screening and follow-up. *Dig Dis* 25:9–19
- [18] Hampel H (2018) Population Screening for Hereditary Colorectal Cancer. *Surgical oncology clinics of North America* 27:319–325
- [19] Weitz J, Knaebel H-P, Büchler MW (2003) Sporadisches und hereditäres Karzinom von Kolon und Rektum. Pathogenetisch different mit unterschiedlicher Therapieindikation. *Chirurg* 74:717–725
- [20] Lynch HT, La Chapelle A de (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:919–932
- [21] Nguyen LH, Goel A, Chung DC (2020) Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 158:291–302
- [22] Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G (2010) The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int* 107:760–766
- [23] Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759–767
- [24] Vacante M, Borzì AM, Basile F, Biondi A (2018) Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases* 6:869–881

- [25] Chen D, Huang J-F, Liu K, Zhang L-Q, Yang Z, Chuai Z-R, Wang Y-X, Shi D-C, Huang Q, Fu W-L (2014) BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9:e90607
- [26] Afrăsânie V-A, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, Miron L, Rusu C (2019) KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol* 53:265–274
- [27] Nosho K, Kawasaki T, Longtine JA, Fuchs CS, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, Yan L, Ogino S (2008) PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Relationship with Genetic and Epigenetic Alterations. *Neoplasia* 10:534–541
- [28] Zhang J, Roberts TM, Shivdasani RA (2011) Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. *Gastroenterology* 141:50–61
- [29] Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW (2016) Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* 22:1745–1755
- [30] Angelis GL de', Bottarelli L, Azzoni C, Angelis N de', Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F (2018) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed* 89:97–101
- [31] Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:2073-2087.e3
- [32] Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74:681–710
- [33] Verma AS, Singh A (Hrsg) (2020) *Animal biotechnology. Models in discovery and translation*. Academic Press, an imprint of Elsevier: London, United Kingdom, San Diego, CA, United States
- [34] Capper D, Voigt A, Bozukova G, Ahadova A, Kickingereeder P, Deimling A von, Knebel Doeberitz M von, Kloor M (2013) BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer* 133:1624–1630
- [35] Bessa X, Ballesté B, Andreu M, Castells A, Bellosillo B, Balaguer F, Castellví-Bel S, Paya A, Jover R, Alenda C, Titó L, Martínez-Villacampa M et al. (2008) A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6:206–214

- [36] Vilar E, Gruber SB (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 7:153–162
- [37] Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst, Deutsches (3/30/2022) Mikrosatelliteninstabilität: Was ist das eigentlich? Krebsinformationsdienst
- [38] Cohen R, Pudlarz T, Delattre J-F, Colle R, André T (2020) Molecular Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 12
- [39] Battaglin F, Naseem M, Lenz H-J, Salem ME (2018) Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol* 16:735–745
- [40] Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S (2016) The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treatment Reviews* 51:19–26
- [41] Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, Carnaghi C, Doci R, Rosati R, Montorsi M, Roncalli M, Gennari L et al. (2007) Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13:3831–3839
- [42] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC et al. (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372:2509–2520
- [43] Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Piñol V, Xicola RM, Bujanda L, Reñé JM, Clofent J, Bessa X et al. (2006) Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 55:848–855
- [44] Kim JE, Hong YS, Kim HJ, Kim K, Lee J-L, Park SJ, Lim S-B, Park IJ, Kim CW, Yoon YS, Yu CS, Kim JC et al. (2015) Defective Mismatch Repair Status was not Associated with DFS and OS in Stage II Colon Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 22 Suppl 3:S630-7
- [45] Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E et al. (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391:2128–2139

- [46] Deschoolmeester V, Baay M, van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, Vermorken JB (2010) Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol* 11:19
- [47] Titu LV, Monson JRT, Greenman J (2002) The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 51:235–247
- [48] Tay RE, Richardson EK, Toh HC (2021) Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther* 28:5–17
- [49] Martin MU, Resch K (2009) *Immunologie*. Verlag EugenUlmer: Stuttgart
- [50] Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I (2021) Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 124:359–367
- [51] Basu R, Whitlock BM, Husson J, Le Floc'h A, Jin W, Oyler-Yaniv A, Dotiwala F, Giannone G, Hivroz C, Biais N, Lieberman J, Kam LC et al. (2016) Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* 165:100–110
- [52] Gordy C, He Y-W (2012) Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing. *Cell Mol Immunol* 9:5–6
- [53] Louten J, Reynolds N (Hrsg) (2016) *Essential human virology*. Academic Press is an imprint of Elsevier: London, UK
- [54] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135
- [55] Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, Theoret MR, Rosenberg SA, Restifo NP (2005) Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* 115:1616–1626
- [56] Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R (2007) *Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen - Labor - Klinik*. Thieme: Stuttgart, New York
- [57] Glaire MA, Domingo E, Sveen A, Bruun J, Nesbakken A, Nicholson G, Novelli M, Lawson K, Oukrif D, Kildal W, Danielsen HE, Kerr R et al. (2019) Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes and colorectal cancer recurrence by tumour and nodal stage. *Br J Cancer* 121:474–482
- [58] Yin C, Okugawa Y, Yamamoto A, Kitajima T, Shimura T, Kawamura M, Tsujiura M, Okita Y, Ohi M, Toiyama Y (2022) Prognostic significance of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and CD66b+ tumor-associated neutrophils in the invasive margins of stages I-III colorectal cancer. *Oncol Lett* 24:212

- [59] Sasidharan Nair V, Saleh R, Taha RZ, Toor SM, Murshed K, Ahmed AA, Kurer MA, Abu Nada M, Al Ejuh F, Elkord E (2020) Differential gene expression of tumor-infiltrating CD4+ T cells in advanced versus early stage colorectal cancer and identification of a gene signature of poor prognosis. *Oncolimmunology* 9:1825178
- [60] Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y, Matsui H, Shindo Y, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Iida M, Tsunedomi R et al. (2019) Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer* 121:659–665
- [61] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R et al. (2014) Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232:199–209
- [62] Malka D, Lièvre A, André T, Taïeb J, Ducreux M, Bibeau F (2020) Immune scores in colorectal cancer: Where are we? *Eur J Cancer* 140:105–118
- [63] El Sissy C, Kirilovsky A, Zeitoun G, Marliot F, Haicheur N, Lagorce-Pagès C, Galon J, Pagès F (2021) Therapeutic Implications of the Immunoscore in Patients with Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13
- [64] Han Y, Liu D, Li L (2020) PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 10:727–742
- [65] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677–704
- [66] Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H (2002) Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538–5545
- [67] Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X (2015) Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in molecular medicine* 21:24–33
- [68] Yaghoubi N, Soltani A, Ghazvini K, Hassanian SM, Hashemy SI (2019) PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 110:312–318
- [69] Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K (2018) Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol* 8:86

- [70] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL (2019) (Zugriff vom 11.02.2023).
<http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>
- [71] Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G et al. (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut
- [72] Nowell PC, Hungerford DA (1960) National Academy of Sciences - A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science* 132:1488–1501
- [73] Rowley JD (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290–293
- [74] Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, Klein A de, Bartram CR, Grosveld G (1983) Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306:239–242
- [75] Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Klein A de, Bartram CR, Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36:93–99
- [76] Tuna M, Amos CI, Mills GB (2019) Molecular mechanisms and pathobiology of oncogenic fusion transcripts in epithelial tumors. *Oncotarget* 10:2095–2111
- [77] Taniue K, Akimitsu N (2021) Fusion Genes and RNAs in Cancer Development. *Noncoding RNA* 7
- [78] Ayatollahi H, Keramati MR, shirdel A, Kooshyar MM, Raiszadeh M, Shakeri S, Sadeghian MH (2018) BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran. *Caspian Journal of Internal Medicine* 9:65–70
- [79] Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, Zheng S, Vegesna R, Kim H, Verhaak RGW (2015) The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene* 34:4845–4854
- [80] Pagani F, Randon G, Guarini V, Raimondi A, Prisciandaro M, Lobefaro R, Di Bartolomeo M, Sozzi G, Braud F de, Gasparini P, Pietrantonio F (2019) The Landscape of Actionable Gene Fusions in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 20

- [81] Kloosterman WP, van den Coebergh Braak RRJ, Pieterse M, van Roosmalen MJ, Sieuwerts AM, Stangl C, Brunekreef R, Lalmahomed ZS, Ooft S, van Galen A, Smid M, Lefebvre A et al. (2017) A Systematic Analysis of Oncogenic Gene Fusions in Primary Colon Cancer. *Cancer Res* 77:3814–3822
- [82] Cocco E, Benhamida J, Middha S, Zehir A, Mullaney K, Shia J, Yaeger R, Zhang L, Wong D, Villafania L, Nafa K, Scaltriti M et al. (2019) Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Res* 79:1047–1053
- [83] Bocciarelli C, Caumont C, Samaison L, Cariou M, Aline-Fardin A, Doucet L, Roudié J, Terris B, Merlio J-P, Marcorelles P, Cappellen D, Uguen A (2021) MSI-High RAS-BRAF wild-type colorectal adenocarcinomas with MLH1 loss have a high frequency of targetable oncogenic gene fusions whose diagnoses are feasible using methods easy-to-implement in pathology laboratories. *Hum Pathol* 114:99–109
- [84] Westphalen CB, Krebs MG, Le Tourneau C, Sokol ES, Maund SL, Wilson TR, Jin DX, Newberg JY, Fabrizio D, Veronese L, Thomas M, Braud F de (2021) Genomic context of NTRK1/2/3 fusion-positive tumours from a large real-world population. *npj Precis. Onc.* 5:69
- [85] Wang J, Li R, Li J, Yi Y, Liu X, Chen J, Zhang H, Lu J, Li C, Wu H, Liang Z (2021) Comprehensive analysis of oncogenic fusions in mismatch repair deficient colorectal carcinomas by sequential DNA and RNA next generation sequencing. *J Transl Med* 19:433
- [86] Choi Y, Kwon CH, Lee SJ, Park J, Shin J-Y, Park DY (2018) Integrative analysis of oncogenic fusion genes and their functional impact in colorectal cancer. *Br J Cancer* 119:230–240
- [87] Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Tejpar S, Sartore-Bianchi A, Hechtman JF, Christiansen J, Novara L, Tebbutt N, Fucà G, Antoniotti C et al. (2017) ALK, ROS1, and NTRK Rearrangements in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 109
- [88] Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, Nathanson M, Doebele RC, Farago AF, Pappo AS, Turpin B, Dowlati A et al. (2018) Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* 378:731–739

- [89] He X, Jiao X-D, Liu K, Qin B-D, Wu Y, Ling Y, Liu J, Xu A-Q, Song K, Zang Y-S (2021) Clinical Responses to Crizotinib, Alectinib, and Lorlatinib in a Metastatic Colorectal Carcinoma Patient With ALK Gene Rearrangement: A Case Report. *JCO Precis Oncol* 5
- [90] Hsiao S-Y, He H-L, Weng T-S, Lin C-Y, Chao C-M, Huang W-T, Tsao C-J (2021) Colorectal Cancer with EML4-ALK Fusion Gene Response to Alectinib: A Case Report and Review of the Literature. *CRO* 14:232–238
- [91] Forsythe A, Zhang W, Phillip Strauss U, Fellous M, Korei M, Keating K (2020) A systematic review and meta-analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase gene fusion frequencies in solid tumors. *Ther Adv Med Oncol* 12:1758835920975613
- [92] Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, Jungbluth AA, Zehir A, Benayed R, Drilon A, Hyman DM, Ladanyi M et al. (2020) NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol* 33:38–46
- [93] Lasota J, Chłopek M, Lamoureux J, Christiansen J, Kowalik A, Wasąg B, Felisiak-Gołąbek A, Agaimy A, Biernat W, Canzonieri V, Centonze G, Chmielik E et al. (2020) Colonic Adenocarcinomas Harboring NTRK Fusion Genes: A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study of 16 Cases and Review of the Literature. *Am J Surg Pathol* 44:162–173
- [94] Guo Y, Guo X-L, Wang S, Chen X, Shi J, Wang J, Wang K, Klempner SJ, Wang W, Xiao M (2020) Genomic Alterations of NTRK, POLE, ERBB2, and Microsatellite Instability Status in Chinese Patients with Colorectal Cancer. *Oncologist* 25:e1671-e1680
- [95] Svrcek M, Colle R, Cayre A, Mas L, Bourgoin P, Cohen R, André T, Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N (2021) 444P Prevalence of NTRK1/2/3 fusions in dMMR/MSI metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 32:S556
- [96] Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, Jayakumar G, Middha S, Zehir A, Donoghue MTA, You D, Viale A et al. (2018) Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 33:125-136.e3
- [97] Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S (2019) Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Ann Oncol* 30:viii5-viii15

- [98] Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545–1564
- [99] Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642
- [100] Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677–736
- [101] Castellano E, Downward J (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2:261–274
- [102] Castel P, Toska E, Zumsteg ZS, Carmona FJ, Elkabets M, Bosch A, Scaltriti M (2014) Rationale-based therapeutic combinations with PI3K inhibitors in cancer treatment. *Mol Cell Oncol* 1:e963447
- [103] Luca A de, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N (2012) The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 Suppl 2:S17-27
- [104] Guo Y-J, Pan W-W, Liu S-B, Shen Z-F, Xu Y, Hu L-L (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 19:1997–2007
- [105] Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL (2019) Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J Mol Diagn* 21:553–571
- [106] Winne K de, Sorber L, Lambin S, Siozopoulou V, Beniuga G, Dedeurwaerdere F, D'Haene N, Habran L, Libbrecht L, van Huysse J, Weynand B, Wouters K et al. (2021) Immunohistochemistry as a screening tool for NTRK gene fusions: results of a first Belgian ring trial. *Virchows Arch* 478:283–291
- [107] Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S (2019) Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol* 32:147–153
- [108] Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, Arcila ME, Dogan S, Klimstra DS, Ladanyi M, Jungbluth AA (2017) Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol* 41:1547–1551
- [109] Stenzinger A, van Tilburg CM, Tabatabai G, Länger F, Graf N, Griesinger F, Heukamp LC, Hummel M, Klingebiel T, Hettmer S, Vokuhl C, Merkelbach-Bruse S et al. (2021)

- Diagnostik und Therapie von Tumoren mit NTRK-Genfusionen. *Pathologie* 42:103–115
- [110] Vitrakvi | European Medicines Agency (08.11.2022) (Zugriff vom 08.11.2022).
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vitrakvi>
- [111] Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, Hechtman JF, Troiani T, López-Rios F, Douillard J-Y, André F, Reis-Filho JS (2019) ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol* 30:1417–1427
- [112] Houang M, Toon CW, Clarkson A, Sioson L, Silva K de, Watson N, Singh NR, Chou A, Gill AJ (2015) ALK and ROS1 overexpression is very rare in colorectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23:134–138
- [113] Lee J, Kim HC, Hong JY, Wang K, Kim SY, Jang J, Kim ST, Park JO, Lim HY, Kang WK, Park YS, Lee J et al. (2015) Detection of novel and potentially actionable anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in colorectal adenocarcinoma by immunohistochemistry screening. *Oncotarget* 6:24320–24332
- [114] Jung DH, Park HJ, Jang HH, Kim S-H, Jung Y, Lee W-S (2020) Clinical Impact of PD-L1 Expression for Survival in Curatively Resected Colon Cancer. *Cancer Invest* 38:406–414
- [115] Noepel-Duenebacke S, Juette H, Schulmann K, Graeven U, Porschen R, Stoehlmacher J, Hegewisch-Becker S, Raulf A, Arnold D, Reinacher-Schick A, Tannapfel A (2021) Microsatellite instability (MSI-H) is associated with a high immunoscore but not with PD-L1 expression or increased survival in patients (pts.) with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with oxaliplatin (ox) and fluoropyrimidine (FP) with and without bevacizumab (bev): a pooled analysis of the AIO KRK 0207 and RO91 trials. *J Cancer Res Clin Oncol* 147:3063–3072
- [116] Kappelmann-Fenzl M (Hrsg) (2021) Next generation sequencing and data analysis. Springer: Cham
- [117] ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe (2020) (Zugriff vom 19.11.2022). <https://www.zytovision.com/products/zytolight/z-2167>
- [118] Qiagen (2019) Epitect® Fast Bisulfite Conversion Handbook
- [119] Pineda M, Mur P, Iniesta MD, Borràs E, Campos O, Vargas G, Iglesias S, Fernández A, Gruber SB, Lázaro C, Brunet J, Navarro M et al. (2012) MLH1 methylation screening is effective in identifying epimutation carriers. *Eur J Hum Genet* 20:1256–1264

- [120] Weiß C (2019) *Basiswissen Medizinische Statistik*. Springer
- [121] Goedhart J, Luijsterburg MS (2020) VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci Rep* 10:20560
- [122] Wang H, Li Z-W, Ou Q, Wu X, Nagasaka M, Shao Y, Ou S-HI, Yang Y (2022) NTRK fusion positive colorectal cancer is a unique subset of CRC with high TMB and microsatellite instability. *Cancer Med* 11:2541–2549
- [123] Ukkola I, Nummela P, Kero M, Tammio H, Tuominen J, Kairisto V, Kallajoki M, Haglund C, Peltomäki P, Kytölä S, Ristimäki A (2022) Gene fusions and oncogenic mutations in MLH1 deficient and BRAFV600E wild-type colorectal cancers. *Virchows Arch* 480:807–817
- [124] Kim JH, Hong JH, Choi Y-L, Lee JA, Seo M, Lee M-S, An SB, Sung MJ, Cho N-Y, Kim S-S, Shin YK, Kim S et al. (2021) NTRK oncogenic fusions are exclusively associated with the serrated neoplasia pathway in the colorectum and begin to occur in sessile serrated lesions
- [125] Chou A, Fraser T, Ahadi M, Fuchs T, Sioson L, Clarkson A, Sheen A, Singh N, Corless CL, Gill AJ (2020) NTRK gene rearrangements are highly enriched in MLH1/PMS2 deficient, BRAF wild-type colorectal carcinomas—a study of 4569 cases. *Mod Pathol* 33:924–932
- [126] Bang H, Lee M-S, Sung M, Choi J, An S, Kim S-H, Lee SE, Choi Y-L (2022) NTRK Fusions in 1113 Solid Tumors in a Single Institution. *Diagnostics* 12:1450
- [127] Milione M, Ardini E, Christiansen J, Valtorta E, Veronese S, Bosotti R, Pellegrinelli A, Testi A, Pietrantonio F, Fucà G, Wei G, Murphy D et al. (2017) Identification and characterization of a novel SCYL3-NTRK1 rearrangement in a colorectal cancer patient. *Oncotarget* 8:55353–55360
- [128] Pfeifer A, Rusinek D, Żebracka-Gala J, Czarniecka A, Chmielik E, Zembala-Nożyńska E, Wojtaś B, Gielniewski B, Szpak-Ulczo S, Oczko-Wojciechowska M, Krajewska J, Polańska J et al. (2019) Novel TG-FGFR1 and TRIM33-NTRK1 transcript fusions in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 58:558–566
- [129] Wang J, Yi Y, Xiao Y, Dong L, Liang L, Teng L, Ying JM, Lu T, Liu Y, Guan Y, Pang J, Zhou L et al. (2019) Prevalence of recurrent oncogenic fusion in mismatch repair-deficient colorectal carcinoma with hypermethylated MLH1 and wild-type BRAF and KRAS. *Mod Pathol* 32:1053–1064

- [130] Margherita Ratti, Giulia Grizzi, Rodolfo Passalacqua, Andrea Lampis, Fabrizio (2021) NTRK fusions in colorectal cancer: clinical meaning and future perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 25:677–683
- [131] Yang L, Wang S, Lee JJ-K, Lee S, Lee E, Shinbrot E, Wheeler DA, Kucherlapati R, Park PJ (2019) An enhanced genetic model of colorectal cancer progression history. *Genome Biol* 20:168
- [132] Choi Y, Won Y-J, Lee S, Kim A, Kim Y, Park W-Y, Jo H-J, Song G am, Kwon CH, Park DY (2018) Cytoplasmic TrkA Expression as a Screen for Detecting NTRK1 Fusions in Colorectal Cancer. *Transl Oncol* 11:764–770
- [133] Bylsma LC, Gillezeau C, Garawin TA, Kelsh MA, Fryzek JP, Sangaré L, Lowe KA (2020) Prevalence of RAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancer patients by tumor sidedness: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med* 9:1044–1057
- [134] Bonnot PE, Passot G (2019) RAS mutation: site of disease and recurrence pattern in colorectal cancer. *Chinese Clinical Oncology* 8:55
- [135] Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, Andrikou K, Cascinu S, Gelsomino F (2019) BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci* 20
- [136] Ahn AR, Kim KM, Jang KY, Moon WS, Ha GW, Lee MR, Chung MJ (2021) Correlation of PIK3CA mutation with programmed death ligand-1 (PD-L1) expression and their clinicopathological significance in colorectal cancer. *Annals of Translational Medicine* 9:1406
- [137] Loree JM, Pereira AAL, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, van Morris K, Advani S, Menter DG, Eng C, Shaw K, Broaddus R et al. (2018) Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res* 24:1062–1072
- [138] Yamashiro Y, Kurihara T, Hayashi T, Suehara Y, Yao T, Kato S, Saito T (2021) NTRK fusion in Japanese colorectal adenocarcinomas. *Sci Rep* 11:5635
- [139] Überlebenszeitanalyse (2011) (Zugriff vom 05.03.2023). <https://www.aerzteblatt.de/archiv/81171/Ueberlebenszeitanalyse>
- [140] Bazhenova L, Lokker A, Snider J, Castellanos E, Fisher V, Fellous M, Nanda S, Zong J, Keating K, Jiao X (2021) TRK Fusion Cancer: Patient Characteristics and Survival Analysis in the Real-World Setting. *Target Oncol* 16:389–399

- [141] Bridgewater J, Jiao X, Parimi M, Flach C, Stratford J, Kamburov A, Schmitz AA, Zong J, Reeves JA, Keating K, Bruno A, Fellous M et al. (2022) Prognosis and oncogenomic profiling of patients with tropomyosin receptor kinase fusion cancer in the 100,000 genomes project. *Cancer Treatment and Research Communications* 33:100623
- [142] Hibar DP, Demetri GD, Peters S, Davies J, Humblet O, Maund SL, Perez L (2022) Real-world survival outcomes in patients with locally advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumors receiving standard-of-care therapies other than targeted TRK inhibitors. *PLoS One* 17:e0270571
- [143] Sato K, Kawazu M, Yamamoto Y, Ueno T, Kojima S, Nagae G, Abe H, Soda M, Oga T, Kohsaka S, Sai E, Yamashita Y et al. (2019) Fusion Kinases Identified by Genomic Analyses of Sporadic Microsatellite Instability-High Colorectal Cancers. *Clin Cancer Res* 25:378–389
- [144] Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R (2018) Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol* 2018
- [145] Srivastava P, Husain N, Shukla S, Chauhan S, Pandey A, Masood S (2021) PD-L1 Expression in colorectal carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters, microsatellite instability and BRAF mutation. *Indian J Pathol Microbiol* 64:490–496
- [146] Chung B-S, Liao I-C, Lin P-C, Wu S-Y, Kang J-W, Lin B-W, Chen P-C, Chan R-H, Lee C-T, Shen M-R, Chen S-H, Yeh Y-M (2022) PD-L1 Expression in High-Risk Early-Stage Colorectal Cancer-Its Clinical and Biological Significance in Immune Microenvironment. *Int J Mol Sci* 23:13277
- [147] Roberts J, Salaria SN, Cates J, Wang Y, Vnencak-Jones C, Berlin J, Shi C (2019) PD-L1 Expression Patterns in Microsatellite Instability-High Intestinal Adenocarcinoma Subtypes. *American Journal of Clinical Pathology* 152:384–391
- [148] Mezheyeuski A, Micke P, Martín-Bernabé A, Backman M, Hrynchyk I, Hammarström K, Ström S, Ekström J, Edqvist P-H, Sundström M, Ponten F, Leandersson K et al. (2021) The Immune Landscape of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13
- [149] Alwers E, Kather JN, Kloor M, Brobeil A, Tagscherer KE, Roth W, Echle A, Amitay EL, Chang-Claude J, Brenner H, Hoffmeister M (2023) Validation of the prognostic value of CD3 and CD8 cell densities analogous to the Immunoscore® by stage and location

- of colorectal cancer: an independent patient cohort study. *J Pathol Clin Res* 9:129–136
- [150] Kasurinen J, Hagström J, Kaprio T, Beilmann-Lehtonen I, Haglund C, Böckelman C (2022) Tumor-associated CD3- and CD8-positive immune cells in colorectal cancer: The additional prognostic value of CD8+ to CD3+ ratio remains debatable. *Tumour Biol* 44:37–52
- [151] Le Flahec G, Badic B, Guibourg B, Doucet L, Bail J-P, Marcorelles P, Schick U, Uguen A (2018) Mismatch repair-deficient colorectal cancer: a model of immunogenic and immune cell-rich tumor despite nonsignificant programmed cell death ligand-1 expression in tumor cells. *Hum Pathol* 72:135–143
- [152] Smedt L de, Lemahieu J, Palmans S, Govaere O, Tousseyn T, van Cutsem E, Prenen H, Tejpar S, Spaepen M, Matthijs G, Decaestecker C, Moles Lopez X et al. (2015) Microsatellite instable vs stable colon carcinomas: analysis of tumour heterogeneity, inflammation and angiogenesis. *Br J Cancer* 113:500–509
- [153] Nestarenkaite A, Fadhil W, Rasmusson A, Susanti S, Hadjimichael E, Laurinaviciene A, Ilyas M, Laurinavicius A (2020) Immuno-Interface Score to Predict Outcome in Colorectal Cancer Independent of Microsatellite Instability Status. *Cancers (Basel)* 12:2902
- [154] Yang S-R, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K, Jayakumaran G, Zhang Y, Frosina D, Drilon A, Ladanyi M, Jungbluth AA et al. (2021) A Performance Comparison of Commonly Used Assays to Detect RET Fusions. *Clin Cancer Res* 27:1316–1328
- [155] Lasota J, Chłopek M, Wasąg B, Kowalik A, Christiansen J, Lamoureux J, Kuźniacka A, Felisiak-Gołębek A, Liu Y, Reyes TAR, Saha R, Agaimy A et al. (2020) Colorectal Adenocarcinomas Harboring ALK Fusion Genes: A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study of 12 Cases and Review of the Literature. *Am J Surg Pathol* 44:1224–1234
- [156] Lai AZ, Schrock AB, Erlich RL, Ross JS, Miller VA, Yakirevich E, Ali SM, Braiteh F (2017) Detection of an ALK Fusion in Colorectal Carcinoma by Hybrid Capture-Based Assay of Circulating Tumor DNA. *Oncologist* 22:774–779
- [157] Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR et al. (2012)

- Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nature medicine* 18:382–384
- [158] Hosono Y, Masuishi T, Mitani S, Yamaguchi R, Kato S, Yoshino T, Ebi H (2019) Evaluation of ALK Fusion Newly Identified in Colon Cancer by a Comprehensive Genomic Analysis. *JCO Precis Oncol* 3:1–5
- [159] Yakirevich E, Resnick MB, Mangray S, Wheeler M, Jackson CL, Lombardo KA, Lee J, Kim K-M, Gill AJ, Wang K, Gowen K, Sun J et al. (2016) Oncogenic ALK Fusion in Rare and Aggressive Subtype of Colorectal Adenocarcinoma as a Potential Therapeutic Target. *Clin Cancer Res* 22:3831–3840
- [160] Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Morano F, Fucà G, Nikolinakos P, Drilon A, Hechtman JF, Christiansen J, Gowen K, Frampton GM et al. (2018) RET fusions in a small subset of advanced colorectal cancers at risk of being neglected. *Annals of Oncology* 29:1394–1401
- [161] Le Rolle A-F, Klempner SJ, Garrett CR, Seery T, Sanford EM, Balasubramanian S, Ross JS, Stephens PJ, Miller VA, Ali SM, Chiu VK (2015) Identification and characterization of RET fusions in advanced colorectal cancer. *Oncotarget* 6:28929–28937
- [162] Jiang J, Wu X, Tong X, Wei W, Chen A, Wang X, Shao YW, Huang J (2018) GCC2-ALK as a targetable fusion in lung adenocarcinoma and its enduring clinical responses to ALK inhibitors. *Lung Cancer* 115:5–11
- [163] Vendrell JA, Taviaux S, Béganton B, Godreuil S, Audran P, Grand D, Clermont E, Serre I, Szablewski V, Coopman P, Mazières J, Costes V et al. (2017) Detection of known and novel ALK fusion transcripts in lung cancer patients using next-generation sequencing approaches. *Sci Rep* 7:12510
- [164] López-Nieva P, Fernández-Navarro P, Graña-Castro O, Andrés-León E, Santos J, Villa-Morales M, Cobos-Fernández MÁ, González-Sánchez L, Malumbres M, Salazar-Roa M, Fernández-Piqueras J (2019) Detection of novel fusion-transcripts by RNA-Seq in T-cell lymphoblastic lymphoma. *Sci Rep* 9:5179
- [165] Azatyan A, Zaphiropoulos PG (2022) Circular and Fusion RNAs in Medulloblastoma Development. *Cancers (Basel)* 14:3134

Anhang

A1: MSI-Kollektiv und Gesamtheit aller MSI-Tumore im Colopredict-2.0-Register

mt = Mutation, wt = Wildtyp, NA = nicht angegeben

		MSI Kollektiv		MSI Colopredict Gesamt	
		Gesamt	%	Gesamt	%
	N	411		1003	
Alter	Mittel	72,02		73,21	
Geschlecht	männlich	143	34,79%	330	32,90%
	weiblich	267	64,96%	667	66,50%
	NA	1	0,24%	6	0,60%
T	T0	2	0,49%	2	0,20%
	T1	26	6,33%	33	3,29%
	T2	72	17,52%	98	9,77%
	T3	186	45,26%	701	69,89%
	T4	125	30,41%	159	15,85%
	NA		0,00%	10	1,00%
	N	N0	258	62,77%	653
	N1	81	19,71%	212	21,14%
	N2	70	17,03%	127	12,66%
	Nx	2	0,49%	3	0,30%
	NA		0,00%	8	0,80%
UICC	I	89	21,65%	95	9,47%
	II	168	40,88%	552	55,03%
	III	154	37,47%	346	34,50%
	NA		0,00%	10	1,00%
Lokalisation	rechts	331	80,54%	844	84,15%
	links	79	19,22%	150	14,96%
	NA	1	0,24%	9	0,90%
Lokalisation führend	Colon ascendens	151	36,74%	412	41,08%
	Colon descendens	24	5,84%	46	4,59%
	Colon transversum	50	12,17%	118	11,76%
	Colon sigmoideum	40	9,73%	72	7,18%
	Linke Colonflexur	13	3,16%	30	2,99%
	Rechte Colonflexur	35	8,52%	96	9,57%
	Rektosigmoidaler Übergang	2	0,49%	2	0,20%
	Zökum	94	22,87%	217	21,64%
	Appendix	1	0,24%	1	0,10%
	Kolon nicht näher bezeichnet	1	0,24%	5	0,50%
	NA		0,00%	3	0,30%
Zweitumor	ja	18	4,38%	38	3,79%
	nein	393	95,62%	965	96,21%
weiterer Tumor	ja	60	14,60%	128	12,76%
	nein	351	85,40%	875	87,24%
Histologischer Subtyp	Adenokarzinom	340	82,73%	835	83,25%
	Muzinöses Adenokarzinom	40	9,73%	83	8,28%

	Siegelringzellkarzinom	2	0,49%	4	0,40%
	Undifferenziertes Karzinom	2	0,49%	5	0,50%
	Adenokarzinom vom intestinalen Typ	3	0,73%	4	0,40%
	Adenokarzinom in tubulovillösem Adenom	2	0,49%	4	0,40%
	Schleimbildendes Adenokarzinom	1	0,24%	3	0,30%
	Medulläres Karzinom	8	1,95%	20	1,99%
	Kribiformes Karzinom	1	0,24%	1	0,10%
	Serratiertes Adenokarzinom	1	0,24%	2	0,20%
	NA	11	2,68%	42	4,19%
BRAF	mt	235	57,18%	618	61,62%
	wt	176	42,82%	370	36,89%
	NA		0,00%	15	1,50%
KRAS	mt	61	14,84%	137	13,66%
	wt	350	85,16%	851	84,85%
	NA		0,00%	15	1,50%
NRAS	mt	10	2,43%	20	1,99%
	wt	401	97,57%	968	96,51%
	NA		0,00%	15	1,50%
PIK3CA	mt	118	28,71%	311	31,01%
	wt	293	71,29%	677	67,50%
	NA		0,00%	15	1,50%
MLH1	intakt	56	13,63%	108	10,77%
	defekt	346	84,18%	873	87,04%
	NA	9	2,19%	22	2,19%
MSH2	intakt	376	91,48%	938	93,52%
	defekt	27	6,57%	45	4,49%
	NA	8	1,95%	20	1,99%
MSH6	intakt	353	85,89%	874	87,14%
	defekt	48	11,68%	105	10,47%
	NA	10	2,43%	24	2,39%
PMS2	intakt	45	10,95%	76	7,58%
	defekt	355	86,37%	903	90,03%
	NA	11	2,68%	24	2,39%
Rezidiv	ja	41	9,98%	67	6,68%
	nein	331	80,54%	830	82,75%
	unbekannt	39	9,49%	106	10,57%
Tod	ja	82	19,95%	151	15,05%
	nein	324	78,83%	841	83,85%
	unbekannt	5	1,22%	11	1,10%
Tod oder Rezidiv	ja	107	26,03%	192	19,14%
	nein	262	63,75%	698	69,59%
	unbekannt	42	10,22%	113	11,27%

A2: MSS-Kollektiv und Gesamtheit aller MSS-Tumore im Colopredict-2.0-Register

mt = Mutation, wt = Wildtyp, NA = nicht angegeben

		MSS Kollektiv		MSS Colopredict Gesamt	
		Gesamt	%	Gesamt	%
	N	98		4421	
Alter	Mittel	69,48		69,46	
Geschlecht	männlich	49	50,00	2556	58,04
	weiblich	49	50,00	1848	41,96
	NA			17	
T	T0	0	0,00	8	0,18
	T1	8	8,16	235	5,42
	T2	21	21,43	499	11,51
	T3	37	37,76	3000	69,22
	T4	32	32,65	592	13,66
	NA			87	
N	N0	57	58,16	2440	56,27
	N1	30	30,61	1255	28,94
	N2	11	11,22	629	14,51
	Nx	0	0,00	12	0,28
	NA			85	
UICC	I	20	20,41	496	11,52
	II	38	38,78	1926	44,75
	III	40	40,82	1882	43,73
	NA			117	
Lokalisation	rechts	55	56,12	2274	52,51
	links	43	43,88	2057	47,49
	NA			90	
Lokalisation führend	Colon ascendens	18	18,37	965	21,97
	Colon descendens	3	3,06	270	6,15
	Colon transversum	8	8,16	392	8,93
	Colon sigmoideum	33	33,67	1504	34,24
	Linke Colonflexur	6	6,12	172	3,92
	Rechte Colonflexur	6	6,12	250	5,69
	Rektosigmoidaler Übergang	1	1,02	111	2,53
	Zökum	23	23,47	647	14,73
	Appendix	0	0,00	20	0,46
	Kolon nicht näher bezeichnet	0	0,00	34	0,77
	Kolon überlappende Regionen	0	0,00	27	0,61
	NA			29	
Zweitumor	ja	4	4,08	154	3,48
	nein	94	95,92	4267	96,52
weiterer Tumor	ja	12	12,24	446	10,09
	nein	86	87,76	3975	89,91
Histologischer Subtyp	Adenokarzinom	91	93,81	4023	94,84
	Muzinöses Adenokarzinom	6	6,19	144	3,39
	Siegelringzellkarzinom	0	0,00	7	0,17
	Adenokarzinom vom intestinalen Typ	0	0,00	20	0,47

	Adenokarzinom in tubulovillösem Adenom	0	0,00	12	0,28
	Schleimbildendes Adenokarzinom	0	0,00	5	0,12
	Kribiformes Karzinom	0	0,00	9	0,21
	Serratiertes Adenokarzinom	0	0,00	4	0,09
	anderer	0	0,00	18	0,41
	NA	1		179	
BRAF	mt	16	16,33	325	8,48
	wt	82	83,67	3508	91,52
	NA			588	
KRAS	mt	45	45,92	1529	39,89
	wt	53	54,08	2304	60,11
	NA			588	
NRAS	mt	4	4,08	143	3,73
	wt	94	95,92	3690	96,27
	NA			588	
PIK3CA	mt	21	21,43	891	23,26
	wt	77	78,57	2940	76,74
	NA			590	
MLH1	intakt	97	98,98	4310	98,74
	defekt	1	1,02	55	1,26
	NA			56	
MSH2	intakt	97	100,0	4335	99,38
	defekt	0	0,00	27	0,62
	NA	1		59	
MSH6	intakt	96	98,98	4181	95,92
	defekt	1	1,02	178	4,08
	NA	1		62	
PMS2	intakt	95	96,94	4280	98,05
	defekt	3	3,06	85	1,95
	NA			56	
Rezidiv	ja	17	17,35	465	13,42
	nein	81	82,65	2999	86,58
	unbekannt			957	
Tod	ja	26	26,53	639	14,52
	nein	72	73,47	3762	85,48
	unbekannt			20	
Tod oder Rezidiv	ja	34	34,69	896	25,81
	nein	64	65,31	2575	74,19
	unbekannt			950	

A3: Übersicht der klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften von Patienten mit *NTRK*-positiven und *NTRK*-negativen MSI-high-Tumoren

mt = Mutation, wt = Wildtyp, NA = nicht angegeben, pos = positiv, neg = negativ, Sig. = Signifikanz, sig. = signifikant, histolog. = histologisch, Siegelringzellkarz. = Siegelringzellkarzinom, schleimbild. = schleimbildend

		MSI Kollektiv					p-Wert	Sig.
		NTRK		Gesamt	% pos	% neg		
	N	NTRK pos	NTRK neg					
	Mittel	71,00	72,05	72,02				
Alter								
Geschlecht	männlich	5	138	143	3,50%	96,50%	0,760	
	weiblich	7	260	267	2,62%	97,38%		
	NA			1				
T	T0	0	2	2	0,00%	100,00%	0,066	
	T1	1	25	26	3,85%	96,15%		
	T2	0	72	72	0,00%	100,00%		
	T3	10	176	186	5,38%	94,62%		
	T4	1	124	125	0,80%	99,20%		
	NA							
N	N0	9	249	258	3,49%	96,51%	0,848	
	N1	2	79	81	2,47%	97,53%		
	N2	1	69	70	1,43%	98,57%		
	Nx	0	2	2	0,00%	100,00%		
	NA							
UICC	I	1	88	89	1,12%	98,88%	0,224	
	II	8	160	168	4,76%	95,24%		
	III	3	151	154	1,95%	98,05%		
	NA							
Lokalisation	rechts	2	329	331	0,60%	99,40%	<0,001 sig.	
	links	10	69	79	12,66%	87,34%		
	NA			1				
Zweitumor	ja	0	18	18	0,00%	100,00%	1	
	nein	12	381	393	3,05%	96,95%		
weiterer Tumor	ja	2	58	60	3,33%	96,67%	0,690	
	nein	10	341	351	2,85%	97,15%		
Histolog. Subtyp	Adenokarzinom	11	329	340	3,24%	96,76%	0,243	
	Muzinöses Adenokarzinom	0	40	40	0,00%	100,00%		
	Siegelringzellkarz.	0	2	2	0,00%	100,00%		
	Undifferenziertes Karzinom	0	2	2	0,00%	100,00%		
	Adenokarzinom vom intestinalen Typ	0	3	3	0,00%	100,00%		
	Adenokarzinom in tubulovillösem Adenom	1	1	2	50,00%	50,00%		
	Schleimbild. Adenokarzinom	0	1	1	0,00%	100,00%		
	Medulläres Karzinom	0	8	8	0,00%	100,00%		

	Kribiformes Karzinom	0	1	1	0,00%	100,00%		
	Serratiertes Adenokarzinom	0	1	1	0,00%	100,00%		
	NA			11				
BRAF	mt	0	235	235	0,00%	100,00%		
	wt	12	164	176	6,82%	93,18%	<0,001	sig.
	NA							
KRAS	mt	0	61	61	0,00%	100,00%		
	wt	12	338	350	3,43%	96,57%	0,228	
	NA							
NRAS	mt	0	10	10	0,00%	100,00%		
	wt	12	389	401	2,99%	97,01%	1	
	NA							
PIK3CA	mt	0	118	118	0,00%	100,00%		
	wt	12	281	293	4,10%	95,90%	0,022	sig.
	NA							
Mutation BRAF/RAS/ PIK3CA	ja	0	324	324	0,00%	100,00%		
	nein	12	75	87	13,79%	86,21%	<0,001	sig.
	NA							
MLH1	intakt	0	56	56	0,00%	100,00%		
	defekt	12	334	346	3,47%	96,53%	0,532	
	NA		9	9				
MSH2	intakt	12	364	376	3,19%	96,81%		
	defekt	0	27	27	0,00%	100,00%	1	
	NA		8	8				
MSH6	intakt	12	341	353	3,40%	96,60%		
	defekt	0	48	48	0,00%	100,00%	0,537	
	NA		10	10				
PMS2	intakt	0	45	45	0,00%	100,00%		
	defekt	12	343	355	3,38%	96,62%	0,551	
	NA		11	11				
Rezidiv	ja	1	40	41	2,44%	97,56%		
	nein	11	320	331	3,32%	96,68%	1	
	unbekannt		39	39				
Tod	ja	2	80	82	2,44%	97,56%		
	nein	10	314	324	3,09%	96,91%	1	
	unbekannt		5	5				
Tod oder Rezidiv	ja	3	104	107	2,80%	97,20%		
	nein	9	253	262	3,44%	96,56%	1	
	unbekannt		42	42				

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Andrea Tannapfel für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jens Christmann, der immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und der mir jederzeit mit großem Engagement zur Seite stand. Die herausragende Betreuung, insbesondere durch den fachlichen Austausch und seine motivierende Art, hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Molekularpathologie zum einen für die großartige Unterstützung im Labor und bei der Auswertung, zum anderen aber auch für die schöne und unterhaltsame Zeit bedanken.

Den Mitarbeiterinnen der Immunhistochemie danke ich für die freundliche Unterstützung beim Färben der IHC-Präparate. Außerdem danke ich den ärztlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die Hilfe bei der Auswertung und Mitbegutachtung der IHC-Präparate.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich zutiefst für die bedingungslose, vielseitige Unterstützung und ihren ermutigenden Zuspruch. Von ganzem Herzen danke ich Samhita dafür, dass sie immer für mich da ist und mich gerade in den schwierigsten Phasen stets motiviert hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Georg Raschewski
Geburtsdatum: 28.01.1998
Geburtsort: Essen

Ausbildung:

10/2016 – aktuell Studium der Humanmedizin
Ruhr-Universität Bochum
Aktuell Praktisches Jahr im 3. Tertial

- 1. Tertial: Pathologie
Institut für Pathologie der Ruhr-Universität
Bochum
- 2. Tertial: Innere Medizin
Universitätsklinikum
Knappschafts Krankenhaus Bochum
- 3. Tertial: Chirurgie
St. Elisabethen-Krankenhaus Frankfurt am
Main

08/2008 – 07/2016 Otto-Pankok-Gymnasium
Mülheim an der Ruhr

09/2004 – 07/2008 Grundschule am Oemberg
Mülheim an der Ruhr

Famulaturen:

08/2020 Klinik für Radioonkologie/Strahlentherapie
Klinikum rechts der Isar, München

02/2020 Klinik für Hämatologie/Onkologie
Knappschafts Krankenhaus Bochum

08/2019 Klinik für Pädiatrie
MGM Medical College & Hospital, Navi Mumbai (Indien)

03/2019 Hausarztpraxis Kauschitz & Cürten, Mülheim/Ruhr