

Diplomarbeit

**Charakterisierung von somatischen
Kopienzahlveränderungen in Patient*Innen mit
metastasierenden kolorektalen Karzinomen**

eingereicht von

Anna Christina Reisinger

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Jochen Geigl

und

Dr. scient. med. Samantha Hasenleithner, MSc.

Graz am 23.02.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz am 23.02.2023

Anna Christina Reisinger eh

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meines Studiums an der Medizinischen Universität Graz und bei der Verfassung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich ein großes Dankeschön an meine Betreuer, Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Jochen Geigl und Dr. scient. med. Samantha Hasenleithner, Msc., richten. Vielen Dank für Ihr stets offenes Ohr, unzählige, hilfreiche Ratschläge und die immerwährende Unterstützung. Bedanken möchte ich mich an diesem Punkt auch beim verbleibenden Team des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik für jegliche Hilfe bei der Erstellung meiner Abschlussarbeit.

Besonderen Dank möchte ich hier meinen Eltern, Eduard und Ulrike Reisinger, aussprechen, die mich, in jeder erdenklichen Weise, nicht nur auf meinem akademischen Weg unterstützen. Meine Großeltern und beiden Schwestern darf ich hier nicht unerwähnt lassen: Danke für den unermüdlichen familiären Rückhalt. An diesem Punkt möchte ich mich besonders bei meiner Tante, Susanne Reisinger, für Ihren liebevollen Support bedanken.

Nicht zu vergessen, sind meine wunderbaren Studienkolleg*Innen, die meine Studienzeit zu etwas ganz Besonderem gemacht haben. Auch meine Freund*Innen abseits des Medizinstudiums möchte ich nicht außer Acht lassen: Danke für all die aufmunternden Worte und eure ununterbrochene Unterstützung. Schlussendlich möchte ich mich von Herzen bei meinem Freund, Florian Daum, bedanken: Danke, dass ich immer auf dich zählen darf.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Das kolorektale Karzinom	4
2.1	<i>Epidemiologie</i>	4
2.2	<i>Risikofaktoren</i>	5
2.3	<i>Pathogenese</i>	6
2.4	<i>Klassifikation des kolorektalen Karzinoms</i>	8
2.4.1	Histopathologische Klassifikation	8
2.4.2	Pathologische Klassifikation nach dem TNM-System	9
2.5	<i>Klinische Symptome</i>	12
2.6	<i>Diagnose</i>	12
2.7	<i>Prognose</i>	13
2.8	<i>Therapie</i>	15
2.9	<i>Molekulare Eigenschaften</i>	16
2.9.1	Chromosomale Instabilität	16
2.9.2	Mikrosatelliten-Instabilität	17
2.9.3	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (CIMP)	20
2.9.4	Tumorsuppressorgene	21
2.9.5	Onkogene	23
2.9.6	Growth Factor Pathways	24
3	Liquid Biopsy	25
3.1	<i>Cell-free DNA</i>	26
3.2	<i>Somatische Kopienzahlveränderungen</i>	28
3.3	<i>Next Generation Sequencing</i>	29
3.4	<i>Whole-Genome-Sequencing</i>	29
4	Zielsetzung	32
4.1	<i>Der medizinischen Alltag</i>	34

5	Material und Methoden	35
5.1	<i>Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen</i>	35
5.2	<i>Fürstenfeldkohorte</i>	36
5.3	<i>GISTIC2.0</i>	37
5.4	<i>Die Filtrierung der Ergebnisse aus GISTIC2.0</i>	38
5.5	<i>Klinische Annotierung amplifizierter und deletierter Gene</i>	39
5.5.1	OncoKB	39
5.5.2	cBioPortal	39
5.5.3	Die Korrelation zwischen Genamplifikation und Genexpression	41
5.5.4	chr16p11.2 als potenzielle Kandidatenregion	41
5.6	<i>Entscheidungsunterstützungssysteme</i>	43
5.6.1	NAVIFY Mutation Profiler	44
5.7	<i>CiberAMP</i>	45
5.7.1	COSMIC Intersect	46
5.7.2	Workflow der Studie	47
6	Ergebnisse	51
6.1	<i>Patientenkohorte</i>	51
6.2	<i>Fürstenfeldkohorte</i>	51
6.3	<i>GISTIC2.0: Identifikation häufig amplifizierter und deletierter Regionen</i>	54
6.4	<i>Filtrierung und Annotierung der GISTIC2.0 Ergebnisse</i>	59
6.4.1	Identifikation therapie-relevanter Alterationen durch OncoKB	59
6.4.2	cBioPortal: Vergleich mit Datensätzen des TCGA PanCancer Atlas	66
6.4.3	cBioPortal: Graphische Gegenüberstellung von Amplifikation und Expression der Region 16p11.2	67
6.4.4	NAVIFY Mutation Profiler: Annotierung klinischer Informationen	73
6.5	<i>CiberAMP</i>	73
6.5.1	SCNA-DEGs Tumor vs. Normal	74
6.5.2	COSMIC Intersect	83

7	Diskussion	85
7.1	<i>Amplifikationen der chromosomalen Region 20q repräsentieren bereits bekannte Veränderungen im CRC</i>	<i>85</i>
7.2	<i>Amplifikationen der chromosomalen Region 16p11.2 finden sich seltener im CRC.....</i>	<i>86</i>
7.3	<i>Longitudinales sWGS der Plasma-DNA ermöglicht eine minimalinvasive Überwachung von Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen.....</i>	<i>87</i>
7.4	<i>Limitationen und Begrenzungen.....</i>	<i>88</i>
7.5	<i>Klinischer Ausblick in die Zukunft.....</i>	<i>90</i>

Abkürzungen

CEA	Carcinoembryonales Antigen
cfDNA	cell-free DNA
cfRNA	circulating cell-free RNA
CGC	Cancer Gene Census
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CNA	Copy Number Alteration
CNV	Copy Number Variation
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRC	Colorectal Cancer
CTC	Circulating Tumor Cells
ctDNA	circulating tumor DNA
CTX	Chemotherapie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FDA	Food and Drug Administration
GISTIC	Genomic Identification of Significant Targets in Cancer
HGP	Human Genome Project
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer
lncRNA	long non-coding RNA
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mCRC	metastatic Colorectal Cancer

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
miRNA	microRNA
MMR	Mismatch Repair
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Next Generation Sequencing
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer
RCTX	Radiochemotherapie
SCNA	Somatic Copy Number Alteration
SCNA-DEGs	SCNA-linked Differentially Expressed Genes
sWGS	shallow Whole-Genome-Sequencing
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TSG	Tumorsuppressorgen
WES	Whole-Exome-Sequencing
WGS	Whole-Genome-Sequencing
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
15-PGDH	15-Prostaglandin Dehydrogenase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz	7
Abbildung 2: Mikrosatelliten-Instabilität	19
Abbildung 3: Liquid Biopsy	25
Abbildung 4: Whole Genome Sequencing.....	30
Abbildung 5: Vorteile des WGS	31
Abbildung 6: Workflow der Studie	50
Abbildung 7: Fürstenfeldkohorte C217	53
Abbildung 8: Fürstenfeldkohorte C218	54
Abbildung 9: Heatmap der segmentierten Kopienzahldaten aus Plasma-Seq	56
Abbildung 10: GISTIC-Output.....	57
Abbildung 11: Oncoplot	58
Abbildung 12: UBE2MP1.....	68
Abbildung 13: DCTPP1	69
Abbildung 14: STX4	70
Abbildung 15: BCKDK.....	71
Abbildung 16: 7p22.1	74
Abbildung 17: 16p11.2	74
Abbildung 18: 19p13.3	75
Abbildung 19: 20p11.1	75
Abbildung 20: 20q11.21	76
Abbildung 21: 20q13.2	76
Abbildung 22: 20q13.12	77
Abbildung 23: 20q13.33	77
Abbildung 24: SCNA-DEGs.....	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-System der UICC für Kolon- und Rektumkarzinome.....	9
Tabelle 2: Klassifikation der regionären Lymphknoten.....	10
Tabelle 3: Klassifikation der Fernmetastasen.....	11
Tabelle 4: Pathologische R-Klassifikation	11
Tabelle 5: Fürstenfeldkohorte.....	36
Tabelle 6: Cytobands für CiberAMP	49
Tabelle 7: Top 10 der analysierten Cytobands	59
Tabelle 8: Annotierte Events aus OncoKB	60
Tabelle 9: Optische Korrelation 16p11.2	72
Tabelle 10: SCNA-DEGs.....	81
Tabelle 11: Häufigkeit der SCNA-DEGs.....	83
Tabelle 12: COSMIC Intersect Annotierungen	84

Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit werden Plasmaproben von 226 Patient*Innen, die an den Klinischen Abteilungen für Onkologie an der Medizinischen Universität Graz und am LKH Fürstenfeld behandelt wurden, zur Analyse von fokalen somatischen Kopienzahlveränderungen herangezogen. Ein Workflow zur Aufarbeitung genetischer Informationen, die Einbeziehung von Entscheidungsunterstützungssystemen wie dem NAVIFY Mutation Profiler (Roche) sowie der neuentwickelte Algorithmus CiberAMP werden präsentiert. Außerdem werden grundlegende Informationen zum kolorektalen Karzinom, insbesondere dessen molekulare Eigenschaften, in Folge einer Literaturrecherche dargelegt. Einblicke in Liquid Biopsy und die Präzisionsonkologie führen schließlich zu der Erläuterung möglicher therapierbarer Ziele und weiterer entdeckter Erkenntnisse in der untersuchten Kohorte.

Die Charakterisierung somatischer Kopienzahlveränderungen in Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom wird unter anderem durch das Programm GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer), welches Treiberänderungen anhand der Frequenz und der Amplitude der vorliegenden Events identifiziert, erreicht. Nach Bestimmung der Tumorfraktion und Ausschluss von Proben mit einem Prozentsatz von unter 5%, wurden insgesamt 742 Proben in GISTIC2.0 analysiert und schließlich durch die folgenden genannten Programme charakterisiert. Eine Fokussierung erfolgt dabei auf folgende Genabschnitte: 20q11.21, 20q13.2, 20q13.12, 20q13.33, 7p22.1, 20p11.1, 16p11.2, 8p22, 19p13.3 und 18q21.32. Der Vergleich von Amplifikation vs. Genexpression, insbesondere der Gene innerhalb des Cytobands chr16p11.2, erlaubt ein besseres Verständnis der genetischen Informationen und wird durch weitere Analysen in cBioPortal und OncoKB ergänzt. Die Webresource cBioPortal ermöglicht sowohl die Analyse und Erforschung als auch die Visualisierung von multidimensionalen genomischen Krebsdaten. Die Wissensdatenbank für Präzisionsonkologie OncoKB annotiert somatische molekulare Veränderungen hinsichtlich ihrer biologischen und onkogenen Effekte und beleuchtet deren prognostische und prädiktive Signifikanz. Die Charakterisierung von somatischen Kopienzahlveränderungen in Patient*Innen

mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen wird durch die Ergebnisse des Algorithmus CiberAMP schließlich vervollständigt.

Abstract

In this thesis, focal somatic copy number alterations were analyzed using plasma samples from 226 patients with metastatic colorectal carcinoma treated at the Clinical Departments of Oncology at the Medical University of Graz and at the LKH Fürstenfeld. A workflow for processing genomic information, including decision support systems such as the NAVIFY Mutation Profiler (Roche) and the newly developed algorithm CiberAMP are presented, as is literature research on colorectal carcinoma, with a focus on its molecular properties. Additionally, insights into liquid biopsy and precision oncology offer possible treatment targets and new understandings in the examined cohort.

The characterization of somatic copy number alterations in patients with colorectal carcinoma was undertaken utilizing the program GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer), which identifies driver changes based on the frequency and amplitude of the presented events. After determining the tumor fraction, and excluding samples with a percentage below 5%, a total of 742 samples were analyzed with GISTIC2.0. The work herein focuses on the following gene segments: 20q11.21, 20q13.2, 20q13.12, 20q13.33, 7p22.1, 20p11.1, 16p11.2, 8p22, 19p13.3 and 18q21.32. The comparison of amplification vs. gene expression, especially of the genes within the cytoband chr16p11.2, allows a better understanding of the genomic information and is complemented by further annotation using cBioPortal and OncoKB. The web resource cBioPortal enables both the analysis and exploration as well as the visualization of multidimensional genomic cancer data. The knowledge database for precision oncology OncoKB annotates somatic molecular changes regarding their biological and oncogenic effects and highlights their prognostic and predictive significance. Finally, the algorithm CiberAMP is applied to the data set and completes the characterization of somatic copy number alterations in patients with metastatic colorectal cancer.

1 Einleitung

Tumorerkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen und stellen eine Barriere gegenüber der Erhöhung der Lebenserwartung dar. Das kolorektale Karzinom verkörpert dabei einen von zehn Krebs- bzw. Todesfällen. In Bezug auf die Inzidenz erreicht das kolorektale Karzinom den dritten Rang aller Tumorerkrankungen. Hinsichtlich der Mortalität befindet sich diese Erkrankung sogar auf dem zweiten Rang (Sung et al., 2021). In Folge des andauernden Fortschritts in Entwicklungsländern wird über die nächsten Jahrzehnte mit einem weltweiten Anstieg der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms gerechnet (Dekker et al., 2019). Die Inzidenz dieses Tumors kann als Marker der sozioökonomischen Entwicklung herangezogen werden. In Ländern, die sich in einem großen Umbruch befinden, steigen beispielsweise die Inzidenzraten tendenziell gleichmäßig mit zunehmendem HDI (Human Development Index) (Sung et al., 2021).

Stadium IV des kolorektalen Karzinoms, bei dem bereits entfernt liegende Metastasen vorkommen, kann in aller Regel nicht geheilt werden, wodurch sich therapeutische Optionen meist auf einen palliativen Zugang beschränken (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Mit dem Ziel, die Diagnose und Behandlungen von malignen Erkrankungen zu verbessern, kommt vermehrt die sogenannte Präzisionsonkologie zum Einsatz. Durch diese Form der Onkologie sind Identifikation von prognostischen Markern, die Festlegung eines molekularen Subtyps zur Prognoseabschätzung, die Charakterisierung von somatischen Änderungen involviert in der Progression der Erkrankung und die Detektion von gestörten Pathways und die Identifikation von molekularen Diskriminanten der metastasierten Erkrankung möglich. Die molekulare Profilerstellung des Tumors soll schlussendlich aber der Detektion von somatischen Veränderungen, welche durch gezielte Therapie behandelt werden können, dienen. Da der Zugang zu Tumormaterial meist mit invasiven Eingriffen in Verbindung steht, welche einerseits nicht bei allen Patient*Innen machbar sind und andererseits ein regelmäßiges Monitoring des Genotyps nicht erlauben, kommt vermehrt eine Methode namens Liquid Biopsy zum Einsatz. Neben der Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und zirkulierender zellfreier Tumor DNA (Desoxyribonukleinsäure) in biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Liquor, Urin,

Aszites oder Pleuraergüssen werden auch Informationen zum Transkriptom, Epigenom, Proteom und Metabolom generiert. In Zukunft wird Liquid Biopsy basierend auf bioinformatische Tools, gestützt auf künstliche Intelligenz, einer multiparametrischen Analyse von Tumorerkrankungen dienen. Der Mangel an klinischer Validität und klinischem Nutzen des Großteils der Liquid Biopsy Assays und dem Problem der Dimensionalität, wobei die Anzahl von Patientenproben wesentlich geringer ist als die potenziellen Merkmale im Rohdatensatz (Basenpaare), deutet auf den dringenden Bedarf von Forschung hin, damit die Methode Liquid Biopsy ihr gesamtes Potential ausschöpfen kann (Heitzer et al., 2019).

Durch Liquid Biopsy können zwar potenzielle molekulare Ziele, wie somatische Kopienzahlveränderungen oder Mutationen, detektiert werden, die Signifikanz vieler solcher Veränderungen in Bezug auf Therapieentscheidungen ist jedoch noch trügerisch. Nichtsdestotrotz zeigte Liquid Biopsy erste erfolgversprechende Ergebnisse im Rahmen des Managements kolorektaler Karzinome im klinischen Setting, der Früherkennung derselben, der Detektion von Rezidiven, der Identifikation von prognostischen Markern, der molekularen Charakterisierung von metastasierenden Erkrankungen und des Überprüfens des Ansprechens auf Therapien. Von enormer Wichtigkeit sind dabei sogenannte Treiber-Veränderungen, welche die Tumorentwicklung aktiv vorantreiben. Insbesondere fokale somatische Kopienzahlveränderungen sind hierbei von Bedeutung. Es handelt sich dabei um Veränderungen, die eine begrenzte Länge des Chromosomenarms umfassen und eine limitierte Anzahl von Genen beherbergen. Von diesen sind schließlich ein oder mehrere für einen Wachstumsvorteil während der Entwicklung des Krebsgenoms verantwortlich (Zhou et al., 2020).

Die zentrale Fragestellung dieser Diplomarbeit liegt nun darin, häufig auftretende fokale somatische Kopienzahlveränderungen in Patient*Innen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom sowohl in der Literatur als auch in einer untersuchten Kohorte zu identifizieren. Es sollen Möglichkeiten der Analyse, Grenzen und Schwierigkeiten der Informationsverarbeitungen durch einen eigens erstellten Workflow präsentiert werden. Eine Fokussierung erfolgt dabei auf einen neuen Algorithmus namens CiberAMP, der im Folgenden genauer erläutert wird (Caloto et al., 2022). Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden Plasmaproben von 226

Patient*Innen, die an den Klinischen Abteilungen für Onkologie an der Medizinischen Universität Graz und am LKH Fürstenfeld behandelt wurden, zur Beantwortung der Fragestellung herangezogen. Eine Extraktion der Plasma-DNA sowie Bestimmung der Tumorfraction brachte eine erste Filtrierung mit sich. Bei Proben mit einer Tumorfraction $\geq 5\%$ wurde eine shallow Whole Genome Sequenzierung durchgeführt. Dies führte schließlich zu 742 Proben, die in GISTIC2.0 analysiert wurden. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Daten stammen aus einer bereits genehmigten Studie (Ethikvotum Nr. 21-229 aus 09/10). Für die verwendeten Daten existierte während der Verfassung dieser Abschlussarbeit ein aktuelles Folgevotum. Eine ausführlich dokumentierte Kohorte von 14 Patient*Innen inklusive deren klinischer Daten wird dabei genauer betrachtet, um eine Verknüpfung zwischen Klinik und Genetik für weitere Forschungen zu gewährleisten. Die Kohorte setzt sich aus 8 männlichen Probanden und 4 weiblichen Probandinnen zusammen, die allesamt im LKH Fürstenfeld behandelt wurden. Zusätzlich erfolgten verschiedene Analysen in cBioPortal und OncoKB, wie beispielsweise der Vergleich von Amplifikation vs. Genexpression der Gene innerhalb des Cytobands chr16p11.2. Auch das kommerzielle Entscheidungsunterstützungssystem NAVIFY Mutation Profiler (Roche) wurde zur Charakterisierung von somatischen Kopienzahlveränderungen in Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen genutzt.

Zu beachten ist, dass es aufgrund von verschiedenen existierenden Definitionen in der Literatur bezüglich somatischer Kopienzahlveränderungen zu Limitationen kommen kann (Zhou et al., 2020). Im Kapitel „Somatische Kopienzahlveränderungen“ wird auf diese Problematik genauer eingegangen. Außerdem kann die vorliegende Arbeit nicht die ganze Palette an fokalen somatischen Kopienzahlveränderungen abdecken, auch hinsichtlich der sich ständig weiterentwickelnden Forschung in diesem Bereich bestehen Einschränkungen. Während der Analyse erfolgt eine Fokussierung auf folgende Genabschnitte: 20q11.21, 20q13.2, 20q13.12, 20q13.33, 7p22.1, 20p11.1, 16p11.2, 8p22, 19p13.3 und 18q21.32. Somit wird nur ein Bruchteil der genetischen Informationen des kolorektalen Karzinoms in dieser Abschlussarbeit aufgearbeitet. Um die Grenzen einer Abschlussarbeit nicht zu überschreiten, wird nur in einen

ausgewählten Bereich der Ergebnisse, die im Rahmen des wissenschaftlichen Arbeitens generiert wurden, Einblick gewährt.

2 Das kolorektale Karzinom

2.1 Epidemiologie

Laut der von GLOBOCAN erstellten Global Cancer Statistics 2020 rangiert das kolorektale Karzinom an dritter Stelle in Bezug auf die Inzidenz, aber an zweiter Stelle in Bezug auf die Mortalität. Für das Jahr 2020 wurden mehr als 1,9 Millionen neue Darmkrebsfälle (einschließlich Anus) und 935.000 Todesfälle geschätzt, was ungefähr einem von zehn Krebsfällen und Todesfällen weltweit entspricht (Sung et al., 2021).

Das kolorektale Karzinom stellt nach dem Mammakarzinom den zweithäufigsten Tumor bei Frauen und nach Lungen- bzw. Prostatakarzinom die dritthäufigste maligne Erkrankung bei Männern dar. Weltweit gesehen, bestehen starke geographische Schwankungen, wobei die höchsten Raten in Europa, Nordamerika und Australasien vorliegen (Ballinger and Anggiansah, 2007).

Der Anteil des kolorektalen Karzinoms in Bezug auf alle jährlich diagnostizierten Tumore und tumor-assoziierte Todesfälle beträgt wie bereits erwähnt ungefähr 10%. Zu beachten ist hierbei, dass Frauen eine um 25% niedrigere Mortalität und Inzidenz im Vergleich zum männlichen Geschlecht aufweisen. Es wird vorhergesagt, dass im Jahre 2035 die weltweite Inzidenz des kolorektalen Karzinoms auf 2,5 Millionen neu diagnostizierte Fälle jährlich steigen wird. In hochentwickelten Ländern zeigen sich jedoch durch nationale Screeningprogramme und durch die vermehrte Nutzung der Vorsorgekoloskopie abnehmende oder zumindest stabilisierende Trends. Der Einfluss eines gesünderen Lebensstiles und besserer Ernährung trägt außerdem zu diesen Veränderungen bei. Im Kontrast dazu stehen ein Anstieg an Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom unter 50 Jahren mit besonderem Fokus auf linkseitige Formen und rektale Lokalisationen. Eine Ursache dafür wurde bisher nicht gefunden (Dekker et al., 2019).

Obwohl die chirurgische Herangehensweise zur Entfernung von kolorektalen Tumoren im Frühstadium oder metastatischen Läsionen eine Heilung ermöglichen kann, sind therapeutische Optionen für das metastasierte kolorektale Karzinom auf die Palliativmedizin beschränkt. Man geht davon aus, dass ungefähr 30% aller Patient*Innen bei Diagnose bereits Metastasen aufweisen. Die Identifizierung von molekularen Zielen und Pathways, welche in der Initiation und Progression des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen, ermöglicht eine bessere Charakterisierung der Erkrankung und bildet eine Chance für maßgeschneiderte Therapien zur Minimierung oder Vermeidung von Resistenzen (Zhou et al., 2020).

2.2 Risikofaktoren

Steigendes Alter stellt den größten Risikofaktor für das sporadische kolorektale Karzinom dar. 90% aller Patient*Innen weisen ein Alter von über 40 Jahren auf. Die steigenden Inzidenzzahlen in Europa sind daher einerseits auf die zunehmende Alterung der Population, andererseits aber auch auf den Anstieg der altersspezifischen Inzidenzraten zurückzuführen. Des Weiteren lässt die Beobachtung der geographischen Schwankung einen Einfluss von Umwelt- und Lifestyle-Faktoren vermuten. Den zweithäufigsten Risikofaktor stellt die Familiengeschichte dar. Eine positive Familienanamnese trifft auf zwischen 10 und 20% aller Patient*Innen zu (Ballinger and Anggiansah, 2007).

Familien- und Zwillingsstudien haben gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Vererblichkeit im Bereich von 12-35% liegt, wobei das Risiko von der Anzahl, dem Verwandtschaftsgrad der betroffenen Familienmitglieder und dem Alter bei Diagnose abhängt. Zu den Hauptrisikofaktoren für das kolorektale Karzinom zählen unter anderem das männliche Geschlecht und ein hohes Alter. Weiters bewirken Rauchen, exzessiver Alkoholkonsum, erhöhtes Körpergewicht und der Konsum von rotem und verarbeitetem Fleisch eine Erhöhung des kolorektalen Tumorrisikos. Eine Infektion mit Bakterien, wie dem *Fusobacterium nucleatum* und dem *Bacteroides fragilis*, könnte das Risiko außerdem erhöhen. Ungefähr 5-7% aller Patient*Innen mit einem kolorektale Karzinom sind von einem hereditären kolorektalen Karzinomsyndrom betroffen. Diese Sonderform der kolorektalen Karzinome wird unterteilt in nicht-polypöse Syndrome, wie das Lynch Syndrom und

das familiäre kolorektale Karzinom und in polypöse Syndrome. Letztere sind unter anderem gekennzeichnet durch die hohe Anzahl an vorkommenden Polypen. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist bei hereditären Formen von großer Bedeutung hinsichtlich einer optimalen Surveillance Strategie gegenüber kolorektalen Karzinomen und Tumoren außerhalb des Kolons und zur Planung engmaschiger Kontrolluntersuchungen von Familienmitgliedern (Dekker et al., 2019).

Es konnte gezeigt werden, dass nach Einwanderung von einem Niedriginzidenzgebiet in ein Hochinzidenzgebiet die erste Generation von Nachfahren bereits ein gleich hohes Risiko für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms wie die ursprüngliche Bevölkerung des Einwanderungslandes aufweist. Dies unterstreicht nochmals die Bedeutung des Lebensstils und der Ernährungsgewohnheiten (Werner, 2020).

Zur Abschätzung des individuellen Risikos des kolorektalen Karzinoms müssen sowohl eine Eigenanamnese als auch eine Familienanamnese erhoben werden. Aus diesem Kontext heraus unterscheidet man zwischen drei Risikogruppen, dem sporadischen, familiär gehäuften und hereditären kolorektalen Karzinom. Mit der Anzahl erkrankter Familienmitglieder und einem jungen Erkrankungsalter der betroffenen Verwandten steigt das Risiko an (Werner, 2020).

2.3 Pathogenese

Das kolorektale Karzinom entsteht aus dysplastischen adenomatösen Polypen in Folge eines Multistep-Prozesses. Zu unterscheiden sind hierbei Keimbahnmutationen von einer schrittweisen Ansammlung von somatischen Mutationen (Ballinger and Anggiansah 2007).

Wie bereits erwähnt entspringen die meisten kolorektalen Karzinome von einem Polypen. Beginn dieses Prozesses stellt jedoch eine aberrante Krypte dar, welche sich in eine neoplastische Vorläuferläsion beziehungsweise einen Polypen umwandelt und schließlich über eine Zeitspanne von 10 - 15 Jahren in ein kolorektales Karzinom übergeht. In der Tumorstammzelle, der Ursprungszelle des kolorektalen Karzinoms, haben sich über diesen Zeitraum hinweg sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen, die Tumorsuppressorgene

inaktivieren und Onkogene aktivieren, akkumuliert. Diese Tumorstammzellen sind von großer Bedeutung im Hinblick auf Anbahnung und Aufrechterhaltung des Tumors. Man unterscheidet zwei Entwicklungswege, die zu einem kolorektalen Karzinom führen können: 70 - 90% der Karzinome entstehen aus dem traditionellen Adenom-Karzinom-Pathway, welcher auch als chromosomal instability pathway bezeichnet wird. 10 - 20% der Karzinome entstehen hingegen aus dem serrated neoplasia pathway. Diese Entwicklungspfade sind jeweils durch verschiedenartige genetische und epigenetische Events, die aufeinanderfolgend auftreten, gekennzeichnet.

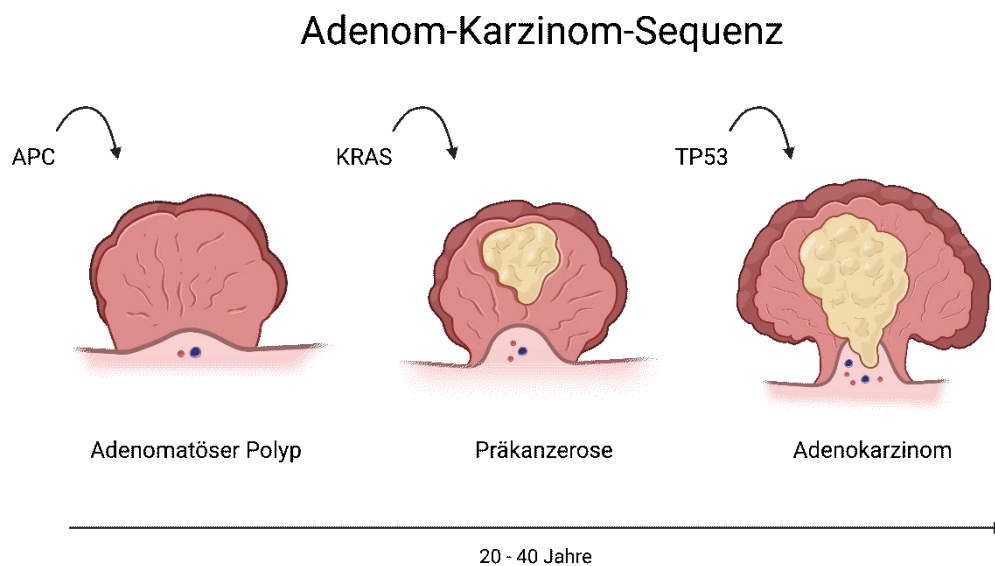


ABBILDUNG 1: ADENOM-KARZINOM-SEQUENZ

In der Abbildung 1 wird der traditionelle Adenom-Karzinom-Pfad dargestellt. 70 - 90% der kolorektalen Karzinome entstehen in Folge dieser Sequenz. Nach der Initiation durch eine *APC*-Mutation, kommt es zu einer *RAS*-Aktivierung oder einem Funktionsverlust von *TP53*. Die Progression konventioneller Adenome entsteht durch die sequenzielle Akkumulation von genetischen Mutationen. In weiterer Folge kommt es zu chromosomaler Instabilität und schließlich zu Mikrosatelliten-stabilen Tumoren (Dekker et al., 2019). Kolorektale Karzinome entstehen über einen Zeitraum von 20 – 40 Jahren als Konsequenz einer Anhäufung von spezifischen Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Diese genetischen Veränderungen treten in einer charakteristischen Sequenz auf, die in Abbildung 1 veranschaulicht werden soll (Rajagopalan et al., 2003). Im Appendix wird die Publikationslizenz für diese in Biorender (created with BioRender.com) erstellte Grafik aufgelistet.

Der traditionelle Adenom-Karzinom-Pfad (Abbildung 1) beginnt durch eine *APC*-Mutation, gefolgt von einem Funktionsverlust von *TP53* oder einer *RAS*-Aktivierung. Im Gegensatz dazu ist die serratierte Karzinogenese mit *RAS*- und *RAF*-Mutationen sowie epigenetischer Instabilität durch den CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp assoziiert. Dies führt zu Mikrosatelliten-stabilen oder instabilen Karzinomen. Zu einem hypermutierten Phänotyp führen Mutationen, die eine Defizienz der Mismatch-Repair-Proteine zur Folge haben oder sogenannte *POLE*-Mutationen. Darüber hinaus muss zwischen rechtsseitigem bzw. proximalem und linksseitigem bzw. distalem kolorektalem Karzinom hinsichtlich der molekularen, embryonalen, biologischen und anatomischen Eigenschaften unterschieden werden. Abhängig von der Lokalisation kommt es zu Abweichungen in der Geschlechterverteilung, der Prognose, dem metastatischen Setting, der Therapieantwort auf Anti-EGFR-Medikamente und der Häufigkeit der oben besprochenen Entwicklungspfade (Dekker et al., 2019).

2.4 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

2.4.1 Histopathologische Klassifikation

Die Klassifikation kolorektaler Karzinome kann unter anderem nach histopathologischen Kriterien erfolgen. Die Mehrheit aller Karzinome im Dickdarm sind Adenokarzinome. Konventionelle Adenokarzinome (NOS) mit tubulärem oder kribriformem Wachstumsmuster sind von weiteren histopathologischen Varianten abzugrenzen:

Muzinöse Adenokarzinome;

Siegelringzellkarzinome;

Medulläre Karzinome;

Mikropapilläre Karzinome;

Adenokarzinome vom kribriform-komedoartigen Typ;

Serratierte Adenokarzinome;

Adenosquamöse Karzinome;

Plattenepithelkarzinome;

Undifferenzierte Karzinome;

Spindelzell-Karzinome.

Bezugnehmend auf die strukturellen Atypien können konventionelle Adenokarzinome in drei Differenzierungsgrade (G1-G3) eingeteilt werden. Als low-grade werden G1- und G2-Tumore klassifiziert. Als high-grade Tumore werden G3-Tumore und undifferenzierte Karzinome bezeichnet. Gut differenzierte, also G1 Tumore, zeigen in mehr als 95% der Fälle einen glandulären Aufbau (Werner, 2020).

2.4.2 Pathologische Klassifikation nach dem TNM-System

Die pathologische Klassifikation erfolgt nach dem TNM-System der UICC (Tabelle 1), wobei die lokale Tiefeninfiltration den entscheidenden Faktor für die Bestimmung des Tumorstadiums darstellt. Wenn sich beispielsweise in der Lamina propria Tumorzellen feststellen lassen, ohne dass eine Infiltration in die Submukosa in Folge einer Ausbreitung durch die Muscularis mucosae stattgefunden hat, spricht man von pTis (Werner, 2020).

TABELLE 1: TNM-SYSTEM DER UICC FÜR KOLON- UND REKTUMKARZINOME

Klassifikation	Beschreibung
pTis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
pT1	Tumor infiltriert Submukosa
pT2	Tumor infiltriert Muscularis propria
pT3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches/perirektales Gewebe
pT4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
pT4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
pT4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

Das pathologische postoperative Tumorstadium ist nach wie vor ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Prognose des kolorektalen Karzinoms. Als zusätzlicher Parameter bezüglich der Risikobewertung von Tumoren im Stadium pT1 kann das Ausmaß des sogenannten Tumorbuddings herangezogen werden (Werner, 2020).

Bei Kolonkarzinomen kommt es meist zu einer lymphogenen Metastasierung. Entlang der großen Arterien, wie der A. ileocolica, A. colica dextra, den beiden Ästen der A. colica media und dem kurzen Stamm der A. mesenterica inferior mit der A. colica sinistra und den Aa. sigmoideae, verlaufen die Lymphabflusswege des Kolons. Dementsprechend kommt es erst ab dem Durchbruch durch die Muscularis mucosae zu Lymphknotenmetastasen. Die Inzidenz einer lymphogenen Metastasierung steigt mit dem Tumorstadium und dem Tumorgrad an. Als Satelliten oder „Tumor deposits“ werden makroskopische und mikroskopische Nester oder Knoten mit Tumorzellen im Lymphabflussgebiet des Primärtumors bezeichnet. Ein diskontinuierliches Auftreten vom Primärtumor ohne histologische Nachweise von Residuen regionärer Lymphknoten, identifizierbare Gefäßstrukturen oder Perineuralscheideninvasionen sind charakteristisch für diese Besonderheit (Werner, 2020). Bei Patient*Innen mit kolorektalen Karzinomen sind Lymphknotenmetastasen einer der wichtigsten prognostischen Faktoren. Eine genauere Prognosestratifizierung als der pN-Status (Tabelle 2) stellt der Lymphknotenquotient dar. Dieser stellt das Verhältnis tumorbefallener Lymphknoten zur Anzahl der resezierten Lymphknoten dar. (Rosenberg et al., 2010).

TABELLE 2: KLASSIFIKATION DER REGIONÄREN LYMPHKNOTEN

Klassifikation	Beschreibung
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	N1a Metastasen in 1 regionären Lymphknoten
	N1b Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
	N1c Tumorknötchen bzw. Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre LK-Metastasen
pN2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
	N2a Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
	N2b Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

Aufgrund des venösen Abflusses über das System der Pfortader trifft man beim kolorektalen Karzinom häufig auf Lebermetastasen. Am zweithäufigsten kommt es zu Metastasen in der Lunge und weiters zu einem Befall des Skeletts, der Nebennieren, des Gehirns und zu einer peritonealen Aussaat (Werner, 2020). Die Klassifikation der Fernmetastasen wird in Tabelle 3 veranschaulicht.

TABELLE 3: KLASSIFIKATION DER FERNMETASTASEN

Klassifikation	Beschreibung
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen
	M1a Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre LK), ohne Peritonealmetastasen
	M1b Metastasen in mehr als einem Organ
	M1c Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

Durch die R-Klassifikation wird das eventuelle Vorhandensein eines Residualtumors nach erfolgter Behandlung beschrieben (Tabelle 4). Zu den fakultativen Deskriptoren der TNM-Klassifikation zählen unter anderem die R-Klassifikation, aber auch das Grading, Lymphgefäßinvasion, Veneninvasion und Perineuralscheiden Infiltration (Werner, 2020).

TABELLE 4: PATHOLOGISCHE R-KLASSIFIKATION

Klassifikation	Beschreibung
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor am Resektionsrand
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Die in diesem Kapitel angeführten Klassifikationskriterien wurden allesamt aus dem Manual „Gastrointestinale Tumoren“ des Tumorzentrums München entnommen (Werner, 2020).

2.5 Klinische Symptome

Unspezifische Symptome, wie Bauchschmerzen, rektale Blutungen, Anämie oder verändertes Stuhlverhalten, können Anzeichen für diese Tumorart sein, treten jedoch auch bei anderen gastrointestinalen Erkrankungen auf. Anhand der Symptome kann bereits eine Tendenz der Lokalisierung abgeschätzt werden: Ein gestörtes Stuhlverhalten durch eine Verengung des Darmlumens, gemeinsam mit weiteren Symptomen wie beispielsweise Diarrhoe sprechen für eine linksseitige Lokalisation des Tumors. Zu beachten ist, dass insgesamt etwa 10% der Patient*Innen mit Eisenmangelanämie ein kolorektales Karzinom haben. Dieses Symptom würde beispielsweise eher für eine rechtsseitige Lokalisation sprechen (Ballinger and Anggiansah, 2007).

Grundsätzlich handelt sich beim kolorektalen Karzinom jedoch um eine weitgehend asymptomatische Erkrankung, die erst im fortgeschrittenen Stadium die oben genannten Symptome zeigt. Bei näherer Betrachtung des Symptoms „rektale Blutung“ zeigt sich, dass es sowohl bei benignen als auch malignen Krankheiten zu diesem klinischen Erscheinungsbild kommen kann. Aus diesem Grund sollten weitere Faktoren in die Überlegung einbezogen werden. Eine plötzlich aufgetretene rektale Blutung bei Personen im Alter von oder über 45 Jahren stellt eine sofortige Indikation für eine umgehende Koloskopie dar. Bei jüngeren Patient*Innen hilft die Einbeziehung weiterer Risikofaktoren, wie unerklärlicher Gewichtsverlust, verändertes Stuhlverhalten oder eine positive Familienanamnese, um eine weitere Abklärung durch eine Koloskopie zu rechtfertigen (Dekker et al., 2019).

2.6 Diagnose

Der Goldstandard zur Diagnose eines kolorektalen Karzinoms ist die Endoskopie, wobei die Koloskopie von fortgeschrittenen Tumoren zu weniger Schwierigkeiten im Vergleich zu Frühformen derselben Tumorart führt. Als ergänzende Untersuchungsmethode wird die Computertomographie zur Diagnose bzw. Differenzierung von Polypen und kolorektalen Karzinomen genutzt. Bei rektaler Lokalisation wird jedoch hauptsächlich die Magnetresonanztomographie angewandt. Zum Zeitpunkt der Diagnose wird neben einem kompletten Blutbild die

Bestimmung des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) empfohlen. Bei erhöhten CEA-Konzentrationen besteht eine Assoziation mit einer schlechten Prognose. Das fehlende postoperative Absinken der CEA-Werte deutet auf eine Resterkrankung (residual disease) hin (Dekker et al., 2019).

Untersuchungen von okkultem Blut im Stuhl oder Messung des CEA zur Abklärung eines Verdachts auf ein kolorektales Karzinom sind nicht geeignet. Zum Screening asymptomatischer Patient*Innen können Hämoccult-Tests sehr wohl verwendet werden. Es ist jedoch anzumerken, dass diese bei symptomatischen Personen eine zu geringe Sensitivität aufweisen. Bei gebrechlichen und betagten Patient*Innen können traditionelle Untersuchungsmethoden Schwierigkeiten mit sich bringen. Prospektive Studien mit einem klinischen Outcome zwischen 12-30 Monaten haben verdeutlicht, dass eine Computertomographie des Abdomen mit oralem Kontrastmittel eine Sensitivität von 88-94% zur Erkennung eines Kolonkarzinom erreicht und in diesen Fällen als alternative Diagnostik Berechtigung im klinischen Alltag erlangt (Ballinger and Anggiansah, 2007).

2.7 Prognose

Die Überlebensrate von Patient*Innen mit kolorektalen Karzinomen ist abhängig von dem Stadium bei Erstdiagnose und unterscheidet sich je nach aktuell vorliegendem Stadium. Die Stadien-Einteilung erfolgt nach dem TNM-System von dem American Joint Committee on Cancer. Zur Veranschaulichung hier folgende Werte: Die 5-Jahres Überlebensrate für Stadium I des Kolonkarzinoms liegt bei 93,2%, hingegen für das Stadium IV bei 8,1%. An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass Patient*Innen mit derselben Histopathologie anhängig von ihrem genetischen und epigenetischen Hintergrund eine komplett unterschiedliche Progression und somit Outcome aufweisen können. Ein Verständnis von molekularen Prozessen, die Initiation und Entwicklung des kolorektalen Karzinoms beeinflussen, ist daher von größter Wichtigkeit (Nguyen and Duong, 2018).

Kolorektale Tumore im Stadium I und II, per definitionem Karzinome, welche sich auf die Dickdarmwand begrenzen, sind heilbar, breiten sich aber bei fehlender Behandlung auf regionale Lymphknoten aus (Stadium III) und metastasieren schließlich in die Peripherie (Stadium IV). 73% der Fälle im Stadium III können durch

eine Kombination aus operativer Herangehensweise und adjuvanter Chemotherapie geheilt werden. Stadium IV stellt eine infauste Prognose dar (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Zu betonen ist an dieser Stelle, dass 50% der Patient*Innen, die initial eine lokalisierte maligne Erkrankung diagnostiziert bekommen haben, anschließend bei Progression des kolorektalen Karzinoms Metastasen entwickeln werden. Ungefähr 30% zeigen bei Diagnosestellung bereits Metastasen (Zhou et al., 2020).

Ziel ist es, in Zukunft durch Präzisionsonkologie die Diagnose und Behandlung von Tumoren zu verbessern. Diese Art der Onkologie beschäftigt sich mit der molekularen Profilerstellung eines Tumors, mit dem Ziel, somatische Veränderungen, welche durch gezielte Therapie behandelt werden können, zu entdecken (Heitzer et al., 2019).

Zum heutigen Zeitpunkt sind einige Mutationen mit einem schlechteren Outcome für die Patient*Innen und fehlendem Ansprechen auf Therapie vergesellschaftet. Patient*Innen mit inaktiven *TP53* Mutationen zeigen erhöhte Mortalitätsraten. Es bestehen jedoch keine Hinweise auf Beeinflussung des Ergebnisses der Chemotherapie. Das Auftreten von *KRAS*-Mutationen lässt Aussagen über mögliche Resistenzen gegenüber der Anti-EGFR-Therapie treffen. Der *KRAS*-Mutationsstatus wird daher im klinischen Setting genutzt, um die therapeutische Effektivität vorauszusagen. Außerdem dienen Mutationen im *APC*-Gen als diagnostische Marker zur Identifikation des individuellen kolorektalen Karzinomrisikos. Patient*Innen mit familiärer adenomatöser Polyposis, die mit Keimbahnmutationen in einem Allel des *APC*-Gens beginnt, haben ein fast 100% Risiko bis zum 40. Lebensjahr an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Nguyen and Duong, 2018).

Des Weiteren können morphologische Kriterien zur Abschätzung der Prognose herangezogen werden. Invasionen lymphatischer und venöser Gefäße, perineurale Tumordinfiltrationen sowie Dedifferenzierungen des Tumors an der Invasionsfront weisen eine ungünstige Prognose auf. Lymphoide Infiltrationen des peritumorösen Gewebes mit Ausbildung von sogenannten Crohn's-like lesions sind hingegen prognostisch günstig (Werner, 2020).

2.8 Therapie

70-80% der Patient*Innen mit neudiagnostiziertem kolorektalem Karzinom weisen eine lokalisierte Erkrankung auf und sind somit für eine kurative chirurgische Resektion (R0) geeignet. Nachdem R0 erreicht wurde, wird Patient*Innen im Stadium III eine adjuvante Chemotherapie mit zytotoxisch wirkenden Mitteln standardmäßig empfohlen (Gustavsson et al., 2015). Dies beruht auf einer Analyse der Daten aus dem National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Trial. Darin wurde gezeigt, dass das Überleben durch eine chirurgische Versorgung in Kombination mit Chemotherapie im Vergleich zur Operation allein signifikant verbessert wird. Die Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit 5-Fluorouracil und Leukovorin nach einer chirurgischen Versorgung bietet somit einen Vorteil gegenüber einer alleinigen Operation (Wilkinson et al., 2010). Die übrigen 20-30% der Patient*Innen setzen sich aus Betroffenen mit bereits metastasiertem, nicht resezierbarem kolorektalem Karzinom zusammen. Bei einem beträchtlichen Anteil der an einem kolorektalen Karzinom Erkrankten (40-50%) kommt es außerdem zu einem Wiederauftreten nach chirurgischer Resektion oder zur Entwicklung von Metastasen, die sich typischerweise in der Lunge oder der Leber befinden. Im Rahmen der Behandlung von Patient*Innen mit metastatischen kolorektalen Karzinomen besteht die Notwendigkeit einer systemischen Therapie mit zytotoxischen Medikamenten (Gustavsson et al., 2015). In den letzten Jahrzehnten konnte man in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mCRC) einen Wandel beobachten: Statt der Monotherapie mit Fluoropyrimidinen setzt man mittlerweile auf verschiedene zytotoxische Kombinationsschemata und zielgerichtete Therapien, sogenannte targeted therapies. Obwohl die zielgerichtete Therapie immer öfter im klinischen Alltag eingesetzt wird, bleiben die traditionellen zytotoxischen Medikamente die Hauptstütze in der Therapie. Durch Optimierung der Dosierung von Fluoropyrimidinen und die Kombination mit Irinotecan und/oder Oxaliplatin konnte eine Verbesserung des Überlebens im Bereich des mCRC erreicht werden. Für über 40 Jahre stellten jedoch die Fluoropyrimidine die alleinige aktive Medikamentenklasse dar. Der zytotoxische Mechanismus von 5-Fluorouracil beruht auf der Störung der DNA-Synthese durch die Inhibierung der Thymidylate Synthase (TS). Zusätzlich kommt es sowohl zu DNA- als auch RNA-Kettenabbrüchen bei der Exposition gegenüber 5-Fluorouracil (Lucas et al., 2011).

Neben dem aggressiveren chirurgischen Vorgehen und Verbesserungen in der adjuvanten Behandlung haben auch das tiefere Verständnis der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms und somit die Entdeckung neuer molekularer Ziele zum Fortschritt im Management des kolorektalen Karzinoms beigetragen. Targeted Therapie, insbesondere Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)- und Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeting monoklonale Antikörper, sind bedeutende Bestandteile in der first-line Therapie des mCRC. Die Hauptsäule der Therapie des mCRC basiert jedoch noch immer auf einer Kombination von zytotoxischer Chemotherapie, wie Irinotecan oder Oxaliplatin, kombiniert mit 5-Fluorouracil und Leukovorin oder Capecitabine (FOLFIRI/FOLFOX oder CAPIRI/CAPOX). FOLFOX (5-Fluorouracil/Leukovorin/Oxaliplatin) ist der Goldstandard in der adjuvanten Therapie (Seeber and Gastl, 2016).

2.9 Molekulare Eigenschaften

Das klinische Verhalten maligner kolorektaler Tumore beruht auf Wechselwirkungen auf vielen verschiedenen Ebenen. Die molekularen Grundlagen der individuellen Suszeptibilität gegenüber kolorektalen Karzinomen zu verstehen und Einflussfaktoren der Tumorentstehung festzulegen, ermöglichen ein besseres Verständnis dieser Erkrankung. Auch die Entdeckung von Faktoren, die die Tumorprogression, das Therapieansprechen oder mögliche Resistenzentwicklung beeinflussen, sind von großer Bedeutung (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Die Progression vom kolorektalen Adenom zum Karzinom ist im Wesentlichen durch drei Hauptwege gekennzeichnet: die Chromosomale Instabilität, die Mikrosatelliten-Instabilität und den CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (Nguyen and Duong, 2018).

2.9.1 Chromosomale Instabilität

Der Verlust genomischer Stabilität bewirkt eine Weiterentwicklung des kolorektalen Karzinoms durch die Erleichterung der Ansammlung von verschiedenen Tumor-assoziierten Mutationen. Die chromosomale Instabilität ist dabei der häufigste Typ der genomischen Instabilität und verursacht zahlreiche Veränderungen hinsichtlich der chromosomalen Kopienzahlen und der chromosomalen Struktur.

Chromosomale Instabilität resultiert im Verlust der Wildtyp Kopien von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise *APC*, *P53* und *SMAD4*. Zahlreiche inaktivierende Mutationen von Genen, deren normale Funktion es sein sollte, chromosomale Stabilität während der Replikation zu wahren, sind in kolorektalen Karzinomen zu finden. Im Gesamten sind diese Mutationen schließlich für die chromosomale Instabilität dieser Tumore verantwortlich. Kolorektale Karzinome weisen im Vergleich zu anderen Tumorarten seltener Amplifikation in Bezug auf die Kopienzahlen von Genen oder Rearrangements von Genen auf (Markowitz and Bertagnoli, 2009). Die Mehrheit der sporadischen kolorektalen Karzinome, rund 85%, zeigen chromosomale Instabilitäten mit Veränderungen in der Anzahl und Struktur der Chromosomen. Gains oder Losses von chromosomalen Segmenten, chromosomale Rearrangements und der Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) sind Beispiele für diese Veränderungen und können essenziell für die Initiation und die Progression des kolorektalen Karzinoms sein. Außerdem zeigen chromosomale Instabilitäten Akkumulationen von Mutationen in bestimmten Onkogenen, wie *KRAS* und *BRAF*, und Tumorsuppressorgenen, wie *APC* und *TP53*. Die übrigen 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome zeigen Phänotypen von hochfrequenten Mikrosatelliten-Instabilitäten (Nguyen and Duong, 2018).

2.9.2 Mikrosatelliten-Instabilität

Unter Mikrosatelliten versteht man repetitive DNA-Sequenzen, welche aus Tandem-Wiederholungen von einem bis zu fünf Basenpaaren bestehen. Patient*Innen mit Mikrosatelliten-Instabilität zeigen eine große Anzahl an Replikationsfehlern in Folge des Verrutschens der DNA-Polymerase, besonders innerhalb repetitiver DNA-Sequenzen (Abbildung 2). Im Bereich der Mikrosatelliten-Sequenzen kommt es durch fortlaufende Insertion und Deletion von Nukleotiden sowohl zu längeren als auch kürzeren Allelen im Vergleich zu gesunden Individuen. Mikrosatelliten-Instabilitäten sind mit Mismatch-Reparatur-Defizienzen (Mismatch Repair, MMR), vorwiegend in Bezug auf *MLH1* und *MSH2*, assoziiert. Einschränkungen der MMR-Gene können durch Inaktivierungen in Folge von Mutationen oder durch epigenetische Inaktivierung bei CpG-Insel-Methylierungen des Promotors erklärt

werden. Gesteigerte Mutationsraten und ein erhöhtes Malignitätspotenzial durch Replikationsfehler sind Ergebnisse des Verlusts oder der Insuffizienz der MMR-Aktivität (Nguyen and Duong, 2018).

DNA-Reparatur Defekte kommen in einer Subgruppe der Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom vor. Gene, welche zur Reparatur eines Basen-Mismatch in der DNA benötigt werden, werden wie bereits erwähnt als Mismatch-Repair-Gene bezeichnet. Deaktivierungen dieser Gene können im Rahmen des Lynch Syndroms (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer, HNPCC) vererbt werden oder als erworbene Inaktivierungen bei Tumoren mit Methylierungs-assoziiertem-Silencing von Genen, die für ein DNA Mismatch-Repair-Protein codieren, vorkommen. HNPCC Patient*Innen mit Keimbahndefekten in Mismatch-Repair-Proteinen (vorwiegend *MLH1* und *MSH2*) leben mit einem Risiko von 80% im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Der Verlust der Funktion der Mismatch-Repair-Proteine ist nicht alleinig auf Keimbahnmutationen zurückzuführen. Eine somatische Inaktivierung des zweiten Wildtyp Allelpaares ist dafür notwendig. Diese somatische Deaktivierung von Mismatch-Repair-Genen tritt zusätzlich in ungefähr 15% der Patient*Innen mit nicht-familiärem kolorektalem Karzinom auf. Durch Promotor-Methylierung kommt es bei diesen Betroffenen zu biallelischen Silencing der Promotorregion des *MLH1* Genes und somit zu einer inaktiven und somit gestörten DNA-Reparatur (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Mikrosatelliten-Instabilität

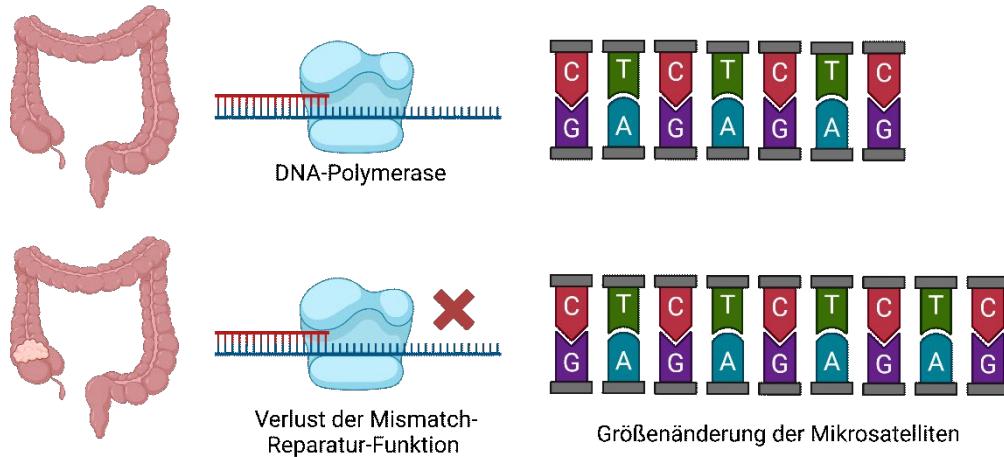


ABBILDUNG 2: MIKROSATELLITEN-INSTABILITÄT

In Abbildung 2 darf ein Aspekt der Mikrosatelliten-Instabilität veranschaulicht werden. Der Verlust der Mismatch-Reparatur-Funktion führt zu Größenveränderungen der mononukleosidischen oder dinukleosidischen Repeats, welche im gesamten Genom verteilt sind (Markowitz and Bertagnoli, 2009). In der ersten Reihe wird die physiologische Situation dargestellt. Die zweite Reihe zeigt die Folgen eines Defekt der Mismatch-Reparatur-Funktion. In diesem Fall kommt es zu einer Verlängerung des Mikrosatelliten-Abschnittes. Im Appendix wird die Publikationslizenz für diese in Biorender (created with BioRender.com) erstellte Grafik aufgelistet.

Der Verlust der Mismatch-Reparatur-Funktion ist gekennzeichnet durch das assoziierte Epiphänomen der Mikrosatelliten-Instabilität (Abbildung 2). Die Unfähigkeit, Strang Verschiebungen innerhalb der sich wiederholenden DNA-Sequenzen zu reparieren, resultiert in einer Größenänderung von mononukleosidischen oder dinukleosidischen Wiederholungen (Mikrosatelliten), welche durch das gesamte Genom verstreut sind. Die durch eine Mismatch-Repair Defizienz gekennzeichnete kolorektale Karzinome entstehen hauptsächlich im proximalen Kolon. Außerdem wurde bei sporadischen Fällen eine Assoziation mit höherem Patientenalter und weiblichem Geschlecht aufgezeigt. Bei Mismatch-Reparatur-Defizienzen kann es zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie *TGF-β*, *TGFBR2* und *BAX*, welche aus funktionellen Regionen bestehen, die sich als mononukleosidische oder dinukleosidische Wiederholungssequenzen

repräsentieren, kommen. Auch Keimbahninaktivierung des Basenexzision Reparaturgenes, *mutY* homologue (*MUTYH* oder *MYH*), kann zu malignen kolorektalen Tumoren führen. Das MYH-Protein schneidet das 8-oxoguanine Produkt im Rahmen von oxidativen Schäden zu Guanin zu. In Patient*Innen, welche zwei inaktive *MYH*-Allele in der Keimbahn aufweisen, entwickelt sich ein Polyposis-Phänotyp mit einem Risiko von 100% im Alter von 60 Jahren ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Bisher wurden noch keine somatischen Inaktivierungen von *MUTYH* im kolorektalen Karzinom entdeckt (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

2.9.3 CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (CIMP)

Epigenetisches Silencing von Genen, meist in Folge von DNA-Methylierungen, führt ebenfalls zu Inaktivierung von Genen bei kolorektalen Karzinomen. Im kolorektalen Krebsgenom ist eine geringe Abnahme an Cytosin-Methylierungen und eine beträchtliche Zunahme von Methylierungen innerhalb Promotor-assoziiertes CpG-Inseln zu beobachten. Letzteres kann zu epigenetischen Silencing der Genexpression führen. In sporadischen malignen kolorektalen Tumoren mit Mikrosatelliten-Instabilität führt somatisches epigenetisches Silencing zu einer Blockade der Expression von *MLH1*. Das Phänomen des CpG-Insel-Methylator-Phänotyps, CIMP oder CIMP-high, beschreibt eine spezielle Subgruppe, welche als Einheit abweichend methyliert wird. Dies ist in 15% der kolorektalen Karzinome zu beobachten und tritt fast immer in Kombination mit einer aberranten Methylierung von *MLH1* auf (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

DNA-Hypermethylierung in Promotor CpG Inseln von Tumorsuppressorgenen führt durch Inaktivierung der Transkription zum Silencing von Genen. In 30-35% der kolorektalen Adenome wurde der CpG-Insel-Methylator-Phänotyp nachgewiesen und stellt somit einen frühzeitigen Schritt der Karzinogenese dar. Als Charakteristikum des serratierten Pathways ist dieser Phänotyp ein wichtiger Mechanismus in der kolorektalen Tumorgenese. Zu betonen ist, dass sporadische kolorektale Tumore mit Mikrosatelliten-Instabilität fast ausschließlich mit CIMP-assoziiertes Methylierung von *MLH1* und folglich der Inaktivierung dieses Genes vergesellschaftet sind. Familiäre kolorektale Tumore mit Mikrosatelliten-Instabilität sind hingegen durch Keimbahnmutationen in den MMR-Genen (*MLH1* und *MSH2*)

verursacht. CIMP positive Tumore zeigen bestimmte Eigenschaften: Lokalisation im proximalen Kolon, schlechte Differenzierung, Mikrosatelliten-Instabilität, *BRAF*-Mutationen und Wildtyp *KRAS*. Beobachtet man die Häufigkeit von *BRAF* Mutationen, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen CIMP positiven und negativen Tumoren (Nguyen and Duong, 2018).

2.9.4 Tumorsuppressorgene

In der Tumorentwicklung des kolorektalen Karzinoms wird *APC* eine Schlüsselrolle zugeordnet. In Abwesenheit von einem funktionierenden *APC* kommt es zur kontinuierlichen Aktivierung des Wnt-Signalweges. Dies wird als initiiierendes Event der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms angesehen. Eine Keimbahnmutation von *APC* resultiert in einem vererbten Krebs-Prädisposition-Syndrom mit mehr als 100 adenomatösen Polypen, der familiären adenomatösen Polyposis. Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom in Alter von 40 Jahren zu erkranken, beträgt 100%. Somatische Mutationen und Deletionen, die zu einer Inaktivierung von beiden Kopien von *APC* führen, sind in den meisten sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen vorhanden (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

90% aller Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom zeigen entweder *APC*-Mutationen oder einen Allelverlust von *APC*. Epigenetische Inaktivierungen durch Promoter-Hypermethylierungen wurden in 18% der primären kolorektalen Karzinome und Adenome entdeckt. Mutationen von *APC* führen zu einer Störung der Formation des Zerstörungskomplexes, welcher dem Abbau und der Suppression des Wnt/ β -catenin Signalwegs dient. Akkumulation des Proteins β -catenin führt zur Komplexbildung mit TCF/LEF. In weiterer Folge kommt es durch die Überaktivierung des Wnt-Signalwegs zur Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung von Krebszellen. In einem geringeren Ausmaß kommt es auch bei Mutation von β -catenin selbst und bei Mutationen von *AXIN2* zu demselben Resultat (Nguyen and Duong, 2018).

Den zweiten entscheidenden Faktor stellt die Inaktivierung von p53 durch eine Mutation von *TP53* dar. In den meisten kolorektalen Karzinomen sind beide *TP53* Allele inaktiviert in Folge einer Mischung aus Missense-Mutationen, welche die Transkriptionsaktivität von p53 deaktivieren, und einer 17p chromosomalen

Deletion, die das zweite *TP53* eliminiert. Die Inaktivierung von *TP53* ist meist mit dem Übergang von großen Adenomen in invasive Karzinome vergesellschaftet (Markowitz and Bertagnolli, 2009). In 50 - 75% der kolorektalen Karzinome wird ein Funktionsverlust von *TP53* nachgewiesen. Im Vergleich zu Adenomen kommt es in Karzinomen wesentlich häufiger zu diesem Ereignis, wodurch die Bedeutung in der Transition vom Adenom zum Karzinom unterstrichen werden kann. *TP53* ist am kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert, welches häufig im kolorektalen Karzinom verloren geht. Dieses Gen wird auch als Hüter des Genoms bezeichnet, da es für die Kodierung von Transkriptionsfaktoren, die wiederum an der Transkription von einer Vielzahl an Genen beteiligt sind, verantwortlich ist. Bei DNA-Schäden bewirkt *TP53* einen Zellzyklusarrest in der Phase G1 beziehungsweise G2 oder leitet bei ausgedehnter Schädigung die Apoptose ein. Funktionsverlust von *TP53* führt zur Übertragung von geschädigter DNA auf die Tochterzellen (Nguyen and Duong, 2018).

Der dritte Schritt im Rahmen der Progression des kolorektalen Karzinoms wird durch eine inaktivierende Mutation des TGF- β Signaling dargestellt. Rund ein Drittel aller Patient*Innen weist somatische inaktivierende Mutationen von *TGFBR2* auf. *TGFBR2* ist in Tumoren mit Mismatch-Reparatur-Defizienzen durch eine charakteristische Frameshift-Mutation im Polyadenine Repeat innerhalb der *TGFBR2* kodierenden Sequenz inaktiviert. Bei zumindest der Hälfte aller kolorektalen Karzinome mit Wildtyp-Mismatch-Repair ist TGF- β Signalling abgeschaltet. Die Inaktivierung dieses Pathways stimmt mit der Transition von Adenomen zu high-grade Dysplasien oder Karzinomen überein (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

70% aller primären kolorektalen Karzinome zeigen zu einem späteren Zeitpunkt der Karzinogenese einen allelischen Verlust des Chromosoms 18q, welcher mit negativen Auswirkungen auf das Überleben der Patient*Innen assoziiert ist. Die große Anzahl an Deletionen im Chromosom 18q lässt an die Lokalisation von Tumorsuppressorgenen in dieser Region denken. Die Inaktivierung dieser Gene, wie beispielsweise *DCC*, *SMAD2* und *SMAD4*, könnte Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms haben. In der Vergangenheit wurde *DCC*, welches für eine Komponente des Neutrin-1 Rezeptor kodiert, eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugesprochen. Diese Behauptung konnte jedoch nicht

ausreichend bewiesen werden. *SMAD2* und *SMAD4*, welche für downstream signal transducers des TGF- β codieren, stellen hingegen etablierte Tumorsuppressorgene dar. Veränderungen in diesen Genen könnten zu Resistenzen von TGF- β führen und in der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen. Die Häufigkeit somatischer Mutationen von *SMAD2* und *SMAD4* im kolorektalen Karzinom ist jedoch relativ niedrig. Im Pankreaskarzinom hingegen zeigt sich Inaktivierungen von *SMAD4* in 60% aller Patient*Innen. Außerdem ist die Geneexpression dieser beiden Gene in kolorektalen Karzinomen trotz Verlust der Heterozygotie von 18q erhalten. Dies lässt vermuten, dass andere Tumorsuppressorgene das Ziel des allelischen Verlustes des Chromosoms 18q im kolorektalen Karzinom sind (Nguyen and Duong, 2018).

2.9.5 Onkogene

Mutationen der Onkogene, *RAS* und *BRAF*, die zu einer Aktivierung des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweges führen, treten in 37% beziehungsweise 13% der kolorektalen Karzinome auf. *BRAF*-Mutationen sind vor allem in kleinen Polypen, *RAS*-Mutationen eher in hyperplastischen Polypen, sowie serratierten Adenomen und proximalen Kolontumoren, insbesondere bei jenen mit CIMP-Phänotyp, zu finden. In einem Drittel aller kolorektalen Karzinome sind aktivierende somatische Mutationen von *PI3KCA* zu finden. Dieses Gen kodiert für die katalytische Subunit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Zur Genfamilie *RAS* wird *KRAS* gezählt, welches in der Mehrheit der menschlichen Zellen zur Expression von *KRAS* führt. *KRAS* ist ein membrangebundenes GTP/GDP bindendes Protein mit intrinsischer GTPase Aktivität und kann in einem aktiven oder auch inaktiven Zustand vorgefunden werden. Eine Mutation von *KRAS* führt zu einer Störung der intrinsischen GTPase Aktivität von *KRAS*, folgend kommt es zur Ansammlung von *KRAS*-Proteinen im GTP gebundenen aktiven Zustand. Dies resultiert in einer Aktivierung der nachgeschalteten proliferativen Signalwege. Onkogene Mutationen im *RAS*-Gen wurden in 30% aller menschlichen Tumore entdeckt, wobei 85% der Mutationen auf *KRAS* zurückzuführen sind. Das frühzeitige

und häufige Auftreten dieser Mutationen lässt an eine Assoziation zur menschliche Tumorgenese denken (Nguyen and Duong, 2018).

2.9.6 Growth Factor Pathways

Beim kolorektalen Karzinom kommt es häufig zu Aktivierungen von Growth Factor Pathways. Während der Entwicklung eines Adenoms stellt unter anderem die Aktivierung des Prostaglandin-Signaling einen frühzeitigen Schritt dar. In Folge von Entzündungsprozessen oder Mitogen-assoziierten Hochregulierungen von COX-2, verantwortlich für die Synthese von Prostaglandin E2, welches wiederum mit kolorektalen Karzinomen assoziiert ist, kann dieser Prozess ausgelöst werden. Erhöhte Prostaglandin E2 Aktivität kann als Folge des Verlust von 15-Prostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH) gedeutet werden. Dieses Enzym katalysiert für gewöhnlich den Abbau von Prostaglandinen. In zwei Drittel aller kolorektalen Karzinome werden erhöhte Werte von COX2 gefunden. In 80% aller kolorektalen Adenome und Karzinome sind Verluste von 15-PGDH nachweisbar (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Der Epidermal Growth Factor (EGF) spielt in einer Subgruppe der kolorektalen Karzinome eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um ein lösliches Protein, welches die Signalwege des EGF-Rezeptors beeinflusst. Es kommt dabei zu einer Aktivierung des MAPK und der PI3K Kaskade (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Außerdem beeinflusst der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der nach Verletzungen oder bei Gewebewachstum der Angiogenese dient, das Wachstumspotenzial von kolorektalen Karzinom und die Letalität der Patient*Innen (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

3 Liquid Biopsy

Der Begriff Liquid Biopsy, geprägt von Pantel und Alix-Panabières im Jahre 2010, beschreibt den Versuch, aus Blutproben denselben Informationsgehalt wie aus Gewebeproben zu erhalten (Pantel and Alix-Panabieres, 2010).

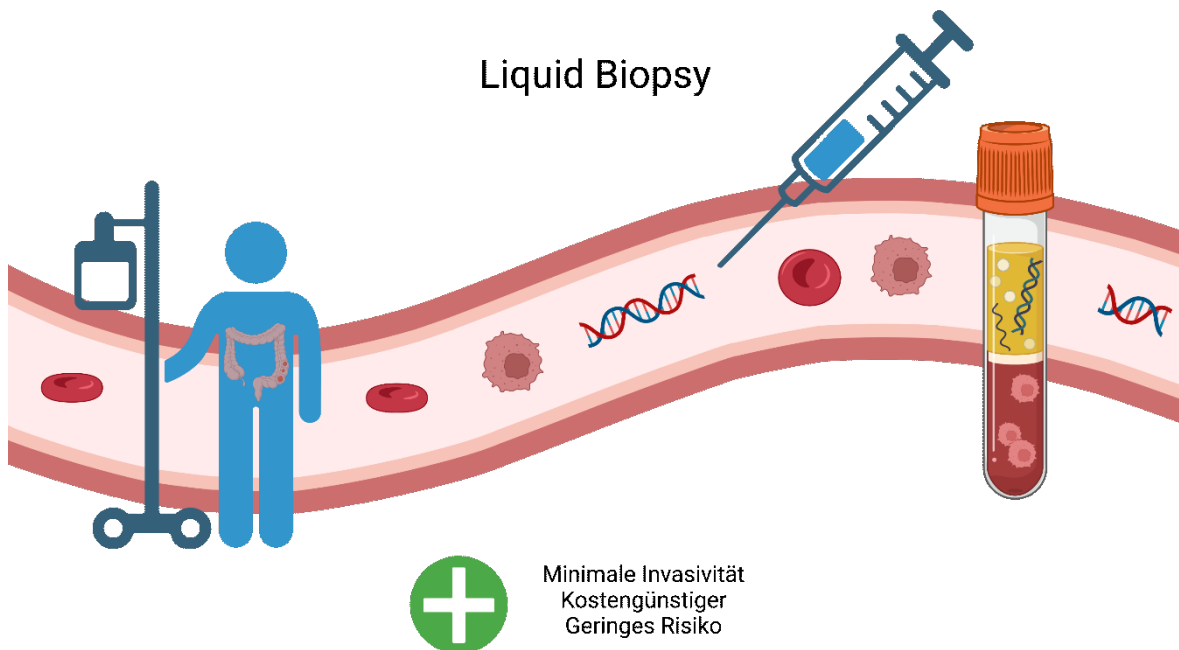


ABBILDUNG 3: LIQUID BIOPSY

In der Abbildung 3 wird das Prinzip des Verfahrens Liquid Biopsy veranschaulicht. Die sich durch die Grafik ziehende Struktur stellt ein Blutgefäß dar. In diesem befinden sich rote Blutkörperchen, DNA und Tumorzellen. Bei Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen ist es durch eine Blutabnahme möglich, genetische Informationen über den Tumor zu erhalten. Die minimalinvasive Methode, Liquid Biopsy, ermöglicht die Analyse von Tumorkomponenten, wie zirkulierender Tumor-DNA und zirkulierender Tumorzellen in Körperflüssigkeiten (Heitzer et al., 2019). Im Appendix wird die Publikationslizenz für diese in Biorender (created with BioRender.com) erstellte Grafik aufgelistet.

Vorteile dieser Methode sind unter anderem das geringere Risiko während der Probenentnahme, angenehmere Bedingungen für Patient*Innen und der niedrigere Kostenfaktor (Abbildung 3). Die mögliche mehrmalige Probenentnahme im Verlauf der Erkrankung stellt neben der minimalen Invasivität weitere positive Argumente

dar. Eine Liquid Biopsy Probe liefert im Vergleich zur klassischen Gewebeprobe mit Limitierung auf die jeweilige anatomische Region Informationen über die gesamte Tumorlast. Zu beachten ist, dass sich der Begriff Liquid Biopsy auf die Messung löslicher Faktoren, im engeren Sinne Proteine, Tumormarker wie beispielsweise CEA, Circulating Tumor Cells (CTC) und zirkulierende zellfreie Nukleinsäure bezieht (Merker et al., 2018).

Weitere Analysen im Rahmen von Liquid Biopsy können zirkulierende freie RNA (circulating cell-free RNA, cfRNA), zirkulierende extrazelluläre Vesikel, wie Exosome, tumor-educated platelets oder Metabolite sein. Neben dem Gewinn von Informationen, über Mutationen und Kopienzahlveränderungen, wird Liquid Biopsy vermehrt zur Charakterisierung des Transkriptoms, des Epigenoms, des Proteoms und des Metaboloms gefolgt von einer multiparametrischen Analyse genützt (Heitzer et al., 2019).

Besonders wenn Tumore nur durch Feinnadelbiopsien erreicht werden können, wie beispielsweise bei Lungenkarzinomen, wird oft nicht genügend Material für die Genotypisierung akquiriert. In diesen Fällen stellt die Liquid Biopsy eine erfolgversprechende Alternative dar. Auch das Ansprechen auf Therapie oder das Auftreten von Resistenzen wird durch Liquid Biopsy überwacht (Bettegowda et al., 2014).

3.1 Cell-free DNA

Tumor DNA kann in der Blutzirkulation in zwei Formen detektiert werden: als zellfreie zirkulierende Tumor DNA, welche weder mit Zellen noch mit Zellfragmenten assoziiert ist und aus kleinen Nukleinsäurenfragmenten besteht, und als CTCs, welche intakte, lebensfähige Zellen aus dem Tumor darstellen. Beide Formen können in Patient*Innen mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen detektiert werden (Bettegowda et al., 2014).

Erstmalig wurde im Jahre 1948 das Vorkommen von zellfreier Nukleinsäure im menschlichen Blut von Mandel and Métais beschrieben. Zellfreie DNA (cell-free DNA, cfDNA) kommt bei gesunden Individuen in einer Konzentration von 1-10 ng ml⁻¹ Plasma vor. Erhöhte cfDNA Konzentrationen findet man bei

Krebspatient*Innen, nach akutem Trauma, Zerebralinfarkten, Sport, Transplantationen und Infektionen. Die Identifizierung von fetalen DNA-Sequenzen im mütterlichen Blut ermöglicht heute die pränatale Geschlechtsbestimmung, die Diagnose von monogenetischen Erkrankungen und Feststellung von Aneuploidien wie beispielweise der Trisomie 21 (Wan et al., 2017).

Durch Apoptose, Nekrose oder aktive Sekretion wird cfDNA von Zellen in die Zirkulation freigesetzt. Nicht nur im Blut, sondern auch in verschiedenen anderen Körperflüssigkeiten, wie Urin, Speichel, Pleuraflüssigkeit und Liquor, ist eine Detektion von cfDNA möglich. Das Genom oder Epigenom der Ursprungszelle wird durch genetische und epigenetische Charakteristika der cfDNA Moleküle widergespiegelt. Durch Untersuchungen der Methylierungsmuster konnte gezeigt werden, dass der Großteil der cfDNA im Plasma von gesunden Individuen von hämatopoetischen Zellen abstammt. In Bezug auf Tumorerkrankungen kann eine ctDNA-Analyse als eine Echtzeit-Bestandsaufnahme der Krankheitslast gesehen werden, da die Halbwertszeit der cfDNA in der Zirkulation zwischen 16 Minuten und 2.5 Stunden beträgt. Die Länge der cfDNA zeigte in Untersuchungen in etwa 166bp. Dies stimmt mit der Länge der DNA, welche um ein Nukleosom gewickelt ist (147bp) und einer Linker-DNA, assoziiert mit dem Histon H1, überein. Circulating tumor DNA (ctDNA) Moleküle sind kürzer als nicht mutierte cfDNA Moleküle, wobei die Ursache hierfür noch nicht gefunden wurde. Eine Verkürzung der Fragmente wurde auch bei fetaler cfDNA im Vergleich zu maternaler cfDNA beobachtet (Wan et al., 2017).

ctDNA wird in den meisten Patient*Innen mit metastasierten Tumorerkrankungen festgestellt, wobei die Konzentration dieser auch innerhalb einer Tumorart stark variieren kann. Diese Variabilität wird durch Unterschiede in den Kopienzahlen der Tumore erklärt. Die ctDNA Levels bei Patient*Innen mit lokalisierten Erkrankungen sind geringer als bei jenen mit metastasierten Tumorerkrankungen. Außerdem wurde eine positive Korrelation der Konzentrationen von ctDNA mit dem jeweiligen Tumorstadium (Bettegowda et al., 2014) beobachtet. Die Fähigkeit zum Nachweis von Mutationen in Plasma cfDNA korreliert ebenfalls mit der Tumorlast (Heitzer et al., 2019).

3.2 Somatische Kopienzahlveränderungen

Liquid Biopsy zeigt im klinischen Setting bereits erfolgversprechende Ergebnisse im Management des kolorektalen Karzinoms: von der Früherkennung, der Detektion von Rezidiven, der Identifikation von prognostischen Markern, der molekularen Charakterisierung der Erkrankung bis zur Überprüfung des Ansprechens der gewählten Therapie. Insbesondere Mutationen, die die Krebsentwicklung aktiv vorantreiben, sind hierbei von großem Interesse. Man geht davon aus, dass im Speziellen fokale Kopienzahlveränderungen bzw. focal Somatic Copy Number Alteration (SCNA) eine bedeutende Rolle spielen. SCNA werden beschrieben als Veränderungen, welche nur eine bestimmte Länge eines Chromosomenarms umfassen. Diese beinhalten eine beschränkte Anzahl an Genen, von welchen ein Wachstumsvorteil ausgehen kann. In der Literatur gibt es verschiedene Definitionen eines fokalen Events (Zhou et al., 2020).

In dieser Diplomarbeit wird folgende Definition nach Ulz auf die vorliegenden Daten angewandt: Die Größe des Amplikons soll kleiner als 20 Mb mit einer \log_2 -ratio > 0.2 and 0.2 größer als die angrenzenden Segmente sein. Außerdem wurden Regionen mit > 100 Genen, $> 50\%$ segmentalen Duplikationen oder Überlappungen mit Datenbanken von bekannten genomischen Varianten exkludiert (Ulz et al., 2016).

Somatische Kopienzahlveränderungen (SCNA), abzugrenzen vom Begriff Copy Number Variation (CNV), sind häufig in Tumoren zu finden. In manchen Fällen haben fokale SCNAs zur Identifikation von Genen, die Malignität verursachen, geführt und somit spezifische Behandlungsversuche ermöglicht. Die Schwierigkeit besteht darin, zwischen SCNAs, welche das Tumorstadium antreiben, und den unzähligen weiteren Veränderungen, die sich während der Tumorgenese anhäufen, zu unterscheiden. Untersuchungen des gesamten Genoms haben gezeigt, dass die am häufigsten vorkommenden SCNAs entweder fokal oder exakt die Länge eines Chromosomenarms oder eines ganzen Chromosoms aufweisen. Außerdem verhält sich die Häufigkeit fokaler SCNAs umgekehrt proportional zu deren Länge (Beroukhi et al., 2010).

3.3 Next Generation Sequencing

Die Konzentrationen von zirkulierender Tumor DNA im Plasma korrelieren mit Tumorgröße und Stadium. Zu Krebsfrüherkennung benötigt man daher ctDNA Assays, die hoch sensitiv, daher aber auch wesentlich teurer sind. Malignome im Spätstadium bringen höhere Konzentrationen von ctDNA mit sich, wodurch eine moderate Sensitivität oft ausreichend ist. Unterschieden wird prinzipiell zwischen PCR-based-Sequencing (Polymerase Chain Reaction) und NGS-based-Sequencing (Next Generation Sequencing). PCR-based-Sequencing wird für single-locus/multiplexed Assays und targeted panels verwendet. Währenddessen kann man NGS-based-Sequencing auf alle Panel-Größen anwenden. PCR-basierte Methoden gehen zwar mit hoher Sensitivität und geringeren Kosten einher, jedoch sind Inputmenge und Geschwindigkeit der Analyse begrenzt. Des Weiteren ist nur ein Screening nach bereits bekannten Varianten möglich. Eine erhöhte Verarbeitungsmenge und die Entdeckung neuerer Varianten sind die großen Vorteile der NGS-Methode. Außerdem kann durch spezielle Markierungen, wie beispielsweise unique molecular identifier oder unique barcodes, die Sensitivität von NGS weiter erhöht werden. NGS wird unter anderem im Rahmen von gezielten Panels zur spezifischen und hochsensitiven Detektion von ctDNA-Mutationen verwendet. Einerseits bringen gezielte Panels aufgrund ihrer hohen Sensitivität und erschwinglichen Kosten viele Vorteile, andererseits ist nur eine Detektion von Punktmutationen und Indels möglich. Der große Nutzen des NGS liegt in der Verwendung von ungezielten Panels zur Detektion von genomweiten DNA-Varianten (Chen and Zhao, 2019).

3.4 Whole-Genome-Sequencing

Whole-Genome-Sequencing (WGS) wird verwendet, um Informationen über das gesamte Tumorgenom mitsamt Punktmutationen, Indels, Rearrangements und CNAs zu erhalten. Der Informationsgewinn aus WGS hängt jedoch stark von der sogenannten Coverage (Abdeckung) ab. Beispielsweise reicht eine 0,1-fache Coverage oder shallow Whole-Genome-Sequencing (sWGS) aus, um somatische Kopienzahlveränderungen mit hoher Zuverlässigkeit zu erkennen (Heitzer et al., 2013). Jüngste Ansätze, gekennzeichnet durch eine hohe Coverage, bieten neue

Möglichkeiten zum Nachweis molekularer Merkmale aus cfDNA (Hasenleithner and Speicher, 2022). Whole-Exome-Sequencing (WES) stellt eine populäre Alternative des WGS dar, da es durch die alleinige Sequenzierung der Exons zu Kosteneinsparungen kommt (Chen and Zhao, 2019). Abbildung 4 verdeutlicht die Unterschiede des WGS gegenüber anderen Sequencing-Formen.

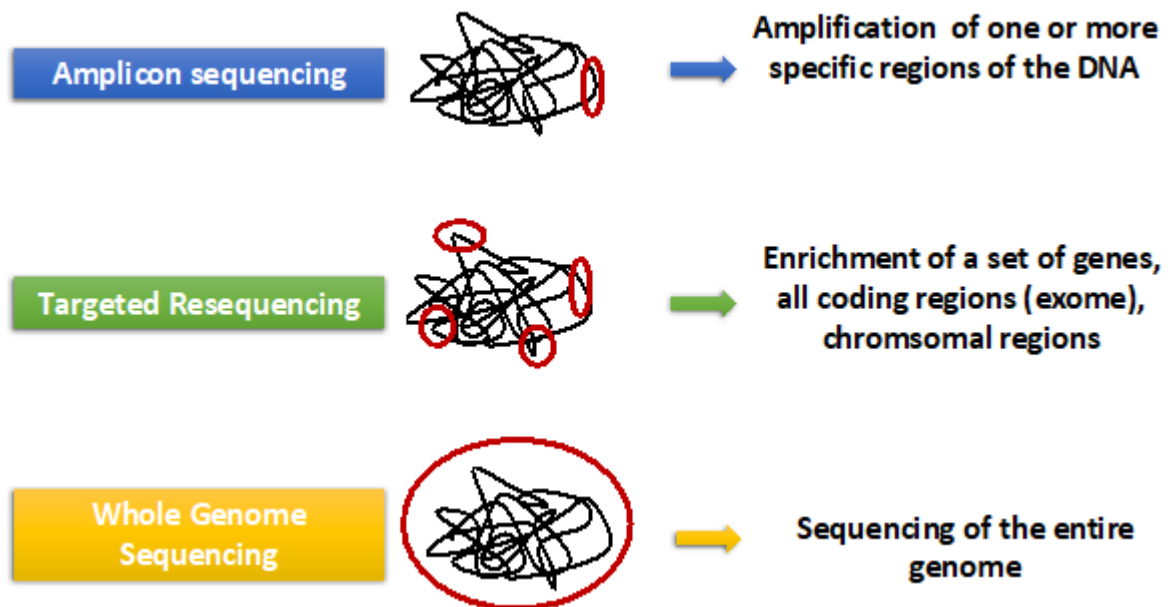


ABBILDUNG 4: WHOLE GENOME SEQUENCING

Abbildung 4 zeigt graphisch die Unterschiede zwischen Amplicon Sequencing, Targeted Resequencing und Whole-Genome-Sequencing. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird WGS zur Sequenzierung des gesamten Genoms angewandt. Beim Amplicon-Sequencing werden hingegen eine oder mehrere spezifische Regionen der DNA analysiert. Zu unterscheiden ist davon das sogenannte Targeted-Resequencing, bei dem es zu einer Anreicherung einer Reihe von Genen, codierenden Regionen (Exons) oder chromosomalen Regionen kommt. Diese Grafik wurde dankenswerterweise von Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Ellen Heitzer zur Verfügung gestellt.

WES oder WGS ermöglichen die umfassende Abdeckung aller kodierenden Bereiche des Genoms und im Falle des WGS auch aller nicht kodierenden Bereiche. Im Gegensatz zu Targeted Sequencing können somit auch neuartige Mutationen einer Tumorentität entdeckt werden (Hasenleithner and Speicher, 2022). Abbildung 5 darf die Bedeutung der Verwendung eines bestimmten cfDNA-Assays zum Nachweis unterschiedlicher genetischer Veränderungen verdeutlichen.

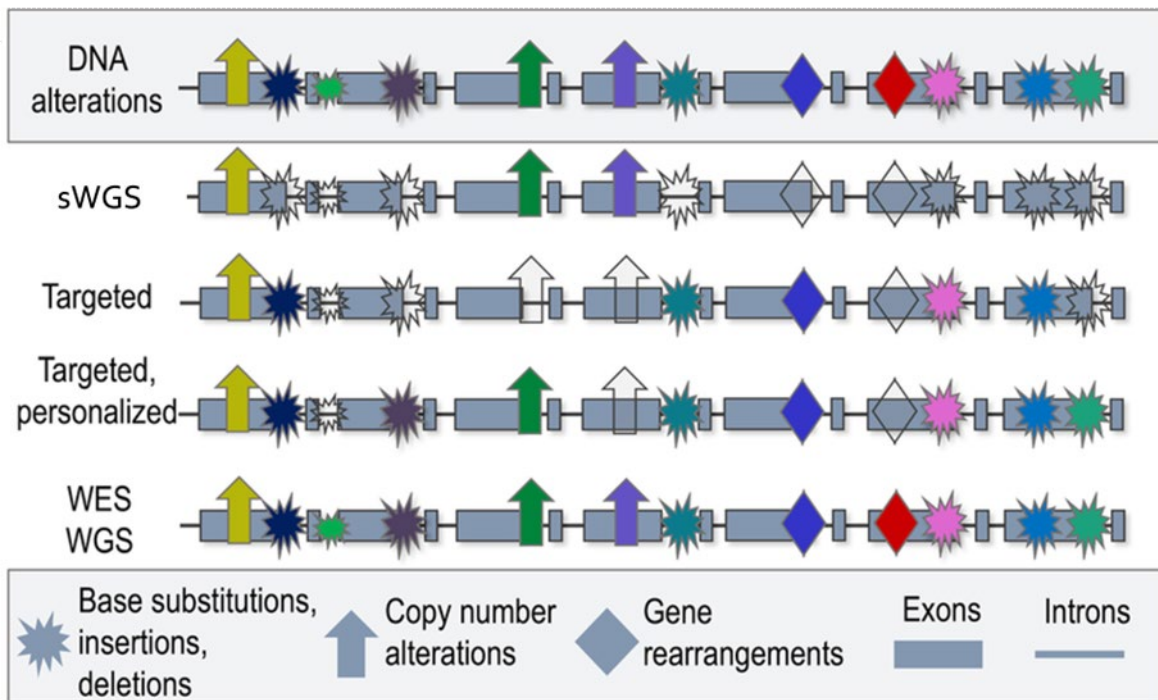


ABBILDUNG 5: VORTEILE DES WGS

Abbildung 5 aus dem Molecular Cancer Journal (Hasenleithner and Speicher, 2022) verdeutlicht die Auswirkung der Verwendung unterschiedlicher cfDNA-Assays. Die erste Reihe zeigt ein DNA-Segment mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen, welche in der Legende erläutert werden. Die zweite Reihe veranschaulicht die Verwendung eines Standard-Panels (sWGS). Durch die farblosen Symbole werden Veränderungen gekennzeichnet, die durch dieses allgemeine Assay übersehen werden. Die dritte Zeile soll die gezielte Verwendung von Panels, die auf bestimmte Tumorentitäten zugeschnitten sind, widerspiegeln. Hier besteht die Gefahr, dass für den jeweiligen Tumor neuartige Mutationen übersehen werden können. Die vierte Zeile zeigt die Verwendung eines patientenspezifischen Multiplex-Tests, der individuell auf der Grundlage der Sequenzierungsinformation des Primärtumors entwickelt wurde. Neue Veränderungen, die zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten sind, können dadurch möglicherweise nicht detektiert werden. Die fünfte Zeile zeigt die Verwendung von WES oder WGS. Durch diese Methoden kann eine umfassende Abdeckung aller kodierenden Bereiche des Genoms und im Falle von WGS auch aller nicht kodierenden Bereiche ermöglicht werden (Hasenleithner and Speicher, 2022).

Genomische Instabilität als ein Bestandteil der Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011) spielt eine große Rolle hinsichtlich des genomweiten Profilings der ctDNA. SCNA im Sinne von Deletionen, Duplikationen und Amplifikationen mit bis zu hunderten Kopien von relativ schmalen genomischen Regionen findet man

häufig in Tumoren. Genetische Instabilität führt meist zu massiven Deletionen und Gains. Fokale Amplifikationen hingegen entstehen durch Progression oder selektiven Druck im Rahmen der Therapie. Onkogene Amplifikationen stehen damit direkt in Relation mit der klinischen Aggressivität des Tumors und treten meist erst im späteren Krankheitsverlauf auf. Zu diesem Zeitpunkt kann es oft nicht mehr möglich sein, Gewebeprobe zu entnehmen, um neu aufgetretene Veränderungen zu detektieren. Durch Liquid Biopsy und genomweite Sequencing-Methoden kann die Entwicklung und Plastizität der Tumore jedoch effektiv verfolgt werden. SCNA können durchaus im Zuge von WES detektiert werden. Vergleicht man diese Methode jedoch mit WGS zeigt sich, dass es vermehrt zu Bias und Störgeräuschen kommt, die die Detektion von SCNA erschweren. Aus diesem Grund verwendet man zur Identifikation von SCNAs in den meisten Fällen WGS (Zhou et al., 2018).

Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass Whole-Genome-Sequencing mit einer shallow sequencing Tiefe von 0.1x ausreichend für eine ausreichende Analyse von Kopienzahlveränderungen in einzelnen Zellen ist (Navin, Kendall et al. 2011).

4 Zielsetzung

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit liegt darin, häufig auftretende fokale somatische Kopienzahlveränderungen oder SCNAs in Patient*Innen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom sowohl in der Literatur als auch in der folgenden untersuchten Kohorte zu identifizieren.

Frühere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass fokale Amplifikationen und Deletionen im Vergleich zu einem Loss oder Gain des gesamten Chromosoms oder eines ganzen Chromosomenarms, potenzielle onkogene Treiberänderungen darstellen (Zhou et al., 2020). Aus diesem Grund sind genomische Analyse und klinische Annotationen fokaler Ereignisse von großer Wichtigkeit hinsichtlich der aktuellen Krebsforschung. Die Identifizierung dieser Ereignisse wird dazu beitragen, weitere eingehende Studien zu konzipieren, um die biologische Funktion und die klinische Assoziation dieser häufig amplifizierten und deletierten Gene aufzuklären. Daher handelt es sich in dieser Diplomarbeit um eine explorative Analyse, die den Grundstein für künftige Studien legen soll. Der in dieser Abschlussarbeit vorgestellte

Workflow ist an einen Prozess aus einer Arbeit im Genome Medicine angelehnt (Zhou et al., 2020).

Anhand dieser Diplomarbeit soll außerdem gezeigt werden, welche Programme und Portale zur Analyse von genetischen Informationen zur Verfügung stehen. Beispielsweise wird der Umgang mit cBioPortal näher beleuchtet. Es handelt sich dabei um eine Webresource, die sowohl die Analyse und Erforschung als auch die Visualisierung von multidimensionalen genomischen Krebsdaten ermöglicht (Gao et al., 2013). Des Weiteren wird die umfassende Wissensdatenbank für Präzisionsonkologie, OncoKB, angewandt. Die Annotierung von somatischen molekularen Veränderungen hinsichtlich ihrer biologischen und onkogenen Effekte sowie ihrer prognostischen und prädiktiven Signifikanz wird durch dieses Tool erreicht. Außerdem sollen mit Hilfe von OncoKB potenzielle Auswirkungen auf die Behandlung bzw. das Ansprechen auf die Behandlung abgeschätzt werden (Chakravarty et al., 2017). Mit dieser Arbeit darf auch ein Einblick in die Welt der Entscheidungsunterstützungssysteme ermöglicht werden. Präzisionsonkologie erfordert, dass molekulare Daten in Therapieempfehlungen umgemünzt werden. Jedoch erschwert die steigende Komplexität durch Next Generation Sequencing die klinische Interpretation der Daten enorm (Perakis et al., 2020). Aus diesem Grund sollen Programme, wie der NAVIFY Mutation Profiler, im Folgenden beschrieben werden. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Korrelation zwischen den Kopienzahlveränderungen und den jeweiligen Expressionslevels dar. Ein neuer Algorithmus namens CiberAMP aus dem Jahr 2022 identifiziert dabei differentielle mRNA-Expression, die in Verbindung zu somatischen Kopienzahlveränderungen steht (Caloto et al., 2022). Außerdem soll mit Hilfe von cBioPortal ein weiterer Weg veranschaulicht werden, um eine Korrelation zwischen Genamplifikationen und Genexpression zu veranschaulichen.

Die Gesamtheit dieser verschiedenen Programme und Algorithmen zielt schlussendlich darauf hin, genetische Veränderungen im kolorektalen Karzinom zu verarbeiten und zu analysieren. Dies wiederum dient im Großen und Ganzen dazu, die Therapie und somit die Prognose des metastasierten kolorektalen Karzinoms zu verbessern.

4.1 Der medizinischen Alltag

Im klinischen Alltag werden Ärzt*Innen förmlich von einer Informationsflut überrollt. Es gibt scheinbar unendliche Möglichkeiten, medizinische Daten zu sammeln. Doch wie geht man mit dieser Menge an Informationen um, ohne wertvolle Zeit und Ressourcen zu verschwenden? Genetische Untersuchungen und in naher Zukunft der breite Einsatz von Liquid Biopsy stellen nicht nur Genetiker*Innen, sondern auch Kliniker*Innen vor eine große Herausforderung. Der Ausbau von Entscheidungsunterstützungssystemen kann dabei zukünftig bis zu einem gewissen Grad Abhilfe leisten.

Ziel dieser Diplomarbeit ist es unter anderem einen „Leitfaden“ zum Einsatz von bioinformatischen Tools für Mediziner*Innen zu erstellen und zu zeigen, dass der Umgang mit genetischen Informationen auch eines gewissen Knowhows von klinischer Seite bedarf. In Zukunft wird der vermehrte Einsatz von Liquid Biopsy auch abseits der Forschung an Bedeutung gewinnen. Aus diesem Grund darf die sogenannte „Fürstenfeldkohorte“ im Rahmen dieser Diplomarbeit vorgestellt werden. Die Intention dabei ist es zu zeigen, dass die Präzisionsonkologie bereits heute fester Bestandteil des klinischen Alltags sein kann. Zusätzlich soll die Aktualität und Bedeutung der verwendeten Verfahren unterstrichen werden. Obendrein soll anhand dieses Beispiels veranschaulicht werden, wie eine Symbiose aus Forschung und Klinik beiden Institutionen einen großen Nutzen bringen kann. Einerseits können individuell an Patienten zugeschnittene Therapien ermöglicht werden, andererseits wertvolle und umfassend dokumentierte Informationen für die Forschung generiert werden.

Beim Rückblick in die Vergangenheit dürfen auch die enormen Fortschritte im Bereich der Sequenzierungen nicht außer Acht gelassen werden. Erst im Oktober 1990 begann eine internationale Forschungsgruppe im Rahmen des sogenannten Human Genome Projects (HGP) die erstmalige Sequenzierung des menschlichen Genoms (Lander et al., 2001).

Die massive Reduktion der Kosten für Sequenzierungen ermöglichte Jahre später die Generierung unzähliger menschlicher Genomsequenzen. Die Weiterentwicklung von Assays sowie statistischer und rechnerischer Methoden führte schließlich zu einem tieferen Verständnis der Komplexität des menschlichen

Genoms und zur Bestimmung der genomischen Basis von einer großen Anzahl an Krankheiten. The National Human Genome Research Institute hat nun im Rahmen eines mehrjährigen Prozesses versucht, Prioritäten für zukünftige Forschungsarbeiten mit dem Schwerpunkt auf die Anwendung im Gesundheitsbereich festzulegen. Die Integration der Genetik in den klinischen Workflow und die Aneignung der Fähigkeit, Entscheidungen auf Basis von genetischen Daten zu treffen, werden als Teil der Vision genannt (Green et al., 2020). Zusammenfassend darf man somit behaupten, dass sich diese Abschlussarbeit am Puls der Zeit befindet.

5 Material und Methoden

5.1 Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen

Es handelt sich um eine retrospektive, deskriptive Studie. Zu Beantwortung der Fragen werden Plasmaproben von 226 Patient*Innen, die an den Klinischen Abteilungen für Onkologie an der Medizinischen Universität Graz und am LKH Fürstenfeld behandelt und begleitet wurden, sowie Primärliteratur herangezogen. Es werden dafür vor allem Daten aus einer bereits genehmigten Studie (Ethikvotum Nr. 21-229 aus 09/10) mit aktuellem Folgevotum für die zentrale Fragestellung verwendet. Außerdem besteht Zugriff zu hauseigenen Datensätzen (Forschungsdatenbank) des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik an der Medizinischen Universität Graz. Es handelt sich um eine empirische Studie, basierend auf retrospektiven Daten. Die Patient*Innen erhalten keine Behandlung oder Therapie im Rahmen dieser Diplomarbeit.

Um einen Überblick über den Status der Kopienzahlveränderung der Plasmaproben und somit des Tumorgenoms durch Liquid Biopsy zu erhalten, wurde die Plasma-Seq Methode (Heitzer et al., 2013) angewandt. Dieser shallow Whole-Genome Sequencing (sWGS) Zugang identifiziert somatische SCNAs aus Plasma-DNA im jeweiligen Tumor. Des Weiteren können sWGS Daten in den ichorCNA Algorithmus (Adalsteinsson et al., 2017) eingespielt werden, um eine Schätzung der Tumorfraktion innerhalb der Plasma-DNA zu erhalten. Durch Anwendung dieser Methoden auf die vorliegenden cfDNA Plasmaproben von Patient*Innen mit

metastasierendem kolorektalem Karzinom im Verlauf der Behandlung können Fluktuationen und neuauftretene Events identifiziert werden und mit Therapiewechsel, Tumorlast und klinischen Status in Verbindung gesetzt werden.

5.2 Fürstenfeldkohorte

In Zusammenarbeit mit Frau OÄ Dr. Sabine Hojas von der Abteilung für Innere Medizin aus dem LKH Fürstenfeld wurde eine kleine, aber ausführlich dokumentierte Kohorte von 14 Patient*Innen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom erstellt. Es sind mehrere Follow-up Plasmaproben von den einzelnen Patient*Innen durchgeführt und analysiert worden. An dieser Stelle darf der Hintergrund dieser Subgruppe erläutert werden: Die Intention dabei ist es zu zeigen, dass die Präzisionsonkologie bereits heute fester Bestandteil des klinischen Alltags sein kann. Die Plasmaproben der Fürstenfeldkohorte wurden in den folgenden Schritten mitanalysiert. Die klinischen Informationen wurden jedoch aufgrund ihrer detailreichen Dokumentation gesondert aufgearbeitet. Dies soll als Basis für weitere Untersuchungen dienen. Die Tabelle 5 verschafft einen ersten Überblick über die sogenannte Fürstenfeldkohorte.

TABELLE 5: FÜRSTENFELDKOHORTE

ID	Probenanzahl	Klinische Informationen
C215	5 Proben	vorhanden
C217	19 Proben	vorhanden
C218	8 Proben	fehlend
C219	17 Proben	vorhanden
C225	3 Proben	vorhanden
C265	12 Proben	fehlend
C344	8 Proben	vorhanden
C348	8 Proben	vorhanden
C428	4 Proben	vorhanden
C429	21 Proben	vorhanden
C436	4 Proben	vorhanden
C439	4 Proben	vorhanden
C440	10 Proben	vorhanden
C441	14 Proben	vorhanden

Ausführliche klinische Informationen wurden von 12 der 14 Patient*Innen übermittelt. Von diesen wurden zwei Patient*Innen durch eine Screening-Untersuchung diagnostiziert. Eines der kolorektalen Karzinome wurde zufällig im Rahmen einer anderen Bildgebung entdeckt. Neun Patient*Innen wurden aufgrund von Symptomen, wie erhöhte Entzündungsparameter, Schmerzen, Obstipation, Hämatochezie, unklarer Gewichtsabnahme, Spannungsgefühl und einem veränderten Stuhlverhalten auffällig. Die Kohorte setzt sich aus 8 männlichen Probanden und 4 weiblichen Probandinnen zusammen. Die Anzahl der Proben und der Zeitraum der Probenentnahme wird mit dem Stichtag vom 29.07.2022 angegeben. Dies gilt für die folgende Zusammenfassung der klinischen Informationen. In einer im Rahmen dieser Diplomarbeit erstellten Übersichtstabelle wird das Geschlecht, Geburtsdatum, Datum der histologischen Diagnose, Tumorstadium und Alter bei Diagnose, die Symptome oder das Ereignis, welches zur Diagnose geführt hat, die primäre Tumorlokalisierung sowie die Histologie angegeben. Außerdem enthält diese Informationen über die Mutationsuntersuchung, etwaige kurative Operationen, kurative neoadjuvante Radiochemotherapie (RCTX), kurative Induktion von Chemotherapie (CTX), kurative adjuvante CTX, Auftreten eines Rezidivs und Beschreibung der palliativen CTX sowie palliativer Operationen. Schlussendlich wird der aktuelle Status, die Anzahl der Proben und der Zeitraum der Probenentnahme angegeben.

5.3 GISTIC2.0

Das Akronym GISTIC wird aus folgendem Begriff zusammengesetzt: Genomic Identification of Significant Targets in Cancer. Dieses Programm wurde in der zweiten Version für alle Proben mit den Standardparametern ausgeführt. Eingespeist wurde dabei die Segmentierungsdatei aus der Plasma-Seq-Analyse. Dieses spezielle Dokument enthält segmentierte Daten, die durch GLAD, CBS oder einen anderen Segmentierungsalgorithmus identifiziert wurden. Es handelt sich um eine sechsspaltige, tabulatorgetrennte Datei mit einer optionalen Zeile zur Identifizierung der Spalten. Die Positionen werden in Basenpaareinheiten angegeben.

Die Spaltenüberschriften lauten wie folgt:

- (1) Probe (Name der Probe)
- (2) Chromosom (Chromosomennummer)
- (3) Startposition (Startposition des Segments, in Basen)
- (4) Endposition (Endposition des Segments, in Basen)
- (5) Num Markers (Anzahl der Marker im Segment)
- (6) Seg.CN ($\log_2()$ -1 der Kopienzahl)

Die daraus resultierende „Amplification Genes“ Datei wurde für die weitere Analyse verwendet.

Zur Auswertung der Daten wurden die 25 häufigsten Cytobands herangezogen. Anhand von diesen wurde dokumentiert, wie viele Gene sich in diesen Abschnitten befinden. Anschließend wurde überprüft, ob es zu einer Überschreitung der Signifikanzschwelle gekommen ist. Gene mit fokalen CNA-Werten kleiner als -0.3 wurden als „Loss“ kategorisiert. Gene mit fokalen CNA-Werten größer als 0.3 wurden als „Gain“ kategorisiert. Gene mit fokalen CNA-Werten zwischen -0.3 und 0.3 wurden als neutral eingestuft.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass alle Daten mit dem Referenzgenom hg19 analysiert wurden.

5.4 Die Filtrierung der Ergebnisse aus GISTIC2.0

Die Filtrierung der Ergebnisse aus GISTIC2.0 nach dem jeweiligen Cytoband von Interesse erfolgt durch Microsoft Excel. Die Informationen zum gewünschten Cytoband wurden folgend in einer eigenen CSV-Datei abgespeichert. Schließlich wurden die Daten im Programm R (Version 4.1.2., <https://www.r-project.org/>) weiterverarbeitet, um die signifikanten Amplifikationen oder Deletionen von den restlichen Daten zu trennen. Dazu wurde zuerst die CSV-Datei des jeweiligen Cytobands ins Programm eingespielt. Der nächste Befehl beinhaltete, dass alle

Zeilen mit einem Wert >0.3 bzw. <-0.3 in mindestens einer Spalte aufbewahrt wurden. Schließlich wurde die filtrierte CSV-Datei exportiert. Diese oben beschriebenen Schritte wurden mit den 10 häufigsten veränderten Cytobands durchgeführt.

5.5 Klinische Annotierung amplifizierter und deletierter Gene

5.5.1 OncoKB

OncoKB ist eine weitere umfassende Datenbank für Präzisionsonkologie, die im Rahmen dieser Diplomarbeit herangezogen wurde. Ziel der interaktiven, öffentlich zugänglichen Website ist es, detaillierte, evidenzbasierte Informationen über individuelle somatische Mutationen und strukturelle Veränderungen in Tumoren für Behandlungsentscheidungen zugänglich zu machen. 619 signifikant veränderte Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands wurden in die Datenbank OncoKB eingelesen, um potenzielle therapierbare Veränderungen abzufragen. OncoKB enthält Informationen über US Food and Drug Administration (FDA) - zugelassene Therapien und Substanzen, die zur Zeit in klinischen Studien evaluiert werden. Des Weiteren werden negative klinische Ergebnisse hervorgehoben, um vom Off-Label-Einsatz zielgerichteter Therapien zu warnen, die beispielsweise in speziellen Mutationsmustern keine Wirkung gezeigt haben. OncoKB enthält biologische, klinische und therapeutische Informationen von einer Vielzahl von Quellen, darunter unter anderem die FDA-Kennzeichnung und die National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines (Chakravarty et al., 2017). Die Analyse mit Hilfe von OncoKB erfolgte am 20.04.2022.

5.5.2 cBioPortal

The Cancer Genome Atlas (TCGA) und das International Cancer Genome Consortium (ICGC) sind groß angelegte Projekte, welche eine überwältigende Menge von Daten zur Krebsgenomik generieren. Das cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>) wurde entwickelt, um den Zugang zu solchen Datensätzen zu erleichtern und die Forschung in diesem Bereich zu

beschleunigen. Das Portal ermöglicht die Visualisierung und Analyse von Genen, Proben und Datentypen (Gao et al., 2013).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands der oben beschriebenen Kohorte im cBioPortal genauer betrachtet. Die jeweiligen Gene wurden mithilfe der Datensätze der TCGA PanCancer Atlas Studies analysiert, wobei nur die Copy number alterations als molekulare Profile von Interesse im Rahmen einer modifizierten Abfrage ausgewählt wurden. Das Projekt The Cancer Genome Atlas (TCGA) wurde in das Leben gerufen, um krebserzeugende genomische Alterationen in großen Kohorten von über 30 Tumorarten in Folge von Sequenzierungen und multidimensionalen Analysen zu entdecken und in einem Katalog zusammenzuführen. Sowohl Daten aus Studien von individuellen Tumorarten als auch sogenannte Pan-Cancer-Analysen werden der Öffentlichkeit im Rahmen dieses Projektes zur Verfügung gestellt (Tomczak et al., 2015). An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass microRNAs (miRNA), long non-coding RNAs (lncRNA) sowie Gene mit der Eigenschaft locus type readthrough nicht in die weitere Analyse miteinbezogen wurden. Dasselbe gilt für nicht charakterisierte Loci (LOC). Mittels einer speziellen Website des HUGO Gene Nomenclature Committee (<https://www.genenames.org/>) wurden Namensänderungen und Herabstufungen als Pseudogen überprüft und schließlich ausführlich dokumentiert. „Previous gene symbols“ oder „alias gene symbols“ wurden neben der zurzeit gültigen Benennung zum schnelleren Abruf der Daten in der im Rahmen dieser Diplomarbeit erstellten Übersichtstabelle notiert. Im cBioPortal wurde der Fokus der Analyse auf die Funktion Cancer Types Summary gelegt. Hierbei wurde für jedes einzelne signifikante Gen dokumentiert, wie oft eine Kopienzahlveränderung in einer Vergleichskohorte von 592 Patient*Innen mit kolorektalem Adenokarzinom auftrat. Des Weiteren wurde die am häufigsten veränderte Tumorart innerhalb der Datensätze der TCGA PanCancer Atlas neben dem kolorektalen Adenokarzinom des jeweiligen Genes ausgewertet. Die Kopienzahlveränderungen der Kohorte wurden somit in diesem Schritt mit Daten groß angelegter Studien (TCGA PanCancer Atlas) verglichen, um Abweichungen oder neue Erkenntnisse abgrenzen zu können und einen Überblick über die Bedeutung dieser Gene zu

bekommen. Die beschriebenen Abfragen wurden im April und Mai 2022 durchgeführt.

5.5.3 Die Korrelation zwischen Genamplifikation und Genexpression

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von cBioPortal dokumentiert, welche Genamplifikationen mit einer erhöhten Genexpression korrelieren. Im Gegenzug wurden Amplifikationen detektiert, welche nicht mit der jeweiligen Genexpression korrelieren. Dazu wurden alle Studien im Raster „Bowel“ verwendet, um eine ausreichende Menge an Vergleichsdaten heranzuziehen. 14 Studien mit insgesamt 5323 Proben wurden zur Analyse herangezogen, wobei in drei Studien zum Teil überlappende Datensätze verwendet werden. In diesem Analyseabschnitt wurde der Fokus auf die Region chr16p11.2 mit 122 Genen gelegt. Erneut kam es zu einer Einengung der molekularen Profile auf Kopienzahlveränderungen. Schließlich wurden unter dem Tool „Plots“ der optische Vergleich von mRNA und CNA durchgeführt, um eine Korrelation von Genexpression und Genamplifikation festzustellen. Das beschriebene Vorgehen wurde am 30.08.2022 und 31.08.2022 durchgeführt.

5.5.4 chr16p11.2 als potenzielle Kandidatenregion

Um das Ausmaß einer Diplomarbeit nicht zu überschreiten, wurde eine Fokussierung auf die Region chr16p11.2 für den optischen Vergleich von mRNA und CNA beschlossen. Die Wahl auf diesen Genabschnitt stützt sich auf die existierenden Daten des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik und die bestehende Literatur, die im Folgenden zusammengefasst wird:

In einer früheren Arbeit einer Forschungsgruppe aus dem Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik, die sich mit Veränderungen des Genoms kolorektaler Karzinome unter Anti-EGFR-Therapie beschäftigt, wurde die Plasma-DNA von 10 Patienten (18 Plasma Proben) unter Anti-EGFR-Therapie mittels Whole-Genome-Sequencing begutachtet. Ultra-sensitives Deep-Sequencing wurde bei Genen durchgeführt, bei denen bereits eine Assoziation zu Resistenzen gegenüber der Anti-EGFR-Behandlung bestand. Es konnten Gains in Regionen

nahe der Zentromere der Chromosomen 16 und 17 nachgewiesen werden. Das fokale Amplikon auf Chromosom 16p11.2 enthielt jedoch kein an der Anti-EGFR-Reaktion beteiligtes Gen, weshalb es im Rahmen dieser Studie nicht näher beleuchtet wurde (Mohan et al., 2014). Dieses Ereignis stimmt jedoch mit den in dieser Diplomarbeit präsentierten Daten überein. Das Chromosom 16p11.2 wurde ebenfalls als häufig amplifizierte Region im selben Patientenkollektiv identifiziert, diesmal jedoch mit einer höheren Probenanzahl.

Im Rahmen einer Studie des The Cancer Genome Atlas Network wurde eine genome-scale Analyse von 276 Proben durchgeführt, um somatische Veränderungen in kolorektalen Karzinomen zu untersuchen. Im Zuge dessen wurde für 257 Tumore ein SCNA-Profil mit Affymetrix SNP 6.0 arrays erstellt. Insgesamt 97 dieser Tumore sind mittels whole-genome sequencing (low-depth-of-coverage) charakterisiert worden. Es konnte gezeigt werden, dass in 66% der Tumore die Chromosomenarme 18p und q deletiert waren. In diesem Abschnitt befindet sich unter anderem *SMAD4*. 17p und q waren in 56% der Fälle betroffen. Diese Genregion beherbergt *TP53*. Andere signifikant deletierte Chromosomenarme waren: 1p, 4q, 5q, 8p, 14q, 15q, 20p und 22q. Im Bereich der Gains wurden folgende, bereits im Vorfeld beschriebene Veränderungen aufgelistet: 1q, 7p und q, 8p und q, 12q, 13q, 19q sowie 20 p und q (Cancer Genome Atlas, 2012).

In einer weiteren Studie wurde das Tumorgenom von 29 Patienten, die sich einer Operation aufgrund eines Lymphknoten-positiven kolorektalen Karzinoms unterzogen, mittels comparativer genomischer Hybridisierung beleuchtet. Gains wurden in 76% und Losses in 41% der Fälle detektiert. Die am häufigsten vorkommenden Regionen, der Häufigkeit nach geordnet, sind folgende:

Gain: 13q, 20q, 7p, 8q, 1q;

Loss: 18q, 4q, 17p, 18p, 15q.

Als Anmerkung am Rande, für keine dieser spezifischen Veränderungen konnte eine Assoziation mit dem Patientenüberleben gezeigt werden (Rooney et al., 2001).

In den ersten Schritten dieser Arbeit wurden folgende 10 Cytobands analysiert und ausgewertet: 20q11.21, 20q13.2, 20q13.12, 20q13.33, 7p22.1, 20p11.1, 16p11.2, 8p22, 19p13.3, 18q21.32. Diese Genabschnitte wurden ihrer Häufigkeit nach hier

aufgelistet. Vergleicht man diese Liste mit der bestehenden Literatur, kristallisieren sich die Regionen 16q11.2 und 19p13.3 als potenzielle Kandidaten zur weiteren Vertiefung heraus. Da es sich bei 16p11.2 um das häufigere Cytoband handelt, wurde es schließlich in cBioportal zum optischen Vergleich von mRNA und CNA herangezogen.

5.6 Entscheidungsunterstützungssysteme

Die große Herausforderung in der Präzisionsonkologie besteht darin, aus einer großen Menge an molekularen Daten Therapieempfehlungen abzuleiten. Um aus komplexen Next-Generation-Sequencing-Daten therapierbare Ziele zu identifizieren, können als Hilfeleistung klinische Decision Support Tools herangezogen werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden Ergebnisse aus dem kommerziellen Entscheidungsunterstützungssystem NAVIFY Mutation Profiler (Roche) herangezogen. Im Vergleich zu anderen kommerziellen Plattformen, wie beispielsweise Interpret (QIAGEN) oder CureMatch Bionov (CureMatch), unterscheidet sich diese Plattform durch die alleinige Verwendung der AMP-Guidelines zur Stufenklassifizierung somatischer Varianten. In Übereinstimmung mit ebendiesen Guidelines der Association for Molecular Pathology (AMP) (Richards et al., 2015) verwendet NAVIFY eine sehr strenge Klassifikation der somatischen Varianten und bewertet nur fest etablierte Tier I-A, I-B und II-C Alterationen als umsetzbar. Ein weiteres Tool, welches Roche anbietet, ist das NAVIFY Tumor Board. Outputs des NAVIFY Mutation Profiler können gemeinsam mit klinischen Daten der Patient*Innen in das Tumor Board importiert werden, um somit Ärzt*Innen in molekularen Tumorboards eine Hilfestellung zu leisten (Perakis et al., 2020). Dieses Hilfsmittel wurde jedoch im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht eingesetzt.

In der Webapplikation selbst wird explizit darauf verwiesen, dass der NAVIFY Mutation Profiler nicht zwischen Keimbahnmutationen und somatischen Varianten unterscheiden kann. Es wird immer davon ausgegangen, dass die bestehenden Varianten somatischen Ursprungs sind. Die Informationen, die im Report enthalten sind, stammen laut Hersteller aus biomedizinischer Literatur, medizinischen

Guidelines und öffentlich zugänglichen Daten, wie beispielsweise Arzneimittelbeipackzetteln und klinischen Studien.

NAVIFY ist als eine lizenzierte Web-Applikation zugänglich und bietet als Endprodukt einen Bericht, der basierend auf vorhandenen individuellen Varianten Behandlungsvorschläge abgibt. Zusätzlich ist die Plattform in der Lage, tumorspezifische Empfehlungen für Kombinationstherapien (jedoch nur für tier I Varianten) darzulegen. Es werden außerdem Vorschläge für klinische Studien, die auf dem jeweiligen Standort des Patienten entsprechend angepasst werden können, unterbreitet (Perakis et al., 2020).

5.6.1 NAVIFY Mutation Profiler

Am 26.08.2021 wurde von Mitarbeiter*Innen des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik mittels des NAVIFY Mutation Profilers ein Report mit der ID COSMIC_consensus_CRC erstellt. Die Software verwendet sekundäre NGS-Analysedaten und versucht basierend auf dem Tumortyp, die Pathogenität von Veränderungen einzuschätzen und Mutationen, SCNAs und Fusionen relevanten Therapien zuzuordnen. Als Rohdaten für diesen Report wurden alle Gene aus der COSMIC Census-List (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>) als „Amplifikationen“ in die Software hochgeladen. Diese Informationen wurden mittels einer Datei im sogenannten BED-Format importiert. Diese Schritte dienen dazu, einen Betroffenen zu simulieren, der theoretisch alle diese Amplifikationen aufweist, um eine möglichst große Menge an klinischen, alterationsspezifischen Anmerkungen und Informationen aus der Datenbank zu generieren.

Die 619 signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands unseres Workflows wurden schließlich mit dem fertiggestellten Report aus dem NAVIFY Mutation Profiler mittels Suchfunktion am 27.07.2022 und 28.07.2022 abgeglichen. Ziel dieses Vorganges ist es, herauszufinden, ob klinisch signifikante Varianten und Kombinationen oder relevante Therapien für die zehn häufigsten veränderten Cytobands bestehen. Wenn vorhanden, soll auf *in vivo* oder *in vitro* Studien oder auch klinische Studien genauer eingegangen werden.

5.7 CiberAMP

Um ein besseres Verständnis des Tumorgenoms zu erreichen, ist die Korrelation zwischen Kopienzahlen und Expressionsniveau von großer Bedeutung. Zur Vereinfachung dieses Vorgangs wurde ein R-codiertes Tool, namens CiberAMP, entwickelt. Damit Genexpressionsveränderungen, welche mit SCNAs assoziiert sind, identifiziert werden können, werden genomische und transkriptomische Daten aus dem Cancer Genome Atlas herangezogen. Bevor die Bedeutung der Ergebnisse dieses R-Pakets aufgelistet wird, müssen noch einige Definitionen erläutert werden: Somatic Copy Number Alterations (SCNAs) werden häufig in Tumorzellen detektiert. Diese genetischen Veränderungen können zu Begleiterscheinungen in der Expression von Genen führen, die einen Selektionsvorteil für die Tumorzellen darstellen. SCNAs stellen entweder einen Gain oder Loss der Genmenge dar. Diese genetischen Veränderungen werden wiederum mit signifikanten Veränderungen in der Expression von Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen in Verbindung gebracht. Es sollte jedoch an dieser Stelle betont werden, dass SCNA-linked Differentially Expressed Genes (SCNA-DEGs) nicht in allen Fällen relevant sind. Deren Amplifikation oder Deletion kann die Folge der physikalischen Nähe zu sowohl deletierten als auch amplifizierten Regionen, welche Treibergene beherbergen, darstellen. Außerdem bedeuten Veränderungen in der Genmenge nicht immer automatisch Änderungen in der Genexpression (Caloto et al., 2022).

CiberAMP nützt differentielle Expressionsanalysen, um Zusammenhänge zwischen spezifischen SCNAs und Veränderungen in der Expression der davon betroffenen Gene herzustellen. Folgende Informationen können durch dieses Programm gewonnen werden:

1. Identifizierung der SCNA-DEGs im Tumorgenom
2. Ermittlung der verschiedenen Expressionsveränderungen, die durch SCNA-DEGs hervorgerufen werden können: SCNA-abhängige Veränderungen, ob sie die Veränderungen verstärken, die bereits innerhalb gesunder Proben und diploider Tumore beobachtet wurden, oder ob sie das Expressionsmuster im Vergleich zu normalen Geweben und diploider Tumore verändern

3. Bereitstellung von Informationen über den genomischen Kontext, in dem SCNAS-DEGs auftreten
4. Einschätzung der potenziellen funktionalen Relevanz der identifizierten SCNA-DEGs

CiberAMP benötigt drei Datensätze des Nutzers, um die beschriebenen Ergebnisse bereitstellen zu können: eine Liste der Gene, welche betrachtet werden sollen, die Menge der zu untersuchenden Tumore (Daten aus The Cancer Genome Atlas) und weitere Parameter, wie den p-Wert, die minimalen fold-change expression changes und die minimalen SCNA frequency thresholds (Caloto et al., 2022).

CiberAMP wurde gestützt durch das Programm R am 30.12.2022 (Version 4.2.2., <https://www.r-project.org/>) durchgeführt. Die später beschriebenen Outputs wurden am selben Tag generiert.

5.7.1 COSMIC Intersect

Der COSMIC Cancer Gene Census (CGS) ist ein fortlaufender Versuch Gene, die mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden können, zu katalogisieren. Ziel ist es zu erklären, wie Funktionsstörungen bzw. Alterationen dieser Gene, Krebs verursachen. Inhalt, Struktur und Auswahlverfahren des COSMIC Cancer Gene Census wurden ausführlich beschrieben und veröffentlicht (Sondka et al., 2018).

Die durch CiberAMP (Caloto et al., 2022) identifizierten SCNA-DEGs im Tumorgenom wurden mit der Genliste aus COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>) abgeglichen, um die detektierten SCNA-DEGs, die auch im COSMIC Cancer Gene Census vorkommen, zu dokumentieren. Außerdem können durch diesen Schritt weitere Informationen zu den veränderten Genen gesammelt werden. Assoziationen zu bestimmten Tumortypen, Syndromen oder Keimbahnveränderungen werden durch den Abgleich mit der Genliste aus COSMIC dokumentiert.

5.7.2 Workflow der Studie

Um ein besseres Verständnis für den Ablauf der Analysen zu ermöglichen, darf der Workflow dieser Abschlussarbeit hier gesondert beschrieben werden: 226 Patient*Innen mit insgesamt 742 Follow-up-Proben wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit analysiert. Durchschnittlich ergibt dies 3 Follow-up-Proben pro Proband*In. Durch Mitarbeiter*Innen des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik erfolgte die Extraktion der Plasma-DNA. Anschließend kam es zur Durchführung eines sogenannten Pre-Screening Approachs. Proben mit einer Tumor-Fraktion $< 5\%$ wurde von den nächsten Analyseschritten ausgeschlossen. Bei Proben mit einer Tumorfraction von $\geq 5\%$ wurden weitere Schritte durchgeführt. Eine Tumorfraction von zumindest 5% ist gleichbedeutend mit einem genomweiten Z-Score von 5. Somit wurden insgesamt 742 Proben mittels shallow Whole-Genome-Sequencing weiter prozessiert. Dieser sWGS-Zugang wird auch als Plasma-Seq bezeichnet. Mit der Hilfe von Plasma-Seq können genomweite Kopienzahlprofile generiert werden. An dieser Stelle darf betont werden, dass die hierfür benötigten Daten von Mitarbeiter*Innen des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik zur Verfügung gestellt würden. An diesem Punkt setzen die Untersuchungen der vorliegenden Diplomarbeit an.

Als Nächstes wurden diese 742 Proben in GISTIC2.0 eingespeist. 2963 Gene und 148 Cytobands wurden analysiert. Insgesamt wurden somit 345213 Amplifikationen und 265303 Deletionen detektiert. Dies führt zu einer Gesamtzahl von 610516 Veränderungen. Alle Aberrationen wurden mit einem sogenannten G-Score (Amplitude des Ereignisses) und der Häufigkeit ihres Auftretens annotiert. Für jede Region, die die Signifikanzschwelle überschreitet (q -Wert $< 0,02$), wurde geschätzt, ob es sich um ein fokales oder breites Ereignis handelt.

Zur weiteren Auswertung der Daten wurden die 25 häufigsten Cytobands herangezogen. Anhand von diesen wurde dokumentiert, wie viele Gene sich in diesen Abschnitten befinden. Anschließend wurde überprüft, ob es zu einer Überschreitung der Signifikanzschwelle gekommen ist. Gene mit fokalen CNA-Werten kleiner als -0.3 wurden als „Loss“ kategorisiert. Gene mit fokalen CNA-Werten größer als 0.3 wurden als „Gain“ kategorisiert. Gene mit fokalen CNA-Werten zwischen -0.3 und 0.3 wurden als neutral eingestuft.

Mittels des Programms R (Version 4.1.2., <https://www.r-project.org/>) wurden die signifikanten Amplifikationen oder Deletionen von den restlichen Daten getrennt. Dieser Schritt wurden mit den 10 häufigsten veränderten Cytobands durchgeführt.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass alle Daten mit dem Referenzgenom hg19 verglichen wurden.

Außerdem muss erwähnt werden, dass microRNAs (miRNA), long non-coding RNAs (lncRNA) sowie Gene mit der Eigenschaft locus type readthrough nicht in die weitere Analyse miteinbezogen wurden. Dasselbe gilt für nicht charakterisierte Loci (LOC). Mittels einer speziellen Website des HUGO Gene Nomenclature Committees (<https://www.genenames.org/>) wurden Namensänderungen und Herabstufungen als Pseudogen überprüft und für die weiteren Analysen dementsprechend angepasst oder aus der Kohorte ausgeschlossen.

Als Nächstes wurden im Zuge dieser Diplomarbeit die signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands der oben beschriebenen Kohorte beispielsweise in Programmen wie cBioPortal genauer betrachtet.

Für die Analyse mittels CiberAMP (Caloto et al., 2022) wurden schließlich erneut die signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands herangezogen (Tabelle 6). Jedoch wurden nur jene Cytobands bzw. deren Gene verwendet, die den Eventtyp „Amplification“ aufwiesen. Somit wurden in diesem Schritt 8 Cytobands mit insgesamt 588 Genen analysiert. Die Nutzung des Tools CiberAMP erfolgte am 30.12.2022.

TABELLE 6: CYTOBANDS FÜR CIBERAMP

Rank	Cytoband
1	20q11.21
2	20q13.2
3	20q13.12
4	20q13.33
5	7p22.1
6	20p11.1
7	16p11.2
8	19p13.3

Die Spalte Rank bezieht sich dabei auf den Rang des jeweiligen Cytobands. Die Rangordnung wurde dabei nach einer Prozentzahl erstellt. Diese gibt an, in wie vielen Prozenten der Proben der jeweilige Genabschnitt verändert aufgetreten ist. Die Benennung des betreffenden Genabschnitts erfolgt in der Spalte Cytoband.

In der Abbildung 6 soll nochmals explizit veranschaulicht werden, welche Schritte im Vorfeld dieser Diplomarbeit notwendig waren. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Daten stammen aus einer bereits genehmigten Studie (Ethikvotum Nr. 21-229 aus 09/10). Für die verwendeten Daten existierte während der Verfassung dieser Abschlussarbeit ein aktuelles Folgevotum.

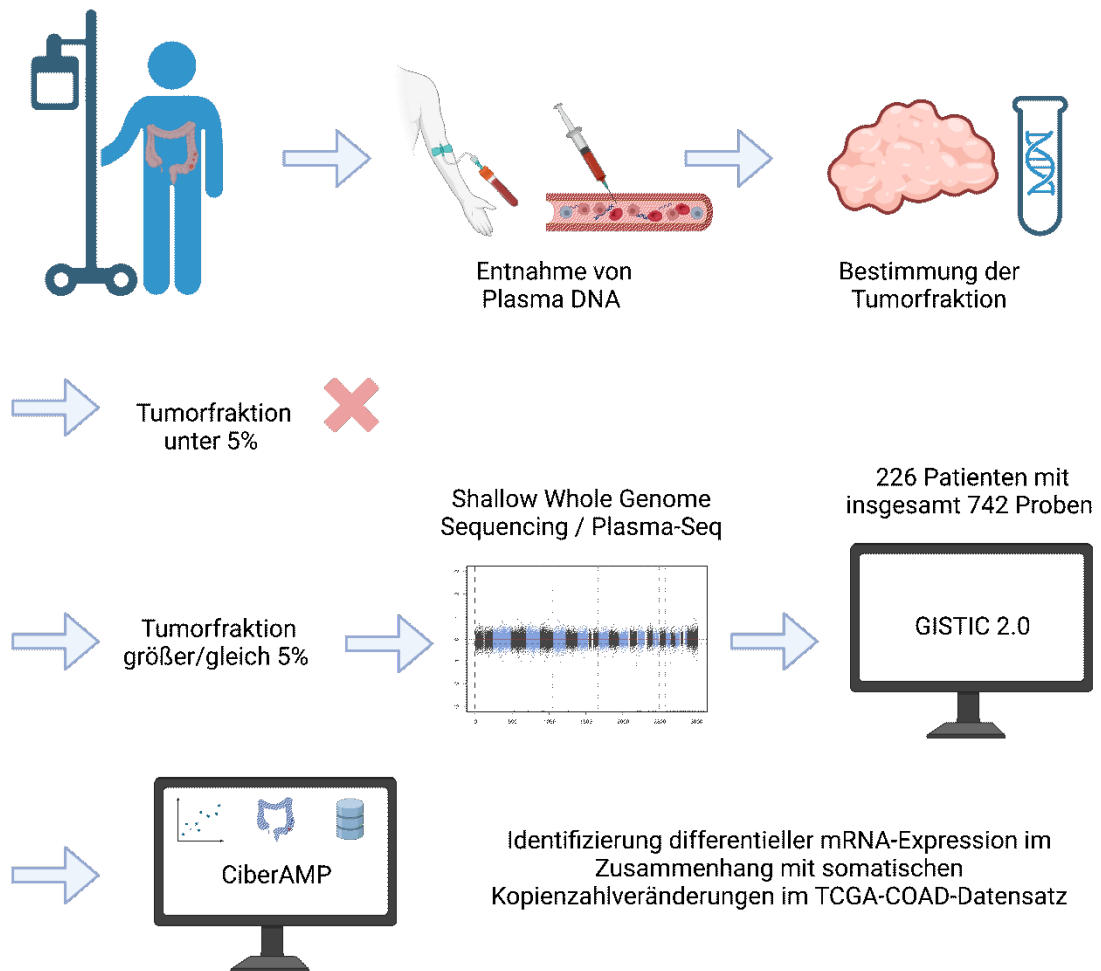


ABBILDUNG 6: WORKFLOW DER STUDIE

Für Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom, die an den Klinischen Abteilungen für Onkologie an der Medizinischen Universität Graz und am LKH Fürstenfeld behandelt wurden, sind im Rahmen einer Blutabnahme Plasmaproben zur genetischen Untersuchung angefordert worden. Schließlich erfolgte im Labor die Isolierung der Plasma-DNA und die Bestimmung der Tumorfraction. Bei Proben mit einer Tumorfraction $\geq 5\%$ wurde eine shallow Whole-Genome-Sequenzierung durchgeführt. Eine Tumorfraction von $< 5\%$ schloss eine weitere Analyse aus. Dies führte schließlich zu 742 Proben, die in GISTIC2.0 analysiert wurden. Signifikant amplifizierte Gene der Kohorte dienten schlussendlich als Input für das Tool CiberAMP (Caloto et al., 2022). Dieses R-Package stellt mit Hilfe von differentiellen Expressionsanalysen Korrelationen zwischen spezifischen SCNAs und Veränderungen in der Expression der betroffenen Gene her. Im Appendix wird die Publikationslizenz für diese in Biorender (created with BioRender.com) erstellte Grafik aufgelistet.

6 Ergebnisse

Nachfolgend dürfen die Ergebnisse aus dieser Diplomarbeit schriftlich und graphisch präsentiert werden. Um die Grenzen einer Abschlussarbeit nicht zu überschreiten, wird nicht auf die Gesamtheit der Ergebnisse, die im Rahmen des wissenschaftlichen Arbeitens generiert wurden, Einblick gewährt.

6.1 Patientenkohorte

226 Patient*Innen mit insgesamt 742 Follow-up-Proben wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit analysiert. Durchschnittlich ergibt dies 3.28 Follow-up-Proben pro Proband*In. Der Median der Follow-up-Proben beträgt 5 mit einer Spannweite von 1-19. Das durchschnittliche Patientenalter wird mit 64 Jahren angegeben. 35% der Proband*Innen sind weiblich, 65% sind männlich. In GISTIC2.0 (Mermel et al., 2011) wurden schließlich 742 Patientenproben eingelese. Insgesamt wurden 2963 Gene mit 148 Cytobands analysiert. 345213 Amplifikationen und 265303 Deletionen wurden in der untersuchten Kohorte detektiert. Dies ergibt eine Gesamtzahl von 610516 Veränderungen. Die Annotierung der GISTIC2.0 Ergebnisse erfolgte für die 619 signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands. Die Sonderanalyse der Region chr16p11.2 beläuft sich auf eine Gesamtzahl von 122 Genen.

6.2 Fürstenfeldkohorte

Die aus 14 Patient*Innen bestehende Kohorte weist für 12 Proband*Innen ausführliche klinische Informationen auf. Auf diese Subgruppe beziehen sich die folgenden statistischen Angaben. Zwei Drittel der Kohorte sind männliche Patienten, ein Drittel der Kohorte ist weiblich. Durch eine Screening-Untersuchung wurden 16,67% der Patient*Innen diagnostiziert. 74,99% (9) der Betroffenen wurden aufgrund von Symptomen wie erhöhte Entzündungsparametern, Schmerzen, Obstipation, Hämatochezie, unklarer Gewichtsabnahme, Spannungsgefühl und einem veränderten Stuhlverhalten auffällig. Eines der kolorektalen Karzinome (somit 8,33%) wurde zufällig im Rahmen einer anderen

Bildgebung entdeckt. Die Plasmaproben und somit genetischen Informationen der Fürstenfeldkohorte wurden gemeinsam mit den Proben der Klinischen Abteilungen für Onkologie der Medizinischen Universität Graz analysiert und dürfen hier anschließend präsentiert werden.

Um nicht nur einen Einblick in die klinischen Informationen zu gewähren, darf folglich auf den Verlauf und die genomischen Veränderungen von 2 Patient*Innen eingegangen werden. Von der Patientin C217 wurden insgesamt 19 Plasmaproben analysiert (Abbildung 7). Der Zeitraum der Probenentnahme erstreckte sich über 666 Tage. Erst bei der 19. Probe wurde ein relevantes fokales Event, *YES1*, detektiert. Laut OncoKB ist eine Überexpression von *YES1*, einem Onkogen, beim kolorektalen Karzinom bereits bekannt (Chakravarty et al., 2017). Innerhalb von 329 Tagen wurden 8 Plasmaproben vom Patienten C218 entnommen (Abbildung 8). Die ersten vier Plasmaproben zeigten keine relevanten fokalen Amplifikationen. Erstmalig kam es bei der 5. Blutabnahme mit *KRAS* zur Detektion eines relevanten fokalen Events. In der 6. Plasmaprobe wurden zusätzlich *AKT2* und *MAP3K10* detektiert. Sowohl in der 7. als auch in der 8. Probe wurde *KRAS* als relevante fokale Veränderung hervorgehoben. Zeitgleich mit dem Auftreten von *KRAS* stieg der Tumorgehalt in den Proben an. Das Fehlen von Mutationen in den *RAS*-Genen (*KRAS*-Wildtype) ist klinisch von großer Bedeutung, da dies eine Erweiterung der Behandlungsmöglichkeiten mit sich bringt. Der *RAS*-Status beim kolorektalen Karzinom im Stadium IV beeinflusst das Ansprechen auf Anti-EGFR-Therapien, wie Cetuximab und Panitumumab (Chakravarty et al., 2017). Denn das Vorhandensein einer fokalen *KRAS*-Amplifikation repräsentiert einen Resistenzmechanismus während einer Anti-EGFR-Therapie (Mohan et al., 2014).

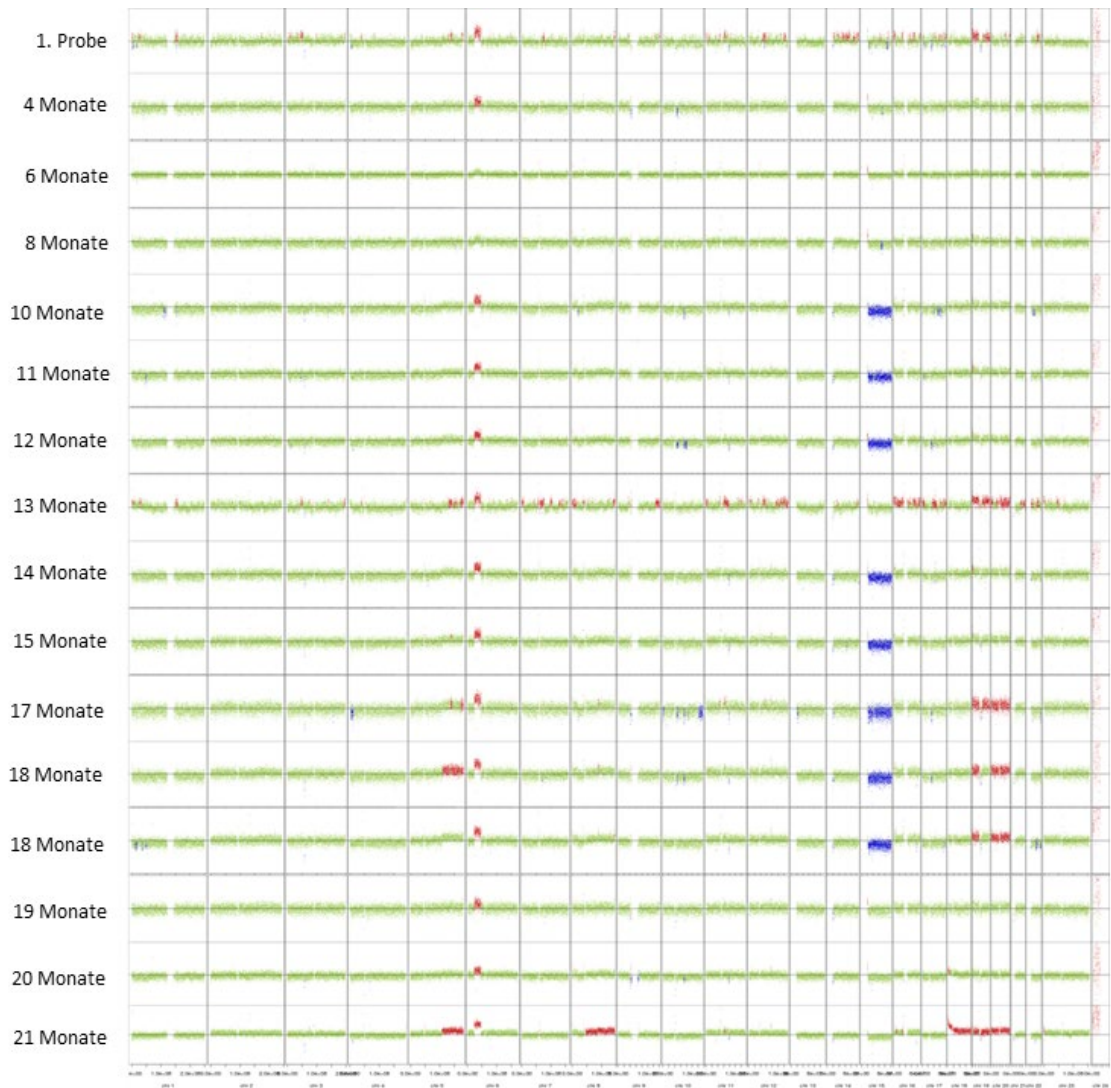


ABBILDUNG 7: FÜRSTENFELDKOHORTE C217

In der Abbildung 7 werden die Plasma-Seq-Kopienzahlprofile der 19 Proben der Patientin C217 präsentiert. Allein die 19. Probe weist mit *YES1* ein relevantes fokales Event auf. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Chromosomen abgebildet. Die Y-Achse zeigt zum Vergleich die Log₂-Ratios von gesunden Kontrollen. Entlang der Y-Achse wird die Zeitspanne ab der 1. Probenentnahme angegeben. Grüne Bereiche zeigen balancierte Ergebnisse. In der Farbe Blau werden die deletierten Abschnitte dargestellt, die roten Abschnitte repräsentieren die amplifizierte Regionen. Zu beachten ist, dass hierbei nur die fokalen Veränderungen von Relevanz sind. Denn es wird davon ausgegangen, dass genomweite Veränderungen durch die genomische Instabilität der Tumorgenoms zu erklären sind.

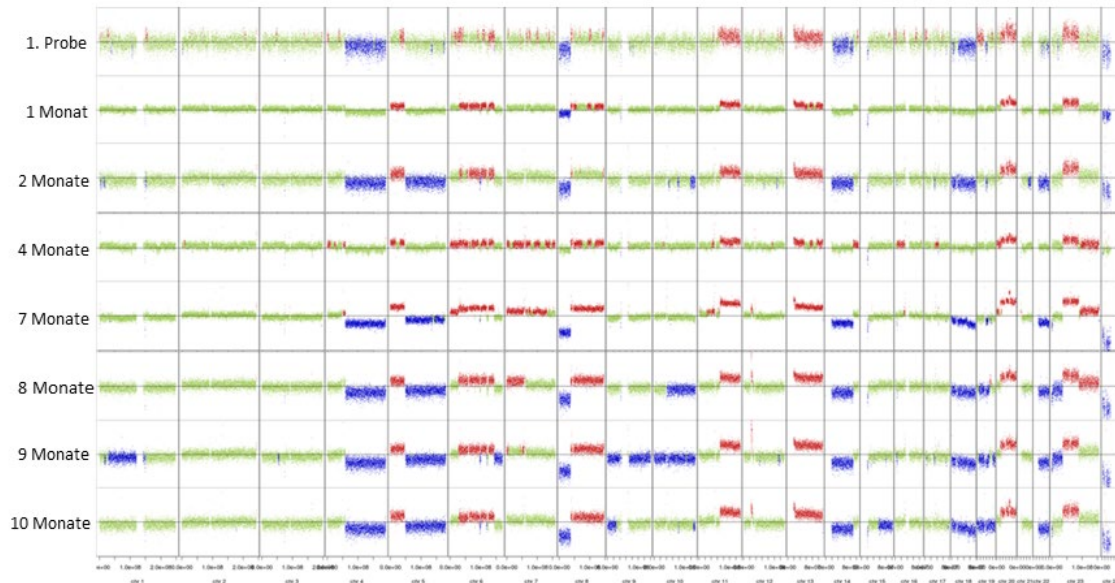


ABBILDUNG 8: FÜRSTENFELDKOHORTE C218

In der Abbildung 8 werden die Plasma-Seq-Kopienzahlprofile der 8 Proben des Patienten C218 präsentiert. Die ersten vier Plasmaproben zeigen keine relevanten fokalen Events. Ab der 5. Plasmaprobe wurde *KRAS* als relevante fokale Amplifikation detektiert. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Chromosomen abgebildet. Die Y-Achse zeigt zum Vergleich die Log₂-Ratios von gesunden Kontrollen. Entlang der Y-Achse wird die Zeitspanne ab der 1. Probenentnahme angegeben. Die Farbcodierung entspricht der Beschreibung in Abbildung 7. Für diese Grafik gilt ebenfalls, dass nur fokale Veränderungen von Bedeutung sind.

6.3 GISTIC2.0: Identifikation häufig amplifizierter und deletierter Regionen

Insbesondere Genen, welche somatische Kopienzahlveränderungen aufweisen, wird eine bedeutende Rolle in der Onkogenese und Krebstherapie zugewiesen. Jedoch bringt die Entdeckung dieser SCNAs zwei Hindernisse mit sich: Somatische Veränderungen werden in jedem einzelnen Zellteilungszyklus erworben, wobei nur wenige, sogenannte Treiberänderungen, die Tumorentstehung beeinflussen. Akquiriert ein Subklon Mutationen, die die klonale Dominanz fördern, können neutrale Passenger-Veränderungen fixiert werden. Ein weiteres Problem stellt dar, dass SCNAs bis zu tausende Gene gleichzeitig beeinflussen. Die selektiven Vorteile der Treiberänderungen werden aber wahrscheinlich nur durch wenige Gene vermittelt. Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung, zwischen

Treiberveränderungen und Passenger-Veränderungen zu differenzieren. Man geht davon aus, dass Regionen, die Treiberveränderungen beinhalten, häufiger verändert sind als Regionen mit Passenger-Veränderungen. GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) identifiziert Treiberveränderungen anhand der Frequenz und der Amplitude der vorliegenden Events. Durch mehrere analytische Verbesserungen des Workflows zur Analyse von Kopienzahlveränderungen konnte die Sensitivität und Spezifität in der Version GISTIC2.0 erhöht werden (Mermel et al., 2011).

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 742 Proben in GISTIC2.0 eingespeist. 2963 Gene und 148 Cytobands wurden analysiert. Insgesamt wurden somit 345213 Amplifikationen und 265303 Deletionen detektiert. Dies führt zu einer Gesamtzahl von 610516 Veränderungen.

Die hier anschließenden Ergebnisse aus der Analyse in GISTIC2.0 zeigen eine anschauliche Zusammenfassung der insgesamt 742 Proben und sollen einen ersten Überblick über die Gesamtheit der Daten ermöglichen, bevor in den weiteren Schritten die Ergebnisse aus den verschiedenen Analysen der zehn häufigsten Cytobands bzw. acht häufigsten amplifizierten Cytobands (CiberAMP) vorgestellt werden. Die Heatmap der segmentierten Kopienzahldaten aus Plasma-Seq (Abbildung 9), die Kopienzahlveränderungen mit den höchsten G-Scores (Abbildung 10) und der Oncoplot (Abbildung 11) erlauben einen ersten Einblick in die analysierten Daten.

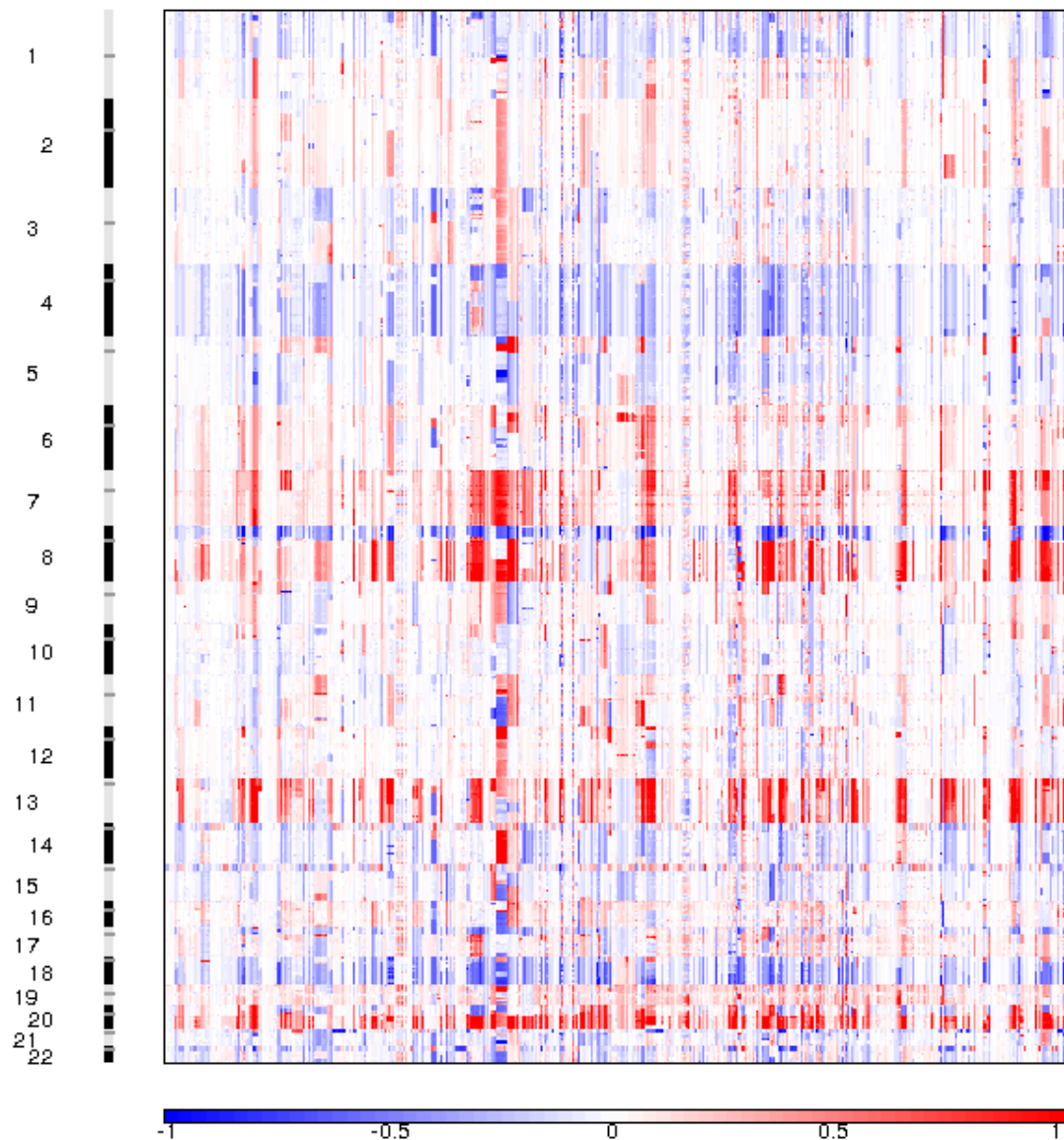


ABBILDUNG 9: HEATMAP DER SEGMENTIERTEN KOPIENZAHLDATEN AUS PLASMA-SEQ

Die Abbildung 9 stellt die Heatmap der segmentierten Kopienzahldaten aller mCRC-Patientenproben dar. Jede Reihe steht für eine chromosomale Position, jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Farbcodierung in der Legende veranschaulicht die \log_2 Kopienzahlratio-Werte und erfolgte folgendermaßen: rote Bereiche stellen Amplifikationen und blaue Färbungen Deletionen dar. Weiße Areale repräsentieren keine signifikanten Unterschiede zum diploiden Genom.

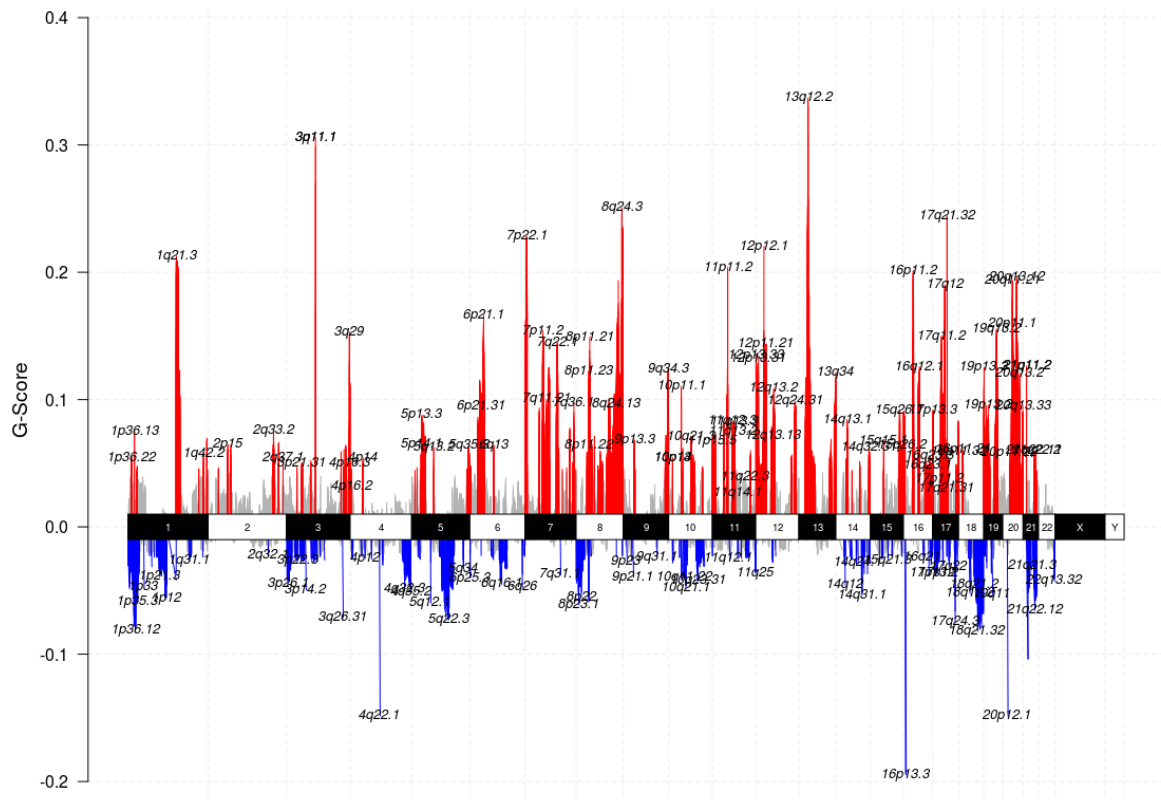


ABBILDUNG 10: GISTIC-OUTPUT

Die Abbildung 10 dient zur Visualisierung der Kopienzahlveränderungen mit den höchsten G-Scores. Jeder Aberration wird dabei ein G-Score zugewiesen, der sowohl die Amplitude der Veränderung, als auch die Häufigkeit des Auftretens innerhalb der Proben berücksichtigt. Man erkennt hierbei den von GISTIC zugewiesenen G-Score für jedes entlang des Chromosoms aufgetragene Cytoband.

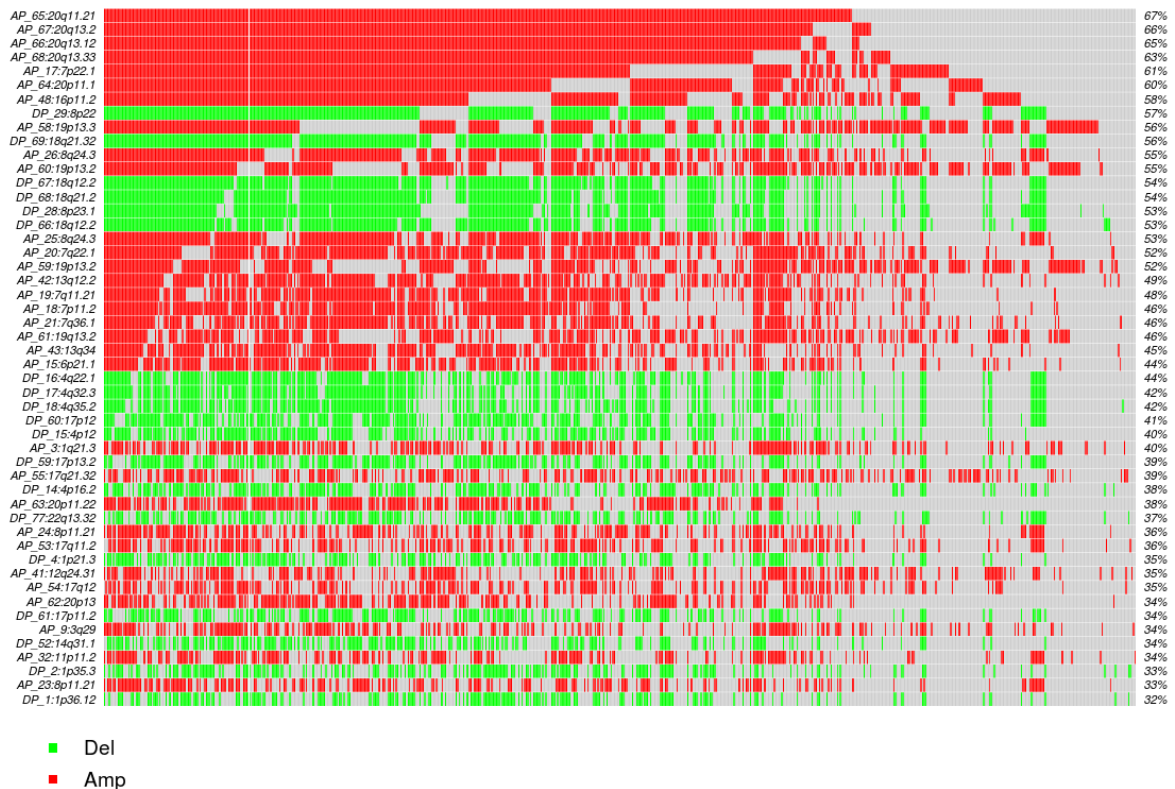


ABBILDUNG 11: ONCOPLOT

Die Abbildung 11 zeigt einen OncoPrint mit den am häufigsten veränderten Kopienzahlveränderungen, im engeren Sinne die häufigsten Amplifikationen (rot) und Deletionen (grün) in Bezug auf deren Frequenz. Jede Reihe repräsentiert ein CNA (Copy Number Alteration) Segment und jede Spalte eine Patientenprobe. In dieser Übersicht wurden die 50 häufigsten Cytobands abgebildet.

Anhand des OncoPrints wurden die häufigsten 10 Cytobands zur Filterung und im weiteren Verlauf zur Analyse ermittelt (Tabelle 7). Folgend eine übersichtlichere Zusammenfassung des OncoPrints bzw. dieser 10 Cytobands und deren Häufigkeit mittels einer Tabelle:

TABELLE 7: TOP 10 DER ANALYSIERTEN CYTOBANDS

Rank	Cytoband	Frequency
1	20q11.21	67%
2	20q13.2	66%
3	20q13.12	65%
4	20q13.33	63%
5	7p22.1	61%
6	20p11.1	60%
7	16p11.2	58%
8	8p22	57%
9	19p13.3	56%
10	18q21.32	56%

Die Spalte Rank bezieht sich dabei auf den Rang des jeweiligen Cytobands. Die Benennung des betreffenden Genabschnitts erfolgt in der Spalte Cytoband. Die Spalte Frequency beschreibt, in wie vielen Prozenten der Proben der jeweilige Genabschnitt verändert aufgetreten ist.

6.4 Filtrierung und Annotierung der GISTIC2.0 Ergebnisse

6.4.1 Identifikation therapie-relevanter Alterationen durch OncoKB

Wie bereits beschrieben wurden 619 Gene in OncoKB (Chakravarty et al., 2017) eingelesen, wobei keines davon als „actionable target“ im Sinne einer Kopienzahlveränderung eingestuft wurde. In 5% der Fälle (31 Gene) waren Informationen zu den Genen in der Datenbank hinterlegt. Diese Daten sollen im Folgenden in Form einer Übersichtstabelle (Chakravarty et al., 2017) präsentiert und zusammengefasst werden. Die Tabelle 8 wurde aus wissenschaftlichen Gründen in englischer Sprache erstellt. Anschließend dürfen Hintergründe und weitere Erkenntnisse zu den Genen ausgeführt werden.

TABELLE 8: ANNOTIERTE EVENTS AUS ONCOKB

Gene	Event Type	Annotated Alterations	Druggable Target	Cancer Role
<i>BCL2L1</i>	Amplification	Amplification likely oncogenic		
<i>ASXL1</i>	Amplification	Deletion, Truncating Mutations and G646Wfs*12 likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>DNMT3B</i>	Amplification	Amplification, Deletion, DNMT3B7, Truncating Mutations likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>NFATC2</i>	Amplification	EWSR1-NFATC2 fusion likely oncogenic		Likely Gain-of-function (Fusion)
<i>TSHZ2</i>	Amplification	TSHZ2-NRG1 fusion likely oncogenic	Zenocutuzumab	Likely Gain-of-function (Fusion)
<i>AURKA</i>	Amplification	Amplification oncogenic		Oncogene
<i>SDC4</i>	Amplification	SDC4-ROS1 fusion is known to be oncogenic; SDC4-NRG1 fusion is likely oncogenic	Zenocutuzumab	SDC4-ROS1 Fusion (Gain-of-function), SDC4-NRG1 Fusion (Likely Gain-of-function)
<i>NCOA3</i>	Amplification		Inhibitors of NCOA3 are in development for anti-tumor therapy	Oncogene
<i>RTEL1</i>	Amplification	Truncating Mutations and M4921 likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>ACTB</i>	Amplification	ACTB-GLI fusion (unknown oncogenic effect)		
<i>PMS2</i>	Amplification	Deletions and R20Q are oncogenic; Truncating mutations, E41A, S46I, S46N, R107W, G207E, I668V, S815L likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>RAC1</i>	Amplification	Amplification, C18Y, P34R, Q61R, C157Y likely oncogenic; G12V, P29L, P29S oncogenic		Oncogene

<i>KDELR2</i>	Amplification	The KDELR2-ROS1 fusion likely oncogenic		Likely Gain-of-function
<i>MAPK3</i>	Amplification		Inhibitors of ERK1/2 are being explored	Oncogene
<i>SETD1A</i>	Amplification			Oncogene
<i>PCM1</i>	Deletion	PCM1-ALK, PCM1-JAK2, MET-PCM1 fusion likely oncogenic		Likely Gain-of-function (Fusion)
<i>ARID3A</i>	Amplification	Truncating Mutations, P268A, W299A, F317A, Y330A are likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>STK11</i>	Amplification	Deletion, Truncating Mutations, L67P, K78A, K78I, M136R, G163D, H174R, D176N, D194Y, S216F, E223V, W308C are likely oncogenic, R304W, A205T, I177N are oncogenic		Tumor Suppressor
<i>DAZAP1</i>	Amplification			
<i>TCF3</i>	Amplification	Oncogenic Mutations (Burkitt Lymphoma)		Tumor Suppressor
<i>DOT1L</i>	Amplification			Oncogene
<i>SPPL2B</i>	Amplification	MAP2K2-SPPL2B fusion unknown Oncogenic Effect		
<i>TLE2</i>	Amplification			
<i>GNA11</i>	Amplification	R183C, Q209L oncogenic		Oncogene
<i>MAP2K2</i>	Amplification	V35M, L46F, Q60P, C125S, N126D oncogenic		Oncogene
<i>CHAF1A</i>	Amplification	CHAF1A-MAP2K2 fusion unknown oncogenic effect		
<i>PTPRS</i>	Amplification	Truncating Mutations likely oncogenic		Tumor Suppressor
<i>MLLT1</i>	Amplification			
<i>VAV1</i>	Amplification	Q498K, S67Y, VAV1-MYO1F Fusion, VAV1-S100A7 Fusion,		Oncogene

		VAV1-THAP4 Fusion are likely oncogenic		
<i>MALT1</i>	Deletion	BIRC3-MALT1 Fusion oncogenic		
<i>PMAIP1</i>	Deletion	Truncating Mutations are likely oncogenic		Tumor Suppressor

BCL2L1 ist durch Mutation oder Amplifikation in verschiedenen Tumorarten, unter anderem dem kolorektalen Karzinom, verändert und fungiert als Regulator der Apoptose (Chakravarty et al., 2017). Präklinische Daten haben gezeigt, dass small molecules, die gezielt auf *BCL-XL* wirken, Potential in der Therapie des Lungenkarzinoms aufweisen (Park et al., 2013).

Der epigenetische Regulator und Tumorsuppressor, *ASXL1*, wird am häufigsten in myeloiden Malignomen durch Mutationen inaktiviert, wobei auch Deletionen als wahrscheinlich onkogen einzustufen sind (Chakravarty et al., 2017). In der beschriebenen Kohorte zeigte sich dieses Gen jedoch amplifiziert.

DNMT3B ist in verschiedenen Tumorarten durch Mutation oder Amplifikation verändert und stellt eine DNA-Methyltransferase dar. Es gibt keine FDA-geprüfte oder NCCN-gelistete Therapie für Patient*Innen mit *DNMT3B7* mutiertem kolorektalem Karzinom (Chakravarty et al., 2017).

Das Onkogen *EWSR1* ist vor allem im Ewing Sarkom im Rahmen eines chromosomalen Rearrangements verändert und bindet als multifunktionales Protein DNA und RNA. Die *EWSR1-NFATC2* Fusion wird als wahrscheinlich onkogen eingestuft (Chakravarty et al., 2017). *NFATC2* ist in der beobachteten Kohorte in Form einer Amplifikation verändert.

Die wahrscheinlich onkogene Fusion *TSHZ2-NRG1* beinhaltet *NRG1*, einen Liganden, der *ERBB3* bindet. Vielversprechende Daten zeigen, dass Patient*Innen mit *NRG1* fusionierten soliden Tumoren auf den anti-HER2/HER3 Antikörper Zenocutuzumab ansprechen. Dies gilt auch für das kolorektale Karzinom (Chakravarty et al., 2017). In der untersuchten Kohorte zeigte sich *TSHZ2* amplifiziert.

Die intrazelluläre Kinase, *AURKA*, ist in Folge von Mutationen, Amplifikationen oder Überexpression unter anderem im kolorektalen Karzinom modifiziert (Chakravarty et al., 2017). Gegenstand aktueller Forschung sind small-molecule Inhibitoren von *AURKA* und auch der Aurora B und C Kinasen als anti-mitotische chemotherapeutische Therapie (Cheung et al., 2014).

Wie bereits erwähnt, liegen vielversprechende klinische Daten vor, dass Patient*Innen mit *NRG1* fusionspositiven Tumoren mit dem anti-HER2/HER3 Antikörper Zenocutuzumab behandelt werden können. Dies gilt auch für die *SDC4-NRG1* Fusion. Für die *SDC4-ROS1* Fusion gibt es ebenfalls therapeutische Möglichkeiten. Für Patient*Innen mit *ROS1* fusionspositivem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom liegen mit Crizotinib und Entrectinib FDA-geprüfte Therapeutika vor, der klinische Nutzen im Setting des kolorektalen Karzinoms ist jedoch unbekannt. In diesen Bereich fällt auch die *KDEL2-ROS1* Fusion (Chakravarty et al., 2017). In der beschriebenen Kohorte waren sowohl *SDC4* als auch *KDEL2* amplifiziert.

Das Onkogen *NCOA3*, ein Koaktivator eines nuklearen Hormonrezeptors, ist durch Mutationen oder Amplifikationen in einer Vielzahl von Malignomen modifiziert (Chakravarty et al., 2017). *NCOA3* oder auch *SRC-1* wird mit der Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen assoziiert und stellt aufgrund seines häufigen Vorkommens in verschiedenen Tumorarten einen Gegenstand aktueller Forschung dar. Das Herzglykosid Bufalin wurde als potenzieller niedermolekularer Inhibitor für *SRC-3* und *SRC-1* identifiziert (Wang et al., 2014).

Der Tumor Suppressor *RTEL1* sichert als Helikase die Regulierung der Telomerlänge. Keimbahnmutationen von *RTEL1* sind assoziiert mit angeborener Dyskeratose und dem Hoyerall-Hreidarsson-Syndrom (Chakravarty et al., 2017). In der betrachteten Kohorte wird eine Amplifikation des Genes beschrieben.

Des Weiteren wird eine Amplifikation von *ACTB* detektiert. Für kolorektale Tumore mit Fusion von *ACTB-GLI* gibt es weder eine FDA-geprüfte noch eine NCCN-gelistete Therapie (Chakravarty et al., 2017).

Keimbahnmutationen von *PMS2* treten beim Lynch Syndrom auf und erhöhen das Risiko für kolorektale Karzinome. Sowohl Deletionen des Tumorsuppressors, als auch die *R20Q* Mutation werden als onkogen eingestuft (Chakravarty et al., 2017).

PMS2 ist in der analysierten Kohorte jedoch amplifiziert. Der Mismatch-Repair-Statuts sagt den klinischen Nutzen einer Immun-Checkpoint-Inhibition mit Pembrolizumab vorher (Le et al., 2015).

Einige gut beschriebene Hotspot Mutationen sind für das Onkogen *RAC1* beschrieben. Dieses Gen kodiert für eine GTPase der *RAS*-Superfamilie, die am Prozess der Adhäsion, Differenzierung und Migration von Zellen beteiligt ist. Die in der Kohorte detektierte Amplifikation wird laut OncoKB als wahrscheinlich onkogen eingestuft (Chakravarty et al., 2017).

Veränderungen der Serin/Threonin Kinase *MAPK3* (*ERK1*) findet man eher seltener in Tumoren (Chakravarty et al., 2017). Eine Amplifikation dieses Gens wurde jedoch in der Kohorte identifiziert. Resistenzen gegen *RAF*- oder *MEK*-Inhibitoren sind häufig mit der Persistenz der *ERK*-Signalgebung assoziiert. Dies stellt eine Notwendigkeit neuer Therapieansätze entlang des *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalweges dar, der in einem hohen Prozentsatz der Tumore hyperaktiviert ist (Samatar and Poulikakos, 2014).

Die Histon Methyltransferase *SET1DA* bindet aktiv transkribierte Gene. In einer Vielzahl von Tumorarten findet man in seltenen Fällen dieses Onkogen in einem veränderten Zustand vor (Chakravarty et al., 2017).

Das Gen *PCM1* ist in der beobachteten Kohorte deletiert. Die Fusion von *PCM1-ALK* wird laut OncoKB als wahrscheinlich onkogen eingestuft. Für *ALK*-positive Lungentumore besteht eine FDA-geprüfte Therapiemöglichkeit mit Crizotinib, Certinib, Alectinib, Brigatinib und Lorlatinib. Der klinische Nutzen für Patient*Innen mit kolorektalen Karzinomen und einer *PCM1-ALK* Fusion ist jedoch unbekannt. Eine weitere wahrscheinlich onkogene Veränderung stellt die *PCM1-JAK2* Fusion dar. Für Patient*Innen mit *PCM1-JAK2* fusionspositiver Leukämie gibt es vielversprechende klinische Daten für den FDA-zugelassenen *JAK1/2*-Inhibitor Ruxolitinib. Der klinische Nutzen bei kolorektalen Tumoren ist aber unbekannt. Auch die *MET-PCM1* Fusion wird als wahrscheinlich onkogen eingestuft (Chakravarty et al., 2017).

Der Tumorsuppressor *ARID3A* stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor in der B-Zell-Differenzierung dar (Chakravarty et al., 2017). Eine starke Expression von

ARID3A wird mit einer guten Prognose bei Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom in Verbindung gebracht (Song et al., 2014).

STK11, ein Tumorsuppressor und eine intrazelluläre Kinase, ist häufig in Lungentumoren mutiert. Das RNA-bindende Protein *DAZAP1* ist durch Rearrangements hingegen in akuten lymphoblastischen Leukämien verändert. Das Onkogen *DOT1L*, eine Histon Methyltransferase, kommt in einer Reihe von verschiedenen Tumorarten in seltenen Fällen variiert vor. Der transkriptionelle Repressor, *TLE2*, wird in verschiedenen Krebsarten durch Überexpression in einem veränderten Status vorgefunden (Chakravarty et al., 2017).

In Folge von Mutationen oder Deletionen ist der Tumorsuppressor *TCF3*, ein Transkriptionsfaktor involviert in die Lymphopoese, in verschiedenen Tumorarten verändert (Chakravarty et al., 2017). In der Kohorte kommt es jedoch zur Amplifikation dieses Gens.

SPPL2B ist in der beschriebenen Kohorte im Sinne einer Amplifikation modifiziert. In der OncoKB Datenbank für Präzisionsonkologie wird unter anderem die *MAP2K2-SPPL2B* Fusion beschrieben. Für Patient*Innen mit kolorektalem Karzinom und dieser Veränderung gibt es keine FDA-geprüfte oder NCCN-gelistete gezielte Therapie (Chakravarty et al., 2017). Das *MAP2K2* bzw. *MEK2* Onkogen, genauer beschrieben eine intrazelluläre Kinase, kommt in der Kohorte im Rahmen einer Amplifikation vor (Chakravarty et al., 2017). In metastasierenden Melanomen zeigten *RAF* oder *MEK* Inhibitoren wesentliche Verbesserungen des klinischen Outcomes (Samatar and Poulikakos, 2014). In OncoKB wird ebenfalls eine *CHAF1A-MAP2K2* Fusion angeführt, deren biologische Bedeutung jedoch unbekannt ist (Chakravarty et al., 2017). Das Gen *CHAF1A* ist in der beschriebenen Kohorte amplifiziert.

Das beim Aderhautmelanom rezidivierend mutierte *GNA11* Gen ist eine G-Protein-Untereinheit. Die Mutationen *R183C* und *Q209L* werden dabei als onkogen eingestuft (Chakravarty et al., 2017). In der beobachteten Kohorte wurde dieses Gen als amplifiziert detektiert.

Der Tumorsuppressor *PTPRS* codiert für eine Tyrosin Phosphatase, welche sowohl in der Regulation der Synapsenstruktur als auch der Funktion und Plastizität des zentralen Nervensystems involviert ist. Auch im kolorektalen Karzinom findet man

Veränderungen dieses Genes, wie beispielsweise Mutationen, veränderte Expressionen oder Mikrodeletionen (Chakravarty et al., 2017).

Eine Translokation des Gerüstproteins *MLLT1*, welches an der transkriptionellen Elongation beteiligt ist, findet man bei hämatologischen Malignomen. Das Onkogen *VAV1* ist durch Mutationen oder Rearrangements in hämatologischen Malignomerkrankungen und soliden Tumoren verändert. Dieser Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor beteiligt sich am Prozess der Hämatopoese (Chakravarty et al., 2017).

Die Paracaspase *MALT1* ist wiederkehrend durch chromosomales Rearrangement im MALT-Lymphom modifiziert (Chakravarty et al., 2017). Die *MALT1* Spaltungsaktivität wird mit der Pathogenese von aktivierten B-Zell-ähnlichen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (ABC-DLBCL) assoziiert. Dies stellt eine chemoresistente Form der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome dar (Fontan et al., 2012).

Mutationen und Deletionen des Tumorsuppressors *PMAIP1*, der im Apoptose-Vorgang involviert ist, werden in Lymphomen und Leukämien gefunden (Chakravarty et al., 2017). In der untersuchten Kohorte traten Deletionen dieses Gens auf.

6.4.2 cBioPortal: Vergleich mit Datensätzen des TCGA PanCancer Atlas

Neben der Überprüfung der Korrelation zwischen Genamplifikation und Genexpression der Gene des Cytobands 16p11.2 wurden die signifikant veränderten Gene der zehn häufigsten Cytobands in cBioPortal hinsichtlich der Funktion Cancer Types Summary analysiert. Für jedes einzelne signifikante Gen wurde dokumentiert, wie oft eine Kopienzahlveränderung in einer Vergleichskohorte von 592 Patient*Innen mit kolorektalem Adenokarzinom auftrat. Des Weiteren wurde die am häufigsten veränderte Tumorart innerhalb der Datensätze der TCGA PanCancer Atlas neben dem kolorektalen Adenokarzinom des jeweiligen Genes ausgewertet. Die Kopienzahlveränderungen der Kohorte wurden somit in diesem Schritt mit Daten groß angelegter Studien (TCGA PanCancer Atlas) verglichen, um Abweichungen oder neue Erkenntnisse abgrenzen zu können und einen Überblick

über die Bedeutung dieser Gene zu bekommen. Auffällig war, dass 186 von 207 Genen im Genabschnitt 19p13.3 in cBioPortal mit dem Eventtyp Deletion dokumentiert wurden. In der analysierten Kohorte wurde dieses Cytoband jedoch dem Eventtyp Amplifikation zugeordnet.

6.4.3 cBioPortal: Graphische Gegenüberstellung von Amplifikation und Expression der Region 16p11.2

Wie bereits erwähnt, erfolgte in cBioPortal die Gegenüberstellung von Genamplifikation und Genexpression. Der Vergleich von mRNA und CNA dient unter anderem dazu, Amplifikationen zu detektieren, die nicht mit der Genexpression korrelieren. Folgendes Beispiel (Abbildung 12) soll zur Veranschaulichung dieser Möglichkeit dienen. Die mRNA-Expression des *UBE2MP1* Gens (Y-Achse) wurde in Beziehung zur Amplifikation (X-Achse), welche in Rot dargestellt wird, gesetzt.

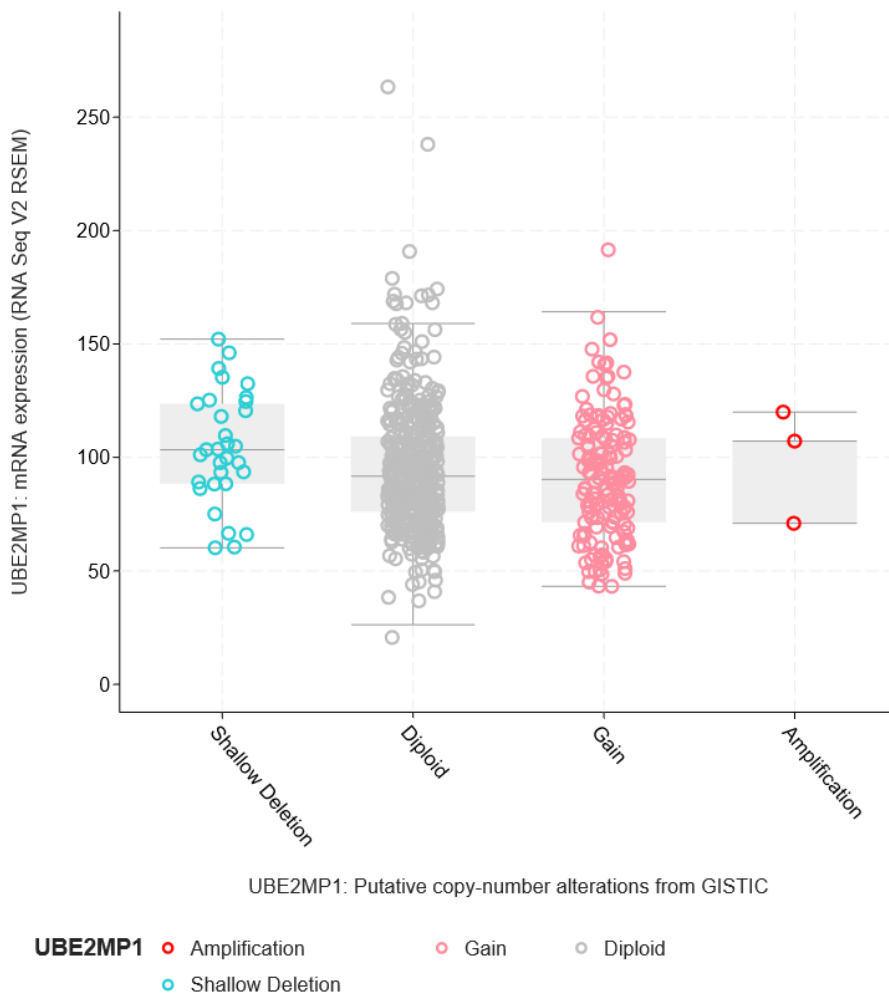


ABBILDUNG 12: UBE2MP1

In der Abbildung 12 wird das Gen *UBE2MP1* dargestellt. Die mRNA-Expression wird auf der Y-Achse und die Parameter „Shallow Deletion“, „Diploid“, „Gain“ und „Amplifikation“ auf der X-Achse repräsentiert.

Außerdem ist es möglich, Amplifikationen zu detektieren, die mit der Genexpression korrelieren (Abbildung 13-15). Erneut wird die mRNA-Expression auf der Y-Achse und die Parameter „Shallow Deletion“, „Diploid“, „Gain“ und „Amplifikation“ auf der X-Achse repräsentiert. Zur Veranschaulichung und dem besseren Verständnis werden nachfolgend einige Beispiele der Region chr16p11.2 gezeigt:

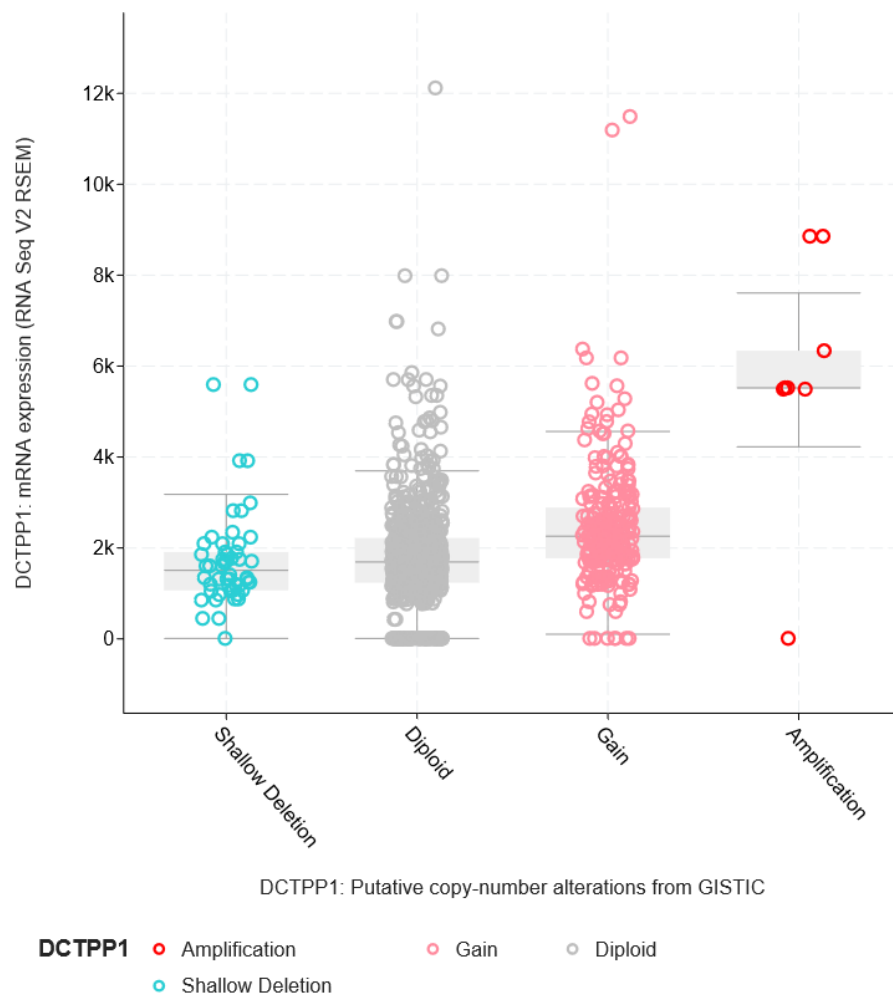


ABBILDUNG 13: DCTPP1

In der Abbildung 13 wird das *DCTPP1* Gen dargestellt. Die mRNA-Expression des *DCTPP1* Gens (Y-Achse) wird in Beziehung zur Amplifikation (X-Achse), welche in Rot dargestellt wird, gesetzt.



ABBILDUNG 14: STX4

Das Gen *STX4* zeigt in Abbildung 14 ähnliche Ergebnisse. Beim Vergleich der grauen und roten Ringe ist es möglich, Amplifikationen zu detektieren, die mit der Genexpression korrelieren.

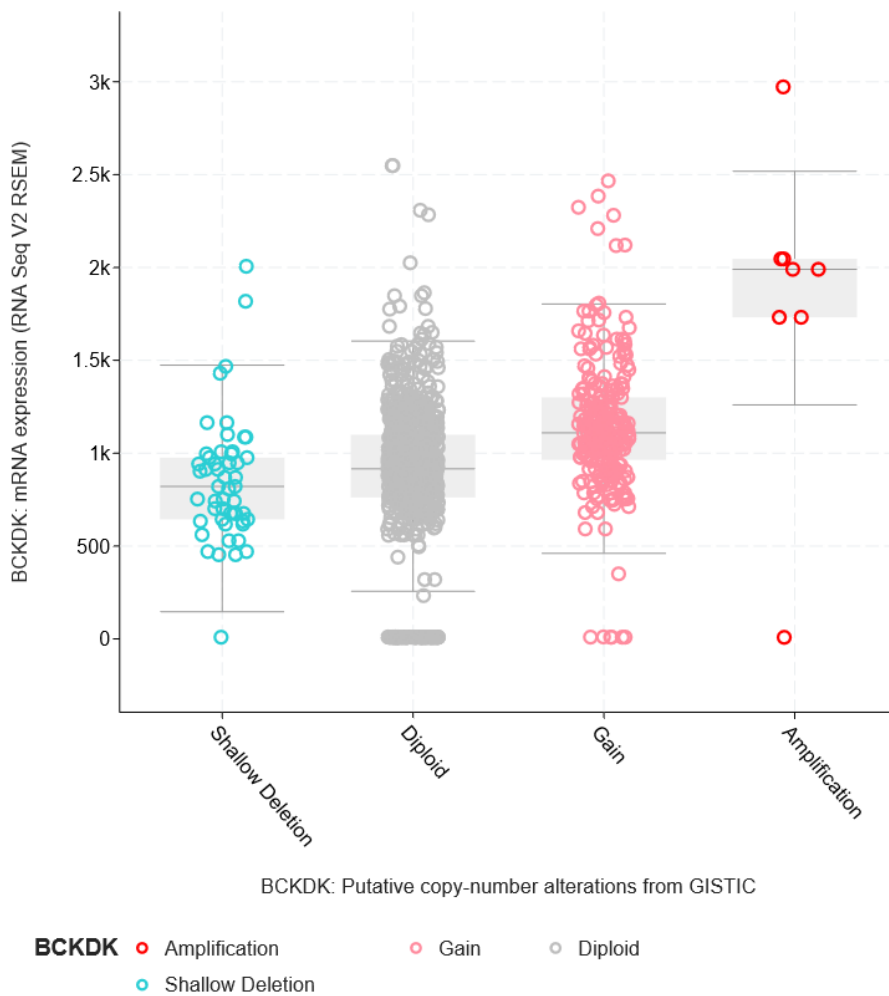


ABBILDUNG 15: BCKDK

In der Abbildung 15 werden erneut die mRNA-Expression auf der Y-Achse und die Parameter „Shallow Deletion“, „Diploid“, „Gain“ und „Amplifikation“ auf der X-Achse repräsentiert. Hier wird das Gen *BCKDK* dargestellt.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass es aus den untersuchten 122 Genen der Region chr16p11.2 für insgesamt fünf Gene keine Daten zur Erstellung der Diagramme gab. Diese wurden somit aus der Analyse ausgeschlossen. Es handelt sich dabei um folgende Gene: *BOLA2B*, *SLX1B-SULT1A4*, *SULT1A4*, *TP53TG3C* und *TP53TG3*. Die jeweiligen Diagramme für insgesamt 117 Gene wurden mithilfe von cBioPortal erstellt. Um festzulegen, ob eine enge Korrelation zwischen Kopienzahl und Genexpression besteht, wurde jedes Gen einzeln untersucht. Durch eine visuelle Analyse wurde ermittelt, welche Gene eine Kopienzahl mit positiven

linearen Einfluss auf die Genexpression aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass die genetische Variation eine direkte Auswirkung auf das Transkriptionsniveau der Gene mit sich bringt. Der Vergleich der Werte der Y-Achse für die Gruppen „Diploid“ und „Amplifikation“ führte zur Entscheidung, ob eine Korrelation besteht. Dieses Vorgehen wird durch die weiteren Analysen und statistischen Korrelationen in ciberAMP (Caloto et al., 2022) gerechtfertigt. Die oben dargestellten Diagramme wurden in cBioPortal am 30.08.2022 erstellt.

Nachstehend dürfen die 31 Gene, die eine optische lineare Korrelation zwischen Amplifikation und Genexpression aufweisen, präsentiert werden (Tabelle 9). Insgesamt wurden somit durch den optischen Vergleich von 117 Genen 26.5% detektiert. Für 86 Gene konnte keine Korrelation festgestellt werden.

TABELLE 9: OPTISCHE KORRELATION 16P11.2

Gene
<i>XPO6</i>
<i>APOBR</i>
<i>SGF29</i>
<i>SULT1A1</i>
<i>ATP2A1</i>
<i>NFATC2IP</i>
<i>SH2B1</i>
<i>SPNS1</i>
<i>TUFM</i>
<i>BOLA2</i>
<i>MAPK3</i>
<i>PPP4C</i>
<i>CD2BP2</i>
<i>TBC1D10B</i>
<i>MYLPF</i>
<i>DCTPP1</i>
<i>SEPHS2</i>
<i>ZNF768</i>
<i>PRR14</i>
<i>RNF40</i>
<i>FBXL19</i>
<i>STX4</i>
<i>PRSS53</i>
<i>VKORC1</i>
<i>BCKDK</i>

<i>PYCARD</i>
<i>ITGAM</i>
<i>ITGAX</i>
<i>ARMC5</i>
<i>TGFB111</i>
<i>SLC6A10P</i>

6.4.4 NAVIFY Mutation Profiler: Annotierung klinischer Informationen

Der Bericht des NAVIFY Mutation Profilers ergab 62 klinisch signifikante Varianten und Kombinationen, 0 Biomarker, 5 relevante Therapien und keine klinischen Studien zu den eingespeisten Daten. Die 619 signifikant veränderten Gene der zehn am häufigsten veränderten Cytobands unseres Workflows wurden schließlich mit dem fertiggestellten Report aus dem NAVIFY Mutation Profiler mittels Suchfunktion abgeglichen. Eine Zusammenfassung des Berichts befindet sich im Anhang. Von den 619 signifikant veränderten Genen wurden 16 in der Kategorie „unclassified variants“ eingestuft. 603 Gene wurden nicht im Report erwähnt. 97,42 % der signifikant veränderten Gene scheinen somit nicht im Bericht auf. Bezüglich relevanter Therapien wurden für 618 Gene (99,84 %) keine Ergebnisse detektiert. Für AURKA wurde als Ergebnis die *AURKA*-Inhibitoren-Therapie im Bereich der MYC-Amplifikation präsentiert, jedoch scheint die *AURKA* Amplifikation selbst nicht im Bericht auf.

6.5 CiberAMP

Als Resultat des Tools CiberAMP (Caloto et al., 2022) erhält man eine Liste von drei Datensätzen. Die Analyse erfolgte auf Basis von Daten des kolorektalen Adenokarzinoms (TCGA-COAD). Der erste Datensatz (CiberAMP EXPintCNA results) beinhaltet alle differentiell exprimierten Gene zwischen Tumor vs. Normal und kopienzahlveränderten Proben vs. diploiden Tumorproben. Der zweite Datensatz (CiberAMP EXPintCNA COSMIC genes results) beinhaltet CGC-Listen differentieller Expressionsergebnisse. Der dritte Datensatz (CiberAMP COSMIC overlap results) analysiert das gleichzeitige Auftreten von SCNA-DEGS und bekannten Treiber-Gen-Amplifikationen und Treiber-Gen-Deletionen. Für die weiteren Analysen und Auswertungen wurde der erste Datensatz herangezogen.

6.5.1 SCNA-DEGs Tumor vs. Normal

Der erste Datensatz (CiberAMP EXPintCNA results) beinhaltet alle differentiell exprimierte Gene zwischen Tumor vs. Normal und kopienzahlveränderten Proben vs. diploiden Tumorproben. Um die Darstellung dieser Ergebnisse zu erleichtern, wurden die Daten als Streudiagramme dargestellt (Abbildungen 16-23).

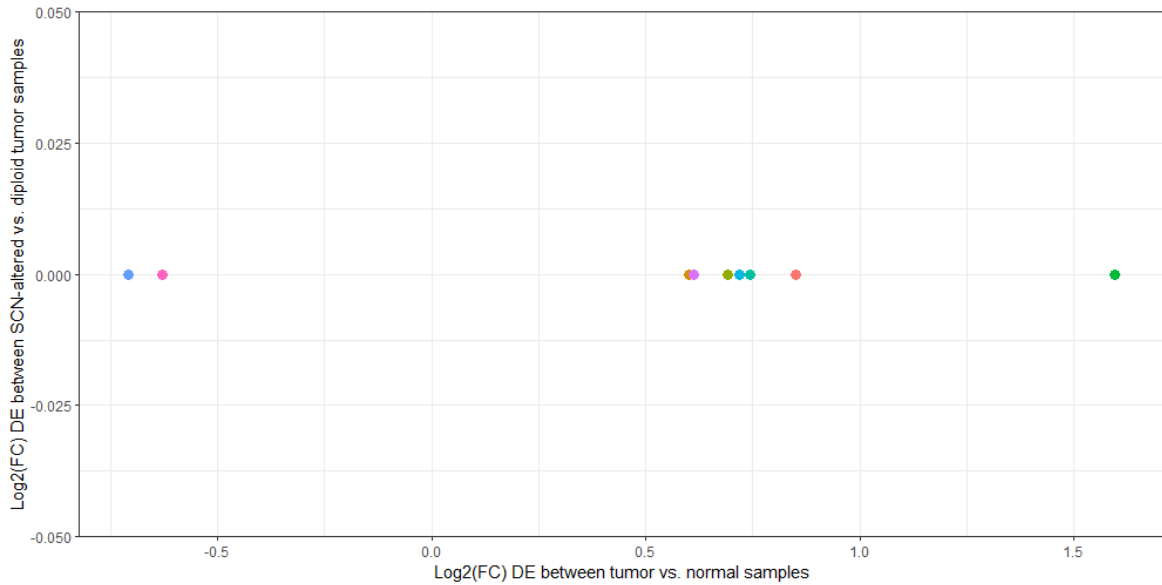


ABBILDUNG 16: 7P22.1

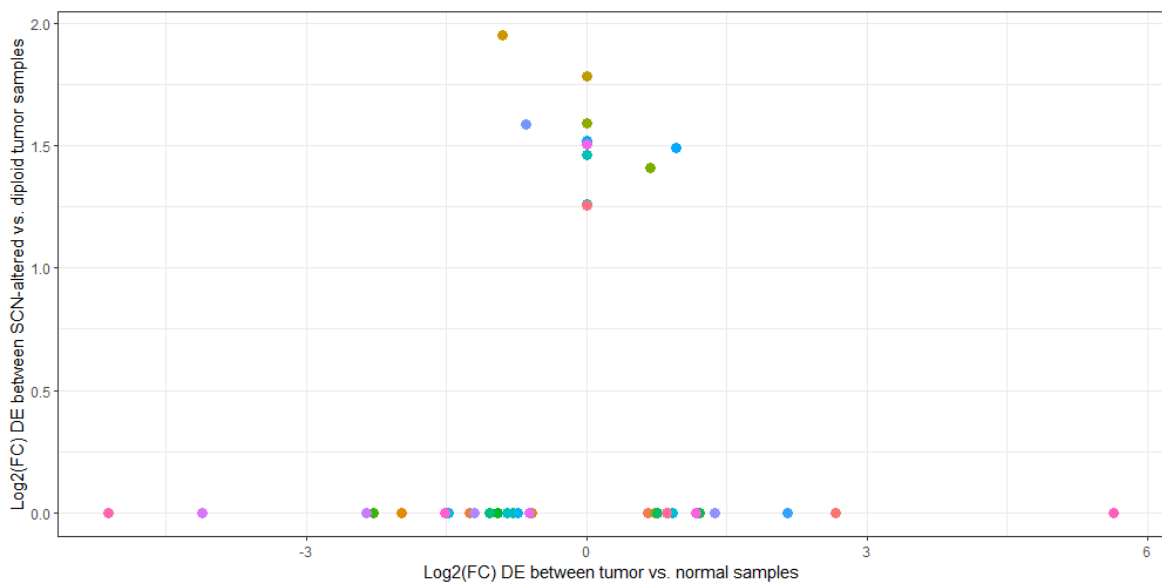


ABBILDUNG 17: 16P11.2

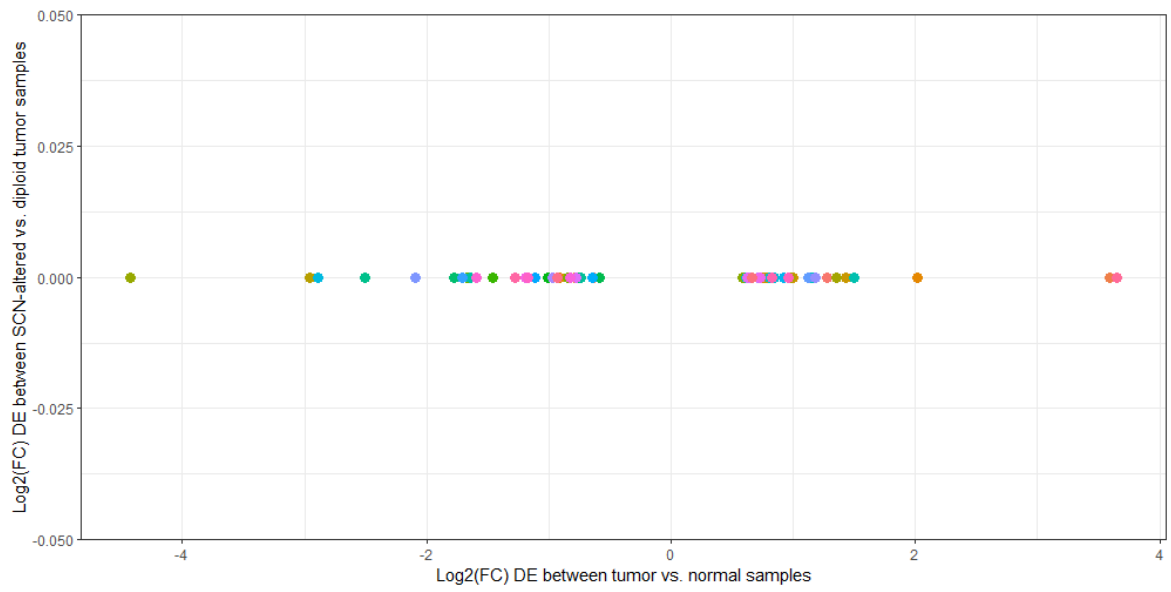


ABBILDUNG 18: 19P13.3

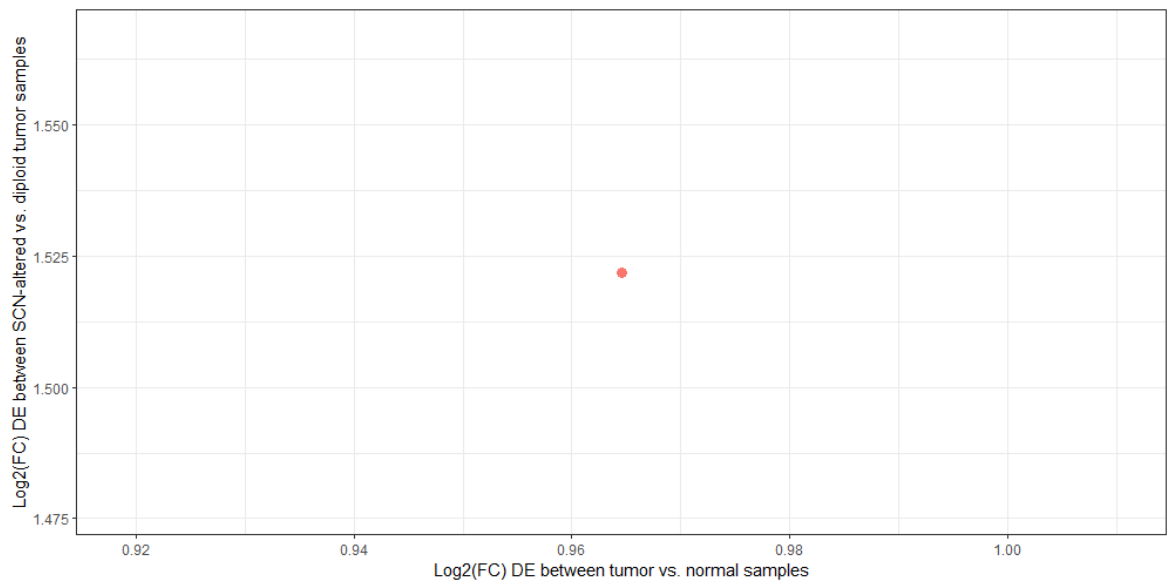


ABBILDUNG 19: 20P11.1

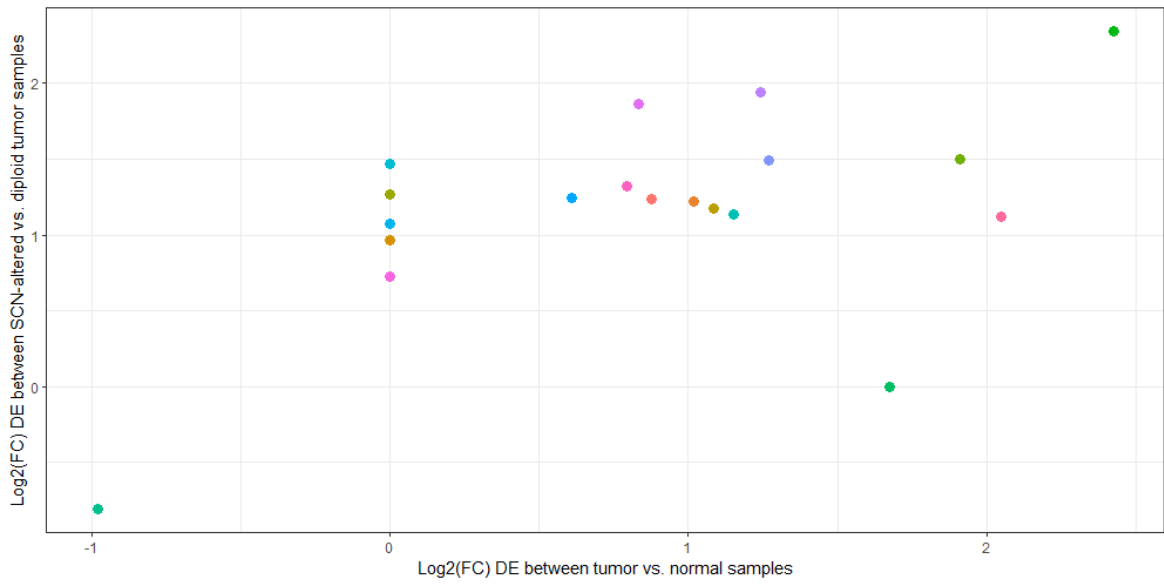


ABBILDUNG 20: 20Q11.21

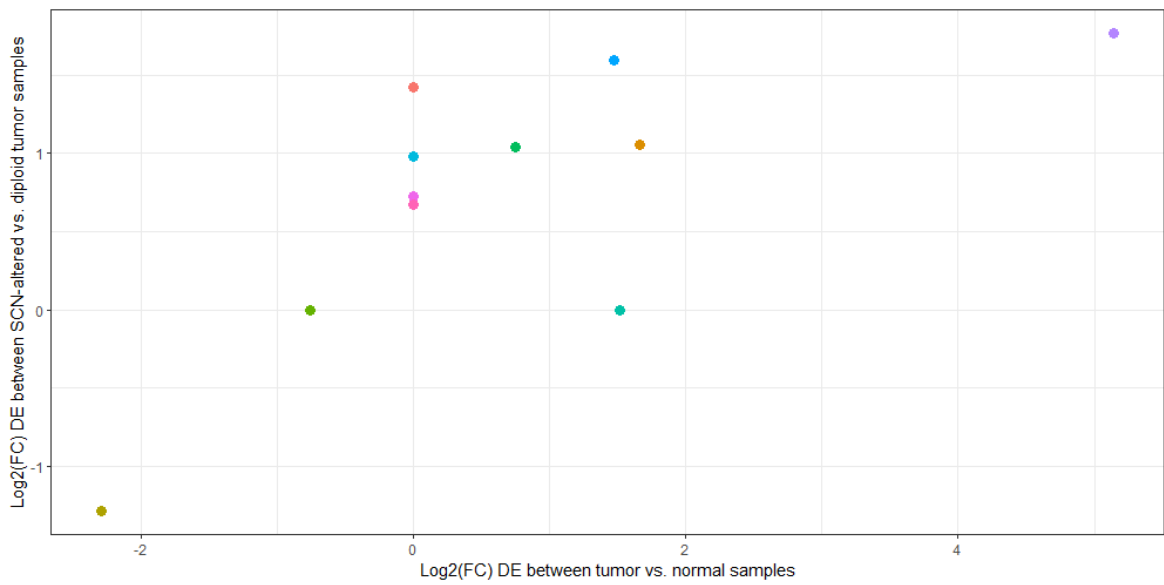


ABBILDUNG 21: 20Q13.2

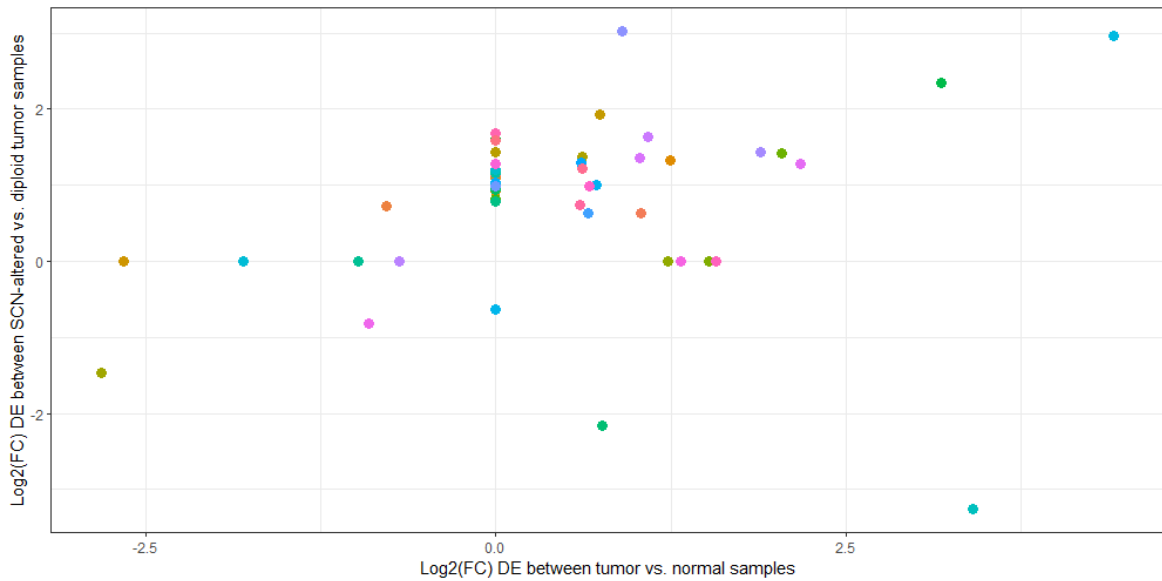


ABBILDUNG 22: 20Q13.12

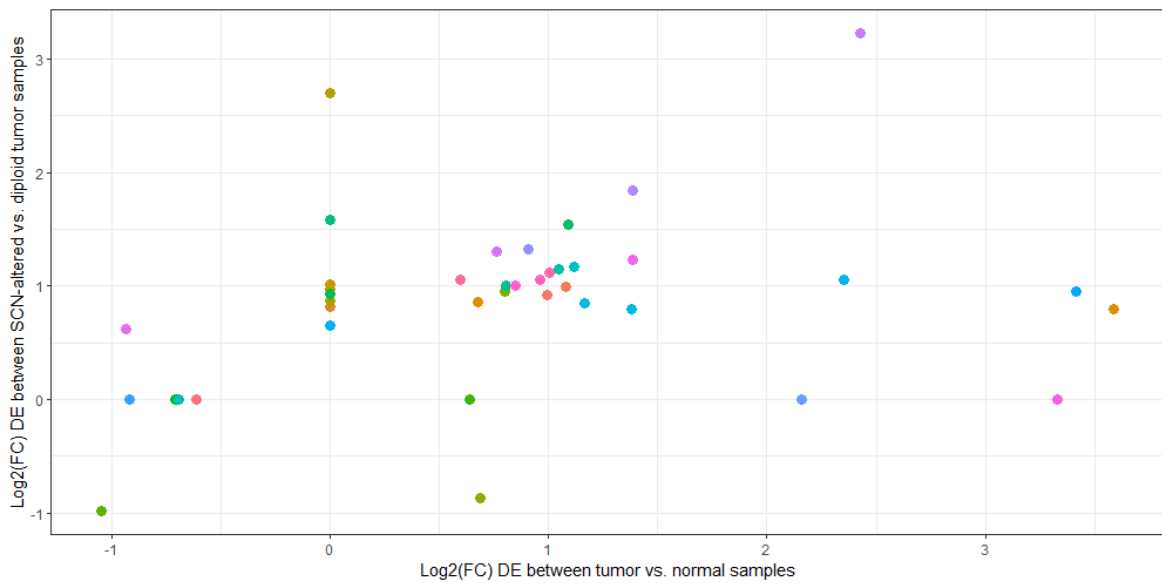


ABBILDUNG 23: 20Q13.33

Die Abbildungen 16-23 bieten eine erste Übersicht der Korrelation zwischen differentiell exprimierten Genen aus dem Tumor und Kopienzahlveränderungen der acht Cytobands. Auf der X-Achse wird „Log2(FC) DE between tumor vs. normal samples“ dargestellt. Auf der Y-Achse wird „Log2(FC) DE between SCN-altered vs. diploid tumor samples“ abgebildet. Die Gene innerhalb der Cytobands werden in Form von Punkten repräsentiert. Beachtet werden müssen die unterschiedlichen Achsenskalierungen.

Ein signifikant verändertes Gen wird nach der Analyse in ciberAMP in 8 Kategorien eingeteilt. Um hierbei den originalen Beschreibungen bzw. Klassifizierungen treu zu bleiben, darf die folgende Information in englischer Sprache angeführt werden:

* $x\text{-value} < 0$; $y\text{-value} > 0$ | Downregulated in tumor vs. normal samples, with a very high expression in SCA-altered tumor samples.

* $x\text{-value} = 0$; $y\text{-value} > 0$ | Upregulated exclusively in SCA-altered tumor samples.

* $x\text{-value} > 0$; $y\text{-value} > 0$ | Upregulated in tumor vs. normal samples with an even higher expression in SCA-altered tumor samples.

* $x\text{-value} \neq 0$; $y\text{-value} == 0$ | Deregulated (up or down) in tumor vs. normal samples without any SCA-driven deregulation.

* $x\text{-value} < 0$; $y\text{-value} < 0$ | Downregulated in tumor vs. normal samples, even more repressed in SCA-altered tumor samples.

* $x\text{-value} = 0$, $y\text{-value} < 0$ | Downregulated exclusively in SCA-altered tumor samples.

* $x\text{-value} > 0$; $y\text{-value} < 0$ | Upregulated in tumor vs. normal samples, but repressed in SCA-altered tumor samples.

Für diese Arbeit sind somit jene Gene von Bedeutung, die sowohl im Bereich Tumorproben vs. gesunde Proben hochreguliert sind, als auch eine noch höhere Expression in kopienzahlveränderten Tumorproben aufweisen. Dies betrifft somit Gene mit positiven Werten im x- und y-Bereich. Hervorzuheben ist, dass in den Genabschnitten 7p22.1 und 19p13.3 keine in dieser Hinsicht bedeutenden Gene vorkommen. Das Cytoband 20p11.1 weist nur ein Gen dieser Kategorie auf: *ZNF337*.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Inhalte wurden der Vignette zum Programm CiberAMP am 30.12.2022. entnommen.

<https://github.com/vqf/ciberAMP/blob/0207d80d2b9f7e6398dd97e2b3b5d6a6d9ab58d0/vignettes/Vignette%20CiberAMP.Rmd>

Insgesamt wurden 113 Gene als „Group AMP vs. Group DIPLOID“ klassifiziert. Dies bedeutet, dass diese Gene im Vergleich zum normalen Gewebe im Tumorgewebe amplifiziert waren. Zusätzlich sind diese 113 Gene zwischen Tumorgewebe und gesunden Proben differentiell exprimiert. 116 Gene wurden als „Not SCN-associated DEG“ eingestuft. Dies bedeutet, dass diese Gene zwar im Gegensatz zum gesunden Gewebe in den Tumorproben amplifiziert waren. Jedoch kommt es in diesen Fällen nicht zu einer differentiellen Expression zwischen Tumorgewebe und gesunden Proben. Hervorzuheben ist jedoch, dass in den Genabschnitten 7p22.1 und 19p13.3 keine SCNA-DEGs vorkamen. Für die Analyse in ciberAMP wurden nur Cytobands bzw. Gene mit dem Eventtyp „Amplification“ analysiert. Um Diskrepanzen zwischen der untersuchten Kohorte und der TCGA (The Cancer Genome Atlas) Kohorte auszuschließen, wurde jedoch ebenfalls nach Deletionen in dieser Auswertung gesucht. In diesen acht Genregionen traten jedoch keine Deletionen auf. Insgesamt sind 590 Gene aus den Regionen 7p22.1, 16p11.2, 19p13.3, 20p11.1, 20q11.21, 20q13.2, 20q13.12, 20q13.33 untersucht worden. Die folgende Abbildung 24, zeigt eine Übersicht der verschiedenen Regionen. In Grün werden die Gene, welche als „Group AMP vs. Group DIPLOID“ klassifiziert wurden, dargestellt.

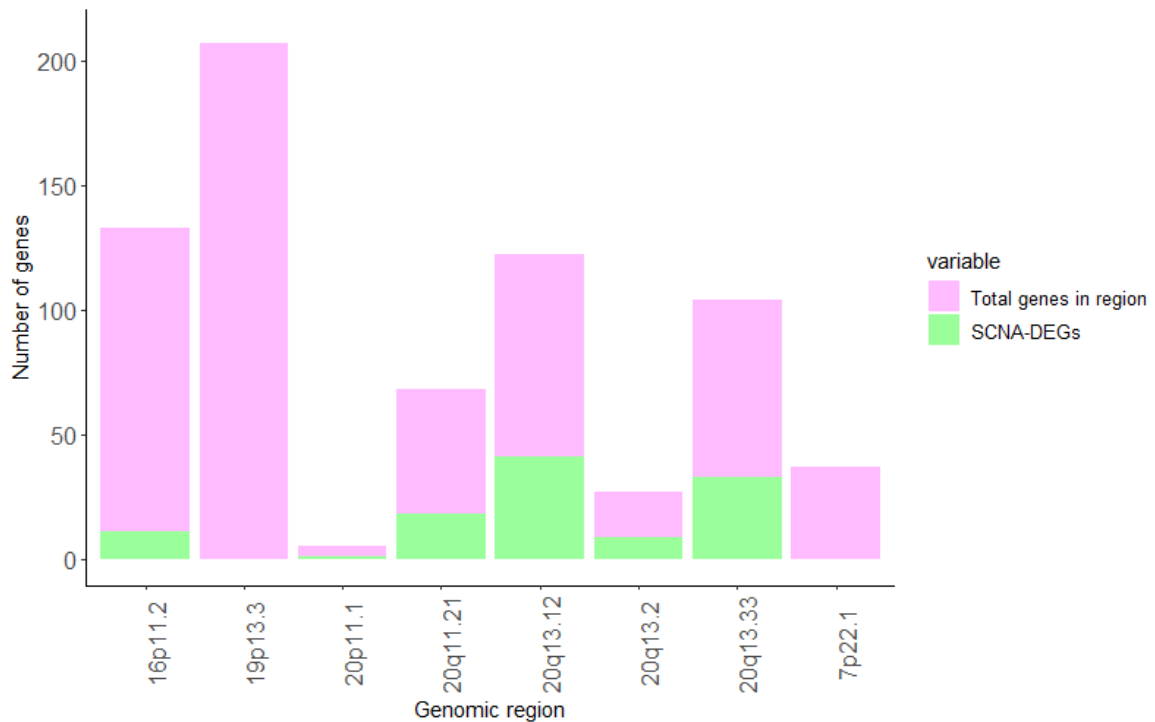


ABBILDUNG 24: SCNA-DEGS

Abbildung 24 veranschaulicht die Informationen des ersten Datensatzes aus ciberAMP. Die violett gefärbten Balken stellen die Gesamtzahl der Gene pro Cytoband dar. Die grünen Bereiche präsentieren die SCNA-DEGs dieser Genabschnitte.

In der folgenden Tabelle 10 dürfen die SCNA-DEGs der jeweiligen Cytobands aufgelistet werden. Da in den Genabschnitten 7p22.1 und 19p13.3 keine SCNA-DEGs detektiert wurden, sind diese anschließend nicht erwähnt. Beim Vergleich mit den Ergebnisse der optischen linearen Korrelationsanalysen der Region 16p11.2 unter Verwendung der TCGA-PanCancer-Kohorte (Tabelle 9) wurden 6 Gene identifiziert, die sich mit den SCNA-DEGs überlappen, die aus der TCGA-COAD-Kohorte mittels ciberAMP detektiert wurden (Tabelle 10): *TBC1D10B*, *DCTPP1*, *SEPHS2*, *PRR14*, *FBXL19*, *PYCARD*.

TABELLE 10: SCNA-DEGs

Analysiertes Cytoband	Signifikante SCNA-DEGs
16p11.2	CTF1 DCTPP1 FBRS FBXL19 ORAI3 PRR14 PYCARD QPRT SEPHS2 TBC1D10B ZNF785
20p11.1	ZNF337
20q11.21	ASXL1 BCL2L1 CBFA2T2 CDK5RAP1 COMMD7 DNMT3B DUSP15 HCK HM13 ID1 KIF3B MAPRE1 PDRG1 PLAGL2 POFUT1 SNTA1 TM9SF4 TPX2
20q13.2	ATP9A AURKA BCAS1 CSTF1 NFATC2 PFDN4 SALL4 ZFP64 ZNF217
20q13.12	ACOT8 ADA CTSA DBNDD2 DNMT1P1 ELMO2 FITM2 HNF4A

	<p> <i>IFT52</i> <i>JPH2</i> <i>MYBL2</i> <i>NCOA3</i> <i>NCOA5</i> <i>NEURL2</i> <i>PABPC1L</i> <i>PCIF1</i> <i>PI3</i> <i>PIGT</i> <i>PLTP</i> <i>SDC4</i> <i>SEMG1</i> <i>SERINC3</i> <i>SLC13A3</i> <i>SLC2A10</i> <i>SLC35C2</i> <i>SNX21</i> <i>STK4</i> <i>SULF2</i> <i>SYS1</i> <i>TNNC2</i> <i>TOMM34</i> <i>TP53RK</i> <i>TTPAL</i> <i>UBE2C</i> <i>WFDC2</i> <i>YWHAB</i> <i>ZMYND8</i> <i>ZNF334</i> <i>ZNF335</i> <i>ZSWIM1</i> <i>ZSWIM3</i> </p>
20q13.33	<p> <i>ADRM1</i> <i>ARFGAP1</i> <i>ARFRP1</i> <i>CABLES2</i> <i>COL9A3</i> <i>DIDO1</i> <i>DNAJC5</i> <i>EEF1A2</i> <i>GMEB2</i> <i>HAR1A</i> <i>LSM14B</i> <i>NTSR1</i> <i>OSBPL2</i> <i>PCMTD2</i> <i>PPP1R3D</i> <i>PRPF6</i> <i>PSMA7</i> </p>

	<i>RPS21</i> <i>RTEL1</i> <i>SAMD10</i> <i>SLC17A9</i> <i>SLC2A4RG</i> <i>SLCO4A1</i> <i>SS18L1</i> <i>STMN3</i> <i>SYCP2</i> <i>TAF4</i> <i>TCEA2</i> <i>TCFL5</i> <i>TPD52L2</i> <i>UCKL1</i> <i>YTHDF1</i> <i>ZGPAT</i>
--	---

Für jedes SCNA-DEGs der genannten Cytobands wurde die Häufigkeit seines Vorkommens unter den Patient*Innen aufgezeichnet. Zur Übersicht wurde der Mittelwert der prozentuellen Häufigkeiten der SCNA-DEGs pro Genabschnitt berechnet (Tabelle 11). Da in den Genabschnitten 7p22.1 und 19p13.3 keine SCNA-DEGs detektiert wurden, sind diese anschließend nicht erwähnt.

TABELLE 11: HÄUFIGKEIT DER SCNA-DEGS

Cytoband	Mittelwert %
16p11.2	1.2
20p11.1	3.0
20q11.21	7.9
20q13.2	8.2
20q13.12	8.6
20q13.33	7.3

6.5.2 COSMIC Intersect

Die zuvor aufgelisteten SCNA-DEGs wurden im nächsten Schritt mit einer Genliste aus COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>) abgeglichen, um bereits bekannte, krebsassoziierte Gene, welche auch als SCNA-DEGs detektiert wurden, zu dokumentieren. Insgesamt wurden somit 113 Gene mit 722 Genen aus COSMIC abgeglichen. Als Ergebnis konnten 5 Gene aus 4 verschiedenen Cytobands (4,42%) detektiert werden. Allesamt stammen aus der Region 20q.

TABELLE 12: COSMIC INTERSECT ANNOTIERUNGEN

Gene	Cytoband	Cancer Role	Syndrome	Tumortyp
<i>ASXL1</i>	20q11.21	TSG	Bohring-Opitz Syndrom	MDS, CMML
<i>NFATC2</i>	20q13.2	Onkogen, Fusion		Ewing Sarkom
<i>SALL4</i>	20q13.2	Onkogen	Duane-Radial Ray Syndrom	Darmkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs, Glioblastom, Melanom
<i>SDC4</i>	20q13.12	Fusion		NSCLC
<i>SS18L1</i>	20q13.33	Fusion		synoviales Sarkoma

Die in der Tabelle 12 verwendeten Abkürzungen dürfen hier gesondert angeführt werden: Tumorsuppressorgen (TSG), Myelodysplastisches Syndrom (MDS), Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML), Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC).

Laut COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) wird das Gen *ASXL1* mit dem Bohring-Opitz Syndrom und das Gen *SALL4* mit dem Duane-Radial Ray Syndrom assoziiert. Nur für das letztgenannte Gen besteht eine vorbekannte Verbindung mit dem kolorektalen Karzinom. Weitere Annotierungen sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

7 Diskussion

In Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die am häufigsten fokal amplifizierten Gene in einer Kohorte von Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen identifiziert. Obwohl bereits ein großes Wissen über Amplifikationen und deren klinische Bedeutung für die Betroffenen vorhanden ist, gibt es noch immer eine reichliche Menge an Genamplifikationen, die weiter erforscht werden muss. Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit der großangelegten TCGA-Datenbank zu vergleichen, wurde das erst kürzlich veröffentlichte R-Package CiberAMP (Caloto et al., 2022) angewandt. Dabei werden sowohl unterschiedlich exprimierte Gene zwischen Tumor und gesunden Proben identifiziert als auch bestimmt, welche dieser Gene mit Genamplifikationen bei Patient*Innen mit kolorektalen Karzinomen korrelieren. Im Großen und Ganzen stimmen die Ergebnisse dieser Diplomarbeit mit der bereits bestehenden Literatur überein. Es wurden jedoch auch weniger bekannte Regionen detektiert, die weitere Forschung benötigen.

7.1 Amplifikationen der chromosomalen Region 20q repräsentieren bereits bekannte Veränderungen im CRC

Dass die Region 20q eine der am häufigsten amplifizierten Regionen des kolorektalen Karzinoms ist, wurde in anderen Arbeiten bereits mehrfach betont (Zhang et al., 2021). Es wird außerdem vorhergesagt, dass im Speziellen Kopienzahlveränderungen in der Region 20q13.33 in Zukunft im Bereich der Früherkennung und zielgerichteter Therapie eine bedeutende Rolle spielen werden (Bui et al., 2020). Diese Diplomarbeit konnte diese Aussagen eindeutig bestätigen.

Ein Zusammenhang zwischen der Progression des kolorektalen Adenoms zu einem kolorektalen Karzinoms und verschiedener Onkogene im Bereich der chromosomalen Region 20q wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt (Carvalho et al., 2009). Aufgrund Kopienzahlveränderungen kommt es in Karzinomen zu einer Überexpression von Genen innerhalb der chromosomalen Region 20q. In einer Studie konnte demonstriert werden, dass beispielsweise im Vergleich zu Adenomen *AURKA* in Karzinomen überexprimiert ist (Carvalho et al., 2009). Außerdem definiert die 20q-Amplifikation eine Subgruppe von Patient*Innen mit einem besseren

Gesamtüberleben ab dem Datum der Metastasierung (Ptashkin et al., 2017). Die Bedeutung dieser chromosomalen Region steht somit außer Frage und konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit nochmals bestätigt werden. Besonders die Berechnung der Häufigkeit der SCNA-DEGs pro Cytoband (Tabelle 11) unterstreicht den Stellenwert der chromosomalen Region 20q.

7.2 Amplifikationen der chromosomalen Region 16p11.2 finden sich seltener im CRC

Im Vergleich zu der bereits ausführlich beschriebenen Amplifikation der chromosomalen Region 20q, werden Amplifikationen in der Region 16p11.2 in der Literatur seltener erwähnt. Die Tabelle 11, welche die Häufigkeit der SCNA-DEGs veranschaulicht, kann diese Behauptung unterstreichen. Die untersuchte Kohorte zeigt häufiger SCNA-DEGs in der Region 20q als in den anderen Abschnitten.

Der Vergleich der Ergebnisse der optischen linearen Korrelationsanalysen der Region 20p11.2 unter Verwendung der TCGA-PanCancer-Kohorte (Tabelle 9) mit den SCNA-DEGs, die aus der TCGA-COAD-Kohorte mittels ciberAMP detektiert wurden (Tabelle 10), führte zu einem spannenden Ergebnis. Es konnten 6 überlappende Gene detektiert werden:

TBC1D10B, DCTPP1, SEPHS2, PRR14, FBXL19, PYCARD

In OncoKB findet man weder Informationen zu *TBC1D10B, DCTPP1, SEPHS2, PRR14, FBXL19* noch zu *PYCARD* (Chakravarty et al., 2017). Daraus lässt sich schließen, dass die klinische Relevanz dieser Genamplifikationen noch nicht geklärt ist. Im Kapitel 5.5.4 wurde bereits darauf eingegangen, warum die chromosomale Region 16p11.2 eine potenzielle Kandidatenregion für weitere Untersuchungen darstellen könnte. Die fehlenden Informationen zu diesen Genen lässt die Notwendigkeit von weiteren Studien anklingen und hebt die im Rahmen dieser Diplomarbeit erhobenen Daten hervor.

7.3 Longitudinales sWGS der Plasma-DNA ermöglicht eine minimalinvasive Überwachung von Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen

In Zusammenarbeit mit Frau OÄ Dr. Sabine Hojas wurden Plasmaproben bei Patient*Innen mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen zur Krankheitsüberwachung entnommen. Mittels sWGS wurden im Verlauf neue SCNAs identifiziert und die Entwicklung des Tumorgenoms während der laufenden Therapie in Echtzeit beobachtet. Die Vorteile von Liquid Biopsy liegen vor allem in der minimalen Invasivität dieser Methode und der Möglichkeit einer longitudinalen Analyse genomischer Veränderungen der ctDNA. Ebenso ist es möglich, zeitgleich ctDNA von allen metastatischen Stellen zu gewinnen. Es gibt bereits erfolgversprechende Studien, die den klinischen Nutzen von sWGS für Überwachungszwecke unterstützen (Nørgaard et al., 2023).

In Zusammenarbeit mit Frau OÄ Dr. Sabine Hojas von der Abteilung für Innere Medizin aus dem LKH Fürstenfeld wurden insgesamt 19 Plasmaproben der Patientin C217 (Abbildung 7) entnommen und analysiert. Im Therapieverlauf zeigten die Proben ein ähnliches Kopienzahlprofil und minimale Schwankungen der Tumorfraktion. Erst zum Zeitpunkt der letzten Probe, 21 Monate nach der Erstanalyse, konnte mittels sWGS eine neue fokale Amplifikation, *YES1* auf Chromosom 18, nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Ereignis während der Drittlinientherapie mit Capecitabine und Cetuximab aufgetreten ist. *YES1* kodiert für eine Tyrosinkinase, die an der Regulierung von Zellwachstum, Zellüberleben, Apoptose, Zell-Zell-Adhäsion, Umbau des Zytoskeletts und Zelldifferenzierung beteiligt ist. Eine Überexpression von *YES1* wurde in der Vergangenheit bereits im kolorektalen Karzinom nachgewiesen (Chakravarty et al., 2017).

Eine ähnlicher Krankheitsverlauf wurde bei dem Patienten C218 beobachtet. Die Kopienzahlprofile der seriellen Plasmaproben blieben während des gesamten Therapieverlaufs konstant und zeigten durchgehend hohe Tumorfraktionen. 7 Monate nach dem Erhalt der Erstprobe zeigte die insgesamt 5. Probe eine neue fokale Amplifikation des *KRAS*-Gens auf Chromosom 12. Die fokale *KRAS*-

Amplifikation wurde auch in den folgenden Proben nachgewiesen. Der Patient verstarb kurz nach Entnahme der letzten Plasmaprobe.

Um mögliche Resistenzmechanismen zu identifizieren, wurden die Proben dieser Patientenkohorte anschließend einer High-Coverage-WGS (30x) unterzogen. Diese Daten werden zum Zeitpunkt der Einreichung der Diplomarbeit noch analysiert.

7.4 Limitationen und Begrenzungen

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit liegt darin, häufig auftretende fokale somatische Kopienzahlveränderungen oder SCNAs in Patient*Innen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom sowohl in der Literatur als auch in der untersuchten Kohorte zu identifizieren. Dies konnte durch den umfassenden Einsatz von Programmen wie GISTIC2.0, OncoKB, cBioPortal, NAVIFY Mutation Profiler und schließlich den Algorithmus CiberAMP erreicht werden. Es besteht jedoch eindeutiger Bedarf der Fortführung, Verbesserung und Ergänzung dieser vorliegenden Charakterisierung. Die Erstellung eines Workflows zur Verarbeitung genetischer Informationen aus Plasmaproben und die Überleitung in den klinischen Alltag konnte schematisch gezeigt werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen und Evaluierungen der Aussagekraft dieser Tools notwendig. Viele der genannten Informationen wurden für jedes einzelne Gen in mühevoller „Handarbeit“ generiert. Um zeitliche und ökonomische Ressourcen optimal zu nützen, besteht die Notwendigkeit einer Prozessoptimierung.

An diesem Punkt darf betont werden, dass diese Diplomarbeit einen verschwindend geringen Anteil der Möglichkeiten zur Analyse von genetischen Informationen widerspiegelt. Es würde noch viele weitere Möglichkeiten zur genaueren Betrachtung der vorliegenden Daten geben. Dies würde den Rahmen einer Diplomarbeit jedoch bei Weitem übersteigen. Aus diesem Grund wurde versucht, die aus unserer Sicht wichtigsten Einblicke zu ermöglichen. Außerdem soll an dieser Stelle erneut angemerkt werden, dass alle Daten mit dem Referenzgenom hg19 verglichen wurden. Mittlerweile verwendet das Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz jedoch bereits eine neuere Version (hg38). Es würde somit Bedarf bestehen, die Daten auch mit dem neueren Referenzgenom abzugleichen.

Zu betonen ist auch, dass die beschriebenen Programme oft noch weitere Entwicklungen benötigen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass sowohl kommerzielle als auch open source Entscheidungsunterstützungssysteme, wie der NAVIFY Mutation Profiler oder OncoKB, in manchen Fällen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Daher besteht die Notwendigkeit, die Performance dieser Clinical Decision Tools ausreichend zu evaluieren (Perakis et al., 2020). In Zukunft könnten Entscheidungsunterstützungssysteme jedoch eine effiziente Möglichkeit zur Verarbeitung genetischer Informationen darstellen.

Es muss hierbei auch hervorgehoben werden, dass sämtliche Daten zu einem bestimmten Zeitpunkt evaluiert wurden. Dies bedeutet nicht, dass bei erneuter Analyse dieselben Ergebnisse garantiert werden können. Bezüglich der Fürstfeldkohorte wurde für die Analyse beispielsweise der Stichtag des 29.07.2022 gewählt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass von einzelnen Patient*Innen danach noch weitere Proben in die Datenbank aufgenommen wurden. An dieser Stelle muss auch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den 742 Proben, welche in GISTIC2.0 eingespeist wurden, ebenfalls um eine Momentaufnahme handelt. Es ist nicht auszuschließen, dass es bei erneuter Durchführung des beschriebenen Workflows zu einem späteren Zeitpunkt zu anderen Ergebnissen gekommen wäre.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden außerdem zwei verschiedene Versionen des Programmes R verwendet (<https://www.r-project.org/>). Die Version 4.1.2. wurde zur Trennung der signifikanten Amplifikationen oder Deletionen von den restlichen Daten angewandt. Die neuere Version 4.2.2 wurde für das Tool CiberAMP eingesetzt. Bezüglich der Ergebnisse sollte die Verwendung der älteren Version zu keinem Unterschied führen. Aus Transparenzgründen wird dies hier jedoch trotzdem angeführt.

Obendrein kann es aufgrund von abweichenden Auffassungen des Begriffs „focal events“ zu Unstimmigkeiten in der Literatur und zwischen unterschiedlichen Datensätzen kommen (Zhou et al., 2020). Weitere Differenzen in der Literatur bestehen hinsichtlich des Begriffs der somatischen Kopienzahlveränderungen. Somatische Kopienzahlveränderungen (SCNA), welche bei Krebserkrankungen äußerst häufig sind, müssen deutlich vom Begriff Copy Number Variation (CNV),

welcher sich auf Keimbahnveränderungen bezieht, abgegrenzt werden (Beroukhim et al., 2010).

Hier darf erneut erwähnt werden, dass die Extraktion der Plasma-DNA, die Bestimmung der Tumorfraction und die Analyse mittels shallow Whole-Genome-Sequencing durch Mitarbeiter*Innen des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Humangenetik erfolgte.

Besonders die Fürstenfeldkohorte lädt zur weiteren Analyse in anderen Arbeiten ein. Die von Frau OÄ Dr. Sabine Hojas ausführlich dokumentierte Kohorte von 14 Patient*Innen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom bietet optimale Voraussetzungen zur Vernetzung genetischer und klinischer Informationen. Die hohe Anzahl an Follow-up-Plasmaproben pro Patient stellt eine hervorragende Ausgangslage für weitere Untersuchungen dar. Insbesondere die longitudinale Analyse der genetischen Veränderungen unter Therapie bildet einen weiter zu erforschenden Aspekt. Die Ausarbeitung der klinischen Informationen kann dabei als Basis für die Beantwortung weiterer Fragestellungen herangezogen werden.

Darüber hinaus besteht die Option, denselben Workflow mit anderen Tumorentitäten durchzuführen, um die Praktikabilität für den klinischen Alltag zu untermauern. Die Analyse von seltenen Tumorentitäten könnte aufgrund der geringeren Vergleichsdaten jedoch zu Problemen führen.

7.5 Klinischer Ausblick in die Zukunft

An dieser Stelle sollte man auch einen Blick in die Zukunft wagen dürfen. Forscher*Innen sehen voraus, dass im Jahre 2030 die Nutzung genomischer Daten im klinischen Alltag einen festen Bestandteil erlangt haben wird. Genetische Testungen werden einen ähnlichen Stellenwert wie routinemäßige Blutbilder erlangen. Es wird sicherlich zu weiteren bahnbrechenden Entdeckungen im Bereich der genetisch modifizierenden Therapien kommen, die wahrscheinlich auch zur Heilung genetischer Krankheiten führen werden. Betrachtet man die beeindruckendsten wissenschaftlichen Errungenschaften im Bereich der Genetik, waren diese rückblickend wohl kaum vorstellbar. So sollen uns laut den

Forscher*Innen diese gewagten Aussagen ebenfalls dazu bewegen, etwas anzustreben, das derzeit unerreichbar erscheint (Green et al., 2020).

Literaturverzeichnis

- ADALSTEINSSON, V. A., HA, G., FREEMAN, S. S., CHOUDHURY, A. D., STOVER, D. G., PARSONS, H. A., GYDUSH, G., REED, S. C., ROTEM, D., RHOADES, J., LOGINOV, D., LIVITZ, D., ROSEBROCK, D., LESHCHINER, I., KIM, J., STEWART, C., ROSENBERG, M., FRANCIS, J. M., ZHANG, C. Z., COHEN, O., OH, C., DING, H., POLAK, P., LLOYD, M., MAHMUD, S., HELVIE, K., MERRILL, M. S., SANTIAGO, R. A., O'CONNOR, E. P., JEONG, S. H., LEESON, R., BARRY, R. M., KRAMKOWSKI, J. F., ZHANG, Z., POLACEK, L., LOHR, J. G., SCHLEICHER, M., LIPSCOMB, E., SALTZMAN, A., OLIVER, N. M., MARINI, L., WAKS, A. G., HARSHMAN, L. C., TOLANEY, S. M., VAN ALLEN, E. M., WINER, E. P., LIN, N. U., NAKABAYASHI, M., TAPLIN, M. E., JOHANNESSEN, C. M., GARRAWAY, L. A., GOLUB, T. R., BOEHM, J. S., WAGLE, N., GETZ, G., LOVE, J. C. & MEYERSON, M. 2017. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun*, 8, 1324.
- BALLINGER, A. B. & ANGGIANSAH, C. 2007. Colorectal cancer. *BMJ*, 335, 715-8.
- BEROUKHIM, R., MERMEL, C. H., PORTER, D., WEI, G., RAYCHAUDHURI, S., DONOVAN, J., BARRETINA, J., BOEHM, J. S., DOBSON, J., URASHIMA, M., MC HENRY, K. T., PINCHBACK, R. M., LIGON, A. H., CHO, Y. J., HAERY, L., GREULICH, H., REICH, M., WINCKLER, W., LAWRENCE, M. S., WEIR, B. A., TANAKA, K. E., CHIANG, D. Y., BASS, A. J., LOO, A., HOFFMAN, C., PRENSNER, J., LIEFELD, T., GAO, Q., YECIES, D., SIGNORETTI, S., MAHER, E., KAYE, F. J., SASAKI, H., TEPPER, J. E., FLETCHER, J. A., TABERNERO, J., BASELGA, J., TSAO, M. S., DEMICHELIS, F., RUBIN, M. A., JANNE, P. A., DALY, M. J., NUCERA, C., LEVINE, R. L., EBERT, B. L., GABRIEL, S., RUSTGI, A. K., ANTONESCU, C. R., LADANYI, M., LETAI, A., GARRAWAY, L. A., LODA, M., BEER, D. G., TRUE, L. D., OKAMOTO, A., POMEROY, S. L., SINGER, S., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., GETZ, G., SELLERS, W. R. & MEYERSON, M. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463, 899-905.
- BETTEGOWDA, C., SAUSEN, M., LEARY, R. J., KINDE, I., WANG, Y., AGRAWAL, N., BARTLETT, B. R., WANG, H., LUBER, B., ALANI, R. M., ANTONARAKIS, E. S., AZAD, N. S., BARDELLI, A., BREM, H., CAMERON, J. L., LEE, C. C., FECHER, L. A., GALLIA, G. L., GIBBS, P., LE, D., GIUNTOLI, R. L., GOGGINS, M., HOGARTY, M. D., HOLDHOFF, M., HONG, S. M., JIAO, Y., JUHL, H. H., KIM, J. J., SIRAVEGNA, G., LAHERU, D. A., LAURICELLA, C., LIM, M., LIPSON, E. J., MARIE, S. K., NETTO, G. J., OLINER, K. S., OLIVI, A., OLSSON, L., RIGGINS, G. J., SARTORE-BIANCHI, A., SCHMIDT, K., SHIH L, M., OBA-SHINJO, S. M., SIENA, S., THEODORESCU, D., TIE, J., HARKINS, T. T., VERONESE, S., WANG, T. L., WEINGART, J. D., WOLFGANG, C. L., WOOD, L. D., XING, D., HRUBAN, R. H., WU, J., ALLEN, P. J., SCHMIDT, C. M., CHOTI, M. A., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N. & DIAZ, L. A., JR. 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6, 224ra24.
- BUI, V. M., METTLING, C., JOU, J. & SUN, H. S. 2020. Genomic amplification of chromosome 20q13.33 is the early biomarker for the development of sporadic colorectal carcinoma. *BMC Med Genomics*, 13, 149.
- CALOTO, R., LORENZO-MARTIN, L. F., QUESADA, V., CARRACEDO, A. & BUSTELO, X. R. 2022. CiberAMP: An R Package to Identify Differential mRNA Expression Linked to Somatic Copy Number Variations in Cancer Datasets. *Biology (Basel)*, 11.
- CANCER GENOME ATLAS, N. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-7.
- CARVALHO, B., POSTMA, C., MONGERA, S., HOPMANS, E., DISKIN, S., VAN DE WIEL, M. A., VAN CRIEKINGE, W., THAS, O., MATTHAI, A., CUESTA, M. A., TERHAAR SIVE DROSTE, J. S., CRAANEN, M., SCHROCK, E., YLSTRA, B. & MEIJER, G. A. 2009. Multiple putative

- oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut*, 58, 79-89.
- CHAKRAVARTY, D., GAO, J., PHILLIPS, S. M., KUNDRRA, R., ZHANG, H., WANG, J., RUDOLPH, J. E., YAEGER, R., SOUMERAI, T., NISSAN, M. H., CHANG, M. T., CHANDARLAPATY, S., TRAINA, T. A., PAIK, P. K., HO, A. L., HANTASH, F. M., GRUPE, A., BAXI, S. S., CALLAHAN, M. K., SNYDER, A., CHI, P., DANILA, D., GOUNDER, M., HARDING, J. J., HELLMANN, M. D., IYER, G., JANJIGIAN, Y., KALEY, T., LEVINE, D. A., LOWERY, M., OMURO, A., POSTOW, M. A., RATHKOPF, D., SHOUSHARI, A. N., SHUKLA, N., VOSS, M., PARAISO, E., ZEHIR, A., BERGER, M. F., TAYLOR, B. S., SALTZ, L. B., RIELY, G. J., LADANYI, M., HYMAN, D. M., BASELGA, J., SABBATINI, P., SOLIT, D. B. & SCHULTZ, N. 2017. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*, 2017.
- CHEN, M. & ZHAO, H. 2019. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*, 13, 34.
- CHEUNG, C. H., SARVAGALLA, S., LEE, J. Y., HUANG, Y. C. & COUMAR, M. S. 2014. Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*, 24, 1021-38.
- DEKKER, E., TANIS, P. J., VLEUGELS, J. L. A., KASI, P. M. & WALLACE, M. B. 2019. Colorectal cancer. *Lancet*, 394, 1467-1480.
- FONTAN, L., YANG, C., KABALEESWARAN, V., VOLPON, L., OSBORNE, M. J., BELTRAN, E., GARCIA, M., CERCHIETTI, L., SHAKNOVICH, R., YANG, S. N., FANG, F., GASCOYNE, R. D., MARTINEZ-CLIMENT, J. A., GLICKMAN, J. F., BORDEN, K., WU, H. & MELNICK, A. 2012. MALT1 small molecule inhibitors specifically suppress ABC-DLBCL in vitro and in vivo. *Cancer Cell*, 22, 812-24.
- GAO, J., AKSOY, B. A., DOGRUSOZ, U., DRESDNER, G., GROSS, B., SUMER, S. O., SUN, Y., JACOBSEN, A., SINHA, R., LARSSON, E., CERAMI, E., SANDER, C. & SCHULTZ, N. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6, p1.
- GREEN, E. D., GUNTER, C., BIESECKER, L. G., DI FRANCESCO, V., EASTER, C. L., FEINGOLD, E. A., FELSENFELD, A. L., KAUFMAN, D. J., OSTRANDER, E. A., PAVAN, W. J., PHILLIPPY, A. M., WISE, A. L., DAYAL, J. G., KISH, B. J., MANDICH, A., WELLINGTON, C. R., WETTERSTRAND, K. A., BATES, S. A., LEJA, D., VASQUEZ, S., GAHL, W. A., GRAHAM, B. J., KASTNER, D. L., LIU, P., RODRIGUEZ, L. L., SOLOMON, B. D., BONHAM, V. L., BRODY, L. C., HUTTER, C. M. & MANOLIO, T. A. 2020. Strategic vision for improving human health at The Forefront of Genomics. *Nature*, 586, 683-692.
- GUSTAVSSON, B., CARLSSON, G., MACHOVER, D., PETRELLI, N., ROTH, A., SCHMOLL, H. J., TVEIT, K. M. & GIBSON, F. 2015. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 14, 1-10.
- HANAHAAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HASENLEITHNER, S. O. & SPEICHER, M. R. 2022. A clinician's handbook for using ctDNA throughout the patient journey. *Mol Cancer*, 21, 81.
- HEITZER, E., HAQUE, I. S., ROBERTS, C. E. S. & SPEICHER, M. R. 2019. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*, 20, 71-88.
- HEITZER, E., ULZ, P., BELIC, J., GUTSCHI, S., QUEHENBERGER, F., FISCHEREDER, K., BENEZEDER, T., AUER, M., PISCHLER, C., MANNWEILER, S., PICHLER, M., EISNER, F., HAEUSLER, M., RIETHDORF, S., PANTEL, K., SAMONIGG, H., HOEFLER, G., AUGUSTIN, H., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2013. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med*, 5, 30.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K.,

- MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, Y., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LE, D. T., URAM, J. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., KEMBERLING, H., EYRING, A. D., SKORA, A. D., LUBER, B. S., AZAD, N. S., LAHERU, D., BIEDRZYCKI, B., DONEHOWER, R. C., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., DUFFY, S. M., GOLDBERG, R. M., DE LA CHAPELLE, A., KOSHIJI, M., BHAIJEE, F., HUEBNER, T., HRUBAN, R. H., WOOD, L. D., CUKA, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ZHOU, S., CORNISH, T. C., TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B. & DIAZ, L. A., JR. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372, 2509-20.
- LUCAS, A. S., O'NEIL, B. H. & GOLDBERG, R. M. 2011. A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 10, 238-44.
- MARKOWITZ, S. D. & BERTAGNOLLI, M. M. 2009. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361, 2449-2460.
- MERKER, J. D., OXNARD, G. R., COMPTON, C., DIEHN, M., HURLEY, P., LAZAR, A. J., LINDEMAN, N., LOCKWOOD, C. M., RAI, A. J., SCHILSKY, R. L., TSIMBERIDOU, A. M., VASALOS, P., BILLMAN, B. L., OLIVER, T. K., BRUINOOGUE, S. S., HAYES, D. F. & TURNER, N. C. 2018. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*, 36, 1631-1641.
- MERMEL, C. H., SCHUMACHER, S. E., HILL, B., MEYERSON, M. L., BEROUKHIM, R. & GETZ, G. 2011. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol*, 12, 41.
- MOHAN, S., HEITZER, E., ULZ, P., LAFER, I., LAX, S., AUER, M., PICHLER, M., GERGER, A., EISNER, F., HOEFLER, G., BAUERNHOFER, T., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2014. Changes in Colorectal Carcinoma Genomes under Anti-EGFR Therapy Identified by Whole-Genome Plasma DNA Sequencing. *PLOS Genetics*, 10, e1004271.
- NGUYEN, H. T. & DUONG, H. Q. 2018. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett*, 16, 9-18.
- NØRGAARD, M., BJERRE, M. T., FREDSDØE, J., VANG, S., JENSEN, J. B., DE LAERE, B., GRÖNBERG, H., BORRE, M., LINDBERG, J. & SØRENSEN, K. D. 2023. Prognostic Value of Low-Pass Whole Genome Sequencing of Circulating Tumor DNA in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Chemistry*.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2010. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 16, 398-406.
- PARK, D., MAGIS, A. T., LI, R., OWONIKOKO, T. K., SICA, G. L., SUN, S. Y., RAMALINGAM, S. S., KHURI, F. R., CURRAN, W. J. & DENG, X. 2013. Novel small-molecule inhibitors of Bcl-XL to treat lung cancer. *Cancer Res*, 73, 5485-96.
- PERAKIS, S. O., WEBER, S., ZHOU, Q., GRAF, R., HOJAS, S., RIEDL, J. M., GERGER, A., DANDACHI, N., BALIC, M., HOEFLER, G., SCHUURING, E., GROEN, H. J. M., GEIGL, J. B., HEITZER, E. & SPEICHER, M. R. 2020. Comparison of three commercial decision support platforms for

- matching of next-generation sequencing results with therapies in patients with cancer. *ESMO Open*, 5, e000872.
- PTASHKIN, R. N., PAGAN, C., YAEGER, R., MIDDHA, S., SHIA, J., O'ROURKE, K. P., BERGER, M. F., WANG, L., CIMERA, R., WANG, J., KLIMSTRA, D. S., SALTZ, L., LADANYI, M., ZEHIR, A. & HECHTMAN, J. F. 2017. Chromosome 20q Amplification Defines a Subtype of Microsatellite Stable, Left-Sided Colon Cancers with Wild-type RAS/RAF and Better Overall Survival. *Mol Cancer Res*, 15, 708-713.
- RAJAGOPALAN, H., NOWAK, M. A., VOGELSTEIN, B. & LENGAUER, C. 2003. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 695-701.
- RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K., REHM, H. L. & COMMITTEE, A. L. Q. A. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17, 405-24.
- ROONEY, P. H., BOONSONG, A., MCKAY, J. A., MARSH, S., STEVENSON, D. A., MURRAY, G. I., CURRAN, S., HAITES, N. E., CASSIDY, J. & MCLEOD, H. L. 2001. Colorectal cancer genomics: evidence for multiple genotypes which influence survival. *Br J Cancer*, 85, 1492-8.
- ROSENBERG, R., ENGEL, J., BRUNS, C., HEITLAND, W., HERMES, N., JAUCH, K. W., KOPP, R., PUTTERICH, E., RUPPERT, R., SCHUSTER, T., FRIESS, H. & HOLZEL, D. 2010. The prognostic value of lymph node ratio in a population-based collective of colorectal cancer patients. *Ann Surg*, 251, 1070-8.
- SAMATAR, A. A. & POULIKAKOS, P. I. 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 928-42.
- SEEBER, A. & GASTL, G. 2016. Targeted Therapy of Colorectal Cancer. *Oncol Res Treat*, 39, 796-802.
- SONDKA, Z., BAMFORD, S., COLE, C. G., WARD, S. A., DUNHAM, I. & FORBES, S. A. 2018. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*, 18, 696-705.
- SONG, M., KIM, H., KIM, W. K., HONG, S. P., LEE, C. & KIM, H. 2014. High expression of AT-rich interactive domain 3A (ARID3A) is associated with good prognosis in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 21 Suppl 4, S481-9.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- TOMCZAK, K., CZERWIŃSKA, P. & WIZNEROWICZ, M. 2015. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19, A68-77.
- ULZ, P., HEITZER, E. & SPEICHER, M. R. 2016. Co-occurrence of MYC amplification and TP53 mutations in human cancer. *Nat Genet*, 48, 104-6.
- WAN, J. C. M., MASSIE, C., GARCIA-CORBACHO, J., MOULIERE, F., BRENTON, J. D., CALDAS, C., PACEY, S., BAIRD, R. & ROSENFELD, N. 2017. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 17, 223-238.
- WANG, Y., LONARD, D. M., YU, Y., CHOW, D. C., PALZKILL, T. G., WANG, J., QI, R., MATZUK, A. J., SONG, X., MADOUX, F., HODDER, P., CHASE, P., GRIFFIN, P. R., ZHOU, S., LIAO, L., XU, J. & O'MALLEY, B. W. 2014. Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer Res*, 74, 1506-1517.
- WERNER, J. 2020. *Gastrointestinale Tumoren*, München, W. Zuckschwerdt Verlag.
- WILKINSON, N. W., YOTHERS, G., LOPA, S., COSTANTINO, J. P., PETRELLI, N. J. & WOLMARK, N. 2010. Long-term survival results of surgery alone versus surgery plus 5-fluorouracil and leucovorin for stage II and stage III colon cancer: pooled analysis of NSABP C-01 through C-05. A baseline from which to compare modern adjuvant trials. *Ann Surg Oncol*, 17, 959-66.

- ZHANG, B., YAO, K., ZHOU, E., ZHANG, L. & CHENG, C. 2021. Chr20q Amplification Defines a Distinct Molecular Subtype of Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *Cancer Res*, 81, 1977-1987.
- ZHOU, Q., MOSER, T., PERAKIS, S. & HEITZER, E. 2018. Untargeted profiling of cell-free circulating DNA. *Translational Cancer Research*, 7, 140-152.
- ZHOU, Q., PERAKIS, S. O., ULZ, P., MOHAN, S., RIEDL, J. M., TALAKIC, E., LAX, S., TOTSCH, M., HOEFLER, G., BAUERNHOFER, T., PICHLER, M., GERGER, A., GEIGL, J. B., HEITZER, E. & SPEICHER, M. R. 2020. Cell-free DNA analysis reveals POLR1D-mediated resistance to bevacizumab in colorectal cancer. *Genome Med*, 12, 20.

Anhang

1. Publikationslizenz Biorender Abbildung 1
2. Publikationslizenz Biorender Abbildung 2
3. Publikationslizenz Biorender Abbildung 3
4. Publikationslizenz Biorender Abbildung 6
5. Bericht NAVIFY Mutation Profiler

Confirmation of Publication and Licensing Rights

February 12th, 2023
Science Suite Inc.

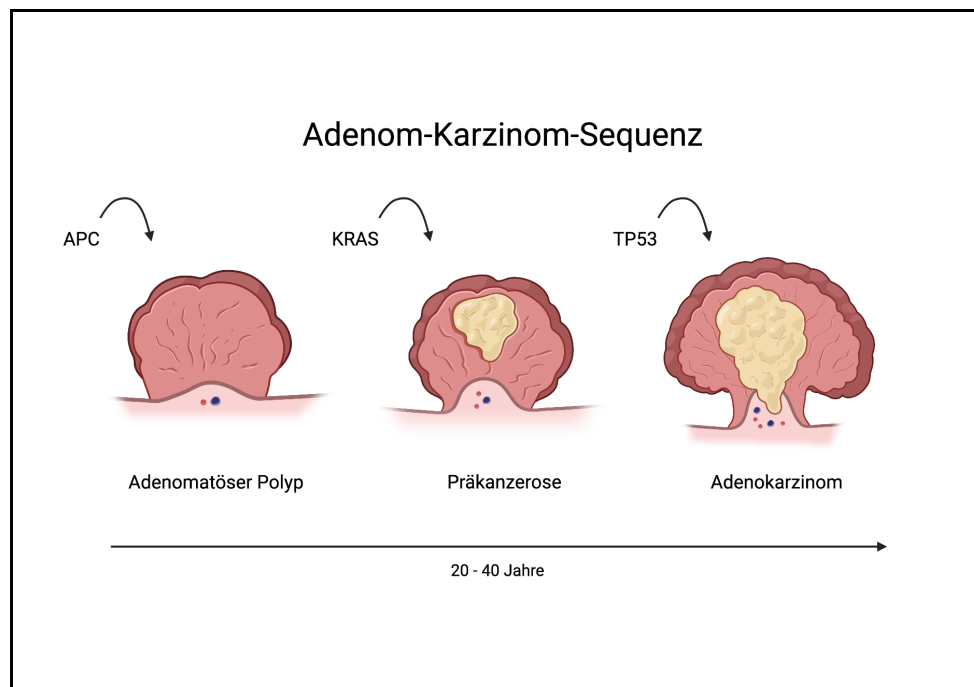
Subscription: Lab
Agreement number: XP2504EEUJ
Journal name: Diplomarbeit Med Uni Graz - Anna Reisinger

To whom this may concern,

This document is to confirm that Samantha Hasenleithner has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

February 10th, 2023
Science Suite Inc.

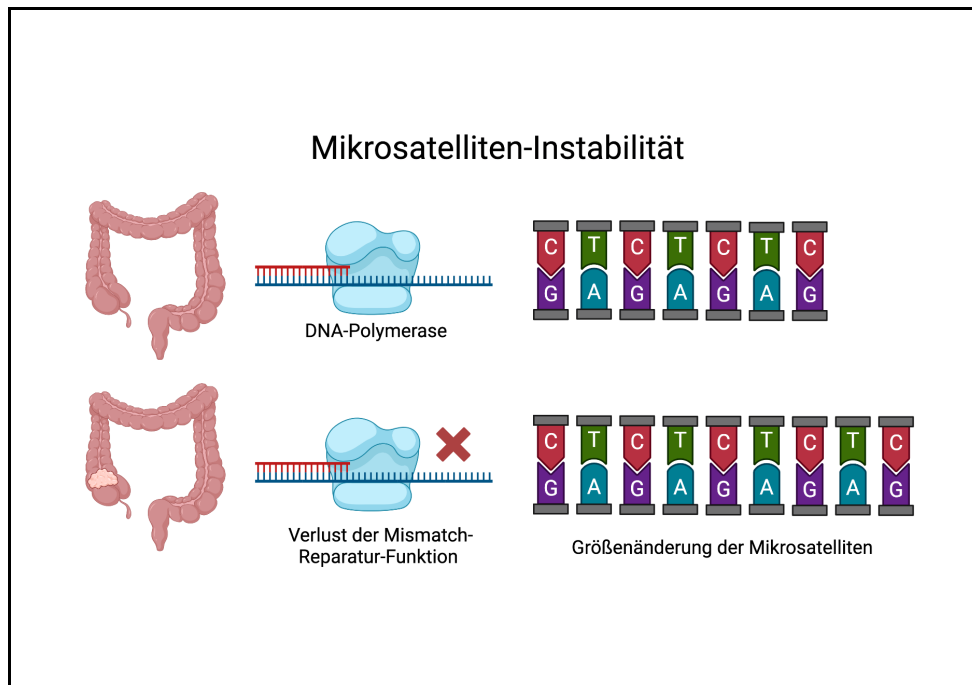
Subscription: Lab
Agreement number: GL24ZTMOH0
Journal name: Diplomarbeit Med Uni Graz - Anna Reisinger

To whom this may concern,

This document is to confirm that Samantha Hasenleithner has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

February 20th, 2023
Science Suite Inc.

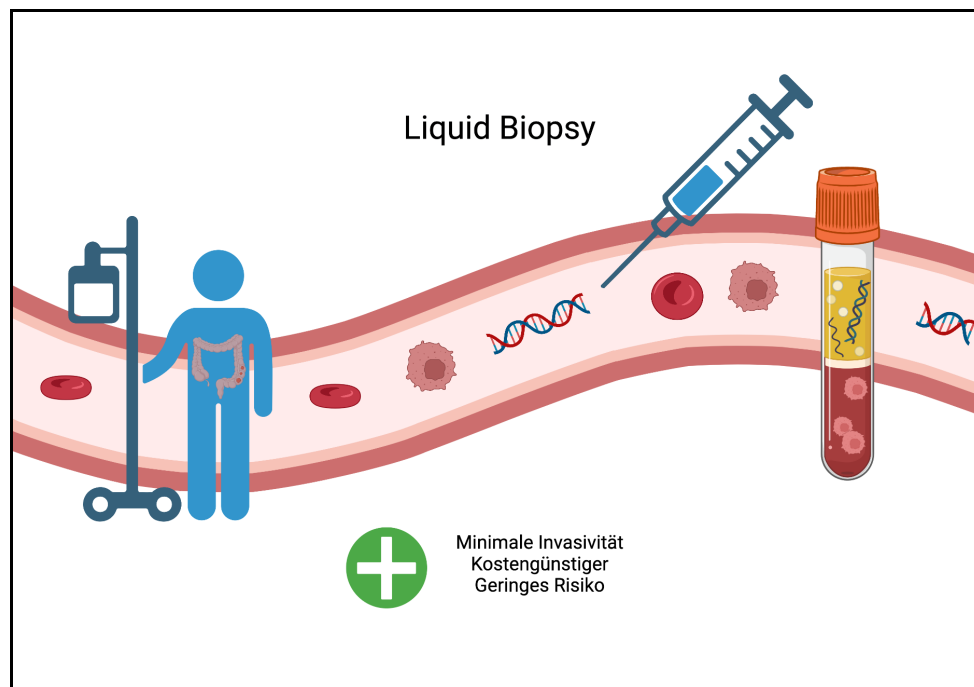
Subscription: Lab
Agreement number: TB25198R2Z
Journal name: Diplomarbeit Med Uni Graz - Anna Reisinger

To whom this may concern,

This document is to confirm that Samantha Hasenleithner has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

February 22nd, 2023
Science Suite Inc.

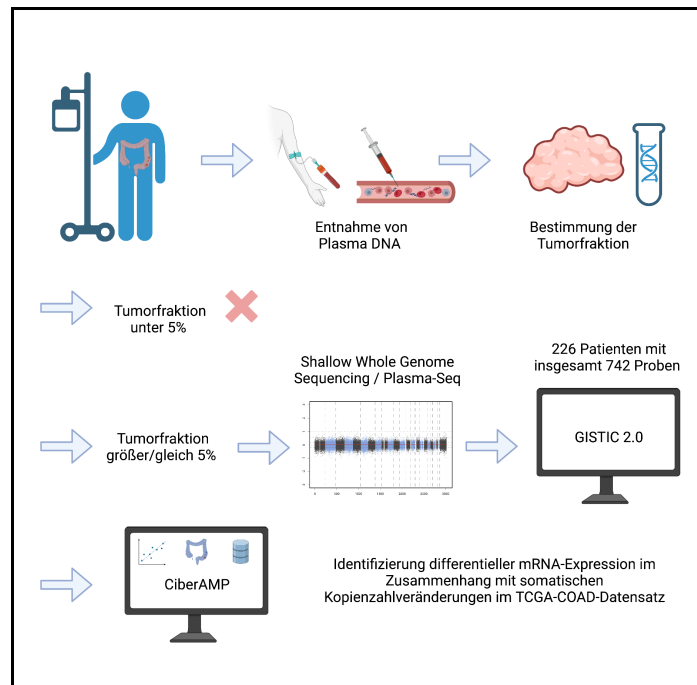
Subscription: Lab
Agreement number: QM251KZ8O4
Journal name: Diplomarbeit Med Uni Graz - Anna Reisinger

To whom this may concern,

This document is to confirm that Samantha Hasenleithner has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

variant present in combination

ERBB2 amplification


Quality Score **7.200640**


Tier I-B

An anti-ERBB2 antibody, in combination with a pan-ERBB inhibitor or another such antibody, and an anti-ERBB2 antibody drug conjugate are recommended for certain patients with ERBB2-amplified and RAS and BRAF wild-type CRC (NCCN). Clinical studies suggest ERBB2-amplified CRC patients may be sensitive to targeted therapies, including anti-ERBB2 antibody-drug conjugates and a HER2/4-1BB bispecific molecule, and less sensitive to anti-EGFR antibodies.

Therapies associated with: **Colorectal cancer**

 **lapatinib + trastuzumab**

 **pertuzumab + trastuzumab**

 **trastuzumab deruxtecan**

variant present in combination

EGFR amplification

Quality Score **7.200640**

Tier I-B

In multiple clinical studies, patients with colorectal cancer harboring EGFR amplification responded to EGFR antibody therapy, with improved overall and progression-free survival. Patients with solid tumors harboring EGFR amplifications match inclusion criteria for clinical trials with HER inhibitors.

no approved therapies

2 combination

FGFR1 amplification, PIK3CA amplification

Tier II-C

In a phase Ib clinical trial, patients with solid tumors harboring PIK3CA mutations with or without FGFR mutations achieved an overall response rate of 9.7% and a disease control rate of 54.8% on combined PI3K and FGFR inhibitor therapy.

no approved therapies

2 combination

FGFR2 amplification, PIK3CA amplification

Tier II-C

In a phase Ib clinical trial, patients with solid tumors harboring PIK3CA mutations with or without FGFR mutations achieved an overall response rate of 9.7% and a disease control rate of 54.8% on combined PI3K and FGFR inhibitor therapy.

no approved therapies

2 combination

FGFR3 amplification, PIK3CA amplification

Tier II-C

In a phase Ib clinical trial, patients with solid tumors harboring PIK3CA mutations with or without FGFR mutations achieved an overall response rate of 9.7% and a disease control rate of 54.8% on combined PI3K and FGFR inhibitor therapy.

no approved therapies

AKT1 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring AKT1 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase II clinical trial with an MTOR inhibitor.

no approved therapies

AKT2 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring AKT2 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase II trial with an MTOR inhibitor.

no approved therapies

AKT3 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with AKT3-mutant solid tumors match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with AKT inhibitors.

no approved therapies

ALK amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring ALK amplification or ALK activating mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials of ALK inhibitors.

no approved therapies

BRAF amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring BRAF amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials of tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

CCND1 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring CCND1 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a CDK4/6 inhibitor.
Patients with solid tumors harboring CCND1 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with CDK4/6 inhibitors.

no approved therapies

CCND3 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring CCND3 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with CDK4/6 inhibitors. In a preclinical study, colorectal cancer cell lines harboring CCND3 amplification demonstrated sensitivity to a CDK4/6 inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination
CCNE1 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring CCNE1 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with CHK1, WEE1 and ATR inhibitors.

no approved therapies

variant present in combination
CD274 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Amplification of the CD274 gene, which encodes PD-L1, is a cause of PD-L1 overexpression in PD-L1-positive cancers.
Patients with PD-L1-positive solid tumors match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with anti-PD-L1 antibodies.

no approved therapies

variant present in combination

CDK4 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring CDK4 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as phase II trials with CDK4/6 inhibitors. In a phase II basket trial including heavily pretreated cancer patients harboring activating CDK4/6 pathway mutations, CDK4/6 inhibitor monotherapy did not meet prespecified endpoints for any solid tumor cohort. A retrospective study suggests targeted therapy regimens including CDK4/6 inhibitors are associated with improved progression-free survival in patients with solid tumors harboring G1-S phase cell cycle alterations, including CDK4 amplification.

no approved therapies

CDK6 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring CDK6 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as phase II trials with CDK4/6 inhibitors. In a phase II basket trial including heavily pretreated cancer patients harboring activating CDK4/6 pathway mutations, CDK4/6 inhibitor monotherapy did not meet prespecified endpoints for any solid tumor cohort. A retrospective study suggests targeted therapy regimens including CDK4/6 inhibitors are associated with improved progression-free survival in patients with solid tumors harboring G1-S phase cell cycle alterations, including CDK6 amplification.

no approved therapies

CSF1R amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring CSF1R mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as phase II trials with a tyrosine kinase inhibitor. Also, anti-CSF1R antibodies and CSF1R inhibitors, alone and in combination with antibodies targeting PD-1, PD-L1, and CTLA4 are under clinical investigation in patients with advanced cancers.

no approved therapies

DDR2 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring DDR2 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials of tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

variant present in combination

ERBB3 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

In a phase I trial, an anti-ERBB3 antibody in combination with an EGFR tyrosine kinase inhibitor or anti-EGFR antibody had modest clinical activity in patients with solid tumors, however ERBB3 expression level did not correlate with response. Two patients with ERBB3-expressing colorectal cancer had a partial response to anti-EGFR and anti-ERBB3 antibody combination therapy. Patients with ERBB3-amplified solid tumors or colorectal cancer match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with an ERBB2 inhibitor and an anti-ERBB3 antibody.

Patients with solid tumors harboring ERBB3 activating mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with an ERBB2 inhibitor and a pan-ERBB inhibitor in combination with a CDK4/6, MTOR, or MEK inhibitor.

no approved therapies

EZH2 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

No therapies are approved or recommended for CRC based on EZH2 mutation status (FDA, EMA, Health Canada, Swissmedic, TGA, NCCN Guidelines for Colorectal Cancer, ESMO, NICE, eviQ). EZH2 amplification was associated with overexpression in several cancers. The prognostic effect of EZH2 overexpression is conflicting in CRC. Patients with solid tumors harboring EZH2 activating mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as phase I and II trials with EZH2 inhibitors. For patients with FL harboring an activating mutation in EZH2, an EZH2 inhibitor is approved and recommended (FDA, NCCN).

No therapies are approved or recommended for colorectal cancer based on EZH2 mutation status (FDA, EMA, Health Canada, Swissmedic, TGA, NCCN Guidelines for Colorectal Cancer, ESMO, NICE, eviQ). Patients with solid tumors harboring EZH2 activating mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as phase I and II trials with EZH2 inhibitors. For patients with FL harboring an activating mutation in EZH2, an EZH2 inhibitor is approved and recommended (FDA, NCCN).

no approved therapies

FANCA amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FANCA amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase I trial with a PARP inhibitor in combination with an anti-PD-1 antibody.

no approved therapies

FANCC amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FANCC amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase I trial with a PARP inhibitor in combination with an anti-PD-1 antibody.

no approved therapies

FANCD2 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FANCD2 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase I trial with a PARP inhibitor in combination with an anti-PD-1 antibody.

no approved therapies

FANCE amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FANCE amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase I trial with a PARP inhibitor in combination with an anti-PD-1 antibody.

no approved therapies

variant present in combination

FGFR1 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FGFR1 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with pan-FGFR and pan-tyrosine kinase inhibitors. In a phase II trial, patients with solid tumors harboring FGFR1 amplification experienced a clinical benefit rate of 41.1% and a six-month progression-free survival rate of 0% on FGFR inhibitor therapy. In a phase I trial, patients with solid tumors harboring genomic alterations of FGFR1/2/3, including amplifications, fusions, and mutations experienced clinical benefit on pan-FGFR inhibitor therapy.

Patients with solid tumors harboring activating FGFR1 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials of pan-FGFR and pan-tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

variant present in combination

FGFR2 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FGFR2 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials for pan-FGFR, FGFR2 and pan-tyrosine kinase inhibitors. In a phase I trial, patients with solid tumors harboring genomic alterations of FGFR1/2/3, including amplifications, fusions, and mutations experienced clinical benefit on pan-FGFR inhibitor therapy. Patients with solid tumors harboring activating FGFR2 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with pan-FGFR inhibitors and pan-tyrosine kinase inhibitors. In a phase II trial, among 12 patients with solid tumors harboring FGFR2 activating mutations, one patient demonstrated a partial response and two patients demonstrated stable disease on FGFR inhibitor therapy. In a phase I trial, patients with solid tumors harboring FGFR 1-4 activating alterations (including amplifications, mutations and translocations) experienced clinical benefit on pan-FGFR inhibitor therapy.

no approved therapies

variant present in combination

FGFR3 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

No therapies are approved or recommended for colorectal cancer based on FGFR3 mutation status (FDA, EMA, Health Canada, Swissmedic, TGA, TFDA, NCCN Guidelines for colorectal cancer, ESMO, NICE, eviQ). Patients with colorectal cancer or solid tumors harboring activating FGFR3 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials of pan-FGFR inhibitors. In a phase II trial, among seven patients with solid tumors harboring FGFR3 activating mutations, one patient demonstrated a partial response and two patients demonstrated stable disease on FGFR inhibitor therapy. In a phase I trial, patients with solid tumors harboring FGFR 1-4 activating alterations (including amplifications, mutations and translocations) experienced clinical benefit on pan-FGFR inhibitor therapy. In a phase I trial, patients with solid tumors harboring genomic alterations of FGFR1/2/3, including amplifications, fusions, and mutations experienced clinical benefit on pan-FGFR inhibitor therapy. A pan-FGFR inhibitor is approved or recommended for certain patients with bladder cancer (urothelial carcinoma) harboring susceptible FGFR2 or FGFR3 alterations (NCCN), which include FGFR2-BICC1 fusion, FGFR2-CASP7 fusion, FGFR3 G370C, FGFR3 R248C, FGFR3 R249C, FGFR3 Y373C, FGFR3-BAIAP2L1 fusion, FGFR3-TACC3 fusion (FDA, Health Canada, TFDA).

Patients with solid tumors harboring FGFR3 amplification match inclusion criteria for clinical trials.

no approved therapies

FGFR4 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FGFR4 amplification match inclusion criteria for clinical trials of pan-FGFR4 inhibitors and pan-tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

FLT3 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with FLT3-amplified solid tumors match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase II trial with a tyrosine kinase inhibitor (TKI). In clinical case studies, two patients with FLT3-amplified colorectal cancers were sensitive to TKIs, however sensitivity of two patient-derived, FLT3-amplified cancer cell lines to these drugs and combinations of TKIs and an MTOR inhibitor was not supported by preclinical evidence.

no approved therapies

variant present in combination

FLT4 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring FLT4 alterations match inclusion criteria for clinical trials with pan-VEGFR inhibitors.

no approved therapies

KDR amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring KDR amplification match inclusion criteria for clinical trials with pan-tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

KIT amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring KIT amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

variant present in combination
KRAS amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with NSCLC harboring KRAS amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with EGFR and RAF inhibitors. In clinical studies, KRAS-amplified colorectal cancer patients were resistant to the monoclonal anti-EGFR antibodies

no approved therapies

MAP2K1 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring activating MAPK pathway alterations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with MEK, ERK, and RAF inhibitors.

no approved therapies

MAPK1 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Patients with solid tumors harboring MAPK1 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with ERK1/2 inhibitors.

no approved therapies

variant present in combination
MDM2 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Activating MDM2 mutations reduce stability of the TP53 tumor suppressor. Small molecule MDM2 and MDM2/MDM4 inhibitors are under clinical investigation in patients with advanced cancers. In a phase I trial, out of 16 patients with TP53 wild-type, MDM2 amplified solid tumors other than liposarcoma, glioblastoma, and breast cancer, ten had stable disease and one achieved partial response on an MDM2 inhibitor. In a clinical study, patients with MDM2-amplified solid tumors had hyperprogression on anti-PD-1 or anti-PD-L1 monotherapy. Patients with solid tumors harboring MDM2 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with an MDM2/MDM4 inhibitor.

no approved therapies

MDM4 amplification Quality Score **7.200640** Tier II-C
Activating MDM4 mutations reduce activity of the TP53 tumor suppressor. Small molecule MDM2/MDM4 inhibitors are under clinical investigation in patients with advanced cancers. Patients with solid tumors harboring MDM4 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a phase I clinical trial with an MDM2/MDM4 inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination

MET amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

No therapies are approved or recommended for CRC based on MET mutation status (FDA, EMA, Health Canada, Swissmedic, TGA, NCCN Guidelines for Colon and Rectal Cancer, ESMO, NICE, eviQ). Patients with CRC harboring MET amplification and wild-type KRAS match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with a MET inhibitor and an anti-EGFR monoclonal antibody or with anti-MET monoclonal antibodies. MET amplification was associated with resistance to a monoclonal anti-EGFR antibody in two CRC patients and in PDX models and sensitivity to an investigational MET inhibitor in PDX models. Three RAS- and BRAF-wild type CRC patients harboring MET amplification had a partial response to an anti-EGFR monoclonal antibody. The NCCN recommends one dual ALK/MET inhibitor as a treatment option for certain patients with non-small cell lung cancer harboring high-level MET amplification.

no approved therapies

MTOR amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring MTOR amplification match inclusion criteria for a clinical trial with an MTOR inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination

MYC amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring MYC amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with ATR and CHK1 inhibitors. In a retrospective study, a patient with colorectal cancer harboring MYC amplification experienced progressive disease on AURKA inhibitor therapy. A preclinical study suggests MYC amplification is associated with sensitivity to a PI3K/HDAC inhibitor in a colorectal cancer patient-derived xenograft model.

no approved therapies

MYCN amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring MYCN amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with BET inhibitors.

no approved therapies

NOTCH1 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with colorectal cancer harboring NOTCH1 amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a NOTCH inhibitor
Patients with colorectal cancer harboring activating NOTCH1 mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a NOTCH inhibitor

no approved therapies

NOTCH2 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring NOTCH2 amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a NOTCH inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination

NRAS amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with NRAS-mutant solid tumors match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with inhibitors of RAF, ERK, and MEK, alone or in combination with HDM2, PI3K, and PI3K/MTOR inhibitors.

no approved therapies

NTRK1 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring NTRK gene amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a TRK/ROS1/ALK inhibitor. In a retrospective analysis, one patient with unspecified tumor type harboring NTRK1 amplification achieved a partial response lasting 3.7 months on TRK inhibitor therapy.

no approved therapies

NTRK3 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring NTRK gene amplification match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a TRK/ROS1/ALK inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination

PDCD1LG2 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Preclinical studies suggest PDCD1LG2 amplifications correlate with PD-L2 overexpression, and patients with PD-L2-positive cancers may benefit from anti-PD-L1 and anti-PD-1 immunotherapy.

no approved therapies

PDGFRA amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with advanced cancer harboring PDGFRA amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

PDGFRB amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

No therapies are approved or recommended for colorectal cancer based on PDGFRB mutation status (FDA, EMA, Health Canada, Swissmedic, TGA, TFDA, NCCN Guidelines for Colon and Rectal Cancers, ESMO, NICE, eviQ). Patients with solid tumors harboring activating mutations in PDGFRB match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with tyrosine kinase inhibitors.

For patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms PDGFRB activating mutations, imatinib is approved (Swissmedic).

Patients with solid tumors harboring PDGFRB amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as a trial with a tyrosine kinase inhibitor.

no approved therapies

variant present in combination

PIK3CA amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring PIK3CA amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with CDK4/6 inhibitors, AKT inhibitors, and PI3K/MTOR inhibitors.

Patients with solid tumors harboring activating PIK3CA mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with AKT inhibitors. In retrospective analyses, treatment with an EGFR inhibitor showed clinical benefit in KRAS/BRAF-wild type colorectal carcinoma patients harboring a PIK3CA mutation.

no approved therapies

PIK3CB amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring PIK3CB amplifications match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with PI3Kbeta inhibitors.

no approved therapies

RAF1 amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring MAP kinase pathway alterations, such as RAF1 activating mutations, match inclusion criteria for clinical trials, including a trial with a pan-RAF inhibitor.

no approved therapies

RET amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring RET amplifications match inclusion criteria for clinical trials with tyrosine kinase inhibitors.

no approved therapies

SMO amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring activating SMO mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as phase II clinical trials with a Hedgehog antagonist and a SMO antagonist.

no approved therapies

SRC amplification

Quality Score **7.200640**

Tier II-C

Patients with solid tumors harboring SRC mutations match inclusion criteria for clinical trials, such as trials with SRC inhibitors.

no approved therapies

2 combination

CD274 amplification, PDCD1LG2 amplification

Tier II-D

A clinical case study supports sensitivity of colon adenocarcinoma cells harboring CD274 and PDCD1LG2 amplification to a PD-1 inhibitor.

no approved therapies

CDK12 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-D

Activating CDK12 mutations are predicted to promote cancer cell survival. CDK inhibitors that act on CDK12 are under clinical investigation, alone and in combination with PARP inhibitors and chemotherapies.

no approved therapies

CREBBP amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-D

Inhibitors of CREBBP and its paralog EP300 are under preclinical investigation. These drugs may block the interactions of these coactivators with transcription factors or inhibit aberrant acetyltransferase activity.

no approved therapies

CTNNB1 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-D

CTNNB1 amplification likely results in increased β -catenin expression and β -catenin-dependent transcription. Activating mutations in CTNNB1 result in increased β -catenin-dependent transcription. Small molecule WNT/ β -catenin inhibitors are under clinical investigation in patients with solid tumors, including β -catenin/TCF interaction inhibitors or downstream transcriptional coactivator antagonists. A preclinical study suggests colon cancer cells with high nuclear β -catenin expression levels may be resistant to an AKT inhibitor alone and sensitive in combination with a PARP inhibitor.

no approved therapies

EP300 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-D

Inhibitors of EP300 and its paralog CREBBP are under preclinical investigation. These drugs may block the interactions of these coactivators with transcription factors or inhibit aberrant acetyltransferase activity.

no approved therapies


variant present in combination

JAK2 amplificationQuality Score **7.200640**

Tier II-D

In a preclinical study, ruxolitinib in combination with PI3K and PI3K/MTOR inhibitors synergistically inhibited growth of transformed cell lines over expressing wild-type JAK2 in cell culture.

no approved therapies

Clinical trials from  **MolecularMatch**Selected trials recruiting: **all sexes, all ages** within **Austria** Variants matched **0**. Genes matched **0**.

No clinical trials

End of findings section
