

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Dr. h.c. Christian Mawrin)

**Molekulare Charakterisierung
von Hirnmetastasen als Erstmanifestation beim Lungenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinische Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Benjamin Hanke
aus Magdeburg
Magdeburg 2021

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Hanke, Benjamin

Molekulare Charakterisierung von Hirnmetastasen als Erstmanifestation beim Lungenkarzinom

2021 – 71 Blatt – 24 Abbildungen – 16 Tabellen

Kurzreferat:

Tumoren der Lunge gehören zu den häufigsten Todesursachen und nehmen unter den Krebstodesfällen in Deutschland Platz 1 (Männer) bzw. Platz 2 (Frauen) ein. Zusätzlich zur primären Tumorerkrankung treten häufig Metastasen auf. Diese können gleichzeitig mit der Diagnose des Primärtumors (synchron) oder im Verlauf der Erkrankung (metachron) auftreten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Metastasen eines Lungenkarzinoms im zentralen Nervensystem (ZNS), die erstmals über eine neurologische Symptomatik auffällig wurden. Zum Zeitpunkt der Resektion war also noch kein Primärtumor bekannt. Über dieses Patientenkollektiv lagen bisher nur spärlich molekulare Daten zu Metastasen im zentralen Nervensystem vor.

Es wurden 33 Patienten in dieser Studie untersucht (23 Männer, 10 Frauen). Das Tumormaterial wurde konventionell-histologisch sowie molekularpathologisch untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse klinischer sowie radiologischer Patienteninformationen.

Histologisch fanden sich überwiegend Adenokarzinome (73%), die übrigen Metastasen stammten von kleinzelligen Lungenkarzinomen (27%). 27 Metastasen lagen supratentoriell (82%) und 6 Metastasen (18%) infratentoriell. Bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten fanden sich singuläre Metastasen (85%), ansonsten lagen multiple Hirnmetastasen vor (15%).

Auf molekularer Ebene fanden sich in 16% der untersuchten Proben der Metastasen *KRAS*-Mutationen, 9% der Tumoren wiesen *EGFR*-Mutationen auf. Es wurden 5 *FGFR1*-Amplifikationen gefunden (16%), diese waren signifikant mit einem erhöhten Metastasenvolumen vergesellschaftet. Darüber hinaus fanden sich 8 *MET*-Amplifikationen (27%). Translokationen von *EML4/ALK*, *ROS1* bzw. *RET* wurden nicht beobachtet.

Die vorliegende Arbeit erweitert das Verständnis molekularer Veränderungen bei Patienten mit ZNS-Metastasen als Erstmanifestation eines Lungenkarzinomes.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	AUSGANGSSITUATION	7
1.2	EPIDEMIOLOGIE	7
1.3	METASTASIERUNG	8
1.4	HISTOLOGISCHE SUBTYPEN DES LUNGENKARZINOMES	9
1.5	MOLEKULARE MECHANISMEN DER ZNS-METASTASIERUNG BEIM LUNGENKARZINOM	10
1.6	PROGNOSE	11
1.7	AKTUELLE THERAPIERELEVANTE MOLEKULARE ZIELSTRUKTUREN	11
1.8	THERAPIE VON ZNS-METASTASEN BEIM LUNGENKARZINOM	13
1.9	AUSSICHT	14
1.10	ZIELSETZUNG	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	ETHIKVOTUM	16
2.2	REKRUTIERUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	16
2.3	DATENERHEBUNG	17
2.4	PROBENVERSAND UND -AUFBEREITUNG	18
2.5	FÄRBUNGEN	18
2.6	HISTOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	18
2.7	TISSUE-MICROARRAY	19
2.8	MOLEKULARE METHODEN	19
2.8.1	Probenvorbereitung	19
2.8.2	Entparaffinierung	19
2.8.3	DNA-Extraktion	19
2.8.4	PCR	20
2.8.5	Sequenzierung	20
2.9	FISH	21
2.10	NEURORADIOLOGIE	23
2.11	GESAMTÜBERLEBEN	24
2.12	STATISTISCHE ANALYSE	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV	25
3.2	ÜBERLEBEN	26
3.3	RAUCHERSTATUS	27
3.4	VORLIEGEN VON HIRNDRUCKZEICHEN	27
3.5	METASTASENVOLUMEN	28
3.6	METASTASENANZAHL	29
3.7	METASTASENLOKALISATION	30
3.8	HISTOLOGIE DER METASTASEN	31
3.9	MOLEKULARPATHOLOGIE (SEQUENZIERUNG)	34
3.9.1	EGFR	34
3.9.2	KRAS	35
3.10	MOLEKULARPATHOLOGIE (FISH)	36
3.10.1	c-MET	36
3.10.2	FGFR1	39
3.10.3	ALK	42
3.10.4	ROS1	42
3.10.5	RET	42

4	DISKUSSION	43
4.1	ERGEBNISDISKUSSION	43
4.2	METHODENDISKUSSION	47
4.2.1	Kohortengröße	47
4.2.2	Fehlende oder unvollständige Falldaten	48
4.2.3	Fehlende Korrelationen zwischen Primärtumor und Hirnmetastase	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	51
7	DANKSAGUNGEN	57
8	EHRENERKLÄRUNG	58
9	DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES	59
10	ANHANG	60
10.1	LISTE DER VERWENDETEN LABORGERÄTE	60
10.2	LISTE DER VERWENDETEN LABORKITS, REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	60
10.3	PROTOKOLL HE-FÄRBUNG	61
10.4	PROTOKOLL EVG-FÄRBUNG	61
10.4.1	Herstellung des Resorcin-Fuchsin	61
10.4.2	Herstellung des Van-Gieson-Gemischs	62
10.4.3	Weigerts Eisenhämatoxylin	62
10.5	PROTOKOLL PAS-FÄRBUNG	62
10.5.1	Zusammensetzung der Periodsäure-Lösung	62
10.5.2	Zusammensetzung des SO ₂ -Gemischs	63
10.5.3	n-HCl	63
10.6	PROTOKOLL IHC-FÄRBUNG	63
10.6.1	Programmierung des Immunfärbeautomaten	63
10.6.2	Vorbehandlung der IHC-Präparate	65
10.7	LISTE DER VERWENDETEN PRIMER	65
10.8	HERSTELLUNG DER FISH-PRÄPARATE	65
10.8.1	Vorbereitung	65
10.8.2	Tag 1	66
10.8.3	Tag 2	66
10.8.4	FISH-Protokoll VP2000 Tag 1	67
10.8.5	FISH-Protokoll VP2000 Tag 2	67
10.9	PRÄPARATION DER DNA	68
10.10	PCR-ANSATZ	69
10.11	ZUSAMMENSETZUNG DER PRIMERMISCHUNG	70
10.12	REINIGUNG DES PCR-PRODUKTES	70
10.13	HERSTELLUNG DES ACRYLAMID-GELS	71

Abkürzungsverzeichnis

CA-125	Cancer-Antigen 125
CEA	Carcinoembryonales Antigen
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
EVG	Elastika-van-Gieson-Färbung
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HR	Hazard ratio
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KI	Konfidenzintervall
MET	Tyrosine-protein kinase Met
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PCR	Polymerase chain reaction
RPM	Rotationen pro Minute
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SD	Standardabweichung
TMA	Tissue Microarray
TTF-1	Thyroid transcription factor 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1	BEISPIELHISTOLOGIEN VON LUNGENKARZINOM-ZNS-METASTASEN	9
ABBILDUNG 2:	SCHÄDEL-MRT-AUFNAHMEN DES PATIENTEN MIT DER FALLNUMMER 11	23
ABBILDUNG 3:	GESCHLECHTERVERTEILUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	25
ABBILDUNG 4:	ALTERSVERTEILUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	25
ABBILDUNG 5:	VERTEILUNG DER GESAMTÜBERLEBENSZEITEN ALLER PATIENTEN	26
ABBILDUNG 6:	KAPLAN-MEIER-KURVE DES GESAMTÜBERLEBENS	27
ABBILDUNG 7:	VERTEILUNG DER METASTASENVOLUMINA	28
ABBILDUNG 8:	ÜBERLEBEN IN ZUSAMMENHANG MIT DEM METASTASENVOLUMEN	28
ABBILDUNG 9:	VERTEILUNG DER METASTASENANZAHL	29
ABBILDUNG 10:	ÜBERLEBEN IN ZUSAMMENHANG MIT DER METASTASENLOKALISATION	30
ABBILDUNG 11	HISTOLOGIE EINER METASTASE EINES KLEINZELLIGEN LUNGENKARZINOMS	31
ABBILDUNG 12:	HISTOLOGISCHE SUBTYPEN IM STUDIENKOLLEKTIV	32
ABBILDUNG 13:	HISTOLOGIE EINER METASTASE EINES ADENOKARZINOMS	32
ABBILDUNG 14:	ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM HISTOLOGISCHEN TYP	33
ABBILDUNG 15:	VERTEILUNG DER EGFR-MUTATIONEN AUF DIE HISTOLOGISCHEN SUBTYPEN	34
ABBILDUNG 16:	SANGER-SEQUENZ VON KRAS-EXON 2	35
ABBILDUNG 17:	VERTEILUNG DER KRAS-MUTATIONEN AUF DIE HISTOLOGISCHEN SUBTYPEN	36
ABBILDUNG 18:	<i>c-MET</i> -FISH	37
ABBILDUNG 19:	<i>MET</i> -AMPLIFIKATIONSSTATUS IN RELATION ZUM GESCHLECHT	38
ABBILDUNG 20:	KAPLAN-MEIER-DIAGRAMM IN BEZUG AUF DEN <i>c-MET</i> -AMPLIFIKATIONSSTATUS	38
ABBILDUNG 21:	VERTEILUNG DER <i>FGFR1</i> -AMPLIFIKATIONEN AUF DIE HISTOLOGISCHEN SUBTYPEN	39
ABBILDUNG 22:	KAPLAN-MEIER-KURVE IN BEZUG AUF DEN <i>FGFR1</i> -AMPLIFIKATIONSSTATUS	40
ABBILDUNG 23:	METASTASENVOLUMEN IN BEZUG ZUM <i>FGFR1</i> -AMPLIFIKATIONSSTATUS	41
ABBILDUNG 24	<i>ROS1</i> -FISH-FOTOGRAFIE OHNE NACHWEIS EINER TRANSLOKATION	42

HINWEIS

IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT WIRD ZUR BESSEREN LESBARKEIT DAS GENERISCHE MASKULINUM VERWENDET, ABWEICHUNGEN SIND GGF. EXPLIZIT ERWÄHNT.

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Tumoren der Lunge gehören zu den häufigsten Todesursachen und nehmen unter den Krebstodesfällen in Deutschland Platz 1 (Männer) bzw. Platz 2 (Frauen) ein [28]. Die aktuelle Inzidenz liegt bei 87,9 (Männer) bzw. 45,7 (Frauen) Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr [7]. Eine häufige und schwere Komplikation einer Lungenkarzinom-Erkrankung ist die Metastasierung in das zentrale Nervensystem. Bei 10 - 20% der Patienten liegt bereits bei Erstdiagnose eine Metastasierung vor und 22 – 64 % entwickeln im Laufe der Erkrankung Hirnmetastasen [4, 19, 23]. Effektive Therapiestrategien zur Behandlung dieser Patientenpopulation sind bisher nur unzureichend etabliert. Die Kenntnis der molekularen Alterationen dieser Metastasen ist daher essentiell für Prognose und Therapie, zumal gegebenenfalls spezifische Therapiestrategien, die bei systemischer Tumorerkrankung erfolgreich sind (Tyrosinkinase-Inhibitoren, Checkpoint-Inhibitoren u.a.) zur Verfügung stehen.

1.2 Epidemiologie

Lungenkarzinome sind in Deutschland bei Männern die zweithäufigsten und bei Frauen die dritthäufigsten Malignome. Insgesamt erkranken in der Bundesrepublik pro Jahr etwa 53.500 Menschen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68,3 (Männer) bzw. 69,3 Jahren (Frauen) [7]. Wie in anderen Ländern der westlichen Welt auch gab es in den letzten Jahrzehnten einen gegenläufigen Trend: Während die Inzidenz bei Männern langsam sinkt, steigt sie bei den Frauen weiter an. Wegen der überragenden Bedeutung des Tabakrauchens für die Onkogenese (90% der Karzinome treten bei Rauchern auf) wird die weitere Entwicklung der Inzidenzrate maßgeblich vom rauchenden Anteil der Bevölkerung abhängen [7].

1.3 Metastasierung

Zusätzlich zur primären Tumorerkrankung treten häufig Metastasen auf. Hier sind dominierend das Gehirn (22-64%), gefolgt von Skelett (30-40%), Nebennierenrinde (8%) und Leber (6%) zu nennen [19, 23, 48, 50, 59]. 50% der Hirnmetastasen stammen von primären Lungenkarzinomen, die übrigen 50% verteilen sich auf Mammakarzinome, maligne Melanome, Nierenzelltumoren und andere Entitäten. Risikofaktoren für die Metastasierung im Vergleich zu nicht-metastasierten Lungenkarzinomen sind weibliches Geschlecht, ein Alter von 60 Jahren oder höher, ein Stadium T3/T4 bzw. N3, eine erhöhte Serum-Laktatdehydrogenase sowie erhöhte Tumormarker (CEA, NSE, CA-125) [23]. Die Metastasen können gleichzeitig mit der Diagnose des Primärtumors (synchron) oder im Verlauf der Erkrankung (metachron) auftreten. Synchroner Metastasen findet man bei etwa 10-20% der Krankheitsfälle, metachrone bei etwa 25-40% [4, 60]. Die mediane Zeit zwischen Erstdiagnose und Metastasierung liegt bei 8,5 - 27 Monaten. Typische Symptome einer zerebralen Metastasierung sind Hirndruckzeichen, Kopfschmerzen, epileptische Anfälle oder andere neurologische Symptome wie Hemiparese, Aphasie, Ataxie, Stehstörungen oder eine Hirnstammsymptomatik [19].

1.4 Histologische Subtypen des Lungenkarzinomes

Folgende histologische Tumor-Subgruppen werden unterschieden: Zunächst ist eine Entscheidung bzgl. des Vorliegens eines kleinzelligen (*small cell lung cancer / SCLC*) oder nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non-small cell lung cancer / NSCLC*) zu treffen - je nachdem, ob der Tumor von Plattenepithelien oder Drüsenzellen (NSCLC) oder dem neuroendokrinen System ausgeht (SCLC). Die NSCLC-Fälle werden dementsprechend aufgeteilt in Adeno-, Plattenepithel- bzw. großzellige Karzinome. Es existieren darüber hinaus noch weitere Subtypen wie mukoepidermoide, adenoidzystische oder epithelial-myoeptitheliale Karzinome, die aber selten sind [22].

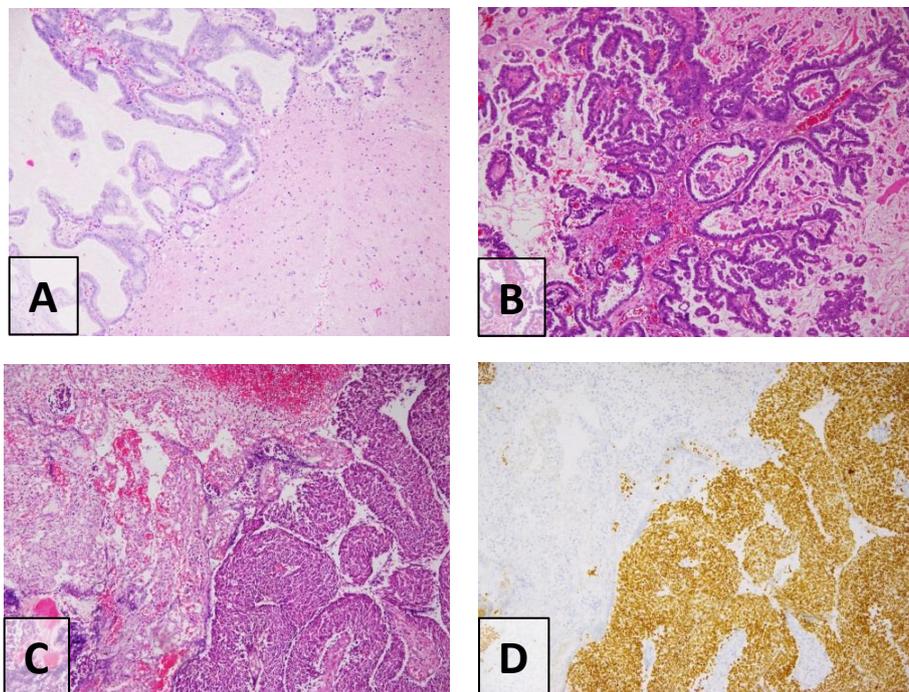


Abbildung 1 Beispielhistologien von Lungenkarzinom-ZNS-Metastasen

A + B Invasionsfront (**A**) und Tumorzentrum (**B**) einer zerebralen Adenokarzinom- Metastase (jeweils HE, 100x). Man beachte das Vorliegen glandulärer Strukturen sowie die deutliche Infiltration des angrenzenden nichtneoplastischen, reaktiv veränderten ZNS-Gewebes. **C** Zerebrale Metastase eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (HE, 100x). Im Gegensatz zur Adenokarzinom-Metastase fehlen hier glanduläre Strukturen. **D** Kräftige Immunreaktion bzgl. TTF-1 (100x).

1.5 Molekulare Mechanismen der ZNS-Metastasierung beim Lungenkarzinom

Wesentliche Schritte der Metastasierung sind Invasion/Migration, Intravasation, Zirkulation und schließlich Extravasation bzw. Kolonisation [56]. Hirnmetastasen entstehen hämatogen, eine lymphogene Metastasierung wird mangels zuführender Lymphgefäße nicht beobachtet [45]. Wahrscheinlich erreichen die Tumorzellen das Gehirn über den arteriellen Blutstrom. Prädilektionsstellen für die Penetration der Gefäßwand sind hierbei Gefäßaufzweigungen, was am ehesten an der hier lokal fehlenden Scherung an diesen Wandabschnitten liegt [27]. Maßgeblich für die Metastasierung von Lungenkarzinomen scheinen Brain Metastasis Initiating Cells (BMICs) zu sein. Es handelt sich hier um eine stammzellähnliche Zellpopulation, die aus Lungenkarzinom-Hirnmetastasen gewonnen werden konnte. Durch in-vivo und in-vitro RNA-Interferenz konnten die für BMICs wesentlichen Regulatorproteine SPOCK1 und TWIST2 identifiziert werden. So entwickelten in einem Mausmodell nur diejenigen Tiere Metastasen, in deren Primärtumoren SPOCK1 überexprimiert war. Das Protein hat Funktionen bei der Selbsterneuerung der BMICs, der Tumorentstehung und der Metastasierung von der Lunge ins ZNS. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen scheint hier aber noch fraglich. Dennoch handelt es sich hier um ein präklinisches Modell der Lungenkarzinom-Metastasierung, das potentielle BMIC-Regulatoren als Zielstrukturen für Therapeutika aufzeigen könnte [57]. Im Gegensatz zu Primärtumoren, in denen vor allem Mutationen der Zelladhäsions- und Motilitätsgene gefunden werden, zeigen Metastasen verstärkt Alterationen zytoprotektiver Gene als Anpassung an das stressreiche Milieu im Metastasierungsgebiet. Zu nennen sind hier beispielsweise *Keap-1*, *Nrf2* und *P300*, Elemente des Keap1-Nrf2-ARE-Signalwegs [2].

1.6 Prognose

Die Prognose der Patienten ist auch im 21. Jahrhundert immer noch schlecht. Viele Erkrankungen werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, was die Behandlung erschwert und die Prognose verschlechtert. Für Lungenkarzinompatienten werden 5-Jahres-Überlebensraten von 21% (Frauen) bzw. 16% (Männer) angegeben [7]. Liegen bereits Metastasen vor bzw. werden im Krankheitsverlauf solche diagnostiziert, verschlechtert sich die Prognose nochmals deutlich mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10% und einem mittlerem Überleben von 6 – 12 Monaten [1, 6, 19, 28]. Maßgeblich für die individuelle Prognose ist das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten, der histologische Typ des Karzinoms, der Zeitpunkt der Erstdiagnose, die allgemeine Krankheitsaktivität sowie das Ausmaß der intra- und extrakraniellen Metastasierung [13]. Ob Patienten mit metastasiertem Lungenkarzinom üblicherweise eine ZNS-Symptomatik zeigen, ist umstritten. Gezeigt wurde aber schon, dass bis zu 63% der Metastasenpatienten asymptomatisch sein können, was wiederum für den Nutzen einer routinemäßigen Bildgebung spricht [4, 32].

1.7 Aktuelle therapierelevante molekulare Zielstrukturen

Die aktuelle S3-Leitlinie empfiehlt über die übliche histochemische Untersuchung hinaus die Untersuchung bzgl. *EGFR*, *EML4/ALK*, *ROS1*, *BRAF* und PD-L1 [28]. Die erstgenannten vier Marker werden molekularpathologisch durch Sequenzierung bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Der PD-L1-Score wird immunhistochemisch bestimmt [15]. Es stehen jedoch inzwischen auch Untersuchungen mit Antikörpern gegen EGFR, ALK und ROS1 zur Verfügung [15]. Diese haben sich als gleichwertig zur FISH-Untersuchung gezeigt [17, 33].

Am häufigsten bei Primärtumoren sind *K-RAS*-Mutationen mit einer Häufigkeit von 30-32%. Das zur *RAS*-Genfamilie gehörende Gen kodiert für ein kleines G-Protein, und seine Mutation führt zur Aktivierung onkogener Signalwege [16].

EML4-ALK-Translokationen findet man in weniger als 5% der Primärtumoren, wobei aber eine hohe Konkordanz von über 90% zwischen Primum und Metastase besteht [9, 24]. Fast die Hälfte der Patienten mit *EML4-ALK*-Translokationen zeigen 4 oder mehr Metastasen. Interessanterweise ist der Allgemeinzustand dieser Patienten bei Diagnosestellung aber auffallend gut. Die Kohorte der angesprochenen Studie bestand allerdings aus jungen Patienten, zahlreichen Nichtrauchern und zeigte insgesamt viele kleine bzw. asymptomatische Metastasen, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden sollte. Zudem ist eine ALK-spezifische TKI-Therapie vor Auftreten der Hirnmetastasen mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben im Vergleich mit einer Therapie nach Diagnose der Metastasen vergesellschaftet [24].

Der *EGF*-Rezeptor ist eine der am besten untersuchten Proteinkinasen. Als Mitglied der *ErbB*-Familie, zusammen mit *HER-2*, *HER-3* und *HER-4*, ist der Rezeptor an Zellproliferation und –differenzierung, sowie am Zellüberleben beteiligt [3]. Aktivierende *EGFR*-Mutationen werden in 10-40% der Lungenherde, aber in 40-61% der Metastasen gefunden [9, 34, 47]. Für die Konkordanz zwischen Primum und Metastase werden Werte zwischen 68% und 100% angegeben [9, 34]. Am häufigsten werden Punktmutationen (v.a. L858R und T790M) und Deletionen (z.B. p.E746_a750delELREA oder p.L747_T751delLREAT) beobachtet [5, 30]. Interessant ist hier auch, dass sich in TKI-behandelten Patienten vermehrt T790M-Mutationen finden lassen, die zu einer TKI-Resistenz führen. Während in TKI-naiven Patienten nur 0,47% der Tumoren die T790M-Mutation zeigen, liegt die Quote bei TKI-behandelten Patienten mit 51,9% deutlich höher [38].

Rezeptorthyrosinkinasen aus der Familie der FGFRs werden durch verschiedene FGF-Liganden aktiviert, was zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von ERK- und anderen Signalwegen führt. Spielt der Signalweg physiologischerweise bei Embryogenese, Stoffwechsel-Homöostase und Angiogenese eine Rolle, führen Mutationen zu Tumorgenese und –transformation sowie zu einem Tumorprogress [62]. Für *FGFR1*-Amplifikationen werden Werte von 3% (Primärtumoren) bzw. 15% (Metastasen) angegeben [9], was auf eine geringe Konkordanz bzw. möglicherweise auch eine Beteiligung des *FGFR1*-Gens an der Metastasierung schließen lässt.

Das auf Chromosom 7 liegende *MET*-Gen kodiert für eine Rezeptorthyrosinkinase, die am PIK3-, Ras-Rac/Rho-, MAP-K- und Phospholipase-C-Signalweg beteiligt ist [8]. *C-MET* Genamplifikationen wurden in 21,6% der Metastasen nachgewiesen, C-MET-Proteinexpression in 44,4%. Zudem bestand eine hohe Korrelation zwischen der Genamplifikation und der Proteinexpression. Allerdings korrelierten beide Parameter nicht mit dem Gesamtüberleben [46].

BRAF-Mutationen treten in 2-7 % der Fälle auf. Mutationen von *Her2/MEK* (0,9-2%), *RET1* (0,9 – 1%) bzw. *ROS1* (Primum 1,8%, Metastasen 1,3%) zählen zu den selteneren Genalterationen beim Lungenkarzinom [9, 13, 26].

Beachtet werden sollte, dass bei Hirnmetastasen generell (also verschiedene Primärtumoren eingeschlossen) in 53% der Fälle genetische Alterationen in den Metastasen nachgewiesen werden können, die im Primärtumor so nicht aufgetreten waren. Ursachen hierfür sind der Selektionsdruck der systemischen TKI-Therapie, eine zusätzliche Tumorevolution der Hirnmetastasen, eine für den gewählten Marker unrepräsentative Biopsie des Primärtumors oder eine fehlende klonale Korrelation zwischen Primärtumor und Metastase. Da über 50% der Metastasenpatienten am zerebralen Progress versterben, hat die Thematik hohe klinische Relevanz, und für eine zielgerichtete molekulare Therapie muss stets der Genotyp der Metastase bestimmt werden [10].

1.8 Therapie von ZNS-Metastasen beim Lungenkarzinom

Beim Auftreten von Hirnmetastasen liegt immer ein UICC-Stadium IV vor, sodass ein palliativer Therapieansatz gewählt wird. Grundsätzlich stehen zur Therapie von Hirnmetastasen operative, strahlentherapeutische sowie medikamentöse Optionen zur Wahl. Sowohl konventionelle Chemotherapie (Cisplatin, Carboplatin), Tyrosinkinase-Inhibitoren (Erlotinib, Gefitinib) als auch Checkpoint-Inhibitoren (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab) kommen zur Anwendung. Trotz neuer Therapeutika kommt die Mehrheit der neu diagnostizierten NSCLC-Fälle nicht für eine Immuntherapie in Frage, sodass insgesamt nur 15-20% der Patienten von dieser Methode profitieren [35]. Eine systemische Behandlung mit ZNS-gängigen Medikamenten eignet sich v.a. für Patienten mit keiner oder nur geringer ZNS-Symptomatik. Entscheidend für die Wahl des Therapieregimes ist letztlich neben dem Patientenwunsch die Metastasenanzahl und –lokalisierung sowie der Allgemeinzustand des Patienten [19].

Nach aktueller S3-Leitlinie kann den Patienten mit isolierter Metastase eine stereotaktische Präzisionsstrahlentherapie oder eine Operation mit anschließender Tumorbett-Nachbestrahlung angeboten werden. Das operative Vorgehen eignet sich hierbei vor allem für größere (> 3 cm) oder hirnstammkomprimierende Tumoren. Darüber hinaus kann bei Zweifeln an der Einordnung als Metastase so auch eine histologische Kontrolle erfolgen, was bei der Strahlentherapie nicht möglich ist. Im Gegensatz zur gezielten Bestrahlung der Raumforderung ist auch eine Ganzhirnbestrahlung (*whole brain radiotherapy WBRT*) möglich. Bei multiplen Herden ist sie die Therapie der Wahl; eine alleinige Behandlung via WBRT bei 4 oder weniger Metastasen sollte aber vermieden werden [19, 28]. Die z.T. recht ausgeprägten Nebenwirkungen stehen hier in ungünstigem Verhältnis zum geringen Nutzen. Generell sollten trotz des reizvollen nicht-invasiven Ansatzes die Nebenwirkungen jeglicher strahlentherapeutischer Behandlungsoptionen beachtet werden: Vergrößerung des peritumoralen Ödems, weitere Verschlechterung der neurologischen Symptome, Nekrotisierungen, Enzephalopathie, vaskuläre Schäden sowie Demyelinisierung. In vielen Fällen sind die beschriebenen Veränderung permanent oder gar progressiv [19].

1.9 Aussicht

Äußerst vielversprechend beim Lungenkarzinom erscheint – wie bei anderen Entitäten auch – die Möglichkeit einer sog. „liquid biopsy“. Die Konzentration der im Blut zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) korreliert sowohl mit dem Tumorstadium als auch der Prognose der Patienten. Zu beachten ist allerdings, dass in frühen Tumorstadien nur in 50% der Patienten ctDNA nachgewiesen werden kann [37].

Die Prävalenz von aktivierenden *EGFR*-Mutationen ist bei Patienten mit Hirnmetastasen etwas höher als bei nicht-metastasierten Primärtumoren, was eine Beteiligung des EGF-Rezeptors bei der Metastasierung nahelegt [47]. Im Umkehrschluss vermindert eine *EGFR*-spezifische Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren die Krankheitsprogression der *EGFR*-mutierten Hirnmetastasen [20].

Nach dem Überqueren der Blut-Hirn-Schranke sterben 95 - 99% der Tumorzellen ab, was eine hohe Effizienz der antineoplastischen Aktivität des zentralen Nervensystems vermuten lässt [47, 64]. Die überlebenden Zellen interagieren mit ortsständigen Blutgefäßen, was zu einer Angiogenese führt. Gerade für Adenokarzinome scheint eine Inhibition der Neoangiogenese ein vielversprechender Therapieansatz zu sein [27, 45].

Die meisten Behandlungsansätze setzen in frühen Stadien der Metastasenformation an. Insbesondere wegen der hohen Bedeutung der invasiven Tumorfront für den Krankheitsprozess dürften sich aber auch hier weitere Ansatzstrategien für die Behandlung fortgeschrittener Stadien ergeben [55]. Als Schwierigkeit erscheint, dass Patienten mit zerebral metastasierten Tumorleiden wegen der geringen Korrelation zwischen systemischem und zerebralem Therapieerfolg teils aus Studien ausgeschlossen werden [11].

1.10 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit widmet sich Lungenkarzinom-Patienten, deren Primarius zum Zeitpunkt der ersten Symptomatik noch nicht bekannt war und die durch eine neurologische Symptomatik einer ZNS-Metastase auffällig wurden. Bei diesen Patienten liegt also bei Erstdiagnose des Primarius bereits eine Metastasierung vor. Dadurch, dass zuerst die Metastase und erst danach der Primärtumor festgestellt wurde, unterscheidet sich dieses Patientenkollektiv von Patienten mit einer synchronen Metastasierung (bei denen zunächst der Lungen-Primarius diagnostiziert wird und gleichzeitig Metastasen auffallen).

Insbesondere über diese Patienten, die erstmal durch eine neurologische Symptomatik auffällig werden, liegen bisher nur spärlich Informationen vor. Dabei sind Erkenntnisse über Verlauf, Prognose und molekularen Phänotyp essentiell für die Auswahl des besten Behandlungsregimes. Die vorliegende Arbeit hat sich daher dem Anliegen gewidmet, über Patienten mit synchroner ZNS-Metastasierung eines Lungenkarzinoms Daten zur Charakterisierung dieser Metastasen zu sammeln, insbesondere im Hinblick auf molekulare Marker. Zudem sollen diese Erkenntnisse mit der derzeitigen verfügbaren Literatur verglichen werden.

Vorgesehen war eine lange Nachbeobachtungszeit, um möglichst vollständige Information bzgl. der Überlebensdaten gewinnen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die zustimmende Bewertung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät (Aktenzeichen 126/14) erging am 18. August 2014.

2.2 Rekrutierung des Patientenkollektivs

Für die Studie geeignete Patienten wurden anhand des in das Institut für Neuropathologie der Otto-von-Guericke-Universität eingesandten Materials ausgewählt. Dazu wurden die Einsendescheine hinsichtlich der Eignung der Patienten für die Studie überprüft und bei Unklarheiten die Patientenakten angefordert und ausgewertet.

Einschlusskriterien waren:

1. Es handelt sich um einen Patienten mit Z.n. neurochirurgischer Tumor-OP.
2. Beim eingesandten Material handelt es sich um eine oder mehrere zerebrale Metastasen eines Lungenkarzinoms.
3. Vor OP war kein Primum bekannt (d.h. die Patienten wurden erstmals durch die Metastase(n) auffällig).

Daraus ergaben sich in analoger Weise die Ausschlusskriterien. Häufigster Anlass für Studienausschluss war das nachträgliche Bekanntwerden eines vorbekannten Primarius, der nicht auf dem Einsendeschein vermerkt war.

Da auch archivierte Einsendescheine zur Patientenakquise herangezogen wurden, liegen die frühesten Einsendungen vor Beginn der Studie.

Insgesamt wurden 33 Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen zwischen Februar 2009 und April 2014 Material eingesandt wurde.

2.3 Datenerhebung

Aus den einsendenden Kliniken wurden die Patientenakten angefordert und ausgewertet. Insbesondere zur Erhebung von Raucherstatus und Überlebensdaten waren diese jedoch nicht immer hinreichend, sodass in derartigen Fällen die Hausärzte der Patienten fernmündlich befragt wurden. Eine kategorische Auflistung der erhobenen Daten findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 Liste der erhobenen Parameter

Patientenbezogen	Krankheitsbezogen	Tumorbezogen
Geschlecht	Gesamtüberleben	Histologischer Typ / Entität
Alter bei Erstdiagnose / OP	Symptome bei Erstdiagnose	Metastasenanzahl
Raucherstatus		Metastasenlokalisierung
		Metastasenvolumen
		Mutationsstatus bzgl. <i>EGFR</i> <i>KRAS</i> <i>FGFR1</i> <i>ROS1</i> <i>RET</i> <i>EML4/ALK</i> <i>c-MET</i>

2.4 Probenversand und -aufbereitung

Nach operativer Entfernung im jeweiligen Krankenhaus wurden die Präparate bei Raumtemperatur an das Institut für Neuropathologie verschickt, bei auswärtigen Einsendern in 4%iger Formalinlösung als Fixierungsmittel. Es wurden Paraffinblöcke gemäß gängiger histopathologischer Praxis angefertigt.

2.5 Färbungen

Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden dann histochemisch bzw. immun-histochemisch gefärbt. Die am häufigsten durchgeführten Färbungen fasst Tabelle 2 zusammen.

Tabelle 2 Liste der am häufigsten verwendeten Färbungen

Histochemische Färbungen	Immunhistochemische Färbungen
Hämatoxylin-Eosin (HE)	Zytokeratin 5/6 (CK 5/6)
Periodic acid-Schiff-Reaktion (PAS)	Zytokeratin 7 (CK 7)
Elastika-van-Gieson (EvG)	Zytokeratin 20 (CK 20)
	Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein / GFAP)
	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1 (thyroid transcription factor 1 / TTF-1)
	Synaptophysin
	Chromogranin A
	Molecular Immunology Borstel (MIB-1)

2.6 Histopathologische Untersuchung

Die aufbereiteten Präparate wurden dann vom erfahrenen Facharzt für Neuropathologie begutachtet. Aus den Einschlusskriterien ergab sich, dass das neoplastische Gewebe im Präparat keinem primären ZNS-Tumor, sondern einer Metastase zuzuordnen war. Derartige Fälle wurden dann bei Eignung in die Studie eingeschlossen. Nach histologischer Morphe und immunhistochemischem Expressionsprofil wurden die Metastasen einer Entität zugeordnet.

2.7 Tissue-Microarray

Zur schnelleren und übersichtlicheren Erhebung insbesondere der immunhistochemischen Färbungen und der FISH wurde ein Tissue-Microarray (TMA) angefertigt. Aus den bereits für die DNA-Extraktion angezeichneten Tumorearealen auf den Paraffinblöcken wurden an drei verschiedenen Stellen Stanzzyylinder entnommen und in einen vorbereiteten weiteren Paraffinblock überführt. Dieser wurde dann wie üblich zugeschnitten und gefärbt, sodass Material vieler Patienten auf wenigen Schnitten ausgewertet werden konnte.

2.8 Molekulare Methoden

2.8.1 Probenvorbereitung

Die Gewinnung von Tumor-DNA erfolgte aus dem paraffineingebetteten Tumormaterial. Hierzu wurden die zuvor vom Neuropathologen als geeignet befundenen Areale auf dem Objektträger eines HE-Schnittes mit der Position am Paraffinblock abgeglichen. An dieser Stelle wurde dann mit einer Rasierklinge Tumormaterial abgeschabt; das gewonnene Material musste zur DNA-Extraktion folglich zunächst entparaffiniert werden.

2.8.2 Entparaffinierung

Das gewonnene Material aus dem Paraffinblock wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit 1000 µl Xylolersatz (Protax-Clear) überschichtet und dann im Thermomixer (Eppendorf) 10 Minuten bei 70°C sanft geschwenkt. Nach Wechsel des Entparaffiniermediums wurde der Zyklus wiederholt.

2.8.3 DNA-Extraktion

Aus dem gewonnenen Material wurde danach die DNA extrahiert. Dazu wurde das *Nucleid Acid and Protein Purification Kit* der Firma Machery-Nagel verwendet. Das dazugehörige Protokoll findet sich im Anhang. Mittels eines Mikrophotometers erfolgte die automatische Quantifizierung der DNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm sowie die Bestimmung des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm als Maßstab der Reinheit der DNA (Abwesenheit von Protein).

2.8.4 PCR

Zur Vervielfältigung der gewünschten DNA-Abschnitte (Amplicons) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) angesetzt. Hierzu wurde das *Hot Star TaqPlus Master Mix Kit* der Firma Qiagen verwendet. Das dazugehörige Protokoll nebst den verwendeten Primern findet sich im Anhang. Die Primer waren als Auftragssynthese von der Firma Biomers.Net synthetisiert, über eine HPLC gereinigt und lyophilisiert worden. Die laut Vorschrift hergestellten Primerstammlösungen in H₂O (100 pmol/μl) waren vor der PCR mit H₂O im Verhältnis 1:25 verdünnt worden (Gebrauchslösung 4 pmol/μl). Die PCR selbst erfolgte in einem Mastercycler (Eppendorf). Die Produkte wurden anschließend mithilfe von PCR-Aufreinigungssäulchen der Firma Thermo Fisher gemäß Herstellerangaben für die nachfolgende Sequenzierung aufgereinigt.

2.8.5 Sequenzierung

Mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurden dann in einem Mastercycler jeweils zwei Sequenzierreaktionen durchgeführt nach der Didesoxy-Methode (Sanger); zum einen mit dem Vorwärts-Primer der PCR-Reaktion und zum anderen mit dem entsprechenden Rückwärtsprimer. Dazu wurde gemäß Herstellerangaben das Big-Dye-Terminator Kit der Firma Applied Biosciences (ABI, Foster City, CA, USA) verwendet. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der Sequenzierreaktionen mithilfe der Aufreinigungsröhrchen für Sequenzierreaktionen der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben. Die so erhaltenen fluoreszenzmarkierten Fragmente wurden einer Kapillarelektrophorese mit automatischer Bestimmung der Basenfolge auf einem 1-Kapillar-Sequenzier (ABI 310-C) der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) unterzogen (Tab. 3).

Tabelle 3 Per Sanger-Sequenzierung untersuchte Exone

<i>EGFR</i>	<i>KRAS</i>
Exon 18	Exon 2
Exon 19	
Exon 20	
Exon 21	

2.9 FISH

Der Mutationsstatus bzgl. der Marker *ALK*, *FGFR1*, *MET*, *ROS1* und *RET* wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Präparate wurden aus Paraffinschnitten vom TMA hergestellt, das zugehörige Protokoll findet sich im Anhang. Die jeweils untersuchten genetischen Abberationen sowie die jeweiligen Auswertkriterien zeigen die Tabellen 4 – 9.

Tabelle 4 Untersuchte Rezeptor-Tyrosinkinase mit untersuchten genetischen Aberrationen

Rezeptor-Tyrosinkinase	Untersuchte genetische Aberration
<i>ALK</i>	Translokation
<i>FGFR1</i>	Amplifikation
<i>MET</i>	Amplifikation
<i>ROS1</i>	Translokation
<i>RET</i>	Translokation

Tabelle 5 Kriterien einer *c-MET*-Amplifikation [53]

<i>c-MET</i> -Amplifikation	Kriterium
High-level	Ratio <i>MET</i> -Sonde / Referenzsonde $\geq 2,0$ und / oder durchschnittl. Genkopienzahl $\geq 6,0$ und / oder $\geq 10\%$ der Kerne ≥ 15 Genkopien
Intermediate	$\geq 50\%$ der Kerne ≥ 5 Genkopien
Low-level	$\geq 40\%$ der Kerne ≥ 4 Genkopien
Keine Amplifikation	Keines der o.g. Kriterien erfüllt

Tabelle 6 Kriterien einer *FGFR1*-Amplifikation [52]

<i>FGFR1</i> -Amplifikation	Kriterium
High-level	Ratio <i>FGFR1</i> / CEN8 $\geq 2,0$ und / oder durchschnittl. Genkopienzahl $\geq 6,0$ und / oder $\geq 10\%$ der Kerne ≥ 15 Genkopien
Low-Level	$\geq 50\%$ der Kerne ≥ 5 Genkopien
Keine Amplifikation	Keines der o.g. Kriterien erfüllt

Tabelle 7 Kriterien einer *RET*-Translokation

Signalkonstellation	Kriterium
Split Signal (SS)	Abstand zwischen 3'RET- und 5'RET-Signal mehr als 1 Signaldurchmesser
Single Red Signal (SRS)	≥ 1 isoliertes rotes Signal pro Kern
<i>RET</i> -Translokation	≥ 15% SS und / oder SRS in 100 auswertbaren nicht-überlappenden Kernen
Keine <i>RET</i> -Translokation	o.g. Kriterien nicht erfüllt

Tabelle 8 Kriterien einer *ALK*-Translokation [29, 51]

Signalkonstellation	Kriterium
Split Signal (SS)	Abstand zwischen 3'ALK- und 5'ALK-Signal mehr als 1 Signaldurchmesser
Single Red Signal (SRS)	≥ 1 isoliertes rotes Signal pro Kern
<i>ALK</i> -Translokation	≥ 15% SS und / oder SRS in 100 auswertbaren nicht-überlappenden Kernen
Keine <i>ALK</i> -Translokation	o.g. Kriterien nicht erfüllt

Tabelle 9 Kriterien einer *ROS1*-Translokation [39]

Signalkonstellation	Kriterium
Split Signal (SS)	Abstand zwischen 3'ROS1- und 5'ROS1-Signal mehr als 1 Signaldurchmesser
Single Green Signal (SGS)	≥ 1 isoliertes grünes Signal pro Kern
<i>ROS1</i> -Translokation	≥ 20% SS und / oder SGS in 100 auswertbaren nicht-überlappenden Kernen
Keine <i>ROS1</i> -Translokation	o.g. Kriterien nicht erfüllt

2.10 Neuroradiologie

Metastasenanzahl, -volumen und -lokalisierung wurden anhand neuroradiologischer Schnittbilder bestimmt. Das Volumen wurde näherungsweise mit der Formel

$$V = \frac{1}{2} \times \text{Ausdehnung}_{\text{sagittal}} \times \text{Ausdehnung}_{\text{axial}} \times \text{Ausdehnung}_{\text{coronar}}$$

berechnet. Das halbierte Produkt aus den Ausdehnungen in den drei Raumrichtungen als einfaches Näherungsverfahren führt beispielsweise bei einer idealen Kugel zu einer Abweichung von nur 4,7% vom wahren Wert. Dies wurde für die Studie als hinreichende Genauigkeit betrachtet.

Beim Vorliegen multipler Metastasen wurde als Metastasenvolumen die Summe aller Metastasenvolumina definiert (entsprechend einer Abbildung der gesamten metastatischen Tumorlast).

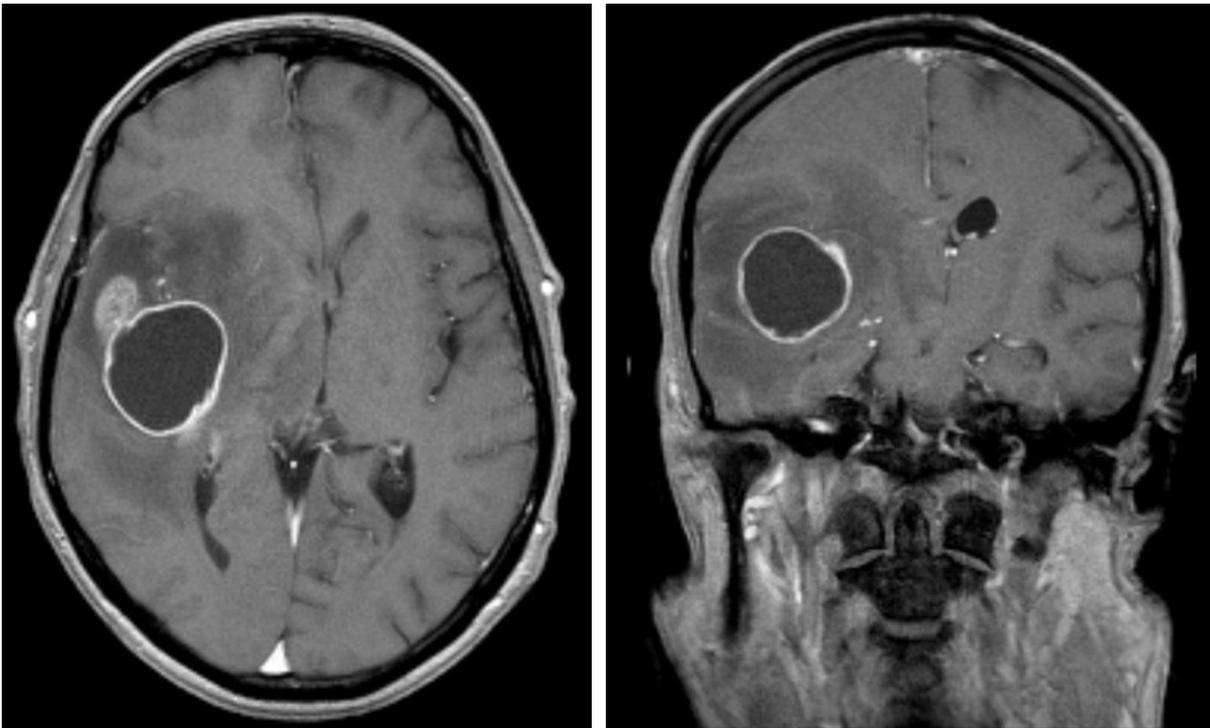


Abbildung 2: Schädel-MRT-Aufnahmen des Patienten mit der Fallnummer 11 (60jähriger Mann).

Abbildung 2 zeigt ein Schädel-MRT eines Patienten (T1- gewichtet, mit Kontrastmittel). In der rechten Hemisphäre stellt sich temporal eine 37,0 mm x 30,7 mm x 32,9 mm messende Metastase dar. Das Volumen wurde zu 18,7 cm³ berechnet. Man beachte die Mittellinienverlagerung und die die Metastase umgebende Stromareaktion.

2.11 Gesamtüberleben

Als Gesamtüberleben wurde die Zeitdifferenz zwischen Erstdiagnose und Todesdatum definiert. In der vorliegenden Studie ist der Zeitpunkt der Erstdiagnose wegen der Einschlusskriterien (= erste Manifestation der Neoplasie durch metastatisch bedingte neurologische Symptomatik) nicht immer klar festlegbar. Deswegen wurde als Erstdiagnose vereinfacht das OP-Datum angesetzt. Die Differenz zum Todeszeitpunkt wurde in ganzen Tagen berechnet und bei Bedarf z.B. in Wochen oder Monate umgerechnet.

Nicht für alle Patienten konnte ein Todesdatum bestimmt werden. Dies kann einerseits medizinisch begründet sein, denn ein langfristiges Überleben ist nicht ausgeschlossen. Andererseits konnten die Hausärzte der Patienten nicht in allen Fällen Aussagen zum Überlebensstatus der Patienten machen. Insgesamt wurden deswegen folgende Festlegungen getroffen:

1. Im Falle eines bekannten Sterbedatums berechnet sich das Gesamtüberleben aus der Differenz zwischen dem Datum der Operation und dem Datum des Todes.
2. Liegen keine oder nicht verwertbare Informationen zum Überlebensstatus vor, werden für den betreffenden Patienten keine Überlebensdaten erhoben.

2.12 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit der Software IBM SPSS Statistics (Release 26) durchgeführt. Die gesammelten Daten wurden folgenden Testverfahren unterzogen:

1. Multivariate Varianzanalyse (*multivariate analysis of variance* / MANOVA)
2. χ^2 -(Chi-Quadrat)-Test nach Pearson
3. Cox-Regression
4. LogRank(Mantel-Cox)-Test
5. Exakter Fisher-Test

Signifikanz wurde angenommen für $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Von den 33 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren 23 (69,7%) männlich und 10 (30,3%) weiblich. Das durchschnittliche Alter bei OP betrug 63,0 Jahre bei einem Median von 61,0 Jahren. Zwei Patientinnen und ein Patient waren bei OP 48 Jahre alt, der älteste Patient war 85 Jahre alt. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Verteilung der Geschlechter bzw. der Altersgruppen auf die Patientenkohorte.

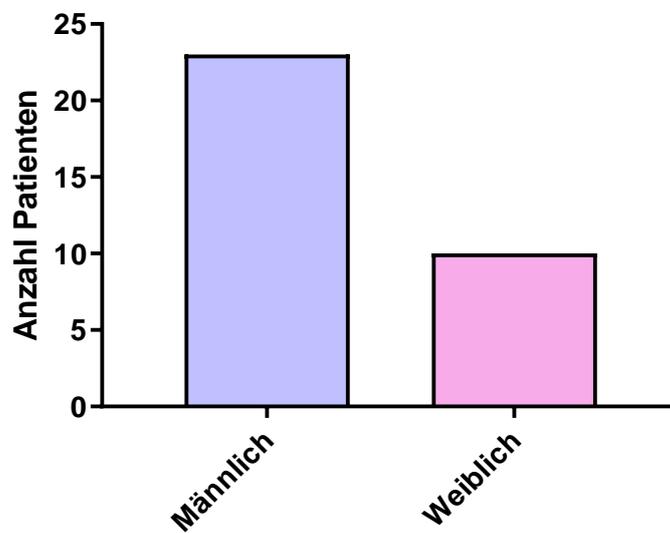


Abbildung 3: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

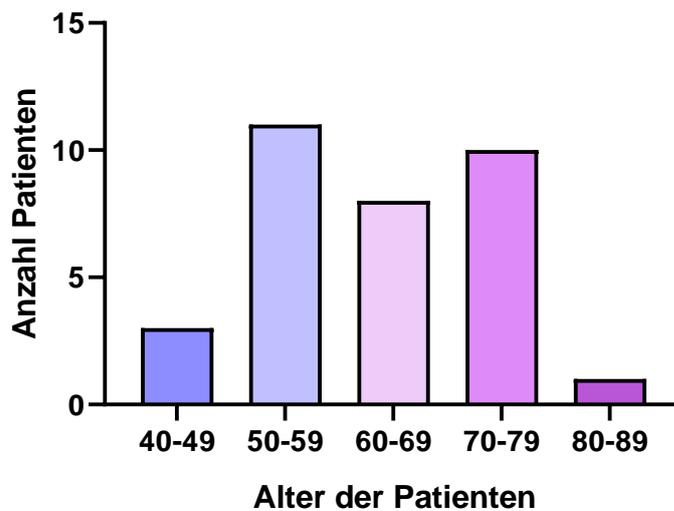


Abbildung 4: Altersverteilung des Patientenkollektivs

3.2 Überleben

Wie bereits in Abschnitt 2.3 dargelegt, wurden die nicht aus den Akten ersichtlichen Überlebensdaten bei den Hausärzten der Patienten angefragt. Nicht in jedem Fall konnten so Daten erhoben werden, derartige Fälle gingen nicht in die Überlebensanalyse ein.

Der Patient mit dem kürzesten Gesamtüberleben verstarb am 4. postoperativen Tag, das längste bekannte Gesamtüberleben lag bei 53,1 Monaten, also gut 4 Jahren. Das mediane Überleben lag bei 17,9 Monaten bei einem arithmetischen Mittel von 10,6 Monaten. Die Verteilung der Überlebenszeiträume innerhalb des Patientenkollektivs ist in Abbildung 5 (Klasseneinteilung) dargestellt. Eine Kaplan-Meier-Darstellung des Gesamtüberlebens zeigt Abbildung 6.

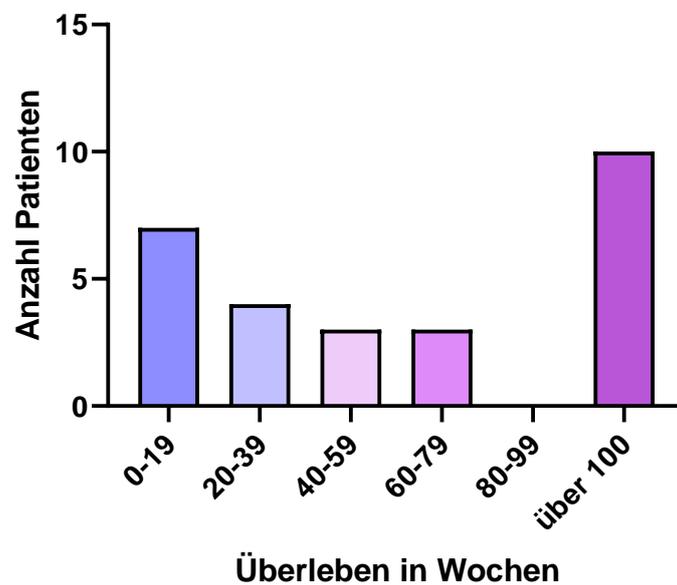


Abbildung 5: Verteilung der Gesamtüberlebenszeiten aller Patienten

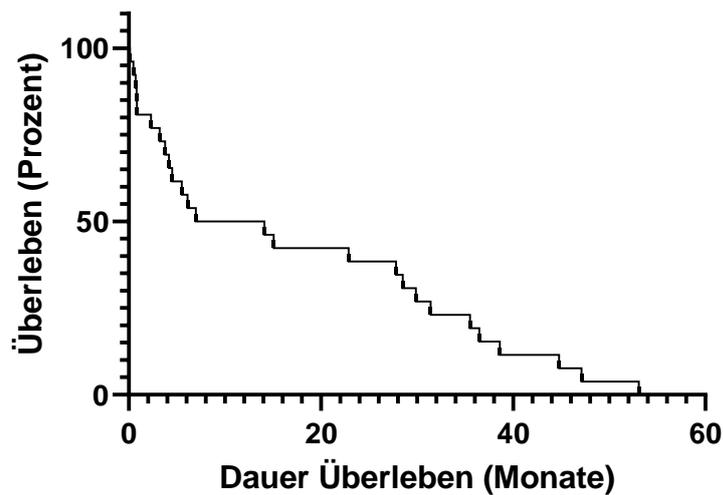


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens

3.3 Raucherstatus

Von 14 Patienten konnten Informationen bezüglich des Rauchstatus gewonnen werden.

Ein 67jähriger Patient mit einer Metastase eines pulmonalen Adenokarzinoms wies keine Raucheranamnese auf (sog. Nie-Raucher – 7% der Patienten mit bekanntem Rauchstatus). In drei weiteren Fällen hatten die Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose das Rauchen bereits aufgegeben (Ex-Raucher - 21,4% der Patienten mit bekanntem Rauchstatus). Die restlichen 10 Patienten (71,4%) waren zum OP-Zeitpunkt noch aktive Raucher.

3.4 Vorliegen von Hirndruckzeichen

Für 26 Patienten lagen klinische Informationen vor, ob sich präoperativ Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Druckes gezeigt hatten. Für 12 Patienten (46,2%) wurde dies klinischerseits bestätigt, es gab also erkennbare Hirndruckzeichen.

Bei den restlichen 14 Patienten (53,8%) waren keine erkennbaren Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Druckes präsent.

3.5 Metastasenvolumen

Das durchschnittliche Metastasenvolumen betrug $22,0 \text{ cm}^3$ bei einem Median von $14,4 \text{ cm}^3$. Die kleinste Metastase hatte ein Volumen von $1,1 \text{ cm}^3$, die größte ein Volumen von $70,7 \text{ cm}^3$. Für 9 Patienten konnten mangels Schnittbildern keine Volumina ermittelt werden. Der Vergleich der kumulativen Überlebenskurven zwischen Patienten mit hohem und kleinem mittleren Metastasenvolumen (als Grenze wurden hier willkürlich 16 cm^3 definiert – entsprechend einem Würfel mit etwa 25 mm Kantenlänge) im LogRank-(Mantel-Cox)-Test ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 8).

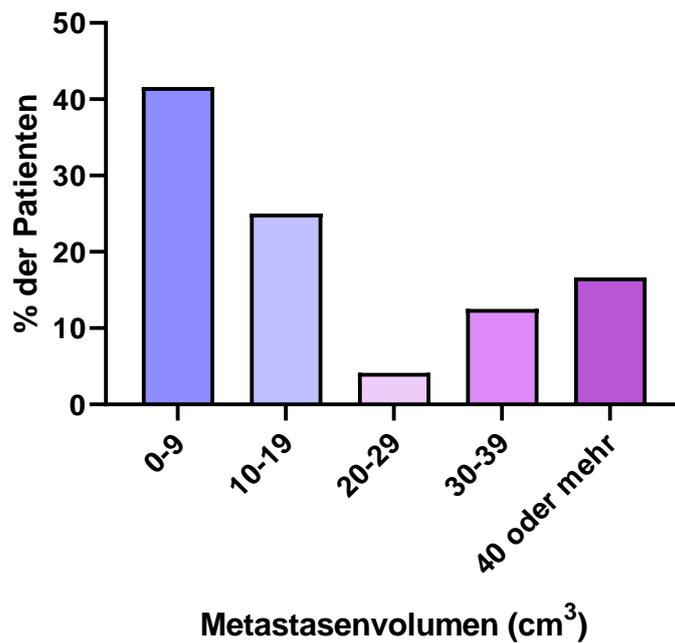


Abbildung 7: Verteilung der Metastasenvolumina

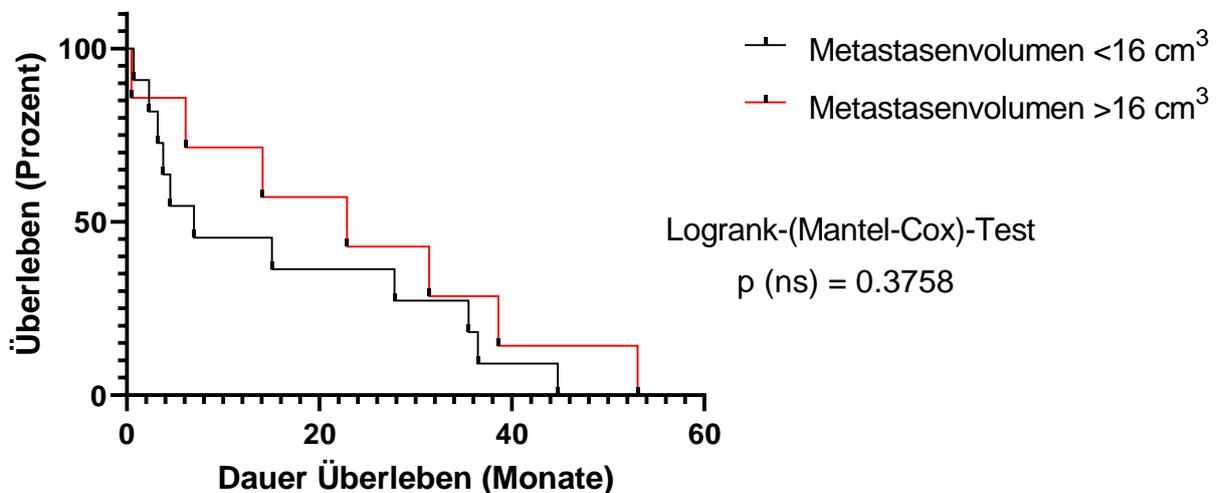


Abbildung 8: Überleben in Zusammenhang mit dem Metastasenvolumen

3.6 Metastasenanzahl

Bei 28 Patienten (84,8%) fand sich eine singuläre Metastase, 5 Patienten (15,2%) zeigten multiple Metastasen. Die höchste bestätigte Metastasenanzahl lag dabei bei 3, wobei jedoch nicht für alle Patienten mit multiplen Metastasen genaue Angaben verfügbar waren. Die Verteilung der Metastasenanzahl auf die Patientenkohorte zeigt Abbildung 9. Es konnte mithilfe des LogRank-(Mantel-Cox)-Testes kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Überlebenszeit festgestellt werden ($p = 0,8417$).

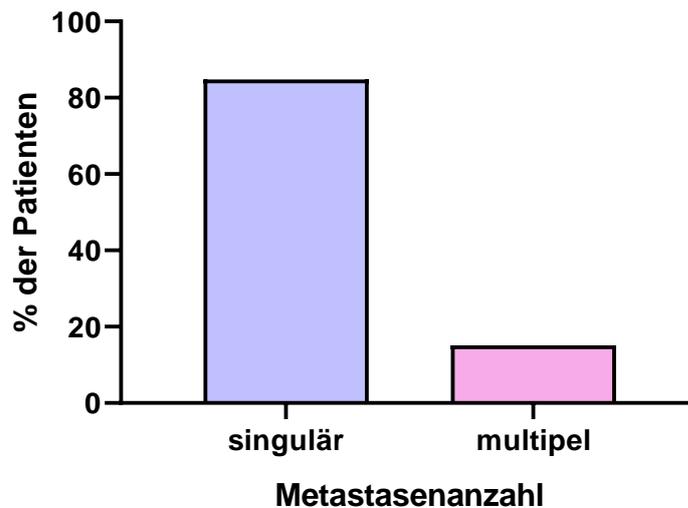


Abbildung 9: Verteilung der Metastasenanzahl

3.7 Metastasenlokalisierung

Von den 33 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren bei 27 Patienten (82%) die Metastase/n supratentoriell lokalisiert, die übrigen 6 Patienten (18%) zeigten eine infratentorielle Lokalisation. Tabelle 10 zeigt die Überlebenszeiten für die beiden Lokalisationen, die gemäß LogRank-(Mantel-Cox)-Test signifikant verschieden sind (Kaplan-Meier-Kurven siehe Abb. 10).

Tabelle 10 Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisierung

Lokalisation	Medianes Überleben (Monate)
Supratentoriell	18,97*
Infratentoriell	0,85*

* $p = 0,0133$

HR (95% KI) = 22,45 (9,02 – 55,90)

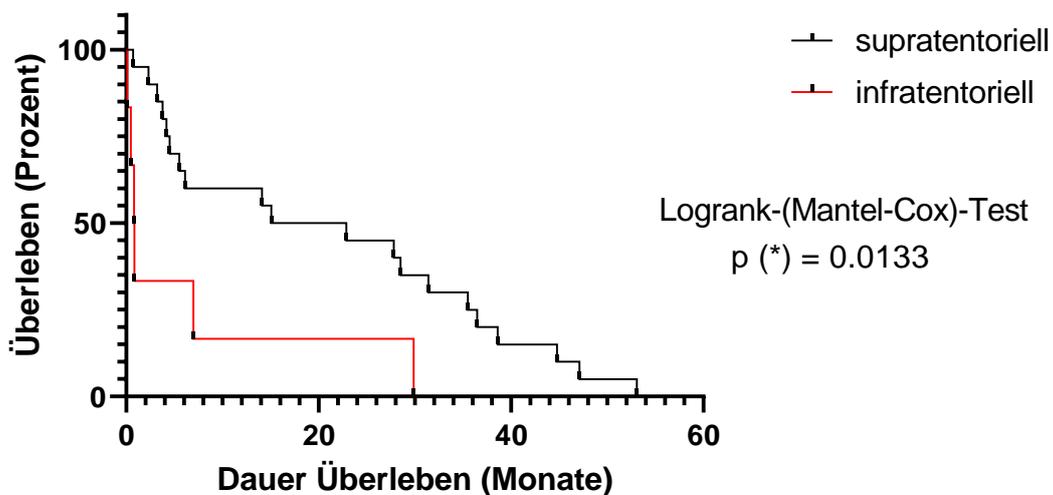


Abbildung 10: Überleben in Zusammenhang mit der Metastasenlokalisierung

Patienten mit infratentoriell lokalisierten Metastasen zeigen ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit supratentoriellen Metastasen ($p = 0,0133$).

3.8 Histologie der Metastasen

Im Studienkollektiv fanden sich 24 Metastasen, die primären Adenokarzinomen der Lunge zugeordnet werden konnten (73%). Die übrigen Metastasen stammten von kleinzelligen Lungenkarzinomen (27%). Metastasen großzelliger Lungenkarzinome bzw. von Plattenepithelkarzinomen fanden sich im Studienkollektiv nicht.

Histologiebefunde (HE-Färbung und Immunhistochemie) in Abbildung 11 (SCLC) bzw. Abbildung 13 (NSCLC) dargestellt. Zudem zeigt Abbildung 12 die Verteilung der histologischen Subtypen auf die Patientenkohorte.

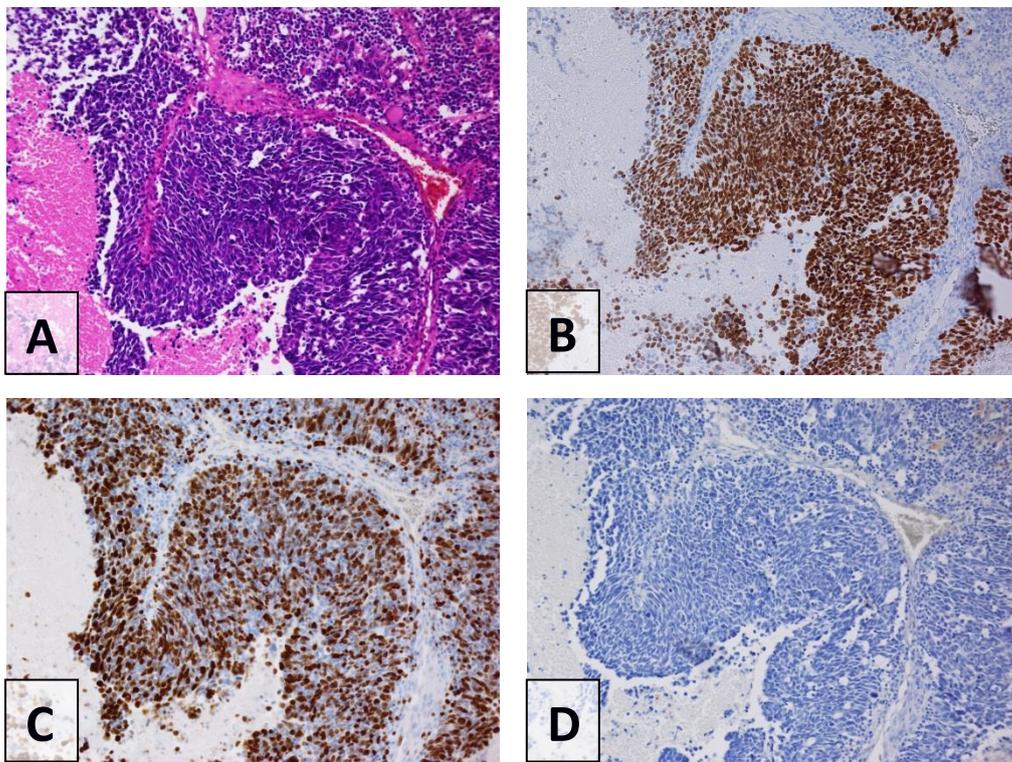


Abbildung 11 Histologie einer Metastase eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (Patient Nr. 8, 75jähriger Mann)

A Verbände kleinzellig imponierender Tumorzellen mit randlicher Nekrose (HE, 200x), **B – D** Immunhistochemische Färbungen (alle 200x), **B** Kräftige nukleäre Immunpositivität für TTF-1
C Hoher Mib-1-Proliferationsindex, **D** Negative Immunreaktion bzgl. GFAP

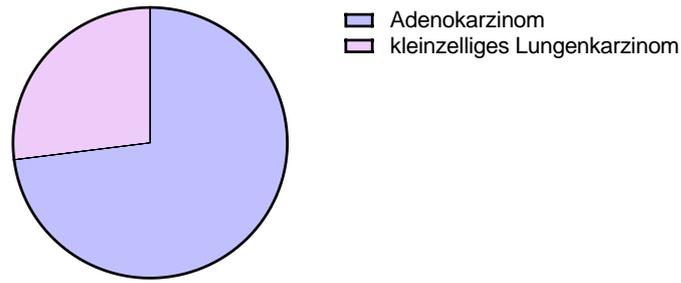


Abbildung 12: Histologische Subtypen im Studienkollektiv

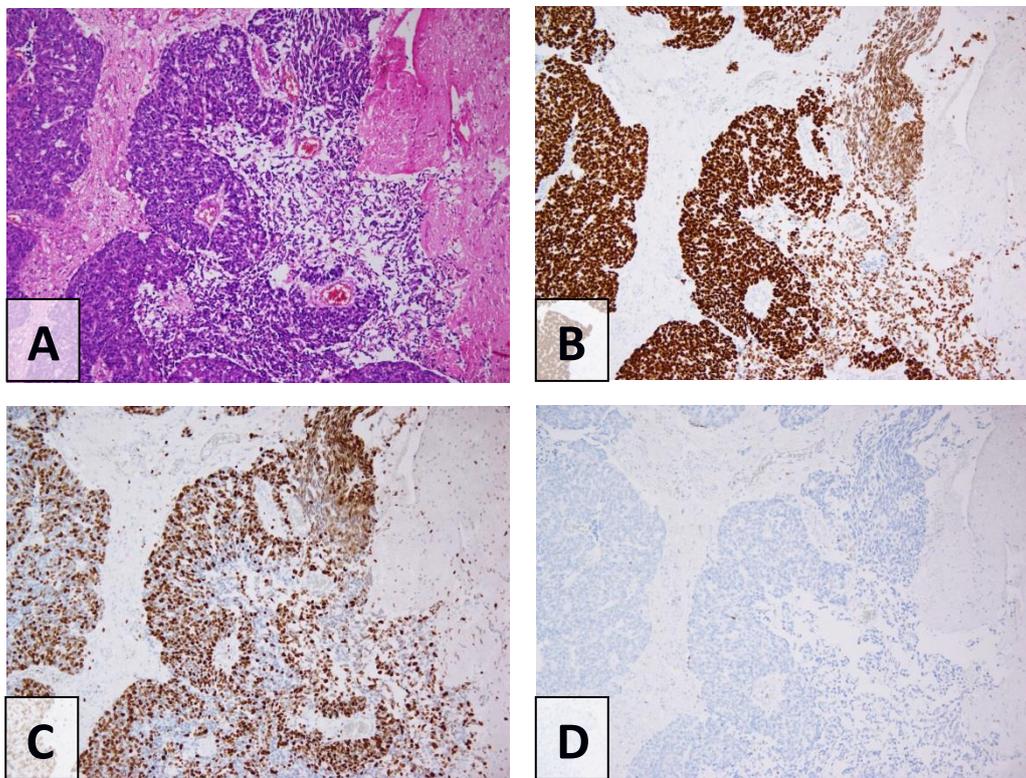


Abbildung 13: Histologie einer Metastase eines Adenokarzinoms (Patientin Nr. 2, 65jährige Frau)

A Partiiell glandulär differenzierte, ansonsten überwiegend solide wachsende Tumorzellen neben ortsständigem, reaktiv transformiertem ZNS-Gewebe (HE, 100x), **B – D** Immunhistochemische Färbungen (alle 100x), **B** Kräftige nukleäre Immunpositivität für TTF-1, **C** Hoher Mib-1-Proliferationsindex, **D** Negative Immunreaktion bzgl. GFAP

Tabelle 11 zeigt die Überlebenszeiten in Bezug auf den histologischen Typ der Metastase. Das dazugehörige Kaplan-Meier-Diagramm findet sich in Abbildung 14. Mithilfe des LogRank(Mantel-Cox)-Testes konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Überlebensdauern festgestellt werden.

Tabelle 11 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom histologischen Typ

Histologischer Typ	Medianes Überleben (Monate)
NSCLC	15,07
SCLC	2,30

p = 0,0902

HR (95% KI) = 6,55 (2,47 – 17,38)

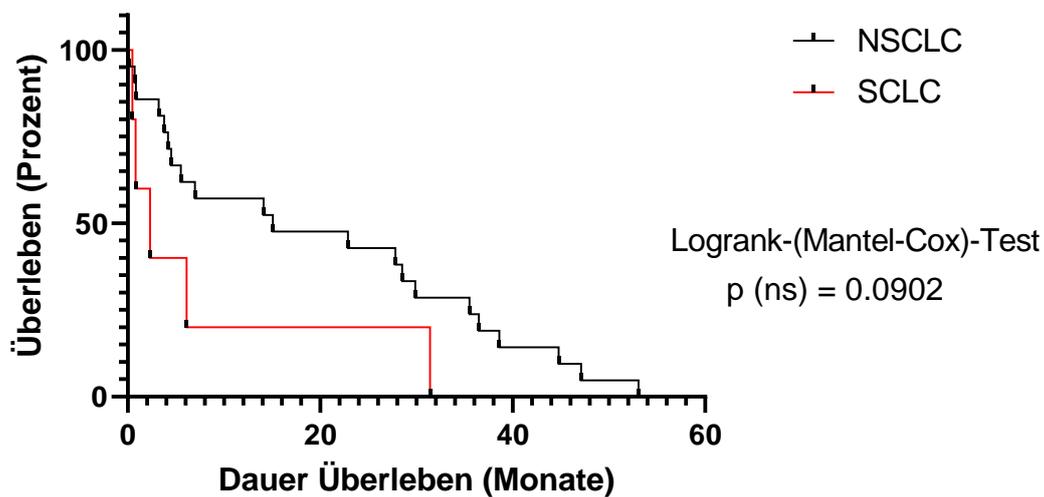


Abbildung 14: Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Typ

3.9 Molekularpathologie (Sequenzierung)

3.9.1 EGFR

Für alle Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *EGFR*-Mutationsstatus vor. 29 Patienten (88%) zeigten keine pathogene Mutation, wohingegen sich bei 4 Patienten Mutationen fanden. Eine in Exon 19 festgestellte P741L-Mutation zeigt keine klare pathogene Relevanz und wurde nachfolgend nicht zu den sicher pathogenen *EGFR*-Mutationen gezählt [31]. Damit konnten 3 sicher pathogene *EGFR*-Mutationen gesichert werden, die alle der beim EGF-Rezeptor häufigen L858R-Mutation zuzuordnen waren. Der *EGFR*-Mutationsstatus korrelierte nicht signifikant mit dem Überleben oder anderen klinischen Parametern. Eine Multivariate Varianzanalyse erbrachte keine signifikante Korrelation des *EGFR*-Mutationsstatus (Test bzgl. "EGFR mutiert" gegen "EGFR ohne Mutation") in Bezug auf das Gesamtüberleben oder einen anderen erhobenen Parameter.

Eine Aufstellung der gefundenen Mutationen findet sich in Tabelle 12 und Abbildung 15.

Tabelle 12 Ergebnisse der *EGFR*-Sequenzierung

Ergebnis	Anzahl Patienten n	Anzahl Patienten %
Ohne <i>EGFR</i> -Mutation	29	88
L858R (Exon 21)	3	9
P741L (Exon 19)	1	3

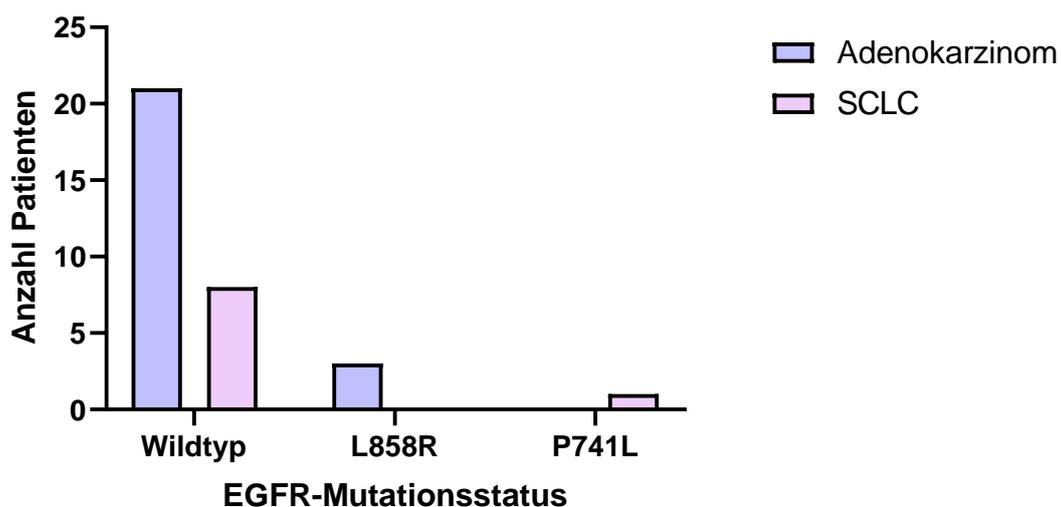


Abbildung 15: Verteilung der *EGFR*-Mutationen auf die histologischen Subtypen

Während alle L858R-Mutationen in Metastasen von Adenokarzinomen auftraten, fand sich die einzige (nicht sicher pathogene) P741L-Mutation in der Metastase eines kleinzelligen Lungenkarzinoms.

3.9.2 KRAS

Von 32 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *KRAS*-Mutationsstatus vor (Tab. 13, Abb. 17). 27 Patienten (84%) zeigten keine pathogene Mutation, bei 5 Patienten (16%) fanden sich derartige Alterationen. Es fand sich mittels einer Multivariaten Varianzanalyse keine Korrelation zwischen dem *KRAS*-Mutationsstatus und dem Überleben oder einem anderen klinischen Parameter. Dabei wurden die verschiedenen Punktmutationen gemeinsam mit sämtlichen Fällen ohne *KRAS*-Mutation verglichen (also unabhängig von der konkreten Punktmutation).

Eine Sanger-Sequenz eines mutierten *KRAS*-Exons 2 zeigt Abbildung 16.

Tabelle 13 Ergebnisse der *KRAS*-Sequenzierung

Ergebnis	Anzahl Patienten n	Anzahl Patienten %
Ohne <i>KRAS</i> -Mutation	27	84
G12V (Exon 2)	2	6
G12A (Exon 2)	1	3
G12C (Exon 2)	1	3
G12R (Exon 2)	1	3

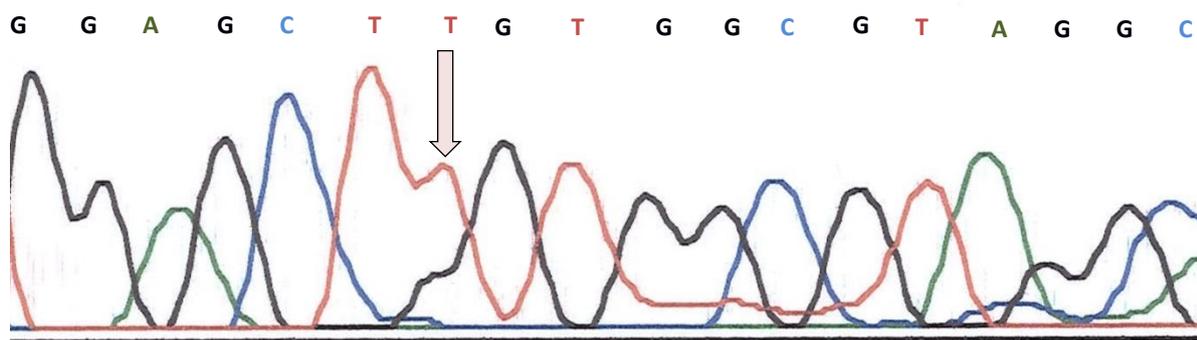


Abbildung 16: Sanger-Sequenz von *KRAS*-Exon 2 bei Patient Nr. 24 (75jähriger Mann)

An Basenposition 34 (Pfeil) findet sich ein Austausch von Guanin durch Thymin (c.34G>T). Das Triplet codiert nun für Cystein statt Glycin (p.G12C).

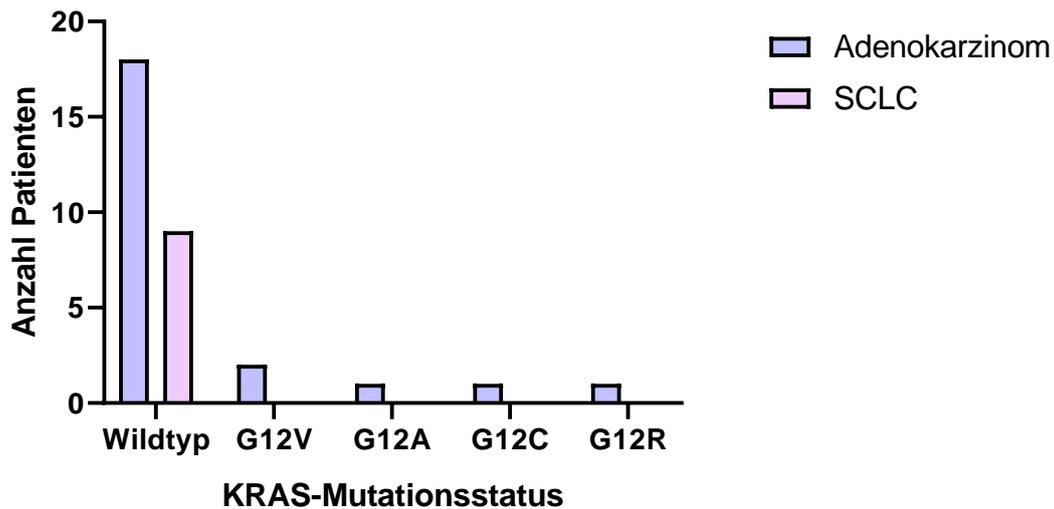


Abbildung 17: Verteilung der KRAS-Mutationen auf die histologischen Subtypen

Alle *KRAS*-Mutationen fanden sich in Metastasen von Adenokarzinomen, die Metastasen von kleinzelligen Lungenkarzinomen waren jeweils dem *KRAS*-Wildtyp zuzuordnen.

3.10 Molekularpathologie (FISH)

3.10.1 *c-MET*

Von 30 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *c-MET*-Mutationsstatus vor. Bei 22 Patienten (73%) lag keine *c-MET*-Amplifikation vor. Es fanden sich folglich insgesamt 8 *c-MET*-Amplifikationen (27%). 7 der Mutationen (88%) fanden sich in Metastasen von Adenokarzinomen, die verbleibende Mutation (12%) trat bei einem kleinzelligen Lungenkarzinom auf.

Tabelle 14 listet die gefundenen *c-MET*-Amplifikationen auf. Abbildung 18 zeigt eine FISH-Fotografie einer High-level-*c-MET*-Amplifikation. In der gleichen Abbildung findet sich eine Fotografie eines nicht amplifizierten Gewebes als Referenz.

Tabelle 14 Ergebnisse der *c-MET*-FISH

Ergebnis	Anzahl Patienten n	Anzahl Patienten %
Keine <i>c-MET</i> -Amplifikation	22	73
Low-level-Amplifikation	5	17
Intermediate-Amplifikation	2	7
High-level-Amplifikation	1	3

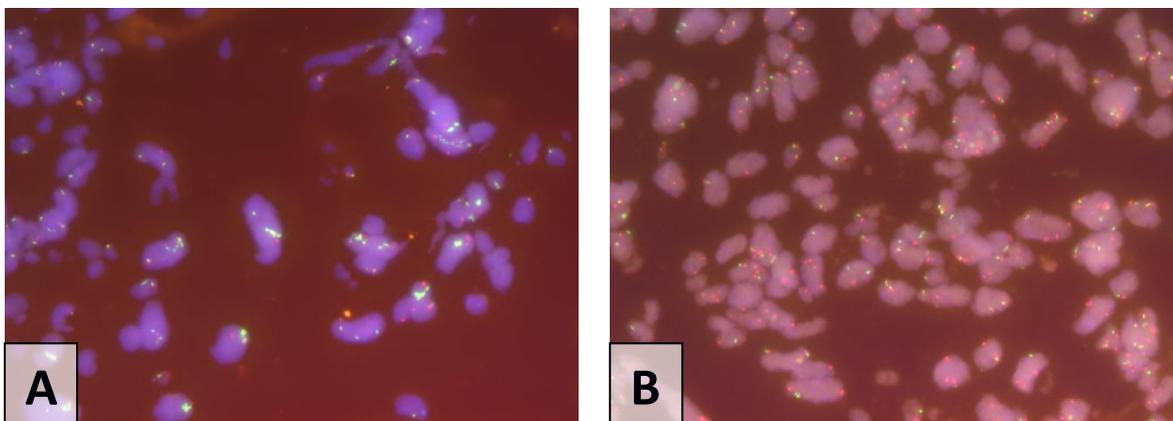


Abbildung 18: *c-MET*-FISH

A Bild einer High-level-*c-MET*-Amplifikation (Patientin Nr. 27, 57jährige Frau).

Vermehrter Nachweis grüner Signale der *MET*-Sonde im Vergleich zu Signalen der roten Referenzsonde.

B *c-MET*-FISH ohne Nachweis einer Amplifikation (Patient Nr. 6, 60jähriger Mann)

Kein vermehrter Nachweis von Signalen der grünen *MET*-Sonde.

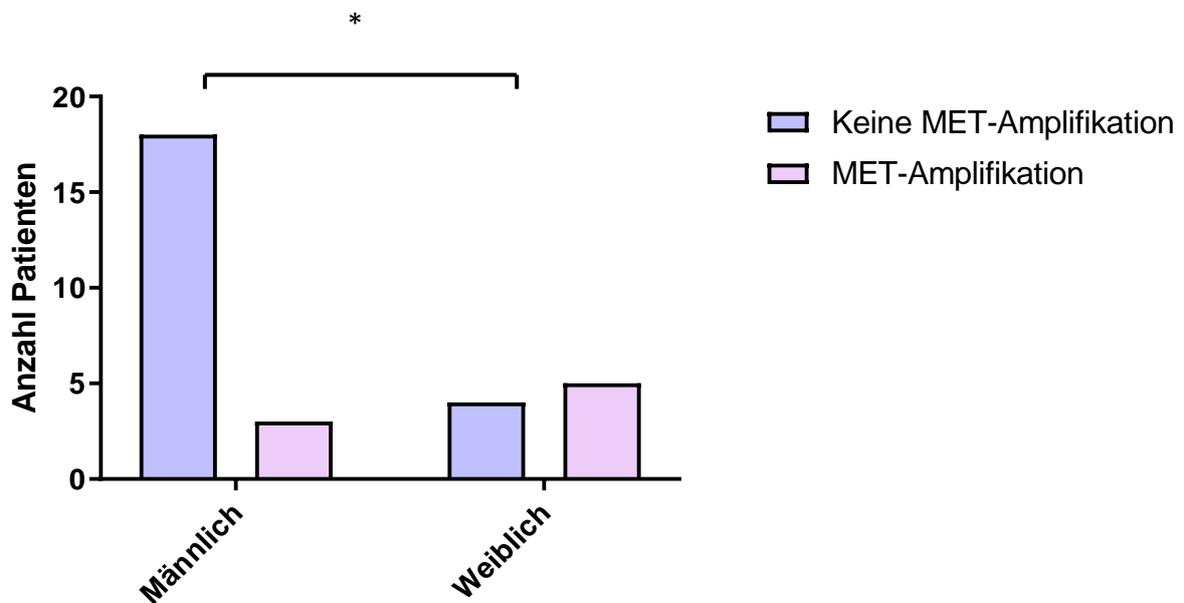


Abbildung 19: MET-Amplifikationsstatus in Relation zum Geschlecht

Frauen zeigten signifikant häufiger MET-Amplifikationen als Männer (p = 0,032).

Der Chi-Quadrat-Test zeigte eine signifikante Korrelation des *c-MET*-Amplifikationsstatus in Bezug auf das Geschlecht in dem Sinne, dass Frauen häufiger *c-MET*-amplifizierte Metastasen zeigten (Abb. 19). Die Überlebenskurven in einem Kaplan-Meier-Diagramm zeigt Abb. 20. Hier konnte mittels LogRank(Mantel-Cox)-Test keine Signifikanz nachgewiesen werden.

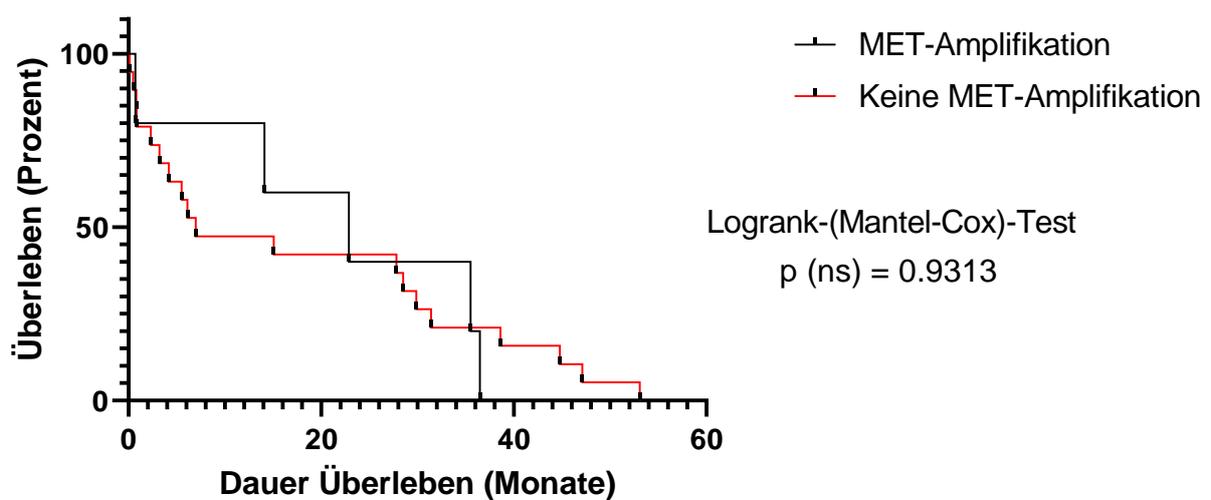


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Diagramm in Bezug auf den *c-MET*-Amplifikationsstatus

3.10.2 FGFR1

Von 31 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *FGFR1*-Mutationsstatus vor (Tab. 15, Abb. 21). Bei 26 Patienten (84%) lag keine *FGFR1*-Amplifikation vor. Es fanden sich folglich insgesamt 5 *FGFR1*-Amplifikationen (16%).

Tab. 15 Ergebnisse der *FGFR1*-FISH

Ergebnis	Anzahl Patienten n	Anzahl Patienten %
Keine <i>FGFR1</i> -Amplifikation	26	84
High-level-Amplifikation	4	13
Low-level-Amplifikation	1	3

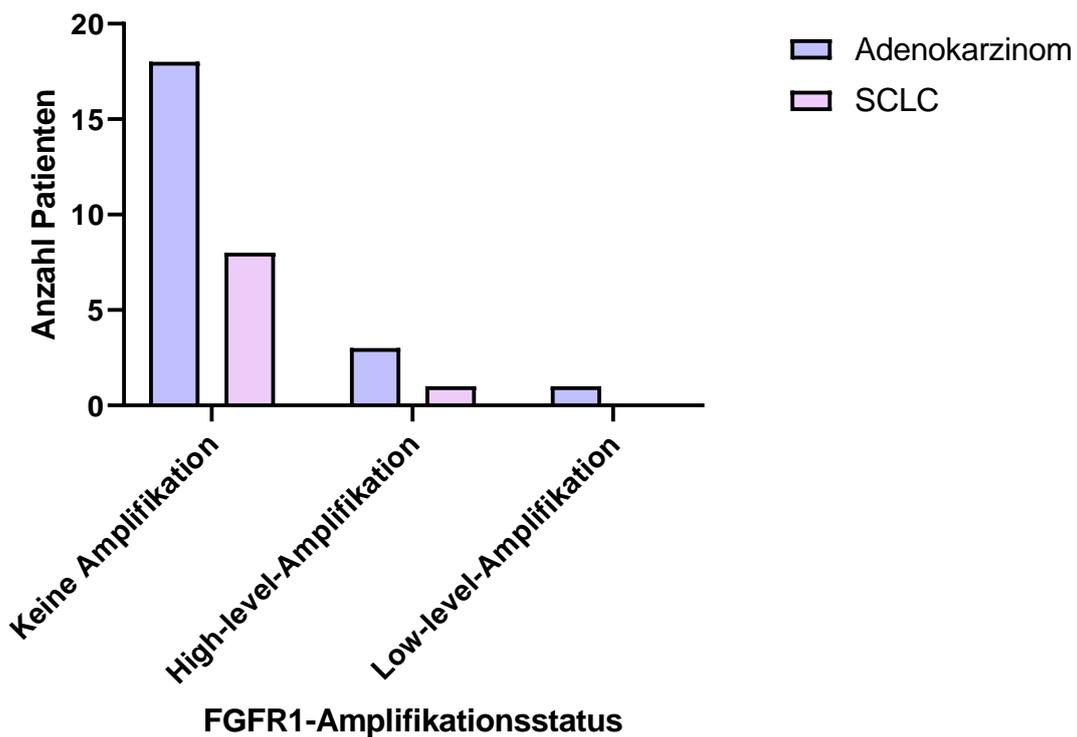


Abbildung 21: Verteilung der *FGFR1*-Amplifikationen auf die histologischen Subtypen

Mittels LogRank(Mantel-Cox)-Test ließ sich keine Signifikanz zwischen *FGFR1*-Amplifikationsstatus und dem Gesamtüberleben erzielen (Abb. 22).

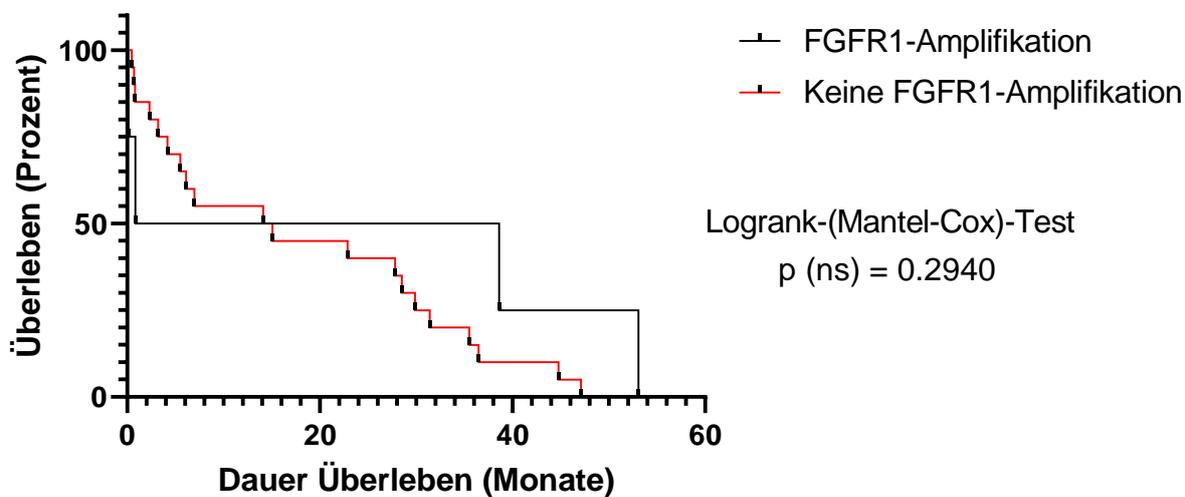


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf den *FGFR1*-Amplifikationsstatus

Tabelle 16 *FGFR1*-Status in Bezug zum Metastasenvolumen

<i>FGFR1</i> -Status	Metastasenvolumen (Mittel ± SD, cm ³)	95% KI (cm ³)
Keine Amplifikation	18,12* ± 3,67	[10,41; 25,82]
Amplifikation	49,43* ± 12,85	[0; 104,73]

* p = 0,03

Tabelle 16 zeigt die Metastasenvolumina in Bezug auf den *FGFR1*-Amplifikationsstatus. Mittels Chi-Quadrat-Test konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden (*FGFR1*-mutierte Metastasen wiesen ein signifikant höheres Volumen auf als solche ohne Amplifikation). Dieser Zusammenhang ist auch in Abb. 23 dargestellt. Hier finden sich die Werte der Metastasengröße in Bezug auf den Amplifikationsstatus nebeneinander dargestellt.

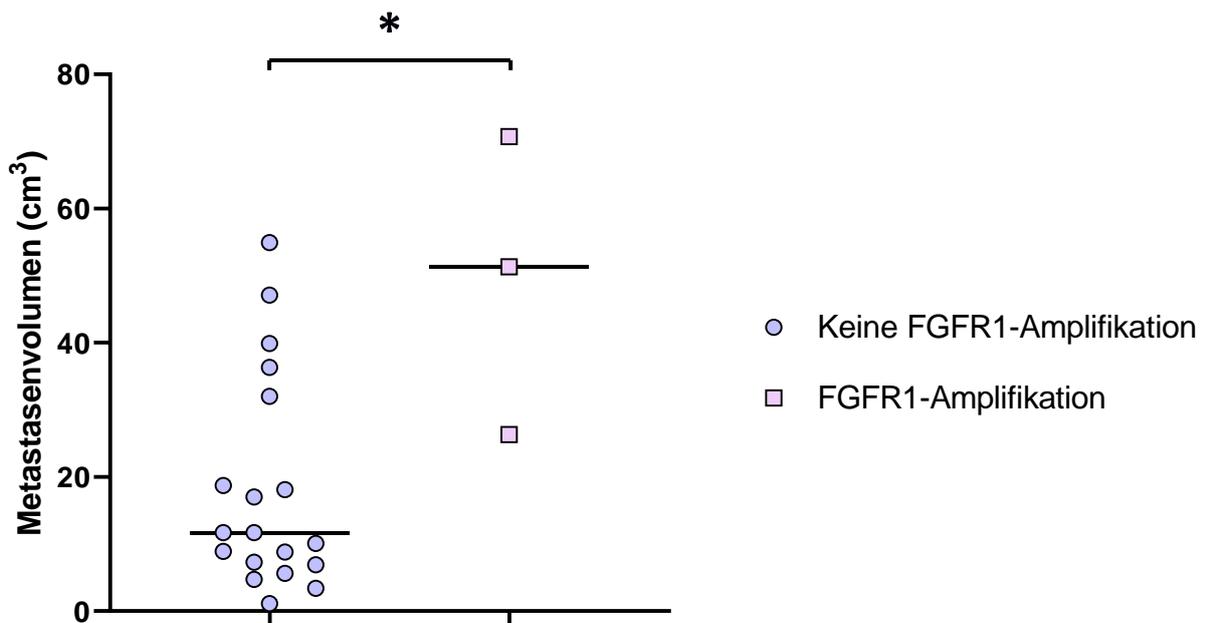


Abbildung 23: Metastasenvolumen in Bezug zum *FGFR1*-Amplifikationsstatus

Metastasen mit *FGFR1*-Amplifikation zeigen ein signifikant höheres Volumen als Metastasen ohne *FGFR1*-Amplifikation (Median jeweils markiert). Dargestellt sind nur die Fälle, in denen Metastasenvolumina ermittelt werden konnten.

*p = 0,03

3.10.3 ALK

Von 32 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *ALK*-Mutationsstatus vor, bei allen 32 Patienten (100%) fand sich keine Translokation.

3.10.4 ROS1

Von 28 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *ROS1*-Mutationsstatus vor, bei allen 28 Patienten (100%) fand sich keine Translokation. Abbildung 24 zeigt eine FISH-Fotografie eines nicht translozierten Tumorgewebes.

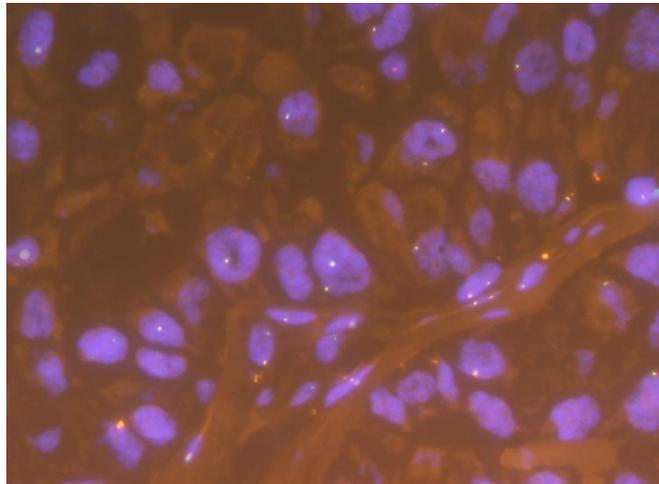


Abbildung 24 *ROS1*-FISH-Fotografie ohne Nachweis einer Translokation

(Patientin Nr. 10, 71jährige Frau)

Die Signale der 3'-Sonde und der 5'-Sonde liegen unmittelbar nebeneinander. Es bilden sich Fusionssignale; eine Translokation liegt folglich nicht vor.

3.10.5 RET

Von 29 Patienten lagen Ergebnisse bzgl. des *RET*-Mutationsstatus vor, bei allen 29 Patienten (100%) fand sich keine Translokation.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisdiskussion

Im dynamischen Umfeld der targetorientierten Onkologie werden gerade häufige Tumorentitäten intensiv beforscht. In diesem Zusammenhang haben sich auch andere Arbeitsgruppen mit molekularen Alterationen beim Lungenkarzinom beschäftigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen nun nachfolgend in das Forschungsumfeld eingebettet werden. Differierende Ergebnisse sollen diskutiert werden.

Eine Arbeitsgruppe um Jünger et al. untersuchte 377 Patienten, denen neurochirurgisch Hirnmetastasen eines Lungenkarzinoms reseziert wurden [25]. Das Kollektiv erlaubte eine Differenzierung nach Metastasen, die entweder 1. als symptomatische Erstmanifestation (wie in der vorliegenden Arbeit), 2. synchron oder 3. metachron auftraten. Da somit teilweise ein ähnliche onkologische Situation untersucht wurde, interessiert der Vergleich der Resultate.

KRAS-Mutationen wurden dort in 17,2% der vergleichbaren Fälle gefunden (15,6% in der vorliegenden Arbeit). Diese Mutationsfrequenz erscheint trotz deutlich größerer Kohorte vergleichbar. Die Frequenzen anderer untersuchter Gene wiesen hingegen deutlichere Differenzen auf (Werte der vorliegenden Arbeit nachfolgend jeweils in Klammern): *EGFR*-Mutationen wurden in 4,0% der Fälle registriert (9,1%), *FGFR1*-Mutationen in 2,0% (16,1%). *MET*-Mutationen fanden sich bei 6,1% der Metastasen (26,7%) [25].

Der z.T. deutliche Unterschied in den Mutationsfrequenzen kann verschiedene Ursachen haben. Im Kollektiv von Jünger et al. fanden sich nur Metastasen nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC). In der vorliegenden Arbeit wurden auch kleinzellige Lungenkarzinome eingeschlossen (SCLC). Da sich das genetische Profil der Entitäten deutlich unterscheidet, sind auch unterschiedliche Mutationsfrequenzen im Gesamtkollektiv zu erwarten.

Zudem wurden knapp 30% der Metastasen dort keiner molekularen Analyse zugeführt, während hier sämtliche Fälle untersucht wurden (auch wenn nicht für jedes Gen bei allen 33 Patienten Ergebnisse vorliegen). Die Einschlusskriterien der Studien sind nicht völlig identisch: so untersuchten Jünger et al. auch Gewebe, das aus Metastasen stammt, die vorher radiotherapeutisch behandelt wurden. Die speziellen Einschlusskriterien der vorliegenden Arbeit bedingen jedoch völlig therapienaive Tumorgewebe in den Metastasen. Auch in diesem Unterschied können Differenzen in den Mutationsfrequenzen begründet liegen.

Eine Erklärung der deutlich differierenden *MET*-Amplifikationen kann in der Auswertung begründet liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden die FISH-Kriterien derart definiert, dass auch intermediate- und low-level-Amplifikationen dokumentiert wurden. Betrachtet man nur die high-level-Amplifikationen, sinkt die Amplifikationshäufigkeit in der vorliegenden Kohorte auf 3,3% und nähert sich somit deutlich den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppe an.

Eine Arbeitsgruppe um Preusser et al. führte Next-generation-sequencing-Untersuchungen (NGS) an einer Kohorte von 76 Adenokarzinom-Hirnmetastasen durch [44]. Diese wurden bezüglich eines Panels aus 48 Genen untersucht, während für *ALK*, *ROS1*, *MET* und *FGFR1* noch FISH-Ergebnisse vorheriger Untersuchungen vorlagen .

Es fanden sich *EGFR*-Mutationen in 3,9% der Fälle [44]. Diese Häufigkeit liegt deutlich unter der der vorliegenden Arbeit, was auch im unterschiedlichen Studiendesign begründet sein kann – untersuchten Preusser et al. doch Hirnmetastasen unabhängig vom Diagnosezeitpunkt (also nicht nur Hirnmetastasen als Erstmanifestation).

Wang et al. untersuchten Hirnmetastasen vom nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom an 61 Patienten [61]. Wie bei Preusser et al. wurde ein Vergleich der Abberationen zwischen Primarius und Metastase durchgeführt. Ebenfalls gleichermaßen erfolgten die Analysen per NGS, in diesem Falle an 416 Genen. Es zeigte sich eine hohe Konkordanz bezüglich des *EGFR*-Mutationsstatus in Primärtumor und Metastase [61]. Auch wenn die *EGFR*-Mutationshäufigkeit beim NSCLC in asiatischen Kohorten höher als in kaukasischen Populationen liegt, ist eine ähnlich hohe Konkordanz auch in europäischen Kohorten zu erwarten.

Die von Preusser et al. gefundene hohe *KRAS*-Mutationsfrequenz von 38,2% [44] konnte so in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings wurden wie bereits beschrieben in dieser Kohorte nur Adenokarzinome eingeschlossen, sodass sich das Studiendesign unterscheidet und folglich auch unterschiedliche Mutationsfrequenzen anzunehmen sind. Preusser et al. stellen mithilfe der COSMIC-Datenbank für die Mutationen des primären Lungenkarzinoms fest, dass die in deren Studie gefundenen *KRAS*-Mutationen in den Metastasen hochsignifikant häufiger als in primären Lungenkarzinomen auftraten [44].

Wang et al. fanden *KRAS*-Mutationen in 18% der primären Lungenkarzinome bzw. in 16% von deren Metastasen [61].

Xie et al. zeigten mit einer komplexen Metaanalyse, dass *FGFR1*-Mutationen häufiger in Plattenepithelkarzinomen (OR 3,60, 95% KI 2,82 – 4,59), bei Rauchern (OR 3,31, 95% KI 2,02 – 5,44) und bei männlichen Patienten (OR 2,05, 95% KI 1,50 – 2,80%) gefunden werden [65]. Die in dieser hier vorliegenden Studie gefundene Gesamtfrequenz an Mutationen des *FGFR1*-Gens lag bei 16%, bezogen auf die Metastasen der Adenokarzinome jedoch bei 13% [65]. Wird die Häufigkeit der Mutationen nur auf die Adenokarzinom-Metastasen bezogen, erlaubt dies einen Vergleich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Preusser. Hier fand sich eine *KRAS*-Mutationsfrequenz von 15,3%, was sich somit mit unseren Daten deckt [44]. Zudem zeigte sich eine höhere Mutationshäufigkeit in den Metastasen als in den primären Lungenkarzinomen. Ein gleichartiger Zusammenhang wäre also zumindest auf bei einer Korrelation der hier untersuchten Metastasen im Vergleich mit den Primärtumoren anzunehmen. Ein Zusammenhang zwischen dem *FGFR1*-Status und dem Geschlecht ließ sich nicht signifikant darstellen [43].

In unserer Studie fanden sich Mutationen von *EGFR*, *KRAS*, *FGFR1* und *MET*. Bezüglich *EML4/ALK*, *ROS1* bzw. *RET1* wurden in den Proben, für die Daten gewonnen werden konnten, keine Abberationen festgestellt. Folglich ist eine niedrige Mutationsfrequenz anzunehmen, was sich mit den Untersuchungen von Jünger et al. sowie der Literaturlage deckt [25, 54, 58, 63].

In dieser Studie wurden auch simultan auftretende Mutationen in verschiedenen Genen in derselben Metastase untersucht. Es fand sich eine Metastase mit kombinierter *EGFR/KRAS*-Mutation. Drei Metastasen wiesen eine kombinierte *EGFR/MET*-Mutation auf.

Castiglione et al. untersuchten eine Kohorte von 86 Patienten mit einem primären Lungenkarzinom, unter denen sie ausschließlich bei den Fällen in fortgeschrittenem Stadium (IIIB/IV) 26 *MET*-Exon-14-Skipping-Mutationen sowie 24 high-level-Amplifikationen feststellen konnten [12]. Als Vergleichskohorte diente das Gewebe von 25 primären Adenokarzinomen in niedrigerem, noch operablen Stadium. Innerhalb der *MET*-mutierten Gewebeproben fanden sich zwei kombinierte *EGFR/MET*-Mutationen sowie eine kombinierte *KRAS/MET*-Mutation. Es wurde auch *FGFR1* untersucht; es fand sich dort eine kombinierte *FGFR1/MET*-Amplifikation, die so in unserer Untersuchung nicht auftrat. Über das von uns gefundene Auftreten einer *FGFR1/KRAS*-Komutation wird dort nicht berichtet, ebenso wenig wie in der sonstigen uns zugänglichen Literatur.

Die Datenlage über molekulare Charakteristika bei Metastasen des kleinzelligen Lungenkarzinoms ist eingeschränkter als beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Die hohe biologische Aggressivität der Entität bedingt das häufige Vorliegen inoperabler Krankheitsstadien bei Erstdiagnose mit der damit einhergehenden geringen Verfügbarkeit von Tumorgewebe zur molekularen Untersuchung. Die noch dürftigen Kenntnisse zu potentiellen Zielstrukturen einer molekularen Krebstherapie schränken die Behandlung dieser sehr aggressiven Tumorentität im Stadium der Metastasierung stark ein [21, 36]. Die hier dargestellten *MET*- und *FGFR1*-Mutationen im SCLC-Metastasengewebe wurden so schon beschrieben und fügen sich insofern gut ins aktuelle Forschungsumfeld ein [18]. Die verhältnismäßig seltene Resektion von Metastasengewebe eines kleinzelligen Lungenkarzinoms lässt die Erkenntnisse dieser Arbeit als wertvoll erscheinen, um potentielle Zielstrukturen einer molekularen Therapie zu identifizieren (also dementsprechend beispielsweise *FGFR1* und *MET*). Weiterführende Forschung mit ggf. größeren Kohorten wäre hier angezeigt.

Die ungünstige Prognose bei Hirnmetastasierung eines Lungenkarzinoms konnte vielfach gezeigt werden [24, 41, 42], zudem wurde dies auch für das Auftreten von Hirnmetastasen als Erstmanifestation bestätigt [25]. Insofern fügt sich die vorliegende Arbeit diesbezüglich in die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen ein.

In der vorliegenden Studie wurden nur Patienten mit Metastasen als Erstmanifestation betrachtet; ein metachrones Setting oder Patienten ohne Metastasen kamen also nicht vor. Andere Arbeitsgruppen verglichen in ihren Studien das Überleben zwischen verschiedenen Zeitpunkten der Metastasendiagnose [40, 49].

Es zeigte sich, dass das Überleben bei metachronen Metastasen signifikant schlechter als bei synchronen Metastasen bei Erstdiagnose war [40]. Beachtet werden muss hierbei, dass die Patienten mit EGFR-TKI behandelt wurden, sodass eventuelle metachrone Metastasen also unter laufender Therapie auftraten.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte darlegen, dass das Auftreten metachroner Metastasen im Verlaufe einer EGFR-TKI-Therapie mit einem signifikant schlechteren Überleben vergesellschaftet war als das Fehlen von Hirnmetastasen [14]. Synchronen Metastasen waren eher mit einer positiven Rauchanamnese und dem Fehlen neurologischer Symptome verbunden [14].

In Bezug auf einige Parameter (Vorliegen von Hirndruckzeichen bei Erstdiagnose, Rauchstatus, Überleben in Zusammenhang mit dem histologischen Typ) konnten in der vorliegenden Studie keine signifikanten Assoziationen dargestellt werden. Weitere Forschung diesbezüglich mit größeren Patientenkohorten erscheint sinnvoll, um hier möglicherweise noch signifikante Aussagen und somit valide Erkenntnisse gewinnen zu können.

4.2 Methodendiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Hirnmetastasen vom Lungenkarzinom derjenigen Patienten untersucht, deren Tumorerkrankung sich erstmals durch eine neurologische Symptomatik geäußert hatte. Es wurden konventionell-lichtmikroskopische sowie molekularpathologische Untersuchungen angestellt, um Informationen bezüglich Histologie und Mutationsstatus ausgewählter Gene zu erhalten. Zudem wurden Überlebensdaten sowie klinische Informationen erhoben, die in Beziehung zu den biologischen Eigenschaften der Metastasen auf eventuelle Signifikanzen hin untersucht wurden. Aus diesem Studiendesign heraus ergeben sich gewisse Limitationen der Studie, die hier diskutiert werden sollen.

4.2.1 Kohortengröße

Es lag Material von insgesamt 33 Hirnmetastasen vor. Diese Kohortengröße entstand durch systematische Analyse des Eingangsgutes eines neuropathologischen Instituts mit mehreren Einsendern über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren. Wie bei derartigen Studiendesigns nicht unüblich, reduzierte sich die letztlich ausgewertete Patientenzahl von eingangs 44 geeignet erscheinenden Fallkonstellationen auf die zuvor erwähnten 33 Patienten. Wesentlich dafür verantwortlich waren hierbei vor allem fehlende essentielle Informationen (beispielsweise in Bezug auf genetische Tumoralterationen) oder die nachträgliche Kenntnis über Ausschlusskriterien (z.B. indem nachträglich bekannt wurde, dass doch schon zum OP-Zeitpunkt ein primäres Lungenkarzinom bekannt war).

In Bezug auf ähnlich gelagerte Fragestellungen haben andere Arbeitsgruppen größere Kohorten untersucht [25, 61]. Eine höhere Kohortengröße würde möglicherweise Signifikanzen in tatsächlich vorhandenen, in der vorliegenden Studie aber (noch) nicht signifikanten Korrelationen zeigen. Höhere statistische Sicherheit durch klar signifikante (oder gar hochsignifikante) Zusammenhänge und Korrelationen ermöglichte dann auch eine validere Abschätzung der Prognose derartiger Fälle und wäre damit ein Hilfsmittel im klinischen Handling solcher Fallkonstellationen. Nachfolgende Untersuchungen mit größeren Fallkohorten sind hier ratsam und sinnvoll.

4.2.2 Fehlende oder unvollständige Falldaten

Nicht zu allen erhobenen Parametern liegen bezüglich des jeweiligen biologischen oder klinischen Fallaspektes Informationen und Daten zu jedem in die Studie eingeschlossenen Patienten vor. Während dies teilweise zu Studienausschluss führte (indem beispielsweise nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, dass nicht doch zum Zeitpunkt der Resektion bereits ein Lungenkarzinom bekannt war), wurde bei anderen Parametern (z.B. einem nicht auswertbaren Mutationsstatus in Bezug auf ein bestimmtes einzelnes Gen) ein Studieneinschluss vorgenommen und der jeweilige Parameter aus der Statistik herausgelassen und nicht gezählt.

Für die untersuchten Gene liegen Informationen für zwischen 28 Fällen (*ROS1* - 84,4%) und 33 Fällen (*EGFR* – 100%) vor. Hierbei handelt es sich um Informationen, die im neuropathologischen Institut aus den Gewebeproben gewonnen werden konnten. Bei den klinischen Parametern lagen teils weniger umfassende Informationen vor. So war von 26 Patienten das Vorliegen von Hirndruckzeichen bei Erstdiagnose und von 14 Patienten der Raucherstatus bekannt.

Je vollständiger derartige Parameter erhoben werden können, umso einfacher lassen sich biologisch-onkologisch-klinisch tatsächlich vorhandene Korrelationen auch statistisch beweisbar belegen. Zwangsläufig reduziert also das Fehlen bestimmter Informationen die Aussagekraft der jeweiligen Statistik. Insofern wäre in Bezug auf bestimmte Fallparameter eine vollständigere Datenlage wünschenswert gewesen. Hier ist bei Nachfolgeuntersuchungen zu hoffen, dass möglichst umfassende Daten gewonnen werden können, um z.B. auch die Aussagekraft bezüglich prognostischer Abschätzungen zu erhärten.

4.2.3 Fehlende Korrelationen zwischen Primärtumor und Hirnmetastase

In der vorliegenden Arbeit wurde das Material der Hirnmetastasen mit histologischen und molekularpathologischen Methoden untersucht, ohne dass Gewebe des primären Lungenkarzinoms vorlag. Eine Erklärung dieser methodischen Limitation ist das Studiendesign an sich: es wurden explizit Patienten gesucht, deren Primärtumor zum OP-Zeitpunkt noch nicht bekannt war und folglich auch nicht behandelt wurde. Deswegen konnte auch keine histologische Sicherung des Primums erfolgt sein. In Anbetracht des also bei Erstdiagnose fortgeschrittenen Krankheitsstadiums erfolgte nicht mehr bei allen Fällen eine Resektion des Primärtumors, zumal eine kurative Intention in derartigem Setting nicht mehr verfolgt werden kann [28]. So lag schon im Studiendesign an sich eine recht ungünstige Voraussetzung für eine (grundsätzlich wünschenswerte) Korrelation molekularpathologischer Tumorparameter zwischen Metastase und Primum begründet.

Ein metastasiertes Lungenkarzinom stellt ein hohes Krankheitsstadium einer onkologischen Erkrankung mit hoher Letalität dar. Einer der eingeschlossenen Patienten verstarb am vierten postoperativen Tag des neurochirurgischen Eingriffs. Hier war also nur sehr kurz bekannt, dass überhaupt ein onkologisches Leiden vorlag. Umso schwieriger und unwahrscheinlicher ist also eine erfolgreiche bioptische Sicherung eines Primärtumors. Insofern musste sich die Primariussuche in den meisten Fällen auf die gängigen histopathologischen Hilfsmittel der Metastasendiagnostik beschränken. Morphologie und Immunphänotyp wiesen hier den Weg in Richtung eines Primärtumors des Respirationstraktes.

Zudem wird eine derartige Korrelation auch dadurch eingeschränkt, dass – selbst wenn es zu einer Resektion oder zumindest einer histologischen Sicherung gekommen sein sollte – das Gewebe einer pulmonalen Läsion in einem allgemeinpathologischen Institut untersucht wird. Folglich ist der Neuropathologie mangels klinischer Hinweise auf den allgemeinpathologischen Befunder nicht immer der Hinweis zugänglich, wo Tumormaterial des Primärtumors angefordert werden könnte.

Prinzipiell wäre eine möglichst umfassende Korrelation beispielsweise des Mutationsstatus der untersuchten Gene interessant und auch wertvoll, um genauere Kenntnisse über die Tumorbilogie von metastatischen Prozessen zu gewinnen. Gegebenenfalls wäre ein angepasstes Studiendesign nachfolgender Untersuchungen noch besser geeignet, solche Korrelationen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Tumoren der Lunge gehören zu den häufigsten Todesursachen und nehmen unter den Krebstodesfällen in Deutschland Platz 1 (Männer) bzw. Platz 2 (Frauen) ein. Zusätzlich zur primären Tumorerkrankung treten häufig Metastasen auf. Diese können gleichzeitig mit der Diagnose des Primärtumors (synchron) oder im Verlauf der Erkrankung (metachron) auftreten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Metastasen eines Lungenkarzinoms im zentralen Nervensystem (ZNS), die erstmals über eine neurologische Symptomatik auffällig wurden. Zum Zeitpunkt der Resektion war also noch kein Primärtumor bekannt. Über dieses Patientenkollektiv lagen bisher nur spärlich molekulare Daten zu Metastasen im zentralen Nervensystem vor.

Es wurden 33 Patienten in dieser Studie untersucht (23 Männer, 10 Frauen). Das Tumormaterial wurde konventionell-histologisch sowie molekularpathologisch untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse klinischer sowie radiologischer Patienteninformationen, um Erkenntnisse über die Metastasengröße, den Rauchstatus, Überlebensdaten und das Vorliegen von Hirndruckzeichen bei Erstdiagnose zu gewinnen.

Histologisch fanden sich überwiegend Adenokarzinome (73%), die übrigen Metastasen stammten von kleinzelligen Lungenkarzinomen (27%). Metastasen von Plattenepithelkarzinomen waren im Untersuchungsmaterial nicht nachzuweisen.

27 Metastasen lagen supratentoriell (82%) und 6 Metastasen (18%) infratentoriell. Bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten fanden sich singuläre Metastasen (85%), ansonsten lagen multiple Hirnmetastasen vor (15%).

Das mittlere Gesamtüberleben der Patienten nach Erstdiagnose lag bei 10,6 Monaten.

Auf molekularer Ebene fanden sich in 16% der untersuchten Proben der Metastasen *KRAS*-Mutationen, 9% der Tumoren wiesen *EGFR*-Mutationen auf. Es wurden 5 *FGFR1*-Amplifikationen gefunden (16%), diese waren signifikant mit einem erhöhten Metastasenvolumen vergesellschaftet. Darüber hinaus fanden sich insgesamt 8 *MET*-Amplifikationen (27%), die signifikant häufiger bei den weiblichen Patienten auftraten. Translokationen von *EML4/ALK*, *ROS1* bzw. *RET* wurden nicht gefunden.

Es fand sich eine Metastase mit kombinierter *EGFR/KRAS*-Mutation. Drei Metastasen wiesen eine kombinierte *EGFR/MET*-Mutation auf, zudem wurde eine bisher nicht beschriebene *FGFR1/KRAS*-Mutation detektiert.

Damit erweitert die vorliegende Arbeit das Verständnis molekularer Veränderungen bei Patienten mit ZNS-Metastasen als Erstmanifestation eines Lungenkarzinomes.

6 Literaturverzeichnis

1. Ali A, Goffin JR, Arnold A, Ellis PM (2013) Survival of patients with non-small-cell lung cancer after a diagnosis of brain metastases. *Curr Oncol* 20. doi: 10.3747/co.20.1481
2. Aljohani HM, Aittaleb M, Furgason JM, Amaya P, Deeb A, Chalmers JJ, Bahassi EM (2018) Genetic mutations associated with lung cancer metastasis to the brain. *Mutagenesis* 33. doi: 10.1093/mutage/gey003
3. do Amaral DN, Lategahn J, Fokoue HH, da Silva EMB, Sant'Anna CMR, Rauh D, Barreiro EJ, Laufer S, Lima LM (2019) A novel scaffold for EGFR inhibition: Introducing N-(3-(3-phenylureido)quinoxalin-6-yl) acrylamide derivatives. *Sci Rep* 9. doi: 10.1038/s41598-018-36846-7
4. Ando T, Kage H, Saito M, Amano Y, Goto Y, Nakajima J, Nagase T (2018) Early stage non-small cell lung cancer patients need brain imaging regardless of symptoms. *Int J Clin Oncol* 23. doi: 10.1007/s10147-018-1254-y
5. Babu Koyyala V, Batra U, Jain P, Sharma M, Goyal P, Medisetty P, Jajodia A, Maheshwari U (2018) Frequency of T790M mutations after progression on epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in metastatic non-small cell lung cancer in Indian patients: Real-time data from tertiary cancer hospital. *Lung India* 35. doi: 10.4103/lungindia.lungindia_451_17
6. Bacha S, Cherif H, Rabaa D, Habibech S, Cheikhrouhou S, Racil H, Chaouch N, Megdiche ML, Chabbou A (2018) Brain metastases of non-small cell lung cancer: Prognostic factors and management. *Tunisie Medicale* 96
7. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland
8. Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, Legrain M, Menecier B, Wihlm JM, Massard G, Quoix E, Oudet P, Gaub MP (2008) MET gene copy number in non-small cell lung cancer: Molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol* 3. doi: 10.1097/JTO.0b013e318168d9d4
9. Berghoff AS, Bartsch R, Wöhrer A, Streubel B, Birner P, Kros JM, Brastianos PK, von Deimling A, Preusser M (2014) Predictive molecular markers in metastases to the central nervous system: recent advances and future avenues. *Acta Neuropathol.* 128
10. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, Van Allen EM, Lawrence MS, Horowitz PM, Cibulskis K, Ligon KL, Taberner J, Seoane J, Martinez-Saez E, Curry WT, Dunn IF, Paek SH, Park SH, McKenna A, Chevalier A, Rosenberg M, Barker FG, Gill CM, Van Hummelen P, Thorner AR, Johnson BE, Hoang MP, Choueiri TK, Signoretti S, Sougnez C, Rabin MS, Lin NU, Winer EP, Stemmer-Rachamimov A, Meyerson M, Garraway L, Gabriel S, Lander ES, Beroukhi R, Batchelor TT, Baselga J, Louis DN, Getz G, Hahn WC (2015) Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov* 5. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0369

11. Brastianos PK, Curry WT, Oh KS (2013) Clinical discussion and review of the management of brain metastases. *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 11
12. Castiglione R, Alidousty C, Holz B, Wagener S, Baar T, Heydt C, Binot E, Zupp S, Kron A, Wolf J, Merkelbach-Bruse S, Reinhardt HC, Buettner R, Schultheis AM (2019) Comparison of the genomic background of MET-altered carcinomas of the lung: biological differences and analogies. *Mod Pathol* 32. doi: 10.1038/s41379-018-0182-8
13. Chalela R, Curull V, Enríquez C, Pijuan L, Bellosillo B, Gea J (2017) Lung adenocarcinoma: From molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. *J. Thorac. Dis.* 9
14. Chen K, Zhang F, Fan Y, Cheng G (2020) Lung-molgpa index predicts survival outcomes of non-small-cell lung cancer patients with synchronous or metachronous brain metastases. *Onco Targets Ther* 13. doi: 10.2147/OTT.S255478
15. Cooks T, Theodorou SDP, Paparouna E, Rizou S V., Myriantopoulos V, Gorgoulis VG, Pateras IS (2019) Immunohisto(cyto)chemistry: An old time classic tool driving modern oncological therapies. *Histol. Histopathol.* 34
16. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G (2018) KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer* 124
17. Gaber R, Watermann I, Kugler C, Reinmuth N, Huber RM, Schnabel PA, Vollmer E, Reck M, Goldmann T (2014) Correlation of EGFR expression, gene copy number and clinicopathological status in NSCLC. *Diagn Pathol* 9. doi: 10.1186/s13000-014-0165-0
18. Gelsomino F, Rossi G, Tiseo M (2014) MET and small-cell lung cancer. *Cancers (Basel).* 6
19. Griesinger F, Roeper J, Pöttgen C, Willborn KC, Eberhardt WEE (2018) Brain metastases in ALK-positive NSCLC - Time to adjust current treatment algorithms. *Oncotarget* 9
20. Heon S, Yeap BY, Britt GJ, Costa DB, Rabin MS, Jackman DM, Johnson BE (2010) Development of central nervous system metastases in patients with advanced non-small cell lung cancer and somatic EGFR mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1588
21. Horn L, Reck M, Spigel DR (2016) The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* 21. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0523
22. Inamura K (2017) Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol* 7. doi: 10.3389/fonc.2017.00193
23. Ji Z, Bi N, Wang J, Hui Z, Xiao Z, Feng Q, Zhou Z, Chen D, Lv J, Liang J, Fan C, Liu L, Wang L (2014) Risk factors for brain metastases in locally advanced non-small cell lung cancer with definitive chest radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.02.025

24. Johung KL, Yeh N, Desai NB, Williams TM, Lautenschlaeger T, Arvold ND, Ning MS, Attia A, Lovly CM, Goldberg S, Beal K, Yu JB, Kavanagh BD, Chiang VL, Camidge DR, Contessa JN (2016) Extended survival and prognostic factors for patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastasis. *J Clin Oncol* 34. doi: 10.1200/JCO.2015.62.0138
25. Jünger ST, Schödel P, Ruess D, Ruge M, Brand JS, Wittersheim M, Eich ML, Schmidt NO, Goldbrunner R, Grau S, Proescholdt M (2020) Timing of development of symptomatic brain metastases from non-small cell lung cancer: Impact on symptoms, treatment, and survival in the era of molecular treatments. *Cancers (Basel)* 12:1–10. doi: 10.3390/cancers12123618
26. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A (2017) *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Berlin
27. Kienast Y, Von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F (2010) Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 16. doi: 10.1038/nm.2072
28. Krebsgesellschaft D (2018) S3-Leitlinie Lungenkarzinom. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf
29. v. Laffert M, Warth A, Penzel R, Schirmacher P, Jonigk D, Kreipe H, Schildhaus HU, Merkelbach-Bruse S, Büttner R, Reu S, Kerler R, Jung A, Kirchner T, Wölfel C, Petersen I, Rodriguez R, Jochum W, Bartsch H, Fisseler-Eckhoff A, Berg E, Lenze D, Dietel M, Hummel M (2013) Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a multi-centre ALK-testing. *Lung Cancer* 81. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.04.015
30. Lai J, Du B, Wang Y, Wu R, Yu Z (2018) Next-generation sequencing of circulating tumor DNA for detection of gene mutations in lung cancer: Implications for precision treatment. *Onco Targets Ther* 11. doi: 10.2147/OTT.S174877
31. De Las Casas CM, Garzón-Ibañez M, Jordana-Ariza N, Viteri-Ramírez S, Moya-Horno I, Karachaliou N, Yeste Z, Campos R, Villatoro S, Balada-Bel A, García-Peláez B, Reguart N, Teixidó C, Jantús E, Calabuig S, Aguado C, Giménez-Capitán A, Román-Lladó R, Pérez-Rosado A, Catalán MJ, Bertrán-Alamillo J, García-Román S, Rodríguez S, Alonso L, Aldeguer E, Martínez-Bueno A, González-Cao M, Hernandez AA, Garcia-Mosquera J, De Los Llanos Gil M, Fernandez M, Rosell R, Molina-Vila MÁ (2019) Prospective analysis of liquid biopsies of advanced non-small cell lung cancer patients after progression to targeted therapies using GeneReader NGS platform. *Transl Cancer Res* 8. doi: 10.21037/tcr.2018.10.12
32. Lester SC, Taksler GB, Kuremsky JG, Lucas JT, Ayala-Peacock DN, Randolph DM, Bourland JD, Laxton AW, Tatter SB, Chan MD (2014) Clinical and economic outcomes of patients with brain metastases based on symptoms: An argument for routine brain screening of those treated with upfront radiosurgery. *Cancer* 120. doi: 10.1002/cncr.28422
33. Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T (2010) Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer* 10. doi: 10.1186/1471-2407-10-376

34. Liao L, Ji X, Ge M, Zhan Q, Huang R, Liang X, Zhou X (2018) Characterization of genetic alterations in brain metastases from non-small cell lung cancer. *FEBS Open Bio* 8. doi: 10.1002/2211-5463.12501
35. Ludovini V, Ricciuti B, Tofanetti F, Mencaroni C, Giannarelli D, Sidoni A, Reda M, Siggillino A, Baglivo S, Crino L, Bellezza G, Chiari R, Metro G (2018) KRAS mutation and DNA repair and synthesis genes in non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*. doi: 10.3892/mco.2018.1731
36. Lukas R V., Gondi V, Kamson DO, Kumthekar P, Salgia R (2017) State-of-the-art considerations in small cell lung cancer brain metastases. *Oncotarget* 8
37. Luo W, Rao M, Qu J, Luo D (2018) Applications of liquid biopsy in lung cancer-diagnosis, prognosis prediction, and disease monitoring. *Am. J. Transl. Res.* 10
38. Ma C, Wei S, Song Y (2011) T790M and acquired resistance of EGFR TKI: A literature review of clinical reports. *J. Thorac. Dis.* 3
39. Michels S, Massutí B, Schildhaus HU, Franklin J, Sebastian M, Felip E, Grohé C, Rodriguez-Abreu D, Abdulla DSY, Bischoff H, Brandts C, Carcereny E, Corral J, Dingemans AMC, Pereira E, Fassunke J, Fischer RN, Gardizi M, Heukamp L, Insa A, Kron A, Menon R, Persigehl T, Reck M, Riedel R, Rothschild SI, Scheel AH, Scheffler M, Schmalz P, Smit EF, Limburg M, Provencio M, Karachaliou N, Merkelbach-Bruse S, Hellmich M, Nogova L, Büttner R, Rosell R, Wolf J (2019) Safety and Efficacy of Crizotinib in Patients With Advanced or Metastatic ROS1-Rearranged Lung Cancer (EUCROSS): A European Phase II Clinical Trial. *J Thorac Oncol* 14. doi: 10.1016/j.jtho.2019.03.020
40. Ouyang W, Yu J, Zhou Y, Xu Y, Li J, Gong J, Zhang J, Xie C (2020) Metachronous brain metastasis in patients with EGFR-mutant NSCLC indicates a worse prognosis. *J Cancer* 11. doi: 10.7150/jca.46462
41. Page S, Milner-Watts C, Perna M, Janzic U, Vidal N, Kaudeer N, Ahmed M, McDonald F, Locke I, Minchom A, Bhosle J, Welsh L, O'Brien M (2020) Systemic treatment of brain metastases in non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* 132
42. Peters S, Bexelius C, Munk V, Leighl N (2016) The impact of brain metastasis on quality of life, resource utilization and survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Treat. Rev.* 45
43. Preusser M, Berghoff AS, Berger W, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C, Widhalm G, Dieckmann K, Wöhrer A, Hackl M, von Deimling A, Streubel B, Birner P (2014) High rate of FGFR1 amplifications in brain metastases of squamous and non-squamous lung cancer. *Lung Cancer* 83. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.004
44. Preusser M, Berghoff AS, Koller R, Zielinski CC, Hainfellner JA, Liebmann-Reindl S, Popitsch N, Geier CB, Streubel B, Birner P (2015) Spectrum of gene mutations detected by next generation exome sequencing in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 51. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.107

45. Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, Berghoff AS, Birner P, Bartsch R, Marosi C, Zielinski C, Mehta MP, Winkler F, Wick W, Von Deimling A (2012) Brain metastases: Pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol.* 123
46. Preusser M, Streubel B, Berghoff AS, Hainfellner JA, von Deimling A, Widhalm G, Dieckmann K, Wöhrer A, Hackl M, Zielinski C, Birner P (2014) Amplification and overexpression of CMET is a common event in brain metastases of non-small cell lung cancer. *Histopathology* 65. doi: 10.1111/his.12475
47. Preusser M, Winkler F, Valiente M, Manegold C, Moyal E, Widhalm G, Tonn JC, Zielinski C (2018) Recent advances in the biology and treatment of brain metastases of non-small cell lung cancer: Summary of a multidisciplinary roundtable discussion. *ESMO Open* 3
48. Rangachari D, Yamaguchi N, VanderLaan PA, Folch E, Mahadevan A, Floyd SR, Uhlmann EJ, Wong ET, Dahlberg SE, Huberman MS, Costa DB (2015) Brain metastases in patients with EGFR-mutated or ALK-rearranged non-small-cell lung cancers. *Lung Cancer* 88. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.01.020
49. Reddy SP, Dowell JE, Pan E (2020) Predictors of prognosis of synchronous brain metastases in small-cell lung cancer patients. *Clin Exp Metastasis* 37. doi: 10.1007/s10585-020-10040-4
50. Riihimäki M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, Hemminki K (2018) Clinical landscape of cancer metastases. *Cancer Med* 7. doi: 10.1002/cam4.1697
51. Schildhaus HU, Deml KF, Schmitz K, Meiboom M, Binot E, Hauke S, Merkelbach-Bruse S, Büttner R (2013) Chromogenic in situ hybridization is a reliable assay for detection of ALK rearrangements in adenocarcinomas of the lung. *Mod Pathol* 26. doi: 10.1038/modpathol.2013.95
52. Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, Riesner K, Schmitz K, Binot E, Paggen E, Albus K, Schulte W, Ko YD, Schlesinger A, Ansén S, Engel-Riedel W, Brockmann M, Serke M, Gerigk U, Huss S, Göke F, Perner S, Hekmat K, Frank KF, Reiser M, Schnell R, Bos M, Mattonet C, Sos M, Stoelben E, Wolf J, Zander T, Buettner R (2012) Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high-and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 25. doi: 10.1038/modpathol.2012.102
53. Schildhaus HU, Schultheis AM, Rüschoff J, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schulte W, Ko YD, Schlesinger A, Bos M, Gardizi M, Engel-Riedel W, Brockmann M, Serke M, Gerigk U, Hekmat K, Frank KF, Reiser M, Schulz H, Krüger S, Stoelben E, Zander T, Wolf J, Buettner R (2015) Met amplification status in therapy-naïve adeno- And squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res* 21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0450
54. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ (2014) Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer . *N Engl J Med* 371. doi: 10.1056/nejmoa1406766

55. Siam L, Bleckmann A, Chaung HN, Mohr A, Klemm F, Barrantes-Freer A, Blazquez R, Wolff HA, Lüke F, Rohde V, Stadelmann C, Pukrop T (2015) The metastatic infiltration at the metastasis/brain parenchyma-interface is very heterogeneous and has a significant impact on survival in a prospective study. *Oncotarget* 6. doi: 10.18632/oncotarget.4201
56. Singh M, Manoranjan B, Mahendram S, McFarlane N, Venugopal C, Singh SK (2014) Brain metastasis-initiating cells: Survival of the fittest. *Int. J. Mol. Sci.* 15
57. Singh M, Venugopal C, Tokar T, Brown KR, McFarlane N, Bakhshinyan D, Vijayakumar T, Manoranjan B, Mahendram S, Vora P, Qazi M, Dhillon M, Tong A, Durrer K, Murty N, Hallet R, Hassell JA, Kaplan DR, Cutz JC, Jurisica I, Moffat J, Singh SK (2017) RNAi screen identifies essential regulators of human brain metastasis-initiating cells. *Acta Neuropathol* 134. doi: 10.1007/s00401-017-1757-z
58. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F (2014) First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer . *N Engl J Med* 371. doi: 10.1056/nejmoa1408440
59. Tamura T, Kurishima K, Nakazawa K, Kagohashi K, Ishikawa H, Satoh H H, Hizawa N (2015) Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol* 3. doi: 10.3892/mco.2014.410
60. Thapa B, Lauko A, Desai K, Venur VA, Ahluwalia MS (2018) Novel Systemic Treatments for Brain Metastases From Lung Cancer. *Curr. Treat. Options Neurol.* 20
61. Wang H, Ou Q, Li D, Qin T, Bao H, Hou X, Wang K, Wang F, Deng Q, Liang J, Zheng W, Wu X, Wang X, Shao YW, Mou Y, Chen L (2019) Genes associated with increased brain metastasis risk in non–small cell lung cancer: Comprehensive genomic profiling of 61 resected brain metastases versus primary non–small cell lung cancer (Guangdong Association Study of Thoracic Oncology 1036). *Cancer* 125. doi: 10.1002/cncr.32372
62. Wang K, Ji W, Yu Y, Li Z, Niu X, Xia W, Lu S (2018) FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial–mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer. *Oncogene* 37. doi: 10.1038/s41388-018-0311-3
63. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, Luo X, Wang L, Li H, Zhang Y, Li F, Lu Y, Lu Q, Xu J, Garfield D, Shen L, Ji H, Pao W, Sun Y, Chen H (2012) RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 30. doi: 10.1200/JCO.2012.44.1477
64. Winkler F (2015) The brain metastatic niche. *J. Mol. Med.* 93
65. Xie FJ, Lu HY, Zheng QQ, Qin J, Gao Y, Zhang YP, Hu X, Mao WM (2016) The clinical pathological characteristics and prognosis of FGFR1 gene amplification in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Onco Targets Ther* 9. doi: 10.2147/OTT.S91848

7 Danksagungen

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Molekulare Charakterisierung von Hirnmetastasen als Erstmanifestation beim Lungenkarzinom

im Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. h.c. Christian Mawrin

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

9 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

10 Anhang

10.1 Liste der verwendeten Laborgeräte

Thermomixer	Thermomixer Eppendorf comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer	Bio photometer	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Maschine	PTC 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gelelektrophorese	Multiphor II	Pharmacia Biotech (GE Healthcare Life Sciences), Uppsala, Schweden
TMA-Gerät	ATA-27	AlphaMetrix, Rödermark
DNA-Sequenzier	ABI 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

10.2 Liste der verwendeten Laborkits, Reagenzien und Chemikalien

Xylolersatz	Roticlear	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DNA-Präparation	NucleoSpin Tissue (Kit)	Macherey-Nagel, Düren
Photometer-Wasser	LiChrosolv Water	Merck KGaA, Darmstadt
PCR-Reinigungskit	Gene JET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bindepuffer	Binding-Buffer	Qiagen, Venlo, Niederlande
Polymerase	Hot Star Taq Polymerase	Qiagen, Venlo, Niederlande

10.3 Protokoll HE-Färbung

1. Entparaffinierung 3x ProTaq Clear je 10 min
2. 2x 100% Ethanol je 5 min
3. 2x 96% Ethanol je 5 min
4. 70% Ethanol 5 min
5. Mit Wasser spülen
6. Kernfärbung mit Hämatoxylin 5 min
7. Mit Wasser spülen
8. Differenzierung in HCl-Ethanol (kurz)
9. Mit Wasser spülen, dann warmes Wasser zum Bläuen der Kerne
10. 1% Eosin 3 min
11. Mit Wasser spülen
12. 70% Ethanol 5 min
13. 2x 96% Ethanol je 5 min
14. 2x 100% Ethanol je 5 min
15. 3x ProTaq Clear je 5 min
16. Eindecken mit Paramount Fa. Quartett

10.4 Protokoll EVG-Färbung

Grundrezeptur

1. Entparaffinierung 3x ProTaq Clear je 10 min
2. 2x 100% Ethanol je 5 min
3. 2x 96% Ethanol je 5 min
4. 70% Ethanol 5 min
5. Resorcin-Fuchsin bei 60° 15-20 min
6. 2x 70% Ethanol differenzieren, bis keine Farbwolken mehr abgehen
7. Weigerts Eisenhämatoxylin 10 min, Kernfärbung
8. Wasser warm, bläuen
9. Van-Gieson-Gemisch 5 min
10. Fließpapier
11. 96% Ethanol 5 min
12. 2x 100% Ethanol je 5 min
13. 3x ProTaq Clear je 5 min
14. Eindecken mit Paramount Fa. Quartett

10.4.1 Herstellung des Resorcin-Fuchsins

- 4 g Resorcin
- + 2 g basisches Diamantfuchsin
- + 200 ml Aqua dest.

Zum Sieden bringen, während des Kochens 25 ml einer 29% Eisen(II)-Chloridlösung zugeben und noch 5 min kochen, dann abkühlen lassen, filtrieren und Flüssigkeit verwerfen, Niederschlag im Filterpapier in 200 ml 96% Ethanol kochen, Filterpapier entfernen, abkühlen lassen, filtrieren, auffüllen mit 96% Ethanol auf 200 ml, dann 4 ml konzentrierte Salzsäure hinzufügen.

10.4.2 Herstellung des Van-Gieson-Gemischs

- 100 ml gesättigte Pikrinsäure
- + 10 ml 1% wässriges Säurefuchsin

10.4.3 Weigerts Eisenhämatoxylin

Weigert 1 und Weigert 2 zu gleichen Teilen mischen (Fa. Hollborn)

10.5 Protokoll PAS-Färbung

1. Entparaffinierung 3x ProTaq Clear je 10 min
2. 2x 100% Ethanol je 5 min
3. 2x 96% Ethanol je 5 min
4. 70% Ethanol 5 min
5. Mit Wasser spülen
6. 0,8% Periodsäure 10 min
7. 2x 70% Ethanol je 5 min
8. Schiffisches Reagenz 10-15 min
9. SO₂-Wasser 2 x 5 min
10. Wasser 5 min fließend wässern
11. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer 1 min
12. Wasser warm bläuen
13. 70% Ethanol spülen
14. 96% Ethanol 5 min
15. 2x 100% Ethanol je 5 min
16. 3x ProTaq Clear je 5 min
17. Eindecken mit Paramount Fa. Quartett

10.5.1 Zusammensetzung der Periodsäure-Lösung

- 0,8g Periodsäure
- + 100 ml Aqua dest.

10.5.2 Zusammensetzung des SO₂-Gemischs

Stammlösung:

- 9 ml rauchende HCl
- + 3,6 g K-metabisulfit
- + 900 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung

- 50 ml Stammlösung
- + 50 ml n-HCl
- + 900 ml Aqua dest.

10.5.3 n-HCl

- 8,3 ml 37% HCl
- + 100 ml Aqua dest.

10.6 Protokoll IHC-Färbung

10.6.1 Programmierung des Immunfärbeautomaten

Synaptophysin, CK5/6, CK20, Chromogranin A
FLEX offen

Schritt	Kategorie	Reagenz	Inkubation
1	Rinse	Buffer	
2	Enzyme Pretreatment		
3	Rinse	Buffer	
4	Endogenous Enzyme Block	FLEX Peroxidase Block	5
5	Rinse	Buffer	
6	Primary Antibody		
7	Rinse	Buffer	
8	Labelled Polymer	FLEX/HRP	20
9	Rinse	Buffer	
10	Rinse	Buffer	
11	Substrate-Chromogen	FLEX DAB + Sub-Chromo	10
12	Rinse	Buffer	
13	Counterstain	FLEX Hematoxylin	10
14	Rinse	Buffer	
15	Rinse	DI Water	

GFAP**FLEX15 offen**

Schritt	Kategorie	Reagenz	Inkubation
1	Rinse	Buffer	
2	Enzyme Pretreatment		
3	Rinse	Buffer	
4	Endogenous Enzyme Block	FLEX Peroxidase Block	5
5	Rinse	Buffer	
6	Primary Antibody		
7	Rinse	Buffer	
8	Labelled Polymer	FLEX/HRP	15
9	Rinse	Buffer	
10	Rinse	Buffer	
11	Substrate-Chromogen	FLEX DAB + Sub-Chromo	10
12	Rinse	Buffer	
13	Counterstain	FLEX Hematoxylin	10
14	Rinse	Buffer	
15	Rinse	DI Water	

TTF-1, ALK, CK7**FLEX30 offen**

Schritt	Kategorie	Reagenz	Inkubation
1	Rinse	Buffer	
2	Enzyme Pretreatment		
3	Rinse	Buffer	
4	Endogenous Enzyme Block	FLEX Peroxidase Block	5
5	Rinse	Buffer	
6	Primary Antibody		
7	Rinse	Buffer	
8	Labelled Polymer	FLEX/HRP	30
9	Rinse	Buffer	
10	Rinse	Buffer	
11	Substrate-Chromogen	FLEX DAB + Sub-Chromo	10
12	Rinse	Buffer	
13	Counterstain	FLEX Hematoxylin	10
14	Rinse	Buffer	
15	Rinse	DI Water	

10.6.2 Vorbehandlung der IHC-Präparate

Antikörper	Vorbehandlung im Dampfgarer 97 °C 30 min	Verdünnung	Firma
CK 5/6	EDTA	1:50	Dako
CK 7	Target Puffer pH 6,1	1:1000	Dako
CK 20	Zitrat	1:100	Dako
GFAP	ohne	1:10000	Dako
TTF1	Target Puffer pH 9,0	1:200	Zytomed
Synaptophysin	Target Puffer pH 6,1	1:1000	Dako
Chromogranin	Target Puffer pH 6,1	1:800	Dako
ALK	Target Puffer pH 9,0	1:100	Origene

10.7 Liste der verwendeten Primer

EGFR-ex18-F	GCT GAG GTG ACC CTT GTC TC
EGFR-ex18-R	CTC CCC ACC AGA CCA TGA
EGFR-ex19-F	CAT GTG GCA CCA TCT CAC A
EGFR-ex19-R	CAG CTG CCA GAC ATG AGA A
EGFR-ex20-F	ATC GCA TTC ATG CGT CTT CA
EGFR-ex20-R	AGA CCG CAT GTG AGG ATC CT
EGFR-ex21-F	GCA GAG CTT CTT CCC ATG ATG A
EGFR-ex21-R	GCT GAC CTA AAG CCA CCT CCT
KRAS-ex2-F	GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA
KRAS-ex2-R	GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC

10.8 Herstellung der FISH-Präparate

10.8.1 Vorbereitung

1. 2 µm dicke Paraffinschnitte herstellen und auf adhäsive Objektträger aufziehen
2. Schnitte über Nacht bei 56°C inkubieren

10.8.2 Tag 1

3. Tumorgewebe anhand eines markierten HE-Präparates mit Diamantschreiber markieren, gegebenenfalls Normalgewebe abkratzen
4. Ablauf nach Protokoll VP2000 Tag 1 (siehe „Protokoll VP2000 Tag 1 und 2“)
5. Sonde auftragen:
zu verdünnende Sonden von Abbott oder Agilent werden wie folgt vorbereitet:
7 µl Hybridisierungspuffer
2 µl Aqua dest.
1 µl Sonde

3-15 µl Sonde auf den Schnitt geben, passendes Deckgläschen auflegen und mit Fixogum umschließen
6. Denaturierung und Hybridisierung im Hybridizer:
je nach Sonde unterschiedliche Denaturierungstemperatur und –zeit einstellen (siehe Tabelle „FISH-Sonden“)
Hybridisierung bei 37°C über Nacht

10.8.3 Tag 2

7. Fixogum vom Objektträger entfernen
8. Deckgläschen abhebeln
9. Ablauf nach Protokoll VP 2000 Tag 2 (siehe „Protokoll VP2000 Tag 1 und 2“)
10. Schnitte mit ca. 15 µl DAPI und 24x32mm Deckgläschen eindecken und im Kühlschrank lagern

10.8.4 FISH-Protokoll VP2000 Tag 1

1. 3x 10 min Xylol	Basin 4, 5, 6
2. 2x 5 min 100% Ethanol	Basin 7, 8
3. 1 min 96% Ethanol	Basin 9
4. 1 min 80% Ethanol	Basin 10
5. 1 min 70% Ethanol	Basin 11
6. 5 min bei 37°C lufttrocknen	Drying Station
7. 20 min 0,2 M HCl	Basin 12
8. 3 min Aqua dest.	Basin 2
9. 3 min 2x SSC-Waschpuffer	Basin 13
10. 30 min Pretreatment Solution bei 80°C	Basin 1
11. 1 min Aqua dest.	Basin 2
12. 2x 5 min 2x SSC-Waschpuffer	Basin 13, 14
13. 90 min Protease I bei 37°C (500ml Protease-Puffer + 250mg Protease I)	Basin 3
14. 2x 5 min 2x SSC-Waschpuffer	Basin 13, 14
15. 10 min 4,5% gepufferte Formaldehydlösung	Basin 15
16. 2x 5 min 2x SSC-Waschpuffer	Basin 13, 14
17. 1 min Aqua dest.	Basin 2
18. 5 min bei 37°C lufttrocknen	Drying Station

10.8.5 FISH-Protokoll VP2000 Tag 2

1. 2 min 2x SSC/0,3% NP40 Waschpuffer bei 72°C	Basin 1
2. 1 min 2x SSC-Waschpuffer	Basin 2
3. 1 min Aqua dest.	Basin 3
4. 1 min 96% EtOH	Basin 9
5. 5 min lufttrocknen	Drying Station

10.9 Präparation der DNA

1. Tumorhaltiges Gewebe auf dem HE-Schnitt markieren und mit Hilfe einer Klinge die markierte Gewebestelle vom Paraffinblock entfernen (Klinge immer nur für einen Patienten benutzen)
2. Das Gewebstück in ein 2ml-Tube geben und mind. 1000 µl Roticlear dazu geben (Entparaffinierung) und bei 70 °C für mind. 10 min in den Thermoschüttler geben
3. Roticlear aus dem Tube entfernen und nochmals mind. 1000 µl neue Roticlear-Flüssigkeit dazugeben und bei 70 °C für mind. 10 min in den Thermoschüttler geben
4. Roticlear aus dem Tube entfernen und Ethanol absolut ins Tube geben (Raumtemperatur 10 min)
5. Ethanol absolut entfernen und 5 min in der Vakuumzentrifuge trocknen lassen (Deckel vom Tube muss geöffnet bleiben)

→ Trockenes Gewebe im Tube

1. 125 µl Proteinase K (-20°C) + 180 µl Lysis-Puffer T1 in das Tube geben bei 56°C über Nacht in den Thermoschüttler zum Verdau Proteine aus der Probe
2. 200 µl B3-Puffer dazugeben und bei 70 °C 10 min auf den Thermoschüttler stellen
3. 210 µl Ethanol absolut dazugeben und den gesamten Inhalt des Tubes auf die Säule überführen (bei 11000 rpm 1 min zentrifugieren)
4. Überstand verwerfen und 500 µl BW-Puffer auf die Säule geben (11000 rpm 1min zentrifugieren)
5. Überstand verwerfen und 600 µl B5-Puffer auf die Säule geben (11000 rpm 1min zentrifugieren)
6. Überstand verwerfen (11000 rpm 1min trocken zentrifugieren)
7. Neues Tube nehmen und Säule überführen und 80 µl BE-Puffer (70°C) dazugeben (1 min stehen lassen, dann 11000 rpm 1min zentrifugieren)
8. Säule kann nun entsorgt werden
9. Tube mit der DNA kann dann im Kühlschrank gelagert werden

10.10 PCR-Ansatz

1. DNA messen (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. Im Sequenziererraum Tubes vorbereiten und beschriften + 1x Leerwert messen
3. PCR ansetzen (siehe Zusammensetzung der Primermischung)
4. Primer biomers.net (siehe Liste der verwendeten Primer)
5. Im Labor DNA dazugeben (Gesamtvolumen 25 μl)
6. Im Thermocycler Programm für EGFR bzw. KRAS wählen
7. Produkte auf dem Acrylamidgel kontrollieren (siehe Ansatz für Acrylamidgel)
8. Nach der Kontrolle auf dem Gel die PCR-Produkte aufreinigen (siehe Anleitung)
9. Sequenzierreaktion ansetzen (siehe Ansatz PCR – Sequenz Mappe)
10. Aufgereinigte DNA zum Sequenzieransatz dazugeben
11. Im Thermocycler Programm Sequenz wählen
12. Centriceps-Säulen mit LiChrosolv Water 600 μl / Säule befüllen und mind. 30 min quellen lassen
13. Bei 3000 rpm 2 min zentrifugieren
14. Säule in neues Tube geben und Sequenzierprodukt auf die Säule geben
15. Bei 3000 rpm 4 min zentrifugieren
16. Produkt in die Sample-Tubes für den Analyzer geben und mit grauem Gummideckel schließen
17. Analyzer starten

10.11 Zusammensetzung der Primermischung

Hot Star Taq Polymerase	12,5 µl
Primer F	2 µl
Primer R	2 µl
Aqua dest.	6,5 µl (variabel, je nach DNA-Konzentration)
DNA	2 µl (variabel, je nach DNA-Konzentration)
Summe	25 µl

10.12 Reinigung des PCR-Produktes

1. alle Zentrifugierschritte bei 10.000 – 14.000 rpm
2. 20 µl PCR-Ansatz (= 25 µl – 5 µl für das Gel) mit Binding-Puffer auf 100 µl auffüllen
3. Das Gemisch in die (rosa) Filterröhrchen geben und zentrifugieren
4. 700 µl Waschpuffer hinzugeben und zentrifugieren, Abfallröhrchen entsorgen
5. Filtersäule in ein neues 1,5ml-Tube geben + 20 µl Elution-Puffer (EB), 1 min Raumtemperatur, dann zentrifugieren (die Menge des EB kann wenn nötig bzw. bei ganz dünnen Banden auf dem Gel angepasst werden)

10.13 Herstellung des Acrylamid-Gels

Für Acrylamid-Gele von 8 %

Folgende Chemikalien (alle bei 4°C) zügig vermischen:

1. 24 ml Acrylamid-PDA (13 %)
2. 16 ml Tris-Puffer (120 mM)
3. 400 µl APS (Ammoniumpersulfat 10 %)
4. 40 µl Temed

Herstellung der Komponenten 1 – 3

1. Acrylamid – PDA für 1l :

7 g PDA (Piperazin-Diarylamid)

352 ml Acrylamid 40 %

648 ml Aqua dest

2. Tris Puffer 120 mM für 1l :

90,75 g Tris-Base

5,21 ml Ameisensäure (85 %) oder 4,47 ml 99 %

Mit Aqua dest. auf 1l auffüllen

3. Ammoniumpersulfat 10 %

10 g auf 100 ml

Komponente 4

4 . TEMED (Fertiglösung)