

Kurzbericht

Zuwendungsempfänger	Förderkennzeichen
Universitätsmedizin Mainz	01KT1514
Vorhabenbezeichnung	Bewilligungszeitraum:
TRANSCAN III - Verbund: Klinische Studie zur Wirkung von Aspirin und/oder Metformin bei der tertiären Prävention von Darmkrebs (ASAMET) mittels immunhistochemischer und genomischer Biomarker	01.03.2016 – 31.03.2024

Einleitung

Darmkrebs (colorectal cancer, CRC) ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Westeuropa. Trotz der Fortschritte in der chirurgischen und adjuvanten Behandlung in den letzten zwei Jahrzehnten ist die Überlebensrate bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien nach wie vor gering. Daher besteht ein Bedarf an innovativen präventiven Maßnahmen um ein Wiederauftreten des Tumors bzw. die Entstehung eines Zweitumors zu verhindern. Im Rahmen dieses Verbundprojektes wurde daher erstmals die Wirksamkeit einer adjuvanten Kombinationstherapie aus niedrig dosiertem Aspirin (ASA) und Metformin (MET) analysiert. Beide Wirkstoffe wurden bereits in Monotherapien in klinischen Studien erfolgreich getestet. Ebenfalls konnte in präklinischen Studien eine synergistische Wirkung von ASA und MET nachgewiesen werden.

Ziele des Projektes

Im Rahmen des Projektes sollte der mögliche Synergismus der adjuvanten Kombinationstherapie aus ASA und MET bei CRC-Patienten nach operativer Entfernung des Primärtumors anhand von unterschiedlichen Surrogatmarkern untersucht werden. Dazu sollten 160 Patienten im Anschluss an die Resektion des Tumors in den jeweiligen Behandlungszentren für ein Jahr mit ASA alleine, MET alleine, ASA und MET kombiniert, oder einem Placebo behandelt werden. Gewebeproben von diesen Patienten sollten in unserem Projektteil immunhistochemisch und molekularpathologisch weiter untersucht werden. Als primäres Ziel der Studie sollte die Expression von NF- κ B an normaler Kolon-Schleimhaut sowohl vor als auch nach der Intervention immunhistochemisch mit Hilfe eines Tissue Micro Arrays ermittelt werden. Als zusätzliche Biomarker sollte die Expression von pS6K, p53, beta-Catenin, PI3K untersucht werden. Ein weiteres Ziel beinhaltete die Untersuchung verschiedener Mutationen und SNPs des Primärtumors (inkl. KRAS, BRAF, NRAS, APC, PIK3CA, TP53, CTNNB1 und EGFR) zur Analyse potentieller Assoziationen auf das Therapieansprechen mittels NGS.

Wichtigste Ergebnisse

Immunhistochemische Analysen

In dem ersten Teilprojekt wurden die Gewebeproben umfassend immunhistochemisch analysiert, um bestimmte Tumor- und Entzündungs-biologisch relevante Proteine nachzuweisen. Die Studie konzentrierte sich auf die Proteine pS6K, EGFR, Ki-67 und NF- κ B. Für die Auswertung wurde die digitale Bildanalyse genutzt, die objektivere und automatisierte Ergebnisse ermöglicht. Zusätzlich wurden neue Analysealgorithmen entwickelt, um positive und negative Zellen zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten eine heterogene Verteilung der Expression der Biomarker. Eine finale biostatistische Auswertung der erhobenen Daten wird, wie geplant, von den entsprechenden Kooperationspartnern durchgeführt werden.

Next Generation Sequencing

Eine molekulare Charakterisierung der Tumoren erfolgte mittels Next-Generation Sequencing (NGS), das auch als massive, parallele Sequenzierung bezeichnet wird. Dabei wurden Bereiche von 26 bzw. 48

Genen im Hinblick auf tumorspezifische Mutationen untersucht. Die hierfür notwendige DNA wurde aus Formalin-fixiertem Tumorgewebe mittels eines bereits etablierten Verfahrens extrahiert. Aufgrund der teilweise geringen Tumormenge und der längeren Lagerung des Gewebes ließen sich in vielen Fällen DNA-Proben in nur geringer Qualität und Menge gewinnen. Diese stellten für die umfangreiche NGS-Mutationsanalyse eine Herausforderung dar. Nachdem die Untersuchung in der Regel zweimal für jede Probe erfolgte, konnten aber in den meisten Proben tumorspezifische Mutationen detektiert werden. Insbesondere im Tumorsuppressorgen TP53 und in den bekannten Hotspotbereichen der Gene BRAF, KRAS und NRAS ließen sich zahlreiche Mutationen identifizieren. In 17 der 29 (58,6 %) untersuchten Tumoren fanden sich deletäre TP53-Mutationen. Die aktivierenden Mutationen in den Genen BRAF, KRAS, NRAS schließen sich in der Regel gegenseitig aus und treten unabhängig von einer TP53-Mutation auf, was auch in diesem Kollektiv zu beobachten war. Von den 29 Tumoren zeigten zwölf Tumoren eine KRAS-Mutation (41,4 %), vier Tumoren eine NRAS-Mutation (13,8 %) und drei eine BRAF-Mutation (10,3 %). Darüber hinaus traten noch in zwei Tumoren (6,9 %) deletäre PTEN-Mutationen und in sechs Tumoren aktivierende PIK3CA-Mutationen (20,7 %) auf (siehe Tabelle weiter unten). Insgesamt gilt anzumerken, dass mit dem hier verwendeten NGS-Verfahren für die meisten Proben tumorspezifische Mutationen detektiert werden konnten. Außerdem können die in diesem Kollektiv ermittelten Mutationshäufigkeiten als typisch für kolorektale Karzinome angesehen werden. Inwieweit das Auftreten bestimmter Mutationen mit dem Therapieansprechen und dem Krankheitsverlauf korreliert, wird derzeit von unseren Kooperationspartnern untersucht.

Zusammenarbeit mit anderen Forschungsinstituten

Im Rahmen des Projektes erfolgte eine enge Interaktion zwischen den Projektpartnern.

Abschlussbericht – eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger	Förderkennzeichen
Universitätsmedizin Mainz	01KT1514
Vorhabenbezeichnung	Bewilligungszeitraum:
TRANSCAN III - Verbund: Klinische Studie zur Wirkung von Aspirin und/oder Metformin bei der tertiären Prävention von Darmkrebs (ASAMET) mittels immunhistochemischer und genomischer Biomarker	01.03.2016 – 31.03.2024

Einleitung

Darmkrebs (CRC) ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Westeuropa. Trotz der Fortschritte in der chirurgischen und adjuvanten Behandlung in den letzten zwei Jahrzehnten ist die Überlebensrate bei Patienten nach kurativer Resektion nach wie vor gering. Daher besteht ein Bedarf an innovativen präventiven Therapiemöglichkeiten um ein Wiederauftreten des Tumors zu verhindern. Im Rahmen dieses Verbundprojektes wurde daher erstmals die Wirksamkeit einer adjuvanten Kombinationstherapie aus niedrig dosiertem Aspirin (ASA) und Metformin (MET) analysiert. Beide Therapeutika wurden bereits in Monotherapien in klinischen Studien erfolgreich getestet. Ebenfalls konnte in präklinischen Studien eine synergistische Wirkung von ASA und MET nachgewiesen werden.

Ziele des Projektes

Im Rahmen des Projektes sollte der mögliche Synergismus der adjuvanten Kombinationstherapie aus ASA und MET bei CRC-Patienten nach operativer Entfernung des Primärtumors anhand von unterschiedlichen Surrogatmarkern untersucht werden. Dazu sollten 160 Patienten im Anschluss an die Resektion des Tumors in den jeweiligen Behandlungszentren für ein Jahr mit ASA, MET, ASA und MET oder einem Placebo behandelt werden. Gewebeproben von diesen Patienten sollten in unserem Projektteil immunhistochemisch und molekularpathologisch weiter untersucht werden. Als primäres Ziel der Studie sollte die Expression von NF- κ B an normaler Kolon-Schleimhaut sowohl vor als auch nach der Intervention immunhistochemisch mit Hilfe eines Tissue Micro Arrays ermittelt werden. Als zusätzliche Biomarker sollte die Expression von pS6K, p53, beta-Catenin, PI3K untersucht werden. Ein weiteres Ziel beinhaltete die Untersuchung verschiedener Mutationen und SNPs des Primärtumors (inkl. *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *APC*, *PIK3CA*, *TP53*, *CTNNB1* und *EGFR*) zur Analyse potentieller Assoziationen auf das Therapieansprechen mittels NGS.

1. Ergebnisse

Gewebeproben

Auf Grund von administrativen und vertraglichen Aspekten hat sich zu Beginn des Projektes die Patientenrekrutierung in den internationalen Behandlungszentren verzögert und konnte erst im Mai 2017 gestartet werden. Des Weiteren kam es zu Schwierigkeiten bei der Patientenrekrutierung u. a. auf Grund der Corona-Pandemie. Schlussendlich konnten statt der geplanten 160 Patienten lediglich 40 Patienten rekrutiert werden, deren Gewebeproben in unserem Projektteil mittels NGS und Immunhistochemie analysiert wurden.

Ergebnisse der Mutationsanalyse (NGS)

a) Etablierung eines NGS-Workflows zur Detektion von tumorspezifischen Mutationen

Im Rahmen dieses Projektteils erhielten wir von den Kooperationspartnern Kolonkarzinomgewebe, das den Patienten im Rahmen der Entfernung des Primärtumors, also noch vor Start der therapeutischen Intervention mit Aspirin (ASA) und Metformin (MET), entnommen wurde. Ziel

dieses Projektteil war die molekularpathologische Untersuchung verschiedener Mutationen des Primärtumors (inkl. *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *APC*, *PIK3CA*, *TP53*, *CTNNB1* und *EGFR*) mittels Next-Generation Sequencing (NGS). Diese Daten werden von den Projektpartnern im Hinblick auf potentielle Assoziationen mit dem Therapieansprechen analysiert.

Die Voraussetzung für eine umfangreiche Mutationsanalyse mittels NGS ist die Extraktion von DNA aus meist Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorgeweben. Hierbei wurde das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Maxwell-System der Firma Promega angewendet. Dieses Verfahren ist speziell für die DNA-Extraktion aus FFPE-Material optimiert und liefert generell eine gute DNA-Ausbeute. Ein weiterer Schritt beim NGS-Workflow besteht in der Anreicherung der gewünschten Genbereiche für die Sequenzierung, was auch als Herstellung der Sequenzierbibliotheken bezeichnet wird. Hierzu wurde der TruSeq Amplicon Cancer Workflow der Firma Illumina im Labor etabliert. Dabei werden ausgewählte Genebereiche von 48 Genen, u. a. *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, amplifiziert. In einigen Fällen konnten nur geringe DNA-Mengen aus dem Tumorgewebe extrahiert werden. Für diese Fälle wurde die sogenannte „Low Input“-Variante des Protokolls etabliert. Anschließend wurden die für die Sequenzierung angereicherten DNA-Moleküle (Sequenzierbibliotheken) mittels der NGS-Plattform MiSeq der Firma Illumina sequenziert. Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte mit der MiSeqReporter-Software und der VariantStudio-Software (beides von Illumina). In einem ersten Schritt werden Varianten im Vergleich zum humanen Referenzgenom ermittelt, die dann in mehreren weiteren Schritten gefiltert wurden. Ausschließlich Varianten mit einer minimalen Abdeckung von 100 Einzelsequenzen und mit einer Mutationsfrequenz von über 5 % wurden berücksichtigt. Zudem wurden synonyme Veränderungen, die nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein führen, herausgefiltert. Zur Überprüfung und Bewertung der detektierten Genvarianten wurden verschiedene Datenbanken wie ClinVar und COSMIC verwendet. Nach erfolgreicher Etablierung und Optimierung des Workflows konnte das Verfahren zur Mutationsanalyse eingesetzt werden.

b) Bestimmung von tumorspezifischen Mutationen bei 15 Patienten

Zunächst wurde uns Tumorgewebe von 19 Patienten zur Mutationsanalyse zur Verfügung gestellt. In zwei von 19 Fällen reichte die Gewebemenge nicht für eine DNA-Extraktion aus. Die extrahierte DNA wies in Bezug auf Quantität und Qualität große Unterschiede aus. Bei zwei weiteren Proben reichte die Menge an extrahierter DNA nicht für die Herstellung der Sequenzierbibliotheken. Insgesamt konnten somit von 15 der 19 Patienten erfolgreiche Sequenzierbibliotheken aus dem Tumorgewebe hergestellt werden. Nach Sequenzierung und Auswertung zeigten einige Proben eine geringe Lesetiefe und das Auftreten zahlreicher Varianten im niedrigen Frequenzbereich, was ein Hinweis auf Artefakt-Varianten darstellt. Bei diesen Proben wurde die gesamte Mutationsanalyse wiederholt. Danach war eine Unterscheidung zwischen tumorspezifischen Mutationen von Artefakt-Varianten möglich.

c) Bestimmung von tumorspezifischen Mutationen bei weiteren 14 Patienten

In einer nächsten Runde wurden uns Gewebelöcke von weiteren 16 Patienten zur Verfügung gestellt. Wie zuvor haben wir die DNA aus dem FFPE-Tumorgewebe mit Hilfe des Maxwell-Systems extrahiert. Es stellte sich allerdings heraus, dass in den meisten Fällen die extrahierte DNA von sehr geringer Qualität war. Erfahrungsgemäß kann dies die Folge einer zu kurzen oder zu langen Fixierung mit Formalin, einer unsachgemäßen Aufbewahrung der FFPE-Blöcke oder des Gebrauchs von nicht-gepuffertem Formalin sein. Da die FFPE-Blöcke aus unterschiedlichen Kliniken/Laboren im Ausland stammten, konnte der Grund der schlechten DNA-Qualität nicht mit letzter Sicherheit

bestimmt werden. Außerdem reichte in zwei der 16 Fälle die Menge an Tumorgewebe nicht für eine DNA-Extraktion aus. Aufgrund der geringen DNA-Qualität wurde ein neueres Verfahren zur Herstellung der Sequenzierbibliotheken eingesetzt. Dieser sogenannte QIAseq Targeted NGS-Workflow der Firma Qiagen wurde speziell für problematische DNA aus FFPE-Gewebe entwickelt. Die zu untersuchenden Genbereiche werden mittels universeller und einzelner genspezifischer Primer (Single Primer Extension) angereichert. Allerdings ist die Anzahl der Genbereiche geringer als beim vorherigen Panel. Mit dem neuen Panel werden Bereiche von 26 Genen, inklusive der Hotspot-Gene *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* und *TP53*, angereichert. Die auf diese Weise generierten Sequenzierbibliotheken wurden wie zuvor mit der MiSeq-Plattform sequenziert. Die Datenanalyse erfolgte mit der CLC-Workbench Software der Firma Qiagen und den gleichen Filterparametern wie zuvor. Aufgrund der geringen DNA-Qualität wurde die komplette NGS-Analyse von allen Proben wiederholt. Erst dann konnte eine Unterscheidung zwischen tumorspezifischen Mutationen und Artefakt-Varianten erfolgen.

d) Zusammenfassung der detektierten Mutationen

Insgesamt konnten die Tumorproben von 29 Patienten ausgewertet werden, wobei 15 Proben mit dem TruSeq Amplicon Cancer Workflow und 14 Proben mit dem QIAseq Targeted NGS-Workflow analysiert wurden. Alle untersuchten Proben zeigten mindestens eine oder mehrere tumorspezifische Mutationen (Tab. 1). Am häufigsten wurden deletäre Mutationen im Gen *TP53* detektiert (Tabelle 2). 17 von 29 Proben (58,6 %) wiesen eine als „pathogen“ eingestufte Mutation in *TP53* auf. In 12 von 29 Fällen (41,4 %) konnte eine aktivierende *KRAS*-Mutation, in 4 von 29 Fällen (13,8 %) eine aktivierende *NRAS*-Mutation und in 3 von 29 Fällen (10,3 %) eine aktivierende *BRAF*-Mutation nachgewiesen werden. Außerdem konnten in 6 der 29 Proben (20,7 %) aktivierende *PIK3CA*-Mutationen und in 2 der 29 Proben (6,9 %) deletäre *PTEN*-Mutationen identifiziert werden. Die ermittelten Mutationshäufigkeiten wurden mit der TCGA-Datenbank (The Cancer Genome Atlas vom National Cancer Institute in den USA), in der die Mutationshäufigkeiten von 754 kolorektalen Tumoren hinterlegt sind, verglichen (Tabelle 2). Die Mutationshäufigkeiten stimmen recht gut überein, was für die Qualität der Untersuchungsmethode der ermittelten Mutationen spricht.

e) Fazit

Die geringe Qualität der extrahierten DNA aus dem Tumorgewebe stellte für die Mutationsanalyse eine Herausforderung dar. Trotzdem konnten durch zahlreiche Wiederholungen und Adaptation der Methode am Ende für die Mehrzahl aller Proben tumorspezifische Hotspot-Mutationen detektiert werden. Im Vergleich zum ursprünglichen Antrag musste das NGS-Verfahren für die Mutationsanalyse angepasst werden. Der zunächst für das Projekt etablierte TruSeq Amplicon Cancer Workflow stellte sich in der zweiten Runde als nicht optimal für die problematischen DNA-Proben heraus. Deswegen wurden die weiteren Proben mit dem aktuelleren und sensitiveren QIAseq Targeted NGS-Workflow analysiert. Auch wenn die Anzahl der untersuchten Gene mit dem neueren Verfahren geringer ist, so werden die wichtigsten Hotspot-Gene wie *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* und *TP53* mit beiden Verfahren abgedeckt.

Tabelle 1. Detektierte Mutationen in 29 Tumoren. Die Tumorproben ITA-001-001 bis ITA-001-023 wurden mit dem TruSeq Amplicon Cancer Workflow untersucht, während die Proben ITA-001-026 bis ITA-001-050 mit dem QIAseq Targeted NGS-Workflow analysiert wurden.

Proben-ID	detektierte Variante	NCBI RefSeq	HGVS_c	HGVS_p	Allel-Frequenz [%]	klinische Beurteilung (ClinVar)
ITA-001-001	APC	NM_000038.6	c.4285C>T	p.Gln1429*	36.0	„pathogenic“
	KRAS	NM_033360.3	c.436G>A	p.Ala146Thr	32.8	“pathogenic / likely pathogenic / uncertain significance”
ITA-001-002	ABL1	NM_007313.3	c.857C>T	p.Thr286Met	36.0	kein Eintrag
	PTEN	NM_000314.6	c.569C>T	p.Pro190Leu	42.2	„uncertain significance“
ITA-001-003 ¹						
ITA-001-004 ¹						
ITA-001-005	TP53	NM_000546.5	c.844C>T	p.Arg282Trp	47.4	„pathogenic / likely pathogenic“
ITA-001-009	TP53	NM_000546.5	c.659A>G	p.Tyr220Cys	11.6	„pathogenic“
ITA-001-010	TP53	NM_000546.5	c.613T>C	p.Tyr205His	51.6	„pathogenic / likely pathogenic“
ITA-001-011	NRAS	NM_002524.4	c.182A>G	p.Gln61Arg	31.9	„pathogenic / uncertain significance“
	APC	NM_000038.6	c.3340C>T	p.Arg1114*	14.8	„pathogenic“
	APC	NM_000038.6	c.4192_4193delAG	p.Arg1399Phefs*9	19.9	kein Eintrag
ITA-001-012	APC	NM_000038.6	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	35.9	kein Eintrag
	KRAS	NM_033360.3	c.38G>A	p.Gly13Asp	29.0	„pathogenic / uncertain significance“
	PIK3CA	NM_006218.3	c.3140A>G	p.His1047Arg	22.3	„pathogenic“
ITA-001-013	MET	NM_000245.4	c.3811G>A	p.Val1289Met	5.6	„uncertain significance“
	PIK3CA	NM_006218.3	c.1633G>A	p.Glu545Lys	17.9	„pathogenic / likely pathogenic“
ITA-001-014	APC	NM_000038.6	c.4336_4345delGCTCAAACCA	p.Ala1446Serfs*24	66.5	kein Eintrag
	KRAS	NM_033360.3	c.35G>T	p.Gly12Val	39.7	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.974dupG	p.Glu326Argfs*11	68.6	kein Eintrag
	STK11	NM_000455.5	c.829G>A	p.Asp277Asn	58.7	„uncertain significance“
ITA-001-016	APC	NM_000038.6	c.3871C>T	p.Gln1291*	72.1	„pathogenic“
	IDH1	NM_005896.4	c.299G>A	p.Arg100Gln	30.2	kein Eintrag

Proben-ID	detektierte Variante	NCBI RefSeq	HGVS_c	HGVS_p	Allel-Frequenz [%]	klinische Beurteilung (ClinVar)
	TP53	NM_000546.5	c.818G>A	p.Arg273His	36.3	„pathogenic“
ITA-001-017 ²						
ITA-001-018 ²						
ITA-001-019	TP53	NM_000546.5	c.586C>T	p.Arg196*	42.9	„pathogenic“
ITA-001-020	TP53	NM_000546.5	c.526T>A	p.Cys176Ser	44.0	„likely pathogenic / uncertain significance“
ITA-001-021	TP53	NM_000546.5	c.818G>A	p.Arg273His	43.0	„pathogenic“
ITA-001-022	NRAS	NM_002524.4	c.182A>T	p.Gln61Leu	47.1	„uncertain significance“
ITA-001-023	KRAS	NM_033360.3	c.34G>A	p.Gly12Ser	66.5	„pathogenic“
	PIK3CA	NM_006218.3	c.1035T>A	p.Asn345Lys	30.3	„pathogenic“
ITA-001-026 ³						
ITA-001-027	KRAS	NM_033360.3	c.35G>A,	p.Gly12Asp	34.5	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.820G>T	p.Val274Phe	67.6	„pathogenic / uncertain significance“
ITA-001-028 ^{4,5}	BRAF	NM_004333.4	c.1799T>A	p.Val600Glu	36.0	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.524G>A	p.Arg175His	66.8	„pathogenic“
ITA-001-032 ⁴	KRAS	NM_033360.3	c.183A>T	p.Gln61His	19.9	„pathogenic, likely pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.733G>A	p.Gly245Ser	71.1	„pathogenic“
ITA-001-034 ⁴	ROS1	NM_002944.2	c.5636C>T	p.Thr1879Ile	60.8	kein Eintrag
	PTEN	NM_000314.6	c.87T>A	p.Tyr29*	39.9	„pathogenic“
	KRAS	NM_033360.3	c.38G>A	p.Gly13Asp	32.3	„pathogenic“
ITA-001-035 ^{4,6}	BRAF	NM_004333.4	c.1799T>A	p.Val600Glu	32.9	„pathogenic“
ITA-001-037 ⁴	KRAS	NM_033360.3	c.35G>A	p.Gly12Asp	34.4	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.809T>G	p.Phe270Cys	44.0	„likely pathogenic / uncertain significance“
ITA-001-039 ⁴	PTEN	NM_000314.6	c.737C>T	p.Pro246Leu	25.5	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.524G>A	p.Arg175His	63.1	„pathogenic“

Proben-ID	detektierte Variante	NCBI RefSeq	HGVS_c	HGVS_p	Allel-Frequenz [%]	klinische Beurteilung (ClinVar)
ITA-001-040 ^{4,6}	BRAF	NM_004333.4	c.1799T>A	p.Val600Glu	14.7	„pathogenic“
ITA-001-041 ⁴	KRAS	NM_033360.3	c.183A>T	p.Gln61His	57.1	„pathogenic / likely pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.481G>A	p.Ala161Thr	54.3	“pathogenic / likely pathogenic / uncertain significance”
ITA-001-043 ⁴	NRAS	NM_002524.4	c.182A>G	p.Gln61Arg	42.3	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.818G>A	p.Arg273His	29.9	„pathogenic“
ITA-001-044 ^{4,7}	TP53	NM_000546.5	c.473G>A	p.Arg158His	28.4	„pathogenic / likely pathogenic“
	KRAS	NM_033360.3	c.35G>T	p.Gly12Val	16.6	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.578A>G	p.His193Arg	16.3	„pathogenic / likely pathogenic“
ITA-001-045 ^{4,7}	PIK3CA	NM_006218.3	c.1633G>A	p.Glu545Lys	8.7	„pathogenic / likely pathogenic“
	PTEN	NM_000314.6	c.821G>A	p.Trp274*	11.2	„pathogenic“
ITA-001-046 ^{4,8}	KRAS	NM_033360.3	c.34G>A	p.Gly12Ser	21.2	„pathogenic“
	NRAS	NM_002524.4	c.35G>T	p.Gly12Val	25.0	„pathogenic / likely pathogenic“
ITA-001-049 ^{4,9}	KRAS	NM_033360.3	c.35G>A	p.Gly12Asp	32.7	„pathogenic“
	TP53	NM_000546.5	c.659A>G	p.Tyr220Cys	52.2	„pathogenic“
ITA-001-050 ³						

¹ Material nicht ausreichend

² Lesetiefe zu niedrig

³ nicht auswertbar

⁴ Niedrige Lesetiefe in einigen Genbereichen

⁵ Einige unklare Varianten mit Frequenzen bis 16 %

⁶ Viele Varianten mit Frequenzen bis 10 %

⁷ Viele Varianten mit Frequenzen bis 15 %

⁸ Einige unklare Varianten mit Frequenzen bis 15 %

⁹ Einige unklare Varianten mit Frequenzen bis 10 %

Tabelle 2. Häufigkeit von Mutationen in ausgewählten Genen. Insgesamt wurden 29 Tumoren untersucht. Pro Tumor können mehrere mutierte Gene vorliegen, so dass die Prozentzahlen zusammen mehr als 100 % ergeben.

Mutiertes Gen	Anzahl Tumoren (%)	Prozent von kolorektalen Tumoren (n=754) in der TCGA-Datenbank
<i>BRAF</i>	3 (10,3 %)	12,7 %
<i>KRAS</i>	12 (41,4 %)	39,9 %
<i>NRAS</i>	4 (13,8 %)	6,1 %
<i>PIK3CA</i>	6 (20,7%)	24,0 %
<i>PTEN</i>	2 (6,9 %)	6,5 %
<i>TP53</i>	17 (58,6 %)	59,8 %

Ergebnisse der immunhistochemische Analysen

Im Rahmen dieses Projektteils erhielten wir von den Kooperationspartnern Gewebe von normaler Kolonschleimhaut, das den Patienten nach der Entfernung des Primärtumors im Rahmen einer Koloskopie entfernt wurde. Pro Patient waren zwei Gewebeentnahmen vorgesehen, eine vor Beginn der therapeutischen Intervention mit Aspirin (ASA) und Metformin (MET) (Zeitpunkt V1), eine weitere nach Ende der einjährigen Intervention (V4). Als primäres Ziel dieses Projektteils sollte die Expression von NF-κB an diesen Geweben immunhistochemisch mit Hilfe eines Tissue Micro Arrays ermittelt werden. Als zusätzliche Biomarker sollte die Expression von pS6K, p53, beta-Catenin, PI3K untersucht werden. Diese Daten werden von den Projektpartnern im Hinblick auf potentielle Assoziationen auf das Therapieansprechen analysiert.

a) Immunhistochemische Färbungen

In der Förderperiode wurden die im Rahmen der ASAMET-Studie gewonnenen Gewebeproben umfangreich analysiert. Immunhistochemische Färbungen ermöglichen den Nachweis bestimmter Moleküle (meistens Proteine) im räumlichen Gewebe- und Zellkontext. Hierzu wird das zu untersuchende Material zunächst mit einem spezifischen Antikörper gegen ein bestimmtes Zielprotein inkubiert. Dieser Antikörper ist direkt oder indirekt mit einem Enzym gekoppelt, welches eine chemische Reaktion katalysiert, z. B. eine Farbreaktion. Nach einer zusätzlichen unspezifischen Kontrastierung des Gewebes, kann so das Zielmolekül innerhalb der Gewebeprobe sichtbar gemacht werden. In der histopathologischen Routinediagnostik werden Chromogen-basierte immunhistochemische Nachweise bevorzugt, weil diese, im Gegensatz zu Fluoreszenz-basierten Nachweisen, u. a. ein stabileres Signal aufweisen, mittels konventioneller Lichtmikroskopie beurteilt werden können und sich für Hochdurchsatz-/Automatisierungsverfahren eignen. Auch wir verwendeten in der vorliegenden Studie DAB-basierte IHC-Verfahren. Diese wurden mit Hilfe unserer Färbeautomaten (DAKO Autostainer) durchgeführt, um einen höheren Durchsatz und ein konstanteres Färbeergebnis zu ermöglichen. Bei der Etablierung der einzelnen Färbungen wurden, wann immer möglich, Positiv-, Negativ- und Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Nichtsdestoweniger gestaltete sich dieser Studienteil für einige Färbungen als schwierig. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Kooperationspartner-Meetings im Verlauf des Projektes die Priorisierung der Biomarker geändert und auch bestimmte Färbungen, welche im initialen Projektantrag noch diskutiert wurden, aufgrund Priorisierungsgründen oder technischer Faktoren nicht durchgeführt. So ist z. B. der immunhistochemische Nachweis von beta-Catenin nicht unproblematisch,

gleichzeitig werden beta-Catenin Mutationen viel einfacher mittels Sequenzierverfahren detektiert, weswegen wir davon absahen, diese IHC-Färbung durchzuführen. So haben wir uns bei der Auswertung (nach Rücksprache mit den Projektpartnern) auf die folgenden tumorbiologisch relevanten Proteine fokussiert:

Protein	Gen	Funktion	Lokalisation
pS6K (phosphorylierte S6 Kinase)	Chromosom 17q23.1	Regulator der Proteinsynthese und Zellproliferation durch Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6.	zytoplasmatisch
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	Chromosom 7p11.2	Rezeptor-Tyrosinkinase, die an Zellwachstum, Differenzierung und Überleben beteiligt ist.	membranär
Ki-67	Chromosom 10q26	Marker für Zellproliferation, der in aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, M) exprimiert wird.	nukleär
NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)	Chromosom 4q24	Transkriptionsfaktor, der in die Regulation der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose eingreift.	nukleär (aktive Form), zytoplasmatisch (inaktive Form)

Nach der Färbung auf unseren Autostainern erfolgte die Digitalisierung der Schnittpräparate auf den Glasobjektträgern mittels eines so genannten Whole Slide Scanners (WSI). Hierfür verwendeten wir den NanoZoomer 2.0HT (Hamamatsu Photonics K.K, Japan). Die hieraus entstandenen ndpi-Dateien wurden dann mittels digitaler Bildanalyse hinsichtlich der Markerexpression in der Immunhistochemie ausgewertet.

b) Digitale Bildanalyse

Die digitale Bildanalyse befasst sich mit der Auswertung der histopathologischen Bilddaten der immunhistochemischen Färbungen mittels Computer-basierter Verfahren. Diese bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber einer manuellen Auswertung. So ist die digitale Bildanalyse objektiver, da alle Gewebeproben mit den gleichen Parametern analysiert werden. Das Verfahren kann automatisiert werden, was es ermöglicht auch hohe Fallzahlen mit vertretbarem Aufwand zu analysieren. Außerdem können zahlreiche Zusatzparameter erhoben werden, was eine umfangreiche Charakterisierung des Gewebes ermöglicht. Auf Nachteile dieses Vorgehens wird unter dem Abschnitt „Probleme während des Projektverlaufs“ eingegangen.

Zur digitalen Bildanalyse histopathologischer Schnittpräparate stehen eine Reihe verschiedener Software-Lösungen zur Verfügung. Wir verwendeten die Open Source Software QuPath, die den momentanen Goldstandard in der Bildanalyse in der digitalen Pathologie darstellt. Zunächst wurden neue Analysealgorithmen erstellt, um das Gewebe vom Hintergrund zu separieren und dann positive und negative Zellen zu identifizieren. Von einem sog. Tissue Classifier wurde letztendlich abgesehen, da das gesamte Gewebe analysiert werden sollte und so der Mehrwert begrenzt gewesen wäre. Über von uns erstellte Skripte wurden dann alle Gewebeproben analysiert und die jeweiligen Messwerte exportiert. Als primären Parameter wählten wir den Prozentsatz

positiver Zellen von allen analysierten Zellen. Aber auch andere Parameter, wie z. B. die durchschnittliche Signalintensität oder morphometrische Parameter wurden exportiert.

Exemplarische Färbungsergebnisse für das Kollektiv finden sich in Abbildung 1. In Abbildung 2 sind die jeweiligen Werte für die einzelnen Marker des gesamten Kollektivs aufgetragen und in prä- und posttherapeutisch aufgeteilt. Zusammengenommen sieht man eine heterogene Verteilung der Expression der Biomarker.

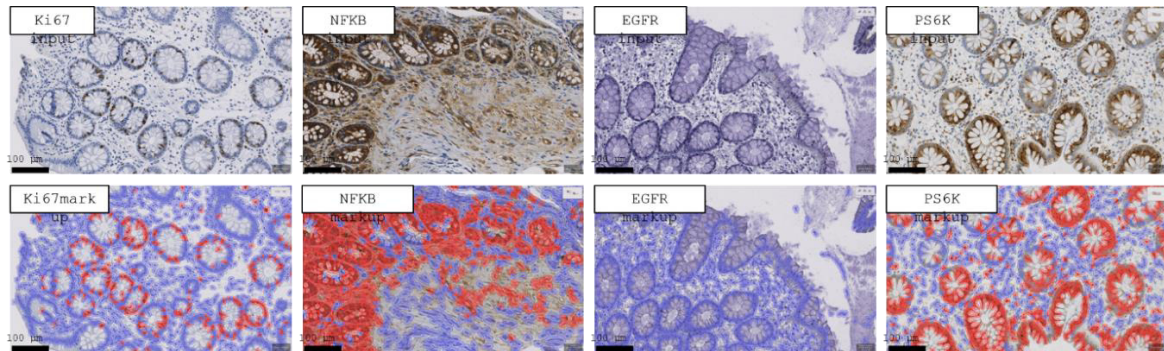


Abbildung 1: Beispielhafte Färberegebnisse des Kollektivs

Oberes Panel: Ausschnitte digitalisierter Schnittpräparate vor der digitalen Bildanalyse. PS6K, NF-κB, EGFR und Ki-67 zeigen ein weitgehend typisches Färbemuster. Unteres Panel: Markup welches das Ergebnis der Bildanalyse zeigt. Positive Zellen werden rot, negative Zellen werden blau dargestellt. Skalenbalken entspricht 100 µm.

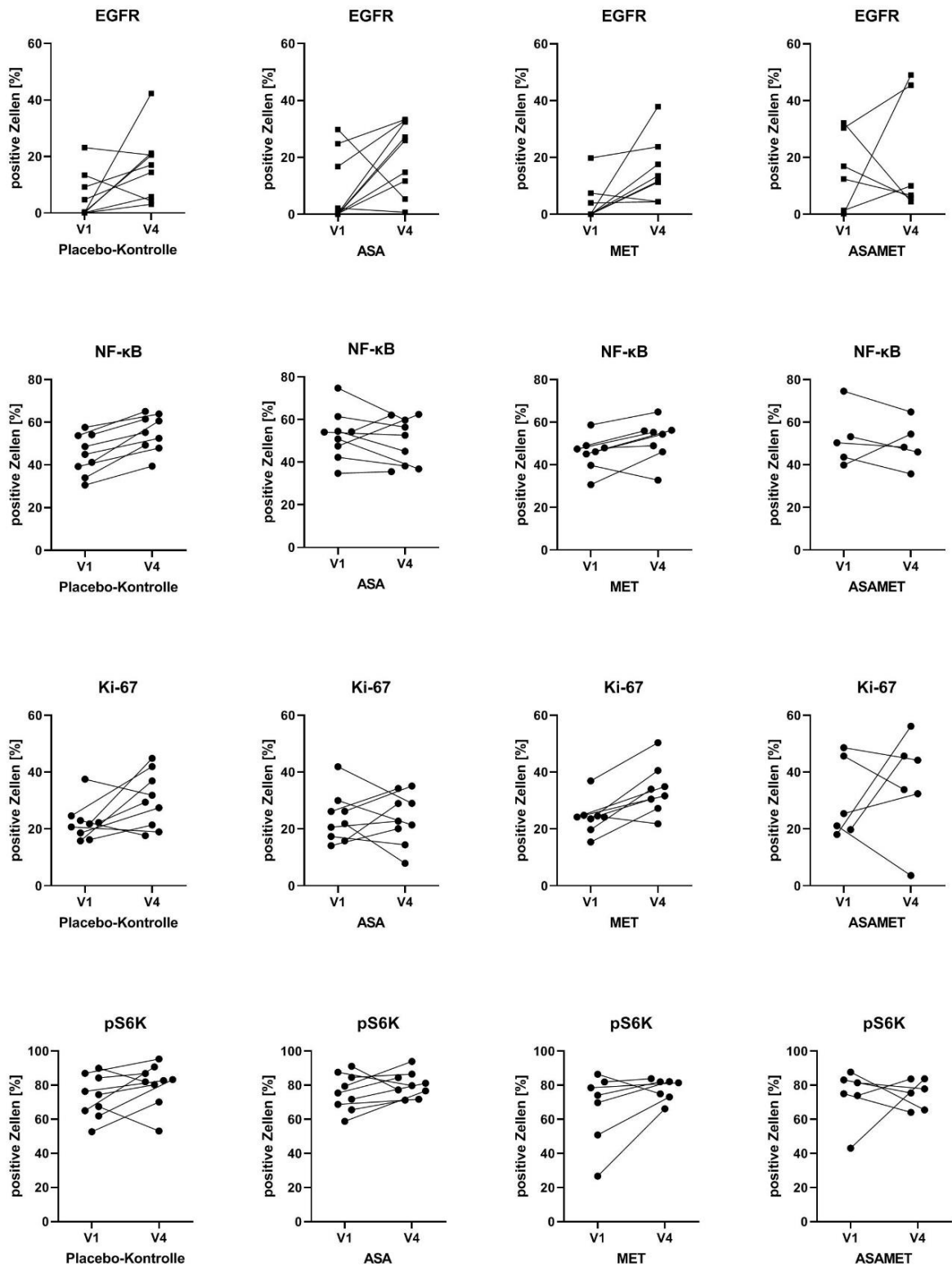


Abbildung 2: Anteil positiver Zellen für die Marker EGFR, NF-κB, Ki-67 und pS6K

Für jeden Marker wurden die positiven Zellen mittels digitaler Bildanalyse ermittelt. Dargestellt sind die Anteile positiver Zellen für jeden Patienten in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Placebo-Kontrolle, Aspirin (ASA), Metformin (MET) und Aspirin + Metformin (ASAMET) vor (V1) und nach (V4) Intervention.

c) Probleme während des Projektverlaufs

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind in folgendem Kontext zu bewerten. Ähnlich wie bei den Sequenzierexperimenten ist die Aussagekraft aufgrund geringer Gewebequalität eingeschränkt. Diese führte bei den jeweiligen Färbungen trotz gründlicher Etablierung immer wieder zu Über- und Unterfärbung. Da wir uns für eine automatisierte digitale Bildanalyse des Gewebes entschieden, kann dies nur in begrenztem Maße korrigiert werden, da man sonst für jede einzelne Probe einen einzelnen Analysealgorithmus erstellen müsste, was weder praktikabel noch sinnvoll ist. Ein weiteres Problem der automatisierten Analyse ist, dass die verwendeten Algorithmen die Zellkerne- und -grenzen nicht perfekt identifizieren, was allerdings dann ein systemischer Fehler ist, der sich für das gesamte Kollektiv wieder ausgleicht. Auch gibt es hier neuere Segmentierungsansätze, wie StarDist oder InstanSeg, welche wir zu Projektende bei uns implementiert haben und mit welchen wir planen, die gesamten Analysen nochmal zu wiederholen. Ein grundsätzliches Problem der Datenanalyse besteht darin, dass aufgrund der beschriebenen Rekrutierungsprobleme eine geringere Probenanzahl zur Verfügung stand als ursprünglich geplant. Eine finale biostatistische Auswertung der erhobenen Daten wird, wie geplant, von den entsprechenden Kooperationspartnern durchgeführt werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal

Ursprünglich wurden ca. 155 T€ Personalmittel bewilligt. Im Rahmen der Anträge auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung wurde dieser Betrag schrittweise zu Lasten der bewilligten Sachmittel erhöht, so dass nach aktuellem Budgetplan ca. 202,5 T€ zur Verfügung standen. Wie in den Anträgen auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung geschildert, wurden 202.400 € für Personalkosten verausgabt. Dies umfasst nicht nur die primäre wissenschaftliche Arbeit, sondern auch die wissenschaftliche Koordination und Überwachung der Teilprojekte und Messungen.

Der auf Grund der Laufzeitverlängerungen entstandene Mehrbedarf an Personalmitteln (38 T€) wurde aus eigenen Ressourcen getragen.

Laboranalysen

Ursprünglich wurden 85 T€ Sachmittel für das Teilprojekt bewilligt. Im Rahmen der Anträge auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung wurde dieser Betrag schrittweise anteilig in Personalmittel umgewidmet, so dass nach aktuellem Budgetplan ca. 40 T€ an Sachmitteln zur Verfügung standen.

Für Laboranalysen sowie Vorbereitung der Proben wurden insgesamt 40 T€ verausgabt. Darin enthalten sind 29 T€ für NGS-Analysen zur Ermittlung von Genmutationen im CRC-Primärtumor sowie weitere 11 T€ für immunhistochemische Analysen. Zusätzlich wurden weitere 10 T€ an Eigenmitteln für die NGS-Analysen beigesteuert.

Auf Grund der teilweise sehr schlechten Qualität der Gewebeproben mussten einige Analysen mehrmals wiederholt werden.

Reisemittel

Ursprünglich wurden 2 T€ Reisekosten bewilligt. Auf Grund der Corona-Pandemie wurden keine projektbezogenen Dienstreisen unternommen und stattdessen Online- und Telefonkonferenzen abgehalten. Im Antrag auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung vom November 2021 wurde eine Umwidmung in Sachmittel beantragt und bewilligt.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geleisteten Projektarbeiten waren bezüglich der ursprünglichen Planung notwendig und angemessen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Aktuell werden die Daten der verschiedenen Analysen des Verbundprojektes von den Kooperationspartnern statistisch ausgewertet. Abhängig von den Ergebnissen der statistischen Auswertung könnte ein Anschlussprojekt (klinische Testphase III) in Betracht gezogen werden.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit sind keine Ergebnisse von dritter Seite bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

Erfolgte Veröffentlichungen

1. Petrera M, Paleari L, Clavarezza M, Puntoni M, Caviglia S, Briata IM, Oppezzi M, Mislej EM, Stabuc B, Gnant M, Bachleitner-Hofmann T, Roth W, Scherer D, Haefeli WE, Ulrich CM, DeCensi A. The ASAMET trial: a randomized, phase II, double-blind, placebo-controlled, multicenter, 2 × 2 factorial biomarker study of tertiary prevention with low-dose aspirin and metformin in stage I-III colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2018; 18(1):1210.
2. Paleari L, Burhenne J, Weiss J, Foersch S, Roth W, Parodi A, Gnant M, Bachleitner-Hofmann T, Scherer D, Ulrich CM, Stabuc B, Puntoni M, Coccia G, Petrera M, Haefeli WE, DeCensi A. High Accumulation of Metformin in Colonic Tissue of Subjects With Diabetes or the Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*. 2018; 154(5):1543-1545.

Geplante Veröffentlichungen

Nach Rücksprache mit den Kooperationspartnern sind nach aktueller Datenlage noch drei weitere Veröffentlichungen geplant, die endgültigen Titel stehen zum momentanen Zeitpunkt noch nicht fest.