

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich
Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

Prävalenz und Heterogenität von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA*
Mutationen in kolorektalen Adenokarzinomen und ihren
korrespondierenden Metastasen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Dinah Hartleb

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: apl. Prof. Dr. Baldus

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. Wesselborg

Meiner lieben Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Vortrag

Baldus S.E., **Hartleb D.**, Stoecklein N., Schäfer K.-L., Gabbert H.E.; Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in colorectal adenocarcinomas and their lymph node metastases; 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. in Freiburg 4.-7. Juni 2009

Publikation

Baldus, S.E., Schafer, K-L., Engers, R., **Hartleb, D.**, Stoecklein, N.H., Gabbert, H.E. (2010). Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases. *Clinical Cancer Research*, 16, 790-799.

Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome zählen in Deutschland heute zu den häufigsten Tumorentitäten beider Geschlechter. Nach wie vor bildet die chirurgische Resektion des Tumors den Hauptpfeiler der Therapie. In den letzten Jahren konnte durch den Einsatz neuer Chemotherapeutika und die Entwicklung der target-controlled therapy ein multimodales Therapiekonzept immer weiter in den Vordergrund gerückt werden. So wird seit 2004 *Cetuximab*, ein Antikörper, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist, in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Im Jahr 2007 folgte die Zulassung von *Panitumumab*, eines weiteren Antikörpers.

Durch zahlreiche Studien der letzten Jahre konnte jedoch belegt werden, dass von einer solchen Therapie nur Patienten profitieren, welche keine *KRAS* Mutation innerhalb des Tumorgewebes aufweisen.

Allerdings zeigen auch bis zu 50% der zuvor als *KRAS* Wildtyp getesteten Patienten eine Therapieresistenz.

Ziel dieser Dissertation war es daher, weitere prädiktive Biomarker zu identifizieren, welche den Erfolg einer anti-EGFR-Therapie genauer voraussagen.

Hierfür wurde die Prävalenz verschiedener EGFR abhängiger Genmutationen, wie *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* in kolorektalen Primärtumoren sowie in deren korrespondierenden Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen untersucht. Weiterhin wurde die Möglichkeit der intratumoralen Heterogenität innerhalb des Primärtumors in Betracht gezogen, indem jeweils das Tumorzentrum und die Tumordinvasionsfront analysiert wurden. Zusätzlich wurde eine heterogene Verteilung der Genmutationen zwischen Primärtumor und Lymphknoten- bzw. Fernmetastase überprüft.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

KRAS Mutationen konnten in 41%, *BRAF* Mutationen in 7% und *PIK3CA* Mutationen in 21% der untersuchten Primärtumore nachgewiesen werden. Die intratumorale Heterogenität von *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* betrug 8%, 1% bzw. 5%. Ein diskordantes Ergebnis zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase wurde bei *KRAS* in 31%, bei *BRAF* in 4% und bei *PIK3CA* in 13% der analysierten Fälle gefunden. Heterogenität zwischen Primärtumor und korrespondierender Fernmetastase konnte bei den 20 untersuchten Proben bei *KRAS* in 2 Fällen (10%), bei *PIK3CA* in einem Fall (5%) nicht aber bei *BRAF* nachgewiesen werden. Durch die erneute Untersuchung zusätzlicher Gewebeproben wurde die Anzahl diskordanter Ergebnisse jedoch erheblich reduziert.

Ein Versagen der gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Antikörpertherapie bei Patienten, deren Mutationsstatus einen *KRAS* Wildtyp aufdeckte, kann teilweise durch die aktivierende Mutation von *BRAF* oder *PIK3CA* erklärt werden. Allerdings muss auch die Möglichkeit der intratumoralen Heterogenität in Betracht gezogen werden.

Auf Grund der hohen Rate an heterogenen Ergebnissen zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase muss von der Gewebeuntersuchung eines Lymphknotens zur Mutationsanalyse in der klinischen Diagnostik abgeraten werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass durch die ergänzende Analyse zusätzlicher EGFR abhängiger Gene, wie *BRAF* und *PIK3CA* die Anzahl an Therapieversagern reduziert werden könnte. Dennoch müssen weitere prädiktive Marker, wie beispielsweise *PTEN*, intensiv untersucht werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	IgG	Immunglobulin G
µl	Mikroliter	IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
µm	Mikrometer	JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
5-FU	5-Fluorouracil	kDa	Kilo Dalton
A	Adenin	KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
Abb.	Abbildung	LK	Lymphknotenmetastase
AKT	Proteinkinasen B	M	Fernmetastase
APC	Adenomatous-polyposis-coli	MAP	Mitogen-Activated Protein
APR	abdominoperineale Rektumexstirpation	MEK	mitogen activated protein kinase / extracellular regulated kinase
ARAF	A Rat Fibrosarcoma	min	Minute
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum	ml	Milliliter
Bp	Basenpaare	mM	millimolar
BRAF	B Rat Fibrosarcoma	MSI	Mikrosatelliteninstabilität
C	Cytosin	NF-KB	nuclear factor kappa-light- chain-enhancer of activated B cells
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs- Phänotyp	nm	Nanometer
CIN	Chromosomale Instabilität	NRAS	Neuroblastom Rat Sarcoma
Cm	Centimeter	NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
CRAF	C Rat Fibrosarcoma	p53	tumor protein 53
cSrc	zelluläre Sarkoma-Kinase	pAKT	phosphoryliertes Akt
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma	PCR	Polymerase Chain Reaction
DEPC	Diethylpyrocarbonate	PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
Dest H₂O	destilliertes Wasser	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

DNA	Deoxyribonucleic acid	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
Ds DNA	Doppelstrang DNA	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
EGF	Epidermal Growth Factor	PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	PLCγ	Phospholipase C gamma
EMEA	European Medicines Agency	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2	RAF	Rat Fibrosarcoma
F	Tumorinvasionsfront	RAS	Rat Sarcoma
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis	sec	Sekunde
FOLFIRI	Folinsäure+5-Fluouracil+Irinotecan	SOS	Son-Of- Sevenless
FOLFOX	Folinsäure+5-Fluouracil+Oxaliplatin	ss DNA	Einzelstrang DNA
FS	Folinsäure	STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
g	Gramm	T	Thymin
G	Guanin	TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
GAP	GTPase-aktivierende Proteine	TEM	transanale endoskopische Mikrochirurgie
GDP	Guanosindiphosphat	TGFα	Transforming Growth Factor alpha
GEF	Guanin nucleotide Exchange Factors	TME	totale Mesorektumexzision
GRB2	growth factor receptor binding protein 2	TNM	Tumor, Nodi, Metastasen
GTP	Guanosintriphosphat	UICC	Union Internationale Contre le Cancer
HB-EGF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor	UV	ultraviolett
HE	Hämatoxylin-Eosin	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HER	human epidermal growth factor receptor	WT	Wildtyp
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom	Z	Tumorzentrum
HRAS	Harvey Rat Sarcoma		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.3	Molekularbiologische Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	3
1.1.4	Die Lokalisation, Histologie und Morphologie kolorektaler Karzinome	5
1.1.5	Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome	6
1.1.6	Grading	8
1.1.7	Residualtumor.....	8
1.1.8	Prognose des kolorektalen Karzinoms	9
1.1.9	Therapiekonzepte kolorektaler Karzinome	9
1.2	Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor.....	12
1.3	EGFR abhängige Signalwege	13
1.3.1	Der RAS-RAF-MAPK-Signalweg.....	13
1.3.2	Das RAS-Protein.....	14
1.3.3	Mutationen im <i>KRAS</i> -Gen.....	15
1.3.4	Das RAF-Protein.....	15
1.3.5	Mutationen im <i>BRAF</i> -Gen	16
1.3.6	Der PI3K-AKT-Signalweg.....	16
1.3.7	Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen	18
1.3.8	Mutationen im <i>PIK3CA</i> -Gen	18
1.4	Die Bedeutung des EGF-Rezeptors in der Onkologie	18
1.4.1	Therapeutische Beeinflussung des EGF-Rezeptors.....	19
1.4.2	Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den EGFR in der Therapie kolorektaler Karzinome.....	20
1.5	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Ergebnisdarstellung einer Sequenzierungsanalyse am Beispiel einer <i>KRAS</i> Mutation.....	33
3.2	Analyse der <i>KRAS</i> Mutationen	34
3.2.1	<i>KRAS</i> Mutationen im Primärtumor	34
3.2.2	<i>KRAS</i> Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase	35

3.2.3	<i>KRAS</i> Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase	38
3.2.4	Lokalisation der <i>KRAS</i> Mutationen	39
3.3	Analyse der <i>BRAF</i> Mutationen	39
3.3.1	<i>BRAF</i> Mutationen im Primärtumor	39
3.3.2	<i>BRAF</i> Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase	40
3.3.3	<i>BRAF</i> Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase	42
3.3.4	Lokalisation der <i>BRAF</i> Mutationen	42
3.4	Analyse der <i>PIK3CA</i> Mutationen	43
3.4.1	<i>PIK3CA</i> Mutationen im Primärtumor	43
3.4.2	<i>PIK3CA</i> Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase	43
3.4.3	<i>PIK3CA</i> Mutation im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase	45
3.4.4	Lokalisation der <i>PIK3CA</i> Mutationen	46
3.5	Gleichzeitiges Auftreten verschiedener Genmutationen innerhalb eines Patienten	47
3.6	Korrelation histopathologischer Parameter	47
4	Diskussion	48
4.1	Analyse der <i>KRAS</i> Mutationsergebnisse	48
4.2	Analyse der <i>BRAF</i> Mutationsergebnisse	52
4.3	Analyse der <i>PIK3CA</i> Mutationsergebnisse	53
4.4	Ergänzende Ergebnisse in der Diskussion	54
5	Schlussfolgerung	56
6	Literaturverzeichnis	58
7	Abbildungsverzeichnis	69
8	Tabellenverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Dickdarmkarzinom stellt eine der häufigsten Krebserkrankungen der heutigen Zeit dar. Jährlich werden weltweit ca. eine Millionen Neuerkrankungen registriert. Vor allem in Industrienationen, allen voran Nordamerika, Australien/Neuseeland und Westeuropa, tritt das kolorektale Karzinom häufig auf, eher selten dagegen in Asien und Afrika (Parkin et al., 2005).

In Deutschland ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Tumorlokalisation bei Frauen nach dem Mammakarzinom und die dritthäufigste Tumorlokalisation bei Männern nach dem Prostata- bzw. Lungenkarzinom. Darüber hinaus handelt es sich bei beiden Geschlechtern um eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen. So starben nach Angaben des Robert Koch-Instituts im Jahre 2010 in Deutschland 13.489 Männer und 12.510 Frauen an bösartigen Neubildungen des Dickdarms.

Die Zahl der Neuerkrankungen belief sich im Jahre 2010 bei den Männern auf 33.800 und auf 28.620 bei den Frauen. Das Durchschnittsalter einer Neuerkrankung liegt für Männer bei 71 Jahren, während Frauen erst in einem durchschnittlichen Alter von 75 Jahren an Darmkrebs erkranken (Robert Koch-Institut, 2013).

Das Lebenszeitrisiko für die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom beträgt für Männer 7,0% und 5,7% für Frauen (Robert Koch-Institut, 2013).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie der kolorektalen Karzinogenese ist noch nicht vollständig geklärt, vielmehr scheint es sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln. Grundsätzlich lassen sich drei ätiologische Gruppen definieren. Hereditäre Krebs syndrome spielen in ca. 10% der Fälle eine Rolle, ca. 5% entstehen auf Grund von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Die größte Gruppe mit ca. 85% tritt sporadisch auf, wobei hier vor allem die Ernährung sowie der Lebensstil einen besonderen Stellenwert einnehmen (Weitz et al., 2003). Prognostisch günstig soll sich eine ausgewogene Ernährung, bestehend aus ballaststoffreicher Nahrung, Bevorzugung von Fisch und Geflügel gegenüber „rotem“ Fleisch auswirken. Ebenso sollte der Alkoholkonsum reduziert und

auf das Rauchen verzichtet werden. Des Weiteren haben sportlich aktive Menschen mit niedrigem „*Body-Mass-Index*“ ein geringeres Krebsrisiko (Scheppach et al., 2000).

Zu den häufigsten genetisch bedingten kolorektalen Karzinomen zählt das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) auch als *Lynch-Syndrom* bezeichnet. Es findet sich in 2-3% der kolorektalen Karzinome (Steinke et al., 2013). Dieser autosomal-dominant vererbten Erkrankung liegt eine Mutation von *DNA-mismatch-repair*-Genen, mit Vorhandensein typischer Mikrosatelliteninstabilität, zu Grunde. Das Durchschnittsalter für das Auftreten eines Kolonkarzinoms liegt bei diesen Patienten im Mittel bei ca. 45 Jahren, wobei sich über 50% im rechten Hemikolon befinden. Sind bei den Betroffenen zudem extrakolonische Neoplasien anzutreffen, z.B. im Ovar oder im Endometrium, so spricht man von einem Lynch II-Syndrom. Manifestiert sich diese Krankheit isoliert am Kolorektum, handelt es sich um ein Lynch I-Syndrom (Lynch et al., 1988).

Ein weiteres Karzinomprädispositionssyndrom ist die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Diese Form macht weniger als 1% der kolorektalen Karzinome aus (Gatalica und Torlakovic, 2008). Ursache dieser ebenfalls autosomal-dominant vererbten Erkrankung ist eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens (Adenomatous polyposis coli) auf Chromosom 5q21 (Bodmer et al., 1987). Das APC-Gen besitzt eine wichtige Funktion als Gatekeeper in der Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe 1.1.3). Charakteristischer Weise führt diese Erkrankung zum Auftreten multipler kolorektaler Adenome, am häufigsten nach dem 15. Lebensjahr. Bis zum 40. Lebensjahr entwickeln fast 100% der Betroffenen ein kolorektales Karzinom (Esplen et al., 2009). Auch bei diesen Patienten besteht die Gefahr der Entwicklung einer weiteren Neoplasie, beispielsweise im Gehirn oder in der Schilddrüse (Müller, 2008/09).

Weitere polypöse Syndrome, welche ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Darmkrebs aufweisen, sind das Peutz-Jeghers-, das Gardner-, das Turcot-Syndrom, die familiäre juvenile Polyposis und das Cowden Syndrom. Diese treten in der Bevölkerung allerdings wesentlich seltener auf. (Weitz et al., 2003).

Auch die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden. Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Patienten mit Colitis ulcerosa ein 19-fach höheres Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (Gillen et al., 1994). Laut Eaden et al. (2001) beträgt die Prävalenz eines Kolonkarzinom bei Patienten mit Colitis ulcerosa etwa 4%, wobei vor allem die Krankheitsdauer einen zusätzlichen Risikofaktor darstellt. So beläuft sich das

kumulative Risiko bei diesen Patienten auf 2% nach 10 Jahren, 8% nach 20 Jahren und 18% nach 30 Jahren. Patienten mit Morbus Crohn haben ein 18-fach erhöhtes Darmkrebsrisiko im Gegensatz zu nicht Erkrankten (Gillen et al., 1994).

1.1.3 Molekularbiologische Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Der überwiegende Anteil bösartiger Erkrankungen des Darms entwickelt sich aus benignen Neoplasien des Drüsenepithels. Die Progression von normalem Darmepithel zu einem Karzinom wurde durch die Adenom-Karzinom-Sequenz (Jackman und Mayo, 1951) beschrieben. Fearon und Vogelstein gelang es 1990 dieses histologische Konzept durch Zuordnung genomischer Läsionen um ein genetisches Modell zu erweitern (Fearon und Vogelstein, 1990).

Es handelt sich bei diesem Tumorprogressionsmodell um einen mehrstufigen Prozess, der sich über viele Jahre erstreckt. Dabei führt die sukzessive Anhäufung genetischer Veränderungen, wie die mutationsbedingte Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, zur Transformation in eine neoplastische Zelle (Fearon und Vogelstein, 1990). Durch Mutationen in Protoonkogenen werden Onkogene aktiviert. Diese führen zu einer unkontrollierten Stimulation des Zellzyklus und zu einer stark gesteigerten Zellproliferation. Wichtige Onkogene in der Tumorgenese kolorektaler Karzinome sind *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA*. Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise *APC* oder *PTEN*, haben die Aufgabe, die Zelle vor übermäßiger Proliferation zu schützen, indem sie in genetisch veränderten Zellen den Zelltod (Apoptose) einleiten.

Man geht nach aktuellem Wissensstand davon aus, dass zwei verschiedene Grundmechanismen bei der Entstehung kolorektaler Karzinome eine Rolle spielen, der der Chromosomeninstabilität und der der Mikrosatelliteninstabilität (Allen, 1995).

Der erste Pathomechanismus, welcher dem von Vogelstein et al. (1990) entspricht, beschreibt die Anhäufung von Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen und wird auch als „gatekeeper pathway“ bezeichnet (Kinzler und Vogelstein, 1997). Bis zu 80% der kolorektalen Karzinome weisen eine Instabilität auf chromosomaler Ebene auf, weshalb dieses Konzept auch „Chromosomeninstabilität (CIN)“-Signalweg genannt wird.

Zu den initialen genomischen Veränderungen zählt, wie im Fall der FAP bereits erwähnt, der Verlust des APC-Tumorsuppressorgens (Chromosom 5q21). Hieraus

resultiert eine unkontrollierte Proliferation der Enterozyten, womit die Entwicklung neoplastischer Veränderungen assoziiert ist. Für die Entstehung maligner Tumore sind allerdings noch weitere Mutationen von Bedeutung, wie die Aktivierung des KRAS-Onkogens (Chromosom 12p 12.1) und der Verlust des DCC-Tumorsuppressorgens (Chromosom 18q 21.1). Schließlich führt der Verlust des p53 Tumorsuppressorgens (Chromosom 17p 13) zur Transformation eines Adenoms in ein Karzinom. Mittlerweile geht man davon aus, dass die genaue Reihenfolge exakt definierter Mutationen bei der Entwicklung kolorektaler Karzinome weniger entscheidend ist als vielmehr die Anhäufung unterschiedlicher Mutationen.

Abb. 1 beschreibt die Abfolge molekularbiologischer Veränderungen bei der Adenom-Karzinom-Sequenz

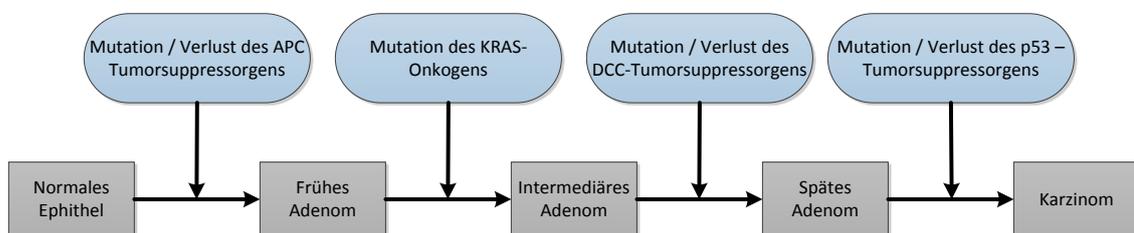


Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein (1990)

Ein bestehendes Adenom muss dabei nicht zwingend zu einem Karzinom entarten. Die Entwicklung vom Adenom zu einem Karzinom ist sowohl von der Größe des Adenoms als auch vom histologischen Adenomtyp abhängig. Die Entartungswahrscheinlichkeit nimmt vom tubulären über das tubulovillöse hin zum villösen Adenom zu. Sind Adenome < 1 cm entarten sie in 0,2% der Fälle, sind sie 1-2 cm groß in 1-6% der Fälle und sind sie >2cm groß, steigt das Entartungsrisiko auf bis zu 3-16% an (Gillespie et al., 1979; Hermanek et al., 1983).

Den zweiten Pathomechanismus zur Entstehung kolorektaler Karzinome stellt der „Mikrosatelliteninstabilität (MSI)“-Signalweg dar, auch unter dem Namen „caretaker pathway“ bekannt (Kinzler und Vogelstein, 1997). Die MSI ist in 90% der Fälle ein typisches Charakteristikum des HNPCC. Aber auch bei etwa 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome sind MSI anzutreffen (Dietmaier, 2010). Mikrosatelliten sind kurze sich wiederholende DNA-Sequenzen, welche anfällig für Fehler sind, die während der Replikation der DNA entstehen können. Im Normalfall sorgt ein intaktes DNA-Mismatchrepair-Systeme dafür, dass solche Fehler ausgebessert werden. Kommt es aber zu Mutationen in Mismatch-Repair-Genen, fallen wichtige Reparaturarbeiten der neu hergestellten DNA-Stränge aus und DNA Fehler können im gesamten Genom akkumulieren (Rüschoff et al., 1998).

Neuere Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass die hier beschriebenen Konzepte die Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms möglicherweise nur unvollständig widerspiegeln. So existieren z.B. Arbeiten, die eine gewisse Überschneidung der beiden dargestellten Pathomechanismen schildern (Fodde et al., 2001; Arnold et al., 2005). Des Weiteren gibt es alternative Konzepte, wie z.B. den „CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp“ (CIMP). CpG-Inseln sind Bereiche im Genom, die reich an Cytosin-Guanin-Basenpaarungen sind und vor allem im Bereich der Promotoren zu finden sind (Herman und Baylin, 2003). Im Normalfall sind diese Bereiche vor Methylierungen geschützt. Im Rahmen der Karzinogenese werden an das Cytosin vermehrt Methylgruppen gebunden, was dazu führen kann, dass die Expression von Tumorsuppressorproteinen unterdrückt wird (Toyota et al., 1999; Munding und Tannapfel, 2009).

1.1.4 Die Lokalisation, Histologie und Morphologie kolorektaler Karzinome

Die häufigste Lokalisation aller kolorektalen Karzinome stellt mit etwa 50% das Rektum dar. Eine exakte anatomische Grenze zwischen Rektum und Kolon existiert nicht. Per Definition handelt es sich dann um ein Rektumkarzinom, wenn der aborale Tumorrand 16 cm oder weniger, gemessen mit einem starren Rektoskop, von der Anokutanlinie entfernt ist. Weitere mögliche Lokalisationen kolorektaler Karzinome sind mit absteigender Häufigkeit das Colon sigmoideum mit etwa 30% und das Coecum/Colon ascendens mit ca. 10%. Die verbleibenden 10% verteilen sich auf übrige Kolonabschnitte (Herold, 2008). In 2-3% der Fälle treten multiple Lokalisationen auf (Müller, 2008/09).

Makroskopisch unterscheidet man drei Wachstumsformen: die schüsselförmig ulzerierende Form mit zentralem Gewebsdefekt und wallartiger Randverdickung (häufigster Typ), die polypöse Form mit blumenkohlartigem Wachstum und die diffus-infiltrierende Wachstumsform (seltener Typ) (Durst, 1998).

Histopathologisch handelt es sich bei kolorektalen Karzinomen überwiegend um Adenokarzinome (85-90%), gefolgt von muzinösen Adenokarzinomen (5-10%) und Siegelringzellkarzinomen (1%). Weitaus seltener anzutreffen sind kleinzellige (neuroendokrine Differenzierung), adenosquamöse, undifferenzierte und Plattenepithelkarzinome (Weitz, 2010).

1.1.5 Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome

Entscheidend für die Therapie und Prognose des Patienten ist das Tumorstadium (Staging). Aus diesem Grund wird der histologische Differenzierungsgrad um das TNM Schema erweitert. Im Jahre 1932 beschrieb *Dukes* als erster ein Stagingssystem für Rektumkarzinome, welches mit der Zeit erweitert wurde und später auch für Kolonkarzinome Anwendung fand. Im klinischen Alltag sollte diese Klassifikation nicht mehr gebraucht werden. Im angloamerikanischen Raum findet sie allerdings auch derzeit noch Verwendung.

In der heutigen klinischen Praxis werden kolorektale Tumore nach dem differenzierten System der TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) unterteilt. Dabei werden die Tumorinfiltrationstiefe (T), der regionale Lymphknotenstatus (N), sowie die Fernmetastasierung (M) berücksichtigt.

Die TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome erfolgt aktuell nach der 7. Auflage der UICC von 2010.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (2010)

T=Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes perikolisches Fett
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
	T4a Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
	T4b Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

N=regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–3 regionären Lymphknoten
	N1a Metastasen in einem regionären Lymphknoten
	N1b Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
	N1c Satellitenherde in der Subserosa ohne regionäre Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
	N2a Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
	N2b Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

M=Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
	M1a Fernmetastasen in einem Organ
	M1b Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder Peritoneum

Aus dem TNM- Schema lässt sich das UICC- Stadium ableiten, welches mit den Ziffern I-IV beschrieben wird. Die Stadiengruppierung ist vor allem für das weitere therapeutische Vorgehen und die Prognose von Bedeutung.

Tabelle 2 zeigt den Zusammenhang zwischen TNM-Klassifikation und UICC-Stadium.

Tabelle 2: Zusammenhang der UICC-Stadien mit der TNM- Klassifikation (2010)

UICC	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2		
Stadium IIA	T3		
Stadium IIB	T4a		
Stadium IIC	T4b		
Stadium IIIA	T1, T2	N1	
	T1	N2a	
Stadium IIIB	T3, T4	N1	
	T2-T3	N2a	
	T1-T2	N2b	
Stadium IIIC	T4a	N2a	
	T3-T4a	N2b	
	T4b	N1-2	
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1b

1.1.6 Grading

Ein weiteres Kriterium für die Bösartigkeit des Karzinoms stellt die Tumordifferenzierung dar. Ausschlaggebend ist hierbei der noch vorhandene Anteil von Drüsengewebe. So können nach der WHO gut differenzierte (G1), mäßig differenzierte (G2), schlecht differenzierte (G3) und undifferenzierte (G4) Karzinome unterschieden werden, wobei G1 und G2 Tumore als niedriggradig maligne (low-grade-Karzinome), G3 und G4 Karzinome als hochgradig maligne (high-grade-Karzinome) betrachtet werden.

1.1.7 Residualtumor

Von entscheidender Bedeutung ist weiterhin, ob der Tumor operativ vollständig entfernt werden konnte. Hierzu dient die sogenannte R-Klassifikation, welche in Tabelle 3 wiedergegeben ist.

Tabelle 3: R-Klassifikation

R= Residualtumor	
RX	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch erkennbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch erkennbarer Residualtumor

1.1.8 Prognose des kolorektalen Karzinoms

Die vollständige Tumorresektion (R0) gilt als einer der entscheidenden Prognosefaktoren. Des Weiteren spielt das Tumorstadium eine wesentliche Rolle.

Tabelle 4 gibt Auskunft über die 5-Jahres-Überlebens-Rate nach R0-Resektion (Weitz, 2010). Zu beachten ist, dass die Prognose von Kolon- und Rektumkarzinomen getrennt betrachtet werden muss.

Tabelle 4: 5-Jahres Überlebensrate der kolorektalen Karzinome

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV*
Kolonkarzinom	70-100%	60-91%	44-60%	3-7%
Rektumkarzinom	72-98%	54-85%	39-60%	3-7%

* 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium IV ohne Therapie

Im Falle eines makroskopisch nachweisbaren kolorektalen Residualtumors (R2) beträgt die mediane Überlebenszeit nur 10 Monate, bei mikroskopisch nachweisbarem Resttumor (R1) 18,7 Monate (Hermanek und Wittekind, 1994). Weitere, zum Teil umstrittene Prädiktoren einer schlechten Prognose sind die Invasion lymphatischer und venöser Gefäße, die perineurale Infiltration sowie die fokale Dedifferenzierung im Bereich der Invasionsfront (Baldus, 2003).

1.1.9 Therapiekonzepte kolorektaler Karzinome

In der heutigen Zeit stehen multimodale Behandlungsmethoden für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zur Verfügung. Grundsätzlich ist ein operativer Eingriff mit vollständiger Resektion des Tumors die zuverlässigste Therapieoption mit einer potentiell kurativen Zielsetzung. Eine solche Operation kann bei nur etwa 75% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom durchgeführt werden (Weitz, 2010). Dabei entscheidet die Lage des Karzinoms über Art und Ausmaß der Operation.

Als Standardverfahren bei Kolonkarzinomen wird der Primärtumor unter Berücksichtigung eines ausreichenden Sicherheitsabstandes und Mitnahme des drainierenden Lymphabflussgebietes mit dem zentralen Blutgefäß reseziert. Um das Risiko der intraoperativen Metastasierung zu minimieren, wird die „no-touch“ Technik nach Turnbull empfohlen (Turnbull et al., 1967). Abhängig von der Lokalisation des Tumors resultiert hieraus eine rechts- bzw. linksseitige Hemikolektomie, eine Kolon-Transversum-Resektion oder eine Sigmaresektion.

Auch bei Rektumkarzinomen spielt die genaue Lokalisation des Tumors eine wichtige Rolle für die Verfahrenswahl. In kurativer Absicht muss neben der Entfernung des

Primärtumors zusätzlich eine partielle oder totale Resektion des Mesorektums und des dazugehörigen Lymphabflussgebietes erfolgen (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2013). Sofern es möglich ist, sollte ein Sphinkter-(Kontinenz-)erhaltendes Resektionsverfahren angestrebt werden. Als Standardverfahren bei Tumoren des oberen Rektumdrittels (aboraler Tumorrund liegt 12 cm bis 16cm von der Anokutanlinie entfernt) gilt die kontinenserhaltende anteriore Rektumresektion mit partieller Mesorektumexzision. Ein aboraler Sicherheitsabstand von 5 cm sollte eingehalten werden (Weitz, 2010). Liegt das Karzinom in den unteren zwei Dritteln, muss eine totale Mesorektumexzision (TME) durchgeführt werden. Der aborale Sicherheitsabstand sollte mindestens 2 cm betragen. Ist ein tumorfreier distaler Sicherheitsabstand von 2 cm zur Linea dentata nicht einzuhalten, wird eine abdominoperineale Rektumexstirpation (APR) mit Anlage eines endständigen Anus praeternaturalis vorgenommen (Müller, 2008/09).

Handelt es sich um low-grade-T1-Rektumkarzinome ohne Lymphknotenbefall, so ist eine transanale Lokalexzision (TEM= transanale endoskopische Mikrochirurgie) ausreichend (Borschitz und Junginger, 2008).

Bei einem primär resektablen Rektumkarzinom im Stadium II und III kann vor der Operation eine neoadjuvante Therapie durchgeführt werden. Sie kann entweder aus einer alleinigen Radiotherapie bestehen oder aus einer kombinierten Radiochemotherapie. Ziel einer solchen Therapie ist zum einen, die Lokalrezidivrate zu senken und zum anderen das sogenannte Downstaging des Tumors. Durch dieses Vorgehen kann gegebenenfalls eine spätere R0-Resektion bzw. eine kontinenserhaltende Operation ermöglicht werden.

Für das Kolonkarzinom haben neoadjuvante Therapiemaßnahmen keinen Stellenwert (Weitz, 2010).

Postoperativ wird bei allen Rektumkarzinompatienten, die eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten haben, eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Eine kombinierte adjuvante Radiochemotherapie sollte bei Patienten im Stadium II und III angewendet werden, wenn sie keine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten haben, bzw. bei Patienten nach einer inkompletten Resektion (R1) oder intraoperativer Tumorperforation. Die Chemotherapie sollte entweder als 5-Fluorouracil (5-FU) Monotherapie, oder in Kombination mit Folinsäure (FS) durchgeführt werden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2013).

Bei Patienten mit einem Kolonkarzinom setzt die Chemotherapie erst postoperativ ein. Hiermit soll der Anteil an Patienten gesenkt werden, die Lokalrezidive erleiden oder Fernmetastasen ausbilden. Patienten im UICC Stadium I–II, also nodalnegative Patienten, haben ein geringes Rezidivrisiko und profitieren nicht von einer adjuvanten Therapie. In besonderen Fällen, insbesondere bei Patienten mit Risikofaktoren im UICC Stadium II (z.B. Vorliegen von T4, Tumorinvasion in Venen oder Lymphgefäßen, Tumorperforation), muss eine adjuvante Therapie in Betracht gezogen werden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2013). Sobald der Lymphknotenstatus positiv ausfällt, ab einem UICC Stadium III, ist eine adjuvante Therapie bei Fehlen von Kontraindikationen grundsätzlich indiziert. Vor der Einführung einer Dreifachkombination galt die Kombination bestehend aus 5-Fluoruracil und Folinsäure als Standard (Seufferlein et al., 2003). Das sogenannte FOLFOX-Schema, bestehend aus einer Kombination von Folinsäure+5-Fluoruracil und Oxaliplatin, stellt heute eine hocheffektive Form der Dreifachkombination dar (Weitz, 2010). Eine weitere Option ist die Verwendung von Folinsäure+5-Fluoruracil in Kombination mit Irinotecan, bekannt als FOLFIRI-Schema.

Die Prognose von metastasierten kolorektalen Karzinomen ist trotz Anwendung neuer Chemotherapeutika weiterhin schlecht.

Neue Erkenntnisse im Bereich der Zellzyklusregulation in Tumorzellen haben dazu geführt, dass neue zielgerichtete molekulare Substanzen entwickelt werden konnten.

Hierdurch steht neben der konventionellen Chemotherapie, welche ubiquitär auf alle Zellen des menschlichen Organismus gerichtet ist und oft mit Nebenwirkungen assoziiert ist, eine gezielte pharmakologische Therapie zur Verfügung, welche gegen spezifische molekulare Strukturen in der Tumorzelle gerichtet ist. So ist es möglich geworden, die Angiogenese zu hemmen oder bestimmte Wachstumsrezeptoren zu blockieren, um so einen antiproliferativen Effekt auf den Tumor zu bewirken. Für eine adjuvante Therapie zugelassen sind momentan drei monoklonale Antikörper: Bevacizumab (Avastin®), welcher gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) gerichtet ist, sowie die zwei monoklonalen Antikörper *Cetuximab* (Erbix®) und *Panitumumab* (Vectibix®) welche den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) blockieren. Unter Einsatz dieses Therapieregimes konnte das progressionsfreie Überleben, sowie teilweise das Gesamtüberleben verlängert werden (Dietel et al., 2008).

Da dieser neue Therapieansatz Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist, soll im Folgenden auf die epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, vor allem auf den EGF-Rezeptor näher eingegangen werden. Zwei Signalkaskaden liegen dabei im Fokus der Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Mutationen innerhalb dieser Kaskaden analysiert und deren mögliche Konsequenzen dargelegt.

1.2 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor

Charakteristika des epidermalen Wachstumsfaktors

Der EGFR ist ein Transmembranprotein und zählt zu der Familie der Tyrosinkinase-Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Bisher sind vier solcher transmembranären Rezeptoren bekannt: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3), und HER4 (erbB-4) (Yarden, 2001). Bei dem EGFR handelt es sich um ein 170 kDa schweres Protein, bestehend aus drei funktionellen Einheiten: einer cysteinreichen, extrazellulären Liganden bindenden Domäne, einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Bislang ist eine Vielzahl von Liganden entdeckt, die an den EGFR binden können. Diese werden auch als „EGF related peptide growth factors“ bezeichnet. Eine wesentliche Rolle spielt hier der EGF (epidermale Wachstumsfaktor). Weitere Liganden sind TGF- α (tumor growth factor- α), Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), Epiregulin und Neuregulin G2 β . Diese Liganden weisen spezifische Affinitäten zu verschiedenen Rezeptoren auf und können aus diesem Grund in drei Gruppen gegliedert werden.

EGF, TGF- α und Amphiregulin binden nur an den EGF-Rezeptor, Neuregulin nur an den HER3-/HER4-Rezeptor und Betacellulin, HB-EGF und Epiregulin binden an den EGF- und HER4-Rezeptor (Riese und Stern, 1998; Wells, 1999; Hynes et al., 2001). Bisher konnte noch kein Ligand für den HER2 Rezeptor identifiziert werden, vermutlich dient er als Korezeptor für die restlichen Liganden (Graus-Porta et al. 1997). Da die verschiedenen Liganden bestimmte Rezeptordimerisierungen begünstigen, ergibt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten der Aktivierung zytoplasmatischer Signalmoleküle, welche wiederum verschiedene Signalwege in Gang setzen (Alroy und Yarden, 1997).

Durch die Bindung des Liganden an der extrazellulären Domäne wird eine EGFR-vermittelte Signaltransduktion in Gang gesetzt. Zuerst führt die Aktivierung zu einer Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren, entweder zweier EGFR oder eines EGFR mit einem anderen Mitglied der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Anschließend folgt

eine Autophosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste (Schlessinger, 2000). Durch Phosphorylierung werden Bindungsstellen für intrazelluläre Effektorproteine frei, wodurch verschiedene Signalkaskaden zum Nukleus eingeleitet werden. Ziel dieser Kaskaden ist die Beeinflussung der Transkription verschiedener Zielgene, die für das Zellwachstum, die Differenzierung und die Zellproliferation wichtig sind (Hackel et al., 1999; Prenzel et al., 2001).

Der EGFR wird entweder durch eine Internalisierung oder durch Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threoninreste der intrazellulären Domäne inaktiviert.

1.3 EGFR abhängige Signalwege

Durch den EGFR wird eine Reihe von Signalwegen gesteuert, dazu gehören der *KRAS-BRAF-MAPK*-, *PIK3CA-AKT-PTEN*-, *JNK/STAT*-, *cSrc*- und der *PLC γ* Signalweg. Vor allem der *KRAS-BRAF-MAPK*- sowie der *PI3K-AKT*- Signalweg stellen zwei wichtige Signalkaskaden dar (McCubrey et al. 2006). Im Folgenden sollen diese beiden Signalwege genauer beschrieben werden.

1.3.1 Der RAS-RAF-MAPK-Signalweg

Der RAS-RAF-MAPK-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei zellulären Prozessen wie z.B. Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und Tumorgenese (Robinson und Cobb, 1997).

Der Signalweg beginnt mit der Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor. Nach der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase kann sich hieran das Adapterprotein GRB2 (growth factor receptor binding protein 2) anlagern, an welches wiederum das Protein SOS (son-of-sevenless) bindet (Fremin und Maloche, 2010). SOS ist dann für die Aktivierung des membrangebundenen RAS (rapid accelerating sarcoma) verantwortlich, indem es den Austausch von GDP in GTP katalysiert (Rozakis-Adcock et al. 1993).

Das aktivierte RAS ist dann in der Lage, mit nachgeschalteten Effektorproteinen zu interagieren. Ein wichtiges Protein ist die Serin/Threoninkinase RAF, die nun die Aktivierung der MAPK-Kaskade bewirkt. Dieses führt zur Phosphorylierung von MEK1/2 (mitogen induced extracellular kinase) (Avruch et al., 1994), welche wiederum ERK1/2 (extracellular signal-regulated-kinase) phosphoryliert. Die Signalkaskade mündet schließlich in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Diese regulieren die Expression zahlreicher Gene, welche vor allem für die Zellproliferation verantwortlich sind.

In Abb. 2 wird der RAS-RAF-MAPK-Signalweg schematisch dargestellt.

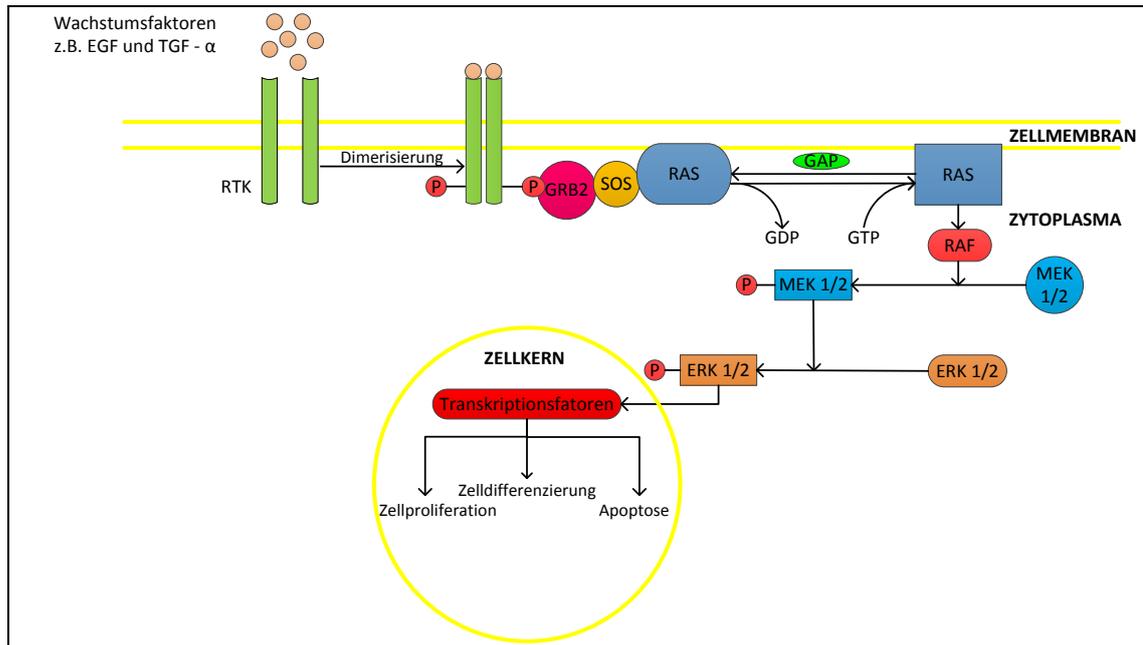


Abb. 2: RAS-RAF-MAPK-Signalweg

1.3.2 Das RAS-Protein

Das RAS-Protein (Rat sarcoma) gehört zu der Familie der GTP-bindenden Proteine (Bourne et al., 1990). Insgesamt sind heute drei humane RAS-Proteine bekannt: HRAS (Harvey-RAS), KRAS (Kirsten-RAS) und NRAS (Neuroblastom-RAS) (Barbacid, 1987). Ihre Expression in unterschiedlichen Geweben variiert sehr stark. In Haut und Muskelzellen findet man vorwiegend HRAS, während im Darm und Thymus KRAS überwiegt und NRAS im Thymus und Hoden dominiert (Lowy und Willumsen, 1993). Das RAS-Protein gilt als ein wichtiger Schlüsselregulator in Signaltransduktionswegen, die der Zellproliferation und der Differenzierung dienen, indem es die Funktion eines molekularen Schalters übernimmt. RAS kann von der inaktiven GDP-bindende in die aktive GTP-bindende Konformation wechseln und so mit weiteren Signalproteinen interagieren (Downward, 1992). Da diese Reaktionen nur langsam ablaufen, wird der Prozess durch verschiedene Faktoren beschleunigt. Dies geschieht einerseits durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs= guanin nucleotide Exchange Factors), die für den Austausch von GDP zu GTP verantwortlich sind, andererseits wird dieser Prozess durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt, wodurch GTP zu GDP dephosphoryliert wird (Wittinghofer und Waldmann, 2000).

1.3.3 Mutationen im *KRAS*-Gen

In epithelialen Neoplasien treten besonders häufig Mutationen des *KRAS*-Gens auf, wohingegen Mutationen von *H-* oder *NRAS* nur selten beschrieben werden. Eine Mutation ist bereits in einem frühen Stadium der Karzinogenese des Kolonkarzinoms zu finden. Durch eine Punktmutation des *KRAS*-Gens wird die Konfiguration des Proteins so verändert, dass das GTPase-aktivierende Protein nicht mehr binden kann und somit *KRAS* dauerhaft in der aktiven GTP-bindenden Form vorliegt (Fearon, 1993). Diese Mutationen befinden sich mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit in Codon 12, 13 und 61 (Losi et al., 1992; Bos et al., 1987). Mit etwa 80% ist das Codon 12 am häufigsten betroffen, es folgt das Codon 13 mit etwa 10% und Codon 61 mit etwa 5% (Andreyev et al., 1998; Kampman et al., 2000). Über die oben beschriebene Signalkaskade werden durch ein mutiertes *KRAS*-Gen permanent wachstumsstimulierende Signale in den Zellkern geleitet, die die Tumorentstehung, das Tumorwachstum fördern oder die Metastasierungsrate steigern können (Weijzen et al., 1999). In einer Vielzahl menschlicher Krebszellen lassen sich Mutationen im RAS-Onkogen nachweisen (Bos, 1989). *KRAS*-Mutationen treten in einem hohen Prozentsatz kolorektaler Karzinome auf. Dabei variiert die Inzidenz der *KRAS*-Mutationen je nach Literatur zwischen 32% und 50% (Bos, 1989; Forrester et al., 1987; Samowitz et al., 2000; Finkelstein et al., 1993; Olschwang et al., 1997).

1.3.4 Das RAF-Protein

Das RAF-Protein (rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma) gehört zu der Gruppe der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Es existieren drei Isoformen: *ARAF*, *BRAF* und *CRAF* (auch *RAF1* genannt) (Roskoski, 2010). *CRAF* ist ubiquitär vorhanden, *BRAF* wird vor allem in neuronalen Zellen exprimiert und *ARAF* findet sich am häufigsten in Zellen des Urogenitaltrakts (Barnier et al., 1995). Diese Serin/Threonin-Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der Signalkaskade des RAS-RAF-MAPK-Signalwegs, indem sie als Bindeglied zwischen RAS und MEK1/2 fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass zur Aktivierung von *BRAF* eine durch RAS vermittelte Membranrekrutierung ausreicht, wohingegen *CRAF* als auch *ARAF* zusätzliche Phosphorylierungen zur Aktivierung benötigen (Mason et al., 1999; Fabian et al., 1993; Wellbrock et al., 2004). Weiterhin unterscheiden sich die drei Isoformen in der Fähigkeit, MEK1/2 zu aktivieren (Marais et al., 1997), wobei *BRAF* als Hauptaktivator von MEK1/2 fungiert. *CRAF* und *ARAF* scheinen hingegen eher für die Feinabstimmung der ERK-Aktivität zuständig zu sein (Wellbrock et al., 2004).

1.3.5 Mutationen im *BRAF*-Gen

Während Mutationen in *ARAF* und *CRAF* nur sehr selten zu finden sind, treten in etwa 7% aller menschlichen Karzinome Mutationen im *BRAF*-Gen auf (Garnett et al., 2005). Die Häufigkeit der Mutation variiert in verschiedenen Geweben stark. In etwa 30-70% maligner Melanome, in etwa 30-50% papillärer Schilddrüsenkarzinome und in etwa 30% der Ovarialkarzinome ist eine Mutation des *BRAF*-Gens anzutreffen (Garnett und Marais, 2004). In kolorektalen Karzinomen wird eine Prävalenz von 5-17% beschrieben (Samowitz et al., 2005; Ogino et al., 2009; Barault et al., 2008; Fransen et al., 2004; Nagasaka et al., 2004; Li et al., 2006; Santini et al., 2010; De Roock et al., 2010). Bisher konnten mehr als 30 verschiedene *BRAF*-Mutationen identifiziert werden. Mit etwa 90% ist die Punktmutation im Exon 15 die am häufigsten auftretende Mutation. Durch diese Mutation findet ein Austausch von Valin gegen Glutamin an der Position 599 im Protein (V599E) statt (Davies et al., 2002). Damit ist die Kinaseaktivität des Proteins ohne Stimulation des vorgeschalteten RAS möglich und darüber hinaus deutlich erhöht. Der nachgeschaltete Signalweg wird dauerhaft aktiviert und die Proliferation und Transformation zur Tumorzelle induziert.

1.3.6 Der PI3K-AKT-Signalweg

Der PI3K-AKT-Signalweg spielt wie auch der RAS-RAF-MAPK-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung intrazellulärer Prozesse zum Zellkern. Dabei ist der PI3K-AKT-Signalweg aufgrund seiner vielen Schleifen und Verzweigungen sehr komplex, weshalb hier nur auf die wichtigsten Abschnitte eingegangen werden soll.

Die Aktivierung des Signalwegs kann dabei durch verschiedene Wege erfolgen.

Am Anfang wird, wie auch beim RAS-RAF-MAPK-Signalweg, die Rezeptortyrosinkinase durch Bindung von Wachstumsfaktoren aktiviert und der zytoplasmatische Anteil phosphoryliert. Durch seine regulatorische Untereinheit (p85) kann dann PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) entweder direkt oder mit Hilfe von Adapterproteinen z.B. IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) an die Phosphotyrosinreste binden. Die Adapterproteine sind dabei an der phosphorylierten Domäne der Rezeptortyrosinkinase gebunden. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung besteht durch das aktive GTP-gebundene RAS (Stein und Waterfield, 2000).

Aktiviertes PI3K bewirkt nun mit seiner katalytischen Untereinheit (p110) die Umwandlung von PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat) in PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat) an der Innenseite der Plasmamembran (Blume-

Jensen und Hunter, 2001). PIP3 wirkt nun als second messenger und sorgt dafür, dass an ihm Signalproteine mit PH-Domäne (Pleckstrin Homology) binden können, wie die Serin/Threonin-Kinase AKT, auch als Proteinkinase B bezeichnet (Engelman et al., 2006). Durch die Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1) und einer weiteren Kinase wird AKT an Threonin (308) und Serin (473) phosphoryliert und somit aktiviert (Sarbasov et al., 2005).

Die AKT-Kinase interagiert dann mit vielen nachgeschalteten Substraten, indem sie diese phosphoryliert und somit aktiviert oder auch inhibiert. Zusammengefasst in drei Gruppen dient AKT dem Überleben der Zelle, der Proliferation und dem Zellwachstum der einzelnen Zelle (Vivanco und Sawyers, 2002).

So wird beispielsweise die proapoptotische Wirkung von Caspase-9 durch Phosphorylierung inhibiert (Cardone et al., 1998). Weiterhin reguliert AKT den antiapoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Romashkova und Makarov 1999).

Durch PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog), eine Lipidphosphatase, wird die AKT-Kinase inaktiviert, indem PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert wird (Steelmann et al., 2004). Die Proliferation der betroffenen Zelle wird damit unterbunden und die Apoptose eingeleitet. PTEN agiert somit als Tumorsuppressor (Yamada und Araki, 2001).

In Abb. 3 sind die verschiedenen Möglichkeiten zur Aktivierung der PI3-Kinase gezeigt (links) sowie die daraus resultierende Bildung von PIP3 und die Aktivierung von AKT (rechts).

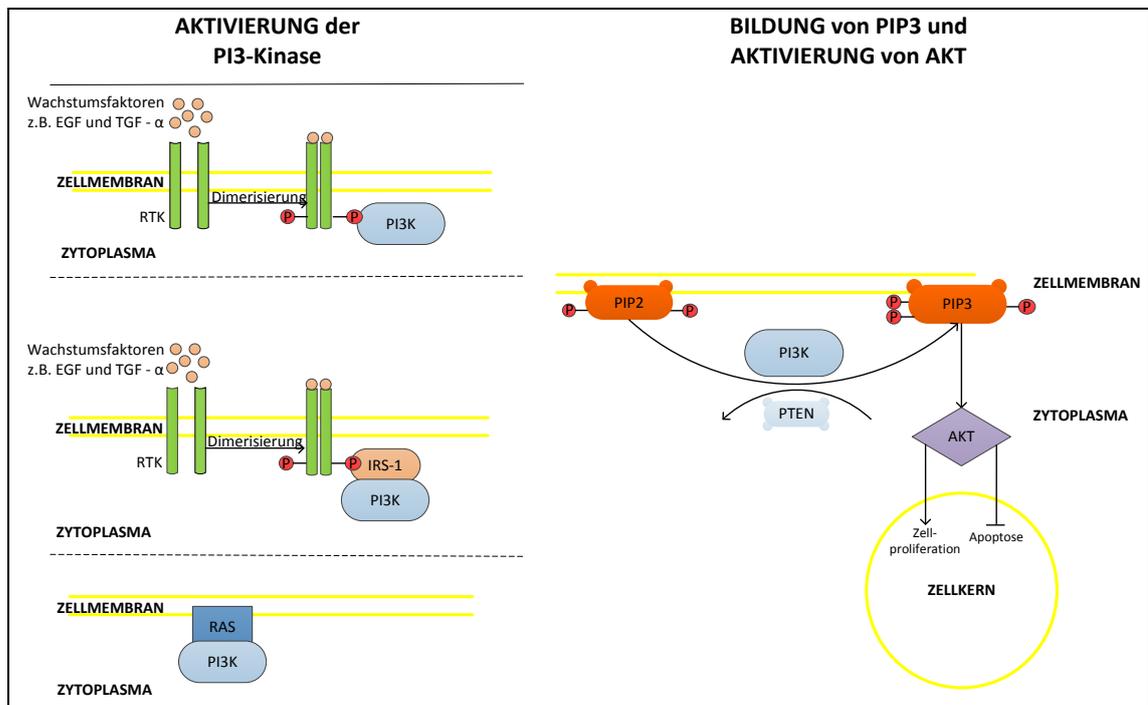


Abb. 3: PI3K-AKT Signalweg

1.3.7 Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) gehören zu der Familie der Lipidkinasen. Sie besitzen die Eigenschaft, die 3'-OH-Position des Inositolrings von Phosphatidylinositolen zu phosphorylieren (Rameh und Cantley, 1999). Dabei sind sie an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen, wie z.B. an der Regulation intrazellulärer Transportprozesse, dem Zellwachstum und Differenzierungsvorgängen, beteiligt (Leevers et al., 1999).

Abhängig von ihrer jeweiligen Proteindomänenstruktur der katalytischen Untereinheit bevorzugen sie spezifische Substrate und können in drei funktionelle Untergruppen gegliedert werden: Klasse IA/IB, II und III. Die für die Rezeptortyrosinkinasen bedeutenden PI3K befinden sich in der Klasse IA. Diese sind Heterodimere und setzen sich aus einer der drei katalytischen (p110 α , p110 β , p110 δ) und einer der fünf regulatorischen Untereinheiten (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) zusammen (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999; Engelman et al., 2006).

Als Substrat bevorzugt die Klasse IA der PI3-Kinasen vor allem PIP₂, wodurch die in 1.3.6 erläuterte Signalkaskade fortgeführt wird.

1.3.8 Mutationen im *PIK3CA*-Gen

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass PI3K eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren spielt. Es zeigte sich, dass eine Mutation des *PIK3CA*-Gens, welches die katalytische Untereinheit p110 α kodiert, mit der Tumorgenese assoziiert sein kann (Aoki et al., 2000; Chang et al., 1997). In einer Vielzahl von Tumorentitäten konnte eine *PIK3CA*-Mutation nachgewiesen werden. (Samuels und Ericson, 2006). In etwa 15% der kolorektalen Karzinome tritt eine solche Mutation auf (Nosho et al., 2008). Die überwiegende Mehrzahl der Mutationen liegt innerhalb von Exon 9 (Helikale-Domäne) und Exon 20 (Kinase-Domäne) des *PIK3CA*-Gens (Samuels et al., 2004). Es handelt sich hierbei um Hotspot-Regionen, in denen einzelne Aminosäuren substituiert werden (Vogt et al., 2007).

Durch diese genetische Veränderung ist die Lipidkinaseaktivität deutlich erhöht (Karakas et al., 2006). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und verminderter Apoptose, so dass letztendlich eine Tumorentstehung begünstigt wird.

1.4 Die Bedeutung des EGF-Rezeptors in der Onkologie

Unter normalen Bedingungen wird der EGF-Rezeptor durch ein streng kontrolliertes System reguliert. Wird dieser Regulationsmechanismus durch pathologische

Veränderungen, wie z.B. eine durch Genamplifikation verursachte Überexpression des EGFR gestört, kann dies zur Entstehung neoplastischen Gewebes führen. Diese Entwicklung trägt schließlich zur Manifestation eines Tumors bei. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass der EGFR in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert vorliegt. Hierzu zählen unter anderem Mamma- und Bronchialkarzinome, Kopf-Hals-Tumore, Glioblastome sowie kolorektale Karzinome (Lynch et al., 2004; Salomon et al., 1995; Grandis et al., 1996; Goike et al., 1999; Messa et al., 1998). Eine Überexpression des EGFR hat zur Folge, dass der Rezeptor verstärkt aktiviert wird und Signalkaskaden unkontrolliert weitergeleitet werden. Durch diesen Vorgang werden die Zellproliferation, die Angiogenese, die Metastasierung und antiapoptotische Vorgänge verstärkt (Salomon et al., 1995; Wells, 1999).

Des Weiteren weisen Karzinome mit einer Überexpression des EGFR häufig eine geringere Sensitivität gegenüber Chemo- und Strahlentherapie auf und sind mit einem aggressiverem Wachstum sowie einer schlechteren Prognose assoziiert (Krause et al., 2006). Neben der Überexpression sind auch verschiedene Mutationen des EGF-Rezeptorgens bekannt. Die EGFRvIII-Mutante ist die am häufigsten detektierte Mutation in soliden humanen Tumoren (Moscatello et al., 1998). Durch diese Mutation wird die extrazelluläre Rezeptordomäne modifiziert. Dies hat zur Folge, dass der Rezeptor durch eine ligandenunabhängige, konstitutiv enzymatische Aktivität nachgeschaltete Signalkaskaden induziert. Zudem wird der EGFRvIII nur verzögert internalisiert, wodurch seine Wirkung zusätzlich noch verlängert wird (Huang et al., 1997).

1.4.1 Therapeutische Beeinflussung des EGF-Rezeptors

In den letzten Jahren konnte neben den herkömmlichen Therapieoptionen, wie der chirurgischen Intervention und der Strahlen- und Chemotherapie, ein neuer Therapieansatz an Bedeutung gewinnen. Durch die Identifikation molekularer Eigenschaften von Tumorzellen, ist es gelungen, eine Therapie zu entwickeln, welche sich spezifisch gegen Tumorzellen richtet, die sogenannte „Target Therapie“.

Diese Therapie wirkt, indem sie mit spezifischen molekularen Zielen, wie z.B. Oberflächenrezeptoren interagiert und somit bestimmte Regulationsmechanismen und Signaltransduktionswege der Tumorzellen blockiert. Von besonderem Interesse sind Ziele, von denen bekannt ist, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Tumorphiliferation spielen. Der EGF-Rezeptor stellt daher ein attraktives Ziel eines solchen Therapieansatzes dar. Dabei kann die Funktionalität und Aktivität dieses Rezeptors

durch verschiedene Strategien inhibiert werden. Zwei therapeutische Ansätze haben dabei bereits Eingang in die Therapie gefunden: monoklonale Antikörper und synthetische Tyrosinkinaseinhibitoren (De Bono und Rowinsky, 2002). Durch die Bindung monoklonaler Antikörper an die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne des EGF-Rezeptors wird die Anlagerung natürlicher Liganden verhindert (Ciardiello und Tortora, 2008).

Die Tyrosinkinaseinhibitoren richten sich gegen die intrazelluläre katalytische Domäne des EGF-Rezeptors. Sie besetzen die ATP-Bindungsstelle, verhindern somit die Autophosphorylierung der Tyrosinreste und unterbinden dadurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalproteine (Ciardiello und Tortora, 2001). Zwei intensiv erforschte Tyrosinkinaseinhibitoren sind Erlotinib (Tarceva[®]) und Gefitinib (Iressa[®]), welche in der Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) eingesetzt werden (Siegel-Lakhai et al., 2005).

Seit 2013 ist Regorafenib (Stivarga[®]) als erster Tyrosinkinaseinhibitor bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom zugelassen, deren Erkrankung bei Verwendung etablierter Behandlungskonzepte fortschreitet.

1.4.2 Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den EGFR in der Therapie kolorektaler Karzinome

Durch die Bindung monoklonaler Antikörper an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors wird die Bindung natürlicher Liganden, wie EGF oder TGF α verhindert. Dadurch findet die Liganden-induzierte Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase nicht statt und nachgeschaltete mitogene Signalkaskaden werden inhibiert. Schließlich wird somit die Zellproliferation gehemmt und die Apoptose von Tumorzellen gefördert (Goldstein et al., 1995; Mendelsohn und Baselga, 2003).

Inzwischen wurden mehrere monoklonale Antikörper entwickelt, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet sind. Seit 2004 ist *Cetuximab* (Erbix[®]) in Europa als erster monoklonaler Antikörper zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen chimären (variable Teil des AK ist ein Mausprotein) IgG1-Antikörper, der gegen die extrazelluläre Bindungsdomäne des EGFR gerichtet ist und dadurch endogene Liganden verdrängt (Cunningham et al., 2004). Die European Medicines Agency (EMA) hat *Cetuximab* 2011 bei Patienten mit metastasierten EGFR-exprimierenden kolorektalem Karzinom, in Kombination mit Chemotherapie oder als Monotherapie bei

Patienten, bei denen die Therapie mit Oxaliplatin und Irinotecan versagt hat bzw. bei Patienten, die Irinotecan nicht vertragen, zugelassen.

Als zweiter monoklonaler Antikörper, der gegen den EGFR gerichtet ist, wurde im Jahr 2007 *Panitumumab* (Vectibix®) von der EMA bei metastasierten EGFR-exprimierenden kolorektalen Karzinomen zugelassen. Dieser Antikörper ist im Gegensatz zu *Cetuximab* ein rein humaner IgG2-Antikörper. *Panitumumab* wurde zunächst in der Monotherapie bei Patienten, bei denen Fluoropyrimidin-, Oxaliplatin- und Irinotecan-haltige Therapieregime versagt hatte, zugelassen. Im Jahr 2011 genehmigte die EMA eine Zulassungserweiterung. Seitdem ist *Panitumumab* auch als Erstlinientherapie in Kombination mit FOLFOX und als Zweitlinientherapie in Kombination mit FOLFIRI bei Patienten, die in der Erstlinientherapie eine Fluoropyrimidin-haltige Chemotherapie erhalten haben (ausgenommen Irinotecan), zugelassen.

Zur Optimierung der Therapie wurde intensiv nach prädiktiven molekularen Markern geforscht. Cunningham et al. (2004), wie auch Saltz et al. (2004), konnten durch ihre Studien nachweisen, dass keine Korrelation zwischen der Ausprägung der immunhistochemisch nachgewiesenen EGFR-Expression und der Effektivität der Anti-EGFR-Therapie besteht.

In zahlreichen Studien sowohl für *Panitumumab* (Amado et al., 2008) als auch für *Cetuximab* (Lièvre et al., 2006; Bokemeyer et al., 2009; van Cutsem et al., 2009) in der Mono- oder Kombinationstherapie, erwies sich dagegen eine *KRAS*-Mutation als ein negativer prädiktiver Faktor. Das heißt, dass die Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor nur dann Erfolge erzielte, wenn ein *KRAS*-Wildtyp vorlag. Denn nur im nicht-mutierten Zustand kann das *KRAS*-Gen durch EGFR- übertragene Signale gesteuert werden. Ein mutiertes *KRAS*-Gen hingegen aktiviert den Signalweg autonom und verliert damit seine Regulierbarkeit.

Übereinstimmende Ergebnisse konnten in Zusammenhang mit einer *BRAF* Mutation von Di Nicolantonio et al. (2008) beobachtet werden.

Aus diesem Grund ist es eine unabdingbare Voraussetzung einer adäquaten Therapie, den *KRAS* Mutationsstatus des Patienten zu bestimmen und ihn ggf. von einer solchen Therapie auszuschließen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, wie *Cetuximab* und *Panitumumab*, hat in den vergangenen Jahren die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung metastasierter, kolorektaler Karzinome deutlich erweitert. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass nur solche Patienten von der Therapie profitieren, bei denen keine *KRAS*- Mutation vorliegt.

Allerdings weisen neue Studien über kolorektale Karzinome darauf hin, dass auch solche Patienten, die zuvor als *KRAS*-Wildtyp getestet wurden, nicht sicher auf eine solche Therapie ansprechen (Linardou et al., 2008; Sartore-Bianchi et al., 2009). Eine mögliche Erklärung könnte die intratumorale Heterogenität sein, die irrtümlicherweise dazu führt, dass Patienten als „Wildtyp“ getestet werden und daher eine EGFR-Antikörpertherapie erhalten. Solche heterogene Verteilungen konnten bei *KRAS*-Mutationen im Primärtumor teilweise schon bewiesen werden (Losi et al., 2005). Widersprüchlich ist die Datenlage im Vergleich zwischen *KRAS*-Mutationen im Primärtumor und Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen. Auch fehlen bisher Ergebnisse zur heterogenen Verteilung von *BRAF*- und *PIK3CA*- Mutationen in kolorektalen Karzinomen.

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Gründe dieses Therapieversagens zu identifizieren. Dafür wurden Mutationen in EGFR abhängigen Signalproteinen, wie *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* untersucht. Die Suche wurde dabei auf sogenannte Hotspots fokussiert, d.h. *KRAS*-Mutationen wurden speziell in Codon 12 und 13 untersucht, *BRAF* Mutationen in Codon 600 und *PIK3CA*- Mutationen in Exon 9 und 20.

Als eine mögliche Ursache falsch- negativ getesteter Untersuchungsmaterialien wurde die Prävalenz intratumoraler Heterogenität untersucht. Weiterhin wurde nach einer möglichen Heterogenität zwischen Primärtumor und korrespondierenden Metastasen wie Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen geforscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra GmbH (Göttingen)
Elektrophorese-kammer	Biometra GmbH (Göttingen)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Geldokumentationssystem	Biometra; BioDocAnalyse(Göttingen)
	Video Copy Processor Mitsubishi (Ratingen)
Kamerasystem, RT COLOR	Diagnostic Instruments Inc. (USA)
Kühlschränke	Liebherr AG (Bulle, Schweiz)
Mikroskop	Leica/Leitz (Wetzlar)
Mikrowelle	Micromat AEG (Nürnberg)
NanoDrop® ND 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
PCR-Gerät, TPersonal	Whatman Biometra(Göttingen)
PCR-Gerät, TGradient	Whatman Biometra(Göttingen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühltruhe -80°C	Hettich (Tuttlingen)
Transilluminator 312 nm BioDoc Analyze	Biometra GmbH (Göttingen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfreaktionsgefäße (0,5-2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Objektträger (ca. 76x26 mm/3x1 inch) 50x	Starfrost Engelbrecht GmbH (Edermünde)
Parafilm	American National Can TM (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg)
PCR Tubes	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)

2.1.3 Chemikalien

Agarose, Peq Gold universal	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Deisenhofen)
DNA -Leiter 50bp	Fermentas GmbH
EDTA 1% (w/v)	Biochrom AG kGaA
Ethidiumbromidlösung (1%) 10mg/ml	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycerin	Merck KGaA (Darmstadt)
6x Loading Dye	Fermentas GmbH (St.Leon-Roth)
Xylol	Merck KGaA (Darmstadt)

2.1.4 Kommerzielle Testsysteme (Kits)

2x PCR Master Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
EZ 1 DNA Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.5 Lösungen und Puffer

10 X TBE-Puffer

108 g Tris Base (890nM)

55 g Borsäure

40 ml 0,5M EDTA pH 8,0

TE-Puffer

12 mg Tris- HCl (10mM)

200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 (1mM)

Ad 100ml Aqua bidest.

EDTA 0,5 M pH 8.0

18,6 g EDTA-Dinatriumsalz (Titrplex III)

80 ml Aqua dest.

Mit ca. 2 g NaOH-Plättchen wird ein pH von 8.0 eingestellt, anschließend wird die Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

5 x GBX-Gel Ladepuffer für DNA

Endkonzentration: 0,25% Bromphenolblau (BPB)
 0,25% Xylencyanol (XC)
 30% Glycerol in Wasser

10 ml Ansatz: 25 mg BPB
 25 mg XC
 3,45 ml Glycerol auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen

2.1.6 Verwendete Primer

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Primer3 Software designed und von der Firma Invitrogen™ bezogen.

In Tabelle 5 sind die Primersequenzen aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer	Sequenz 5'→3'	Größe
KRAS Exon 2	for 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' rev 5'-AAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'	171 bp
BRAF Exon 15	for 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3' rev 5'-AGCCTCAATTCTTACCATCCA-3'	191 bp
PIK3CA Exon 9	for 5'-GACAAAGAACAGCTCAAAGCA-3' rev 5'-ACATGCTGAGATCAGCCAAA-3'	166 bp
PIK3CA Exon 20	for 5'-ATGATGCTTGGCTCTGGAAT-3' rev 5'-GCATGCTGTTAATTGTGTGG-3'	188 bp

2.1.7 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 100 Patienten (56 Männer und 44 Frauen), bei denen in den Jahren 2002 bis 2008 ein Adenokarzinom des Kolorektums diagnostiziert wurde. Die Altersspanne liegt zwischen 18 und 94 Jahren. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 65 Jahre. Alle zu untersuchenden Präparate stammen aus dem Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf.

Diese Arbeit entstand in Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. med. N. H. Stoecklein, Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie der Universität Düsseldorf.

Das Aktenzeichen der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität lautet 3821. Die Patientendaten wurden im Rahmen dieser Arbeit pseudoanonymisiert.

2.1.8 Evaluation der kolorektalen Karzinome

Alle Kolonkarzinompräparate wurden in den Jahren 2002 bis 2008 im Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf in 5%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von diesen Blöcken 5 µm dicke Schnitte angefertigt,

auf Objektträgern aufgetragen und zur histologischen Untersuchung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden für jeden Patienten alle HE-Schnitte sowie die dazugehörigen Paraffinblöcke dem Archiv entnommen. Zur Überprüfung der Stadieneinteilung wurde jede zu untersuchende Gewebeprobe nochmals mikroskopiert, so dass im Folgenden nur solche Präparate analysiert wurden, die mindestens als UICC-Stadium pT3 klassifiziert werden konnten. Zur genauen Tumorlokalisation wurde das zu untersuchende Gewebe auf den HE-Schnitten mittels Filzstiften markiert. Im Anschluss daran wurde für die DNA Isolierung für jeden Patienten von jeweils einem Paraffinblock 4 Schnitte á 5µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Entparaffinieren

Vor der manuellen Mikrodissektion müssen die Schnitte, welche das zu untersuchende Tumormaterial tragen, entparaffiniert werden. Dazu werden die Schnitte in einen Objektträgerhalter eingestellt und durch folgende Reagenzien geführt.

Xylol 2x 15 min

Ethanol 2x 5 min

Anschließend werden die Schnitte vorübergehend in destilliertem Wasser gelagert, wobei darauf zu achten ist, dass keine Alkohol- oder Paraffinschlieren auf dem Objektträger zurückbleiben. Nach diesem Schritt können die Gewebeschnitte für die DNA-Isolierung weiter verwendet werden.

2.2.2 Manuelle Mikrodissektion der Gewebeschnitte

Zunächst werden 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 190 µl Digestionspuffer (EZ 1 DNA Tissue Kit, Qiagen) befüllt und entsprechend der abzutragenden Gewebelokalisation beschriftet. Hierbei entspricht *Z* dem Tumorzentrum, *F* der Tumorinvasionsfront, *LK* der Lymphknotenmetastase und *M* der Fernmetastase. Anschließend wird das zu untersuchende Gewebe vom Objektträger abgetragen und in die bereits vorbereiteten Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Dabei werden die zuvor angefertigten HE-Schnitte mit den Markierungen zur genauen Tumorlokalisation als Vergleich herangezogen.

2.2.3 Isolierung der Tumor DNA

Um die DNA zu lysieren, werden in jedes Eppendorfreaktionsgefäß jeweils 10 µl Proteinase K hinzugefügt. Anschließend folgt die Inkubation über Nacht in einem Schüttelheizblock bei einer Temperatur von 56 °C. Sollten sich am nächsten Tag noch Gewebeüberreste in dem Reaktionsgefäß befinden, wird erneut 10 µl Proteinase K hinzugegeben und die Lösung für weitere 30 min inkubiert, bis keine Rückstände mehr sichtbar sind. Anschließend werden die Proben für kurze Zeit zentrifugiert und in 2 ml Auffanggefäße pipettiert.

Die Reinigung der DNA wird durch einen Nukleinsäureroboter ausgeführt (BioRobot EZ1, Qiagen).

2.2.4 Bestimmung der DNA Konzentration mittels NanoDrop®

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten Tumor-DNA wird die NanoDrop® Technologie angewandt. Ein großer Vorteil dieser Methode, gegenüber den üblichen Spektrophotometern, ist die geringe Menge an DNA Lösung, die zur Extinktionsmessung ausreicht. Zudem sind keine Verdünnungen der Proben mehr notwendig, so dass diese Methode den Arbeitsprozess erheblich beschleunigt.

Der NanoDrop® ND-1000 misst die optische Dichte der DNA-Probe mittels Absorptionsmessungen bei Wellenlängen zwischen 220 bis 750 nm. Zur Quantifizierung der DNA wird eine Wellenlänge von 260 nm ausgewählt, da in diesem Bereich die maximale UV- Absorption der Nukleinsäuren liegt. Vor der eigentlichen Messung muss das Gerät mittels 1-2 µl H₂O bidest. kalibriert werden. Anschließend werden 1 µl der DNA Probe auf die Messoptik pipettiert und das Gerät geschlossen. Durch die entstehende Flüssigkeitssäule wird anschließend der Lichtstrahl mit einer festgelegten Wellenlänge von 260nm geleitet, um eine Aussage über die DNA-Konzentration zu ermöglichen. Die Konzentrationsangabe der gemessenen DNA wird dabei in ng/µl angegeben.

2.2.5 Verdünnung der zu amplifizierenden DNA

Um eine 1:5 Verdünnung der Proben zu gewinnen, wird von jeder Probe 2µl DNA Lösung abpipettiert und mit 8µl DPC-Wasser verdünnt.

2.2.6 Polymerasenkettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR) können kleinste Mengen DNA vervielfältigt werden. Das Prinzip beruht auf einem sich wiederholenden Zyklus, bestehend aus drei Schritten.

Die *Denaturierung* stellt den ersten Schritt dieser Reaktion dar. Hierbei wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) auf 92-95 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Es entsteht einzelsträngige Matrizen-DNA (ssDNA). Anschließend wird der Reaktionsansatz auf 50-55°C heruntergekühlt, wobei diese Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers ist.

Jetzt kann sich der Primer an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA anheften, dieser Vorgang wird auch als *Primerannealing* bezeichnet.

Für den dritten Schritt, die *Elongation*, wird der Reaktionsansatz auf 72 °C erwärmt. Diese Temperatur stellt das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase dar, welche die komplementären Stränge aus freien Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) synthetisiert. Dadurch kann der gewünschte DNA-Abschnitt verdoppelt werden und dient in nachfolgenden Zyklen selbst als Matrize. Durch eine erneute Temperaturerhöhung auf 92-95°C beginnt ein neuer Zyklus. Für gewöhnlich wird diese Reaktion 20-40-mal wiederholt, wodurch das Ausgangsmaterial theoretisch um den Faktor 2^{20} bis 2^{40} vervielfältigt wird. In der Praxis können aus verschiedenen Gründen diese Amplifikationsraten allerdings nicht erreicht werden. Nach Erreichen der 40 voreingestellten Zyklen wird der Prozess beendet und der Reaktionsansatz bei 4-8°C gekühlt. Tabelle 6 und Tabelle 7 geben Aufschluss über die verwendeten Mischungsverhältnisse und Reaktionsbedingungen für die PCR.

Tabelle 6: PCR Ansatz

Mix	Menge [μ l]
2x PCR Mastermix	12,5
Primer Sense	1
Primer Antisense	1
DNA	2
DEPC-H ₂ O	8,5

Tabelle 7: PCR Bedingungen für *KRAS*, *BRAF* & *PIK3CA*

	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Initiale Denaturierung	94	240
Denaturierung	94	30
Annealing	55	45
Elongation	72	45
Finale Elongation	72	300
Endphase	5	∞

Jede PCR wurde zur Kontrolle jeweils mit einer positiven Probe (LS-DNA; 20 ng/ μ l) sowie einer negativen Probe (Wasser) durchgeführt.

2.2.7 DNA-Gelelektrophorese

2.2.7.1 Prinzip der DNA-Gelelektrophorese

Anschließend werden die entstandenen DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da die DNA durch ihre Phosphatreste negativ geladen ist, wandern die Nukleinsäuren nach Anlegen einer Spannung zur Anode. Kleinere DNA-Fragmente können dabei schneller durch das Agarosegel wandern als größere DNA-Fragmente. Durch Zugabe eines mitlaufenden Größenmarkers lässt sich die Größe der DNA-Fragmente ermitteln (GeneRuler™, 50bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth). Anschließend können die DNA Banden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden und zur Dokumentation sowohl ausgedruckt, als auch abgespeichert werden.

2.2.7.2 Herstellung eines Agarosegels und Durchführung der Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wird 1,6 g Agarose mit 80 ml TBE-Puffer vermischt und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, bis keine Schlieren mehr

sichtbar sind. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 60°C wird 3 µl des Fluoreszenz-Farbstoffes Ethidiumbromid hinzugefügt, dieser interkaliert mit der DNA und ermöglicht so das spätere Erkennen der DNA Banden auf dem Transluminator. Sobald sich das Ethidiumbromid gelöst hat, wird die Gelflüssigkeit zur Aushärtung in einen Gelträger mit eingesetztem Kamm gegossen, welcher nach Entfernung die späteren Geltaschen formt.

Bevor das Gel mit der zu analysierenden DNA Probe beladen werden kann, werden 5 µl DNA Lösung mit 2 µl Ladepuffer vermischt. Dieser enthält den Farbstoff Bromphenolblau, wodurch die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel sichtbar gemacht wird.

Als Laufpuffer wird 1x TBE-Puffer verwendet. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer konstanten Spannung von 85-90 Volt für etwa 35 min.

2.2.8 Aufreinigung der amplifizierten DNA

Um Verunreinigungen wie Primer, Salze, Enzyme und nicht eingebaute dNTPs von der amplifizierten Tumor-DNA zu entfernen, muss in einem nächsten Schritt eine Aufreinigung vorgenommen werden. Dieser ist erforderlich, um ein reines PCR Produkt zu erhalten und um Störungen bei der späteren Sequenzierung vorzubeugen. Die Reinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

In einem ersten Schritt des Reinigungsprozesses wird das PCR Amplifikat mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer versetzt und gemischt. Anschließend wird die Lösung auf eine Aufreinigungssäule übertragen, welche in einem 2 ml Auffanggefäß platziert ist. Dann wird diese Lösung bei 17,900 x g für 60 sec zentrifugiert. Das entstandene Eluat wird verworfen und die Aufreinigungssäule wieder auf das Ausganggefäß gesetzt. Jetzt wird die Säule mit 0,75 ml PE Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, wodurch insbesondere Salze entfernt werden. Der Durchfluss wird wiederum verworfen und eine zusätzliche Zentrifugation wird durchgeführt, um sicherstellen zu können, dass sich kein PE Puffer mehr in der Aufreinigungssäule befindet. Danach wird die Aufreinigungssäule in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß platziert und 30 µl H₂O_{bidest.} auf die Mitte der Säule aufgetragen. Nach einer Wartezeit von einer Minute wird eine abschließende Zentrifugation durchgeführt. Die amplifizierte DNA befindet sich jetzt aufgereinigt in einem Eppendorfreaktionsgefäß.

Für die sich anschließende Sequenzierung ist es wichtig, die Konzentration der eluierten DNA zu kennen. Dazu ist eine erneute Gelelektrophorese aller Proben erforderlich, wie bereits unter 2.2.7.2 beschrieben.

2.2.9 DNA Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen der aufgereinigten PCR Produkte übernahm das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Hierzu wurde die Template-DNA mit den entsprechenden Primern an das BMFZ versendet. Die Sequenzierungen erfolgten gemäß der Sangermethode mit Hilfe eines Kapillarsequenziergerätes (3130 xL Genetic Analyzer, Life Technologies™). Die anschließende Analyse wurden durch die Software Sequencing Analysis 5.3.1 (Life Technologies™) durchgeführt. Abschließend wurden die Ergebnisse des BMFZ zum Download bereitgestellt.

Aufbauend auf der Sequenzanalyse konnten nachfolgend die Gene auf die einzelnen Mutationen überprüft werden. Ein Auszug dieser Ergebnisse ist in Kapitel 3.1 dargestellt.

2.2.10 Statistische Analyse

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen histopathologischen Parametern und gefundenen Mutationen wurde der Fisher's exact Test verwendet. Falls erforderlich kam zusätzlich der χ^2 –Test zum Einsatz. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der SPSS Software durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf $P < 0,05$ gesetzt.

2.2.11 Pyrosequenzierung

Zur Reevaluierung der in Kapitel 3 aufgeführten Ergebnisse wurde als zweite unabhängige Methode, neben der Standard-PCR, die Pyrosequenzierung verwendet.

Die Arbeiten in Zusammenhang mit der Pyrosequenzierung wurden von der AG Schäfer (Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf) durchgeführt. Auf das Prinzip der Pyrosequenzierung soll daher im Folgenden nur grob eingegangen werden.

Die Methode beruht auf der Pyrophosphatproduktion während der DNA Synthese. Zur Durchführung werden vier Enzyme (DNA Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase) und 2 Substrate (Adenosin 5'Phosphosulfat (APS) und Luziferin), sowie

einzelsträngige Template DNA benötigt. Zu der mit Primern gebundenen Template DNA werden nacheinander in einer festgelegten Reihenfolge die dNTPs zugegeben. Die DNA Polymerase baut diese anschließend in den DNA Strang ein, wenn sie komplementär zur Base der Template DNA sind. Hierbei wird Pyrophosphat frei, welches durch die ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgebaut wird. ATP wird anschließend durch die Luziferase in Oxyluziferin umgesetzt. Bei diesem Prozess wird Licht freigesetzt, dessen Intensität proportional zur ATP Menge ist. Dieses Lichtsignal wird detektiert und als Peak in einem Pyrogramm dargestellt. Die Apyrase sorgt vor dem Zufügen eines neuen Nukleotids dafür, dass nicht eingebaute dNTPs und ATP abgebaut werden.

Wird ein nicht passendes Nukleotid zugegeben, bleibt demzufolge die Lichtreaktion aus.

Die verwendeten Primer zur Durchführung der Pyrosequenzierung sind in Tabelle 8 aufgeführt. Primer, die zur Analyse von *KRAS* verwendet wurden, werden in der Arbeit von Ogino et al. (2005) genauer beschrieben. Die *BRAF* und *PIK3CA* Primer wurden mit Hilfe der Software „Pyrosequencing Assay Design Software“ (Biotage AB) designed.

Tabelle 8: Verwendete Primer für die Pyrosequenzierung

Primer	Sequenzen		
<i>BRAF</i> Exon 15	for: TGCTTGCTCTGATAGGA AAATGA	rev: Bio- CAAAATGGATCCAGACA GTTCT	Seq: GGTGATTTTGGTCTAGC
<i>PIK3CA</i> Exon 9	for: Bio- AAGCAATTTCTACACGA GATCCT	rev: TAGCACTTACCTGTGACTCC ATAG	Seq: AGATCCAATCCATTTTTG TTGTC
<i>PIK3CA</i> Exon 20	for: Bio- TGA CTCCATAGAAAATC TTT	rev: GAGCAAGAGGCTTTGGAGT ATTT	Seq: GTTGTCCAGCCACCA

Zur Festlegung der Basenzusammensetzung und des Mutationsstatus wurde das PyroMarkTMQ24, zusammen mit einer dazugehörigen Software, verwendet. Der Cutoff zur Unterscheidung zwischen einer Mutation und einem Wildtyp wurde bei 15 % mutierter Allele festgesetzt.

Die Pyrosequenzierung wurde durchgeführt als weitere, unabhängige Methode zur Bestimmung des Mutationsstatus. Alle hierbei erzielten Ergebnisse stimmten mit denen der im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Standard PCR Methode überein.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisdarstellung einer Sequenzierungsanalyse am Beispiel einer *KRAS* Mutation

Als Ergebnis der DNA Sequenzanalyse werden Chromatogramme erstellt, anhand derer sich eine Aussage darüber treffen lässt, ob innerhalb einer bestimmten Gewebelokalisation eine Mutation stattgefunden hat, oder ein Wildtyp vorliegt.

Abb. 4 und Abb. 5 stellen die Chromatogramme einer Sequenzanalyse am Beispiel des *KRAS* Gens dar (Fallnummer 21).

Die Sequenzdaten zeigen im Bereich des Tumorzentrums und der Invasionsfront innerhalb des Primärtumors keine Mutation. Es liegt in beiden Fällen demnach ein *KRAS* Wildtyp vor (vgl. Abb. 4). In der Lymphknotenmetastase sowie in der Fernmetastase ist eine Mutation innerhalb des Codons 12 sichtbar (vgl. Pfeile Abb. 5). In beiden Fällen wurde die Base Guanin gegen Adenin ersetzt (GGT→GAT). Hierdurch findet ein Austausch der Aminosäure Glycin nach Asparaginsäure statt.

Die Sequenzanalyse und die daraus resultierende Auswertung der Ergebnisse wurden in gleicher Weise auch für das *BRAF*- und *PIK3CA*-Gen durchgeführt.

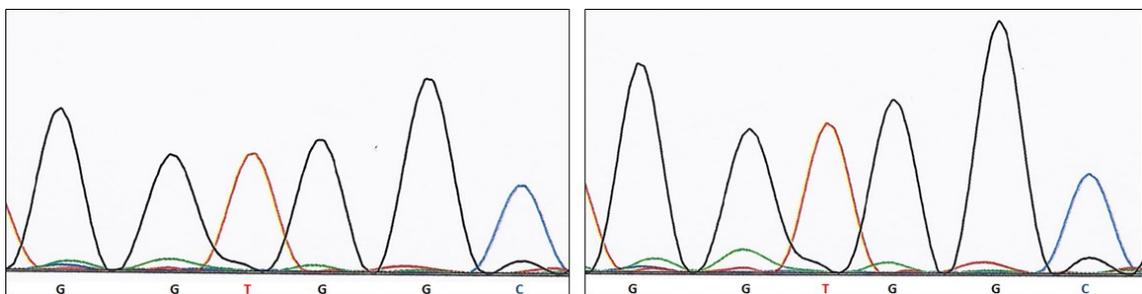


Abb. 4: *KRAS* Wildtyp im Tumorzentrum (links) und *KRAS* Wildtyp in der Invasionsfront (rechts)

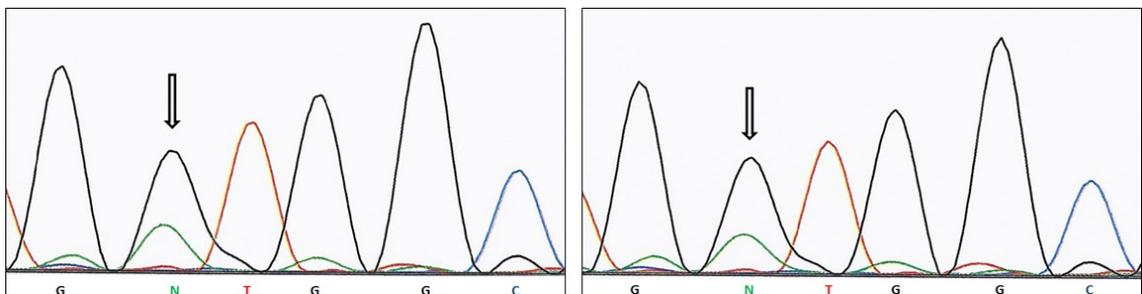


Abb. 5: *KRAS* Mutation in der Lymphknotenmetastase (links) und *KRAS* Mutation in der Fernmetastase (rechts)

3.2 Analyse der *KRAS* Mutationen

3.2.1 *KRAS* Mutationen im Primärtumor

Bei der Untersuchung der 100 Primärtumoren, wurde sowohl das Tumorzentrum (Z) als auch die Tumorinvasionsfront (F) analysiert. Insgesamt konnte dadurch bei 41 Patienten (41%) eine *KRAS* Mutation in Codon 12 bzw. 13 gefunden werden, während 59 Patienten (59%) keine *KRAS* Mutation aufwiesen.

Der Großteil dieser Mutationen (33%) konnte dabei übereinstimmend im Tumorzentrum und auch an der Tumorinvasionsfront nachgewiesen werden.

In 8% aller Fälle (d.h. 20% der mutierten Karzinome) wurde eine intratumorale Heterogenität detektiert. 6% der *KRAS* Mutationen lagen nur im Tumorzentrum vor und konnten in der korrespondierenden Tumorinvasionsfront nicht gefunden werden, dieses entspricht 15% der mutierten Karzinome). Den umgekehrten Fall, also eine Mutation des *KRAS* Gens in der Tumorinvasionsfront und einen Wildtyp (WT) im Tumorzentrum, zeigten dagegen nur 2% der Fälle. Eine solche Konstellation konnte nur in Karzinomen des UICC Stadium II oder III, nicht dagegen in Tumoren des UICC-Stadium IV gefunden werden.

Abb. 6 stellt das Ergebnis der *KRAS* Mutationsanalyse in Primärtumoren dar.

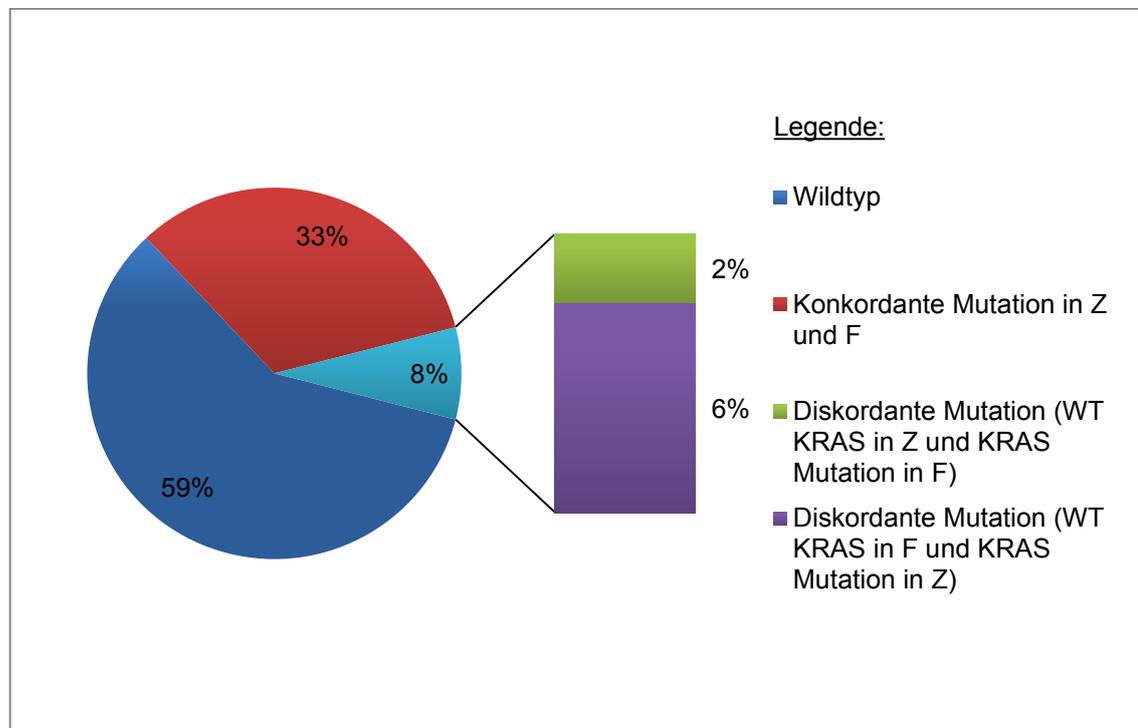


Abb. 6: *KRAS* Mutationsanalyse in Primärtumoren

3.2.2 *KRAS* Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase

In 55 Fällen war es möglich, die korrespondierende Lymphknotenmetastase (LK) zusätzlich zum Primärtumor zu untersuchen und hinsichtlich des *KRAS* Mutationsstatus zu vergleichen.

24 Patienten wiesen im Primärtumor und in der Lymphknotenmetastase einen *KRAS* Wildtyp auf (44% aller Fälle).

Bei 31 Patienten konnte hingegen in mindestens einer der beiden Tumorlokalisationen eine *KRAS* Mutation nachgewiesen werden, das entspricht 56% der insgesamt 55 Fälle. Innerhalb dieser Gruppe konnte bei 14 der 31 Patienten (45%) ein konkordantes Ergebnis hinsichtlich der *KRAS* Mutation in der Lymphknotenmetastase und dem entsprechenden Primärtumor gefunden werden. In Bezug auf die Gesamtzahl aller untersuchten Fälle mit Lymphknotenmetastase entspricht dies 25%.

In 17 der 55 analysierten Fälle (31%) wurde ein diskordantes Ergebnis des *KRAS* Mutationsstatus gefunden. So wurde bei 15 Patienten (27%) eine *KRAS* Mutation ausschließlich im Primärtumor nachgewiesen. Bezogen auf die Gesamtzahl aller *KRAS* mutierten Fälle, macht dies 48% aus. Bei zwei Patienten (4%) beschränkten sich die Mutationen ausschließlich auf die korrespondierende Lymphknotenmetastase des Primärtumors. Dieses Ergebnis entspricht 6% aller *KRAS* mutierten Fälle.

Abb. 7 stellt das Ergebnis der *KRAS* Mutationsanalyse in Primärtumoren und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen dar.

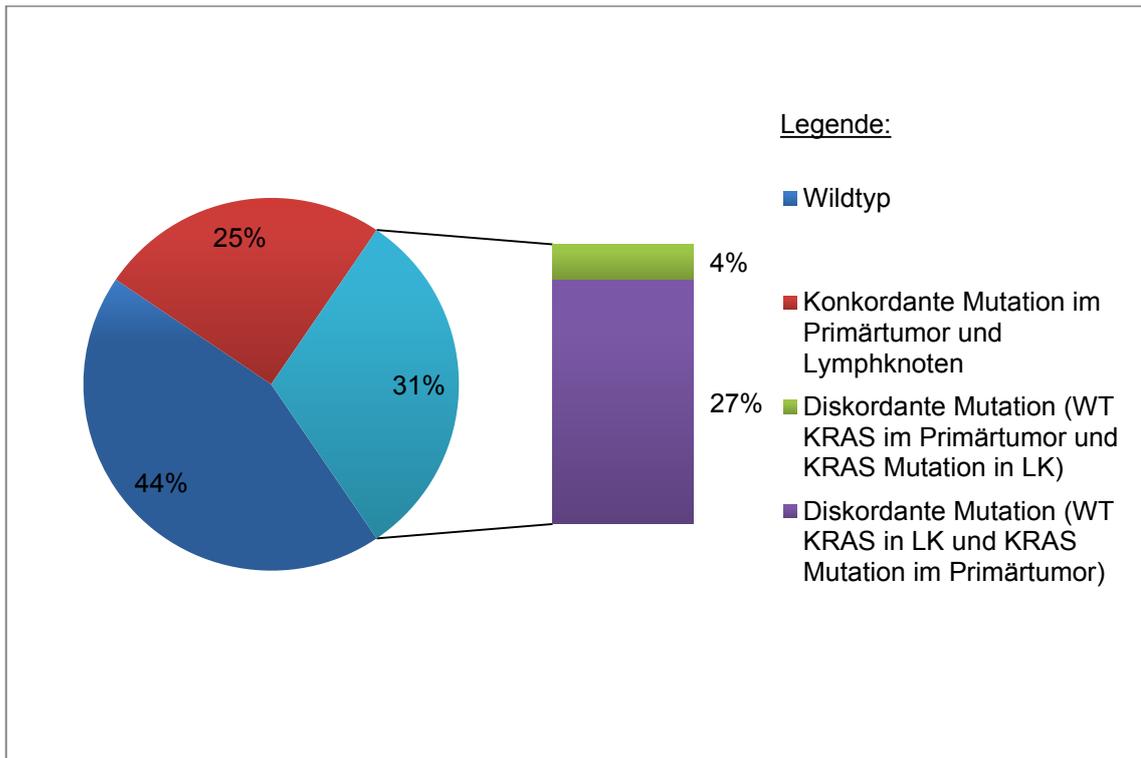


Abb. 7: KRAS Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen

Insgesamt betrachtet konnten demnach, bezogen auf alle *KRAS* mutierten Fälle, mehr diskordante Ergebnisse (55%) zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase detektiert werden, als konkordante Fälle (45%).

3.2.2.1 Zusätzliche *KRAS* Mutationsanalyse im Falle eines diskordanten Ergebnisses zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase

Um das Ergebnis der hohen Anzahl (31%) an beobachteter Heterogenität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase zu überprüfen, wurden erneute Untersuchungen an den Geweben durchgeführt, die zunächst *KRAS* Wildtyp enthielten.

In zwei der insgesamt 17 diskordanten Fälle (4%) konnte eine heterogene Verteilung zwischen Primärtumor (*Z1/F1*) und Lymphknotenmetastase gefunden werden. Die *KRAS* Mutation beschränkte sich dabei ausschließlich auf die Lymphknotenmetastase (*LK1*).

Für diese zwei Fälle wurden jeweils zwei neue Gewebeproben aus dem Tumorzentrum (*Z2/Z3*) und der Tumordinvasionsfront (*F2/F3*) untersucht. Im ersten Fall konnte so in

allen vier entnommenen Gewebeproben die gleiche Mutation nachgewiesen werden, während der zweite Fall nur in einer Probe (Z3) eine identische Mutation aufwies.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Analyse für die Fälle 1 und 2.

Tabelle 9: Untersuchungsergebnisse für Fall 1 und 2

Fall	Z1	Z2	Z3	F1	F2	F3	LK1
1	WT	c.35G>A	c.35G>A	WT	c.35G>A	c.35G>A	c.35G>A
2	WT	WT	c.35G>A	WT	WT	WT	c.35G>A

Im Folgenden wurden die Gewebeproben der 15 Patienten untersucht, in denen eine KRAS Mutation nur im Primärtumor (Z1/F1), nicht aber in der Lymphknotenmetastase (LK1) zu finden war. In 5 Fällen konnte kein zusätzliches Tumormaterial mehr aus den Lymphknotenmetastasen gewonnen werden, weshalb sich die Auswertung auf 10 Fälle beschränkte. In diesen 10 Fällen war es möglich, mindestens eine weitere Lymphknotenmetastase (LK2/LK3) zu analysieren.

In 6 dieser 10 Fälle konnte in mindestens einer weiteren Lymphknotenmetaste (LK2/LK3) eine KRAS Mutation gesichert werden. In vier Fällen konnte keine KRAS Mutation durch die zusätzliche Untersuchung (LK2/LK3) detektiert werden.

Tabelle 9 veranschaulicht die Ergebnisse der zusätzlichen Analysen an Lymphknotenmetastasen.

Tabelle 10: Untersuchungsergebnisse der 10 Fälle

Fälle	Z1	F1	LK1	LK2	LK3
1	c.38G>A	c.38G>A	WT	c.38G>A	
2	c.38G>A	WT	WT	c.38G>A	
3	c.35G>A	c.35G>A	WT	c.35G>A	c.35G>A
4	c.35G>A	c.35G>A	WT	c.35G>A	c.35G>A
5	c.35G>A	c.35G>A	WT	c.35G>A	
6	c.35G>A	c.35G>A	WT	c.35G>A	c.35G>A
7	c.34G>T	c.34G>T	WT	WT	WT
8	c.35G>T	c.35G>T	WT	WT	
9	c.38G>A	WT	WT	WT	WT
10	c.35G>T	c.35G>T	WT	WT	

3.2.3 *KRAS* Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase

In 20 der 100 untersuchten Fälle lag bereits eine Metastasierung weiterer Organe vor. Die vorhandenen Fernmetastasen wurden ebenfalls auf eine *KRAS* Mutation untersucht und anschließend mit dem *KRAS* Mutationsergebnis des Primärtumors verglichen.

In der Hälfte der analysierten Fälle konnte eine *KRAS* Mutation in der Lymphknotenmetastase detektiert werden. Eine simultane *KRAS* Mutation im Primärtumor und Fernmetastase konnte in 8 der 20 Fälle (40%) nachgewiesen werden. In 2 Fällen (10%) lag eine Heterogenität zwischen Primärtumor und Fernmetastase vor, wobei in einem Fall die *KRAS* Mutation nur im Primärtumor zu finden war. Eine zusätzliche Untersuchung der Fernmetastase konnte wegen Materialmangels nicht durchgeführt werden. In dem anderen Fall zeigte sich eine *KRAS* Mutation zunächst nur in der Fernmetastase. Durch eine zusätzliche Untersuchung des Primärtumors konnte auch hier eine *KRAS* Mutation nachgewiesen werden.

Abb. 8 stellt das Ergebnis der *KRAS* Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen dar.

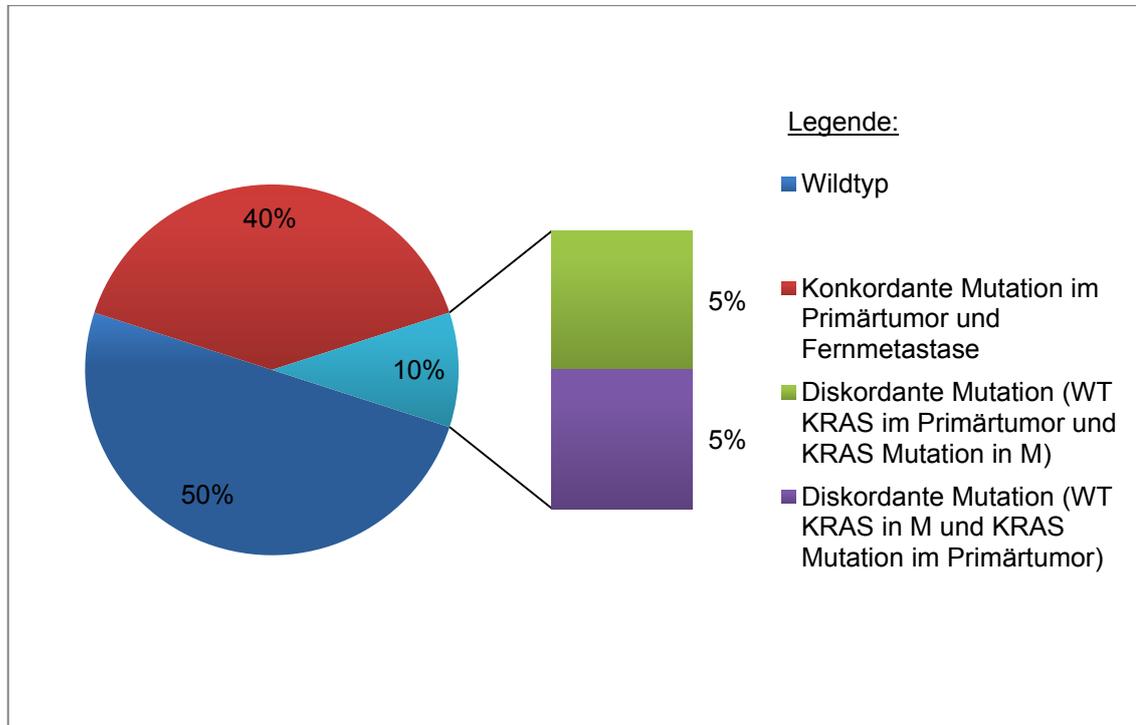


Abb. 8: *KRAS* Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen

3.2.4 Lokalisation der *KRAS* Mutationen

Bezüglich der Mutationslokalisierung wurden 68% aller *KRAS* Mutationen im Codon 12 gefunden, die restlichen 32% lagen im Codon 13. Wurde eine *KRAS* Mutation bei einem Patienten detektiert, lag immer eine identische Mutation innerhalb des Primärtumors, der Lymphknotenmetastase und der Fernmetastase vor.

Mutationen im Codon 12 betrafen überwiegend die zweite Base. In 29% wurde Guanin gegen Thymin ausgetauscht (GGT→GtT, Gly→Val, G12V). Bei 27% der Patienten konnte ein Austausch von Guanin gegen Adenin beobachtet werden (GGT→GaT, Gly→Asp, G12D). In nur 12% wurde die erste Base ausgetauscht, in 7% wurde Guanin gegen Thymin ersetzt (GGT→tGT, Gly→Cys, G12C), in 5% Guanin gegen Adenin (GGT→aGT, Gly→Ser, G12S).

Auch in Codon 13 wurde hauptsächlich die zweite Base ausgetauscht. So konnte in 29% ein Austausch der Base Guanin gegen Adenin nachgewiesen werden (GGC→GaC, Gly→Asp, G13D). In lediglich 3% konnte ein Austausch der ersten Base dokumentiert werden, wobei Guanin gegen Thymin ersetzt wurde (GGC→tGC, Gly→Cys, G13C).

3.3 Analyse der *BRAF* Mutationen

3.3.1 *BRAF* Mutationen im Primärtumor

In 7 der insgesamt 100 untersuchten Primärtumoren konnte eine *BRAF* Mutation gefunden werden. Davon zeigten 6 Fälle (6%) eine homogene Verteilung des *BRAF* Mutationsstatus. In nur einem Fall konnte ein diskordantes Ergebnis beobachtet werden, wobei sich die Mutation nur an der Tumorinvasionsfront (F), nicht aber im Tumorzentrum (Z) nachweisen ließ.

Signifikante Unterschiede zwischen den UICC Stadien konnten nicht beobachtet werden.

Abb. 9 stellt das Ergebnis zwischen Tumorzentrum und Tumorinvasionsfront der *BRAF* Mutationsanalyse dar.

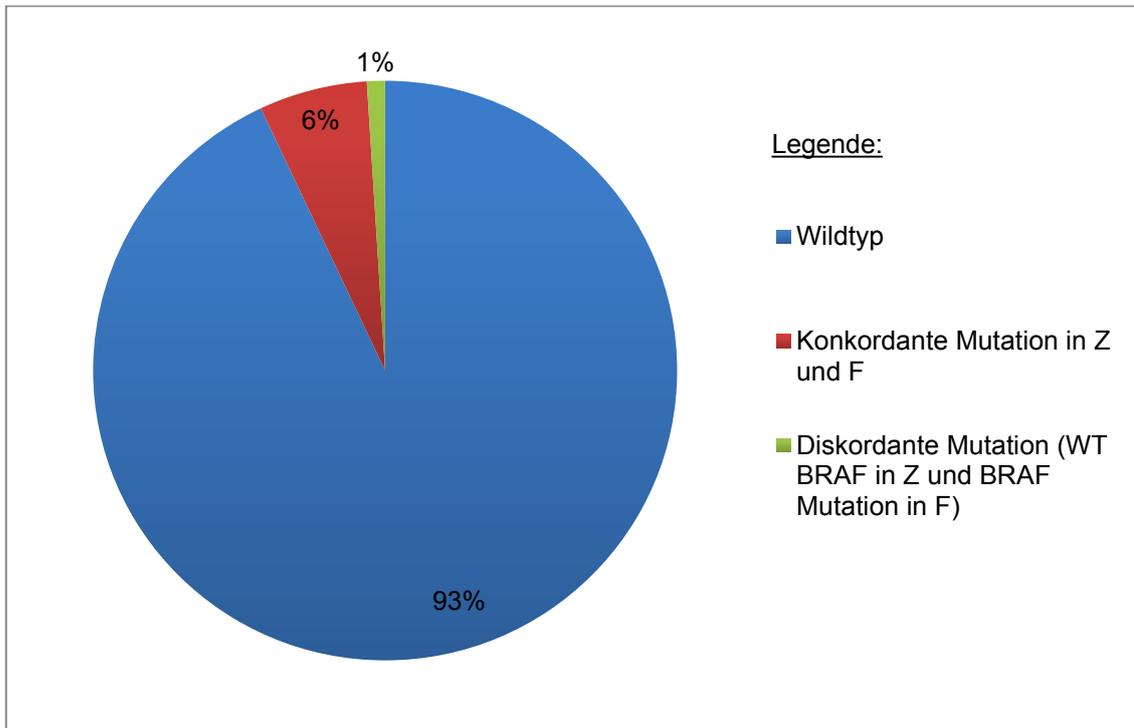


Abb. 9: *BRAF* Mutationsanalyse in Primärtumoren

3.3.2 *BRAF* Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase

Zusätzlich zum Primärtumor wurden 55 korrespondierende Lymphknotenmetastasen auf eine *BRAF* Mutation hin analysiert und mit dem Ergebnis der *BRAF* Mutationsanalyse im Primärtumor verglichen. In 5 der 55 Fälle (9%) konnte eine *BRAF* Mutation gefunden werden. Dabei wurde in 3 der 55 Fälle (5%) eine konkordante *BRAF* Mutation im Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase detektiert. In 2 der 55 Fälle (4%) wurde eine Heterogenität aufgedeckt, wobei sich die *BRAF* Mutation nur im Primärtumor fand.

Abb. 10 stellt das Ergebnis der *BRAF* Mutationsanalyse zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen dar.

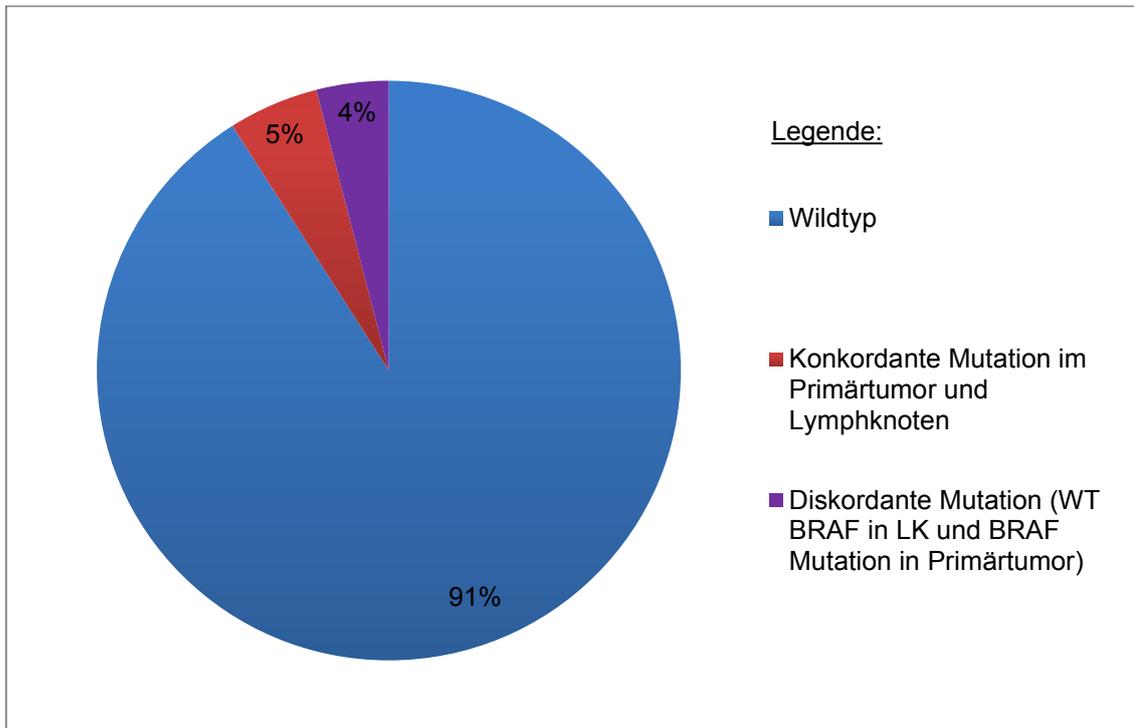


Abb. 10: BRAF Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen

3.3.2.1 Zusätzliche *BRAF* Mutationsanalyse im Falle eines diskordanten Ergebnisses zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase

In zwei Fällen (4%) wurde ein diskordantes Ergebnis zwischen Primärtumor (Z1/F1) und Lymphknotenmetastase (LK1) aufgezeigt. Eine *BRAF* Mutation wurde in diesen beiden Fällen nur im Primärtumor gefunden.

In einem der beiden Fälle war es möglich, zwei weitere Gewebeproben aus dem Lymphknoten (LK2/LK3) zu gewinnen und erneut zu untersuchen. Hierbei konnte in beiden Proben die gleiche Mutation, wie sie zuvor schon im Primärtumor gefunden wurde, nachgewiesen werden.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Analyse für diesen Fall an.

Tabelle 11: Untersuchungsergebnis Fall 1

Fälle	Z1	F1	LK1	LK2	LK3
1	c.1799T>A	c.1799T>A	WT	c.1799T>A	c.1799T>A

3.3.3 *BRAF* Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase

Eine *BRAF* Mutationsanalyse der Fernmetastase konnte bei nur 20 der 100 Patienten durchgeführt werden, da hier bereits eine Metastasierung weiterer Organe diagnostiziert wurde. In nur einem Fall (5%) wurde eine *BRAF* Mutation festgestellt, welche sich sowohl im Primärtumor, als auch in der korrespondierenden Fernmetastase nachweisen lies. Eine heterogene Verteilung konnte nicht beobachtet werden.

Abb. 11 stellt das Ergebnis der *BRAF* Mutationsanalyse zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen dar.

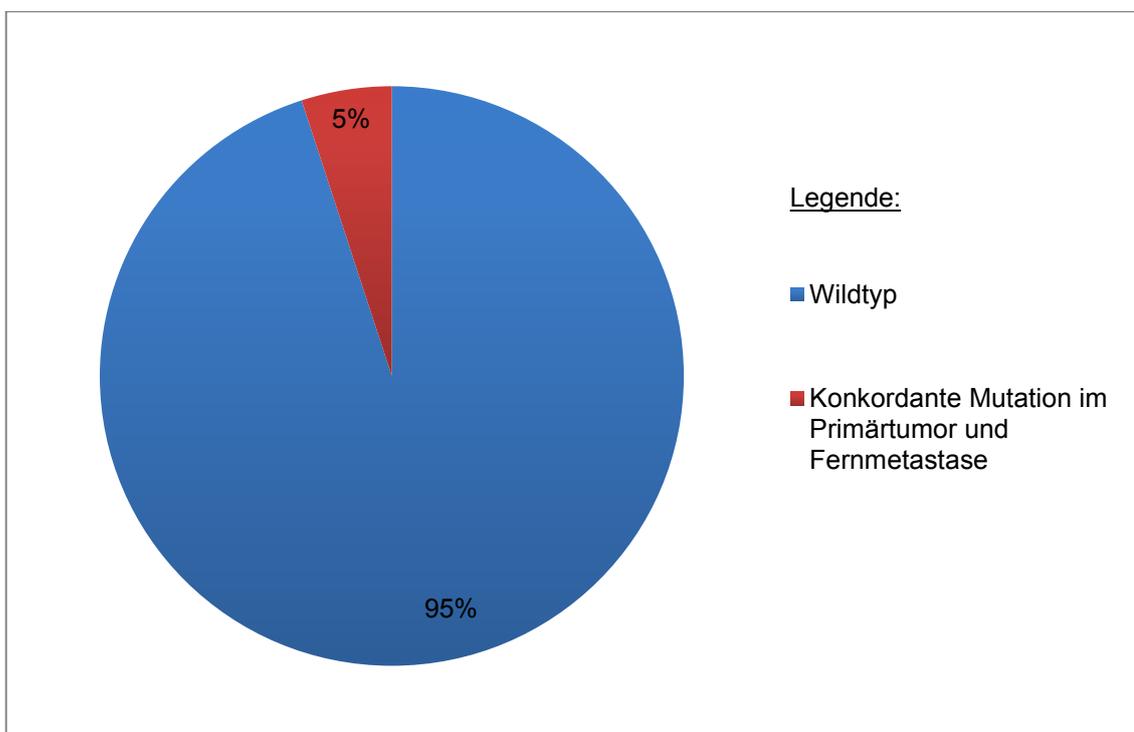


Abb. 11: *BRAF* Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen

3.3.4 Lokalisation der *BRAF* Mutationen

BRAF Mutationen wurden nur im Codon 600 im Exon 15 gefunden, wobei die Base Thymin gegen Adenin ersetzt wurde (GTG→GaG, Val→Glu, V600E). Wurde eine *BRAF* Mutation innerhalb eines Patienten gefunden, lag immer eine identische *BRAF* Mutation sowohl im Primärtumor als auch in der Lymphknotenmetastase und der Fernmetastase vor.

3.4 Analyse der *PIK3CA* Mutationen

3.4.1 *PIK3CA* Mutationen im Primärtumor

Mutationen im *PIK3CA* Gen konnten in 21 der 100 untersuchten Primärtumore (21%) gefunden werden. In 16 Fällen (16%) lag eine simultane *PIK3CA* Mutation im Tumorzentrum und Tumorinvasionsfront vor. Eine Heterogenität konnte in 5 Fällen (5%) beobachtet werden, bezogen auf alle *PIK3CA* Mutationen macht dies 24% aus. Dabei konnte in 4 der 5 Fälle (19% aller *PIK3CA* mutierten Fälle) eine Mutation nur im Tumorzentrum nachgewiesen werden. In einem Fall (5% aller *PIK3CA* mutierten Fälle) lag der umgekehrte Fall vor, eine Mutation konnte lediglich an der Tumorinvasionsfront gefunden werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den UICC-Stadien konnten hier nicht aufgezeigt werden.

Abb. 12 stellt das Ergebnis der *PIK3CA* Mutationsanalyse im Tumorzentrum und in der Tumorinvasionsfront dar.

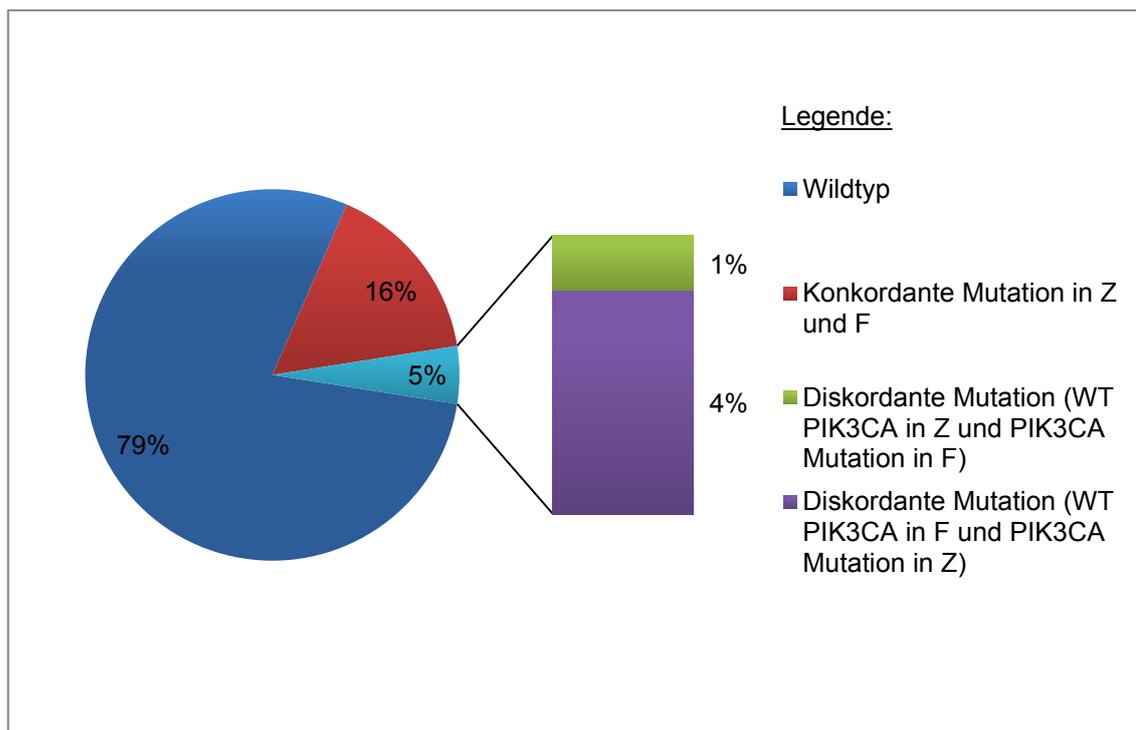


Abb. 12: *PIK3CA* Mutationsanalyse in Primärtumoren

3.4.2 *PIK3CA* Mutationen im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase

Bei den 55 untersuchten Patienten mit Lymphknotenmetastasen konnte in 14 Fällen (26%) eine *PIK3CA* Mutation nachgewiesen werden. Eine diskordante Verteilung ließ

sich in 7 Fällen (13%) finden. Davon konnte in 6 Fällen (11%) eine *PIK3CA* Mutation nur im Primärtumor, in einem Fall (2%) nur in der Lymphknotenmetastase detektiert werden.

Abb. 13 verdeutlicht die *PIK3CA* Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.

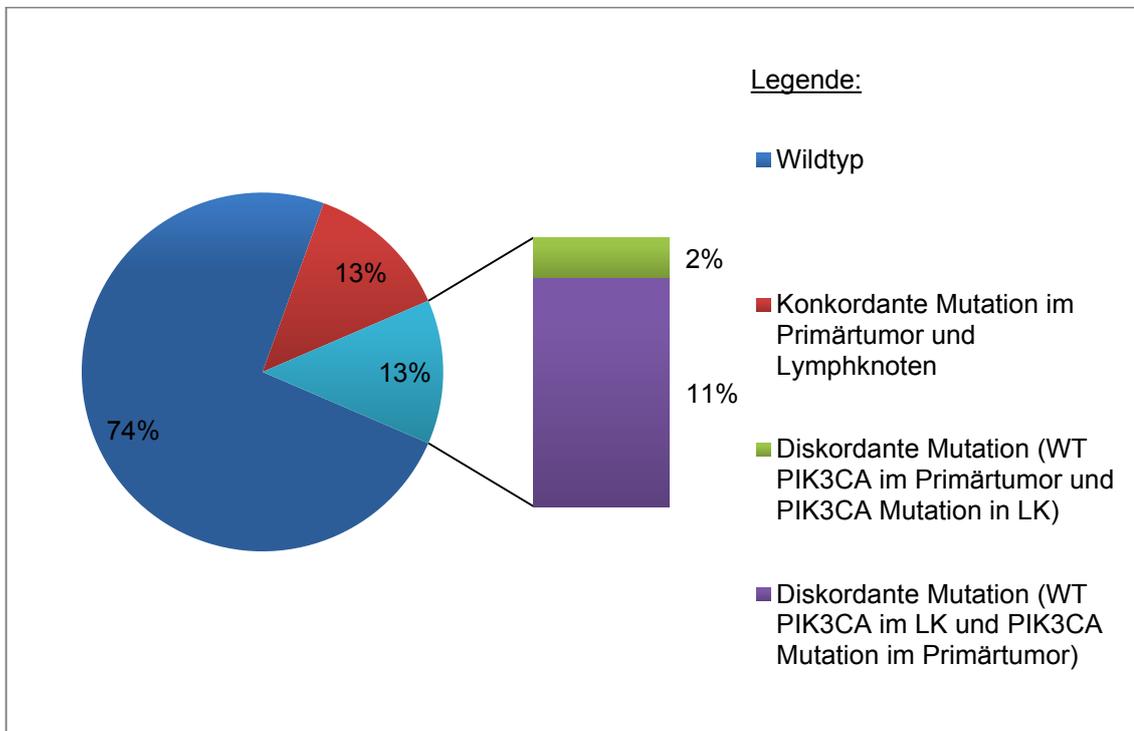


Abb. 13: *PIK3CA* Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen

3.4.2.1 Zusätzliche *PIK3CA* Mutationsanalyse im Falle eines diskordanten Ergebnisses zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase

In den sieben Fällen (13%), in denen eine diskordante Verteilung zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase vorlag, wurden erneut Gewebeprobe entnommen und analysiert.

In dem einen Fall (2%), in dem eine *PIK3CA* Mutation nur in der Lymphknotenmetastase (LK1) nachgewiesen werden konnte, wurden jeweils zwei zusätzliche Proben aus dem Tumorzentrum (Z2/Z3) sowie der Tumorinvasionsfront (F2/F3) untersucht. Aus den insgesamt vier gewonnenen Proben konnte in einer, aus dem Tumorzentrum (Z3) stammende Probe, nachträglich eine *PIK3CA* Mutation gefunden werden.

Tabelle 12: Untersuchungsergebnis Fall 1

Fall	Z1	Z2	Z3	F1	F2	F3	LK1
1	WT	WT	c.3140A>T	WT	WT	WT	c.3140A>T

Auch die sechs Fälle (11%) in denen eine *PIK3CA* Mutation nur in den Primärtumoren (Z1/F1) zu finden war, wurden durch weitergehende Untersuchungen genauer analysiert. Soweit es möglich war, wurden zwei zusätzliche Lymphknotenproben (LK2/LK3) gewonnen. Dabei zeigte sich in 3 Fällen in mindestens einer der analysierten Proben eine *PIK3CA* Mutation (LK2/LK3). In den restlichen drei Fällen konnte auch durch die zusätzliche Untersuchung keine *PIK3CA* Mutation in den Lymphknoten (LK2/LK3) gefunden werden.

Tabelle 13: Untersuchungsergebnis Fall 1 - 6

Fall	Z1	F1	LK1	LK2	LK3
1	c.1633G>A	WT	WT	c.1633G>A	WT
2	c.1633G>A	WT	WT	c.1633G>A	c.1633G>A
3	c.1636C>A	c.1636C>A	WT	c.1636C>A	WT
4	c.1633G>A	WT	WT	WT	WT
5	c.3140A>G	c.3140A>G	WT	WT	
6	c.1636C>A	c.1636C>A	WT	WT	WT

3.4.3 *PIK3CA* Mutation im Primärtumor im Vergleich zur korrespondierenden Fernmetastase

Bei 20 der 100 untersuchten Patienten war eine zusätzliche Untersuchung der Fernmetastasen möglich, da hier bereits eine Fernmetastasierung vorlag. Vier dieser 20 Fälle (20%) zeigten dabei eine *PIK3CA* Mutation. Die weitere Analyse zeigte, dass in 3 Fällen (15%) eine konkordante Mutation im Primärtumor und Fernmetastase vorlag. Lediglich in einem Fall (5%) wurde ein diskordantes Ergebnis gefunden, wonach sich die Mutation nur im Primärtumor nachweisen ließ.

Abb. 14 verdeutlicht den Zusammenhang der *PIK3CA* Mutationsanalyse zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen.

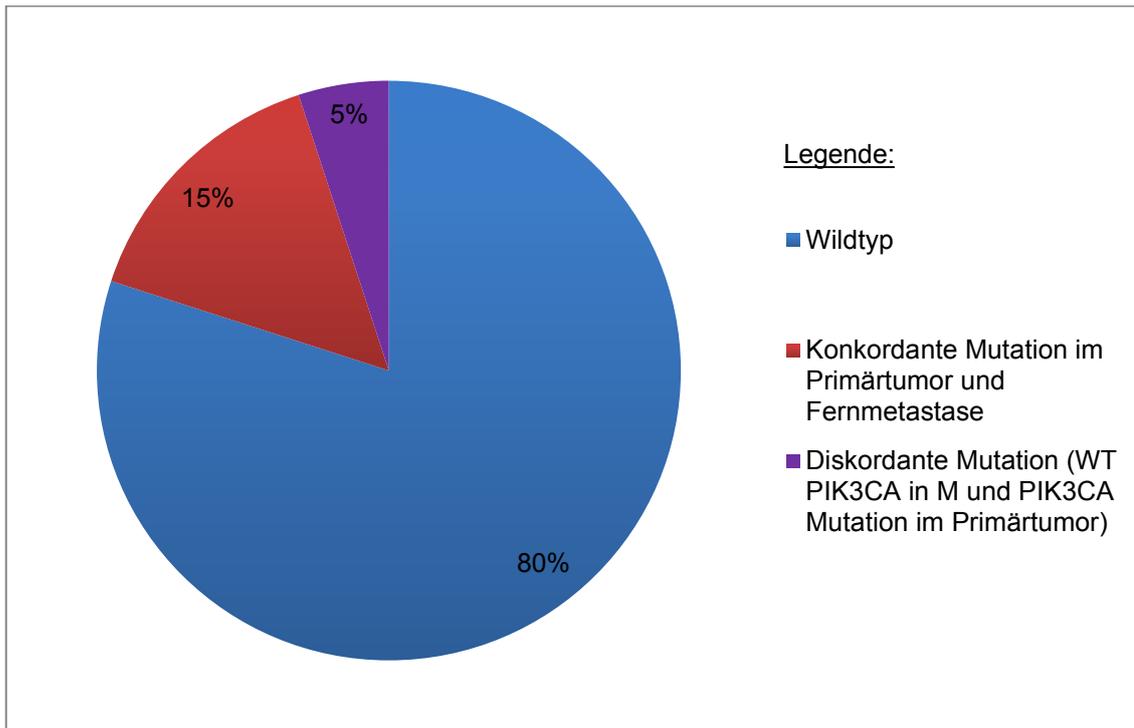


Abb. 14: PIK3CA Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen

3.4.4 Lokalisation der *PIK3CA* Mutationen

Konnte eine *PIK3CA* Mutation gefunden werden, so lag innerhalb eines Patienten immer eine identische Mutation sowohl im Primärtumor wie auch der Lymphknotenmetastase bzw. Fernmetastase vor. Die überwiegende Mehrheit der *PIK3CA* Mutationen wurde im Exon 9 gefunden, nur 10% konnten im Exon 20 lokalisiert werden.

Am häufigsten konnte mit 70% eine *PIK3CA* Mutationen in Codon 545 im Exon 9 gefunden werden. Vor allem wurde hier ein Austausch der ersten Base beobachtet. In 55% der Fälle wurde Guanin gegen Adenin ausgetauscht (GAG→aAG, Glu→Lys, E545K), in 5% Guanin gegen Cytosin (GAG→cAG, Glu→Gln, E545Q). In nur 10% lag ein Austausch der zweiten Base vor, hier wurde Adenin gegen Guanin ersetzt (GAG→GgG, Glu→Gly, E545G). In jeweils 10% lag die Mutation auf Codon 542 (GAA→aAA, Glu→Lys, E542K) bzw. Codon 546 (CAG→aAG, Gln→Lys, Q546K).

Im Exon 20 wurden 10% der *PIK3CA* Mutation gefunden, in 5% lag die Punktmutation im Codon 1043 (ATG→Ata, Met→Ile, M1043I) in 5% im Codon 1047 (CAT→CgT, His→Arg, H1047R).

3.5 Gleichzeitiges Auftreten verschiedener Genmutationen innerhalb eines Patienten

Alle Primärtumore wurden hinsichtlich eines simultanen Auftretens einer *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* Mutation untersucht. Die gleichzeitige Mutation von *KRAS* und *BRAF* innerhalb eines Tumors konnte nicht gefunden werden. Allerdings ließ sich in 9% eine simultane Mutation von *KRAS* und *PIK3CA* nachweisen. Das gleichzeitige Auftreten einer *BRAF* und *PIK3CA* Mutation, innerhalb eines Tumors, konnte bei 3% aufgedeckt werden.

Insgesamt betrachtet wurde in der Mehrzahl der untersuchten Primärtumore (57%) in mindestens einem der untersuchten Gene eine Mutation detektiert. Bei 43% der analysierten Tumore konnte weder eine *KRAS*, *BRAF* noch eine *PIK3CA* Mutation gefunden werden.

Bezogen auf das UICC Stadium wurde signifikant häufiger eine Mutation im Primärtumor in mindestens einem Gen nachgewiesen (66,7%), wenn ein UICC III/IV Stadium klassifiziert wurde ($P=0,017$, χ^2 -Test). In Tumoren mit einem UICC-Stadium II, konnte lediglich in 42,5% eine Mutation in mindestens einem der untersuchten Gene detektiert werden.

3.6 Korrelation histopathologischer Parameter

Der Mutationsstatus der Primärtumoren wurde mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern, wie pT, pN, pM und G, korreliert. *KRAS* Mutationen konnten häufiger bei lymphknotenpositiven Patienten gefunden werden (pN1 bzw. pN2), verglichen mit Patienten, bei denen der Lymphknotenstatus negativ (pN0) ausfiel. Bei lymphknotenpositiven Patienten betrug die Mutationshäufigkeit 50 %, während lymphknotennegative Patienten in nur 24,4 % eine Mutation aufwiesen. ($P = 0,014$).

BRAF Mutationen konnten nur in schlecht differenzierten (G3) kolorektalen Karzinomen beobachtet werden, nicht aber in gut oder mäßig differenzierten (G1 bzw. G2) Tumoren (38,9% versus 0%, $P < 0,001$).

Weitere Korrelationen des *KRAS*, *BRAF* bzw. *PIK3CA* Mutationsstatus mit histopathologischen Parametern konnte nicht aufgedeckt werden.

4 Diskussion

4.1 Analyse der *KRAS* Mutationsergebnisse

Die Mutation des *KRAS* Onkogens stellt ein frühes Ereignis im Rahmen der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms, beschrieben durch die Adenom-Karzinom-Sequenz, dar (Vogelstein et al., 1988; Stoecklein und Klein, 2010). In dem vorliegenden Kollektiv, bestehend aus 100 Primärtumoren, konnte eine *KRAS* Mutation in 41 Fällen (41%) nachgewiesen werden. Diese Häufigkeit stimmt mit Angaben in der Literatur überein, welche hier zwischen 32% und 50% variiert. (Bos, 1989; Forrester et al., 1987; Samowitz et al., 2000; Finkelstein et al., 1993; Olschwang et al., 1997; De Roock et al., 2010).

In den letzten Jahren konnte die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms durch Anwendung monoklonaler Antikörper, wie *Cetuximab* oder *Panitumumab*, welche gegen den EGF-Rezeptor gerichtet sind, erweitert werden. Neue Studien konnten zeigen, dass sich die Mutation des *KRAS* Gens negativ auf den Erfolg einer Antikörpertherapie auswirkt (Lièvre et al., 2006; Amado et al., 2008). So zeigen Patienten mit einem mutiertem *KRAS* Gen eine geringere Ansprechrate auf die EGFR-Therapie, ein geringeres progressionsfreies Überleben sowie ein kürzeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit einem *KRAS* Wildtyp (Karapetis et al., 2008; Tol et al., 2009; van Cutsem et al., 2009). Allerdings profitieren längst nicht alle Patienten, die zuvor als *KRAS* Wildtyp getestet wurden, von einer solchen Therapie (Knijn et al., 2011). In der Literatur schwankt die Ansprechrate dieser Patienten zwischen 10-50% (De Roock et al., 2008; Sartore-Bianchi et al., 2009; Ciardiello und Tortora, 2008; Karapetis et al., 2008; Freeman et al., 2008).

Eine mögliche Ursache dieses Therapieversagens könnte die Heterogenität innerhalb des untersuchten Tumorgewebes sein, die dazu führen kann, dass eine vorhandene *KRAS* Mutation nicht detektiert wird. Für gewöhnlich wird in der diagnostischen Routineuntersuchung pro Patient nur eine einzige Tumorgewebeprobe entnommen und auf eine *KRAS* Mutation analysiert. Dies kann dazu führen, dass Patienten als Wildtyp getestet werden und so einer Antikörpertherapie unterzogen werden, obwohl im Tumorgewebe auch Anteile existieren, die eine *KRAS* Mutation aufweisen.

Um dieser möglichen Ursache nachzugehen, untersuchten wir 100 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom. Für jeden dieser Patienten wurden zwei Gewebeproben aus dem Primärtumor entnommen, aus dem Tumorzentrum sowie der Tumordinvasionsfront.

Diese wurden anschließend separat auf eine *KRAS* Mutation untersucht. Eine heterogene Verteilung zwischen Tumorzentrum und Tumorinvasionsfront konnte so in 8 der 100 Fälle (8%) nachgewiesen werden, das entspricht 20% (8/41) der *KRAS* mutierten Tumore. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Studie von Richman et al. (2011) mit einer intratumoralen Heterogenität von 7,2%.

Auffallend an der vorliegenden Arbeit ist, dass im Tumorzentrum, im Vergleich zur Tumorinvasionsfront, eine höhere Rate an *KRAS* Mutationen gefunden werden konnte. In 6 Fällen konnte eine *KRAS* Mutation nur im Tumorzentrum, nicht aber an der Tumorinvasionsfront nachgewiesen werden. In nur 2 Fällen war es genau umgekehrt. Um eine höhere Rate an *KRAS* Mutation innerhalb eines Patienten zu detektieren, ist es daher empfehlenswert, die Probengewinnung aus dem Tumorzentrum vorzunehmen.

Die oben genannten Ergebnisse stehen in Kontrast zu anderen Autoren, welche ebenfalls die intratumorale Heterogenität von *KRAS* Mutationen in kolorektalen Karzinomen untersuchten. In der Studie von Al-Mulla et al. (1998) konnte bei 34,6% aller *KRAS* mutierten Fälle eine intratumorale Heterogenität festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Watanabe et al. (2011), die eine Heterogenität innerhalb des Primärtumors von 33% der *KRAS* mutierten Fälle aufwies. Losi et al. (2005) konnte sogar in 64% der *KRAS* mutierten Fälle eine heterogene Verteilung nachweisen. Auch in der Studie von Giaretti et al. (1996) konnte in 47% der untersuchten Fälle eine Heterogenität gezeigt werden. Grund dieser hohen Rate an intratumoraler Heterogenität innerhalb dieser Studien könnte die vergleichsweise geringe Zahl der untersuchten Patienten sein (n= 78, 43, 25 bzw.19).

Weiterhin ist auffällig, dass Primärtumore im UICC Stadium III (55%) und IV (50%) signifikant häufiger eine *KRAS* Mutation aufwiesen, als Tumore im UICC Stadium II (28%). Die Rate an Heterogenität nimmt allerdings mit Fortschreiten der Tumorerkrankung ab. Im UICC Stadium II und III konnte eine intratumorale Heterogenität in 10% gefunden werden, im UICC Stadium IV dagegen in 0%. Ähnliche Beobachtungen machte auch die Studie von Losi et al. (2005).

Ein weiterer wichtiger klinischer Aspekt betrifft die Heterogenität von *KRAS* Mutationen zwischen dem Primärtumor und der Lymphknotenmetastase. Wie Eingangs bereits erwähnt, ist es in der klinischen Routinediagnostik üblich, nur eine Gewebeprobe pro Patient zu analysieren. Bisher gibt es allerdings keine generelle Empfehlung darüber, ob die Gewebeprobe aus dem Primärtumor, den Lymphknotenmetastasen oder der Fernmetastase entnommen werden sollte. Aufgrund dieses Problems wurde in der

vorliegenden Arbeit zusätzlich zu dem Primärtumor die korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (n=55) und Fernmetastasen (n=20) untersucht.

Heterogenität zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase konnte so in 31% der Fälle nachgewiesen werden. In 27% dieser Fälle konnte eine *KRAS* Mutation nur im Primärtumor, nicht aber in der Lymphknotenmetastase gefunden werden. Der umgekehrte Fall, also eine *KRAS* Mutation nur in der Lymphknotenmetastase, wurde in nur 4% detektiert. Eine ähnliche heterogene Verteilung weist die Studie von Oliveira et al. (2007) auf. Sie untersuchten in 28 kolorektalen Primärtumoren und deren zugehörigen Lymphknotenmetastasen den *KRAS* Mutationsstatus. In 32% (9/28) konnte eine heterogene Verteilung der beiden Lokalisationen gefunden werden. Allerdings lag hier der Anteil an *KRAS* Mutationen, die nur in der Lymphknotenmetastase nachzuweisen waren, höher (25%). Zusätzlich war der Anteil an *KRAS* Mutationen, die nur im Primärtumor zu finden waren, niedriger (7%) als in der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren lag die Häufigkeit der *KRAS* Mutation innerhalb des Primärtumors bei 64,3% und somit deutlich über dem Durchschnitt von ~ 40%. Diese Abweichung ist wahrscheinlich auf die geringe Zahl an untersuchten Fällen (n=28) zurückzuführen. Eine geringere Heterogenität von nur 20% zeigt die Studie von Olstedal et al. (2011). Jedoch wurden hier mehr *KRAS* Mutationen im Primärtumor (10/15) als in der korrespondierenden Lymphknotenmetastase gefunden (5/15).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den heterogenen Ergebnissen zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase um Stichprobenfehler handelt, wurden zusätzliche Gewebeproben entweder aus dem Primärtumor oder der Lymphknotenmetastase analysiert. In zwei Fällen, in denen die *KRAS* Mutation zunächst nur in der Lymphknotenmetastase gefunden werden konnte, wurde durch die zusätzliche Untersuchung von vier weiteren Gewebeproben aus dem Primärtumor in mindestens einer dieser Proben eine *KRAS* Mutation detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Lymphknotenmetastasen von einer *KRAS* mutierten Subpopulation des Primärtumors stammen. Weniger wahrscheinlich ist es, dass es zu einer neuen *KRAS* Mutation innerhalb des Lymphknotens gekommen ist. Weiterhin könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass *KRAS* Mutationen in einer *KRAS* mutierten Subpopulation des Primärtumors in der Standarddiagnostik unentdeckt bleiben würden.

Durch die zusätzliche Untersuchung von Lymphknotenmetastasen (in Fällen bei denen eine *KRAS* Mutation zunächst nur im Primärtumor zu finden war) konnte schließlich in

6 der 10 Fälle ebenfalls eine *KRAS* Mutation identifiziert werden. Dabei wurde immer die gleiche Mutation nachgewiesen wie bereits im Primärtumor. In den restlichen vier Fällen blieb die zusätzliche Suche nach einer *KRAS* Mutation im Lymphknoten ergebnislos. Diese Daten lassen darauf schließen, dass sich verschiedene Lymphknotenmetastasen, die von einem Primärtumor abstammen, im *KRAS* Mutationsstatus unterscheiden. Wahrscheinlich ist dies auf die klonale Selektion während des Metastasierungsprozesses zurückzuführen.

Es ist daher zu empfehlen, Gewebeproben für die Routinediagnostik der *KRAS* Mutationsanalyse nicht aus dem Lymphknotengewebe zu entnehmen, da hierdurch nicht zuverlässig auf den Mutationsstatus des Primärtumors geschlossen werden kann. Zu der gleichen Empfehlung kommt Han et al. (2012), welcher in einer Literaturrecherche eine hohe Rate an diskordanten Mutationen im Primärtumor und Lymphknotenmetastase belegen konnte.

Um eine mögliche heterogene Verteilung der *KRAS* Mutation zwischen Primärtumor und Fernmetastase festzustellen, wurden in einem weiteren Schritt 20 korrespondierende Fernmetastasen untersucht. In 18 Fällen (90%) konnte der gleiche *KRAS* Mutationsstatus nachgewiesen werden. In 8 Fällen (40%) lag sowohl im Primärtumor als auch in der Fernmetastase ein *KRAS* Wildtyp vor. In nur 2 Fällen (10%) konnte eine Heterogenität detektiert werden, wobei sich in einem Fall die *KRAS* Mutation nur im Primärtumor fand, in dem anderen Fall konnte die *KRAS* Mutation nur in der Fernmetastase lokalisiert werden.

Die hohe Übereinstimmung des *KRAS* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Fernmetastase, welche zumeist aus der Leber stammte, steht in Einklang mit der allgemeinen Studienlage, die von einer Konkordanzrate von etwa 90-100% ausgeht (Molinari et al., 2009; Italiano et al., 2010; Kaneko et al., 2011). Baas et al. (2011) konnte bei der Literaturrecherche, die 21 Studien beinhaltetete, eine durchschnittliche Übereinstimmung von 93% darlegen. Etienne-Grimaldi et al. (2008) konnte sogar eine 100%ige Übereinstimmung des *KRAS* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Lebermetastase nachweisen. Knijn et al. (2011) fanden in über 96% einen übereinstimmenden *KRAS* Mutationsstatus, Cejas et al. (2009) eine 94%ige Konkordanz zwischen Primärtumor und Fernmetastase. In zwei weiteren Studien konnte ebenfalls eine über 90%ige Übereinstimmung des *KRAS* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Fernmetastase gefunden werden (Santini et al., 2008; Artale et al., 2008). Allerdings existieren vereinzelt auch Studien, die eine geringere Konkordanz demonstrieren konnten. So wies die Studie von Albanese et al. (2004) in

nur 70% ein konkordantes Ergebnis zwischen Primärtumor und Fernmetastase auf. Berücksichtigt werden muss allerdings auch die angewendete Methodik in den jeweiligen Studien, da sich hierdurch möglicherweise schon ein Unterschied in der Anzahl der Konkordanz erzielen lässt.

Insgesamt kann durch die hohe Übereinstimmung der *KRAS* Mutationsanalyse zwischen Primärtumor und Fernmetastase gezeigt werden, dass Proben aus beiden Tumorlokalisationen ein geeignetes Gewebe darstellen, um einen zuverlässigen *KRAS* Mutationsstatus zu erhalten. Auch die Studie von Han et al. (2012) spricht eine solche Empfehlung aus.

4.2 Analyse der *BRAF* Mutationsergebnisse

Wie in der Einleitung bereits erläutert, könnte eine mögliche Ursache der relativ schlechten Ansprechrate auf eine EGFR-gerichtete Antikörpertherapie auch bei *KRAS* Wildtyp getesteten Patienten eine Mutation innerhalb des *BRAF* Gens darstellen. Aus diesem Grund wurden 100 Primärtumoren analysiert, wobei in 7% eine *BRAF* Mutation nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben in der Literatur, welche eine Prävalenz von 5-17% beschreibt (Samowitz et al., 2005; Ogino et al., 2009; Barault et al., 2008; Fransen et al., 2004; Nagasaka et al., 2004; Li et al., 2006; Santini et al., 2010; De Roock et al., 2010).

Von den 100 untersuchten kolorektalen Primärtumoren konnte in nur einem Fall (1%) eine intratumorale Heterogenität detektiert werden, dieses entspricht 14% aller gefundenen *BRAF* mutierten Karzinome. In der Literatur sind bislang nur wenige Studien zur intratumoralen Heterogenität des *BRAF* Mutationsstatus bei kolorektalen Karzinomen veröffentlicht. So beobachtete Richman et al. (2011) ähnliche Ergebnisse. Die heterogene Verteilung innerhalb des Primärtumors lag hier bei 2,9%. Eine weitere Studie zum intratumoralen *BRAF* Mutationsstatus, welche allerdings Gewebe aus papillären Schilddrüsenkarzinomen untersuchte, publizierte eine weitaus höhere Heterogenität (40%) innerhalb des Primärtumors (Giannini et al., 2007), als die vorliegende Arbeit.

Betrachtet man die Ergebnisse der *BRAF* Mutationsrate innerhalb des Primärtumors im Vergleich zur korrespondierenden Lymphknotenmetastase, konnte in 2 Fällen (4%) der 55 untersuchten Fälle ein heterogenes Ergebnis aufgedeckt werden. Dabei befand sich die *BRAF* Mutation in beiden Fällen lediglich im Primärtumor, nicht jedoch in den Lymphknotenmetastasen. In einem Fall war es durch zusätzliche Untersuchung des Lymphknotens möglich, doch noch eine *BRAF* Mutation nachzuweisen.

Eine heterogene Verteilung der *BRAF* Mutation zwischen Primärtumor und Fernmetastase konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Von den 20 untersuchten Fällen wurde in nur einem Fall (5%) eine *BRAF* Mutation detektiert, welche sich sowohl im Primärtumor als auch in der Fernmetastase befand. Diese Ergebnisse sind mit denen anderer Studien vergleichbar. Molinari et al. (2009) und Cejas et al. (2012) konnten ebenfalls eine 100%ige Konkordanz des *BRAF* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Fernmetastase nachweisen. In zwei weiteren Studien konnte eine ähnlich hohe Übereinstimmung (97% bzw. 98%) des *BRAF* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Fernmetastase dargelegt werden (Santini et al., 2010; Italiano et al., 2010).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass *BRAF* Mutationen in kolorektalen Karzinomen mit einer Prävalenz von 5-17% eher selten auftreten. Kann allerdings eine *BRAF* Mutation innerhalb des Primärtumors nachgewiesen werden, werden bis zu 14% der *BRAF* mutierten Tumore auf Grund der intratumoralen Heterogenität möglicherweise als Wildtyp diagnostiziert.

Ähnlich wie bei dem *KRAS* Mutationsstatus stellt sich die Situation bei der *BRAF* Mutationsanalyse dar. In der klinischen Routinediagnostik sollte daher der *BRAF* Mutationsstatus nicht an Gewebe der Lymphknotenmetastasen bestimmt werden, denn durch die klonale Selektion erhöht sich die Rate an heterogenen Ergebnissen.

4.3 Analyse der *PIK3CA* Mutationsergebnisse

Zusätzlich zur *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse wurde die Häufigkeit einer *PIK3CA* Mutation untersucht. Bei der Analyse der 100 Primärtumore konnte in 21% eine *PIK3CA* Mutation nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit denen anderer Arbeitsgruppen, welche eine Prävalenz von etwa 15% beobachten (Nosho et al., 2008 (17,8%); Velho et al., 2005 (13,6%); De Roock et al., 2010 (14,5%). In der vorliegenden Arbeit konnten 90% der *PIK3CA* Mutationen auf Exon 9 gefunden werden, nur 10% auf Exon 20. Diese Verteilung der *PIK3CA* Mutationen auf Exon 9 bzw. 20 ist mit denen in der Literatur vergleichbar. Auch De Roock et al. (2010) und Liao et al. (2012) konnten deutlich mehr Mutationen auf Exon 9 lokalisieren, als auf Exon 20.

Bei der Analyse der 100 Primärtumoren konnte in 5 Fällen (5%) eine intratumorale Heterogenität detektiert werden. In einem Fall konnte die *PIK3CA* Mutation nur an der Tumorinvasionsfront gefunden werden, in den verbleibenden vier Fällen wurde die

Mutation lediglich im Tumorzentrum beobachtet. Bislang wurden keine Daten zur intratumoralen Heterogenität des *PIK3CA* Mutationsstatus in kolorektalen Karzinomen veröffentlicht.

Wie schon bei der Analyse der *KRAS* Ergebnisse fällt auch bei dem Vergleich des *PIK3CA* Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase eine relativ hohe Heterogenität auf. So konnte in 13% ein diskordantes Ergebnis der *PIK3CA* Mutation zwischen beiden Gewebelokalisationen gefunden werden. Bei der Betrachtung nur der *PIK3CA* mutierten Tumore (26%), bedeutet dies, dass bei der Hälfte der mutierten Fälle eine Heterogenität nachweisbar war. Ähnlich wie bei der *KRAS* Mutationsanalyse stellt sich die Situation bei den *PIK3CA* Mutationen dar. *PIK3CA* Mutationen zeigen sich häufiger in Primärtumoren (11%), als in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (2%). Allerdings konnte auch hier durch die zusätzliche Analyse weiterer Lymphknoten die Rate an *PIK3CA* Mutationen erhöht werden und somit die Rate heterogener Fälle gesenkt werden.

Ein diskordantes Ergebnis zwischen Primärtumor und Fernmetastase konnte in nur einem (5%) der 20 untersuchten Fälle beobachtet werden, wobei sich eine *PIK3CA* Mutation lediglich im Primärtumor nachweisen ließ. Auch Vakiani et al. (2012) konnten in über 98% ein übereinstimmendes *PIK3CA* Mutationsergebnis zwischen Primärtumor und Metastase finden. Aus diesem Grund scheint es möglich, für die klinische Praxis Gewebe sowohl aus dem Primärtumor, als auch aus der Fernmetastase zu entnehmen, um einen zuverlässigen *PIK3CA* Mutationsstatus zu erhalten. Von der Mutationsanalyse eines Lymphknotenpräparates sollte in der klinischen Praxis abgesehen werden.

4.4 Ergänzende Ergebnisse in der Diskussion

Bei einigen Patienten konnte das gleichzeitige Auftreten zweier Genmutationen nachgewiesen werden. 9% der Patienten wiesen sowohl eine *KRAS* als auch eine *PIK3CA* Mutation auf. Bei 3% konnte das simultane Auftreten einer *PIK3CA* und *BRAF* Mutation detektiert werden. Das gemeinsame Vorhandensein einer *KRAS* und einer *BRAF* Mutation konnte dagegen nicht gefunden werden, im Einklang mit der aktuellen Studienlage (Tol et al., 2009; De Roock et al., 2010).

Bei Betrachtung des Primärtumors (Tumorzentrum und Tumordinvasionsfront) ist in 57% mindestens eines der drei untersuchten Gene mutiert. Diese Prozentzahl lässt sich auf 60% korrigieren, bei zusätzlicher Analyse weiterer Proben aus dem Primärtumor.

Bislang wurde die *KRAS* Mutationstestung routinemäßig in Codon 12 und 13 vorgenommen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, da hier mit Abstand die meisten Mutationen lokalisiert sind. Durch neue klinische Studien konnte jedoch belegt werden, dass durch eine erweiterte Mutationsanalyse im RAS-Signalweg, die Anzahl derer Patienten, die von einer Antikörpertherapie profitieren, deutlich eingegrenzt werden kann. So hat der Hersteller von Cetuximab im Januar 2014 die Bestimmung des RAS Wildtypstatus in Exon 2,3 und 4 von *KRAS* und *NRAS* als eine Voraussetzung für die Verwendung einer auf Cetuximab basierenden Therapie erklärt. Die Aktualisierung beruht auf eine Subgruppenanalyse einer weiteren Phase 2-Studie (OPUS-Studie). Durch die zusätzliche Untersuchung von Tumorgewebe, welches zuvor als *KRAS* Wildtyp in Exon 2 getestet wurde, konnten in 30,5% weitere *RAS* Mutationen detektiert werden. Werden nur solche Patienten mit einem *RAS* Wildtyp in die Therapie mit Cetuximab und FOLFOX4 eingeschlossen, kann die Gesamtansprechrates im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie deutlich erhöht werden (Tejpar et al., 2014). Entsprechende Resultate konnten bei Anwendung des FOLFIRI Regimes in Kombination mit Cetuximab erhoben werden (Ciardiello et al., 2014).

Auch bei der Verwendung von Panitumumab und FOLFOX4 bei Patienten mit *RAS* Wildtyp konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Douillard et al., 2013; Peeters et al., 2013).

5 Schlussfolgerung

Bislang dient die Bestimmung des *KRAS* Mutationsstatus als eine therapeutische Entscheidungshilfe, ob eine Anti-EGFR-Therapie indiziert ist. Allein durch dieses diagnostische Testverfahren lässt sich jedoch keine 100%ige Aussage über den Benefit einer solchen Therapie treffen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich demnach ableiten, dass sich durch die ergänzende Untersuchung des *BRAF* und *PIK3CA* Gens, zusätzlich zum *KRAS* Gen, die Anzahl derer Patienten, welche vermutlich nicht von einer EGFR spezifischen Antikörpertherapie profitieren würden, um 15% erhöhen würde.

Weiterhin kann durch die vorliegende Dissertation gezeigt werden, dass in Tumoren, die eine Genmutation aufweisen, eine signifikante Rate an Heterogenität, bis zu 50%, festzustellen ist. Am häufigsten findet man dieses heterogene Verteilungsmuster bei dem Vergleich des Primärtumors mit der zugehörigen Lymphknotenmetastase. Wahrscheinlich lässt sich dieses Ereignis als Ergebnis der klonalen Selektion während des Metastasierungsprozesses erklären. Als Folge sollte bei der diagnostischen Untersuchung des Mutationsstatus vorzugsweise Gewebe aus dem Primärtumor oder der Fernmetastase entnommen werden. Proben aus der korrespondierenden Lymphknotenmetastase stellen dagegen ein wenig geeignetes Material dar, um den Mutationsstatus zuverlässig zu bestimmen.

Dennoch können auch die zusätzlich detektierten *BRAF* und *PIK3CA* Mutationen innerhalb eines *KRAS* Wildtyp tumors nicht ausreichend die relativ hohe Rate an Therapieversagern erklären. Es wird daher in der Literatur über weitere Signalproteine innerhalb der EGFR abhängigen Signalwege diskutiert, welche zu dieser Therapieresistenz beitragen. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise eine Mutation bzw. Mangel an PTEN, eine Überexpression von pAKT, eine erhöhte EGFR oder HER2 Genkopiezahl, eine erhöhte EGFR Phosphorylierung und eine Überexpression an alternativen EGFR Liganden, wie z.B. Amphiregulin oder Epiregulin erwogen (Siena et al., 2009; Laurent-Puig et al., 2009).

Auch der finanzielle Aspekt spielt eine wesentliche Rolle, denn eine Antikörpertherapie ist im Vergleich zu einer erweiterten Mutationsdiagnostik sehr teuer. Durch die zusätzliche molekulare Mutationsuntersuchung könnten somit Kosten eingespart werden.

Neben dem Auftreten von Diskordanzen als Erklärungsansatz für ein Nichtansprechen auf eine EGFR-gerichtete Therapie müssen auch folgende weitere Aspekte in Betracht gezogen werden.

So spielt beispielsweise das Verfahren zur Analyse einer *KRAS*-Mutation eine entscheidende Rolle. Bisher gibt es keine einheitlichen standardisierten Verfahren zur Bestimmung des *KRAS* Mutationsstatus, so dass jedem Labor die Wahl der Analytik selbst überlassen wird und somit fehlerhafte Ergebnisse erzielt werden können.

Des Weiteren könnte eine noch nicht detektierte Zweitneoplasie mit einem anderen *KRAS* Mutationsstatus parallel existieren.

Neben der ausschließlichen Bestimmung des *KRAS* Mutationsstatus im Codon 12 und 13 hat sich inzwischen durch weiterführende Untersuchungen die zusätzliche Analyse von RAS Mutationen im Exon 2,3 und 4 von *KRAS* und *NRAS* zur Bestimmung der Einsatzmöglichkeiten einer EGFR Antikörpertherapie etabliert. Dadurch ist es bereits möglich das Ansprechverhalten auf eine EGFR-basierte Antikörpertherapie effektiver vorherzusagen.

Trotz der verbesserten Vorauswahl geeigneter Patienten durch eine im Vorfeld durchgeführte, optimierte Genanalyse sprechen nicht alle Behandelten auf eine derartige Therapie an. Aus diesem Grund ist auch in Zukunft eine intensivere Forschung zur Bestimmung passender Biomarker notwendig, um die Vorhersagbarkeit des Ansprechverhaltens auf eine EGFR-Therapie bei kolorektalen Karzinomen erhöhen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Albanese, I; Scibetta, A; Migliavacca, M; Russo, A; Bazan, V; Tomasino, R et al. **(2004)** Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (3), 784–791.
- Allen, J **(1995)** Molecular biology of colon polyps and colon cancer. *Semin Surg Oncol* 11 (6), 399–405.
- Al-Mulla, F; Going, J; Sowden, E; Winter, A; Pickford, I; Birnie, G **(1998)** Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 185 (2), 130–138.
- Alroy, I; Yarden, Y **(1997)** The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters* 410 (1), 83–86.
- Amado, R; Wolf, M; Peeters, M; van Cutsem, E; Siena, S; Freeman, D et al. **(2008)** Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26 (10), 1626–1634.
- Andreyev, H; Norman, A; Cunningham, D; Oates, J; Clarke, P **(1998)** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 90 (9), 675–684.
- Aoki, M; Schetter, C; Himly, M; Batista, O; Chang, H; Vogt, P **(2000)** The Catalytic Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase: Requirements for Oncogenicity. *Journal of Biological Chemistry* 275 (9), 6267–6275.
- Arnold, C; Goel, A; Blum, H; Boland, C **(2005)** Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* 104 (10), 2035–2047.
- Artale, S; Sartore-Bianchi, A; Veronese, SM; Gambi, V; Sarnataro, CS; Gambacorta, M et al. **(2008)** Mutations of KRAS and BRAF in Primary and Matched Metastatic Sites of Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26 (25), 4217–4219.
- Avruch, J; Zhang, X; Kyriakis, J **(1994)** Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 19 (7), 279–283.
- Baas, J; Krens, L; Guchelaar, H; Morreau, H; Gelderblom, H **(2011)** Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist* 16 (9), 1239–1249.
- Baldus, S **(2003)** Klinisch-pathologische und molekulare Prognosefaktoren kolorektaler Karzinome. *Pathologe* 24, 49–60.
- Barault, L; Veyrie, N; Jooste, V; Lecorre, D; Chapusot, C; Ferraz, J et al. **(2008)** Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *International Journal of Cancer* 122 (10), 2255–2259.
- Barbacid, M **(1987)** Ras Genes. *Annual Review of Biochemistry* 56 (1), 779–827.
- Barnier, J; Papin, C; Eychene, A; Lecoq, O; Calothy, G **(1995)** The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 270 (40), 23381–23389.
- Blume-Jensen, P; Hunter, T **(2001)** Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411 (6835), 355–365.

- Bodmer, W; Bailey, C; Bodmer, J; Bussey, H; Ellis, A; Gorman, P et al. **(1987)** Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328 (6131), 614–616.
- Bokemeyer, C; Bondarenko, I; Makhson, A; Hartmann, J; Aparicio, J; Braud, F et al. **(2009)** Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27 (5), 663–671.
- Borschitz, T; Junginger, T **(2008)** Transanale endoskopische Mikrochirurgie (TEM). *Der Onkologe* 14 (1), 81–92.
- Bos, J **(1989)** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49 (17), 4682–4689.
- Bos, J; Fearon, E; Hamilton, S; Vries, M; van Boom, J; van der Eb, A; Vogelstein, B **(1987)** Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 (6120), 293–297.
- Bourne, H; Sanders, D; McCormick, F **(1990)** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348 (6297), 125–132.
- Cardone, M; Roy, N; Stennicke, H; Salvesen, G; Franke, T; Sanbridge, E et al. **(1998)** Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* 282 (5392), 1318–1321.
- Cejas, P; López-Gómez, M; Aguayo, C; Madero, R; Castro Carpeño, J; Belda-Iniesta, C et al. **(2009)** KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis. *PLoS ONE* 4 (12), 8199.
- Cejas, P; Lopez-Gomez, M; Aguayo, C; Madero, R; Moreno-Rubio, J; Carpeno, J et al. **(2012)** Analysis of the Concordance in the EGFR Pathway Status Between Primary Tumors and Related Metastases of Colorectal Cancer Patients: Implications for Cancer Therapy. *CURRENT CANCER DRUG TARGETS* 12 (2), 124–131.
- Chang, H; Aoki, M; Fruman, D; Auer, K; Bellacosa, A; Tsichlis, P et al. **(1997)** Transformation of Chicken Cells by the Gene Encoding the Catalytic Subunit of PI 3-Kinase. *Science* 276 (5320), 1848–1850.
- Ciardiello, F; Tortora, G **(2001)** A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor. *Clinical Cancer Research* 7 (10), 2958–2970.
- Ciardiello, F; Tortora, G **(2008)** EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* 358 (11), 1160–1174.
- Ciardiello, F; Lenz, HJ ;Kohne, CH; Heinemann, V; Tejpar, S; Esser, R et al. **(2014)** Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): New results from the CRYSTAL trial. *Journal of Clinical Oncology* 32 (3), Meeting Abstract: LBA443
- Cunningham, D; Humblet, Y; Siena, S; Khayat, D; Bleiberg, H; Santoro, A et al. **(2004)** Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 351 (4), 337–345.
- Davies, H; Bignell, G; Cox, C; Stephens, P; Edkins, S; Clegg, S et al. **(2002)** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417 (6892), 949–954.

- De Bono, J; Rowinsky, E **(2002)** The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends in Molecular Medicine* 8 (4), 19–26.
- De Roock, W; Claes, B; Bernasconi, D; Schutter, J; Biesmans, B; Fountzilas, G et al. **(2010)** Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology* 11 (8), 753–762.
- De Roock, W; Piessevaux, H; Schutter, J; Janssens, M; Hertogh, G; Personeni, N et al. **(2008)** KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 19 (3), 508–515.
- Dietel, M; Tannapfel, A; Baretton, G; et al. **(2008)** Molekularpathologische KRAS-Mutationsanalyse. Voraussetzung für die zielgerichtete Antikörpertherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Molecular pathologic KRAS mutation analysis. A prerequisite of effective antibody treatment for metastasized colorectal cancer. *Der Chirurg* 79 (6), 576–579.
- Dietmaier, W **(2010)** Microsatellite instability. A new predictive marker (?). *Pathologe* 31 Suppl 2, 268–273.
- Di Nicolantonio, F; Martini, M; Molinari, F; Sartore-Bianchi, A; Arena, S; Saletti, P et al. **(2008)** Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26 (35), 5705-5712.
- Douillard, JY; Oliner, KS; Siena, S; Tabernero, J; Burkes, R; Barugel, M et al. **(2013)** Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 369 (11), 1023-1034.
- Downward, J **(1992)** Regulatory mechanisms forras proteins. *BioEssays* 14 (3), 177–184.
- Durst, J; Arnholdt, H (Hg.) **(1998)** Bauchchirurgie. Stuttgart: Schattauer.
- Eaden, J; Abrams, K; Mayberry, J **(2001)** The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48 (4), 526–535.
- Engelman, J; Luo, J; Cantley, L **(2006)** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* 7 (8), 606–619.
- Esplen, M; Stuckless, N; Berk, T; Butler, K; Gallinger, S **(2009)** The FAP self-concept scale (adult form). *Familial Cancer* 8 (1), 39–50.
- Etienne-Grimaldi, M; Formento, J; Francoual, M; Francois, E; Formento, P; Renee, N et al. **(2008)** K-Ras Mutations and Treatment Outcome in Colorectal Cancer Patients Receiving Exclusive Fluoropyrimidine Therapy. *Clinical Cancer Research* 14 (15), 4830–4835.
- Fabian, J; Daar, I; Morrison, D **(1993)** Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13 (11), 7170–7179.
- Fearon, E **(1993)** K-ras Gene Mutation as a Pathogenetic and Diagnostic Marker in Human Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 85 (24), 1978–1980.
- Fearon, E; Vogelstein, B **(1990)** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5), 759–767.

- Finkelstein, S; Sayegh, R; Christensen, S; Swalsky, P **(1993)** Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 71 (12), 3827–3838.
- Fodde, R; Smits, R; Clevers, H **(2001)** APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1 (1), 55–67.
- Forrester, K; Almoguera, C; Han, K; Grizzle, W; Perucho, M **(1987)** Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327 (6120), 298–303.
- Fransen, K; Klintenas, M; Osterstrom, A; Dimberg, J; Monstein, H; Soderkvist, P **(2004)** Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 25 (4), 527–533.
- Freeman, D; Juan, T; Reiner, M; Hecht, J; Meropol, N; Berlin, J et al. **(2008)** Association of K-ras Mutational Status and Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving Panitumumab Alone. *Clinical Colorectal Cancer* 7 (3), 184–190.
- Fremin, C; Meloche, S **(2010)** From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 3 (1), 8.
- Garnett, M; Marais, R **(2004)** Guilty as charged. *Cancer Cell* 6 (4), 313–319.
- Garnett, M; Rana, S; Paterson, H; Barford, D; Marais, R **(2005)** Wild-Type and Mutant B-RAF Activate C-RAF through Distinct Mechanisms Involving Heterodimerization. *Molecular Cell* 20 (6), 963–969.
- Gatalica, Z; Torlakovic, E **(2008)** Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Familial Cancer* 7 (1), 15–26.
- Giannini, R; Ugolini, C; Lupi, C; Proietti, A; Elisei, R; Salvatore, G et al. **(2007)** The Heterogeneous Distribution of BRAF Mutation Supports the Independent Clonal Origin of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (9), 3511–3516.
- Giaretti, W; Monaco, R; Pujic, N; Rapallo, A; Nigro, S; Geido, E **(1996)** Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 149 (1), 237–245.
- Gillen, C; Walmsley, R; Prior, P; Andrews, H; Allan, R **(1994)** Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35 (11), 1590–1592.
- Gillespie, P; Chambers, T; Chan, K; Doronzo, F; Morson, B; Williams, C **(1979)** Colonic adenomas--a colonoscopy survey. *Gut* 20 (3), 240–245.
- Goike, H; Asplund, A; Petersson, E; Liu, L; Sanoudou, D; Collins, V **(1999)** Acquired Rearrangement of an Amplified Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene in a Human Glioblastoma Xenograft. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (7), 697–701.
- Goldstein, N; Prewett, M; Zuklys, K; Rockwell, P; Mendelsohn, J **(1995)** Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1 (11), 1311–1318.
- Grandis, RJ; Melhem, M; Barnes, E; Tweardy, D **(1996)** Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 78 (6), 1284–1292.

- Graus-Porta, D; Beerli, R; Daly, J; Hynes, N **(1997)** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO Journal* 16 (7), 1647–1655.
- Hackel, P; Zwick, E; Prenzel, N; Ullrich, A **(1999)** Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 11 (2), 184–189.
- Han, C; Li, F; Ma, J; Zou, H **(2012)** Concordant KRAS Mutations in Primary and Metastatic Colorectal Cancer Tissue Specimens: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Cancer Invest* 30 (10), 741–747.
- Herman, J; Baylin, S **(2003)** Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine* 349 (21), 2042–2054.
- Hermanek, P; Frühmorgen, P; Guggenmoos-Holzmann, I; Altendorf, A; Matek, W **(1983)** The Malignant Potential of Colorectal Polyps - A New Statistical Approach -. *Endoscopy* 15 (01), 16–20.
- Hermanek, P; Wittekind, C **(1994)** Residual tumor (R) classification and prognosis. *Seminars in Surgical Oncology* 10 (1), 12–20.
- Herold, G (Hg.) **(2008)** Innere Medizin. Köln: Herold.
- Hiddemann, W; Bartram, CR (Hg.) **(2010)** Die Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Huang, H; Nagane, M; Klingbeil, C; Lin, H; Nishikawa, R; Ji, X et al. **(1997)** The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 272 (5), 2927–2935.
- Hynes, N; Horsch, K; Olayioye, M; Badache, A **(2001)** The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine Related Cancer* 8 (3), 151–159.
- Italiano, A; Hostein, I; Soubeyran, I; Fabas, T; Benchimol, D; Evrard, S et al. **(2010)** KRAS and BRAF Mutational Status in Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites: Biological and Clinical Implications. *Annals of Surgical Oncology* 17 (5), 1429–1434.
- Jackman, R; Mayo, C **(1951)** The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 93 (3), 327–330.
- Kampman, E; Voskuil, D; van Kraats, A; Balder, H; van Muijen, G; Goldbohm, R; van't Veer, P **(2000)** Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. *Carcinogenesis* 21 (2), 307–309.
- Kaneko, Y; Kuramochi, H; Nakajima, G; Nakamura, A ; Inoue, Y; Hayashi, K et al. **(2011)** Heterogeneity of Kras status in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *Journal of Clinical Oncology* 29 (15), e14037.
- Karakas, B; Bachman, K; Park, B **(2006)** Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94 (4), 455–459.
- Karapetis, C; Khambata-Ford, S; Jonker, D; O'Callaghan, C; Tu, D; Tebbutt, N et al. **(2008)** K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 359 (17), 1757–1765.
- Kinzler, K; Vogelstein, B **(1997)** Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 (6627), 761–763.
- Knijjn, N; Mekenkamp, L; Klomp, M; Vink-Borger, M; Tol, J; Teerenstra, S et al. **(2011)** KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched

- liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 104 (6), 1020–1026.
- Krause, M; Zips, D; Thames, H; Kummermehr, J; Baumann, M **(2006)** Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 80 (2), 112–122.
- Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013
- Laurent-Puig, P; Cayre, A ; Manceau, G; Buc, E; Bachet, JB; Lecomte, T et al. **(2009)** Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR Status in Determining Benefit From Cetuximab Therapy in Wild-Type KRAS Metastatic Colon. *Cancer Journal of Clinical Oncology* 27 (35), 5924-5930.
- Leevers, S; Vanhaesebroeck, B; Waterfield, M **(1999)** Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current Opinion in Cell Biology* 11 (2), 219–225.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3- Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer 021-007OL.
- Li, W; Kawakami, K; Ruszkiewicz, A; Bennett, G; Moore, J; Iacopetta, B **(2006)** BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 5, 1–6.
- Liao, X; Morikawa, T; Lochhead, P; Imamura, Y; Kuchiba, A; Yamauchi, M et al. **(2012)** Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clinical Cancer Research* 18 (8), 2257–2268.
- Lièvre, A; Bachet, J; Le Core, D; Boige, V; Landi, B; Emile, J et al. **(2006)** KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 66 (8), 3992–3995.
- Linardou, H; Dahabreh, IJ; Kanaloupiti, D; Siannis, F; Bafaloukos, D; Kosmidis, P et al. **(2008)** Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncology* 9 (10), 962–972.
- Losi, L; Baisse, B; Bouzourene, H; Benhattar, J **(2005)** Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 26 (5), 916–922.
- Losi, L; Benhattar, J; Costa, J **(1992)** Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 28 (6-7), 1115–1120.
- Lowy, D; Willumsen, B **(1993)** Function and Regulation of RAS. *Annual Review of Biochemistry* 62 (1), 851–891.
- Lynch, T; Bell, D; Sordella, R; Gurubhagavatula, S; Okimoto, R; Brannigan, B et al. **(2004)** Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine* 350 (21), 2129–2139.
- Lynch, H; Lanspa, S; Boman, B; Smyrk, T; Watson, P; Lynch, J et al. **(1988)** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer--Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am.* (17), 679–712.

- Marais, R; Light, Y; Paterson, H; Mason, C; Marshall, C **(1997)** Differential Regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by Oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 272 (7), 4378–4383.
- Mason, C; Springer, C; Cooper, R; Superti-Furga, G; Marshall, C; Marais, R **(1999)** Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal* 18 (8), 2137–2148.
- McCubrey, J; Steelman, L; Abrams, S; Lee, J; Chang, F; Bertrand, F et al. **(2006)** Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in Enzyme Regulation* 46 (1), 249–279.
- Mendelsohn, J; Baselga, J **(2003)** Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21 (14), 2787–2799.
- Messa, C; Russo, F; Caruso, M; Di Leo, A **(1998)** EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 37 (3), 285–289.
- Molinari, F; Matrin, V; Saletti, P; De Dosso, S; Spitale, A; Camponovo, A et al. **(2009)** Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer* 100, 1087–1094.
- Moscato, D; Hogado-Madruga, M; Elmet, D; Montgomery, R; Wong, A **(1998)** Constitutive Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by a Naturally Occurring Mutant Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273 (1), 200–206.
- Müller, Markus (Hg.) **(2008/2009)** Chirurgie für Studium und Praxis. Breisach: Med. Verl.- und Informationsdienste.
- Munding, J; Tannapfel, A **(2009)** Pathogenese des sporadischen und hereditären Kolonkarzinoms. *Der Onkologe* 15 (12), 1182–1192.
- Nagasaka, T; Sasamoto, H; Notohara, K; Cullings, H; Takeda, M; Kimura, K et al. **(2004)** Colorectal Cancer With Mutation in BRAF, KRAS, and Wild-Type With Respect to Both Oncogenes Showing Different Patterns of DNA Methylation. *Journal of Clinical Oncology* 22 (22), 4584–4594.
- Nosho, K; Kawasaki, T; Ohnishi, M; Suemoto, Y; Kirkner, G; Zepf, D et al. **(2008)** PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 10 (6), 534–541.
- Ogino, S; Kawasaki, T; Brahmandam, M; Yan, L; Cantor, M et al. **(2005)** Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *Journal of Molecular Diagnostics* 7 (3), 413–421.
- Ogino, S; Nosho, K; Kirkner, G; Kawasaki, T; Meyerhardt, J; Loda, M et al. **(2009)** CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 58 (1), 90–96.
- Oliveira, C; Velho, S; Moutinho, C; Ferreira, A; Preto, A; Domingo, E et al. **(2007)** KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 26 (1), 158–163.
- Olschwang, S; Hamelin, R; Laurent-Puig, P; Thuille, B; De Rycke, Y; Li, Y et al. **(1997)** Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (22), 12122–12127.
- Oltedal, S; Aasprong, OG; Moller, JH; Korner, H; Gilje, B; Tjensvoll, K et al. **(2011)** Heterogeneous distribution of K-ras mutations in primary colon carcinomas:

- implications for EGFR-directed therapy. *International Journal of Colorectal Disease* 26 (10), 1271-1277.
- Parkin, D; Bray, F; Ferlay, J; Pisani, P **(2005)** Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55 (2), 74–108.
- Peeters, M; Oliner, KS; Parker, A; Siena, S; Van Cutsem, E; Huang, J et al. **(2013)** Massively Parallel Tumor Multigene Sequencing to Evaluate Response to Panitumumab in a Randomized Phase III Study of Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 19 (7), 1902-1912.
- Prenzel, N; Fischer, O; Streit, S; Ullrich, A **(2001)** The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine Related Cancer* 8 (1), 11–31.
- Rameh, L; Cantley, L **(1999)** The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *Journal of Biological Chemistry* 274 (13), 8347–8350.
- Richman, S; Chambers, P; Seymour, M; Daly, C; Grant, S; Hemmings, G; Quirke, P **(2011)** Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol* 34, 61–66.
- Riese, D; Stern, D **(1998)** Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20 (1), 41–48.
- Robinson, M; Cobb, M **(1997)** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9 (2), 180–186.
- Romashkova, J; Makarov, S **(1999)** NF-kappa B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401 (6748), 86–90.
- Roskoski, R **(2010)** RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (3), 313–317.
- Rozakis-Adcock, M; Fernley, R; Wade, J; Pawson, T; Bowtell, D **(1993)** The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363 (6424), 83–85.
- Rüschoff, J; Dietmaier, W; Bocker, T; Wallinger, S; Kullmann, F; Beham, A; Hofstädter, F **(1998)** Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms **. *Der Pathologe* 19 (4), 269–278.
- Salomon, D; Brandt, R; Ciardiello, F; Normanno, N **(1995)** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 19 (3), 183–232.
- Saltz, L; Mirepol, N; Loehrer, P; Needle, M; Kopit, J; Mayer, R **(2004)** Phase II Trial of Cetuximab in Patients With Refractory Colorectal Cancer That Expresses the Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Clinical Oncology* 22 (7), 1201–1208.
- Samowitz, W; Albertsen, H; Herrick, J; Levin, T; Sweeney, C; Murtaugh, M et al. **(2005)** Evaluation of a Large, Population-Based Sample Supports a CpG Island Methylator Phenotype in Colon Cancer. *Gastroenterology* 129 (3), 837–845.
- Samowitz, W; Curtin, K; Schaffer, D; Robertson, M; Leppert, M; Slattery, M **(2000)** Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (11), 1193–1197.
- Samuels, Y; Ericson, K **(2006)** Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Current Opinion in Oncology* 18 (1), 77–82.

- Samuels, Y; Wang, Z; Bardelli, A; Silliman, N; Ptak, J; Szabo, S et al. **(2004)** High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 304 (5670), 554.
- Santini, D; Loupakis, F; Vincenzi, B; Floriani, I; Stasi, I; Canestrari, E et al. **(2008)** High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 13, 1270–1275.
- Santini, D; Spoto, C; Loupakis, F; Vincenzi, B; Silvestris, N; Cremolini, C et al. **(2010)** High concordance of BRAF status between primary colorectal tumours and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Annals of Oncology* 21 (7), 1565.
- Sarbassov, D; Guertin, D; Ali, S; Sabatini, D **(2005)** Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307 (5712), 1098–1101.
- Sartore-Bianchi, A; Martini, M; Molinari, F; Veronese, S; Nichelatti, M; Artale, S et al. **(2009)** PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* 69 (5), 1851–1857.
- Scheppach, W; Melcher, R; Lührs, H; Menzel, T **(2000)** Primaerpraevention des sporadischen kolorektalen Karzinoms durch Ernaehrungsmodifikation und Medikamente? *Der Internist* 41 (9), 868–875.
- Schlessinger, J **(2000)** Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103 (2), 211–225.
- Seufferlein, T; Lutz, M; Adler, G **(2003)** Multimodale Therapiekonzepte beim Kolonkarzinom. *Internist* 44, 322–335.
- Siegel-Lakhai, W; Beijnen, J; Schellens, J **(2005)** Current Knowledge and Future Directions of the Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors Erlotinib (Tarceva(R)) and Gefitinib (Iressa(R)). *The Oncologist* 10 (8), 579–589.
- Siena, S; Sartore-Bianchi, A; Di Nicolantonio, F; Balfour, J; Bardelli, A **(2009)** Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 101 (19), 1308–1324.
- Steelman, L; Bertrand, F; McCubrey, J **(2004)** The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 8 (6), 537–550.
- Stein, R; Waterfield, M **(2000)** PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Molecular Medicine Today* 6 (9), 347–358.
- Steinke, V; Engel, C; Büttner, R; Schackert, H; Schmiegel, W; Propping, P **(2013)** Erblicher Darmkrebs ohne Polyposis: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), Lynch-Syndrom. *Dtsch. Ärzteblatt* 110, 32–39.
- Stoecklein, N; Klein, C **(2010)** Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International Journal of Cancer* 126 (3), 589–598.
- Tol, J; Koopman, M; Cats, A; Rodenburg, C; Creemers, G; Schrama, J et al. **(2009)** Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 360 (6), 563–572.
- Tejpar, S; Lenz, HJ ; Köhne, CH; Heinemann, V; Ciardiello, F; Esser, R et al. **(2014)** Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus

- FOLFOX4: New results from the OPUS study. *Journal of Clinical Oncology* 32 (3), Meeting Abstract: LBA444.
- Toyota, M; Ahuja, N; Ohe-Toyota, M; Herman, J; Bayling, S; Issa, J (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (15), 8681–8686.
- Turnbull, R; Kyle, K; Watson, F; Spratt, J (1967) Cancer of colon - influence of no-touch isolation technic on survival rates. *Annals of Surgery* 166 (3), 420 ff.
- van Cutsem, E; Köhne, C; Hitre, E; Zaluski, J; Chang Chien, C; Makhson, A (2009) Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 360 (14), 1408–1417.
- Vakiani, E; Manickam, J; Ronglai, S; Rileen, S; Zhaoshi Z (2012) Comparative Genomic Analysis of Primary Versus Metastatic Colorectal Carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 30 (24), 2956-2962.
- Vanhaesebroeck, B; Waterfield, M (1999) Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases. *Experimental Cell Research* 253 (1), 239–254.
- Velho, S; Oliveira, C; Suriano, G; Schwartz, S; Duval, A (2005) The prevalence of mutations in gastric and colon cancer. *European Journal of Cancer* 41 (11), 1649–1654.
- Vivanco, I; Sawyers, C (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2 (7), 489–501.
- Vogelstein, B; Fearon, E; Hamilton, S; Kern, S; Preisinger, A; Leppert, M et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 (9), 525–532.
- Vogt, P; Kang, S; Elsliger, M; Gymnopoulos, M (2007) Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends in Biochemical Sciences* 32 (7), 342–349.
- Watanabe, T; Kobunai, T; Yamamoto, Y; Matsuda, K; Ishihara, S; Nozawa linuma, H et al. (2011) Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 54 (9), 1170–1178.
- Weijzen, S; Velders, M; Kast, W (1999) Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras. *Leukemia* 13 (4), 502–513.
- Weitz, J; Knaebel, H; Buechler, M (2003) Sporadisches und hereditäres Karzinom von Kolon und Rektum. *Der Chirurg* 74 (8), 717–725.
- Weitz, J; Schalhorn, A; Kadmon, M; Buechler, M; Krempien, R (2010) Kolon- und Rektumkarzinom. In: Hiddemann, W und Bartram, C (Hg.): Die Onkologie, Bd. 2. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 848–897.
- Wellbrock, C; Karasarides, M; Marais, R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (11), 875–885.
- Wells, A (1999) EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (6), 637–643.
- Wittinghofer, A; Waldmann, H (2000) Ras - A molecular switch involved in tumor formation. *Angewandte Chemie-International Edition* 39 (23), 4193–4214.
- Yamada, K; Araki, M (2001) Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science* 114 (13), 2375–2382.

Yarden, Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 37, 3–8.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein (1990).....	4
Abb. 2: RAS-RAF-MAPK-Signalweg	14
Abb. 3: PI3K-AKT Signalweg	17
Abb. 4: <i>KRAS</i> Wildtyp im Tumorzentrum (links) und <i>KRAS</i> Wildtyp in der Invasionsfront (rechts)	33
Abb. 5: <i>KRAS</i> Mutation in der Lymphknotenmetastase (links) und <i>KRAS</i> Mutation in der Fernmetastase (rechts).....	33
Abb. 6: <i>KRAS</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren	34
Abb. 7: <i>KRAS</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.....	36
Abb. 8: <i>KRAS</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen.....	38
Abb. 9: <i>BRAF</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren	40
Abb. 10: <i>BRAF</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.....	41
Abb. 11: <i>BRAF</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen.....	42
Abb. 12: <i>PIK3CA</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren	43
Abb. 13: <i>PIK3CA</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.....	44
Abb. 14: <i>PIK3CA</i> Mutationsanalyse in Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen.....	46

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (2010)	7
Tabelle 2: Zusammenhang der UICC-Stadien mit der TNM- Klassifikation (2010).....	8
Tabelle 3: R-Klassifikation	8
Tabelle 4: 5-Jahres Überlebensrate der kolorektalen Karzinome.....	9
Tabelle 5: Verwendete Primer	25
Tabelle 6: PCR Ansatz	29
Tabelle 7: PCR Bedingungen für <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> & <i>PIK3CA</i>	29
Tabelle 8: Verwendete Primer für die Pyrosequenzierung	32
Tabelle 9: Untersuchungsergebnisse für Fall 1 und 2.....	37
Tabelle 10: Untersuchungsergebnisse der 10 Fälle.....	37
Tabelle 11: Untersuchungsergebnis Fall 1	41
Tabelle 12: Untersuchungsergebnis Fall 1	45
Tabelle 13: Untersuchungsergebnis Fall 1 - 6	45

Danksagung

Für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Pathologie der Heinrich-Heine Universität durchführen zu können, danke ich dem Direktor Herrn Prof. Dr. med. H. E. Gabbert.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. E. Baldus für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Seine fortwährende und hilfsbereite Betreuung war eine entscheidende Hilfe bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. K. L. Schäfer und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. N. H. Stoecklein für die stets hilfreiche Unterstützung und die guten Ratschläge.

Ein herzlicher Dank geht auch an die Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine Universität Frau Ingrid Büchmann, Frau Marianne Niermann-Kaiser und Frau Julia Lange für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die geduldige und kompetente Hilfestellung im Laboralltag.

Ganz besonders danke ich Herrn Giuseppe Cadeddu für die wertvolle Hilfe und die angenehme und entspannte Atmosphäre im Labor.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für ihre stetige Unterstützung auf meinem Lebensweg sowie ihre Liebe und Zuneigung.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Kilian Neubert, der mir während der Erstellung meiner Arbeit geduldig und motivierend zur Seite stand.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Aachen, den 02.12.2014

Dinah Hartleb