

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Michael von Bergwelt
ehem. Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Einfluss der mRNA-Expression der *EGFR*-Liganden Epiregulin (*EREG*)
und Amphiregulin (*AREG*) auf das Überleben von Patienten mit metasta-
siertem kolorektalen Karzinom unter 5-Fluoruracil/Leucovorin plus Irino-
tecan (FUFIRI) oder Irinotecan plus Oxaliplatin Erstlinientherapie (FIRE 1
– Studie).**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arndt Stahler

aus
Amberg/Deutschland

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Clemm
Prof. Dr. Dr. Fuat Oduncu
PD Dr. rer. nat. Anton Eberharter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dominik Paul Modest

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2018

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	3
<u>2. ZIELSETZUNG</u>	12
<u>3. STUDIENDESIGN UND METHODEN</u>	13
3.1. FIRE1-STUDIE	13
3.2. METHODEN.....	16
<u>3.2.1. Analyse des RAS- und PIK3CA-Status</u>	16
<u>3.2.2. Immunhistochemische Färbung des EGFR</u>	20
<u>3.2.3. mRNA-Expressionsanalyse von Amphi- und Epiregulin</u>	20
<u>3.2.4. Statistische Analyse</u>	23
<u>4. AUSWERTUNG</u>	24
4.1. ERGEBNISSE DER FIRE1-STUDIE	24
4.2. HÄUFIGKEITEN DER BIOMARKER	28
4.3. KORRELATION DER BIOMARKER MIT DEN ÜBERLEBENS DATEN DES FIRE1-SUBSETS	35
4.4. UNI- UND MULTIVARIATE REGRESSIONS ANALYSEN DER mRNA-EXPRESSION.....	43
<u>5. DISKUSSION</u>	50
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	58
<u>7. ANHANG</u>	59
7.1. MATERIAL	59
7.2. AUSFÜHR LICHE PROTOKOLLE.....	62
7.3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	67
<u>8. DANKSAGUNGEN</u>	71
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	72
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	84
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	86
<u>PUBLIKATION</u>	87

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist nach Angaben des Robert-Koch-Institutes eine der häufigsten Tumorerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland. Die Inzidenz im Jahr 2010 betrug insgesamt 62.420 Neudiagnosen (33.800 Männer und 28.620 Frauen).¹ Mehr als die Hälfte der kolorektalen Karzinome treten ab einem Alter von 70 Jahren auf. Ein besonders hohes Risiko für diese Erkrankung weisen übergewichtige Personen mit einer ballaststoffarmen Ernährung auf. Weitere Risikofaktoren sind eine genetische Prädisposition in der Familie, das Vorkommen von Dickdarmpolypen, das Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung sowie der regelmäßige Konsum von Nikotin und Alkohol.¹ Obwohl die Sterberaten in den letzten 10 Jahren bei beiden Geschlechtern um mehr als 20 % zurückgegangen sind, betrug die altersstandardisierte Mortalität im Jahr 2010 trotz präventiver Untersuchungen immer noch durchschnittlich 20 % bei beiden Geschlechtern.¹

Ätiologisch unterscheidet man zwei Gruppen des kolorektalen Karzinoms. Hereditäre Formen treten in 5 % der Fälle auf und kommen im Rahmen von Primärerkrankungen wie dem Hereditären Nicht-Polypösen Colorectalen Carcinom (HNPCC) und der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) vor. In etwa 95 % der Fälle treten sporadische Formen des Dickdarmkrebses auf.² Dieses entsteht maßgeblich aus bereits bestehenden gutartigen Dickdarmadenomen. Für eine bösartige (maligne) Entartung sind mehrere aufeinanderfolgende molekulargenetische Veränderungen der Adenomzellen notwendig.³ Risikofaktoren für die maligne Entartung eines Dickdarmadenoms sind

- die Größe des Adenoms,
- der histologisch identifizierbare Typ des Adenoms
- und der Grad der Dysplasie.⁴

Fehlende Frühsymptome erschweren die rechtzeitige Diagnose einer manifesten Erkrankung. Umso wichtiger ist die präventive Erkennung einer beginnenden Dysplasie. Der Haemoccult®-Test kann durch Untersuchung des Stuhls auf

verstecktes Blut erste Hinweise auf das Vorliegen einer Läsion geben.⁵ In der Koloskopie können bestehende Läsionen sofort entfernt und histologisch auf das Vorliegen einer Dysplasie untersucht werden.^{6, 7} Allerdings liegen bei Erstdiagnose in 20 % der Fälle bereits (synchrone) Metastasen vor, wohingegen etwa 25 % aller Tumore metachron metastasieren.⁸

Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK) hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten stark verändert. Ursprünglich wurde die Kombination aus dem Thymidylatsynthase-Inhibitor 5-Fluoruracil und Leucovorin in der Erst- und Zweitlinien-Therapie verabreicht, unter der bei niedriger Lebensqualität nur geringe Überlebenszeiten erreicht wurden.⁹⁻¹¹ Die Addition von Irinotecan zu 5-Fluoruracil und Leucovorin (FUFIRI) in der Erstlinientherapie verbesserte signifikant die Therapie-Ansprechraten und verlängerte sowohl das progressionsfreie wie auch das Gesamtüberleben um durchschnittlich 3 Monate.^{12, 13} Ein ähnlicher Effekt konnte bei zusätzlicher Gabe von Oxaliplatin zu 5-Fluoruracil und Leucovorin (FOLFOX) beobachtet werden.¹⁴ Der monoklonale chimäre Maus/Mensch-IgG2-Antikörper Cetuximab richtet sich gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*).¹⁵ Durch Bindung an die extrazelluläre Domäne inhibiert er kompetitiv die Aktivierung des Rezeptors durch Verdrängung seiner Liganden.¹⁶ Als Monotherapie und in Kombination mit konventioneller Chemotherapie konnte Cetuximab im Irinotecan-refraktären mKRK die Therapie-Ansprechraten, das progressionsfreie und das Gesamtüberleben weiterhin steigern.¹⁷⁻²⁰ Darüber hinaus zeigte sich eine Re-Sensitivierung gegenüber Irinotecan in refraktären Patienten.¹⁷ Nach aktuellem Konsensus der European Society of Medical Oncology (ESMO) sind mehrere Kriterien notwendig, um Patienten der richtigen Therapie zuzuführen. Ein vereinfachter Auszug dieses Konsensus ist im Nachfolgenden beschrieben.²¹

Ist der Patient in akzeptabler medizinischer Kondition, so sollten Therapieziele festgelegt werden:

- Im Falle resektabler Metastasen chirurgische Resektion +/- Chemotherapie
- Zur Zytoreduktion bei RAS Wildtyp Chemotherapie-Doublet und EGFR-Antikörper; bei RAS Mutation Chemotherapie-Doublet oder -Triplett und Bevacizumab, jeweils mit 2-monatiger Re-Evaluation
- Zur Krankheitskontrolle bei RAS Wildtyp Chemotherapie-Doublet und ein zugelassenes Biologikum (s. Tabelle 1); bei RAS Mutation Chemotherapie-Doublet und Bevacizumab, jeweils mit 2 – 3 -monatiger Re-Evaluation
 - o Bei progressiv fortschreitender Erkrankung sollten Zweitlinientherapie-Optionen erwogen werden, z.B. nicht genutzte Therapieschemata aus dem Bereich der Erstlinientherapie oder der Einsatz von Biologika (s. Tabelle 1)
 - o Bei Therapieerfolg sollten zur weiteren Zytoreduktion Therapieschemata beibehalten werden oder das Ziel der Krankheitskontrolle verfolgt werden.
 - o Bei Therapieerfolg sollten zur weiteren Krankheitskontrolle Therapieschemata beibehalten werden, oder es sollte eine Erhaltungstherapie mit geringerer Toxizität gewählt werden oder die Therapie sollte pausiert werden.

Ist der Patient unfit, aber bei besserer Kondition für obiges Schema möglicherweise geeignet, können Therapieansätze mit einem Fluoropyrimidin (5-Fluoruracil, Capecitabin) + Bevacizumab oder ein Chemotherapie-Doublet in reduzierter Dosierung oder ein EGFR-Antikörper erwogen werden. Bei Nicht-Eignung sollte eine supportive Therapie der Symptomatik erfolgen.

Ergänzend werden in nachfolgender Tabelle noch weitere, derzeit gängige medikamentöse Behandlungsansätze für das metastasierte kolorektale Karzinom aufgeführt.

Weitere Optionen in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (basierend auf Leitlinien der AWMF und ESMO)			
Schema	Eigenschaften	Indikation ^{2, 22}	Studien
FOLFOXIRI	Zytostatika (5-Fluoruracil, Folinsäure, Oxaliplatin, Irinotecan)	Remissionsinduktion, sek. Lebermetastasen-Resektion	Falcone et al., 2007 ²³ ; TRIBE [Souglakos et al., 2006 ²⁴ ; Cremolini et al., 2015 ²⁵]
Bevacizumab	humaner VEGF-R Antikörper	Erst- und Zweitlinientherapie in Kombination mit fluorpyrimidin-haltiger Chemotherapie	Hurwitz et al., 2009 ²⁶ ; AGITG-MAX [Price et al., 2011 ²⁷ ; 2015 ²⁸]
Panitumumab	humaner EGF-R Antikörper	KRAS-Wildtyp-Tumore in Erst- und Zweitlinientherapie	PRIME [Douillard et al., 2010 ²⁹ ; 2013 ³⁰ ; 2014 ³¹]; Peeters et al., 2010 ³² ; 2014 ³³
Aflibercept	Anti-VEGF-R-Fusionsprotein	Zweitlinientherapie in Kombination mit Chemotherapie	VELOUR [Van Cutsem et al., 2012 ³⁴ ; 2015 ³⁵ ; Tabernero et al., 2014 ³⁶] AFFIRM [Folprecht et al., 2016 ³⁷]
Regorafenib	Tyrosinkinase-Inhibitor	Drittlinientherapie nach Versagen konventioneller Chemotherapie-Schemata	CORRECT [Grothey et al., 2013 ³⁸ ; Tabernero et al. 2015 ³⁹] CONCUR [Li et al., 2015 ⁴⁰] Schultheis et al., 2013 ⁴¹
Pembrolizumab	PD1-Inhibitor	Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	Le et al., 2015 ⁴²
Ramucirumab	Anti-VEGF-R2-Tyrosinkinase-Inhibitor	Zweitlinientherapie in Kombination mit Chemotherapie	RAISE [Tabernero et al., 2015 ⁴³ ; Obermannová et al., 2016 ⁴⁴]
Trastuzumab / Lapatinib	humaner HER2-Antikörper / Tyrosinkinase-Inhibitor	HER2-positive KRAS-Wildtyp-Tumore in Zweitlinientherapie	HERACLES [Sartore-Bianchi et al., 2016 ⁴⁵]
Lonsurf (TAS102)	Zytostatika (Trifluridin, Tipiracil)	Drittlinientherapie nach Versagen konventioneller Chemotherapie-Schemata, VEGF- und EGFR-Antikörper	RECOURSE [Mayer et al., 2015 ⁴⁶]

Tabelle 1: Weitere Optionen in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (basierend auf Leitlinien der AWMF und ESMO).

Epidermal Growth Factor Receptor und Signaltransduktion

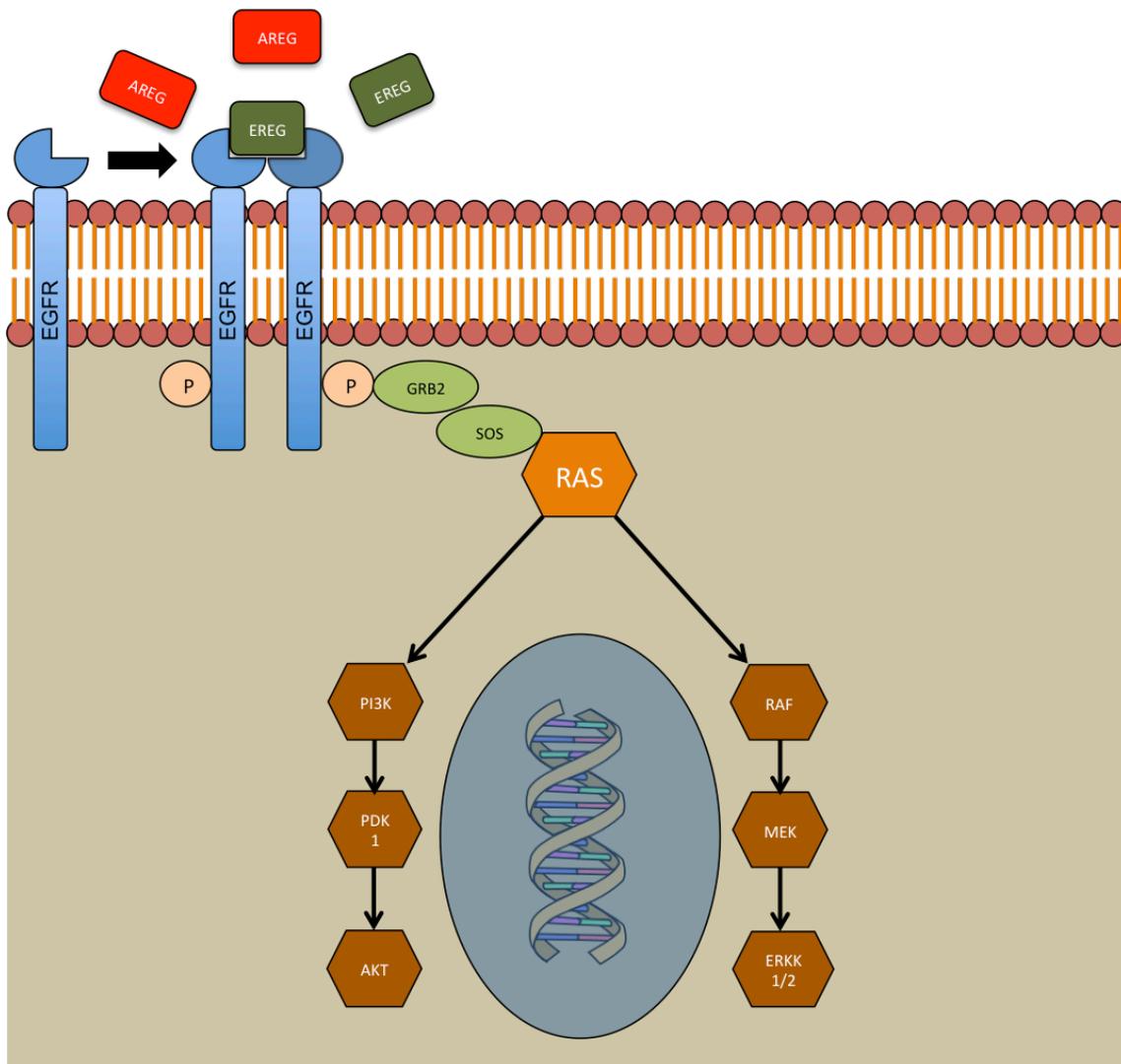


Abbildung 1: Vereinfachte Signaltransduktion des Epidermal Growth Factor Receptor – Signalwegs.

Der Epidermal Growth Factor Receptor gehört neben *HER2*, *HER3* und *HER4* zur Familie der *HER*-Proteine. Zwischen 60 und 85 % aller Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom weisen eine Expression von *EGFR* auf.⁴⁷⁻⁵⁰ Der *EGFR* besitzt eine Tyrosinkinase-Aktivität. Sofern keine Liganden gebunden sind, liegt er als Monomer in der Zellmembran vor. Das Binden von passenden Liganden führt zunächst zur Dimerisierung des Rezeptors. Dies ermöglicht eine Autophosphorylierung durch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Dadurch ist der *EGFR* wiederum in der Lage, weitere Proteine zu phosphorylieren. Ziel der Phosphorylierung durch den *EGFR* sind unter anderem *RAS* (Rat Sarcoma) – Proteine. Nach ihrer Aktivierung binden sie GTP und können über Phosphorylierung weitere Proteine der Zelle aktivieren. Darunter zählen zum Einen *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) sowie *MAPK* (Mitogen Activated Protein Kinase), zum Anderen die *PI3K* (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) und *AKT* (AKR mouse Thymoma inducing).⁵¹⁻⁶⁰

Als Liganden konnten bisher neben dem Epidermal Growth Factor (*EGF*) der Transforming Growth Factor α (*TGF α*), Amphiregulin (*AREG*), Epiregulin (*EREG*), Betacellulin (*BTC*), Heparin-binding EGF-like Growth Factor (*HB-EGF*), Neuregulin (*NRG*), Tomoregulin, Cripto-1 (*CR-1*) und Criptin nachgewiesen werden.^{53, 61} Amphiregulin und Epiregulin sind einkettige Polypeptide.^{61, 62} Während *AREG* ausschließlich an den Epidermal Growth Factor Receptor bindet,^{63, 64} kann *EREG* sowohl *EGFR* als auch *HER4* aktivieren.⁶¹ Im Rahmen von Zellkulturmodellen konnte beiden Liganden eine bifunktionale Wachstumsmodulation nachgewiesen werden.^{61, 63-65} Der stimulierende bzw. inhibitorische Effekt hing ab von den experimentellen Bedingungen und der beobachteten Zellart.

Biomarker in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Obwohl der Einsatz monoklonaler Antikörper das Überleben der Patienten deutlich verbessert hat, profitierten zunächst nur etwa 60 % von einer Therapie mit Cetuximab.⁶⁶ Um die Therapie zu individualisieren und für jeden Patienten zu optimieren, mussten Biomarker identifiziert werden, die ein Therapieansprechen vorhersagen können. Prädiktive Biomarker sagen die Effektivität einer speziellen Therapie voraus. Prognostische Biomarker lassen eine Aussage über das Überleben der Patienten unabhängig von der Therapie zu. Hinsichtlich der anti-*EGFR*-Therapie wurden Mutationen im Exon 2 des *KRAS*-Gens als negative prädiktive Biomarker für eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab identifiziert.^{29, 67-69} Diese Mutationen treten in circa 35 – 40 % aller Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom auf.⁶⁶ Eine *KRAS*-Mutation bewirkt eine kontinuierliche Aktivierung der Signaltransduktion durch Blockade der GTPase. Somit werden unter Umgehung des Epidermal Growth Factor Receptors Proliferation, aggressiveres Wachstum, Neovaskularisation und Metastasierung gefördert sowie die Apoptose inhibiert.^{3, 70} Kürzlich wurde die Analyse von *RAS*-Mutationen ausgeweitet auf *KRAS* Exon 3 und 4 sowie *NRAS* Exon 2 bis 4. Seit 2013 ist damit der *RAS*-Wildtyp-Status in kolorektalen Tumoren Voraussetzung für eine anti-*EGFR*-Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Der Ausschluss von *RAS*-mutierten Tumoren aus dieser Therapieart steigerte das mediane Gesamtüberleben der neuen Zielpopulation in Erstlinienstudien auf über 30 Monate.^{30, 71-73}

Die *EGFR*-Liganden Amphiregulin und Epiregulin wurden erstmals von Khambata-Ford et al. innerhalb eines Micro-Arrays als Biomarker in der Zweit- und Drittlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit Cetuximab untersucht. Hierbei zeigte sich vor allem in *KRAS* Wildtyp Tumoren eine größere Krankheitskontrollrate mit einem günstigeren progressionsfreien Überleben.⁷⁴ Jacobs et al. untersuchten retrospektiv in 220 Irinotecan-refraktäre Patienten unter Cetuximab-Monotherapie aus mehreren Studien (EVEREST, BOND, SALVAGE, BABEL) die Expression von Amphiregulin und Epiregulin mithilfe der

RTqPCR und konnte diesen Effekt bestätigen.⁷⁵ Neuere Studien mit kleineren Patientenzahlen wiesen ähnliche Ergebnisse auf.⁷⁶⁻⁷⁸ Dennoch wurde ebenfalls ein negativ-prädiktiver Effekt beschrieben. In einer immunhistochemischen Analyse der Gewebe-Expression und in einer serologischen Untersuchung durch einen ELISA-Test zeigte sich eine Korrelation hoher Amphiregulin- und Epiregulin-Expression mit einem aggressiveren Tumorwachstum.⁷⁹ Weiterhin konnte in einer Untersuchung des metastasierten kolorektalen Karzinoms ausschließlich in *KRAS*-Wildtyp-Primärtumoren ein günstiger Effekt einer niedrigen *EREG*-Expression nachgewiesen werden.⁸⁰ Darüber hinaus ist es zwei kleineren Studien gelungen, retrospektiv die Expression von Amphiregulin und Epiregulin zur Vorhersage von Lebermetastasen zu benutzen.^{81, 82}

Insgesamt ist die Aussagekraft über die Rolle von Amphiregulin und Epiregulin als prädiktive bzw. prognostische Biomarker bislang eingeschränkt. Drei Studien, die sich auf refraktäre Patienten konzentrierten, wiesen einen Kontrollarm ohne Therapie mit monoklonalen Antikörpern auf. So wurde der prädiktive Effekt einer Ligandenexpression (*AREG* und *EREG*) für eine anti-*EGFR*-Therapie zum einen in einer Studie untersucht, die Panitumumab und Irinotecan mit Irinotecan alleine verglich.⁸³ Zum Anderen zeigte sich der günstige Effekt einer hohen *EREG*-Expression in Patienten, die Cetuximab und eine supportive Therapie erhalten hatten gegenüber Patienten, die ausschließlich supportive Therapie erhielten.⁷⁶ Die bisher umfangreichste Untersuchung des PICCOLO-Kollektivs umfasste 323 Patienten mit fortgeschrittenem, nicht metastasierten kolorektalen Karzinom (Irinotecan vs. Irinotecan + Panitumumab). Hier konnte eine hohe *AREG* und *EREG*-Expression mit einem günstigen prädiktiven Effekt auf eine Therapie mit Panitumumab in *RAS*-Wildtyp-Patienten assoziiert werden.⁸⁴

Die meisten Studien hingegen untersuchten die Expression von Amphiregulin und Epiregulin ausschließlich in Kollektiven, welche eine Therapie mit Cetuximab erhalten hatten.^{75, 77, 78} Somit lässt sich bislang keine Aussage über den möglichen prognostischen Wert einer vermehrten Ligandenexpression nachweisen, da ein rein auf Chemotherapie basierendes Kollektiv bislang fehlte.

Aufgrund dieser unzureichenden Datenlage sind weitere Untersuchungen notwendig, um den prognostischen Wert von Amphiregulin und Epiregulin ermitteln zu können.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Analyse war es, den prognostischen Effekt der *EGFR*-Ligandenexpression von Amphiregulin und Epiregulin in Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom zu untersuchen, die möglichst nicht mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab behandelt wurden. Dazu sollten Schwellenwerte (Cut-Offs) definiert werden, die eine Aussage über die Prävalenz der hohen Expression zulassen sollten. Zudem sollten diese Schwellenwerte eine statistische Grundlage zur objektiven Dichotomisierung der Expression darstellen. Dafür wurde retrospektiv das Kollektiv der randomisierten Phase III – Studie FIRE1 molekulargenetisch analysiert. Hier erhielten die Patienten die Kombination aus 5-Fluoruracil, Leucovorin und Irinotecan (FUFIRI) oder ein modifiziertes Protokoll aus Irinotecan und Oxaliplatin (mlrOx) in der Erstlinientherapie.

Folgende Faktoren wurden untersucht, um die Fragestellung zu klären:

- Die Expression der *EGFR* – Liganden Amphiregulin und Epiregulin mithilfe der Real-Time Quantification PCR (RTqPCR)
- Der *RAS*- und *PIK3CA*-Mutationsstatus mithilfe der Pyrosequenzierung zum Ausschluss potentieller Signalweg-bezogenen Interaktionen
- Die *EGFR*-Expression mit einer immunhistochemischen Färbung unter Adaption eines bereits bestehenden Bewertungs-Scores

3. Studiendesign und Methoden

3.1. FIRE1-Studie

Alle in diesem Kapitel gemachten Angaben beziehen sich auf die zur Studie gehörigen Artikel von Fischer von Weikersthal et al. sowie Stahler et al.^{85, 86}

Studiendesign

FIRE1 ist eine multizentrische, abgeschlossene, zweiarmige, randomisierte klinische Phase III-Studie. Sie verglich die Kombinationstherapien Irinotecan plus 5-Fluoruracil / Folinsäure (FUFIRI) und Irinotecan plus Oxaliplatin (mlrOx) in der Erstlinientherapie. Insgesamt waren 48 Zentren in Deutschland an ihrer Durchführung beteiligt. Patienten im FUFIRI-Arm erhielten eine wöchentliche i.v. - Chemotherapie mit 2000 mg/m² 5-Fluoruracil als 24-stündige Infusion, anschließend 500 mg/m² Folinsäure i.v. innerhalb 120 Minuten. Patienten im mlrOx-Arm erhielten eine wöchentliche Chemotherapie mit 85 mg/m² Oxaliplatin innerhalb von 120 Minuten an den Tagen 15 und 29. Beide Gruppen erhielten Irinotecan initial als eine dreißig minütige Infusion mit 80 mg/m². Der Therapiezyklus wiederholte sich alle 49 Tage.

Als Zweitlinientherapie wurde crossover treatment (Wechsel zum jeweils anderen Therapieschema) empfohlen.

Patienten

Die Ein- und Ausschlusskriterien der FIRE1-Studie sind tabellarisch aufgeführt (Tabelle 2).

Ein- und Ausschlusskriterien der FIRE1- Studie	
Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Patienten zwischen 18 und 75 Jahren	Sympt. Peritonealkarzinose
Histologisch nachgewiesenes metastasierendes Kolon- oder Rektum-Ca	Hirnmetastasen
Frühere adjuvante Therapie, wenn behandlungsfreies Intervall > 6 Monate und keine vorherige Behandlung mit Topoisomerase I – Inhibitoren oder Platinderivaten	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
Karnofsky-Index > 70 %	Darmobstruktion
Vertretbare Leber- und Knochenmark-Werte	5-Fluoruracil- oder Folinsäure-Intoleranz
Zweidimensional messbare Tumorkläsionen	weitere bösartige Erkrankungen außer einem in-situ-Karzinom der Cervix uteri und einem Basalzellkarzinom
Verfügbares Tumormaterial	bekanntes Gilbert-Syndrom
	Anwendung antineoplastischer Medikamente
	Schwangerschaft und/oder Stillzeit
	Strahlentherapie innerhalb 6 Wochen vor Studieneintritt

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der FIRE1-Studie.

Von jedem Patienten wurde eine schriftliche Einwilligungserklärung eingeholt. Von allen Patienten wurden demographische, pathologische und klinische Daten erhoben und dokumentiert. Für die Dauer der Behandlung und des Follow-Ups fand eine kontinuierliche Überwachung statt. Die FIRE1-Studie wurde nach der Declaration of Helsinki (1996) durchgeführt. Eine Bewilligung der retrospektiv durchgeführten Analyse erfolgte durch die lokale Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München (registry-Nr.: 545-11).

Von 208 (43.4 %) der insgesamt 479 Patienten war Tumormaterial in Form eines Gewebblocks vorhanden. Diese verteilen sich etwa gleichmäßig auf die Arme FUFIRI (n = 108, 51.9 %) und mlrOx (n = 100, 48.1 %).

Alle 208 Patienten konnten hinsichtlich *RAS*- und *PIK3CA*-Status sowie *EGFR*-Expression analysiert werden. 192 Studienteilnehmer wiesen eine messbare

mRNA-Expression auf. Von 16 Tumoren konnte aufgrund unzureichenden Tumorgewebes keine RNA extrahiert werden.

Endpunkte

Der primäre Endpunkt der Originalstudie war der Vergleich des progressionsfreien Überlebens (progression free survival, PFS) einer Therapie mit FUFIRI gegenüber einer modifizierten IrOx-Therapie (mIrOx). Sekundäre Endpunkte waren response rate, Gesamtüberleben (overall survival, OS), Resektion von Lebermetastasen und Therapietoxizität. Zur Ermittlung des progressionsfreien Überlebens, Gesamtüberlebens und der Effektivität der Zweitlinientherapie wurden Patienten im Intervall von 3 Monaten erneut untersucht. Das PFS war definiert als Intervall zwischen der Randomisierung und erster Dokumentation einer Progression bzw. des Todes. Das OS wurde berechnet als Zeitspanne zwischen Randomisierung und einem eingetretenen Todesfall, ungeachtet des Grundes. Sowohl PFS als auch OS wurden immer als Mediane angegeben. Die letzte Zensierung lebender Patienten fand beim letzten Patientenkontakt statt. Die letzte Aktualisierung des Gesamtüberlebens wurde 2012 durchgeführt.⁸⁷

3.2. Methoden

3.2.1. Analyse des *RAS*- und *PIK3CA*-Status

DNA-Isolation

Von den Patienten lag Tumormaterial in Form eines Formalin Fixierten Paraffin Eingebetteten (FFPE) Gewebeblocks vor. Mit einem Mikrotom wurden Leerschnitte mit einer Dicke von etwa 10 µm abgetrennt und auf einem Objektträger fixiert. Von jedem Patienten wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung angefertigt. Von den übrigen Leerschnitten wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Xylol-, später 100 prozentigen Ethanol-Reihe rehydriert und das Paraffin entfernt.

Nach Lufttrocknung der Schnitte fand unter mikroskopischer Betrachtung eine Makrodissektion von Tumorzellen mithilfe von sterilen Skalpelln statt. Hierfür

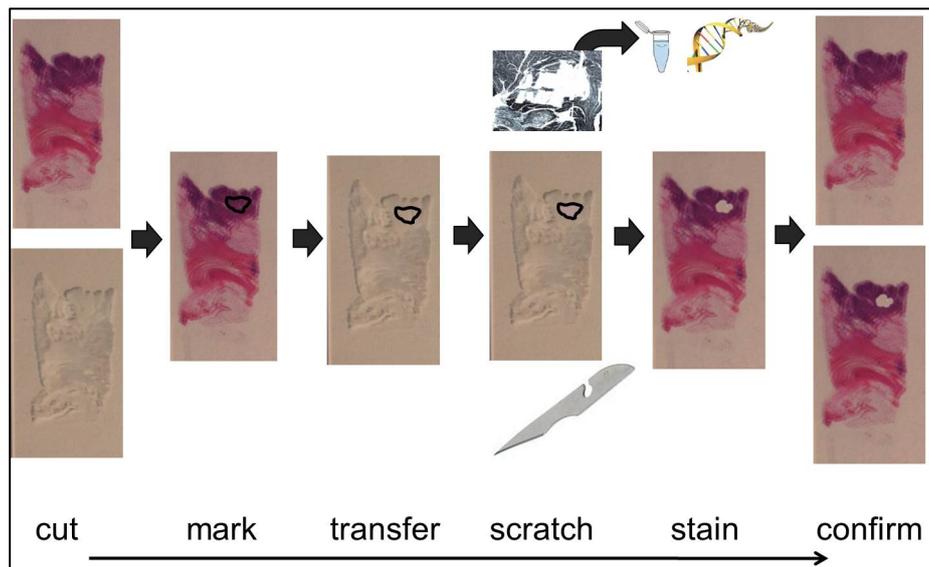


Abbildung 2: Workflow der Nukleinsäuren-Extraktion aus FFPE-Gewebe.

diente die HE-Färbung als Blaupause, um die Tumorareale erkenntlich zu machen und auf die übrigen Leerschnitte zu übertragen.

Die abgetrennten Zellen wurden gemäß des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits in eine Pufferlösung überführt. Anschließend fand die Isolation der DNA nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden bei 56 Grad Celsius und anschließender Denaturierung bei 90 Grad Celsius für zehn Minuten protokollgemäß unter Zuhilfenahme des Isolierroboters QIAcube statt. Dabei wird die DNA an die Silikatmembran der mitgelieferten Säulen gebunden. Daraufhin erfolgt die Reinigung durch das Waschen mit Puffern und anschließendes Abzentrifugieren. Das genaue Protokoll findet sich im Anhang dieser Dissertation. Die reine DNA war daraufhin über mehrere Monate bei -20 Grad Celsius haltbar.

DNA-Amplifikation

Um Mutationen nachweisen zu können, wurde die DNA mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase-Chain-Reaction, kurz PCR) amplifiziert. Dafür waren zunächst Primer notwendig. Primer sind kurze Nukleotidsequenzen, welche komplementär zu den benachbarten Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts waren.⁸⁸ Das Schlüsselenzym der PCR stellt die sogenannte Taq-Polymerase dar. Es handelt sich dabei um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die am 3'-Ende des jeweiligen Primers ansetzt. Daraufhin werden in 5'-3'-Richtung zum Gegenstrang komplementäre Desoxyribonukleotide (dNTPs), Bausteine der DNA, eingebaut. Als Besonderheit zur menschlichen DNA-Polymerase stammte die Taq-Polymerase vom Bakterium *Thermus aquaticus*. Dadurch war auch das Enzym sehr hitzebeständig.⁸⁹ Als Basis für die PCR wurde das HotStarTaq DNA Polymerase Kit (1000 U) (QiaGen) benutzt. Die Forward- und Reward-Primer der (Biomers) besaßen eine Ausgangskonzentration von 100 pmol / µl und wurden auf eine Endkonzentration von 20 µM verdünnt. In der Denaturierung wurde die DNA auf 95°C erhitzt, damit sich die Doppelstränge voneinander trennen. Bei einer Annealing Temperatur von 60 Grad Celsius wurden 50 Zyklen durchlaufen. Nach Beendigung des letzten Zyklus kühlte der

MasterCycler auf 4°C herunter. Bei 2 – 8°C waren die PCR-Produkte mehrere Wochen lang haltbar. In der abschließenden Elongation bei 72 Grad Celsius fand die Verlängerung des gewünschten DNA-Abschnitts ausgehend von den angelagerten Primern statt. Das ausführliche Protokoll und die Primersequenzen finden sich im Anhang dieser Dissertation.

Pyrosequenzierung

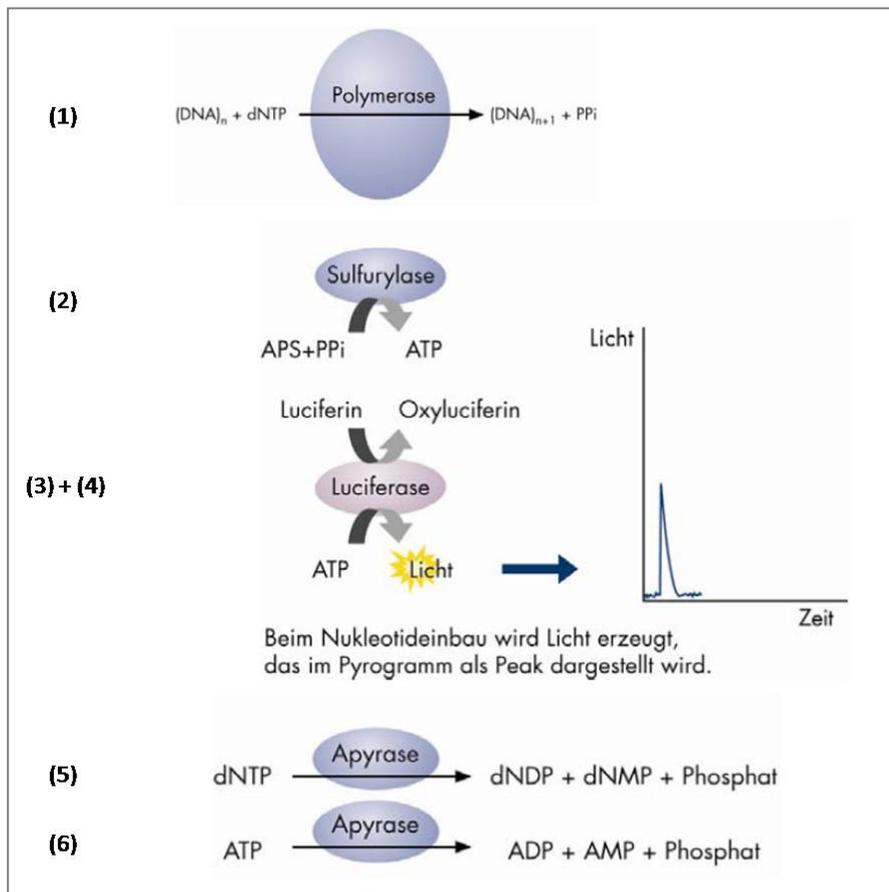


Abbildung 3: Prinzip der Pyrosequenzierung. Modifiziert nach Pyromark Q24® Handbuch (Qiagen).

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um eine DNA-Sequenzierungstechnik, welche auf der Detektion von freiwerdendem Pyrophosphat während der DNA-Synthese beruht. In einer enzymatischen Reaktionskaskade entsteht Licht, das proportional zur Anzahl der eingefügten Nukleotide ist.

In einem System zur Pyrosequenzierung sind eine DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase enthalten. Als Substrate für diese Enzyme fungieren die amplifizierte DNA mit einem angelagerten Sequenzierungsprimer,

Adenosinphosphosulfat und D-Luciferin. Zusätzlich werden Desoxyribonukleotide benötigt.

In einem ersten Schritt lagert die DNA-Polymerase komplementär zum Gegenstrang das passende Nukleotid an das 3'-Ende des Primers. Hierbei wird der DNA-Strang also um ein Nukleotid verlängert und Pyrophosphat (PPi) wird abgespalten (1). Das anorganische Pyrophosphat (PPi) dient daraufhin als Substrat für die ATP-Sulfurylase, die ATP herstellt (2).

In den nächsten beiden Schritten wird Licht bei der Umsetzung von Luciferin freigesetzt, sofern das richtige Nukleotid eingebaut wurde (3)(4). Die Apyrase sorgt dafür, dass nicht passende Nukleotide und ATP zwischen den einzelnen Reaktionen abgebaut werden (5)(6). (Abbildung 3)

Zusätzlich wurden für die Analyse Streptavidin-beschichtete, magnetische Beads verwendet. Die Streptavidin-Beschichtung ermöglicht eine Bindung an das biotinylierte Ende der PCR-Produkte. Dadurch wird DNA immobilisiert und der Pyrosequenzierung zugänglich gemacht.^{90, 91}

Zu Beginn wurde ein Master-Mix erstellt, welcher den Binding Buffer von QiaGen, destilliertes, HPLC-gereinigtes Wasser sowie Streptavidin-beschichtete Beads enthielt. Der Binding Buffer verbesserte hierbei die Bindung der PCR-Produkte an die Beads. Jeweils 65 µl dieses Mixes wurde in jedes well einer 24-well-PCR-Platte pipettiert.

Zu diesem Mix wurde jeweils 15 µl PCR-Produkt hinzugegeben. Die PCR-Platte wurde daraufhin für 5 Minuten bei moderater Stärke gerüttelt, um eine ideale Bindung von PCR-Produkt und Beads zu begünstigen. Dieser Schritt wirkte einer verfrühten Sedimentation entgegen. In diesem Zeitraum wurde der Sequenzierungs-Primer mit Annealing Buffer angesetzt und daraufhin noch einmal mit diesem verdünnt. Der Annealing Buffer dient dem Zweck, die Bindung von Sequenzierungs-Primer an PCR-Produkt zu verbessern. Es wurden jeweils 25 µl verdünnte Primer-Lösung auf eine flache Platte der Firma QiaGen pipettiert. Mithilfe eines Kompressors und einer Saugnadel-Vorrichtung wurde zunächst zweifach destilliertes Wasser angesogen, daraufhin der Master-Mix mit den Beads, welche sich nun an die Nadelköpfe anlagerten. Diese Beads wurden nun schrittweise für

5 Sekunden in Ethanol 70 %, für 5 Sekunden in Denaturation Solution und für 10 Sekunden in Waschpuffer überführt. Die Denaturation Solution sorgt dafür, dass sich der Doppelstrang des PCR-Produktes trennt und ein DNA-Einzelstrang übrig bleibt. Der Waschpuffer wäscht die Einzelstränge. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die Beads auf die Platte mit der verdünnten Sequenzierungsprimer-Lösung überführt. Der Annealing-Schritt von Sequenzierungsprimer an Beads erfolgte durch Erhitzen der Platte auf 80°C für 2 Minuten. Daraufhin kühlte die Platte 5 Minuten ab. In dieser Zeit wurde die sog. Cartridge, eine Dispensationseinheit mit mehreren Kammern, nach vorheriger Spülung mit zweifach destilliertem Wasser mit den Reagenzien des PyroMark Gold Q24 Kits befüllt. Dieses Kit umfasst eine Enzymlösung, eine Substratlösung, sowie die Nukleotide A, C, G und T. Anstelle von Desoxyadenosintriphosphat wurde jedoch Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat verwendet, um die Funktionsweise der Luciferase nicht zu beeinträchtigen. Sobald die mit Sequenzierungsprimer und PCR-Produkt beladene Platte abgekühlt war, wurde sie zusammen mit der Cartridge in den PyroMark Q24 Pyrosequencer überführt.

Dieser analysierte die Sequenz des Einzelstrangs nach oben genanntem Prinzip. Als Negativkontrolle wurde stets Wasser verwendet.

3.2.2. Immunhistochemische Färbung des *EGFR*

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein vorverdünnter monoklonaler Maus-Antikörper-Klon (3C6) von Ventana Medical Systems (Tucson, Arizona, USA) verwendet.

Die Färbung fand vollautomatisiert unter Verwendung eines Ventana BenchMark XT Autostainers mithilfe des XT Ultra View Diaminobenzidine Kits statt. Die Auswertung erfolgte an einem normalen Lichtmikroskop.

3.2.3. mRNA-Expressionsanalyse von Amphi- und Epiregulin

RNA-Isolation

Nach der Entparaffinierung in einer Xylol-Ethanol-Reihe und anschließender Lufttrocknung fand eine Markierung des Tumoreals mit anschließender Dissektion unter dem Mikroskop statt. Die Zellen wurden gemäß des RNeasy FFPE Tissue Kits in eine Pufferlösung überführt und für 15 Minuten bei 55 Grad Celsius, danach weitere 15 Minuten bei 80 Grad Celsius inkubiert. Anschließend fand die Isolation der RNA unter Zuhilfenahme des Isolierroboters QIAcube statt. Dabei wurde die RNA an die Silikatmembran der mitgelieferten Säulen gebunden. Daraufhin erfolgt die Reinigung durch das Waschen mit Puffern und anschließendes Abzentrifugieren. Das genaue Protokoll findet sich im Anhang dieser Dissertation. Die reine RNA war daraufhin über mehrere Monate bei -80 Grad Celsius haltbar. Optional konnten die gekratzten Leerschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt werden, um zu bestätigen, dass die Tumoreale entfernt wurden.

Um auch kleinste Reste genomischer DNA aus der isolierten RNA zu entfernen, wurde diese anschließend noch einmal mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit in Verbindung mit dem RNase-free DNase Set von QiaGen aufgereinigt. Eine DNase löste dabei die DNA auf. Danach fanden mehrere Reinigungs- und Zentrifugationsschritte statt.

Für die Vermessung der RNA wurde das Spektrophotometer NanoDrop 1000 (Fa. Thermo Scientific) mit einem Messbereich zwischen 220 und 750 nm unter Verwendung von 1 µl isolierter RNA benutzt. Die dazugehörige Software konnte damit die Konzentration der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren angeben. Die Initialisierung des Geräts fand durch Messung von 1 µl RNase-freiem Wasser statt, welches auch zur Messung des Leerwerts benutzt wurde.

Um die RNA quantifizieren zu können, wurde eine cDNA-Kopie mit einer Reversen Transcriptase angefertigt.⁹² In diesem Fall wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas benutzt. Für eine angemessene Vergleichbarkeit zwischen allen Patienten wurden unabhängig von der Isolationsmenge an RNA jeweils nur 150 ng umgeschrieben.

Herstellung einer Positiv-Kontrolle für cDNA-Quantifizierung

Zur Qualitätssicherung aller Messungen wurde für jedes zu messende Gen eine eigene Positivkontrolle von 5×10^4 cDNA-Molekülen / μl angefertigt. Dadurch konnte der spezifische Crossing point (C_P) – Wert ermittelt werden. Die Positivkontrolle wurde jeder Messung hinzugefügt unter Beachtung des gleichbleibenden C_P -Werts.

Nach Amplifikation einer cDNA in einer PCR-Reaktion fand die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit von QiaGen statt. Anschließend wurde die copy number (Anzahl der amplifizierten DNA-Stücke) nach Quantifizierung am Nanodrop 1000 mit nachfolgender Formel ermittelt:

$$\text{conc}_{\#} \left[\frac{\#}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{conc} [\text{ng}/\mu\text{l}]}{\text{length} [\text{bp}]} \times 9.12576 \times 10^{11}$$

$$\text{copy number} = \frac{\text{conc}_{\#} \times 6.023 \times 10^{23} \times 10^{-9}}{\text{length} \times 660} \left[\frac{\text{g} \times \# \times \text{mol} \times \text{bp}}{\mu\text{l} \times \text{mol} \times \text{bp} \times \text{g}} \right]$$

Daraufhin wurde das Probenvolumen für 5×10^{10} Moleküle / μl berechnet:

$$\text{Vol} [\mu\text{l}] = 5 \times 10^{10} / \text{copy number}$$

Für die Minimierung von Pipettierfehlern wurde die zehnfache Menge an Probenvolumen hergestellt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 μl eingestellt. Zur besseren Darstellung auf der nachfolgenden Messung am LightCycler von Roche wurde die Molekülzahl pro μl auf 5×10^4 Moleküle / μl verdünnt.

cDNA-Quantifizierung mittels RT-qPCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde der LightCycler 480 von Roche benutzt. Dieser erfasst eine PCR-Reaktion in Echtzeit mithilfe fluoreszenzmarkierter, humane Oligonukleotid-Probes (RTqPCR). Probes sind spezifische Oligonukleotid-Sequenzen, die zu einem Teil mit einem Fluorophor-Donor, zum anderen Teil mit einem Fluorophor-Akzeptor gekennzeichnet sind. Zunächst wurde für jedes Gen ein Mastermix für die Amplifikation der jeweiligen cDNA-Proben angefertigt. Dieser bestand aus dem Roche ProbeMaster, den jeweiligen Primern und ihren Probes. Jeweils 8 µl dieses Mastermixes wurden mit 2 µl der jeweiligen zu messenden cDNA in die Wells einer gekühlten Multiwell-Platte pipettiert. Um einer möglichen Evaporation vorzubeugen, wurden die Multiwell-Platten mit Folie versiegelt. Daraufhin wurden sie im Lightcycler vermessen. Die Ergebnisse wurden als Crossing point (Cp) -Werte ausgegeben. Der Cp-Wert ist definiert als Zeitpunkt, an dem die gemessene Fluoreszenz durch die entstandenen PCR-Produkte höher ist als die Hintergrund-Fluoreszenz.

Die Expression der Zielgene *AREG* und *EREG* wurde mit *b-Actin* als Referenzgen verglichen.

3.2.4. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde SPSS PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) und SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) benutzt.

Gesamtüberleben (overall survival, OS) und progressionsfreies Überleben (progression free survival, PFS) wurden nach den molekularen Biomarkern stratifiziert und mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Als Signifikanztest für Unterschiede wurden Log-Rank-Tests und Cox-Regressionsanalysen verwendet. Univariate Cox-Regressionsanalysen wurden in Subgruppen stratifiziert nach Biomarkern durchgeführt. Zusätzlich fand eine multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Backward elimination Algorithmus statt.

4. Auswertung

4.1. Ergebnisse der FIRE1-Studie

Patienten

In einem Zeitraum der Jahre 2000 bis 2004 wurden insgesamt 495 Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom aus 48 deutschen Studienzentren akquiriert. Von diesen gelangten 479 Patienten in die Intention-to-treat-Analyse. Die Patienten wurden randomisiert auf die beiden Behandlungsarme 5-Fluoruracil + Irinotecan (FUFIRI) sowie Oxaliplatin + Irinotecan (mlrOx) verteilt (n[FUFIRI] = 238, n[mlrOx] = 241).⁸⁵ 2012 fand eine Aktualisierung der Überlebensdaten statt.⁸⁷ Basierend auf diesem Kollektiv wurden für diese Dissertation verfügbare Tumorproben von 208 Patienten analysiert. Die Stratifizierung sowie die Charakteristika von Patienten und Tumoren in den Subpopulationen erwiesen sich in beiden Behandlungsgruppen als ausgeglichen (Tabelle 3).⁸⁶

Baseline Charakteristika der Subpopulationen der FIRE1-Studie.⁸⁶		
Parameter	FUFIRI Subpopulation (n = 108)	mlROX Subpopulation (n = 100)
Alter, median (Spannweite) (Jahre)	62.9 (42 – 75)	63.2 (25 – 76)
Geschlecht, Zahl (%)		
weiblich	38 (35.2)	32 (32.0)
männlich	70 (64.8)	68 (68.0)
Karnofsky Index, Zahl (%)		
100	47 (44.0)	48 (48.0)
90 - 70	61 (56.0)	52 (52.0)
Lokalisation Primärtumor, Zahl (%)		
Colon	64 (59.3)	63 (63.0)
Rektum	44 (40.7)	37 (37.0)

4. Auswertung

Metastasierung, Zahl (%)		
Leber	89 (82.4)	80 (80.0)
Lunge	30 (27.8)	24 (24.0)
Lymphknoten	23 (21.3)	19 (19.0)
Metas. Organbefall, Zahl (%)		
1	64 (60.0)	61 (61.0)
≥ 2	43 (39.0)	37 (37.0)
NA	1 (1.0)	2 (2.0)
Overall Response Rate %	46	38
Medianes PFS (Monate)	8.4	6.8
95% KI	7.4 – 9.5	5.1 – 8.4
Log rank	0.16	
HR (95% KI)	1.23 (0.92-1.63)	
Medianes OS (Monate)	21.3	18.2
95% KI	17.4 - 25.2	15.1 - 21.2
Log rank	0.40	
HR (95% KI)	1.14 (0.85-1.52)	

Tabelle 3: Baseline-Charakteristika der FIRE1-Subpopulationen. **Legende:** Mediane Überlebensdaten aller Patienten; p-Werte basierend auf log-rank-Test; HR: hazard ratio; KI: Konfidenzintervall; PFS: progression-free survival; OS: overall survival.

Effektivität in der Subpopulation

Das mediane progressionsfreie Überleben der FUFIRI-behandelten Patienten betrug 8.4 Monate (95% KI: 7.4 – 9.5 Monate). Im mlrOx-Behandlungsarm zeigte sich ein medianes PFS von 6.8 Monaten (95% KI: 5.1 – 8.4 Monate). Die Analyse mittels Cox-Regression ergab mit einer hazard ratio [95% KI] von 1.23 [0.92 – 1.63] einen leichten Überlebensnachteil für Patienten, die sich im mlrOx-Arm befanden. Signifikante Überlebensunterschiede waren nach Durchführung eines log-rank-Testes nicht festzustellen ($p = 0.16$).

Bei der Betrachtung des Gesamtüberlebens wies der FUFIRI-Arm einen medianen Wert von 21.3 Monaten (95% KI: 17.4 – 25.2 Monate) auf gegenüber dem mlrOx-Arm mit 18.2 Monate (95% KI: 15.1 – 21.2). Eine hazard ratio [95% KI] von 1.14 [0.85 – 1.52] zeigte hierbei weder günstige noch nachteilige Effekte hinsichtlich des Überlebens auf, was durch den log-rank-Test bestätigt werden konnte ($p = 0.40$) (Abbildungen 4, 5).

Vergleich der Effektivität von Subpopulation und Gesamtpopulation

Die originale Gesamtpopulation der FIRE1-Studie wies im Vergleich zu den oben erwähnten Subpopulationen ein ähnliches progressionsfreies Überleben auf (FUFIRI: 8.2 Monate [95% KI: 7.1 – 9.2] vs. mlrOx: 7.2 Monate [95% KI: 6.2 – 8.2]; HR [95% KI] = 1.14 [0.94 – 1.37]; $p = 0.18$).

Auch das Gesamtüberleben der Gesamtpopulation war vergleichbar mit dem oben genannten Gesamtüberleben der Subpopulation (FUFIRI: 21.0 Monate [95% KI: 18.3 – 23.8] vs. mlrOx: 18.7 Monate [95% KI: 16.2 – 21.1]; HR [95% KI] = 1.09 [0.90 – 1.32]; $p = 0.40$).

4. Auswertung

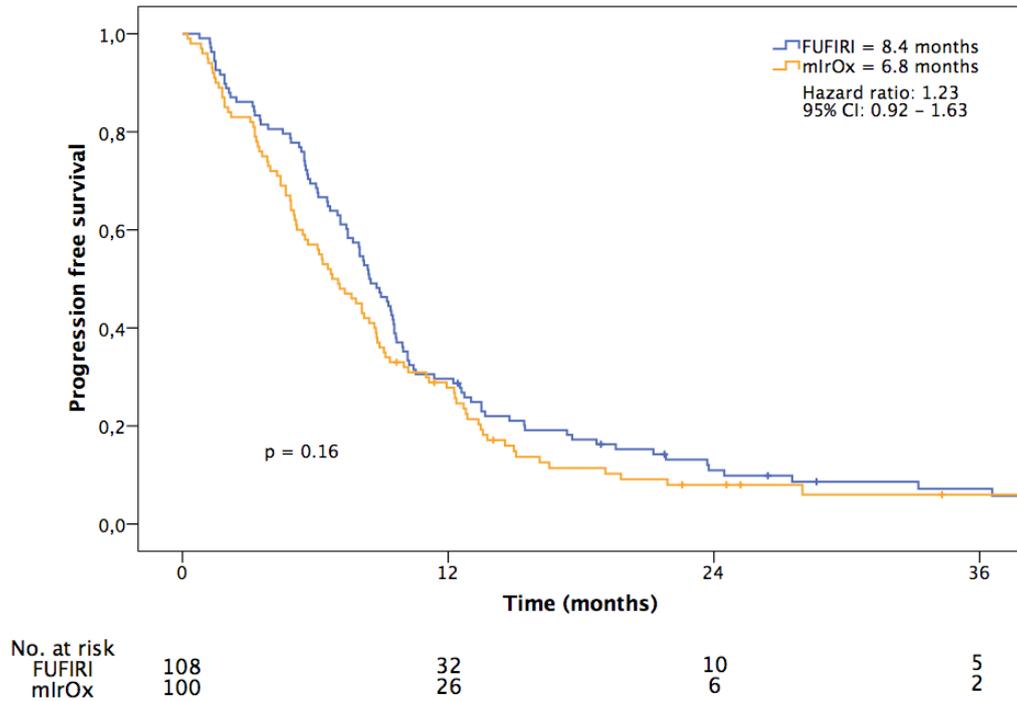


Abbildung 4: Vergleich des progressionsfreien Überlebens unter FUFIRI oder mlrOx in der FIRE1-Subpopulation. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

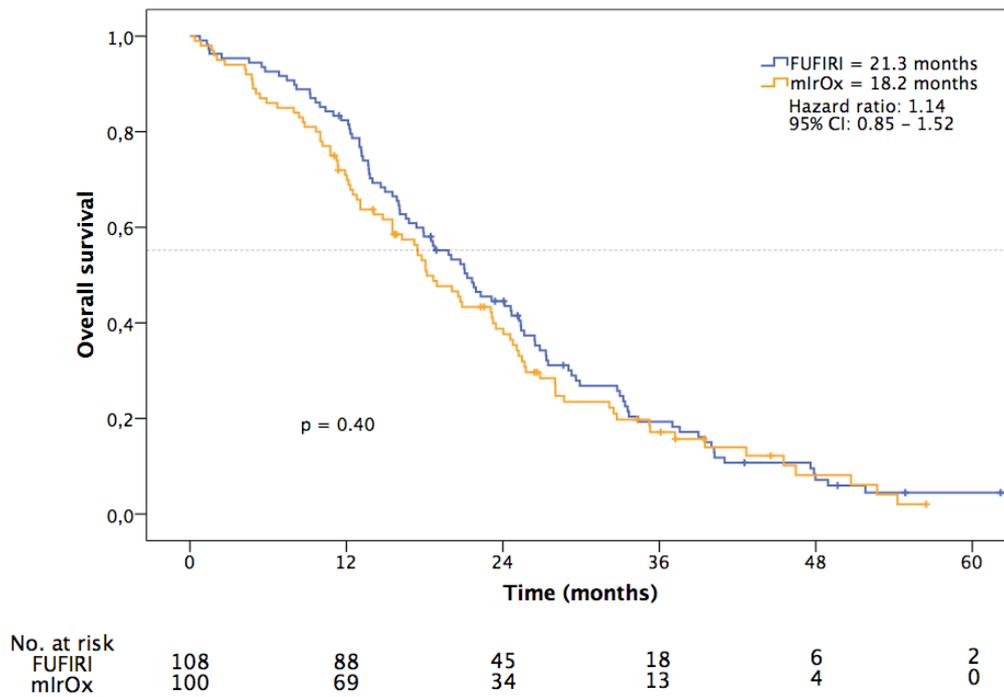


Abbildung 5: Vergleich des Gesamtüberlebens unter FUFIRI oder mlrOx in der FIRE1-Subpopulation. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

4.2. Häufigkeiten der Biomarker

RAS- und PIK3CA-Mutationen

Insgesamt lagen Gewebeproben von 208 Patienten der FIRE1-Studie vor, welche sich gleichermaßen auf beide Behandlungsarme verteilten.

Der *RAS*-Status konnte von dem kompletten Subset erhoben werden.

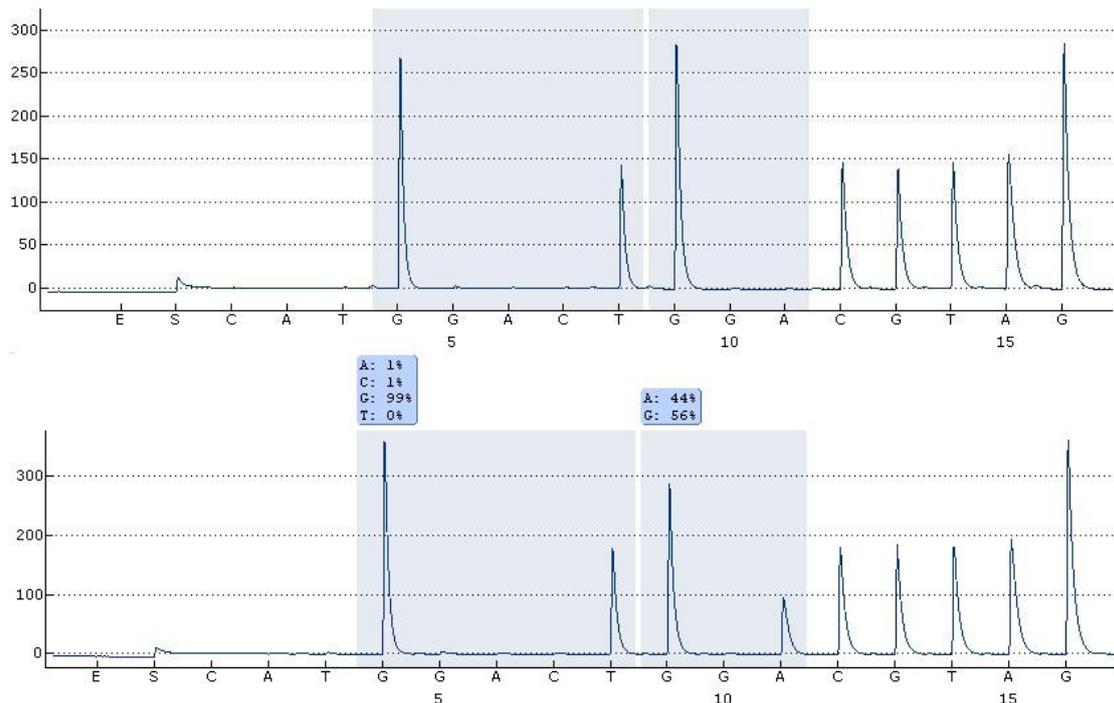


Abbildung 6: Pyrogramm eines Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-Sequenz (oben) im Vergleich zu einer c.35G>A-Mutation in *KRAS* Exon 2, Codon 12.

107 von 208 Patienten (51.4 %) wiesen eine Mutation im *RAS*-Gen auf. Der Anteil der *KRAS* Exon 2 – Mutationen betrug 38.9 %, der Anteil sonstiger *RAS*-Mutationen 12.5 %. 101 Patienten wiesen keine Mutation auf und wurden dementsprechend als Wildtyp klassifiziert. Die häufigsten Mutationen zeigten sich in *KRAS* Codon 12 und 13 als c.35G>A-, c.38G>A- und c.35G>T-Mutation. (Abbildung 7). Bei insgesamt 15 von 208 Patienten konnte eine *PIK3CA*-Mutation nachgewiesen werden. Ein Patient wies eine Doppelmutation in Exon 9 und 20 auf. (Abbildung 8)

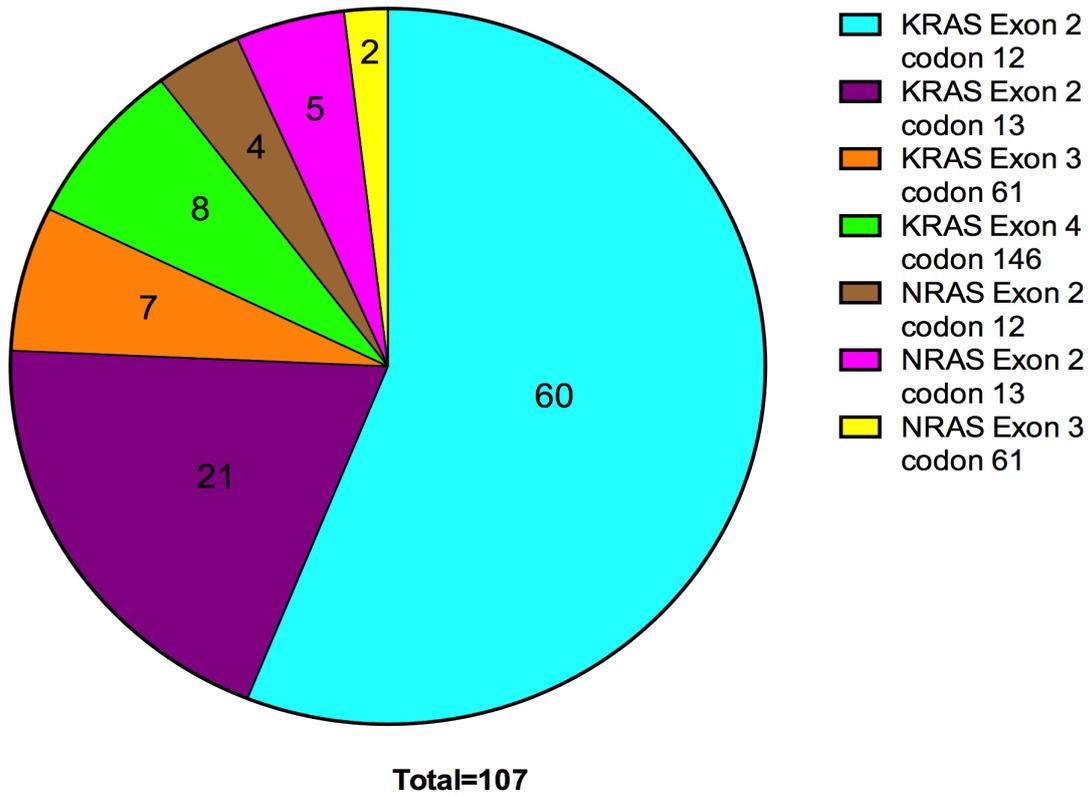


Abbildung 7: Prävalenz der RAS-Mutationen im Subset der FIRE1-Studie.

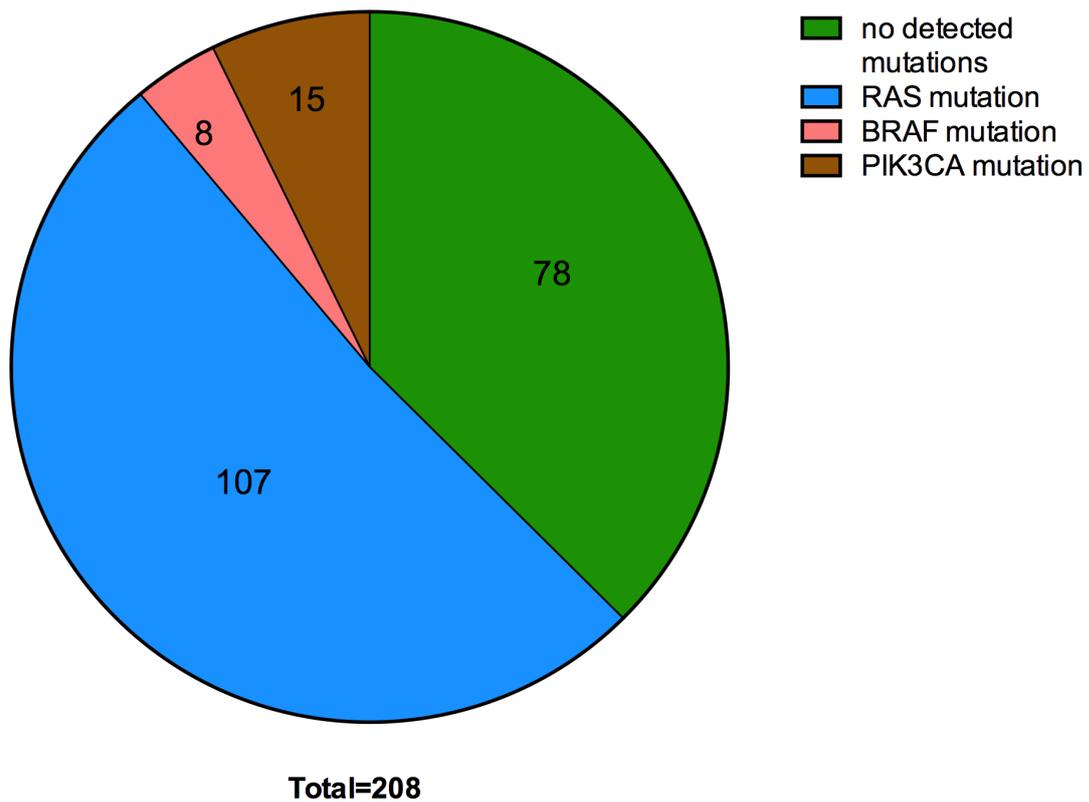


Abbildung 8: Prävalenz von Mutationen in der gesamten FIRE1-Subpopulation.

Verteilung der <i>RAS</i> - und <i>PIK3CA</i> -Mutationen auf die Studienarme						
Results	FUFIRI (n = 108)			miROX (n = 100)		
Exon	2	3	4	2	3	4
<i>KRAS</i> mut. (%)	45 (41.7)	3 (2.8)	6 (5.6)	36 (36.0)	4 (4.0)	2 (2.0)
<i>NRAS</i> mut. (%)	3 (2.8)	4 (3.7)	0 (0.0)	3 (3.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
Results	FUFIRI (n = 108)		miROX (n = 100)			
Exon	9	20	9	20		
<i>PIK3CA</i> mut. (%)	5 (4.6)	3 (2.8)	5 (5.0)	3 (3.0)		

Tabelle 4: Verteilung der *RAS*- und *PIK3CA*-Mutationen auf die Studienarme. **Legende:** mut. = mutiert;

AREG- bzw. EREG-Expression

Für eine Unterscheidung hoher und niedriger Expression von mRNA in Patientenmaterial wurde ein Schwellenwert festgelegt. Lagen Patienten über diesem Schwellenwert, wiesen sie eine hohe Expression auf. Studienteilnehmer, die darunter lagen, gingen mit einer niedrigen Expression einher. Hierfür wurden Crossing Point (C_P)-Werte von Beta-Actin, Amphiregulin (*AREG*) und Epiregulin (*EREG*) mithilfe des LightCyclers von Roche in Duplikaten bestimmt. C_P -Werte geben den Zyklus an, ab dem die detektierte Fluoreszenz merklich über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Je größer dieser Wert ist, desto geringer muss die Expression sein, weil sie erst in einem späteren Zyklus wahrgenommen wird. Das Referenzgen (Beta-Actin) wird in jedem Patienten etwa gleich exprimiert. Die Expression des Zielgens muss in Relation dazu quantifiziert werden. Sowohl Überexpression als auch Expressionsverlust können nur definiert werden, wenn das normale Expressionsprofil eines Tumors bekannt ist. Zunächst wurde der relative ΔC_P -Wert kalkuliert als Differenz des maximalen Werts von 40 und der gemessenen Werte. Daraufhin wurden die ΔC_P -Werte exponenziert, da sie ursprünglich als logarithmierte Werte vorlagen. Da es sich nun um natürliche Zahlen handelte, konnte man den Mittelwert aus den Duplikaten und den Quotienten mit dem

Referenzgen bestimmen. Zur einfacheren Handhabung wurden die erhaltenen Werte wiederum logarithmiert. Indem man nun jeden gemessenen Wert auf den niedrigsten Wert bezog, erhielt man $\Delta\Delta C_P$. Somit wurde nun jeder $\Delta\Delta C_P$ -Wert zu einem Vielfachen des niedrigsten Wertes. Der Schwellenwert für die Unterteilung einer hohen und niedrigen Expression wurde bestimmt als das Maximum von Sensitivität und Spezifität aller ermittelten $\Delta\Delta C_P$ -Werte bezogen auf die Gesamtansprechrate (overall response rate, ORR). Mithilfe einer Receiver Operator Characteristic (ROC)-Analyse konnte der entsprechende Punkt aus den Daten bestimmt werden (Abbildungen 9, 10). Die Area Under Curve (AUC) ist ein Maß für die Güte des Schwellenwerts. Eine AUC von 0.5 geht damit einher mit einer zufälligen Einteilung von Patienten mit hoher und niedriger Expression. Eine AUC von 1.0 würde Patienten mit hoher und niedriger Expression perfekt voneinander trennen. Im Fall von Amphiregulin betrug die AUC 0.546 (95% KI: 0.461 – 0.630), und für Epiregulin 0.624 (95% KI: 0.5 – 0.694). Der Cut-Off für Amphiregulin wurde nach dieser Methode auf 71.60 festgelegt und für Epiregulin auf 2.12. Nach dieser Unterteilung wiesen 31 Patienten eine hohe Amphiregulin-Expression gegenüber den übrigen 161 Studienteilnehmern auf (16.1 vs. 83.9 %). Hinsichtlich Epiregulin exprimierten 89 von 192 Patienten diese mRNA oberhalb des ermittelten Schwellenwerts. (46.4 vs. 53.6 %).

4. Auswertung

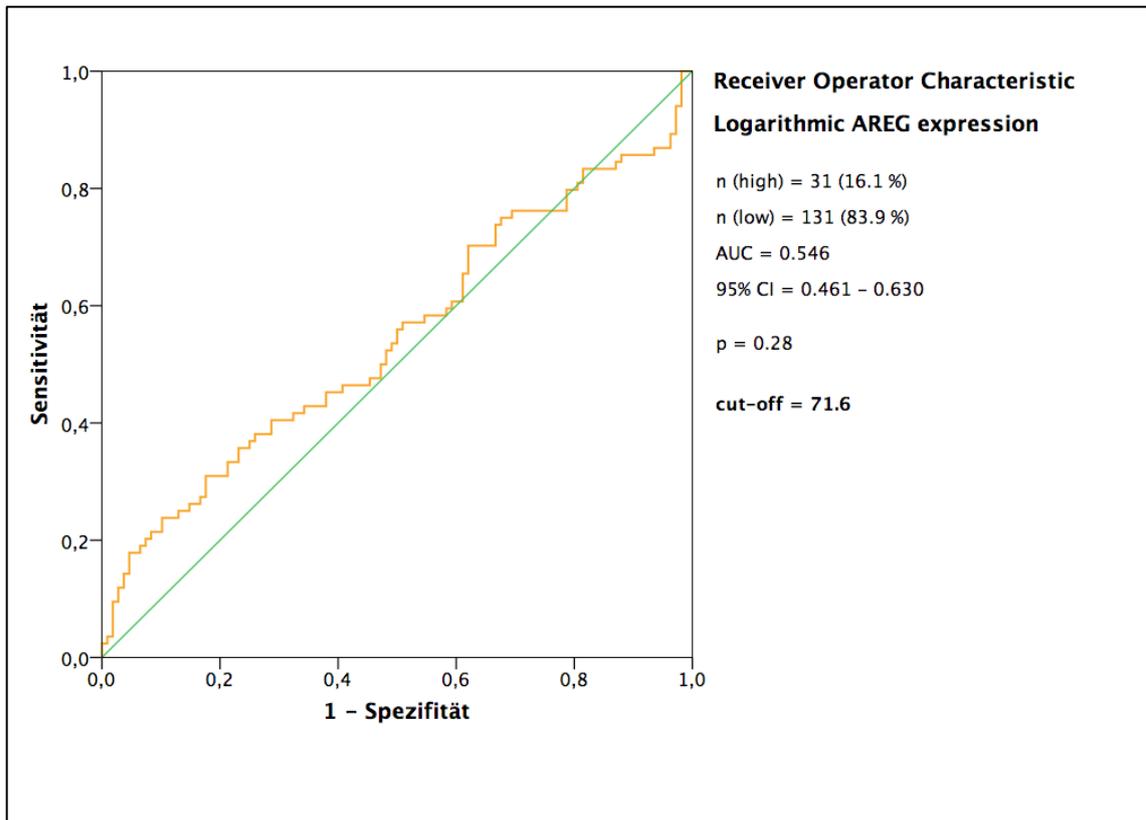


Abbildung 9: Receiver Operator Characteristic Analyse zur Ermittlung eines Schwellenwerts für die Dichotomisierung niedriger und hoher AREG-Expression.

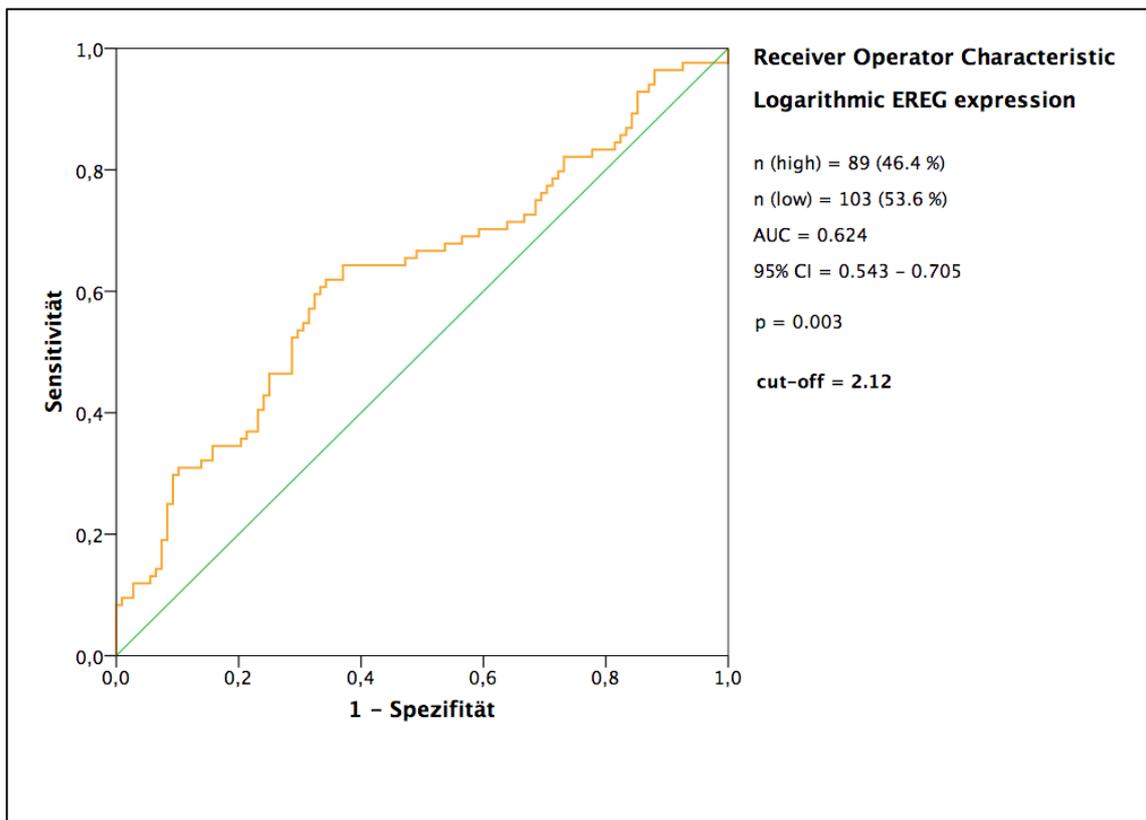


Abbildung 10: Receiver Operator Characteristic Analyse zur Ermittlung eines Schwellenwerts für die Dichotomisierung niedriger und hoher EREG-Expression.

EGFR-Expression

Analog zur mRNA-Expression musste auch zwischen hoher und niedriger *EGFR*-Expression unterschieden werden. Hierbei wurde zum Teil auf eine vorausgegangene immunhistochemische Analyse von Neumann et al. zurückgegriffen.⁹³ (Abbildung 11) Der Schwellenwert bestand aus dem Produkt der Färbeintensität (0 – keine Färbung; 1 – schwache Färbung; 2 – moderate Färbung; 3 – starke Färbung) mit dem prozentualen Anteil der angefärbten Zellen. Somit ergab sich ein End-Score von minimal 10 bis maximal 300. Anschließend wurde eine Receiver Operator Characteristic (ROC) – Analyse durchgeführt, um den besten Schwellenwert mit einem Maximum an Sensitivität und Spezifität herauszufinden. Die Analyse ermittelte den Wert 22.5 (AUC: 0.522, 95% KI: 0.443 – 0.602, $p = 0.58$). 137 Patienten zeigten niedrige Expression (*EGFR* low) und 71 Patienten hohe Expression (*EGFR* high).

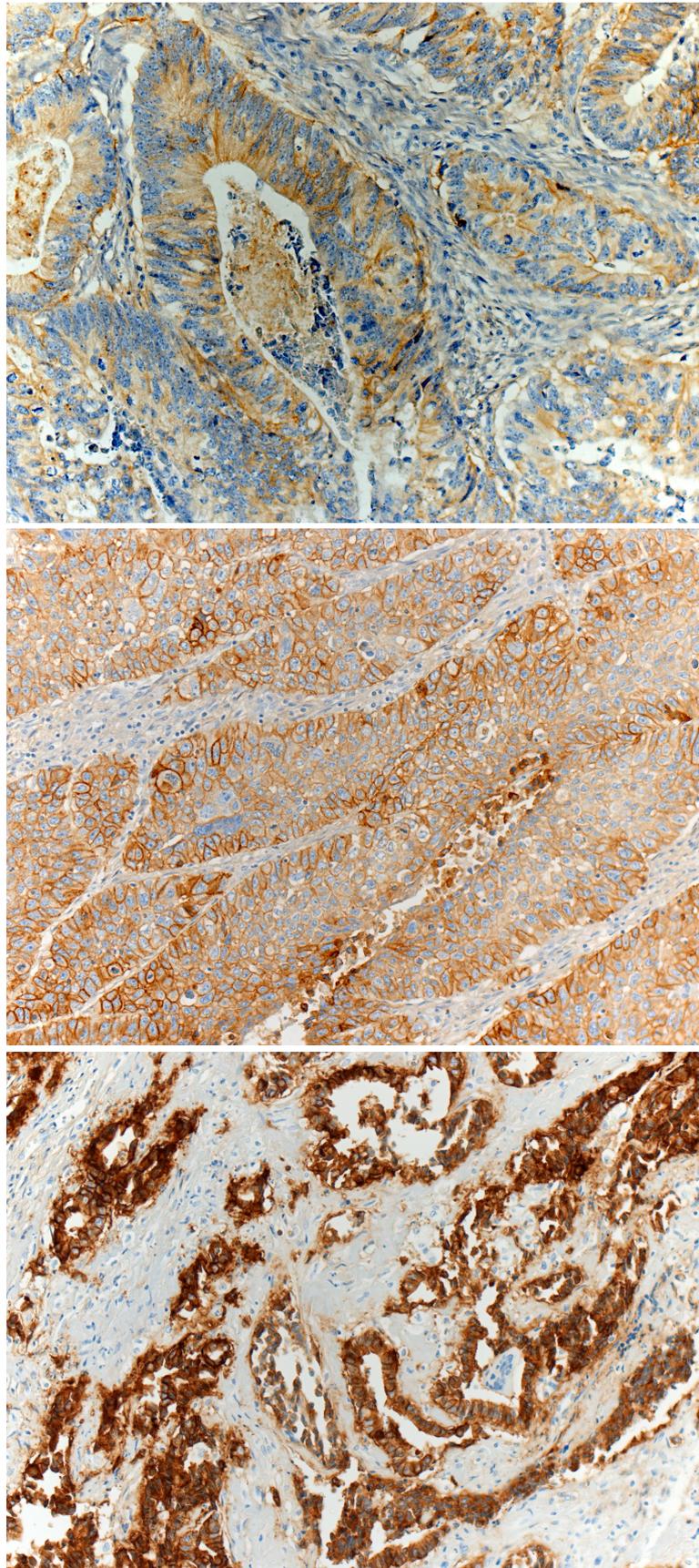


Abbildung 11: Membranöse *EGFR*-Färbung durch Immunhistochemie. Schwach (oben), moderat (mittig), stark (unten).

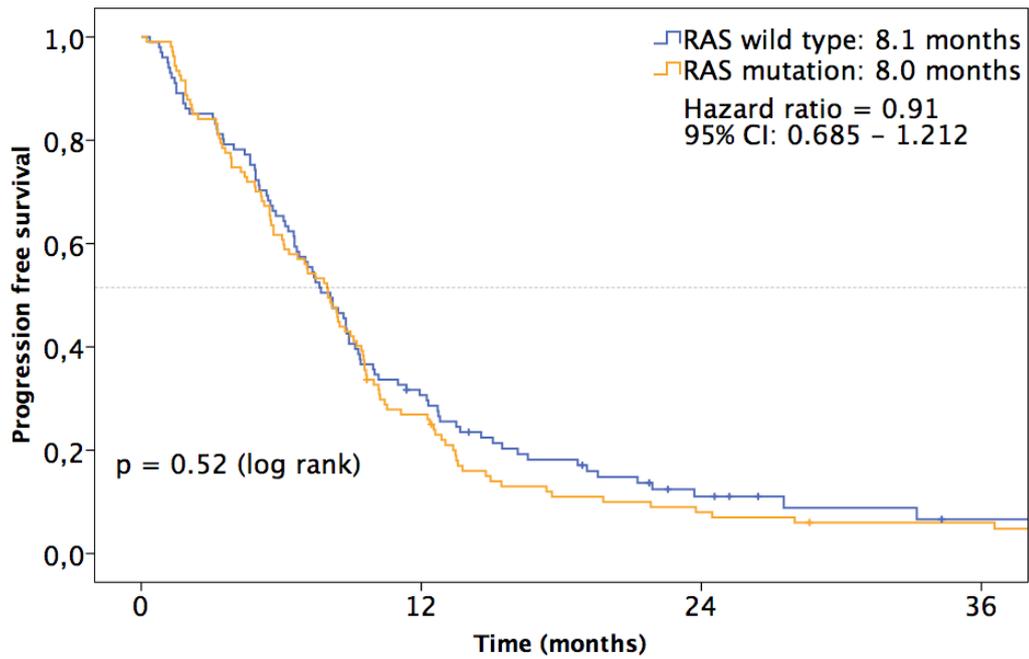
4.3. Korrelation der Biomarker mit den Überlebensdaten des FIRE1-Subset

RAS

Das progressionsfreie Überleben von Wildtyp-*RAS*-Patienten zeigte mit median 8.1 Monaten (95% KI: 6.8 – 9.4 Monate) keinen signifikanten Unterschied gegenüber 8.0 Monaten (95% KI: 6.8 – 9.2 Monate) in *RAS*-mutierten Tumoren. Eine Cox-Regressionsanalyse zur Ermittlung der hazard ratio mit 95% Konfidenzintervall zeigte keinen Überlebensnachteil (HR [95% KI] = 0.91 [0.685 – 1.212]; $p = 0.52$). Auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit *RAS*-WT Tumor und *RAS*-MUT Tumor festgestellt werden (21.9 [95% KI: 18.2 – 25.6] vs. 18.6 [95% KI: 16.3 – 21.0] Monate; HR [95% KI] = 0.885 [0.661 – 1.186]; $p = 0.414$). (Abbildung 12, 13)

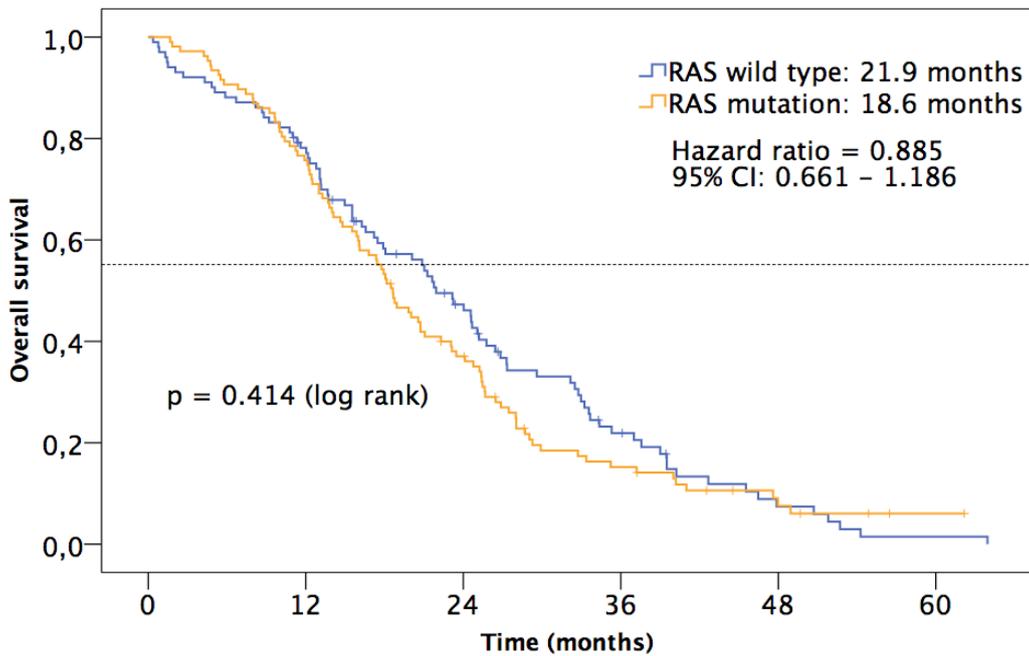
PIK3CA

Patienten mit *PIK3CA*-mutierten Tumoren wurden mit einem Trend zu einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert. Ein Vergleich univariater Cox-Regressionsanalysen offenbarte eine hazard ratio [95% KI] von 0.638 [0.368 – 1.105]. Der Effekt war allerdings nicht signifikant ($p = 0.109$). (Tabelle 5)



No. at risk				
RAS wildtype	101	30	8	2
RAS mutation	107	28	8	5

Abbildung 12: Vergleich des progressionsfreien Überlebens für Patienten mit RAS-Wildtyp-Tumoren oder RAS-mutierten Tumoren durch Kaplan-Meier-Analyse. Signifikanz-Test durch Log-Rank.



No. at risk					
RAS wildtype	101	76	41	17	5
RAS mutation	107	81	38	14	5

Abbildung 13: Vergleich des Gesamtüberlebens für Patienten mit RAS-Wildtyp-Tumoren oder RAS-mutierten Tumoren durch Kaplan-Meier-Analyse. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

EGFR

Die Expression des *EGF*-Rezeptors korrelierte nicht mit dem Überleben des Kollektivs. Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens ergab eine hohe *EGFR* Expression gegenüber einer niedrigen Expression Werte von 8.0 [95% KI: 7.0 – 9.0 Monate] vs. 8.4 [95% KI: 7.1 – 9.6 Monate] Monaten (HR [95% KI] = 0.94 [0.79 – 1.43]; $p = 0.69$). Auch das Gesamtüberleben wurde nicht von der *EGFR* Expression beeinflusst (hohe Expression: 18.1 [95% KI: 14.4 – 21.7 Monate] vs. niedrige Expression: 20.9 Monate [95% KI: 17.9 – 23.8 Monate]; HR [95% KI] = 0.92 [0.80 – 1.48]; $p = 0.59$). (Abbildungen 14, 15)

4. Auswertung

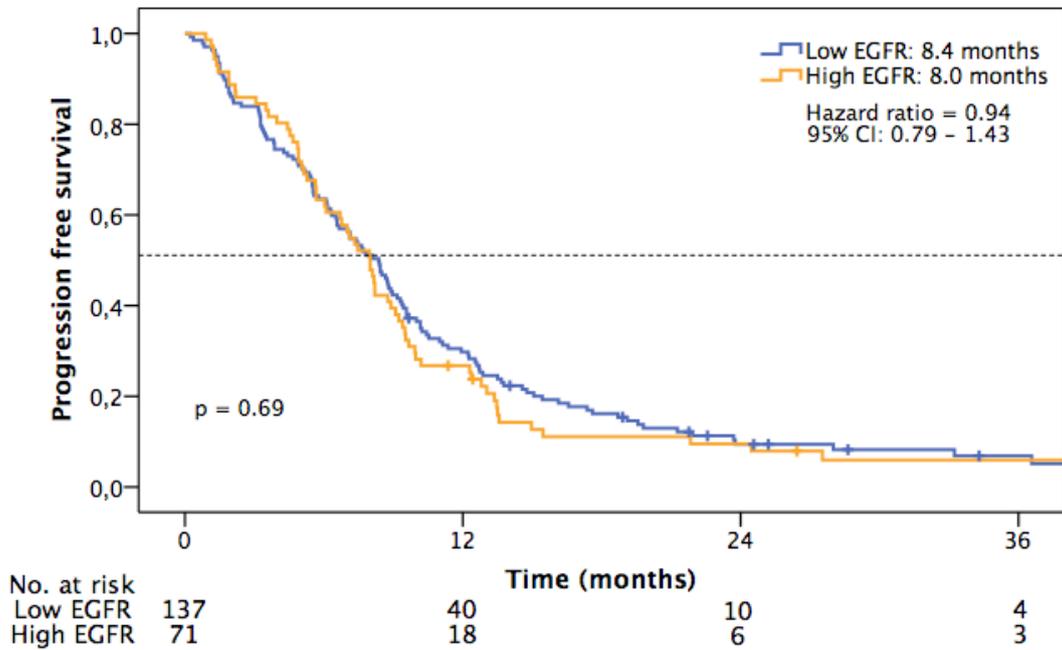


Abbildung 14: Vergleich des progressionsfreien Überlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Expression des Epidermal Growth Factor Receptors. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

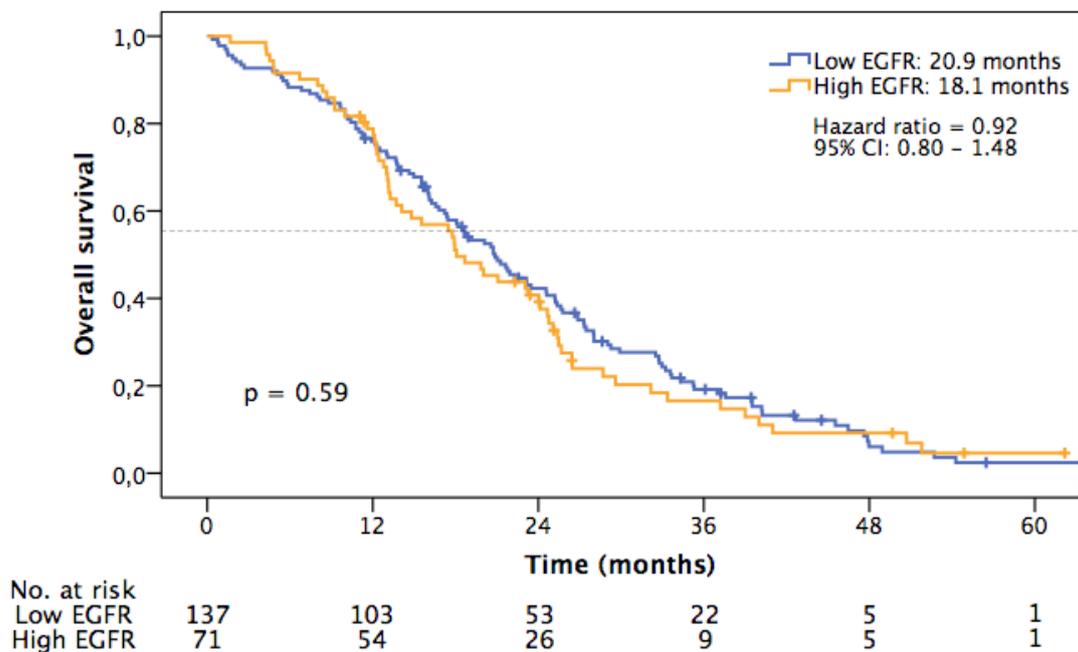
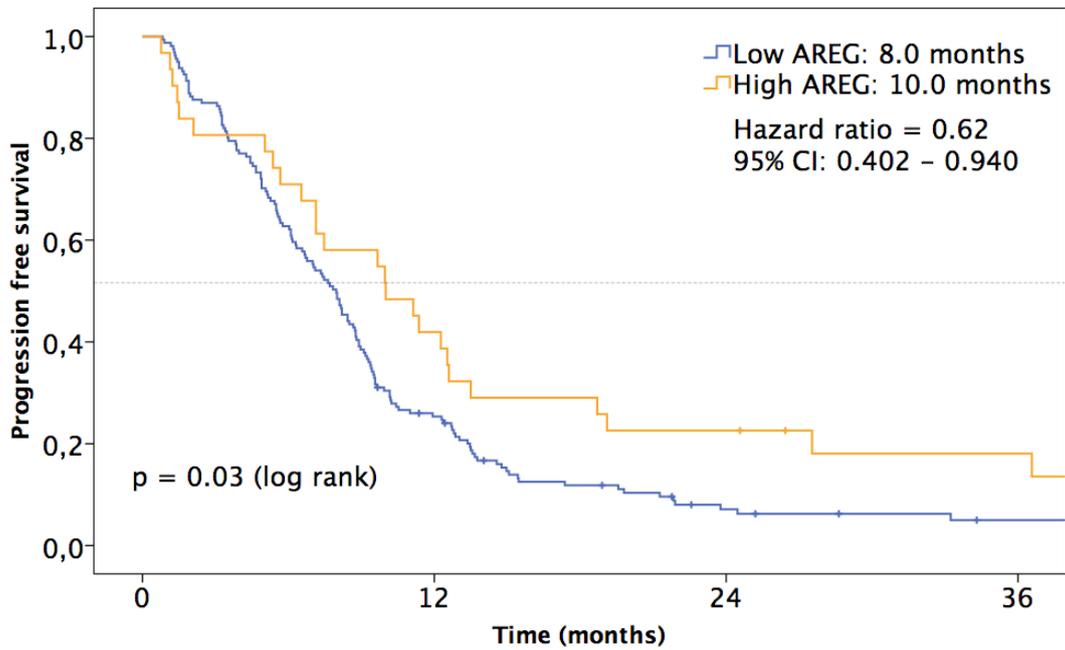


Abbildung 15: Vergleich des Gesamtüberlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Expression des Epidermal Growth Factor Receptors. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

AREG-Expression

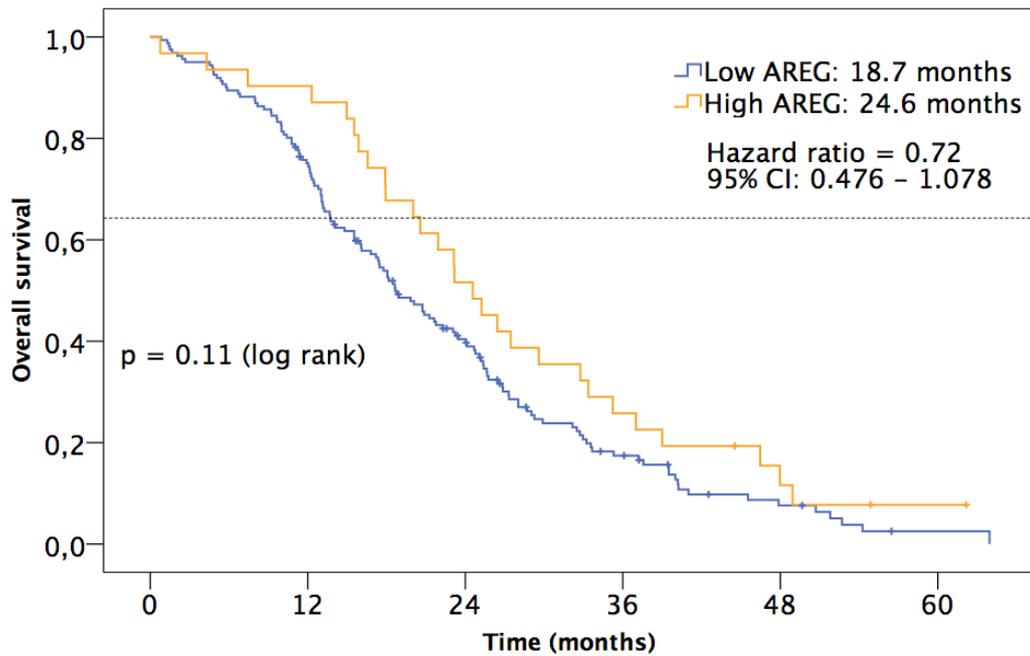
Von den 192 messbaren Patienten wiesen 161 eine niedrige, 31 eine hohe Expression auf.

Das progressionsfreie Überleben zeigte einen signifikanten Unterschied mit 8.0 Monaten [95% KI: 7.0 – 9.0 Monate] bei niedriger Expression und 10.0 Monate [95% KI: 5.7 – 14.3 Monate] bei hoher Expression (HR [95% KI] = 0.62 [0.402 – 0.940]; $p = 0.03$). Im Gegensatz dazu ließ sich dieser signifikante Überlebensvorteil nicht im Gesamtüberleben nachweisen. Allerdings zeigte sich hier ein Trend von 24.6 Monaten [95% KI: 19.7 – 29.5 Monate] bei Patienten mit hoher Expression gegenüber 18.7 Monaten [95% KI: 15.9 – 21.5 Monate] bei niedriger Expression mit einer hazard ratio [95% KI] von 0.72 [0.476 – 1.048; $p = 0.11$] (Abbildungen 16, 17).



No. at risk				
Low AREG	161	39	8	3
High AREG	31	13	7	4

Abbildung 16: Vergleich des progressionsfreien Überlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Amphiregulin-Expression. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

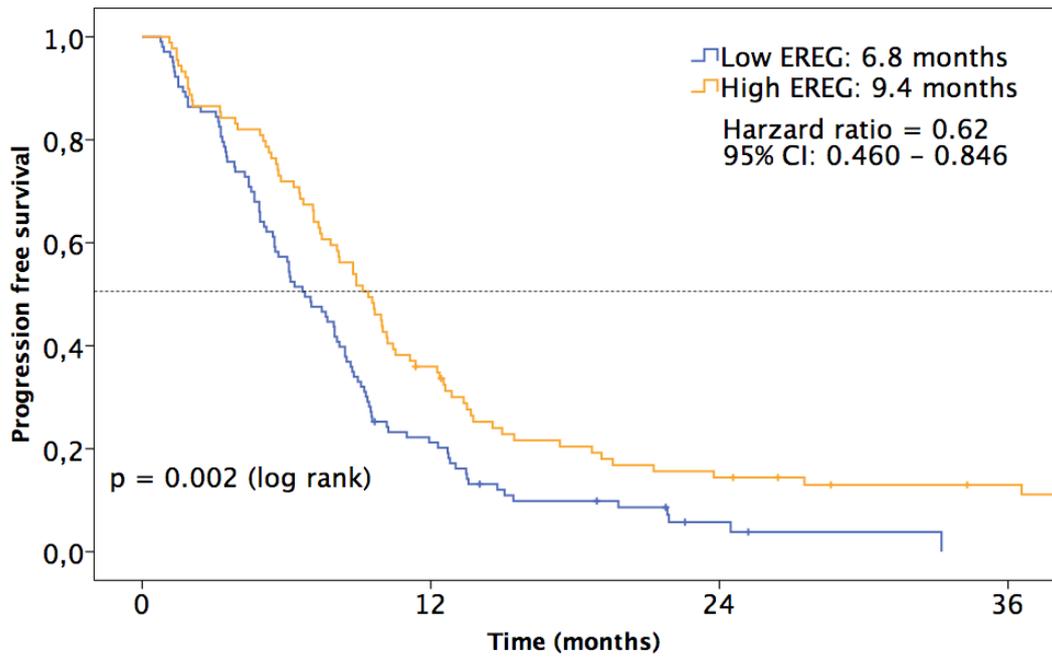


No. at risk						
Low AREG	161	118	57	21	7	1
High AREG	31	28	16	8	3	1

Abbildung 17: Vergleich des Gesamtüberlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Amphiregulin-Expression. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

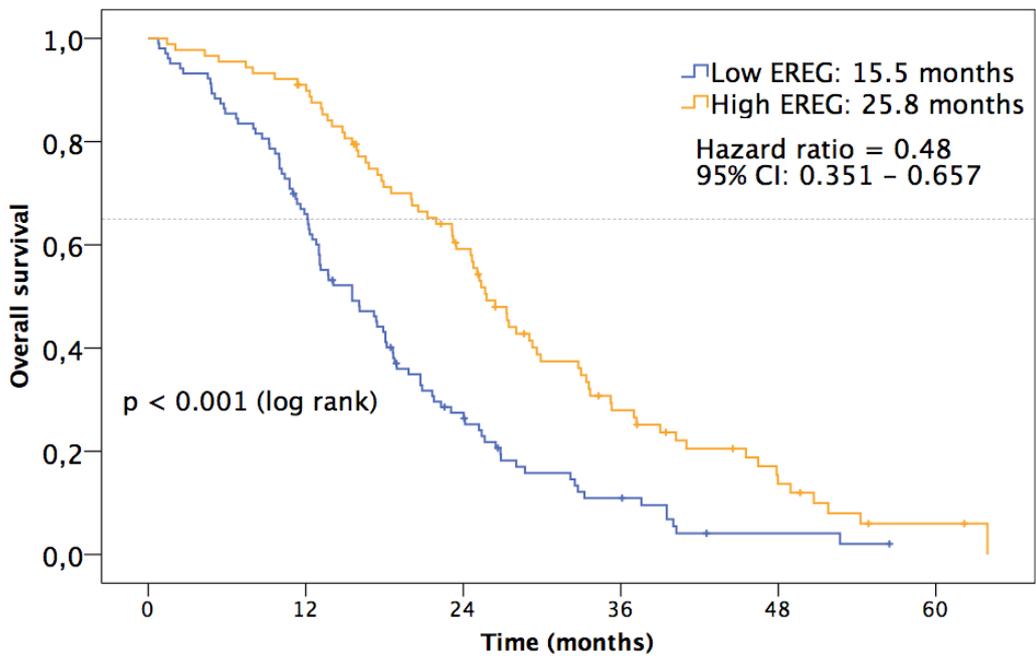
EREG-Expression

89 von 192 Patienten zeigten eine Überexpression von *EREG*. Diese Patienten wiesen sowohl ein signifikant prolongiertes progressionsfreies Überleben auf (9.4 [95% KI: 7.8 – 11.0 Monate] vs. 6.8 Monate [95% KI: 5.4 – 8.1 Monate], HR [95% KI] = 0.62 [0.460 – 0.846]; $p = 0.002$) als auch ein verlängertes Gesamtüberleben (25.8 [95% KI: 23.2 – 28.3 Monate] vs. 15.5 months [95% KI: 11.7 – 19.3 Monate], HR [95% KI] = 0.48 [0.351 – 0.657]; $p < 0.001$) (Abbildungen 18, 19).



No. at risk				
Low EREG	103	21	3	
High EREG	89	31	12	7

Abbildung 18: Vergleich des progressionsfreien Überlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Epiregulin-Expression. Signifikanz-Test durch Log-Rank.



No. at risk						
Low EREG	103	67	25	9	2	2
High EREG	89	79	48	20	8	2

Abbildung 19: Vergleich des Gesamtüberlebens für Patienten mit niedriger oder hoher Epiregulin-Expression. Signifikanz-Test durch Log-Rank.

4.4. Uni- und multivariate Regressionsanalysen der mRNA-Expression

Univariate Cox-Regression

Um die Interaktionen einer gesteigerten Ligandenexpression mit weiteren Faktoren zu testen, wurden univariate Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in sog. Forest Plots veranschaulicht, in denen die Hazard ratio und das 95%-Konfidenzintervall für die einzelnen Faktoren aufgetragen wurden. Im Rahmen der Dokumentation der FIRE1-Studie fehlten bei drei Patienten Daten zum Metastasenstatus.

Untersucht wurde hierbei die Abhängigkeit der Amphi- und Epiregulin-Expression von den Baseline Charakteristika des FIRE1-Subsets, sowie von den jeweiligen Behandlungsarmen, dem *RAS*-Mutationsstatus, dem *PIK3CA*-Mutationsstatus und der *EGFR*-Expression für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben. (Abbildungen 20 - 23)

Der mögliche günstige Effekt einer hohen Amphiregulin-Expression für das progressionsfreie Überleben war am ehesten beim Vorliegen von Lungenmetastasen und dem *PIK3CA*-Mutationsstatus zu beobachten. Das Gesamtüberleben korrelierte mit dem Vorhandensein von Lungenmetastasen, jedoch auch mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen und dem *RAS*-Mutationsstatus.

Der protektive Effekt einer hohen Epiregulin-Expression zeigte sich sowohl im progressionsfreien Überleben als auch im Gesamtüberleben in allen Subgruppen.

Der günstige Effekt einer gesteigerten Expression von *AREG* oder *EREG* zeigte sich unabhängig vom *EGFR*-Expressionsmuster.

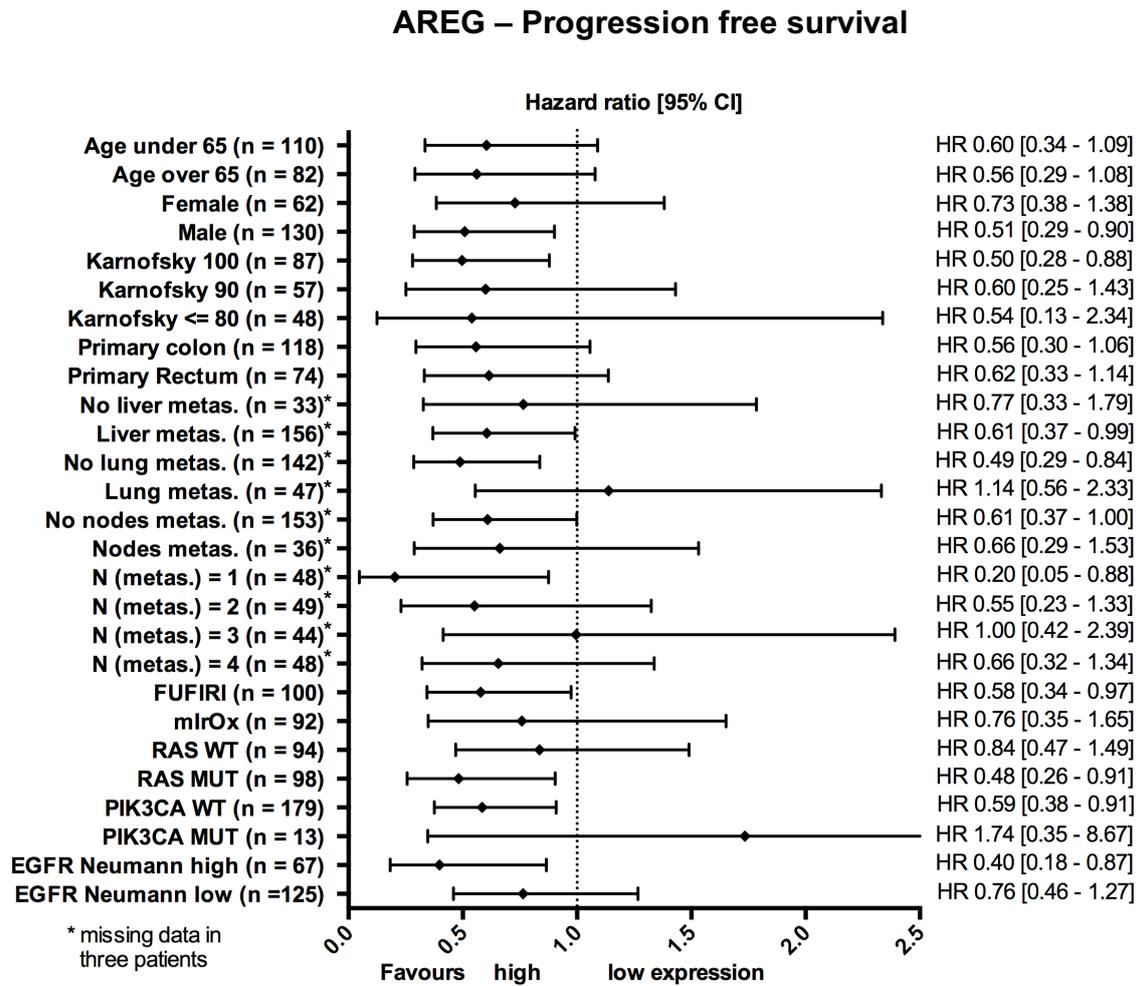


Abbildung 20: Forest plot der Baseline-Charakteristika und des Tumor-Mutationsstatus in Bezug auf die Amphiregulin-Expression für das progressionsfreie Überleben.

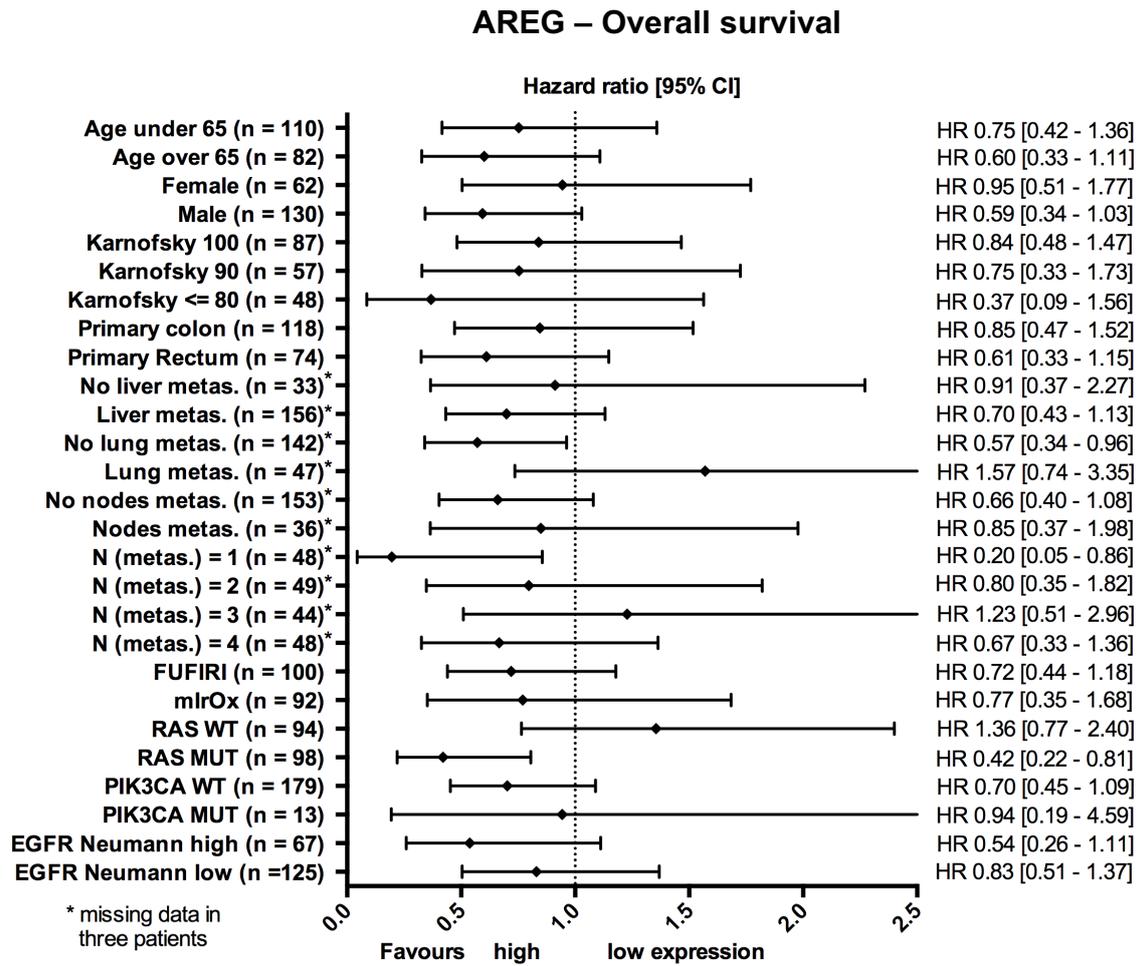


Abbildung 21: Forest plot der Baseline-Charakteristika und des Tumor-Mutationsstatus in Bezug auf die Amphiregulin-Expression für das Gesamtüberleben.

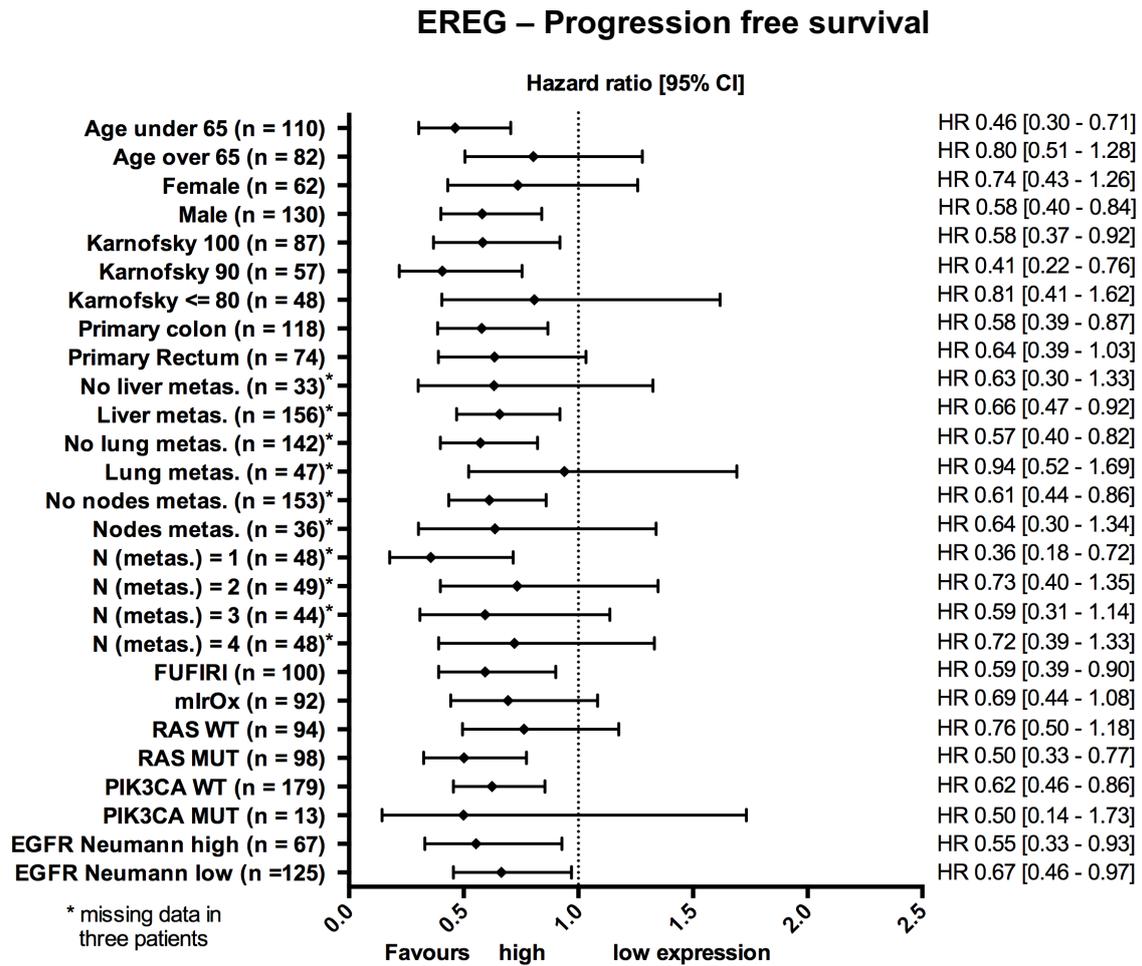


Abbildung 22: Forest plot der Baseline-Charakteristika und des Tumor-Mutationsstatus in Bezug auf die Epiregulin-Expression für das progressionsfreie Überleben.

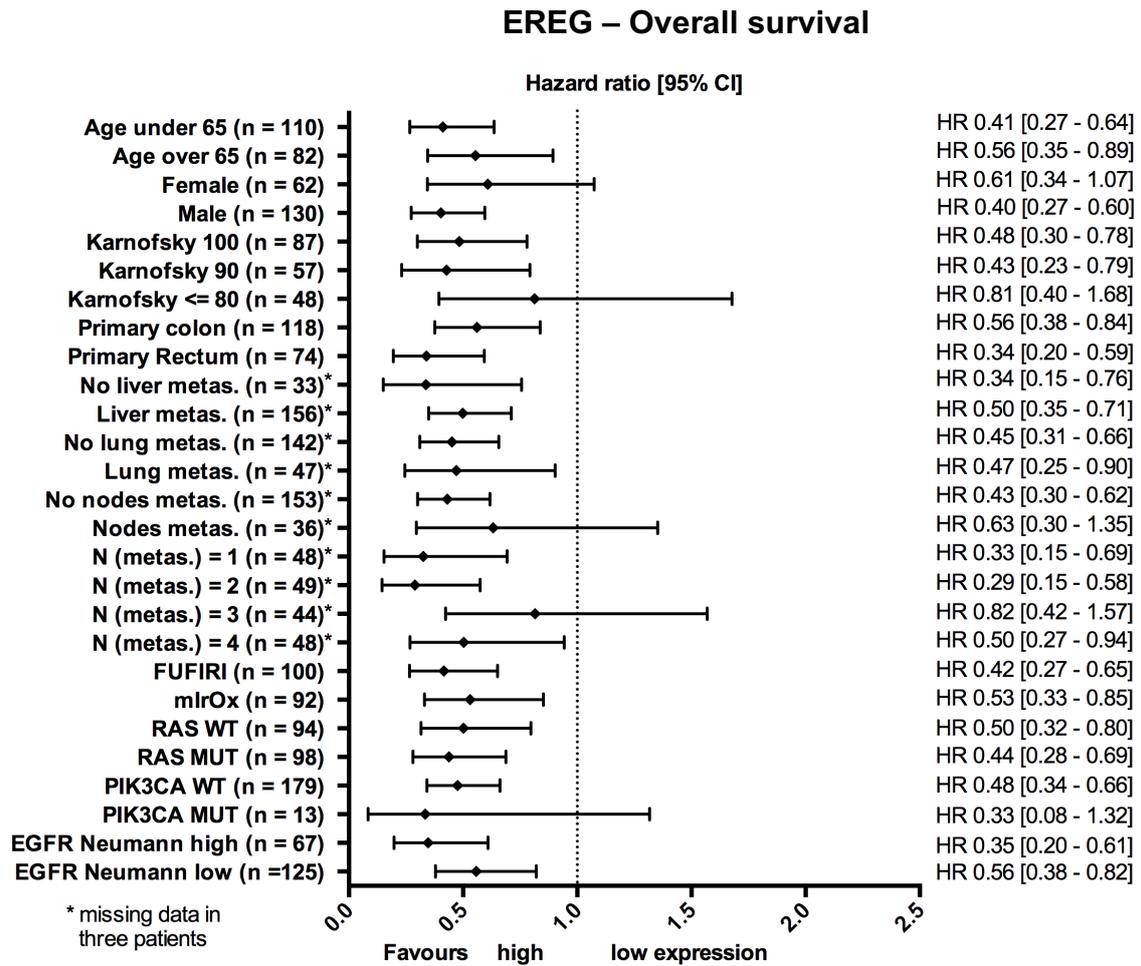


Abbildung 23: Forest plot der Baseline-Charakteristika und des Tumor-Mutationsstatus in Bezug auf die Epiregulin-Expression für das Gesamtüberleben.

Multivariate Cox-Regression

Um interagierende Variablen zu berücksichtigen, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Innerhalb eines sog. Backward elimination Algorithmus wurden schrittweise Faktoren ausgeschlossen, sodass zum Schluss nur noch signifikante Einflüsse übrig blieben.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigten sich das Alter < 65 vs. ≥ 65 Jahre (HR [95% KI]: 1.445 [1.051 – 1.986]; $p = 0.023$) sowie hohe vs. niedrige *EREG*-Expression (HR [95% KI]: 0.471 [0.343 – 0.647]; $p = <0.001$) als signifikante Einflussfaktoren. Im progressionsfreien Überleben blieben das Vorhandensein von Leber- (HR [95% KI]: 1.629 [1.053 – 2.519]; $p = 0.028$) und Lungenmetastasen (HR [95% KI]: 1.490 [1.019 – 2.178]; $p = 0.04$), *PIK3CA*-Mutationen vs. Wildtyp-Tumore (HR [95% KI]: 1.898 [1.042 – 3.459]; $p = 0.036$) sowie hohe vs. niedrige *EREG*-Expression (HR [95% KI]: 0.663 [0.487 – 0.902]; $p = 0.009$) als signifikante Faktoren übrig. Der prognostische Effekt von *EREG* interagiert hinsichtlich PFS und OS nicht mit den übrigen in dieser Studie untersuchten Biomarkern (*RAS*, *PIK3CA*, *EGFR*).

Vergleich der prognostischen Faktoren mittels Cox-Regression

Die vorherigen univariaten Regressionsanalysen wurden nach der Expression von Amphiregulin und Epiregulin stratifiziert. Abschließend sollte die Prognostizität der nicht-stratifizierten Faktoren *RAS*- und *PI3KCA*-Status, *EGFR* Expression, Amphiregulin und Epiregulin-Expression zusammen mit den Baseline-Charakteristika des FIRE1-Subsets für das Gesamtüberleben (OS) verglichen werden (Tabelle 3). Wildtyp-*RAS*-Tumore waren prognostisch leicht günstiger als mutierte Tumore. Allerdings konnte dieser Effekt im Subset der FIRE1-Studie keine statistische Signifikanz erreichen. Sowohl der *PI3KCA*-Wildtyp-Status als auch eine hohe Amphiregulin-Expression zeigten einen nicht-signifikanten Trend für ein prolongiertes Überleben in Patienten mit einem

Vergleich der Biomarker und Baseline Charakteristika anhand der Hazard ratios					
Variable		no. (%)	hazard ratio	95 % KI	p
Geschlecht	männlich	138 (66.3)	0.986	0.725 - 1.342	0.930
	weiblich	70 (33.7)			
Alter	< 65	120 (57.7)	0.817	0.608 - 1.097	0.180
	≥ 65	88 (42.3)			
Therapie	FUFIRI	108 (51.9)	0.881	0.657 - 1.179	0.395
	mlrOx	100 (48.1)			
Karnofsky Index	100	95 (45.7)	0.528	0.392 - 0.711	< 0.001
	90 - 70	113 (54.3)			
Lokalisation d. Primärtumors	Rektum	81 (39.0)	0.816	0.603 – 1.105	0.188
	Colon	127 (61.0)			
Leber-metastasen	keine Metastasen	36 (17.6)	0.766	0.524 - 1.120	0.170
	Metastasen	169 (82.4)			
Lungen-metastasen	keine Metastasen	151 (73.7)	0.925	0.666 - 1.285	0.642
	Metastasen	54 (26.3)			
Lymphknoten-metastasen	keine Metastasen	163 (79.5)	0.812	0.566 - 1.167	0.261
	Metastasen	42 (20.5)			
PIK3CA Status	Wildtyp	193 (92.8)	0.638	0.368 - 1.105	0.109
	Mutation	15 (7.2)			
RAS Status	Wildtyp	101 (48.6)	0.885	0.661 – 1.186	0.414
	Mutation	107 (51.4)			
EGFR Expression	hohe Expression	71 (34.1)	1.089	0.799 – 1.483	0.591
	niedrige Expression	137 (65.9)			
AREG Expression	hohe Expression	31 (16.1)	0.716	0.476 – 1.078	0.109
	niedrige Expression	161 (83.9)			
EREG Expression	hohe Expression	89 (46.4)	0.480	0.351 – 0.657	< 0.001
	niedrige Expression	103 (53.6)			

Tabelle 5: Vergleich der Biomarker und Baseline-Charakteristika anhand der Hazard ratio. **Legende:** no. = Anzahl, 95% KI = 95% Konfidenzintervall.

metastasierten kolorektalen Karzinom. Lediglich der Karnofsky-Index und die Epiregulin-Expression erwiesen sich gegenüber allen Faktoren als prognostische und statistisch signifikante Faktoren.

5. Diskussion

Zusammenfassung der Analyse des FIRE1-Subsets

Das Ziel dieser Dissertation war es, die mRNA-Expression der *EGFR*-Liganden Amphiregulin und Epiregulin als prognostischen Faktor in Verbindung mit möglichen Interaktionen wie *RAS*, *PIK3CA* und *EGFR* retrospektiv zu evaluieren. Das Kollektiv von 208 Patienten basierte auf einer Chemotherapie-Studie ohne Verwendung von *EGFR*-Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab. Dadurch konnte ein prognostischer Effekt untersucht werden. Hiermit sollte eine Datenlücke geschlossen werden, da den vorher durchgeführten Untersuchungen ausschließlich antikörperbasierte Therapieregime zugrunde lagen und die Expression von *AREG* und *EREG* daher bislang als potentieller prädiktiver Biomarker galt.

EGFR-Expression und *RAS* – Mutationsstatus zeigten keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Der *PIK3CA* – Status konnte innerhalb der multivariaten Regressionsanalyse als möglicher prognostischer Faktor im FIRE1-Subset beschrieben werden. Eine gesteigerte Amphiregulin-Expression führte zu einem tendenziell verlängerten Gesamtüberleben und einem signifikant prolongierten progressionsfreien Überleben. Eine hohe Epiregulin-Expression erwies sich signifikant als unabhängiger, prognostisch günstiger Biomarker im progressionsfreien und Gesamtüberleben.

Diese Untersuchung repräsentiert nach bisherigem Wissensstand durch eine Fallzahl von 192 Patienten eine der größten Studienpopulationen, die jemals Amphiregulin und Epiregulin als Biomarker innerhalb einer randomisierten, kontrollierten Studie untersucht haben.^{74, 75, 77, 78, 80, 82, 84, 94}

RAS- und *PI3KCA*-Status als prognostische Biomarker im mCRC

Die Nukleinsäuren wurden aus Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded- (FFPE-) Gewebe extrahiert. Damit war die DNA- und RNA-Qualität mit den meisten früher durchgeführten Studien vergleichbar.^{75-78, 80, 90, 95, 96} Alternativ dazu wäre eine Isolation aus Fresh Frozen (FF-) Gewebe möglich.^{91, 97} Da bei Nukleinsäuren aus

FFPE-Gewebe eine vermehrte Methylierung und Fragmentation denkbar ist, könnte die Qualität der Messungen gegenüber Fresh Frozen Gewebe beeinträchtigt sein.

Der Anteil an *KRAS*-Mutationen in Codon 12 und 13 betrug im Subset der FIRE1-Studie 38.9 % (n = 81). Damit konnte das FIRE1-Subset die Resultate vieler vorheriger Studien bestätigen.^{29, 30, 32, 66-69, 96, 98-106} Die übrigen *RAS*-Mutationen (*KRAS* Codon 61 und 146, *NRAS* Codon 12, 13 und 61) wurden in 12.5 % aller Patienten gefunden. Verglichen mit kürzlich durchgeführten Untersuchungen ist der Anteil des FIRE1-Subsets nur etwas niedriger (PEAK: 23.0 %; FIRE3: 16.0 %; CRYSTAL: 14.7 %).⁷¹⁻⁷³

Die Rolle von *RAS*-Mutationen als prognostischer Faktor im metastasierten kolorektalen Karzinom ist aufgrund fehlender Analysen von *EGFR*-Antikörper-freien Kollektiven nicht abschließend geklärt. Die FIRE1-Studie inkludierte Patienten mit einem bereits metastasierten kolorektalen Karzinom. Die Behandlung basierte auf Chemotherapie und enthielt keine monoklonalen Antikörper in der Erstlinientherapie. Im FIRE1-Subset zeigten Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-*RAS* Tumoren und *RAS*-mutierten Tumoren. Wildtyp-*RAS* Tumore zeigten lediglich einen nicht-signifikanten Trend bezüglich besseren Gesamtüberlebens.

Der *KRAS* Exon 2 – Status wurde bereits von vielen Studien als prädiktiver Marker in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab evaluiert.^{29, 30, 32, 67-69, 96, 99-101, 106} Mutationen in Exon 2 des *KRAS*-Gens wirkten sich hierbei ungünstig auf das Therapieansprechen aus. Allerdings konnte auch das Vorliegen eines *KRAS*-Wildtyps das Profitieren von einer antikörperbasierten Therapie nicht garantieren. Daher etablierte sich das erweiterte *RAS*-Screening mit Untersuchung der Exone 2, 3 und 4 des *KRAS* – und *NRAS* – Gens. Hiermit wurden weitere Patienten identifiziert, die zwar keine Mutation in *KRAS* Exon 2, jedoch andere Mutationen in *KRAS* Exon 3 und 4 sowie in *NRAS* Exon 2, 3 und 4 aufwiesen und dadurch nicht von der Therapie profitieren konnten.⁷¹⁻⁷³ Weiterhin bestätigte eine Studie *KRAS* Exon 2 – Mutationen als prädiktiven Faktor bei Cetuximab-

Zweitlinientherapie.⁹⁷ Zwei Untersuchungen zeigten jedoch keine günstigere Prognose von KRAS-Wildtyp-Patienten in Bezug auf Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben.^{102, 105}

Zusammenfassend ist die Rolle von *RAS*-Mutationen als prädiktive Biomarker in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern unbestritten. Allerdings scheint der *RAS*-Status eine geringe prognostische Information zu tragen, die teilweise durch *EGFR*-Inhibitoren maskiert wird. Die Patientenzahl des FIRE1-Subsets ist verglichen mit früheren Studien möglicherweise zu klein, um diesbezüglich eine abschließende Aussage ableiten zu können.

PIK3CA-Mutationen traten in 7.7 % der untersuchten Patienten auf und verteilten sich gleichermaßen auf die Exone 9 und 20. Der Mutationsanteil ist damit etwas geringer als in den vorherigen Studien.^{28, 107-110} Eine Analyse wies einen Anteil von 2.2 % *PIK3CA* Exon 20 Mutationen auf.¹¹¹ Im Subset der FIRE1-Studie konnte in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse eine negative prognostische Information für *PIK3CA*-Mutationen unabhängig der Exon-Lokalisation beobachtet werden. Im Vergleich zu ähnlichen Analysen war die FIRE1-Subpopulation jedoch kleiner. Andere Untersuchungen bestätigen diesen Effekt nur für Doppelmutationen in *PIK3CA* Exon 9 und 20 oder für alleinige Mutationen in Exon 20.^{28, 107, 112, 113}

EGFR-Expression korreliert nicht mit dem Therapieansprechen

Um eine Überexpression des *EGF*-Rezeptors festzustellen, wurde von 208 Patienten eine automatisierte immunhistochemische Färbung angefertigt.⁹³ Im Kollektiv der FIRE1-Studie wurde das von Neumann et al. entwickelte Bewertungssystem übernommen,⁹³ wodurch 34.1 % (n = 71) Patienten eine hohe *EGFR*-Expression an den Zellmembranen kolorektaler Tumorzellen aufwiesen im Gegensatz zu 8.8 % bei Neumann et al. selbst. Allerdings wurde im FIRE1-Subset anstelle eines empirischen Schwellenwertes von 200 eine ROC-Analyse durchgeführt, um den Schwellenwert mit der höchsten Sensitivität und Spezifität ermitteln. Dadurch wurde das Bewertungssystem objektiver und die Fallzahlen

könnten sich verschoben haben. Andere Studien untersuchten die Kopiezahl des Gens mithilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).¹¹⁴⁻¹¹⁷ Der Vorteil hierbei gegenüber einer Immunhistochemie ist eine genauere Aussage über die Amplifikation eines Gens. Bisher hat sich noch kein einheitlicher Score zur Klassifizierung hoher und niedriger Expression in der immunhistochemischen Färbung etabliert. Die Ergebnisse variieren daher stark in Abhängigkeit von dem zugrundeliegenden Cut-Off. Aufgrund nicht einheitlicher Scoring-Systeme in der Bewertung immunhistochemischer *EGFR*-Expression ist die Aussagekraft bezüglich Prävalenz und Prognose daher eingeschränkt.

Epiregulin als prognostischer Biomarker des mCRC

Die Quantifizierung der mRNA-Expression in 192 Patienten wurde in dieser Arbeit mittels RT-qPCR durchgeführt.^{75-78, 80} Der Vorteil dieser Methode liegt in einer sensitiven und genauen Erfassung auch kleinerer Unterschiede, auch wenn kein einheitlicher Schwellenwert zur Unterscheidung hoher und niedriger Expression vorliegt. Der Erfolg einer Messung kann mit Positiv- und Negativkontrolle nachgewiesen werden. Für das Subset der FIRE1-Studie wurde versucht, mit statistischer Methodik unter Verwendung einer ROC-Analyse einen objektiven, signifikanten Schwellenwert zu ermitteln. Diese Methode lehnte sich an andere Studien an, welche ebenfalls das Maximum von Sensitivität und Spezifität als Basis einer Dichotomisierung benutzt haben.^{75, 78} Im Subset der FIRE1-Studie konnte kein signifikanter Cut-Off für Amphiregulin gefunden werden. Die Verteilung der einzelnen Messwerte grenzte an Zufall. Hinsichtlich Epiregulin war die ROC-Analyse des FIRE1-Subsets erfolgreich. Hier konnte ein hochsignifikanter Schwellenwert zur Unterscheidung hoher und niedriger Expression gefunden werden. Für Amphiregulin ergab die Analyse einen Anteil von 16.1 % (n = 31) hoher Expression (AUC: 0.546; 95 % KI: 0.461 – 0.630; p = 0.277). 89 Patienten (46.4 %) wiesen eine hohe Epiregulin-Expression auf (AUC: 0.624; 95 % KI: 0.543 – 0.705; p = 0.003). Der Anteil an Patienten mit hoher *AREG*-Expression schwankt und wurde in anderen Analysen als größer beschrieben.^{74, 77-79, 94} Dieser Umstand könnte durch eine mögliche prädiktive Aussagekraft von Amphiregulin für eine Therapie mit Cetuximab begründet sein. Trotz Verwendung

unterschiedlicher Methoden und Cut-Offs korrelierte der Anteil von Patienten mit einer hohen *EREG*-Expression mit früheren Studien.^{74-76, 94}

Zwei Analysen unterschieden die Ligandenexpression durch die Färbungsintensität in der Immunhistochemie.^{79, 94} Die Aussagekraft ist aber durch eine begrenzte Abstufung (0, +, ++, +++), durch einen fehlenden einheitlichen Schwellenwert zur Unterscheidung hoher und niedriger Expression sowie durch die Subjektivität des Untersuchers eingeschränkt. Generell konnte unter Verwendung einer immun-histochemischen Färbung eine höhere Prävalenz der *AREG*- und *EREG*-Expression beobachtet werden.^{79, 94} Zwei Untersuchungen verwendeten die mediane Signalintensität als Schwellenwert zur Unterscheidung von hoher und niedriger Expression.^{74, 80} Weiterhin existierte der Schwellenwert nach minimum-p-value-Methode. Hierbei wird der Cut-Off mit dem niedrigsten signifikanten p-Wert ausgewählt.^{76, 77} Die bislang neueste Untersuchung verwendete das oberste Terzil als Schwellenwert.⁸⁴ Diese Studien unterstreichen die Varianz der einzelnen Ergebnisse je nach verwendetem Cut-Off.

Abschließend ist die Einigung auf eine einheitliche und praktikable Methode zur Dichotomisierung unabdingbar. Nur so werden in Zukunft vergleichbare Resultate produziert werden können. Dafür sind allerdings noch weitere Studien notwendig. Dadurch könnte die Bestimmung der Amphi- und Epiregulin-Expression eine individuelle Unterstützung bei der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms bieten.

Der positive prognostische Effekt der hohen *AREG*-Expression in 16 % der Patienten konnte für das progressionsfreie Überleben statistisch signifikant aufgezeigt werden. Im Gesamtüberleben zeigte sich lediglich ein nicht-signifikanter Trend. Trotzdem wurde die Amphiregulin-Expression in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse weder für das progressionsfreie Überleben noch für das Gesamtüberleben als prognostischer Biomarker verifiziert. Diese Ergebnisse bestätigten bereits vorher durchgeführte Studien.^{76, 80} Größtenteils ließ sich jedoch ein prädiktiver Effekt einer hohen Amphiregulin-Expression unter einer Therapie mit Cetuximab nachweisen.^{74, 75, 77, 78, 94, 118} Diese Resultate widersprechen denen

der vorliegenden Arbeit nicht, da das vorliegende Kollektiv rein auf Chemotherapie ohne Verwendung monoklonaler Antikörper basiert.

Anders als Amphiregulin korrelierte eine hohe Epiregulin-Expression im Subset der FIRE1-Studie mit einem prolongierten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben unabhängig aller Subgruppenanalysen. Der Effekt einer hohen *EREG*-Expression war in der vorliegenden Arbeit somit nicht mit dem *RAS*-Status, dem *PIK3CA*-Status und der membranständigen Expression des *EGF*-Rezeptors assoziiert. Eine frühere Analyse zeigte ebenfalls einen positiven *KRAS*-unabhängigen Effekt.⁷⁷ Darüber hinaus wurde eine hohe *EREG*-Expression als unabhängig prognostischer Faktor in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine hohe *EREG*-Expression eine statistisch signifikante prognostische Information für Patienten beinhaltet, die eine Erstlinientherapie zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms erhalten.

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit ist limitiert. Es fehlte, wie auch bei früheren Studien, ein weiteres Kollektiv mit einer vergleichbaren Studienpopulation, um die Ergebnisse zu validieren. Da sich mittlerweile die Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab, Panitumumab oder Bevacizumab in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms etabliert hat, war es nicht möglich, ein geeignetes Kollektiv zu erwerben und eine erneute Testung durchzuführen. Die FIRE1-Studie stoppte 2004 mit der Patientenrekrutierung und empfahl gemäß Studienprotokoll eine Crossover-Behandlung (d.h. einen Wechsel in den jeweils anderen Studienarm) als Zweitlinientherapie. Dahingehend ist es sehr unwahrscheinlich, dass Patienten der vorliegenden Arbeit im Nachhinein mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab oder Panitumumab behandelt wurden. Trotzdem könnte diese Behandlung einen kleinen möglichen Confounder für die Subset-Analyse der FIRE1-Studie darstellen.

Eine Micro-Array-Analyse von 110 Patienten unter Cetuximab-Monotherapie korrelierte eine hohe *AREG* und *EREG* Expression mit einer wahrscheinlicheren Krankheitskontrollrate. Eine weitere Stratifizierung nach *KRAS*-Status bekräftigte diesen Effekt für *KRAS*-Wildtyp-Tumore. Die hazard ratios hinsichtlich

des progressionsfreien Überlebens mit 0.47 für *EREG* und 0.44 für *AREG* sind mit der Subset-Analyse der FIRE1-Studie vergleichbar (*AREG* und *EREG* jeweils 0.62).⁷⁴ Eine größere Analyse von 220 Patienten unter Cetuximab-Irinotecan-Therapie zeigte ein größeres Ansprechen sowie ein verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben von *KRAS*-Wildtyp-Patienten verglichen mit *KRAS*-mutierten Tumoren. *KRAS*-Wildtyp-Tumore mit einer Ligandenexpression unterhalb des definierten Schwellenwerts zur Dichotomisierung wiesen eine ähnliche Überlebensrate auf wie *KRAS*-mutierte Tumore.⁷⁵ Innerhalb eines Vier-Gen-Models war eine hohe Ligandenexpression prädiktiv für eine Therapie mit Cetuximab. Offen ist, ob der günstige Effekt auf das Langzeitüberleben der Patienten durch alle vier Gene gleichermaßen zustande kommt, oder ob der positive Einfluss von Amphiregulin und Epiregulin überwiegt.⁷⁸ In einer Vergleichsgruppen-Analyse (Cetuximab vs. best supportive care) fand nur in der Subgruppe von *KRAS*-Wildtyp-Tumoren mit einer hohen Epiregulin-Expression eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens in der Cetuximab-Gruppe statt.⁷⁶

Dem gegenüber konnte eine kleinere Studie mit 120 Patienten unter Cetuximab-Therapie zeigen, dass sich eine niedrigere *EREG*-Expression günstig auf das Gesamtüberleben in Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-Tumoren auswirkt. Allerdings konnte dieser Effekt lediglich in der Primärtumor-Analyse nachgewiesen werden.⁸⁰ In einer Analyse von 73 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde gezeigt, dass ein hoher Spiegel von Amphiregulin im Serum und als immunhistochemische Färbung im Gewebe sowie ein hoher Epiregulin-Spiegel im Gewebe signifikant mit der Tiefe einer Invasion und dem Vorhandensein von Fernmetastasen korrelierte.⁷⁹ Damit würden diese Resultate der gängigen Theorie einer Aktivierung der Tumorzellproliferation eher entsprechen als der Großteil anderer Studien. Allerdings wiesen die meisten Patienten ein lokal begrenztes Tumorstadium auf. Zusammen mit der geringen Studienpopulation ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse daher eingeschränkt.

Eine gängige biologische Erklärung für den positiven Effekt einer Überexpression von *EGFR*-Liganden existiert momentan noch nicht. Eine gesteigerte Ligandenexpression würde auf ein vermehrtes Proliferationsverhalten der Tumorzellen mit ungünstigerer Prognose schließen lassen. Obwohl Epiregulin jedoch an den *EGFR* bindet und so die Signaltransduktion aktivieren müsste, bestand in der Subset-Analyse der FIRE1-Studie kein quantitativer Zusammenhang zwischen *EREG* und *EGFR*-Expression. Jonker et al. hingegen schlugen einen autokrinen Inhibitionsmechanismus vor, sodass eine hohe Ligandenexpression das Wachstumsverhalten der Zelle hemmt.⁷⁶ Allerdings ist bislang nicht klar, ob jede mRNA auch in ein funktionsfähiges Protein translatiert werden kann. Wenn man diesem und Jonkers Gedankengang folgt, liegt die Vermutung nahe, dass eine hohe Expression nicht unbedingt zu funktionsfähigen Proteinen führen muss. Eine übersteigerte Transkription könnte das Zeichen einer defekten Translation sein. In diesem Fall könnten defekte Liganden unfähig sein, den *EGF*-Rezeptor zu binden und die Proliferation der Tumorzelle anzuregen. Als Folge könnte die Tumorzelle versuchen, diesen Defekt durch übersteigerte Expression zu kompensieren. Andererseits könnte ebenfalls eine Mutation im *EGF*-Rezeptor selbst vorliegen, sodass die Bindungsstelle für die Liganden modifiziert sein könnte.

Abschließend muss jedoch auch betont werden, dass Epiregulin nicht alleine an den *EGFR*, sondern auch an den *HER4*-Rezeptor bindet.⁶¹ Durch die breitgestreute Aktivierung nachgeschalteter downstream Elemente des Signalwegs ist nicht auszuschließen, dass weitere Biomarker im Zusammenhang mit Epiregulin zu diesem prognostisch günstigen Effekt beitragen. Dahingehend werden noch weitere Studien nötig sein, um die Zusammenhänge zwischen einer gesteigerten *EREG*-Expression und einem günstigeren Krankheitsverlauf im metastasierten kolorektalen Karzinom endgültig zu klären.

6. Zusammenfassung

Diese Dissertation korrelierte die mRNA-Expression der *EGFR*-Liganden Amphiregulin (*AREG*) und Epiregulin (*EREG*) mit dem progressionsfreien (PFS) und Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom (mCRC). Zusätzlich wurde die Expression des Epidermal Growth Factor Receptors (*EGFR*) immunhistochemisch bestimmt sowie der Mutationsstatus für die Proteine *RAS* und *PIK3CA* unter Verwendung der Pyrosequenzierung erhoben. Das Kollektiv basierte auf der FIRE1-Studie und bestand aus 208 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom unter 5-Fluoruracil / Leucovorin / Irinotecan – Therapie (FUFIRI) oder unter einem modifizierten Regime aus Irinotecan und Oxaliplatin (mIrOx). Die molekularen Charakteristika der Patienten wurden mit dem Therapieansprechen, dem progressionsfreien Überleben (PFS) und dem Gesamtüberleben (OS) korreliert. Mit Hilfe einer ROC-Analyse wurde die mRNA-Expression in 192 Tumoren untersucht (*AREG* high n=31 vs. low n=161; *EREG* high n=89 vs. low n=103). Hohe versus niedrige *AREG* Expression wies ein PFS von 10.0 vs. 8.0 Monaten (HR = 0.62, 95% KI: 0.402 – 0.940, p = 0.03) und ein OS von 24.6 vs. 18.7 months (HR = 0.72, 95% KI: 0.476 – 1.078, p = 0.11) auf. Hohe versus niedrige *EREG* Expression korrelierte mit verlängerterem PFS (9.4 vs. 6.8 Monate, HR = 0.62, 95% KI: 0.460 – 0.846, p = 0.002) und OS (25.8 vs. 15.5 Monate, HR = 0.48, 95% KI: 0.351 – 0.657, p < 0.001). Der positive prognostische Effekt einer hohen *EREG* Expression konnte in einer multivariaten Regressionsanalyse bestätigt werden und wurde weder von der *EGFR* Expression noch von Mutationen der *RAS*- oder *PIK3CA*-Gene beeinflusst. Somit erscheint eine hohe *EREG* Expression als unabhängiger prognostischer Biomarker in Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom, die eine auf Irinotecan basierende Chemotherapie als Erstlinientherapie erhalten.

7. Anhang

7.1. Material

Geräte

QiaCube	QiaGen
Thermomixer	Eppendorf
MasterCycler	Eppendorf
PyroMark Q24	QiaGen
ABI3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
LightCycler	Roche
NanoDrop	ThermoScientific
Megafuge 1.0R	Heraeus
Ventana Benchmark XT Autostainer	Ventana
Mikrowelle	Toshiba

Kits

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	QiaGen
HotStarTaq-Polymerase DNA Kit	QiaGen
Pyromark Q24 Gold Kit	QiaGen
Multiplex PCR Kit	QiaGen
RNeasy FFPE Tissue Kit	QiaGen
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QiaGen
DyeEx 2.0 Spin Kit	QiaGen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoScientific
XT Ultra View diaminobenzidine Kit	Ventana Medical Systems

Reagenzien

Xylol	Roth
Ethanol	Roth
Aqua steril	Braun
Desoxyribonukleotide, 20 mM	GE Healthcare
Annealing Buffer	QiaGen
Binding Buffer	QiaGen
WashBuffer 10x	QiaGen
Denaturation Solution	QiaGen
Streptavidin Sepharose Beads	VWR International
Male DNA	Promega
Universal Probe Library	Roche
ProbeMaster	Roche
Anti-EGFR monoclonal mouse AB (3C6)	Ventana Medical Systems

Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Gefäße 1,5ml, 2ml	Eppendorf
8-stripes 0,2ml	Eppendorf
Pipettenspitzen	Biozym
Sterile Skalpellklinge Fig.28 VE	Neolab
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	QiaGen
Rotor Adapters	QiaGen
24-well-PCR-Platten, 0,2 ml	Brand
Pyromark Q24 Plate 100, version 1	QiaGen
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
LightCycler® 480 Sealing foil	Roche

Software

PyroMark Q24 Software

QiaGen

LightCycler-Software

Roche

ProbeFinder

Roche

SPSS PASW Version 18

IBM

SAS 9.2

SAS Institute

Primer

Verwendete Primer				
Gen-Name	Bezeichnung	Sequenz [5'....3']	Modifikation 5'	Analysesequenz
KRAS Ex 2	Forward	TAAGCCTGCTGAAAATGACTGAA	biotinyliert	GNTGRCGTAGGCAA
	Reverse	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT		
	Sequencing	TGTGGTAGTTGGAGCT		
KRAS Ex 3	Forward	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCA		GTC/G/ANA/CTGAGGAGTACAGTCAATGA
	Reverse	CTCATGTACTGGTCCCTCATTG	biotinyliert	
	Sequencing	ATATTCTCGACACAGCAG		
KRAS Ex 4	Forward	AGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTT		CAG/C/AC/TAAAGACAAGACAGG
	Reverse	GCCCTCTCAAGACAAAAACAT	biotinyliert	
	Sequencing	AATTCCTTTTATTGAAACAT		
BRAF Ex 11	Forward	CAGTGGGACAAAGAATTGGATCTG	biotinyliert	TNCAA/CATGATCCA
	Reverse	CCATGCCACTTCCCTTGTAGA		
	Sequencing	ACTTCCCTTGACTACTGT		
BRAF Ex 15	Forward	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG		TC/GTAGCTACG/AG/AT/A/GG/TAAATCT
	Reverse	TCCAGACAAGTTCAAACTGAT	biotinyliert	
	Sequencing	GTAAAAATAGGTGATTTTGG		
NRAS Ex 2	Forward	CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG		CANGTNGTGTTGRGAA
	Reverse	TGGATTGTCAGTGCCTTTT	biotinyliert	
	Sequencing	TGGTGGTGGTTGGAG		
NRAS Ex 3	Forward	GGTGAAACCTGTTTGTGGACATA		TGGWCNHGAAGAGT
	Reverse	GGTCTCTCATGGCACTGTACTCTT	biotinyliert	
	Sequencing	GGACATACTGGATACAGC		
NRAS Ex 4	Forward	CGAACTGGCCAAGAGTTACG		TCARCCAAGACCAG
	Reverse	TGAAAGCTGTACCATACCTGTCTG	biotinyliert	
	Sequencing	TCCATTCAATTGAAACCT		
PIK3 Ex 9	Forward	AACAGCTCAAAGCAATTTCTACAG	biotinyliert	G/T/ACTC/TAGTGATTTT/TAGAGAGA-GATCTCGTGTAGAAATT
	Reverse	ACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTT		
	Sequencing	CCATAGAAAATCTTTCTCCT		
PIK3 Ex 20	Forward	CAAGAGGCTTTGGAGTATTTC	biotinyliert	TGAT/AG/ATG/TCATCA/CTTC/AATTTG
	Reverse	CAATCCATTTTGTGTCCA		
	Sequencing	GTTGTCCAGCCACCA		
Amphiregulin (AREG)	u	CGGAGAATGCAAATATATAGAGCAC		
	l	CACCGAAATATTCTTGCTGACA		
Epiregulin (EREG)	u	TGGTCTTCACTCAGGTCTCA		
	l	CGTGAGTTGGCATAGGGAAC		
β -Actin	u	CCAACCGGAGAAGATGA		
	l	CCAGAGGCGTACAGGGATAG		

Tabelle 6: Verwendete Primer.

7.2. Ausführliche Protokolle

DNA-Isolation (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit)

- Makrodissektion der Tumorzellen mit Skalpell und Lyse in 180 µl ATL-Puffer (70°C) und 20 µl Protease K
- Inkubation im ThermoMixer (Fa. Eppendorf) für 5 h bei 56°C
- Erhitzen auf 90°C für 10 min
- Bestücken des Isolierroboters „QIACube“ (Fa. Qiagen)
- Zufügen von 200 µl Lyse-Puffer AL
- Zufügen von 200 µl Ethanol 70 %
- Mischen und Überführung in QiaAmp MinElute Column
- Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 min
- Waschen des Lysats mit 500 µl AW1-Puffer
- Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 min
- Waschen des Lysats mit 500 µl AW2-Puffer
- Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 min
- Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 3 min zur Trocknung der Membran
- Transport der QiaAmp MinElute Column auf ein 1,5ml Eppendorf Gefäß
- Lösung der DNA in 60 µl ATE-Puffer
- Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 1 min

DNA-Amplifikation (HotStarTaq DNA Polymerase Kit 1000 U)

- Verdünnung der Primer von einer Ausgangskonzentration von 100 pmol / µl auf 20 pM
- Ansetzen eines Mastermixes gemäß dem unten aufgeführten Pipettieransatzes:

<u>Vorgehensweise bei einer Polymerasekettenreaktion</u>							
Pipettieransatz				Protokoll			
Stock		pro Patient		50 Zyklen bei Annealing Temperatur von 60°C			
		[µl]					
H ₂ O			32,60		1x	95°C	15 min
10xbuffer (incl. 15 mM MgCl ₂)			4,00		50x	95°C	30 s
dNTP	20	mM	0,40			60°C	30 s
Primer-Mix	20	pM	0,80			72°C	30 s
Taq-Polymerase	5	U/µl	0,2		1x	72°C	2 min
			38 µl				

Tabelle 7: Vorgehensweise bei einer Polymerasekettenreaktion.

- Zufügen von 2 µl DNA-Lysat
- PCR-Reaktion gemäß Protokoll im MasterCycler (Fa. Eppendorf)

Pyrosequenzierung (PyroMark Gold Q24 Kit)

- Erstellung eines Mastermixes:

Mastermix für Pyrosequenzierung	
	pro Patient [μ l]
Streptavidin-Beads	2 μ l
HPLC gereinigtes Wasser	23 μ l
Binding Buffer	40 μ l
	65 μ l

Tabelle 8: Mastermix für Pyrosequenzierung.

- Pipettieren von 65 μ l Mastermix auf eine 24-well-Platte
- Hinzufügen von 15 μ l PCR-Produkt
- Rütteln der Mixtur für 5 min bei moderater Stärke
- Verdünnung des Sequenzierprimers mit Annealing Buffer von 100 pM auf 0,3 pM
- Pipettieren von 25 μ l Sequenzierprimer-Lösung auf eine Analyse-Platte mit Wasser als Negativ-Kontrolle
- Start einer kompressorbetriebenen Nadel-Saug-Vorrichtung
- Waschen der Nadeln mit destilliertem Wasser für 10 sec
- Ansaugen des PCR-Produkt-haltigen Mastermixes
- Waschen der Beads in Ethanol 70 % für 5 sec
- Denaturierung der DNA in Denaturation Solution für 5 sec
- Waschen der Beads in Waschpuffer für 10 sec
- Lufttrocknung der Beads für 10 sec
- Ausschalten des Sogs
- Platzieren der Nadelvorrichtung auf der Analyse-Platte
- Lösung der Beads in der Sequenzierprimer-Lösung durch Rütteln
- Erhitzen der Platte auf 80°C für 2 min
- Abkühlen der Platte für 5 min
- Zweifache Spülung der Dispensationseinheit mit destilliertem Wasser
- Befüllung der Dispensationseinheit mit den Nukleotiden A, T, G, C, sowie der Enzym- und Substrat-Lösung
- Überführung der abgekühlten Analyse-Platte und der Dispensationseinheit in den Pyrosequencer
- Analyse der Analysesequenz (siehe unten)

RNA-Isolation (RNeasy FFPE Kit)

- Makrodissektion der Tumorzellen mit Skalpell und Lyse in 150 μ l PKD-Puffer und 10 μ l Protease K
- Inkubation im ThermoMixer (Fa. Eppendorf) für 15 min bei 55°C
- Erhitzen auf 80°C für 15 min
- Bestücken des Isolierroboters „QIACube“ (Fa. Qiagen)
- Zufügen von 320 μ l RBC-Puffer
- Überführung in eine gDNA Eliminator spin column
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 30 sec

- Abwurf der gDNA Eliminator spin column
- Mischen des Lysats mit 720 µl Ethanol 100 %
- Übertragung auf RNeasy MinElute spin column
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 15 sec
- Zufügen von 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 15 sec
- Zufügen von 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 2 min
- Trocknung der Säulenmembran durch Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 5 min
- Transport der RNeasy MinElute spin column auf ein 1,5ml Eppendorf Gefäß
- Lösung der RNA in 22 µl RNase-freiem Wasser
- Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 1 min

RNA-Reinigung (RNeasy MinElute CleanUp Kit + RNase-free DNase Set)

- Lösung der lyophilisierten DNase I in 550 µl RNase-freiem Wasser
- Zufügen von 2,5 µl DNase I zu jeder isolierten RNA-Probe
- Zufügen von 10 µl RDD-Puffer
- Adjustierung des Gesamtvolumens auf 100 µl mit 68,5 µl RNase-freiem Wasser
- Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
- Zufügen von 350 µl RLT-Puffer
- Zufügen von 250 µl Ethanol 100 %
- Übertragung der Lösung auf eine RNeasy MinElute spin column mit 2ml Eppendorf-Gefäß
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 15 sec
- Transport der RNeasy MinElute spin column auf ein neues 2ml Eppendorf-Gefäß
- Waschen der Säulenmembran mit 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 15 sec
- Waschen der Säulenmembran mit 500 µl Ethanol 80 %
- Zentrifugieren bei 10 000 rpm für 2 min
- Trocknung der Säulenmembran durch Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 2 min
- Lösung der RNA in 22 µl RNase-freiem Wasser
- Zentrifugieren bei 14 000 rpm für 1 min

Reverse Transkription (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)

- Ermittlung des Volumens eines RNA-Gehalts von 150 ng
- Zufügen von 1 µl Random Hexamer Primer
- Adjustierung des Gesamtvolumens auf 12,5 µl mit RNase-freiem Wasser
- Inkubation bei 65°C für 5 min
- Sofortige Abkühlung der Proben nach Inkubation auf Eis
- Abzentrifugieren der Proben

- Erstellung eines Mastermix:

Vorgehensweise bei einer Reversen Transkription						
Pipettieransatz				Protokoll		
Stock		pro Patient [μ l]		Bei Annealing Temperatur von 42°C		
Ribolock RNase Inhibitor		0,5		1x	25°C	10 min
5x reaction buffer		4,00		1x	42°C	60 min
dNTP	10 mM	2,00				
RevertAid Reverse Transcriptase		1,00				
			7,5 μ l	1x	72°C	10 min

Tabelle 9: Vorgehensweise bei einer Reversen Transkription.

- Zufügen von 7,5 μ l Mastermix zu 12,5 μ l RNA-Probe
- RT-Reaktion gemäß Protokoll im MasterCycler (Fa. Eppendorf)

cDNA-Quantifizierung mittels RT-qPCR

- Herstellung eines Mastermix:

Vorgehensweise bei einer RT-qPCR					
Pipettieransatz β-Actin		Pipettieransatz AREG		Pipettieransatz EREG	
	pro Patient [μ l]		pro Patient [μ l]		pro Patient [μ l]
Roche Probe Master	5	Roche Probe Master	5	Roche Probe Master	5
RNase-freies Wasser	2,78	RNase-freies Wasser	2,78	RNase-freies Wasser	2,78
β -Actin u Primer (100 pM)	0,09	AREG u Primer (100 pM)	0,09	EREG u Primer (100 pM)	0,09
β -Actin I Primer (100 pM)	0,03	AREG I Primer (100 pM)	0,03	EREG I Primer (100 pM)	0,03
Probe # 64	0,1	Probe # 38	0,1	Probe # 86	0,1

Tabelle 10: Vorgehensweise bei einer RT-qPCR.

- Zufügen von 8 µl Mastermix in eine gekühlte Roche 96-Multiwell-Platte
- Zufügen von 2 µl cDNA
- Versiegelung der Platten mit Folie
- Abzentrifugieren der Platten bei 1000 rpm für 1 min
- Vermessung der Platte im Light Cycler gemäß Protokoll:

Temperaturprotokoll für RT-qPCR			
Zyklen	Temp.	Zeit	Ramp rate
1x	95°C	10 min	4.4 °C/s
45x	95°C	10 sec	4.4 °C/s
	60°C	15 sec	2.2 °C/s
1x	40°C	30 sec	2.2 °C/s

Tabelle 11: Temperaturprotokoll für RT-qPCR.

7.3. Abkürzungsverzeichnis

<i>AKT</i>	AKR mouse Thymoma inducing
<i>AREG</i>	Amphiregulin
<i>ATP</i>	Adenosin-Triphosphat
<i>AUC</i>	Area under curve
<i>BRAF</i>	RAS Associated Factor B
<i>BSC</i>	best supportive care
<i>BTC</i>	Betacellulin
<i>C</i>	Celsius
<i>CAPIRI</i>	Capecitabin / Irinotecan
<i>CAPOX</i>	Capecitabin / Oxaliplatin
<i>cDNA</i>	copy Desoxyribonukleinsäure
<i>C_P</i>	Crossing point
<i>CR-1</i>	Cripto-1
<i>C_T</i>	Cycle threshold
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>DNase</i>	Desoxyribonuklease
<i>dNTP</i>	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>DUSP6</i>	Dual Specificity Phosphatase 6
<i>EGF</i>	Epidermal growth factor
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>ERCC</i>	Excision repair cross-complementation
<i>EREG</i>	Epiregulin

et al.	et alii
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FF	Fresh Frozen (tissue)
FFPE	Formalin fixiert Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
FOLFOX	5-Fluoruracil / Leucovorin / Oxaliplatin
FUFIRI	5-Fluoruracil / Leucovorin / Irinotecan
<i>GRB2</i>	Growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanin-Triphosphat
<i>HB-EGF</i>	Heparin-binding EGF-like Growth Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>HER</i>	Human epidermal growth factor receptor
HPLC	High performance liquid chromatography
HNPC	Hereditäres Nicht-Polypöses Colon Carcinom
HR	Hazard ratio
i.v.	intravenös
KI	Konfidenzintervall
<i>KRAS</i>	Kirsten Rat Sarcoma
m ²	Quadratmeter
<i>MAPK</i>	Mitogen Activated Protein Kinase (= MEK)
mCRC/mKRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
<i>MEK</i>	Mitogen Activated Protein Kinase (= MAPK)
mg	Milligramm

mIrOx	Irinotecan / Oxaliplatin (modifiziert)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MUT	mutiert
ng	Nanogramm
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
<i>NRG</i>	Neuregulin
ORR	Overall response rate
OS	Overall survival, Gesamtüberleben
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PDK1</i>	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFS	progressionsfreies Überleben
<i>PI3K / PIK3CA</i>	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
pmol	Picomol
PPi	anorganisches Pyrophosphat
<i>RAF</i>	RAS Associated Factor
<i>RAS</i>	Rat Sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operator Characteristic
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
<i>SLC26A3</i>	solute carrier family 26 member 3
SOS	Son Of Seven
Taq	Thermophilus aquaticus
<i>TGF α</i>	Transforming Growth Factor α

U	Unit
<i>VEGF-R</i>	Vascular endothelial growth factor receptor
WT	Wildtyp
μl	Mykroliter
μM	Mykromolar

8. Danksagungen

Folgenden Personen möchte ich danken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre:

- Prof. Dr. med. Volker Heinemann für die Überlassung des Themas, für die Teilnahme an den Kongressen der ASCO, DGHO und AIO, sowie für die Reviews der Dissertation und der Publikation
- PD Dr. med. Dominik Paul Modest für die außerordentlich gute Betreuung, Unterstützung und Motivation
- Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen und für hilfreiche Anregungen bei Problem und Unklarheiten
- Prof. Dr. med. Thomas Kirchner für die Möglichkeit, im Pathologischen Institut der LMU arbeiten zu dürfen
- PD Dr. med. Jens Neumann für die Hilfe und Unterstützung bei immunhistochemischen Färbungen
- PD Dr. med. Sebastian Stintzing für die Hilfestellung bei organisatorischen Problemen und für hilfreiche Anregungen zur Auswertung der Amphi- und Epiregulin-Expression
- Jutta Hügel-Treppe, Gaby Charell und Nicole Pereira für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsabläufe
- Sabine Sagebiel-Kohler und Gertrud Lenz für ihre tägliche Unterstützung und Hilfe bei der Organisation von Experimenten
- Meiner Mutter, meinem Stiefvater und meinem Bruder für Ihre Geduld
- Meiner Freundin Julia Schorisch für ihren Beistand

Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut GdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2009/2010 2013;**9. Ausgabe**: 36-9.
2. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014;**Langversion 1.1**.
3. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 1988;**319**: 525-32.
4. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982;**35**: 830-41.
5. Lieberman DA, Weiss DG, Veterans Affairs Cooperative Study G. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *The New England journal of medicine* 2001;**345**: 555-60.
6. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine* 1993;**329**: 1977-81.
7. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Waye JD. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England journal of medicine* 2012;**366**: 687-96.
8. Jauch KWN, V. Tumorzentrum München, Jahrbuch 2011. *Agileum Gesundheitsakademie* 2011.
9. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1992;**10**: 896-903.
10. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, Morvan F, Louvet C, Guillot T, Francois E, Bedenne L. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997;**15**: 808-15.
11. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, Krook JE, Mailliard JA, Laurie JA, Tschetter LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1989;**7**: 1407-18.
12. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for

metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;**355**: 1041-7.

13. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England journal of medicine* 2000;**343**: 905-14.

14. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000;**18**: 2938-47.

15. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1995;**1**: 1311-8.

16. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;**19**: 6550-65.

17. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2004;**351**: 337-45.

18. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2007;**357**: 2040-8.

19. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;**26**: 2311-9.

20. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;**25**: 4557-61.

21. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016;**27**: 1386-422.

22. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014;**25 Suppl 3**: iii1-9.

23. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, et al. Phase III trial of

infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;**25**: 1670-6.

24. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, Kakolyris S, Tsousis S, Kouroussis C, Vamvakas L, Kalykaki A, Samonis G, et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *British journal of cancer* 2006;**94**: 798-805.

25. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, Tonini G, Carlomagno C, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet Oncology* 2015;**16**: 1306-15.

26. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *The oncologist* 2009;**14**: 22-8.

27. Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, Weickhardt A, Townsend AR, Wrin JW, Chua A, Shivasami A, Cummins MM, Murone C, Tebbutt NC. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;**29**: 2675-82.

28. Price TJ, Bruhn MA, Lee CK, Hardingham JE, Townsend AR, Mann KP, Simes J, Weickhardt A, Wrin JW, Wilson K, GebSKI V, Van Hazel G, et al. Correlation of extended RAS and PIK3CA gene mutation status with outcomes from the phase III AGITG MAX STUDY involving capecitabine alone or in combination with bevacizumab plus or minus mitomycin C in advanced colorectal cancer. *British journal of cancer* 2015;**112**: 963-70.

29. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;**28**: 4697-705.

30. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2013;**369**: 1023-34.

31. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line

treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014;**25**: 1346-55.

32. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;**28**: 4706-13.

33. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI {+/-} panitumumab for second-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014;**25**: 107-16.

34. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, Ruff P, van Hazel GA, Moiseyenko V, Ferry D, McKendrick J, Polikoff J, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;**30**: 3499-506.

35. Van Cutsem E, Joulain F, Hoff PM, Mitchell E, Ruff P, Lakomy R, Prausova J, Moiseyenko VM, van Hazel G, Cunningham D, Arnold D, Schmoll HJ, et al. Aflibercept Plus FOLFIRI vs. Placebo Plus FOLFIRI in Second-Line Metastatic Colorectal Cancer: a Post Hoc Analysis of Survival from the Phase III VELOUR Study Subsequent to Exclusion of Patients who had Recurrence During or Within 6 Months of Completing Adjuvant Oxaliplatin-Based Therapy. *Target Oncol* 2015.

36. Tabernero J, Van Cutsem E, Lakomy R, Prausova J, Ruff P, van Hazel GA, Moiseyenko VM, Ferry DR, McKendrick JJ, Soussan-Lazard K, Chevalier S, Allegra CJ. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *European journal of cancer* 2014;**50**: 320-31.

37. Folprecht G, Pericay C, Saunders MP, Thomas A, Lopez RL, Roh JK, Chistyakov V, Hohler T, Kim JS, Hofheinz RD, Ackland SP, Swinson D, et al. Oxaliplatin and 5-FU/folinic acid (modified FOLFOX6) with or without aflibercept in first line treatment of patients with metastatic colorectal cancer - the AFFIRM study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016.

38. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Tabernero J, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;**381**: 303-12.

39. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Yoshino T, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *The Lancet Oncology* 2015;**16**: 937-48.

40. Li J, Qin S, Xu R, Yau TC, Ma B, Pan H, Xu J, Bai Y, Chi Y, Wang L, Yeh KH, Bi F, et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2015;**16**: 619-29.

41. Schultheis B, Folprecht G, Kuhlmann J, Ehrenberg R, Hacker UT, Kohne CH, Kornacker M, Boix O, Lettieri J, Krauss J, Fischer R, Hamann S, et al. Regorafenib in combination with FOLFOX or FOLFIRI as first- or second-line treatment of colorectal cancer: results of a multicenter, phase Ib study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;**24**: 1560-7.

42. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine* 2015;**372**: 2509-20.

43. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, Ciuleanu TE, Portnoy DC, Van Cutsem E, Grothey A, Prausova J, Garcia-Alfonso P, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2015;**16**: 499-508.

44. Obermannova R, Van Cutsem E, Yoshino T, Bodoky G, Prausova J, Garcia-Carbonero R, Ciuleanu T, Garcia Alfonso P, Portnoy D, Cohn A, Yamazaki K, Clingan P, et al. Subgroup analysis in RAISE: a randomized, double-blind phase III study of irinotecan, folinic acid, and 5-fluorouracil (FOLFIRI) plus ramucirumab or placebo in patients with metastatic colorectal carcinoma progression. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016;**27**: 2082-90.

45. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E, Troiani T, Ciardiello F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2016.

46. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, Yamazaki K, Shimada Y, Tabernero J, Komatsu Y, Sobrero A, Boucher E, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2015;**372**: 1909-19.

47. Wan CW, McKnight MK, Brattain DE, Brattain MG, Yeoman LC. Different epidermal growth factor growth responses and receptor levels in human colon carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 1988;**43**: 139-43.

48. Murthy U, Anzano MA, Greig RG. Expression of TGF-alpha/EGF and TGF-beta receptors in human colon carcinoma cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1989;**44**: 110-5.

49. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer research* 1988;**48**: 137-41.

50. Magnusson I, Rosen AV, Nilsson R, Macias A, Perez R, Skoog L. Receptors for epidermal growth factor and sex steroid hormones in human colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 1989;**9**: 299-301.

51. Ciardiello F, Dono R, Kim N, Persico MG, Salomon DS. Expression of cripto, a novel gene of the epidermal growth factor gene family, leads to in vitro transformation of a normal mouse mammary epithelial cell line. *Cancer research* 1991;**51**: 1051-4.

52. Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991;**47**: 87-98.

53. Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992;**4**: 1-24.

54. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;**309**: 418-25.

55. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;**230**: 1132-9.

56. Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;**87**: 4905-9.

57. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;**86**: 9193-7.

58. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;**90**: 1746-50.

59. Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 2000;**103**: 931-43.

60. Nassar N, Horn G, Herrmann C, Scherer A, McCormick F, Wittinghofer A. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* 1995;**375**: 554-60.

61. Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Morimoto S. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene* 1997;**15**: 2841-8.

62. Plowman GD, Green JM, McDonald VL, Neubauer MG, Disteché CM, Todaro GJ, Shoyab M. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol* 1990;**10**: 1969-81.

63. Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989;**243**: 1074-6.

64. Johnson GR, Kannan B, Shoyab M, Stromberg K. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. *J Biol Chem* 1993;**268**: 2924-31.

65. Cook PW, Mattox PA, Keeble WW, Pittelkow MR, Plowman GD, Shoyab M, Adelman JP, Shipley GD. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* 1991;**11**: 2547-57.

66. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology, research and practice* 2009;**205**: 858-62.

67. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;**26**: 1626-34.

68. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2008;**359**: 1757-65.

69. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;**29**: 2011-9.

70. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer research* 2007;**67**: 2643-8.

71. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmuller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2014;**15**: 1065-75.

72. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, Yu H, Oliner KS, Go WY. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;**32**: 2240-7.

73. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, van Krieken JH, Ciardiello F. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2015;**33**: 692-700.

74. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;**25**: 3230-7.

75. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuws S, Vandesompele J, Peeters M, Van Laethem JL, Humblet Y, Penault-Llorca F, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;**27**: 5068-74.

76. Jonker DJ, Karapetis CS, Harbison C, O'Callaghan CJ, Tu D, Simes RJ, Malone DP, Langer C, Tebbutt N, Price TJ, Shapiro J, Siu LL, et al. Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer. *British journal of cancer* 2014;**110**: 648-55.

77. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatseas G, Papakostas P, Makatsoris T, Papamichael D, Xanthakis I, Sgouros J, Televantou D, Kafiri G, Tsamandas AC, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC cancer* 2013;**13**: 49.

78. Baker JB, Dutta D, Watson D, Maddala T, Munneke BM, Shak S, Rowinsky EK, Xu LA, Harbison CT, Clark EA, Mauro DJ, Khambata-Ford S. Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2011;**104**: 488-95.

79. Li XD, Miao SY, Wang GL, Yang L, Shu YQ, Yin YM. Amphiregulin and epiregulin expression in colorectal carcinoma and the correlation with clinicopathological characteristics. *Onkologie* 2010;**33**: 353-8.

80. Kuramochi H, Nakajima G, Kaneko Y, Nakamura A, Inoue Y, Yamamoto M, Hayashi K. Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *BMC cancer* 2012;**12**: 88.

81. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Kanazawa T, Konishi T, Tanaka T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Eshima K, Muto T, Nagawa H. Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes. *European journal of cancer* 2010;**46**: 2119-26.

82. Yamada M, Ichikawa Y, Yamagishi S, Momiyama N, Ota M, Fujii S, Tanaka K, Togo S, Ohki S, Shimada H. Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;**14**: 2351-6.

83. Seligmann JFE, F.; Richman, S.; Jacobs, B.; Hemmings, G.; Barrett, J.; Tejpar, S.; Quirke, P.; Seymour, M.T. Combined epiregulin (EREG) and amphiregulin (AREG) expression levels as a biomarker of prognosis and panitumumab benefit in RAS-wt advanced colorectal cancer (aCRC). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;**32**: 5S.

84. Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, Jacobs B, Hemmings G, Brown S, Barrett JH, Tejpar S, Quirke P, Seymour MT. Combined Epireregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 2016.

85. Fischer von Weikersthal L, Schalhorn A, Stauch M, Quietzsch D, Maubach PA, Lambertz H, Oruzio D, Schlag R, Weigang-Kohler K, Vehling-Kaiser U, Schulze M, Truckenbrodt J, et al. Phase III trial of irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/folinic acid versus irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment of advanced colorectal cancer. *European journal of cancer* 2011;**47**: 206-14.

86. Stahler A, Heinemann V, Giessen-Jung C, Crispin A, Schalhorn A, Stintzing S, Fischer von Weikersthal L, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Quietzsch D, Held S, von Einem JC, et al. Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial). *International journal of cancer Journal international du cancer* 2016;**138**: 739-46.

87. Giessen C, Fischer von Weikersthal L, Laubender RP, Stintzing S, Modest DP, Schalhorn A, Schulz C, Heinemann V. Evaluation of prognostic factors in liver-limited metastatic colorectal cancer: a preplanned analysis of the FIRE-1 trial. *British journal of cancer* 2013;**109**: 1428-36.

88. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986;**324**: 163-6.

89. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988;**27**: 6008-13.

90. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2005;**7**: 413-21.

91. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathology, research and practice* 2007;**203**: 489-97.

92. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. 1970. *Biotechnology* 1992;**24**: 3-5.

93. Neumann J, Wehweck L, Maatz S, Engel J, Kirchner T, Jung A. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2013;**463**: 509-23.

94. Yoshida M, Shimura T, Sato M, Ebi M, Nakazawa T, Takeyama H, Joh T. A novel predictive strategy by immunohistochemical analysis of four EGFR ligands in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibodies. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2013;**139**: 367-78.

95. Cushman SM, Jiang C, Hatch AJ, Shterev I, Sibley AB, Niedzwiecki D, Venook AP, Owzar K, Hurwitz HI, Nixon AB. Gene Expression Markers of Efficacy and Resistance to Cetuximab Treatment in Metastatic Colorectal Cancer: Results from CALGB 80203 (Alliance). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;**21**: 1078-86.

96. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *British journal of cancer* 2007;**96**: 1166-9.

97. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;**26**: 374-9.

98. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *Journal of the National Cancer Institute* 1998;**90**: 675-84.

99. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research* 2006;**66**: 3992-5.

100. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2008;**19**: 508-15.

101. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;**27**: 663-71.

102. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, Idziaszczyk S, Harris R, Fisher D, Kenny SL, Kay E, Mitchell JK, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011;**377**: 2103-14.

103. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;**28**: 466-74.

104. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2010;**304**: 1812-20.

105. Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, Dietzfelbinger H, Oruzio D, Klein S, Zellmann K, Decker T, Schulze M, Abenhardt W, et al. Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104--a randomized trial of the German AIO CRC study

group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;**29**: 1050-8.

106. Ocvirk J, Brodowicz T, Wrba F, Ciuleanu TE, Kurteva G, Beslija S, Koza I, Papai Z, Messinger D, Yilmaz U, Faluhelyi Z, Yalcin S, et al. Cetuximab plus FOLFOX6 or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer: CECOG trial. *World journal of gastroenterology : WJG* 2010;**16**: 3133-43.

107. Ogino S, Liao X, Imamura Y, Yamauchi M, McCleary NJ, Ng K, Niedzwiecki D, Saltz LB, Mayer RJ, Whittom R, Hantel A, Benson AB, 3rd, et al. Predictive and prognostic analysis of PIK3CA mutation in stage III colon cancer intergroup trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;**105**: 1789-98.

108. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, Zalcborg JR, Simes J, Moore MJ, Tebbutt NC, Price TJ, Shapiro JD, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;**20**: 744-53.

109. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, Li S, Tsui C, Tie J, Desai J, Xu ZZ, Molloy P, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;**19**: 3285-96.

110. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer research* 2009;**69**: 1851-7.

111. Eklof V, Wikberg ML, Edin S, Dahlin AM, Jonsson BA, Oberg A, Rutegard J, Palmqvist R. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *British journal of cancer* 2013;**108**: 2153-63.

112. Liao X, Morikawa T, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Yamauchi M, Noshio K, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;**18**: 2257-68.

113. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogerias KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, et al. 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* 2010;**11**: 753-62.

114. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet Oncology* 2005;**6**: 279-86.

115. Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G, Bobos M, Kouvatsas G, Tzaida O, Makatsoris T, Papakostas P, Bai M, Goussia A, Samantas E, Papamichael D, et al. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014;**140**: 737-48.

116. Scartozzi M, Bearzi I, Mandolesi A, Pierantoni C, Loupakis F, Zaniboni A, Negri F, Quadri A, Zorzi F, Galizia E, Berardi R, Biscotti T, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis. *BMC cancer* 2009;**9**: 303.

117. Algars A, Lintunen M, Carpen O, Ristamaki R, Sundstrom J. EGFR gene copy number assessment from areas with highest EGFR expression predicts response to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *British journal of cancer* 2011;**105**: 255-62.

118. Sunakawa Y, Yang D, Moran M, Astrow SH, Tsuji A, Stephens C, Zhang W, Cao S, Takahashi T, Denda T, Shimada K, Kochi M, et al. Combined assessment of EGFR-related molecules to predict outcome of 1st-line cetuximab-containing chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2016: 1-9.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: VEREINFACHTE SIGNALTRANSDUKTION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR – SIGNALWEGS.....	7
ABBILDUNG 2: WORKFLOW DER NUKLEINSÄUREN-EXTRAKTION AUS FFPE-GEWEBE.	16
ABBILDUNG 3: PRINZIP DER PYROSEQUENZIERUNG. MODIFIZIERT NACH PYROMARK Q24® HANDBUCH (QIAGEN).....	18
ABBILDUNG 4: VERGLEICH DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS UNTER FUFIRI ODER MIROX IN DER FIRE1-SUBPOPULATION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	27
ABBILDUNG 5: VERGLEICH DES GESAMTÜBERLEBENS UNTER FUFIRI ODER MIROX IN DER FIRE1-SUBPOPULATION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	27
ABBILDUNG 6: PYROGRAMM EINES PATIENTEN MIT <i>KRAS</i> -WILD TYP-SEQUENZ (OBEN) IM VERGLEICH ZU EINER C.35G>A-MUTATION IN <i>KRAS</i> EXON 2, CODON 12.....	28
ABBILDUNG 7: PRÄVALENZ DER <i>RAS</i> -MUTATIONEN IM SUBSET DER FIRE1-STUDIE.	29
ABBILDUNG 8: PRÄVALENZ VON MUTATIONEN IN DER GESAMTEN FIRE1-SUBPOPULATION.	29
ABBILDUNG 9: RECEIVER OPERATOR CHARACTERISTIC ANALYSE ZUR ERMITTLUNG EINES SCHWELLENWERTS FÜR DIE DICHOTOMISIERUNG NIEDRIGER UND HOHER AREG-EXPRESSION. 32	
ABBILDUNG 10: RECEIVER OPERATOR CHARACTERISTIC ANALYSE ZUR ERMITTLUNG EINES SCHWELLENWERTS FÜR DIE DICHOTOMISIERUNG NIEDRIGER UND HOHER EREG-EXPRESSION. 32	
ABBILDUNG 11: MEMBRANÖSE <i>EGFR</i> -FÄRBUNG DURCH IMMUNHISTOCHEMIE. SCHWACH (OBEN), MODERAT (MITTIG), STARK (UNTEN).	34
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT <i>RAS</i> -WILD TYP-TUMOREN ODER <i>RAS</i> -MUTIERTEN TUMOREN DURCH KAPLAN-MEIER-ANALYSE. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	36
ABBILDUNG 13: VERGLEICH DES GESAMTÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT <i>RAS</i> -WILD TYP-TUMOREN ODER <i>RAS</i> -MUTIERTEN TUMOREN DURCH KAPLAN-MEIER-ANALYSE. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	36
ABBILDUNG 14: VERGLEICH DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER EXPRESSION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.....	38

ABBILDUNG 15: VERGLEICH DES GESAMTÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER EXPRESSION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	38
ABBILDUNG 16: VERGLEICH DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER AMPHIREGULIN-EXPRESSION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	40
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DES GESAMTÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER AMPHIREGULIN-EXPRESSION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	40
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER EPIREGULIN-EXPRESSION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	42
ABBILDUNG 19: VERGLEICH DES GESAMTÜBERLEBENS FÜR PATIENTEN MIT NIEDRIGER ODER HOHER EPIREGULIN-EXPRESSION. SIGNIFIKANZ-TEST DURCH LOG-RANK.	42
ABBILDUNG 20: FOREST PLOT DER BASELINE-CHARAKTERISTIKA UND DES TUMOR-MUTATIONSSTATUS IN BEZUG AUF DIE AMPHIREGULIN-EXPRESSION FÜR DAS PROGRESSIONSFREIE ÜBERLEBEN.	44
ABBILDUNG 21: FOREST PLOT DER BASELINE-CHARAKTERISTIKA UND DES TUMOR-MUTATIONSSTATUS IN BEZUG AUF DIE AMPHIREGULIN-EXPRESSION FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN.	45
ABBILDUNG 22: FOREST PLOT DER BASELINE-CHARAKTERISTIKA UND DES TUMOR-MUTATIONSSTATUS IN BEZUG AUF DIE EPIREGULIN-EXPRESSION FÜR DAS PROGRESSIONSFREIE ÜBERLEBEN.	46
ABBILDUNG 23: FOREST PLOT DER BASELINE-CHARAKTERISTIKA UND DES TUMOR-MUTATIONSSTATUS IN BEZUG AUF DIE EPIREGULIN-EXPRESSION FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN.	47

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: WEITERE OPTIONEN IN DER THERAPIE DES METASTASIIERTEN KOLOREKTALEN KARZINOMS (BASIEREND AUF LEITLINIEN DER AWMF UND ESMO).....	6
TABELLE 2: EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN DER FIRE1-STUDIE.....	14
TABELLE 3: BASELINE-CHARAKTERISTIKA DER FIRE1-STUDIE. LEGENDE: MEDIANE ÜBERLEBENS DATEN ALLER PATIENTEN; P-WERTE BASIEREND AUF LOG-RANK-TEST; HR: HAZARD RATIO; KI: KONFIDENZINTERVALL; PFS: PROGRESSION-FREE SURVIVAL; OS: OVERALL SURVIVAL.	25
TABELLE 4: VERTEILUNG DER <i>RAS</i> - UND <i>PIK3CA</i> -MUTATIONEN AUF DIE STUDIENARME. LEGENDE: MUT. = MUTIERT;.....	30
TABELLE 5: VERGLEICH DER BIOMARKER UND BASELINE-CHARAKTERISTIKA ANHAND DER HAZARD RATIO. LEGENDE: NO. = ANZAHL, 95% KI = 95% KONFIDENZINTERVALL.....	49
TABELLE 6: VERWENDETE PRIMER.....	61
TABELLE 7: VORGEHENSWEISE BEI EINER POLYMERASEKETTENREAKTION.	62
TABELLE 8: MASTERMIX FÜR PYROSEQUENZIERUNG.	63
TABELLE 9: VORGEHENSWEISE BEI EINER REVERSE TRANSKRIPTION.	65
TABELLE 10: VORGEHENSWEISE BEI EINER RT-QPCR.....	65
TABELLE 11: TEMPERATURPROTOKOLL FÜR RT-QPCR.....	66

Publikation

Teile dieser Dissertation wurden im Rahmen einer Publikation im International Journal of Cancer (Stahler A. et al., Int J Cancer 2016, **138**: 739 – 746; doi: 10.1002/ijc.29807; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.29807>) und im Rahmen von Posterpräsentationen auf dem Annual Meeting der American Society of Clinical Oncology (ASCO) (J Clin Oncol 32:5s, 2014 [suppl; abstr 3522]) sowie auf dem Jährlichen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) (Abstract P264) veröffentlicht.



Dekanat Medizinische Fakultät



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Stahler, Arndt

Name, Vorname

Zielstattstraße 121

Straße, Hausnummer

81379 München

PLZ, Ort

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel
Einfluss der mRNA-Expression der EGFR-Liganden Epiregulin (EREG) und Amphiregulin (AREG) auf das Überleben von Patienten mit metasta-siertem kolorektalen Karzinom unter 5-Fluoruracil/Leucovorin plus Irino-tecan (FUFIRI) oder Irinotecan plus Oxaliplatin Erstlinientherapie (FIRE 1 – Studie).

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 18.03.2018

Ort, Datum

Arndt Stahler

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Eidesstattliche Versicherung

Stahler, Arndt

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der mRNA-Expression der EGFR-Liganden Epiregulin (EREG) und Amphiregulin (AREG) auf das Überleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom unter 5-Fluoruracil/Leucovorin plus Irinotecan (FUFIRI) oder Irinotecan plus Oxaliplatin Erstlinientherapie (FIRE 1 – Studie).

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.03.2018

Ort, Datum

Arndt Stahler

Unterschrift Doktorandin/Doktorand