

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Klinikum der Universität München

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

DIE MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER GENE
DER EGFR („EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR“)-
SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE UND IHRE BEDEUTUNG BEI EINER
CETUXIMAB-BASIERTEN CHEMOTHERAPIE DES METASTASIIERTEN
KOLOREKTALEN KARZINOMS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sophie-Charlotte Mook

Aus

Hamburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. C. Berking
Priv.- Doz. Dr. A. Herbst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. S. Stintzing

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2013

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das kolorektale Karzinom	7
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Kolonkarzinoms	7
1.2	Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRRK)	9
1.2.1	Systemische Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms.....	9
1.2.2	Einordnung der CIOX- Studie in die aktuelle Studienlandschaft	10
1.2.3	Eingesetzte Substanzen im Rahmen der CIOX-Studie	11
1.3	Bedeutung des EGF-Rezeptors und der sekundären Signaltransduktionskaskade im Zusammenhang mit einer Cetuximab-basierten Chemotherapie	13
1.4	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Patienten und Therapieschema.....	18
2.1.2	Probengewinnung.....	20
2.2	Methodik.....	20
2.2.1	Probenverarbeitung	20
2.2.2	DNA-Isolierung und Aufarbeitung	20
2.2.3	PCR	21
2.2.4	PCR-Durchführung	21
2.2.5	Überprüfung der PCR mittels Gelelektrophorese	24
2.2.6	Pyrosequenzierung	25
2.2.7	Statistik:.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	DNA-Extraktion und Probenverarbeitung.....	29
3.2	Mutationslokalisationen der einzelnen Gene.....	32
3.3	Statistische Auswertungen der durch die Mutationsanalyse erhobenen Daten	35
3.3.1	KRAS Codon 12 und 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET).....	36

3.3.2	KRAS Codon 12 und 13 (CAPIRI + CET)	37
3.3.3	KRAS Codon 12 und 13 (CAPOX + CET)	38
3.3.4	KRAS Codon 12 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET).....	39
3.3.5	KRAS Codon 12 (CAPIRI + CET)	40
3.3.6	KRAS Codon 12 (CAPOX + CET)	41
3.3.7	KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET).....	42
3.3.8	KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET)	43
3.3.9	KRAS Codon 13 (CAPOX + CET)	44
3.3.10	KRAS Codon 12 vs. KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET).....	45
3.3.11	KRAS Codon 12 vs. KRAS Codon 13 vs. KRAS Wildtyp (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)	46
3.3.12	BRAF (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)	47
3.3.13	BRAF (CAPIRI + CET).....	48
3.3.14	BRAF (CAPOX + CET)	49
3.3.15	PIK3CA (CAPIRI + CET und CAPOX + CET).....	50
3.3.16	PIK3CA (CAPIRI + CET)	51
3.3.17	PIK3CA (CAPOX + CET).....	52
3.3.18	KRAS / KRAS / BRAF / PIK3CA vs. Wildtyp (CAPIRI + CET und CAPOX + CET) 53	
4	Diskussion	54
4.1	Diskussion der verwendeten Methodik	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.2.1	KRAS	55
4.2.2	BRAF	59
4.2.3	PIK3CA.....	60
4.2.4	KRAS / BRAF / PIK3CA vs. Wildtyp.....	61
4.3	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	63

6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Anhang	70
7.1	Materialen und Geräte	70
7.1.1	Allgemein verwendete Materialien und Geräte.....	70
7.1.2	DNA-Isolation	70
7.1.3	PCR und Pyrosequenzierung.....	71
8	Abbildungverzeichnis.....	72
9	Tabellenverzeichnis.....	73
10	Danksagung.....	75
11	Lebenslauf	76

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Kolonkarzinoms

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen in den westlichen Industrieländern. In Europa ist das kolorektale Karzinom nach Brustkrebs die zweithäufigste Form von Krebs, gefolgt von Lungenkrebs [1]. Auch in Deutschland ist Darmkrebs mit 16 % die zweithäufigste Krebserkrankung und mit 12 % auch die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Im Jahre 2006 erkrankten etwa 36.300 Männer und 32.440 Frauen an diesem Tumor [2]. Das mediane Erkrankungsalter bei Männern beträgt etwa 69 Jahre, bei Frauen etwa 73 Jahre. Weniger als 10 % der Patienten sind zum Diagnosezeitpunkt jünger als 50 Jahre [3]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Erkrankungsstadien liegt bei beiden Geschlechtern bei etwa 60 %. 30 % aller kolorektalen Karzinome werden im Rektum diagnostiziert.

Das Kolonkarzinom ist ein maligner Tumor mit einer hohen Metastasierungsrate. Daher geht das kolorektale Karzinom mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate einher. Lediglich die Hälfte aller Patienten kann durch eine Operation und eine adjuvante Nachbehandlung geheilt werden [4]. Die restlichen Patienten entwickeln Metastasen und bedürfen einer palliativen Chemotherapie. Für die Prognose des Kolonkarzinoms ist daher das primäre Tumorstadium zum Zeitpunkt der Therapie von großer prognostischer Bedeutung. Die folgende Grafik mit Daten des Tumorregisters München verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Tumorstadium (eingeteilt nach UICC-Stadien) des Kolonkarzinoms und relativer Überlebenszeit. Die Grafik stellt die relativen Überlebensdaten von 15.947 Patienten mit kolorektalem Karzinom aus dem Einzugsgebiet des Tumorregisters München (1988-2007) dar [5]. Besonders auffallend ist der rasche Abfall der Überlebenskurve von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom (mKRK), also UICC Stadium IV. 5 Jahre nach Diagnosestellung sind in dieser Gruppe weniger als 10 % der Patienten noch am Leben.

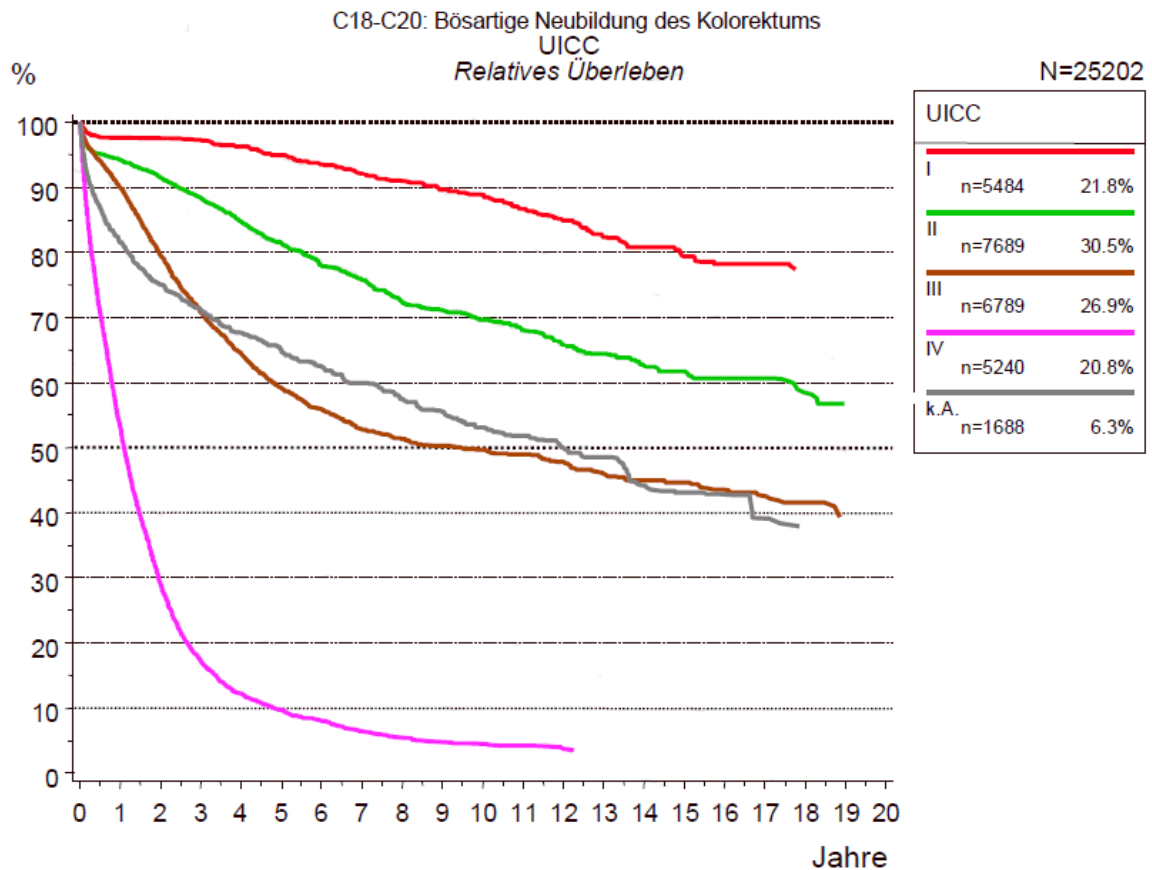


Abbildung 1-1 Relative Überlebensdaten des Kolonkarzinoms nach UICC-Stadien [5]

Um das individuelle Risiko für die Entstehung eines Kolonkarzinoms abschätzen zu können, müssen Familien- und Eigenanamnese berücksichtigt werden. Ein wichtiger Risikofaktor ist die Ernährung. Vor allem eine ballaststoffarme, fettreiche Nahrung und großzügiger Verzehr von rotem Fleisch erhöhen das Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Auch ein regelmäßiger Alkoholkonsum trägt zu einer Erhöhung des Risikos bei [6]. Andere wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms sind Übergewicht und Zigarettenkonsum [7]. Das Vorhandensein von Dickdarmpolypen erhöht ebenfalls die Wahrscheinlichkeit, an Darmkrebs zu erkranken. Das Risiko, dass sich aus derartigen Polypen in späterer Zukunft ein Karzinom entwickelt, beträgt 10 % [8]. Neben den Risikofaktoren für das Auftreten eines Kolonkarzinoms spielt bei der Entwicklung dieses Tumors auch die Familienanamnese eine wichtige Rolle. Während sich der Großteil der kolorektalen Karzinome aus einer klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz entwickelt, weisen 10 - 15 % der erkrankten Patienten eine positive Familienanamnese auf. Ist ein erstgradiger Verwandter an einem Kolonkarzinom erkrankt, ist im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung das Risiko etwa um das doppelt erhöht, auch ein kolorektales Karzinom zu entwickeln [9].

Das bei weitem höchste Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, haben Patienten mit hereditären Syndromen, wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und dem hereditären non-polypösen Karzinom (HNPCC). Bei diesen Erkrankungen tritt das Kolonkarzinom mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit schon in jüngeren Jahren auf. Vor allem für Patienten, die an einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) erkrankt sind, ist die Prognose schlecht: Hat ein Patient diese Erbkrankheit, so wird er im Laufe seines Lebens zu 100% an einem Kolonkarzinom erkranken [10]. Sowohl beim Kolonkarzinom, welches sich durch die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz entwickelt, als auch bei dem hereditären kolorektalen Karzinom lässt sich die Entwicklung des Tumors in der Regel durch die sogenannte „Adenom-Karzinom-Sequenz“ erklären. Diese Sequenz beschreibt die Entwicklung des Kolonkarzinoms über adenomatöse Vorstadien und Akquirierung von verschiedenen Mutationen über einen Zeitraum von ca. 10 - 15 Jahren.

1.2 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK)

1.2.1 Systemische Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Die vorliegende Arbeit und die dazugehörige Studie untersucht ausschließlich Patienten mit mKRK (UICC Stadium IV). Aus diesem Grund wird im folgenden Abschnitt ausschließlich auf Therapiekonzepte eingegangen, die sich auf das mKRK beziehen.

Gemäß der aktuell gültigen S3-Leitlinie „kolorektales Karzinom“, welche aus dem Jahr 2008 datiert, ist eine chemotherapeutische Behandlungsindikation als Erstlinienbehandlung bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom indiziert. Diejenigen Patienten, für die primär keine chirurgische Interventionsmöglichkeit besteht, sollten eine systemische Chemotherapie erhalten. Ausschließlich ein schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky-Performance Status < 60) oder Kontraindikationen der zu verwendeten Substanzen stellen Ausnahmen zu einer ansonsten sehr breiten Indikationsstellung der systemischen Chemotherapie dar [11]. Als Chemotherapeutikum der ersten Wahl wird bisher 5-Fluorouracil (5-FU) eingesetzt. 5-FU alleine konnte das Überleben der Patienten mit mKRK bisher von 6 Monate auf 10 Monate verlängern [3]. Eine Metanalyse von 19 Studien mit 3.300 Patienten zeigte nahezu eine Verdoppelung der Ansprechrate von 11 % auf 21% durch biochemische Modulation von 5-FU durch Folsäure (FA). Außerdem konnte so das mediane Gesamtüberleben von 10,5 Monate auf 11,7 Monate signifikant ($p = 0,004$) gesteigert werden [12]. In den letzten Jahren haben mehreren Studien gezeigt, dass eine 5-FU-basierte Chemotherapie kombiniert mit neueren Substanzen, wie Irinotecan oder Oxaliplatin einer Monotherapie mit 5-FU überlegen ist. Sowohl das progressionsfreie Überleben

als auch das mediane Gesamtüberleben kann durch eine solche Kombinationstherapie verbessert werden [13-15]. Nachdem Irinotecan und Oxaliplatin auch in der hier untersuchten CIOX-Studie eingesetzt wurden, wird an dieser Stelle auf eine weitere Erklärung der Substanzen verzichtet und auf das Kapitel 1.2.3 verwiesen. Bei der Erstlinienbehandlung des mKRR sind die folgenden Kombinationsschemata gebräuchlich:

Kombinationsschema	Medikament und Dosierung	Applikationsart	Zeitschema
FOLFOX Tournigand et al.	5-FU 2400-3000 mg/m ² 5-FU 400 mg/m ² Folinsäure 400 mg/m ² Oxaliplatin 100 mg/m ²	i.v. 46 h i.v. Bolus i.v. 120 min. i.v. Bolus	Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14
FOLFIRI Tournigand et al.	5-FU 2400-3000 mg/m ² 5-FU 400 mg/m ² Folinsäure 400 mg/m ² Irinotecan 180 mg/m ²	i.v. 46 h i.v. Bolus i.v. 120 min. i.v. 30-90 min.	Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14 Tag 1, Wdh Tag 14
CAPIRI Koopman et al.	Capecitabin 1000 mg/m ² Irinotecan 250 mg/m ²	p.o. 2/d i.v.	Tag 1-14, Wdh Tag 21 Tag 1, Wdh Tag 21
XELOX Cassidy et al.	Capecitabin 1000 mg/m ² Oxaliplatin 130 mg/m ²	p.o. 2/d i.v. 120 min	Tag 1-14, Wdh Tag 21 Tag 1, Wdh Tag 21
CAPOX Porschen et al.	Capecitabin 1000 mg/m ² Oxaliplatin 70 mg/m ²	p.o. 2/d i.v. 120 min	Tag 1-14, Wdh Tag 21 Tag 1 + 8, Wdh Tag 21

Tabelle 1-1 Kombinationsschemata der Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

1.2.2 Einordnung der CIOX- Studie in die aktuelle Studienlandschaft

Die in Tabelle 1-1 aufgeführten Kombinationsschemata sind derzeit als Erstlinienbehandlung des mKRR zugelassen. Vor einigen Jahren wurde zudem gezeigt, dass der monoklonale Antikörper Cetuximab sowohl als Einzelsubstanz als auch in Kombination mit Irinotecan Wirksamkeit zeigt, wenn er bei der Therapie des Irinotecan-resistenten mKRR eingesetzt wird [16]. Kürzlich konnte in einer Phase-III-Studie (CRYSTAL) und einer großen Phase-II-Studie (OPUS) bestätigt werden, dass eine Kombination von Cetuximab mit FOLFIRI (Tabelle 1-1) oder FOLFOX (Tabelle 1-1) als Erstlinienbehandlung des mKRR einer alleinigen Chemotherapie mit FOLFIRI oder FOLFOX bei Patienten mit KRAS Wildtyptumoren überlegen ist [17, 18].

Vor dem Hintergrund dieser aktuellen Studienerkenntnisse hat die CIOX-Studie (AIO KRR-0104), eine randomisierte offene Phase-II-Studie, von September 2004 bis Dezember 2006 zwei verschiedene Patientenkollektive (insgesamt 185 Patienten) untersucht. Arm A des Patientenkollektivs erhielt eine Chemotherapie bestehend aus Cetuximab, Capecitabin und Irinotecan (CAPIRI + CET). Arm B des Patientenkollektivs wurde mit den Cetuximab, Capecitabin und

Oxaliplatin behandelt (CAPOX + CET). Die CIOX-Studie hat die Effizienz und Toxizitäten von CAPIRI + CET und CAPOX + CET als Erstlinienbehandlung des mKRR untersucht.

1.2.3 Eingesetzte Substanzen im Rahmen der CIOX-Studie

Irinotecan

Irinotecan ist ein halbsynthetisches Camptothecin-Derivat aus der Klasse der Topoisomerase-I-interagierenden Substanzen. Im Organismus wird Irinotecan rasch zu dem aktiven Metaboliten SN-38 hydrolysiert. Diese Reaktion wird durch Carboxylesterasen katalysiert und spielt sich überwiegend in der Leber und im Gastrointestinaltrakt ab. Sowohl Irinotecan als auch sein aktiver Metabolit SN-38 hemmen die Topoisomerase I. Somit kommt es zur Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-I-Komplexes. Dies führt dazu, dass in der Replikationsphase der Zelle DNA-Einzelstrangbrüche entstehen, die schließlich zum Zelltod führen. Irinotecan zeige bislang mit anderen beim kolorektalem Karzinom angewendeten Substanzen keine Kreuzresistenz [19]. In mehreren Studien (Phase I, II und III Studien) wurde der therapeutische Nutzen eine Kombinationstherapie von Irinotecan mit 5-FU bzw. Folinsäure untersucht. Insgesamt konnte herausgefunden werden, dass eine Kombinationstherapie des mKRR mit Irinotecan und 5-FU bzw. Folinsäure zu höheren Ansprechraten, einem längeren progressionsfreien Überleben (PFS) und zu einem längeren medianen Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zu einer Monotherapie mit 5-FU bzw. Folinsäure führt [20-24].

Oxaliplatin

Oxaliplatin ist ein Diaminocyclohexan (DACH)-Derivat. Es ist seit September 1999 in Deutschland in der Erstlinienbehandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen. Wie das Zytostatikum Cisplatin bildet Oxaliplatin Quervernetzungen vor allem innerhalb der DNA-Stränge („inter- und intrastrand crosslinks“) aus, die zur DNA-Synthesehemmung führen. Oxaliplatin wurde wegen des Synergismus mit 5-FU bereits früh in der klinischen Entwicklung mit 5-FU kombiniert. In drei Phase-III-Studien ließ sich durch die Oxaliplatin / 5-FU-Kombinationstherapie beim mKRR die Remissionsrate im Vergleich zu einer 5-FU / Folinsäure verdoppeln und das progressionsfreie Intervall um 3 Monate verlängern [13, 25, 26]. Das von de Gramont entwickelte FOLFOX-Schema, bestehend aus einer Oxaliplatin, einer 5-FU-Bolusgabe, gefolgt von einer kontinuierlichen 46 h Infusion von 5-FU (Tabelle 1-1), erzielte ähnlich gute Remissionsraten [27].

Capecitabin

Capecitabin (Xeloda ®) ist ein oral zu verabreichendes Flouropyrimidin-Carbamat. Es ist seit dem 5. Februar 2001 auf dem europäischen Markt für die Erstlinienbehandlung des mKRRK zugelassen. Nach oraler Aufnahme wird Capecitabin unverändert aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Daraufhin wird Capecitabin durch mehrere enzymatische Schritte im Tumor- und Lebergewebe letztendlich in das zytotoxisch wirkende 5-FU umgewandelt. In zwei Phase-III-Studien wurde Capecitabin als Erstlinienbehandlung beim mKRRK mit dem Mayo-Clinic-Schema (5-FU / Folinsäure) verglichen. Es zeigte sich eine höhere Ansprechrate beim Kombinationsschema, jedoch kein Unterschied in den Überlebenszeiten. Außerdem war die Toxizität von Capecitabin geringer als die des Mayo-Clinic-Schemas [28, 29]. Unter diesen Aspekten wurde Capecitabin auch in Kombination mit Irinotecan getestet. Mehrere Phase I- und II-Studien haben diese Kombination untersucht und über sehr konstante Daten für Ansprechen (38 - 47 %) und Zeit bis zur Progression (TTP = definiert als Zeitintervall zwischen erstem Behandlungstag und dem Nachweis eines Fortschreitens der Krankheit) geliefert [30-34].

Cetuximab

Cetuximab (Erbix ®) ist ein chimärer monoklonaler IgG1 Antikörper, der von einer rekombinanten Zelllinie in Maus-Myelomzellen produziert wird [35]. Der Antikörper richtet sich gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR = Epidermal Growth Faktor Receptor). Dieser Rezeptor wird in gesunden Epithelzellen exprimiert. In Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms ist der EGFR-Rezeptor sogar oft überexprimiert (25 - 80 % der Fälle) [35]. Die EGFR-Signalübertragung ist beteiligt an der Kontrolle der Überlebensfähigkeit von Tumorzellen, an der Zellzyklusprogression und der Angiogenese [36]. Grundsätzlich wird die EGFR-Expression mit einer stärkeren Aggressivität und einer schlechteren Prognose des kolorektalen Karzinoms in Verbindung gebracht [37]. Cetuximab hemmt durch die Bindung an den EGF-Rezeptor dessen Funktion. Es induziert die Internalisierung und damit die Downregulierung des EGF-Rezeptors. Dies führt schließlich zu einer Verhinderung von Zellproliferation und Angiogenese und zu der Einleitung von Apoptose-induzierenden Mechanismen [38]. Der Wirkungsmechanismus des monoklonalen Antikörper Cetuximab wird als „Targeted Therapie“ (molekular gezielte Therapie), da Cetuximab selektiv an den EGF-Rezeptor bindet und somit dessen Funktion inhibiert.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Cetuximab gehören das akneiforme Exanthem und allergische Reaktionen. Bei dem Exanthem handelt es sich um eine sterile eitrig-follikuläre Dermatitis. Mit Fortdauer der Therapie bessert sich das Exanthem. Es führt meistens nicht zu Therapieabbrüchen

[39]. Man nimmt an, dass das Auftreten dieses Exanthems stark mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab korreliert [40, 41].

Seit Juli 2004 ist Cetuximab in Deutschland für die Therapie des EGFR-exprimierenden, metastasierten Kolonkarzinoms nach Versagen einer Therapie mit Irinotecan zugelassen. Klinische Studien haben gezeigt, dass bei einer Monotherapie mit Cetuximab nach irinotecanhaltiger Vorbehandlung Ansprechraten von ca. 10 % erreicht werden. Die Ansprechrate bei einer Kombination von Cetuximab mit Irinotecan liegt bei sogar 23% [16, 42]. In einer großen Phase-II-Studie (OPUS) wurde in jüngster Zeit die Kombination von Cetuximab mit FOLFOX untersucht, während in einer anderen Phase-III-Studie (CRYSTAL) Cetuximab mit FOLFIRI kombiniert wurde. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass eine Kombination von Cetuximab mit beiden Therapieschemata in einer höheren Ansprechrate resultiert und das Risiko der Krankheitsprogression somit gesenkt werden kann [17, 18]. Diese Erkenntnisse sprechen stark für eine Steigerung der Effektivität der Erstlinienbehandlung durch Zugabe von Cetuximab. In der CIOX-Studie wurde die Kombination von Cetuximab mit Capecitabin – Irinotecan (CAPIRI) oder Capecitabin – Oxaliplatin (CAPOX) untersucht, da es bisher keine ausreichenden Angaben zur Sicherheit und Effektivität dieser Kombination gab. Die CIOX-Studie untersuchte, ob es Anhaltspunkte für eine Effektivitätssteigerung durch Cetuximab gibt und sollte, durch engmaschige Sicherheitsanalysen, die ausreichende Verträglichkeit des untersuchten Regimes belegen.

Es konnte aufgrund von molekularbiologischen Untersuchungen bei Patienten mit mKRK festgestellt werden, dass ein Therapieansprechen auf Cetuximab nicht zu erwarten ist, falls bestimmte Genmutationen im EGFR-Signalweg vorliegen. Aufgrund dessen wird im folgenden Abschnitt näher auf diese Erkenntnisse und den EGFR-Signalweg eingegangen.

1.3 Bedeutung des EGF-Rezeptors und der sekundären Signaltransduktionskaskade im Zusammenhang mit einer Cetuximab-basierten Chemotherapie

Der epidermale EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor ist ein Transmembranprotein. Er gehört zu der Familie der erbB-Membran-Rezeptoren, einer Unterfamilie der Tyrosinkinase-Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Der EGF-Rezeptor ist in den letzten Jahren bei mehreren Tumor-erkrankungen, wie dem kolorektalen Karzinom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Pankreaskarzinom und dem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zu einem wichtigen therapeutischen Ziel geworden. Durch Bindung des EGF-Rezeptors wird eine Signaltransduktion in Richtung Zellkern aktiviert. Über diesen Weg werden Prozesse wie Proliferation,

Angiogenese, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert. Die folgende Grafik gibt einen Überblick über die wichtigsten Wege dieser Signaltransduktionskaskade:

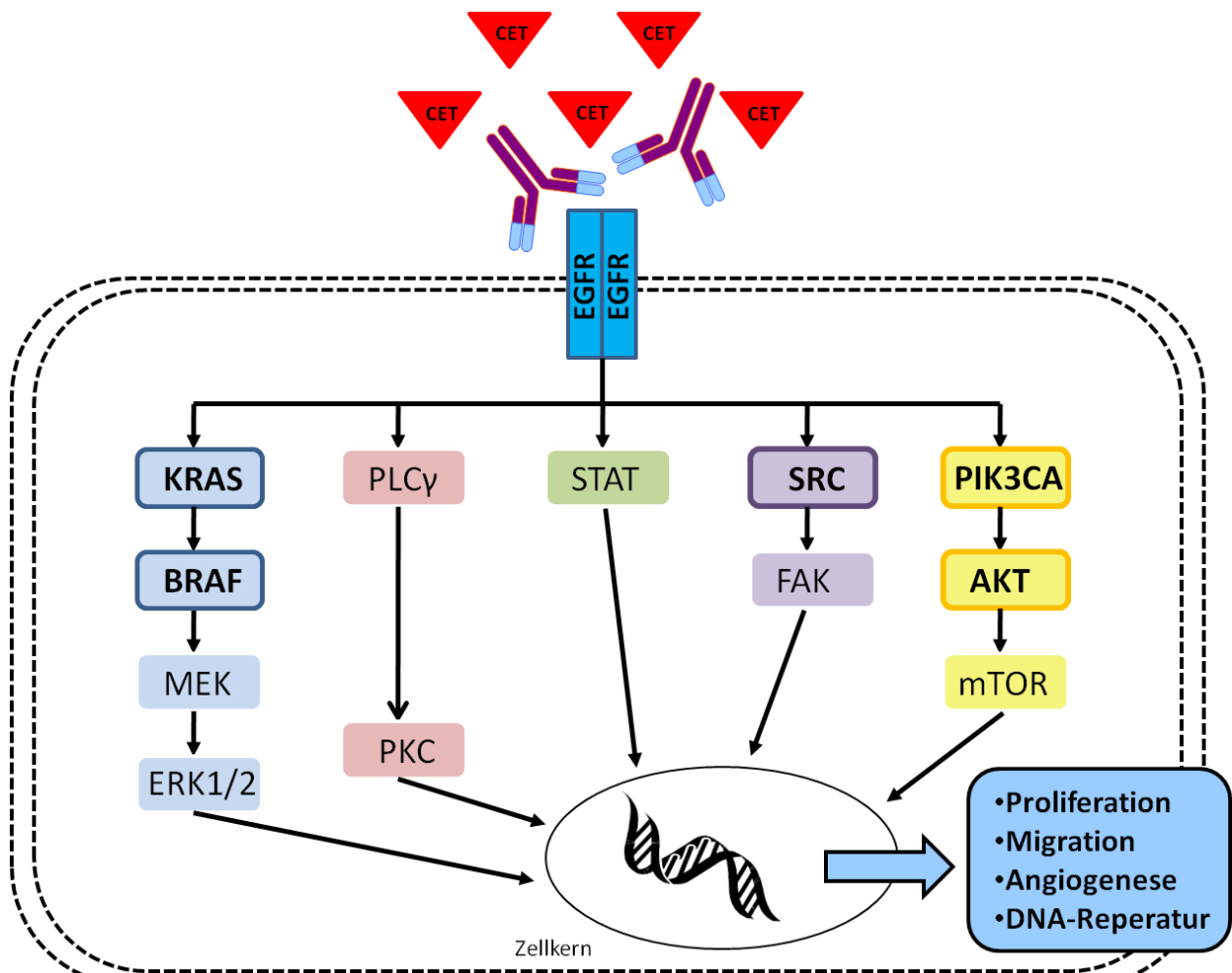


Abbildung 1-2 Der EGF-Rezeptor und die durch ihn aktivierten Signalwege

Durch extrazelluläre Bindung von Liganden wie EGF (epidermal growth factor) oder dem TGF- α (transforming growth factor α) wird der Rezeptor aktiviert. Es kommt zur Homodimerisierung des Rezeptors und daraufhin zur Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. Dadurch werden mehrere Signalkaskaden im Inneren der Zelle in Gang gesetzt, die eng miteinander verbunden sind. Die wichtigsten fünf sind (Abbildung 1-2): der RAS (rat sarcoma)-RAF (rat fibrosarcoma)-Signalweg, der Phospholipase C-Signalweg, der PIK3CA (phosphoinositol-3-kinase) / AKT (proteinkinase B)-Signalweg, der STAT (signal transducers and activators of transcriptions)-Signalweg und der SRC (sarcoma) / FAK (focal adhesion kinase)-Signalweg. Die Schlüsselrolle in Bezug auf Zellproliferation und Zellüberleben spielt der RAS-RAF-Signalweg. Durch Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinkinase wird KRAS (kirsten rat sarcoma)-Protein aktiviert. Das KRAS-Protein gehört zu der ras-Proto-Onkogen-Familie. Es ist an der inneren Plas-

amembran lokalisiert und besitzt GTPase Aktivität [43]. Im aktiven Zustand hat das KRAS-Protein GTP (guanosine triphosphate) gebunden und kann in diesem Zustand das Wachstumssignal in Richtung Zellkern weiterleiten. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über RAF, genauer gesagt BRAF. BRAF gehört zu den RAF-Proteinen, eine Familie von Serin / Threoninproteinkinasen. Durch BRAF werden MEK (mitogen-activated kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktiviert und dies führt letztendlich zur Transkription von Genen im Zellkern, die das Wachstum und die Proliferation der Zelle regulieren. Auch der PIK3CA / AKT-Signalweg und der SCR / FAK-Signalweg sind an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt.

Aufgrund der wichtigen Funktionen der durch den EGF-Rezeptor aktivierten Signalkaskaden, ist es von großer Bedeutung, falls eines oder mehrere Schlüsselgene der einzelnen Signalwege mutiert sind. So treten onkogene KRAS Mutationen in etwa 40 % aller mKRK auf [17, 18, 44, 45]. Diese Punktmutation des Protoonkogens befindet sich zu 98,4 % auf Codon 12 und 13, die Restlichen auf Codon 61 und 146 des KRAS Gens [46]. Eine Mutation des KRAS Gens führt zu einer Autoaktivierung des Signalweges, der dem KRAS-Protein nachgeschaltet ist. Es konnte in den vergangenen Jahren in mehreren Studien, die an Patienten mit mKRK durchgeführt wurden, retrospektiv gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem EGF-Rezeptor-Antagonist Cetuximab bei KRAS-mutierten Tumoren ineffektiv ist [47-50]. Diese Erkenntnisse wurden durch die CRYSTAL-Studie und eine OPUS-Studie bestätigt. Die CRYSTAL-Studie verglich eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Irinotecan (FOLFIRI) mit und ohne Kombination mit Cetuximab. Es konnte bei 540 der 1198 Patienten der KRAS Mutationsstatus des mKRK bestimmt werden, wobei bei 36 % der Patienten der Tumor ein mutiertes KRAS Gen aufwies. Die Zugabe von Cetuximab zu FOLFIRI bewirkte bei Patienten mit KRAS Wildtyptumoren eine signifikante Verlängerung des PFS (9,9 versus 8,7 Monate) und eine Erhöhung der Remissionsrate (59 % versus 43 %) [18]. Bei Patienten mit einer KRAS mutierten Tumoren konnte jedoch keine Wirkung durch die Zugabe von Cetuximab beobachtet werden. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden auch in der OPUS-Studie erzielt, die eine Oxaliplatin-basierte Chemotherapie (FOLFOX) mit Cetuximab kombinierte und diese mit einer alleinigen FOLFOX-Behandlung verglich. In dieser Studie induzierte die Zugabe von Cetuximab bei Patienten mit KRAS mutierten Tumoren eine signifikant niedrigere PFS (5,5 versus 8,6 Monate) und eine verringerte Remissionsrate (33 % versus 49 %) als unter der alleinigen Chemotherapie [17]. Diese Erkenntnisse weisen sehr stark darauf hin, dass Patienten, deren Tumore eine Mutation auf dem KRAS Gen aufweisen, nicht von einer Behandlung mit Cetuximab profitieren.

Das BRAF Protein, welches in der Signaltransduktionkaskade dem KRAS Protein folgt (Abbildung 1-2) ist bei 7-11 % der Patienten mit kolorektalen Karzinom mutiert. Fast alle Mutationen liegen auf Exon 15 (Codon 600) [44, 45, 51]. Eine Mutation des BRAF Gens entkoppelt dieses vom Aktivitätsstatus des EGF-Rezeptors und des KRAS Gens. Interessant ist, dass sich KRAS und BRAF Mutationen, abgesehen von ein paar sehr wenigen Ausnahmen, gegenseitig ausschließen [52, 53]. Ob eine BRAF Mutation ebenfalls ein negativer Prädiktor für ein Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab ist, ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion [54]. Eine aktuelle retrospektive Studie, die eine Kohorte von 132 Patienten untersucht hat, konnte die Einschränkung des Therapieansprechens bei Patienten mit BRAF mutierten Tumoren verdeutlichen. Keiner der Tumore der Patienten, die hier auf eine Cetuximab-basierte Therapie ansprachen, zeigte eine Mutation des BRAF Proteins, während bei 11 Patienten (14%), die nicht auf diese Therapie ansprachen, der Tumor eine Mutation auf dem BRAF Gen aufwies [55]. Außerdem konnte festgestellt werden, dass Patienten mit BRAF mutierten Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose zeigen als Patienten mit BRAF Wildtypumoren [56, 57].

Abgesehen von dem RAS-RAF-Signalweg aktiviert der EGF-Rezeptor auch den PIK3CA / AKT Signalweg. PIK3CA Mutationen können bei 13-16% der Patienten gefunden werden. Sie befinden sich auf Exon 9 und Exon 20 des Onkogens, zum größten Teil jedoch auf Exon 9 [58, 59]. Es konnte durch Analysen gezeigt werden, dass KRAS / BRAF Mutationen und PIK3CA Mutationen sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern gleichzeitig auftreten können [60, 61]. Studien aus jüngster Zeit deuten darauf hin, dass eine Mutation von PIK3CA ebenfalls mit einer schlechten Ansprechrate auf eine Cetuximab-basierte Chemotherapie in Verbindung gebracht werden kann [54, 58]. Somit könnte prinzipiell auch PIK3CA, genauso wie KRAS und BRAF als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab angesehen werden. Hingegen ist über Mutation AKT, welche PIK3CA im Signalweg nachgeschaltet ist, sehr wenig bekannt. Es ist berichtet worden, dass eine Mutation von AKT bei ca. 6 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom auftritt. Auch über den prädiktiven Wert des SRC / FAK-Signalwegs ist bisher wenig erforscht worden. Die Expression und die Aktivität der Tyrosinkinase SRC ist in über 80 % der kolorektalen Karzinome gesteigert. SRC wird mit einem schnellerem Fortschreiten und einer erhöhten Metastasierungsrate des Kolonkarzinoms in Verbindung gebracht [62]. Die klinische Relevanz einer AKT Mutation oder einer SRC Überexpression im Zusammenhang mit einer Cetuximab-basierten Chemotherapie ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht einschätzbar.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der einzelnen Genmutationen des EGFR-Pathways im Hinblick auf die objektive Ansprechrate (ORR= Overall Response Rate), progressionsfreies Überleben (PFS = Progression Free Survival) und Gesamtüberleben (OS = Overall Survival) darzustellen. Hierzu wurde eine molekularbiologische Klassifikation von 147 Patienten mit mKRK durchgeführt, welche im Rahmen der CIOX-Studie behandelt wurden.

Es wurden die folgenden Gene molekularbiologisch bestimmt und untersucht:

- KRAS Codon 12
- KRAS Codon 13
- KRAS Codon 61
- KRAS Codon 146
- BRAF Exon 11
- BRAF Exon 15
- PIK3CA Exon 9
- PIK3CA Exon 20
- AKT
- SRC

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung einzelner Mutationen auf die Auswahl des chemotherapeutischen Backbones (Irinotecan vs. Oxaliplatin) zu beurteilen und miteinander zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten und Therapieschema

Im Zeitraum von September 2004 bis Dezember 2006 wurden insgesamt 185 Patienten mit mKRK in die CIOX Studie (AIO KRK-0104) eingeschlossen. Bei der CIOX-Studie handelt es sich um eine randomisierte, offene multizentrische Phase II-Studie.

Einschlusskriterien, um an der Studie teilnehmen zu können, waren die Folgenden:

- Unterzeichnete, schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme nach erfolgter Aufklärung
- Alter der Patienten: 18 - 75 Jahre
- Histologisch nachgewiesenes Adenokarzinom des Kolons (UICC Stadium IV)
- Messung der EGFR- Expression (das Ergebnis der Analyse musste bei Randomisation nicht vorliegen)
- Karnofsky Performance Status ≥ 70 %
- Lebenserwartung ≥ 3 Monate
- Vorliegen von mindestens einer messbaren Läsion nach RECIST (längster Durchmesser mindestens 20 mm, Läsion nicht in einem bestrahlten Gebiet)
- Wirksame Kontrazeption bei Männern und Frauen, falls die Möglichkeit einer Schwangerschaft / Zeugung besteht
- Keine vorherige Therapie mit Topoisomerase-1 Inhibitoren
- Keine vorherige den EGF-Rezeptor betreffende Therapie mit monoklonalen Antikörpern, Inhibitoren der Signalübertragung oder mit anderen auf den EGF-Rezeptor abzielenden Therapien
- Keine chirurgischen Eingriffe oder Bestrahlungen innerhalb von 4 Wochen vor Studienbeginn

Ausschlusskriterien waren:

- Andere gleichzeitige Behandlung des kolorektalen Karzinoms (außer mit Studienmedikation)
- Z.n. Myokardinfarkt
- Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance < 30 ml/min)

- Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
- Bekannte oder vermutete Hirnmetastasen
- Bekannter Alkohol- oder Drogenmissbrauch
- Akuter oder subakuter Darmverschluss
- Kontraindikation oder bekannte Unverträglichkeit gegen eine der als Studienmedikation verabreichten Substanzen
- Fehlende oder eingeschränkte Geschäftsfähigkeit

Im Rahmen der zwei Chemotherapieschemata wurden die jeweiligen Substanzen als Erstlinienbehandlung in folgenden Dosierungen pro Zyklus (21 Tage) verabreicht:

Cetuximab = Initialdosis von 400 mg/m² KÖF als 120-minütige intravenöse Infusion, gefolgt von einer 60 minütigen intravenösen Infusion von 250 mg/m² KÖF

Capecitabin = Arm A: 800 mg/m² KÖF per os Tag 1 – 14, gefolgt von einer einwöchigen Pause
 Arm B: 1000 mg/m² KÖF per os Tag 1 – 14, gefolgt von einer einwöchigen Pause

Irinotecan = 200 mg/m² KÖF als 30-minütige Infusion an Tag 1

Oxaliplatin = 130 mg/m² als 120-minütige Infusion an Tag 1

Bei Patienten, die über 65 Jahre alt waren, wurden die Dosierungen von Irinotecan und Capecitabin um 20 % reduziert. Ob der Tumor auf diese Behandlung ansprach, wurde alle zwei Zyklen (alle sechs Wochen) von den Untersuchern mittels CT oder MRT beurteilt. Das Überleben der Patienten wurde alle drei Monate mindestens zwei Jahre lang kontrolliert. Die intention-to-treat (ITT) Population der Studie umfasste alle Patienten, die mindestens zu einem Zeitpunkt eine Chemotherapie erhalten hatten. Die assessable-for-efficacy (AFE) Population des Patientenkollektivs wurde definiert als die Patienten, die eine weiterführende Behandlung innerhalb der Studie auch nach der ersten Tumorbeurteilung erhielten.

Primärer Endpunkt der Studie war die objektive Ansprechrate (Overall Response Rate = Complete Response + Partial Response) des Tumors auf die angewandte Therapie.

Sekundäre Endpunkte waren die Zeit bis zur Progression (definiert als Zeitintervall zwischen erstem Behandlungstag und erstem Nachweis eines Fortschreitens der Krankheit), die Krankheitskontrollrate (Disease Control Rate = Overall Response Rate plus Stable Disease) und die Beurteilung der Grad drei und vier Toxizität (nach National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria for Adverse Events Version 3.0).

2.1.2 Probengewinnung

Nach Abschluss der Studie im Jahre 2006 konnten von 155 Patienten (etwa 80% der Studienpopulation) Tumorproben gesammelt werden. Die in Paraffin eingebetteten, formalinfixierten Tumorblöcke wurden von 35 verschiedenen pathologischen Instituten aus ganz Deutschland eingeschickt. Es handelte sich entweder um Tumorsektate oder Biopsien.

Die Genehmigung, den KRAS Mutationsstatus und vergleichbare Veränderungen der EGFR-abhängigen Signaltransduktion der vorhandenen Tumorproben im Rahmen der CIOX-Studie nachzubestimmen, wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München eingeholt (Ethikvotumnummer 0904).

2.2 Methodik

2.2.1 Probenverarbeitung

Um die Mutationsanalysen durchführen zu können, wurden zunächst von den eingesandten Tumorblöcken 4 µm dünne Paraffinschnitte hergestellt. Pro Gewebeprobe wurden jeweils 12 Schnitte angefertigt und diese auf Objektträgern fixiert. Von den 12 Schnitten wurde jeweils ein Paraffinschnitt mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung versehen. Hierbei wurde der relevante Tumoranteil detektiert und markiert. Zur weiteren Probenverarbeitung musste das Material entparaffiniert werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst zweimal 15 Minuten in reines Xylol gegeben und danach dreimal 10 Minuten in reinen Alkohol gegeben. Somit lag das Gewebe frei und stand zur weiterführenden Diagnostik zur Verfügung.

Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien und Puffer sind im Anhang (7) aufgeführt. Im Folgenden werden, der besseren Lesbarkeit halber, nur die Puffer und Reagenzien benannt.

2.2.2 DNA-Isolierung und Aufarbeitung

Das für die DNA-Extraktion vorgesehene Tumorgewebe wurde, wie zuvor beschrieben, auf dem Hämatoxylin-Eosin-Schnitt markiert und daraufhin mittels Mikrodissektion per Hand aus dem entparaffinierten Leerschnitt herausgelöst. Dieses Tumorgewebe wurde in ein mit gepufferter Proteinase Lösung gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lösung besteht aus jeweils 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K und dient der Gewebelyse. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit der Firma Qiagen genutzt. Nach diesem Schritt wurde das Gewebe über Nacht in einem Thermomixer inkubiert. Die DNA-Proben wurden hierbei zunächst 5 Stunden auf 56°C erhitzt und danach 23 Stunden lang konstant auf Raumtemperatur (23 °C) gehalten. Der Thermomixer ist durch dieses Programm in der Lage, die Gewebeprobe zu mischen und gleichzeitig zu temperieren. Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebelysate mit Hilfe des bereits etablier-

ten DNAeasy Systems der Firma Qiagen aufgereinigt, welches ebenfalls Bestandteil des oben erwähnten Kits ist.

Bei dieser Methode wurden ATE Puffer (Waschpuffer), AL Puffer (Lysepuffer), AW 1 Puffer (Waschpuffer), AW 2 Puffer (Waschpuffer) und 100 % Alkohol mit den in Proteinase gelösten Gewebeproben in den Qiacube der Firma Qiagen gegeben. Nach Durchführung gemäß den Angaben des Herstellers stand am Ende die durch ein einstündiges Programm gereinigte DNA zur Verfügung. Die purifizierte DNA wurde daraufhin bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.3 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction) bietet die Möglichkeit, in vitro eine spezifische Nukleinsäuresequenz exponentiell zu vervielfältigen. Sogar bei Vorliegen einer einzelnen Kopie einer DNA-Matrize (Template), kann diese mittels PCR amplifiziert werden.

Verwendet wird hierbei eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (die sogenannte Taq-Polymerase) sowie ein jeweils sequenzspezifisches Oligonukleotid-Primerpaar.

Das Prinzip der PCR lässt sich durch drei Reaktionszyklen beschreiben:

Zunächst wird die Doppelstrang-DNA auf 95 °C erhitzt und somit denaturiert. Anschließend hybridisieren die Primer, die komplementär zu der zu untersuchenden DNA-Sequenz oder deren Komplementärstrang sind, an die DNA. Dies geschieht bei Temperaturen zwischen 40 °C und 70 °C. Im letzten Schritt wird die DNA bei 72 °C durch die thermostabile Taq-Polymerase elongiert. Diese Vorgänge werden mehrfach durchlaufen, sodass im Idealfall eine exponentielle Vervielfältigung des DNA-Fragments zwischen den beiden Primern daraus resultiert.

2.2.4 PCR-Durchführung

Für die Durchführung der PCR musste zunächst ein Mastermix angesetzt werden.

Dieser Mastermix setzte sich bei jedem zu untersuchenden Zielgen aus den gleichen Bestandteilen zusammen. Er enthält die für die PCR notwendigen Puffer und Nukleinsäuren, sodass vor der PCR nur noch die Taq-Polymerase und die spezifischen Primer zugesetzt werden müssen. Der Mastermix wurde für jedes zu untersuchende Gen nach einer bereits etablierten, standardisierten Methodik (SOP = standard operation procedure) der Diagnostik des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilian-Universität München angesetzt. Genutzt wurde auch hier ein kommerziell erwerbliches Kit der Firma Qiagen.

Der Mastermix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- H₂O (Aqua.dest)

- PCR Puffer (containing 15 mM MgCl₂)
- dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate)

Als Template dienten jeweils 2 µl der zu untersuchenden DNA.

Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht der verwendeten Elemente zur späteren Durchführung der PCR. Sie bezieht sich auf einen Ansatz für 24 DNA Proben. Zusätzlich zu den DNA Proben von 24 verschiedenen Patienten wurde jeweils eine Positivkontrolle mit einer Human Genomic Male DNA durchgeführt und eine Negativkontrolle mit H₂O (Aqua.dest). Daher wurde der Mastermix jeweils für 26 Proben angesetzt (Tabelle 2-1).

Reagenz	Ausgangskonzentration		Endkonzentration		Probe	Mastermix
	Menge	Einheit	Menge	Einheit	Menge in µl	Menge in µl
H ₂ O					30,2	785,2
10fach Puffer	10	x	1	x	4	104
MgCl ₂	25	mM	1,5	mM	2,4	62,4
dNTP	20	mM	0,2	mM	0,4	10,4
Primer-Mix	20	µM	0,4	µM	0,8	20,8
Taq-Polymerase	5	U/µl	1	U/µl	0,2	5,2
					Σ 38	Σ 988

dNTP = Desoxyribonucleosidtriphosphat, 10xbuffer = PCR Puffer

Tabelle 2-1 Mastermix

Von dem hergestellten Mastermix wurden jeweils 38 µl mit 2 µl DNA in dafür vorgesehene Tubes überführt. Die so gewonnene Lösung wurde daraufhin für 2½ Stunden in den Thermocycler gegeben, in dem die PCR erfolgte. Der Thermocycler durchläuft in dieser Zeit 50 Zyklen nach dem zuvor beschriebenen Prinzip, in denen die DNA vervielfältigt wird (Tabelle 2-2).

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	15min	94°C
50	30sec	94°C
1	30sec	T _M
1	30sec	72°C
1	10min	72°C
1	1sec	20°C

Tabelle 2-2 Zyklen der PCR

Die Schmelztemperatur (T_M) des Primers musste bei den verschiedenen zu untersuchenden Genen im Thermocycler eingestellt werden. Die Schmelztemperatur ist abhängig von Länge und Sequenz des jeweiligen Primers. Die genaue Bestimmung der Schmelztemperatur ist wichtig, um

die spezifische Anlagerung der jeweiligen Primer an die DNA zu gewährleisten (Hybridisierungsprozess der PCR).

Bei den Genen SRC, KRAS 61, KRAS 146, PIK3CA Exon 9, PIK3CA Exon 20 und AKT war die im Thermocycler einzustellende Schmelztemperatur noch nicht bekannt und musste daher anhand eines PCR Optimierungsprotokolls herausgefunden werden. Bei diesem Protokoll wurde ebenfalls ein Mastermix nach dem zuvor beschriebenen Schema (Tabelle 2-1) angesetzt. Hinzugefügt wurden der jeweilige Primer (Tabelle 2-3). Als Template wurden jeweils 2 µl Human Genomic Male DNA mit 8µl des Mastermixes in acht dafür vorgesehene Tubes gefüllt. In dem Thermocycler wurde nun ein ca. dreistündiges Gradientenprogramm gestartet, welches die PCR mit acht verschiedenen Schmelztemperaturen durchläuft. Durch Überprüfung mittels eines Agarsegels konnte daraufhin sichtbar gemacht werden, bei welcher Temperatur die PCR am erfolgreichsten war.

Gen	Primer	Sequenz	Firma
KRAS Exon 2*	Ogino: A1975 KRAS-Pyro-F1 A1976 KRAS-Pyro-R1-BIO	Fwd_5'-NNNGGCCTGAAAATGACTGAA-3' Rev_5'-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'	Biomers
	Poehlmann: A1978 KRAS-Pyro-F2-BIO A1979 KRAS-Pyro-R2	Fwd_5'-TGACTGAATAACTTGTGGTAGTTG-3' Rev_5'-TCGTCCACAAAATGATTCGAA-3'	
KRAS Codon 61	A2213 KRAS 61-F-Loupakis A2214 KRAS 61-R-BIO-Loupakis	Fwd_5'-CAGACTGTGTTCTCCCTTCTCA-3' Rev_5'-CTCATGTACTGGTCCCTCATTG-3'	Biomers
KRAS Codon 146	A2269 KRAS 146 #2-U A2270 KRAS 146#2-L-BIO	Fwd_5'-AGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTT-3' Rev_5'-GCATAATTGAGAGAAAACTGATATATTAATG-3'	Biomers
BRAF Exon 11	A1951 BRAF-Ex11-Pyro-F1-BIO A1952 BRAF-Ex11-Pyro-R1	Fwd_5'-CAGTGGGACAAAGAATTGGATCTG-3' Rev_5'-CCATGCCACTTTCCTTGTAGA-3'	Biomers
BRAF Exon 15	A1954 BRAF-Ex15-Pyro-F1 A1955 BRAF-Ex15-Pyro-R1-BIO	Fwd_5'-TGAAGACCTCACAGTAAAATAGG-3' Rev_5'-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT-3'	Biomers
AKT	A2079 AKT-F8-BIO A2080 AKT-R1	Fwd_5'-GTGTGCGTGGCTCTCACC-3' Rev_5'-GCCGCCAGGCTTGATGTAC-3'	Biomers
SRC	A2064-cSRC-F1 A2065-cSRC-R3-BIO	Fwd_5'-GTCCACCCGACCCAGTA-3' Rev_5'-AGCCGAGAAGCCGGTCTG-3'	Biomers
PIK3CA Exon 9	A2328-PIK3CA-Ex9-F A2329-PIK3CA-R-BIO	Fwd_5'-AACAGCTCAAAGCAATTTCTACAG-3' Fwd_5'-ACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTT-3'	Biomers
PIK3CA Exon 20	A2331-PIK3CA-Ex20-F A2332-PIK3CA-Ex20-R-BIO	Fwd_5'-CAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA-3' Rev_5'-CAATCCATTTTTGTTGTCCA-3'	Biomers

KRAS = Kirsten rat sarcoma, RAF = b-rat fibrosarcoma, AKT = proteinkinase B, SRC = sarcoma, PIK3CA = phosphoinositol-3-kinase

Tabelle 2-3 Verwendete Primer für die PCR

* Im Fall von KRAS Exon2 basiert die Reaktion auf zwei verschiedenen PCRs, die durch die in entgegengesetzter Richtung laufenden Primer nach Ogino und Poehlmann generiert wird.

2.2.5 Überprüfung der PCR mittels Gelelektrophorese

Zur Überprüfung einer erfolgreichen PCR wurde das jeweilige PCR Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung eines solchen Gels wurde zunächst 2 g Agarose zusammen mit 100 ml TBE-Puffer in einen Glaskolben gegeben. Dieser wurde daraufhin für 2 min bei 60 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurde zusätzlich 3 µl Ethidiumbromid (EtBr) dazugegeben und die flüssige Gellösung in den dafür vorgesehenen Gelständer gegeben. Während das Gel sich verfestigte, wurden die DNA-Proben vorbereitet. Hierzu wurden jeweils ca. 8 µl PCR Produkt (DNA) mit 1,5 µl Loading Dye in ein Tube überführt. Der sogenannte Loading Dye ist ein glycerinhaltiger Ladepuffer, der die DNA-Proben beschwert und somit dafür sorgt, dass diese im Agarosegel stärker nach unten sinken. Außerdem ist es durch diesen Ladepuffer möglich, den farblichen Verlauf der DNA-Proben auf dem Gel zu verfolgen.

Nach diesem Schritt wurden jeweils 5 µl Probe aus den vorbereiteten Tubes in kleine Taschen des inzwischen verfesteten Gels gegeben. An die beiden Ränder wurde 100bp Plus DNA Ladder 0,1 µg/ml gegeben. Dies ist ein Standardmarker mit einer Länge von 100 Basenpaaren zum Vergleich des Laufs der DNA Proben auf dem Gel. Nun wurde eine 80 Volt Spannung angelegt und die Auftrennung der DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe gestartet. Nach ca. einer Stunde war das Gel durchgelaufen. Als bildgebendes Gerät wurde eine Kamera mit Weiß- und UV-Licht (Alpha Innotech, vertrieben von Biorad) benutzt, um das Ergebnis fotografisch festzuhalten.

Abbildung 2-1 zeigt ein Beispiel eines Gels mit insgesamt sieben verschiedenen DNA-Proben. Je deutlicher die Banden auf dem Gelhintergrund zu sehen sind, desto erfolgreicher ist die PCR verlaufen.

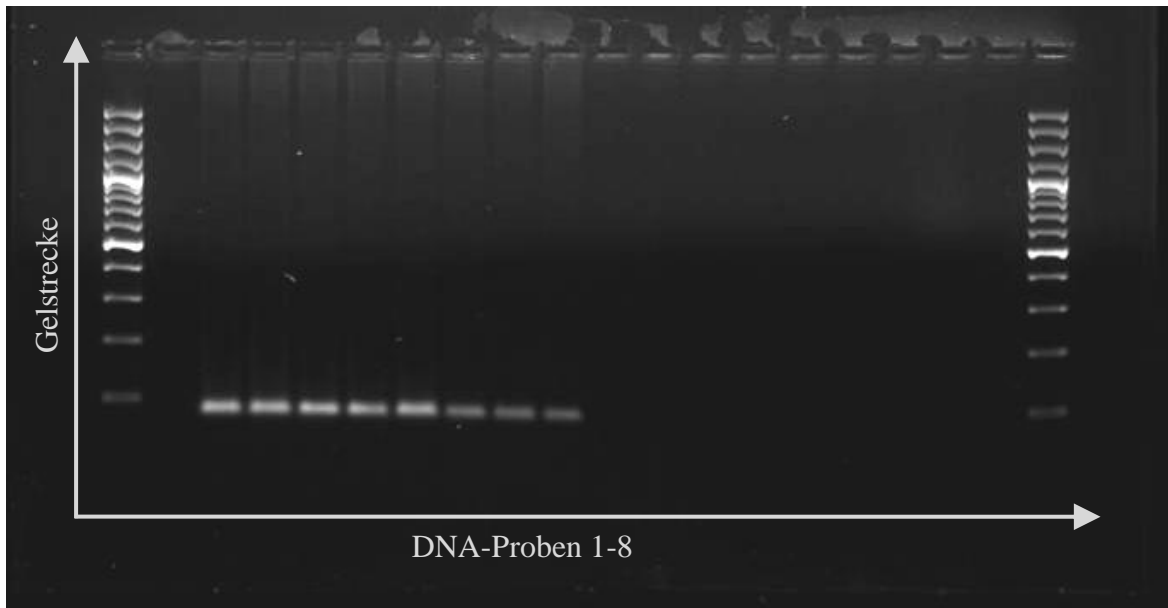


Abbildung 2-1 Beispiel einer Gelelektrophorese mit sieben DNA-Proben

2.2.6 Pyrosequenzierung

Bei einem positiven Ergebnis der Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt weiter verarbeitet und mittels Pyrosequenzer sequenziert. Die Methode des Pyrosequenzings basiert auf der Synthese eines DNA-Gegenstrangs durch die DNA-Polymerase. Hierbei werden von der DNA-Polymerase nacheinander die einzelnen Nukleotide an den neu synthetisierten DNA-Strang angehängt. Der erfolgreiche Einbau des passenden Nukleotids wird durch ein Enzymsystem unter Beteiligung der Luziferase in einen Lichtblitz umgesetzt, der von einem Detektor erfasst wird. Die Verlängerung des DNA-Stranges erfolgt auf diesem Wege mit Hilfe des Sequenzierungsprimers (Tabelle 2-6) und durch Zugabe des Nukleosidtriphosphates mit der jeweils passenden Base Adenin (A), Guanin (G), Cytidin (C), oder Thymin (T). Genutzt wurde ein kommerziell erwerbliches Pyrosequencing Kit der Firma Biotage.

Die Durchführung des Pyrosequenzings erfolgte anhand eines bereits bekannten Protokolls der Pathologie der LMU München. Hierbei wurde zunächst ein Mastermix aus sogenannten Beads, welche die DNA-Proben binden und immobilisieren, zusätzlichem Binding Buffer und destilliertem Wasser hergestellt. Währenddessen wurde der passende Sequenzierungsprimer (Tabelle 2-6) nach Protokoll mit Annealing Buffer vermischt. Eine Übersicht des Sequenzierungsprotokolls des pathologischen Instituts der LMU München geben die folgenden Tabellen (Tabelle 2-4, Tabelle 2-5).

Reagenz	Probe	Mastermix
	Menge in μl	Menge in μl
beads	2	52
binding buffer	40	1040
Wasser	23	598
Σ	80	2080

beads = Streptavidin Sepharose, siehe Anhang

Tabelle 2-4 PCR-Produkte

Reagenz	Probe	Mastermix
	Menge in μl	Menge in μl
primer (10x; 3 μM)	2,5	65
annealing buffer	22,5	585
Σ	25	650

Tabelle 2-5 Primeransatz

Die Berechnung bezog sich auch hier auf 26 DNA-Ansätze. Jedoch wurden pro Sequenzierun-
lauf nur jeweils 22 PCR-Protokolle, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle sequenziert.
Nach Ansetzen des Mastermixes (Tabelle 2-4) wurden 65 μl von diesem mit jeweils 15 μl DNA
in vorhergesehene Tubes überführt. Vor Ansetzen des Primers (Tabelle 2-5) wurden jeweils 3 μl
des passenden Primers mit 97 μl Annealing Buffer verdünnt. Danach konnte der Mastermix für
den Primer angesetzt werden (Tabelle 2-5), von dem jeweils 25 μl in vorhergesehene Tubes ge-
füllt wurden.

Nach diesem Schritt konnten die PCR-Produkte durch Ausführung des von der Firma Biotage
vorgegebenen PyroMark Q₂₄ Plate Systems mit dem jeweiligen Primer auf einer dafür vorge-
sehenen Tube-Plate zusammengeführt werden. Dieser hergestellte Mix musste nun für zwei Mi-
nuten auf einer Heizplatte auf 80 °C erhitzt werden. Dies dient der Denaturierung des DNA-
Doppelstrangs in zwei Einzelstränge, da nur so die DNA-Polymerase an die DNA hybridisieren
und diese vervielfältigen kann. Danach wurde die sogenannte Kartusche des Pyrosequenzers
(PyroMark Q₂₄, Firma: Biotage) mit den folgenden Bestandteilen des Pyrosequenzierung-Kits
beladen:

119 μl Substrat, 119 μl Enzym und jeweils vier passenden Basen Adenin, Guanin, Cytidin,
Thymin. Jeder dieser Bestandteile hatte seine vorgegebene Position in der Kartusche (Abbildung
2-2).

Enzym	Adenin	Substrat
Thymin		Cytidin
	Guanin	
Label		

Abbildung 2-2 Belegung der Kartusche

Nun konnten die beladene Kartusche und die Reagenzgefäßplatte, bestehend aus PCR-Produkt und Primer, in den Pyrosequenzer gegeben und das Sequenzierungsprogramm gestartet werden. Je nach Art des zu untersuchenden Gens war das Programm innerhalb von zwanzig bis dreißig Minuten durchgelaufen.

Mit Hilfe einer zum Pyrosequenzer zugehörigen Software (PyroMark Q₂₄, 2.0.6) war man letztendlich in der Lage, die Sequenz des jeweiligen Gens zu analysieren. Die Höhe der erzeugten Peaks der jeweiligen Base durch die vorausgegangene Lichtreaktion gibt Aufschluss über die Abfolge der einzelnen Basen und damit über das Vorhandensein einer Mutation. Die Ergebnisse wurden zunächst in einer Exceltabelle festgehalten und in weiteren Arbeitsschritten ausgewertet.

Gen	Primer	Sequenz	Firma
KRAS Codon 12 und 13	Ogino: A1977-KRAS-Pyro-S1	5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3'	Biomers
	Poehlmann: A1980-KRAS-Pyro-S2	5'-GCACTCTTGCCTACG-3'	
KRAS Codon 61	A2215-KRAS61-S-Loupakis	5'-ATATTCTCGACACAGCAG-3'	Biomers
KRAS Codon 146	A2271-KRAS146#2-S	5'-AATTCCTTTTATTGAAACAT-3'	Biomers
BRAF Exon 11	A1953-BRAF-Ex11-Pyro-S1	5'-ACTTTCCTTGTAGACTGT-3'	Biomers
BRAF Exon 15	A1956-BRAF-Ex15-Pyro-S1	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGG-3'	Biomers
AKT	A2081-AKT-S6	5'-CGCCAGGTCTGGATGT-3'	Biomers
SRC	A2066-cSRC-S1	5'-CACCGAGCCCCAGTA-3'	Biomers
PIK3CA Exon 9	A2330-PIK3CA-Ex9-S2	5'-CTACACGAGATCCTCTCTC-3'	Biomers
PIK3CA Exon 20	A2330-PIK3CA-Ex20-S2	5'-GTTGTCCAGCCACCA-3'	Biomers

KRAS = Kirsten rat sarcoma, RAF = b-rat fibrosarcoma, AKT = Proteinkinase B, SRC = sarcoma, PIK3CA = Phosphoinositol-3-kinase

Tabelle 2-6 Verwendete Primer für das Pyrosequenzieren

2.2.7 Statistik:

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) durchgeführt. Primäres Ziel war es, die untersuchten Mutationen als Prädiktor für die Gesamt-Ansprechraten (Overall Response Rate) und die Kontrollrate (Disease Control Rate) zu beurteilen. Aus diesem Grund wurden die Ansprechraten der verschiedenen Gruppen durch den exakten Test nach Fisher ausgerechnet. Sekundäre Endpunkte waren hier das progressionsfreie Überleben (PFS = Progression Free Survival) und das Gesamtüberleben (OS = Overall Survival).

Die Überlebenszeiten wurden mittels Kaplan-Meier-Diagrammen dargestellt und Unterschiede zwischen den Gruppen mittels logrank-Test untersucht. Differenzen in den Ansprechraten wurden mittels exaktem Test nach Fisher zweiseitig auf statistische Signifikanz getestet.

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Extraktion und Probenverarbeitung

Von den 185 Patienten, die von September 2004 bis Dezember 2006 an der CIOX-Studie teilgenommen haben, konnten insgesamt 155 Tumorproben gesammelt werden. Bei der Probenverarbeitung stellte sich bei 8 Proben heraus, dass kein Tumor im Gewebeblock vorhanden war. Infolgedessen wurden diese Proben nicht weiter verarbeitet und von der Mutationsanalyse ausgeschlossen. Die DNA-Extraktion mittels Mikrodissektion am Mikroskop erfolgte bei den restlichen 147 Tumorproben ohne Probleme. Auch die Aufreinigung der DNA durch das DNAeasy System und die Durchführung der PCR konnten mit Hilfe der bereits etablierten, standardisierten Methodik der Diagnostik des pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilian-Universität München erfolgreich durchgeführt werden. Vor Ablauf der PCR im Thermocycler musste die Schmelztemperatur der Gene bestimmt werden. Bei den Genen KRAS Exon 12, BRAF Exon 11 und BRAF Exon 15 war die einzustellende Temperatur durch etablierte Protokolle bereits bekannt. Sie betrug in allen vier Fällen 60 °C. Bei den Genen SRC, KRAS Codon 61, KRAS Codon 146, PIK3CA Exon 9, PIK3CA Exon 20 und AKT musste die Schmelztemperatur ermittelt werden. Durch das PCR-Optimierungsprogramm und ein dreistündiges Gradientenporgramm im Thermocycler (2.2.4) konnte schließlich durch Durchführung eines Agarosegels bestimmt werden, welche Schmelztemperatur für die verschiedenen Gene geeignet war. Abbildung 3-1 zeigt das Agarosegel, durch welches die Schmelztemperatur von Pi3CA Exon 9 bestimmt wurde. Man erkennt deutlich die gut sichtbare Bande der DNA-Probe bei 59,9 °C. Aus diesem Grund wurde eine Schmelztemperatur von 60 °C für die PCR von PIK3CA Exon 9 ausgewählt (Abbildung 3-1).

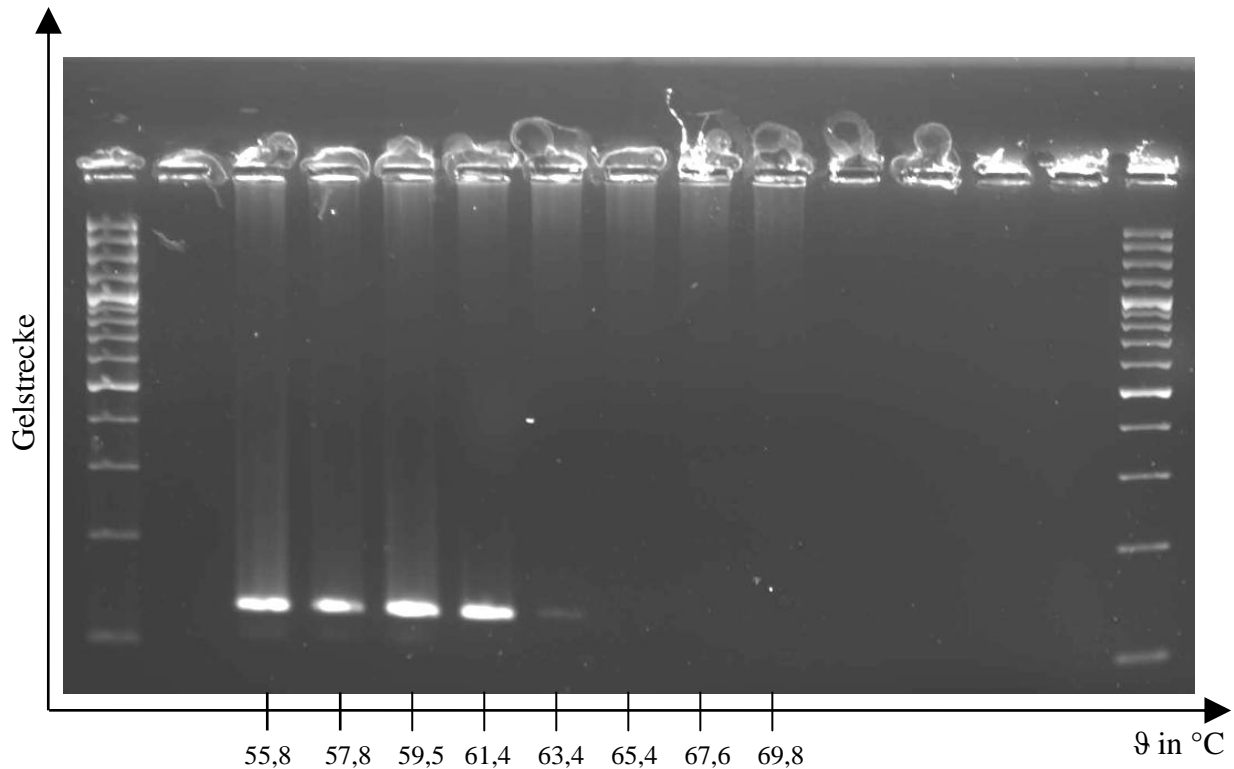


Abbildung 3-1 Agarosegel zur Bestimmung der Schmelztemperatur von PIK3CA Exon 9

Nach der Ausführung dieser Schritte ließen sich folgende Schmelztemperaturen für die einzelnen Gene ermitteln:

Gen	T_M
SRC	58 °C
KRAS 61	58 °C
KRAS 146	58 °C
PIK3CA Exon 9	60 °C
PIK3CA Exon 20	60 °C
AKT	62 °C

Tabelle 3-1 Übersicht der Schmelztemperaturen der einzelnen Gene

Nach Ablauf der PCR der verschiedenen Gene konnte durch die Durchführung des Pyrosequenzings und mit Hilfe der Pyrosequenzung Software herausgefunden werden, ob eine Mutation vorlag und welcher Art sie war. Die folgenden zwei Abbildungen stellen zwei Ergebnisse des Pyrosequenzings dar. Abbildung 3-2 zeigt KRAS Codon 12 und 13 am Beispiel eines Wildtypstumors mit der Basensequenz GGT GGC. In Abbildung 3-3 ist KRAS Codon 12 mutiert. Die Base Guanin ist durch Tyrosin ausgetauscht, wodurch sich für KRAS Codon 12 und 13 Basensequenz GTT GGC ergibt.

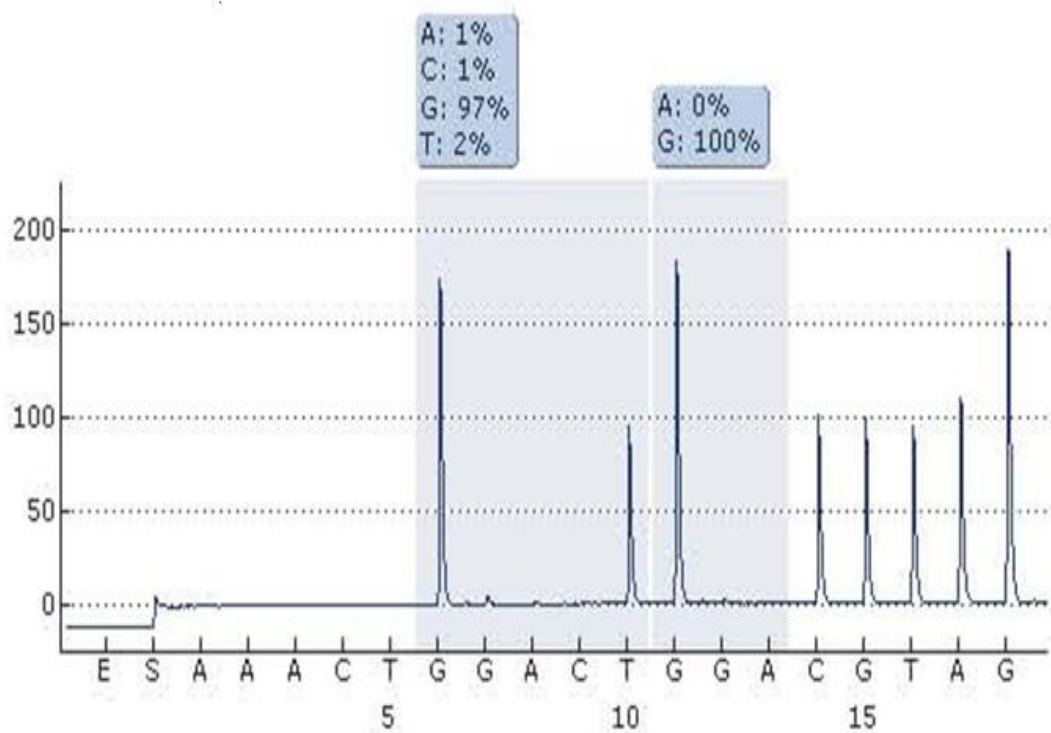


Abbildung 3-2 Pyrosequenzung: KRAS Codon 12 Wildtyp, KRAS Codon 13 Wildtyp

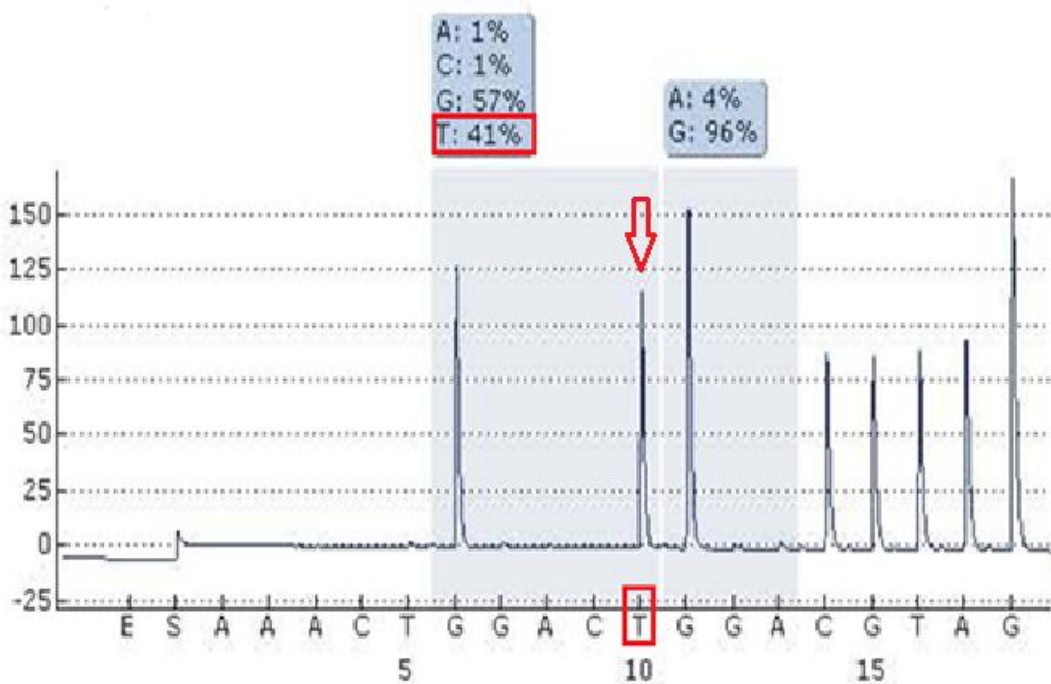


Abbildung 3-3 Pyrosequenzung: KRAS Codon 12 mutiert, KRAS Codon 13 Wildtyp

3.2 Mutationslokalisationen der einzelnen Gene

Nach der Durchführung und der Auswertung des Pyrosequenzings aller zu untersuchenden Gene für die gesamten Proben wurde letztendlich ersichtlich, wie oft welches Gen in der untersuchten Kohorte mutiert war und welche verschiedenen Arten von Mutationen vorkamen. Abbildung 3-4 zeigt den Anteil der verschiedenen Mutationen von KRAS. Von den 147 untersuchten Proben war bei insgesamt 57 Proben das KRAS Gen mutiert. Dies entspricht einem Prozentsatz von 39 %. Den größten Anteil nahm mit Abstand Codon 12 ein. Bei 44 der 57 Proben, bei denen KRAS mutiert war, befand sich die Mutation auf Codon 12 (77 %).

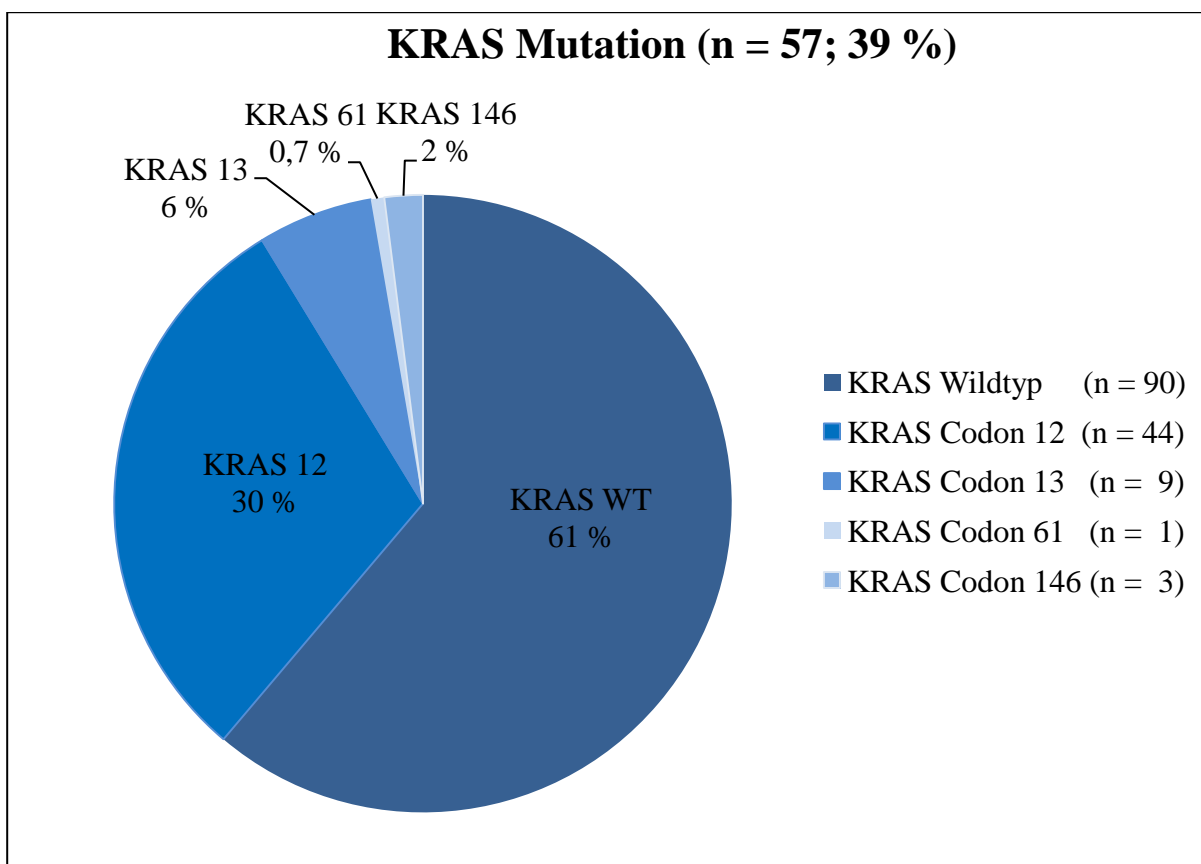


Abbildung 3-4 Anteile der verschiedenen KRAS Mutationen

Bei den 44 Proben, bei denen KRAS Codon 12 mutiert war, konnten verschiedene Mutationen an unterschiedlichen Stellen des Gens entdeckt werden. Tabelle 3-2 gibt eine Übersicht der einzelnen Mutationslokalisationen von Codon 12.

Art der KRAS Codon Mutation (n = 44)		
Aminosäurenaustausch	Lokalisation / Nukleotidaustausch	Anteil in %
Glycin > Aspartat	c.35 Guanin > Adenin	34%
Glycin > Valin	c.35 Guanin > Thymin	30%
Glycin > Cystein	c.34 Guanin > Thymin	18%
Glycin > Alanin	c.35 Guanin > Cytosin	16%
Glycin > Serin	c.34 Guanin > Adenin	2%

Tabelle 3-2 Lokalisationen der verschiedenen KRAS Codon 12 Mutationen

Bei KRAS Codon 13 hingegen kam ausschließlich die Mutation c.38 G > A vor. Auch bei KRAS Codon 61 und bei KRAS Codon 146 konnte jeweils nur eine Art von Mutation beobachtet werden. Im Falle von KRAS Codon 61 war dies die Mutation c.183 A > C und im Falle von KRAS Codon 146 handelte es sich um die Mutation c.436 G > A.

Insgesamt war bei 19 Proben das BRAF Gen mutiert. Dies entspricht einem Prozentsatz von 13 %. Wie in Abbildung 3-5 zu erkennen ist, war ausschließlich BRAF Exon 15 betroffen. BRAF Exon 11 war in keinem der Fälle mutiert. Auf Exon 15 trat nur die Mutation c.1799 T > A auf.

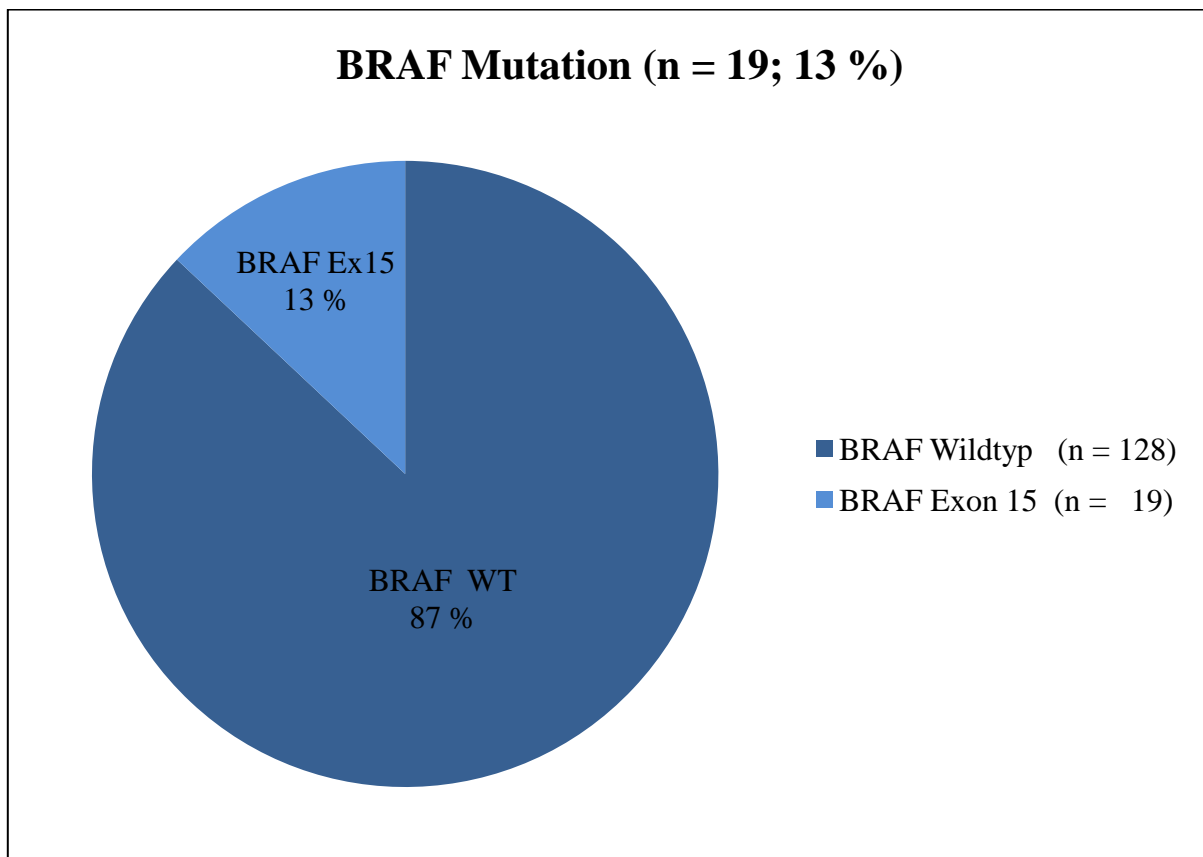


Abbildung 3-5 Anteil der BRAF Mutationen

Abbildung 3-6 zeigt die Häufigkeit der PIK3CA Mutationen. Insgesamt trat eine Mutation von PIK3CA bei 24 Proben auf. Diese entspricht einem Prozentsatz von 16 %. Die Mutation war in allen Fällen auf Exon 9 lokalisiert. Exon 20 zeigte keine Mutation. Auf Exon 9 kam ausschließlich die c.1624 G > C vor.

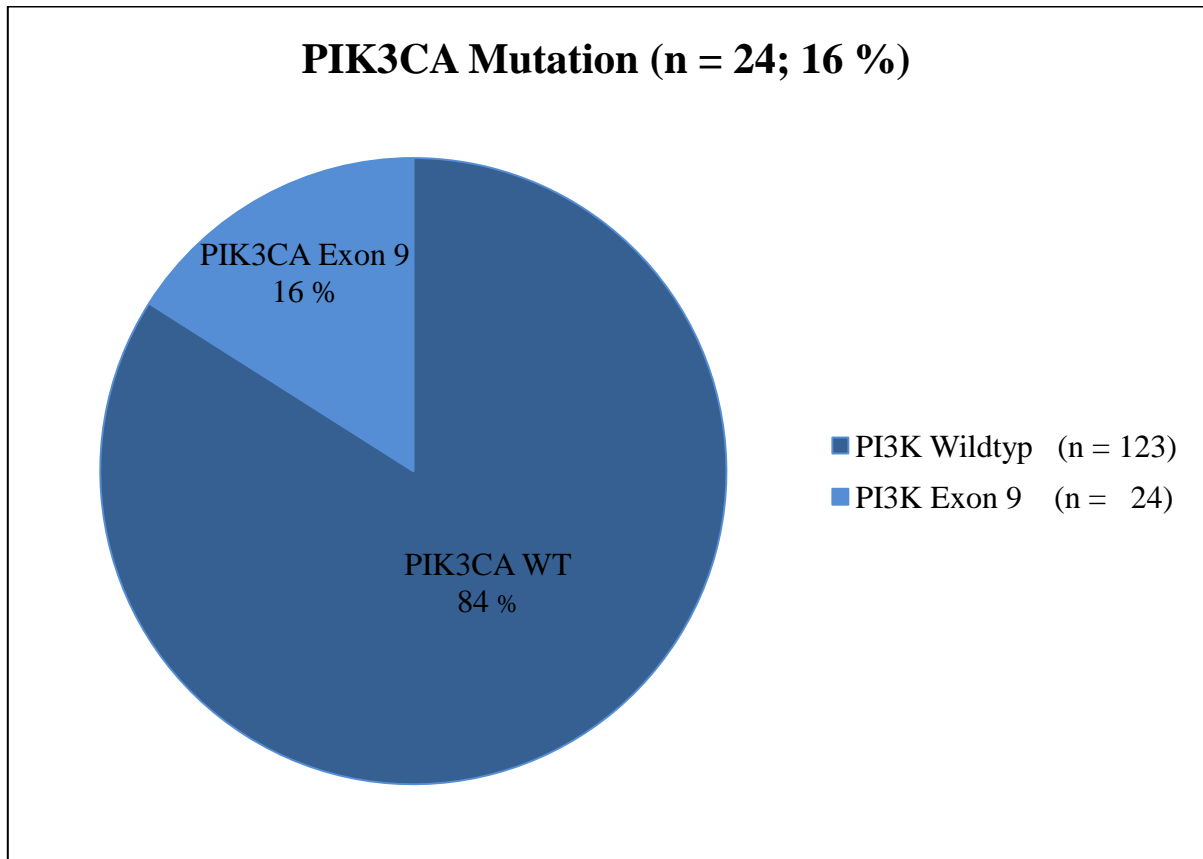


Abbildung 3-6 Anteil der PIK3CA Mutationen

Bei den Genen SCR und AKT konnte bei keiner der 147 Proben eine Mutation festgestellt werden. Daher scheiden die Gene für die weitere Darstellung in dieser Arbeit aus.

3.3 Statistische Auswertungen der durch die Mutationsanalyse erhobenen Daten

Durch das Statistikprogramm SPSS PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) konnten die Daten der einzelnen Gene, die durch die Ergebnisse des Pyrosequenzings erhoben wurden, ausgewertet werden. Die Auswertungen beziehen sich auf den Anteil der Studienpopulation, welcher auch nach der ersten Tumorbeurteilung eine Chemotherapie im Rahmen der CIOX-Studie erhalten hat (AFE = assessable-to-efficacy). Es wurde beim Erheben der Ergebnisse zum einen die gesamte ATE-Population untersucht, zum anderen wurden die beiden unterschiedlichen Arme (Arm A = CAPIRI + CET und Arm B = CAPOX + CET) der Chemotherapie getrennt voneinander betrachtet. Bezogen auf die verschiedenen Studienpopulationen und die verschiedenen untersuchten Gene wurden jeweils das progressionsfreie Überleben (PFS = Progression Free Survival), das Gesamtüberleben (OS = Overall Survival) und die Ansprechraten (PD = Progressive Disease, SD = Stable Disease, PR = Partial Remission, CR = Complete Remission, DCR = Disease Control Rate) mit besonderem Augenmerk auf die Gesamtansprechraten (ORR = Overall Response Rate) berechnet.

3.3.1 KRAS Codon 12 und 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 und 13 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren zu erkennen (PFS = 7,0 vs. 6,3 Monate, OS = 23,2 vs. 19,7 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren zeigten eine ORR von 57,4 %, bei den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 52,1 %.

KRAS Codon 12 und 13			
	CAPIRI + CET und CAPOX + CET	p-Wert	
	WT (n= 75)	MUT (n= 46)	
PD	12,0%	4,3%	0,20
SD	30,7%	43,5%	0,17
PR	50,7%	47,8%	0,85
CR	6,7%	4,3%	0,71
DCR	88,1%	95,6%	0,20
ORR	57,4%	52,1%	0,71

Tabelle 3-3 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren

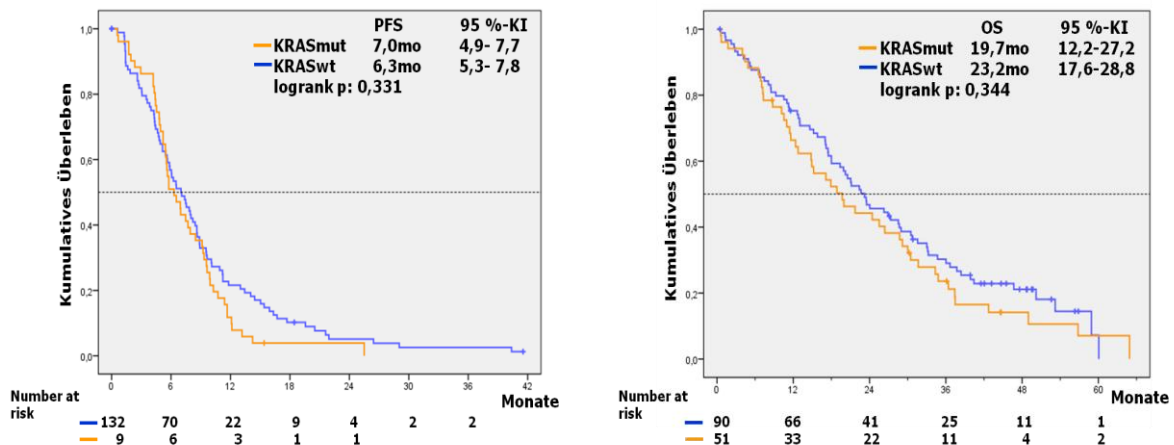


Abbildung 3-7 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren

3.3.2 KRAS Codon 12 und 13 (CAPIRI + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm A (CAPIRI + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 und 13 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren zu erkennen (PFS = 6,1 vs. 5,8 Monate, OS = 21,1 vs. 20,0 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren zeigten eine ORR von 52,8 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 53,6 %.

KRAS Codon 12 und 13			
	CAPIRI + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 36)	MUT (n= 28)	
PD	19,4%	7,1%	0,28
SD	27,8%	39,3%	0,42
PR	50,0%	50,0%	> 0,99
CR	2,8%	3,6%	> 0,99
DCR	80,6%	92,9%	0,28
ORR	52,8%	53,6%	> 0,99

Tabelle 3-4 Anprechraten der Patienten in mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm A

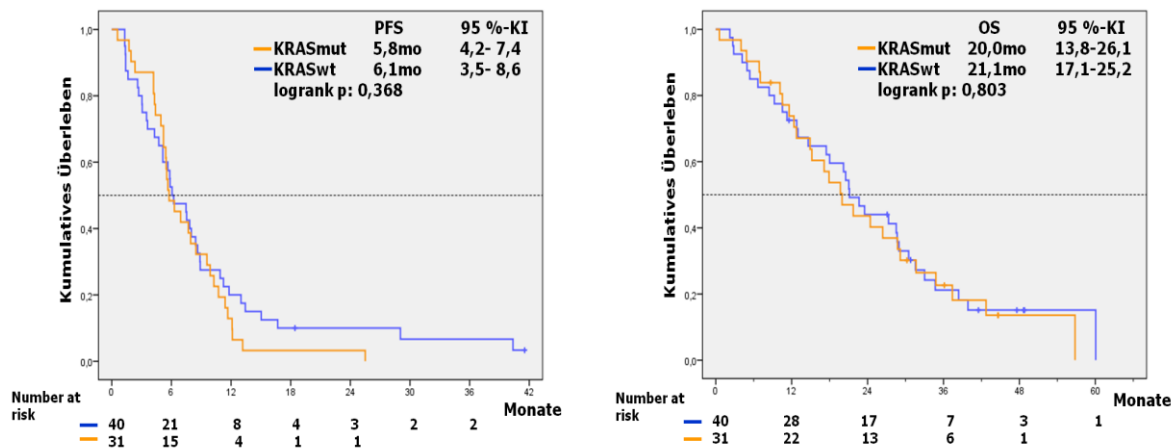


Abbildung 3-8 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm A

3.3.3 KRAS Codon 12 und 13 (CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm B (CAPOX + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 und 13 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren zu erkennen (PFS = 7,1 vs. 6,5 Monate, OS = 23,5 vs. 14,8 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren zeigten eine ORR von 61,5 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 50,0 %.

KRAS Codon 12 und 13			
	CAPOX + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 39)	MUT (n= 18)	
PD	5,1%	0,0%	> 0,99
SD	33,3%	50,0%	0,26
PR	51,3%	44,4%	0,78
CR	10,3%	5,6%	> 0,99
DCR	94,9%	100,0%	> 0,99
ORR	61,5%	50,0%	0,56

Tabelle 3-5 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm B

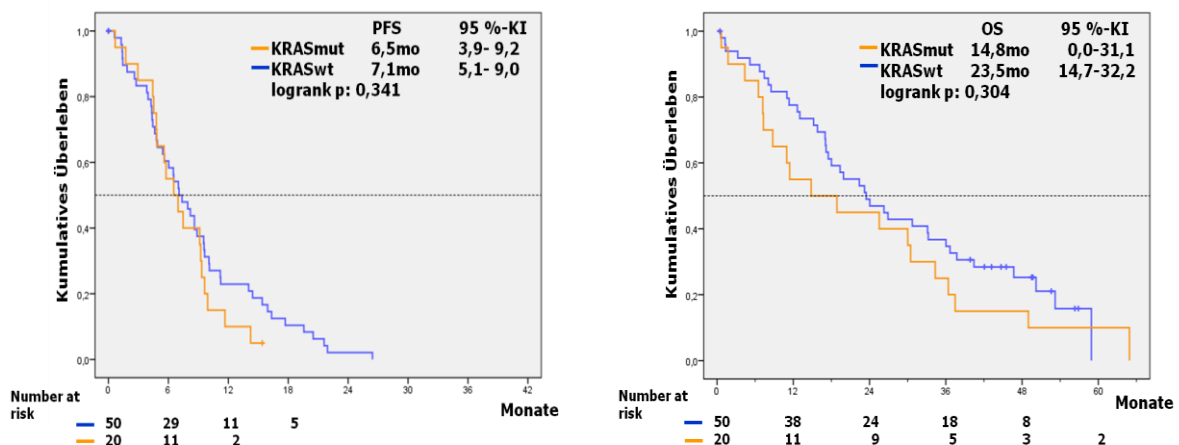


Abbildung 3-9 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm B

3.3.4 KRAS Codon 12 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren. Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, gingen als Wildtypumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren und den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren festgestellt werden (PFS = 5,6 vs. 7,4 Monate, p-Wert: 0,039). Bezogen auf das OS konnte nur ein Trend zu einem längeren OS in der Gruppe der Patienten, bei denen der Tumor keine Mutation auf KRAS Codon 12 aufwies, zu erkennen (OS = 23,5 vs. 17,9). Die Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren zeigten eine ORR von 58,3 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren betrug die ORR 48,6 %.

KRAS Codon 12			p-Wert (nach Fisher)
	CAPIRI + CET und CAPOX + CET WT (n= 84)	MUT (n= 37)	
PD	10,7%	5,4%	0,50
SD	31,0%	45,9%	0,15
PR	51,2%	45,9%	0,69
CR	7,1%	2,7%	0,67
DCR	89,3%	94,6%	0,50
ORR	58,3%	48,6%	0,33

Tabelle 3-6 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren

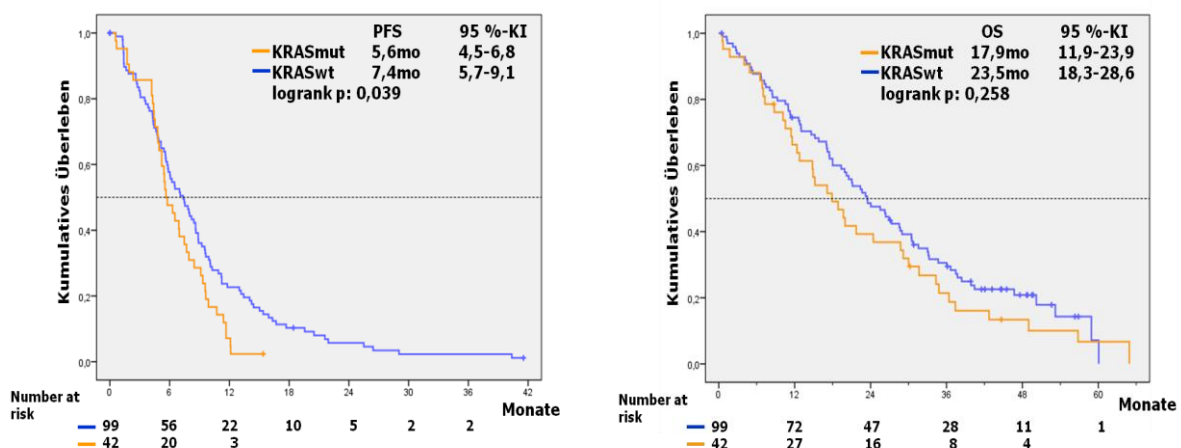


Abbildung 3-10 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren

3.3.5 KRAS Codon 12 (CAPIRI + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm A (CAPIRI + CET). Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, gingen als Wildtyptumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS in der Gruppe der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren zu erkennen (PFS = 7,5 vs. 5,5 Monate, OS = 23,5 vs. 17,9 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 56,4 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren betrug die ORR 48,5 %.

KRAS Codon 12			
	CAPIRI + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 39)	MUT (n= 25)	
PD	17,9%	8,0%	0,46
SD	25,6%	44,0%	0,17
PR	51,3%	48,0%	> 0,99
CR	5,1%	0,0%	0,51
DCR	82,1%	92,0%	0,46
ORR	56,4%	48,0%	0,61

Tabelle 3-7 Ansprechraten der Patienten in mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm A

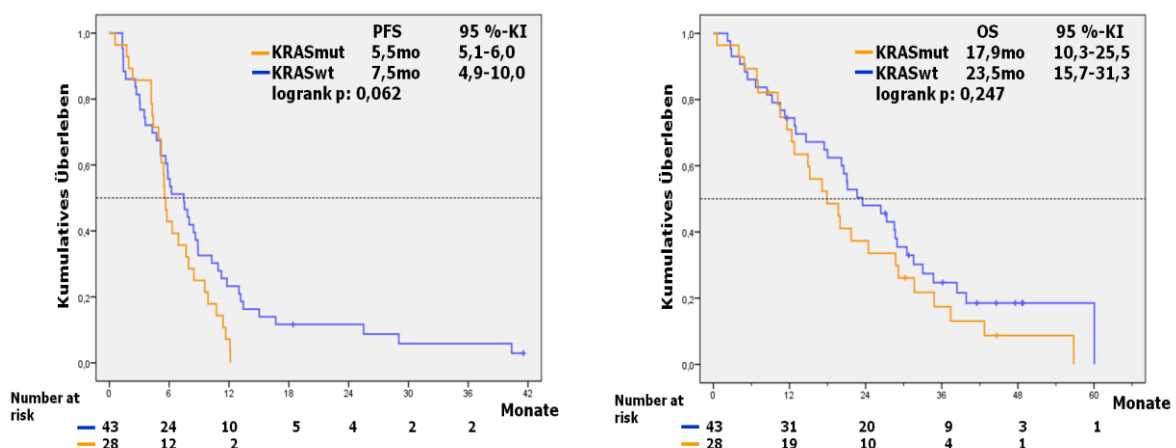


Abbildung 3-11 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm A

3.3.6 KRAS Codon 12 (CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm B (CAPIRI + CET). Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, gingen als Wildtypumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS in der Gruppe der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren zu erkennen (PFS = 7,5 vs. 5,5 Monate, OS = 23,5 vs. 17,9 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren zeigten eine ORR von 56,4 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren betrug die ORR 48,5 %.

KRAS Codon 12			
	CAPOX + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 45)	MUT (n= 12)	
PD	4,4%	0,0%	> 0,99
SD	35,6%	50,0%	0,51
PR	51,1%	41,7%	0,75
CR	8,9%	8,3%	> 0,99
DCR	95,6%	100,0%	> 0,99
ORR	60,0%	50,0%	0,74

Tabelle 3-8 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm B

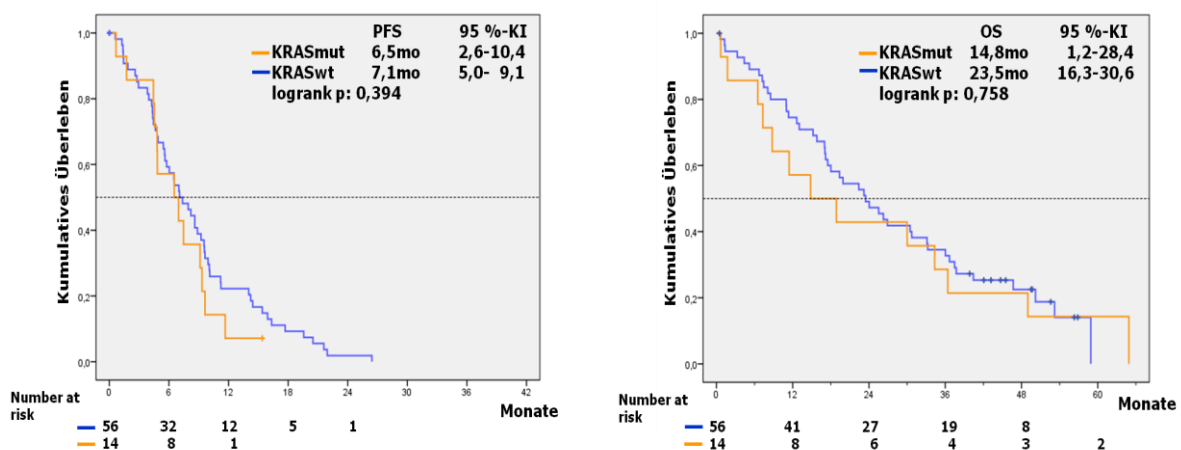


Abbildung 3-12 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm B

3.3.7 KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren. Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, gingen als Wildtypumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 12 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Interessanterweise war ein Trend zu einem längeren PFS (9,9 vs. 6,5 Monate) und einem längeren OS (26,4 vs. 21,0 Monate) bei Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren zu erkennen. Die Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtypumoren zeigten eine ORR von 54,4 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 66,7 %.

KRAS Codon 13			p-Wert (nach Fisher)
	CAPIRI+CET und CAPOX +CET WT (n= 112)	MUT (n= 9)	
PD	9,8%	0,0%	> 0,99
SD	35,7%	33,3%	> 0,99
PR	49,1%	55,6%	0,74
CR	5,4%	11,1%	0,43
DCR	90,2%	100,0%	> 0,99
ORR	54,5%	66,7%	0,73

Tabelle 3-9 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren

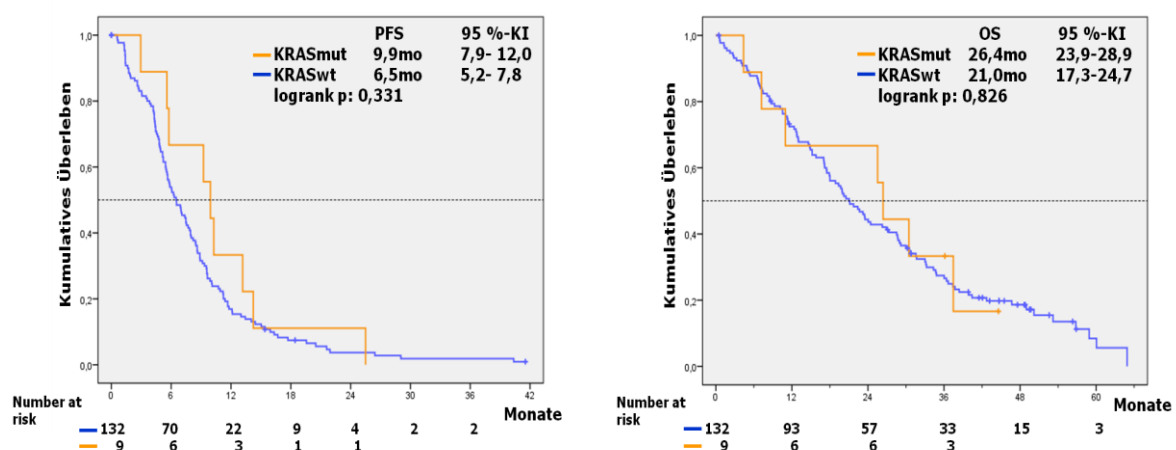


Abbildung 3-13 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtypumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren

3.3.8 KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm A (CAPIRI + CET). Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, gingen als Wildtyptumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 13 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Interessanterweise war ein Trend zu einem längeren PFS bei den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren zu erkennen (PFS = 13,2 vs. 5,8 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 50,8 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 100 %. (Das OS war aufgrund eines frühen Ausstiegs zu vieler Patienten aus der Studie in dieser Gruppe nicht beurteilbar)

KRAS Codon 13			
	CAPIRI + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 61)	MUT (n= 3)	
PD	14,8%	0,0%	> 0,99
SD	34,4%	0,0%	0,55
PR	49,2%	66,7%	> 0,99
CR	1,6%	33,3%	0,92
DCR	85,2%	100,0%	> 0,99
ORR	50,8%	100,0%	0,24

Tabelle 3-10 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm A

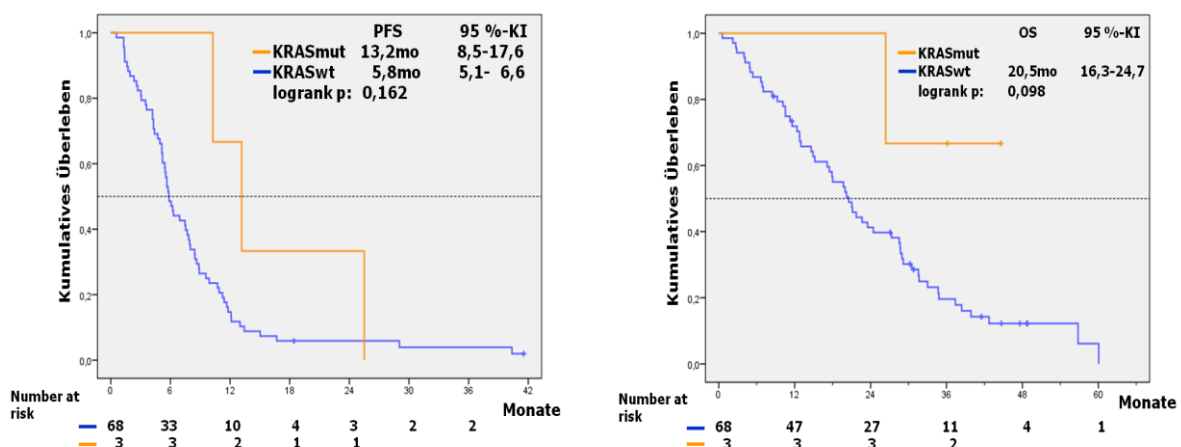


Abbildung 3-14 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS 13 Codon mutierten Tumoren in Arm A

3.3.9 KRAS Codon 13 (CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm B (CAPOX + CET). Patienten, deren Tumor ausschließlich eine Mutation auf KRAS Codon 12 aufwies, gingen als Wildtyptumore in die Analyse mit ein. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine KRAS Mutation auf Codon 13 aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyppatienten zu erkennen (PFS = 7,0 vs. 5,8 Monate, OS = 23,2 vs. 11,0 Monate). Die Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 58,8 %; bei den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren betrug die ORR 50,0 %.

KRAS Codon 13			
	CAPOX + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 51)	MUT (n= 6)	
PD	3,9%	0,0%	> 0,99
SD	37,7%	50,0%	0,67
PR	49,0%	50,0%	> 0,99
CR	9,8%	0,0%	> 0,99
DCR	96,1%	100,0%	> 0,99
ORR	58,8%	50,0%	0,69

Tabelle 3-11 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm B

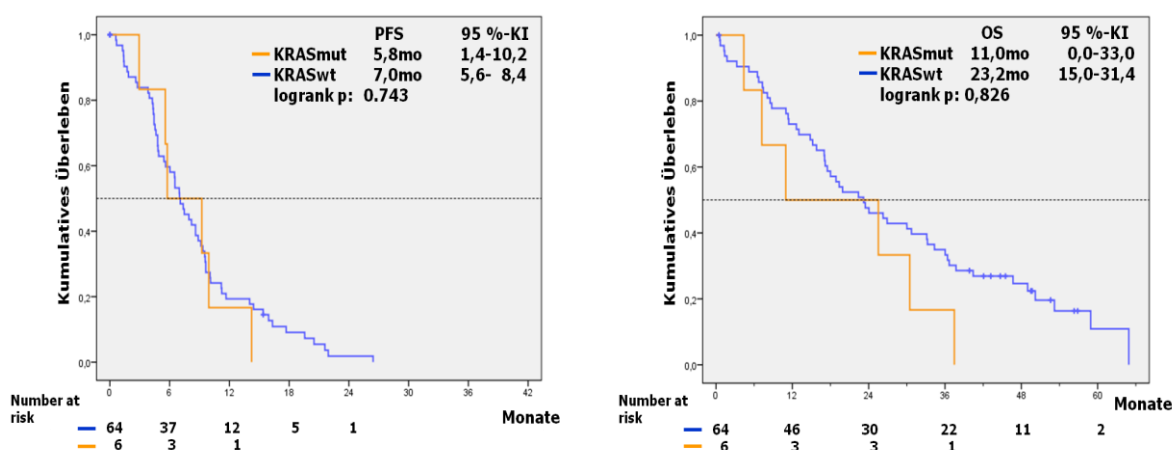


Abbildung 3-15 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm B

3.3.10 KRAS Codon 12 vs. KRAS Codon 13 (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren. Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren waren aus der Analyse ausgeschlossen. Interessanterweise zeigten die Patienten, deren Tumor eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwies, ein signifikant längeres PFS als die Patienten, deren Tumore eine Mutation auf Codon 12 aufwies (PFS = 10,0 vs. 5,6 Monate, p-Wert: 0,040). Vergleich man das OS beider Patientengruppen miteinander, so zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch war auch hier ein Trend zu einem längeren OS bei den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren zu erkennen (OS = 27,9 vs. 17,9 Monate). Die Anprechraten wurden hier aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht berechnet.

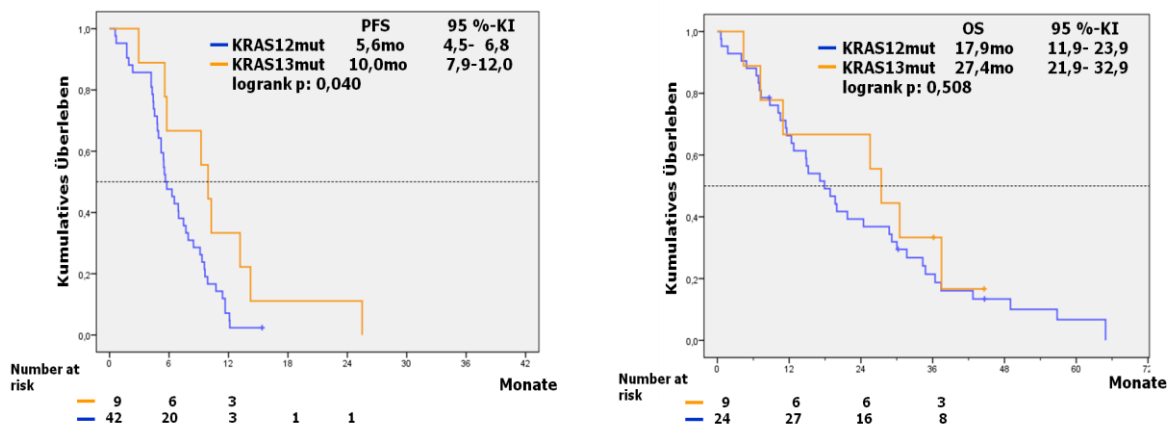


Abbildung 3-16 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren

3.3.11 KRAS Codon 12 vs. KRAS Codon 13 vs. KRAS Wildtyp (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen das PFS und das OS der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren, zum einen im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren und zum anderen im Vergleich zu Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren. Zwar ließ sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen allen drei Patientengruppen erkennen, jedoch war klar ersichtlich, dass die Patienten mit KRAS Codon 12 mutiertem Tumoren das längste PFS (PFS = 9,9 vs. 7,4 vs. 5,8) und auch das längste OS aufwiesen (OS = 27,4 vs. 22,7 vs. 17,9). Die Ansprechraten wurden hier aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht berechnet.

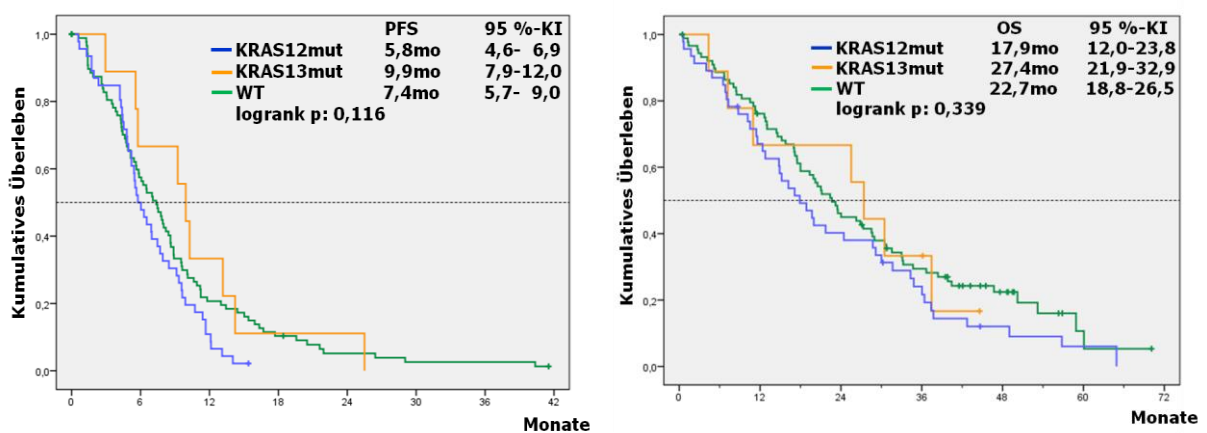


Abbildung 3-17 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren, KRAS Codon 13 mutierten Tumoren und KRAS Codon 12 und 13 Wildtypumoren

3.3.12 BRAF (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit BRAF mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren. Es konnte in Bezug auf das OS ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren festgestellt werden (OS = 23,5 vs. 13,0 Monate, p-Wert: 0,037). Vergleich man das PFS beider Patientengruppen miteinander, so zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch war auch hier ein Trend zu einem längeren PFS bei den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren erkennen (PFS = 7,1 vs. 4,2 Monate). Die Patienten mit BRAF Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 55,7 %; bei den Patienten mit BRAF mutierten Tumoren betrug die ORR 57,1 %.

BRAF			p-Wert (nach Fisher)
	CAPIRI + CET und CAPOX + CET WT (n= 106)	MUT (n= 14)	
PD	6,6%	21,4%	0,09
SD	37,7%	21,4%	0,38
PR	49,1%	57,1%	0,78
CR	6,6%	0,0%	> 0,99
DCR	93,4%	78,6%	0,09
ORR	55,7%	57,1%	> 0,99

Tabelle 3-12 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren

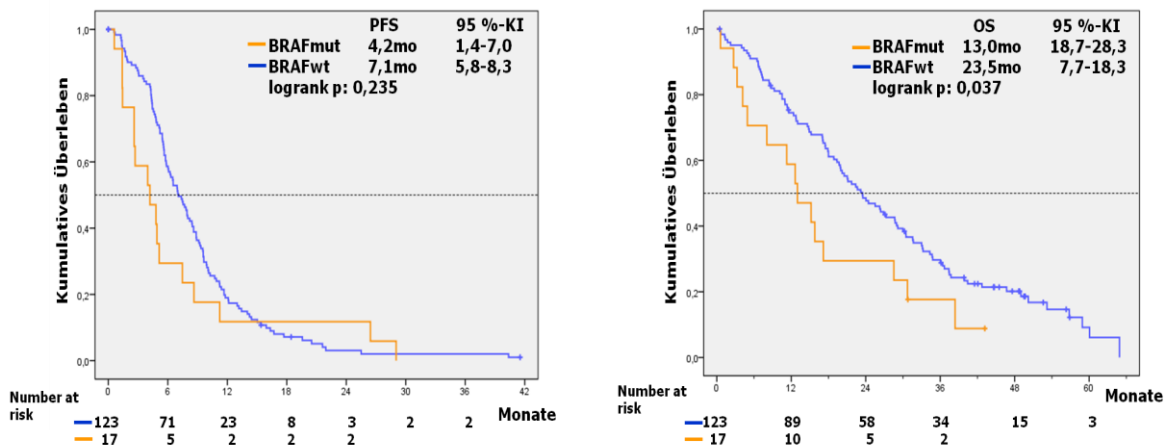


Abbildung 3-18 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren

3.3.13 BRAF (CAPIRI + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit BRAF mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren in Arm A (CAPIRI + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine BRAF Mutation aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren zu erkennen (PFS = 6,3 vs. 4,2 Monate, OS = 21,8 vs. 13,0 Monate). Die Patienten mit BRAF Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 54,5 %; bei den Patienten mit BRAF mutierten Tumoren betrug die ORR 50,0 %.

BRAF			
	CAPIRI + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 55)	MUT (n= 8)	
PD	10,9%	25,0%	0,27
SD	34,5%	25,0%	0,71
PR	50,9%	50,0%	> 0,99
CR	3,6%	0,0%	> 0,99
DCR	89,1%	75,0%	0,27
ORR	54,5%	50,0%	> 0,99

Tabelle 3-13 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm A

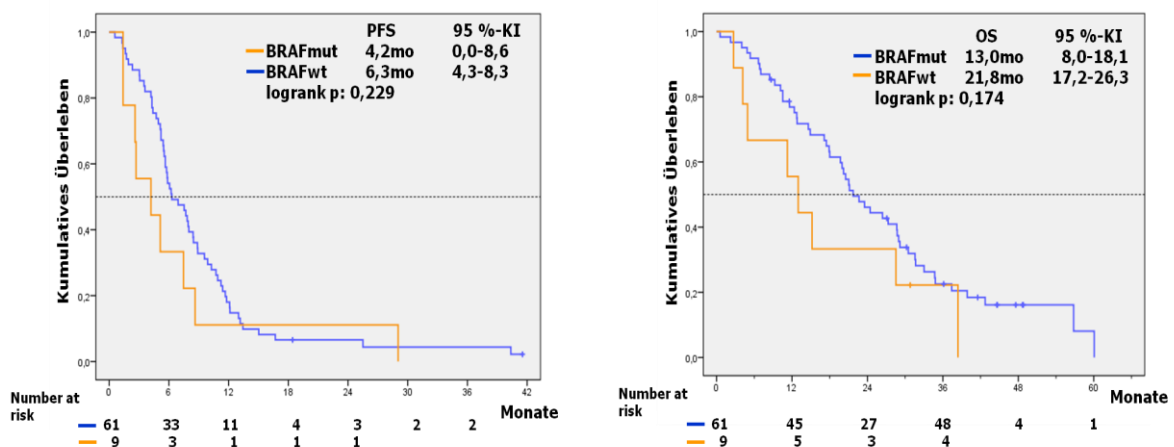


Abbildung 3-19 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm A

3.3.14 BRAF (CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit BRAF mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren in Arm B (CAPOX + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine BRAF Mutation aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren zu erkennen (PFS = 7,4 vs. 4,0 Monate, OS = 24,0 vs. 12,6 Monate). Die Patienten mit BRAF Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 56,9 %; bei den Patienten mit BRAF mutierten Tumoren betrug die ORR 66,7 %.

BRAF			
	CAPOX + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 51)	MUT (n= 6)	
PD	2,0%	16,7%	0,20
SD	41,2%	16,7%	0,39
PR	47,2%	66,7%	0,43
CR	9,8%	0,0%	> 0,99
DCR	98,0%	83,3%	0,20
ORR	56,9%	66,7%	> 0,99

Tabelle 3-14 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm B

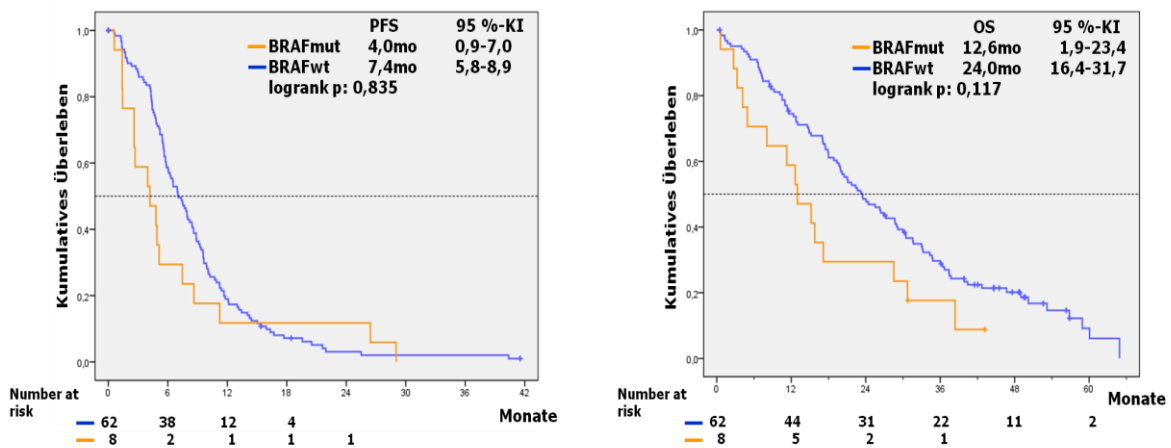


Abbildung 3-20 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm B

3.3.15 PIK3CA (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine PIK3CA Mutation aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren zu erkennen (PFS = 7,1 vs. 6,5 Monate, OS = 23,2 vs. 20,2 Monate). Die Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 55,9 %; bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren betrug die ORR 55,6 %.

PIK3CA			
	CAPIRI + CET und CAPOX + CET		p-Wert
	WT (n= 102)	MUT (n= 18)	(nach Fisher)
PD	8,8%	5,6%	> 0,99
SD	35,3%	38,9%	> 0,99
PR	50,0%	50,0%	> 0,99
CR	5,9%	5,6%	> 0,99
DCR	91,2%	94,4%	> 0,99
ORR	55,9%	55,6%	> 0,99

Tabelle 3-15 Ansprechraten der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren

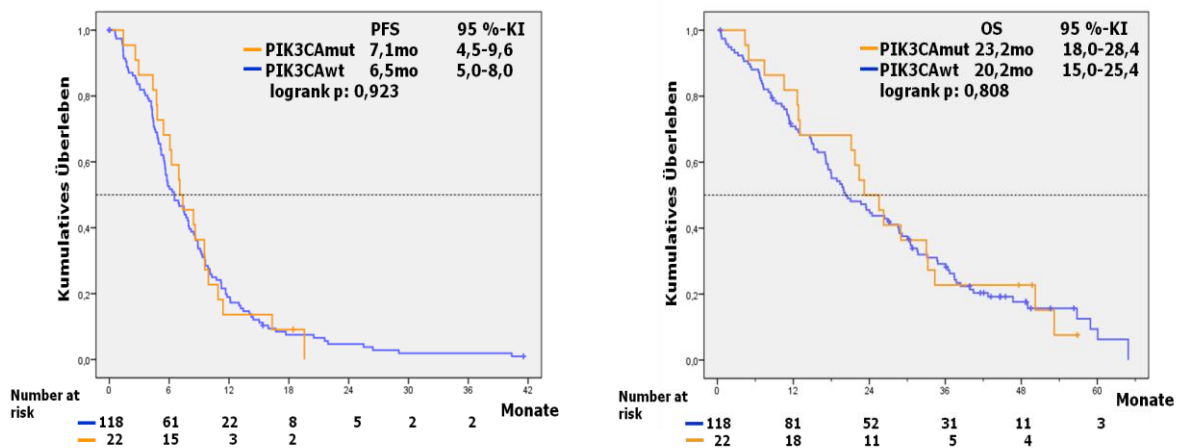


Abbildung 3-21 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren

3.3.16 PIK3CA (CAPIRI + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren in Arm A (CAPIRI + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine PIK3CA Mutation aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem einem längeren PFS und bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren zu erkennen (PFS = 6,2 vs. 5,8 Monate). Das OS betrug in beiden Patientengruppen 21,0 Monate. Die Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 55,2 %; bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren betrug die ORR 40,0%.

PIK3CA			
	CAPIRI + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 58)	MUT (n= 5)	
PD	13,8%	0,0%	> 0,99
SD	31,0%	60,0%	0,32
PR	51,7%	40,0%	0,67
CR	3,4%	0,0%	> 0,99
DCR	86,2%	100,0%	> 0,99
ORR	55,2%	40,0%	0,65

Tabelle 3-16 Ansprechraten der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm A

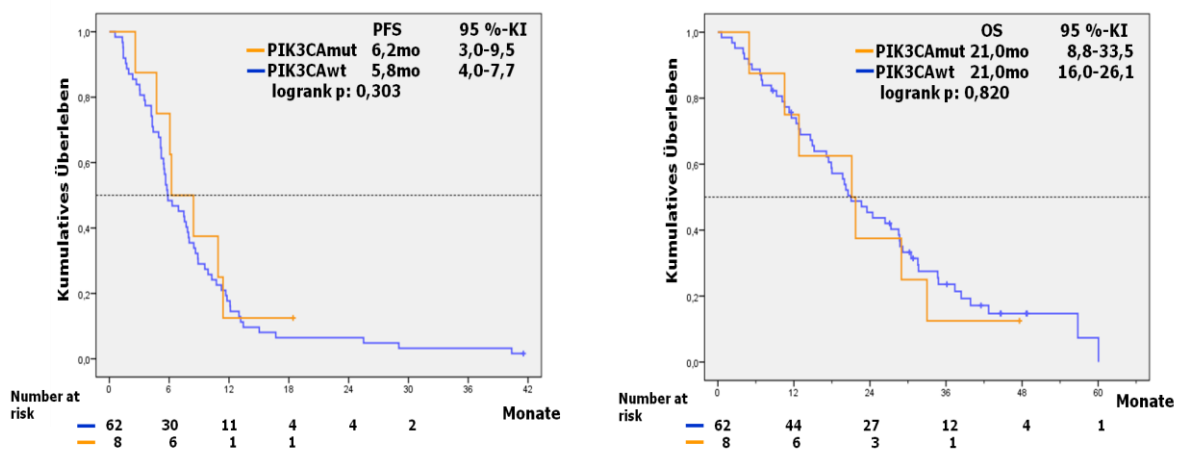


Abbildung 3-22 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm A

3.3.17 PIK3CA (CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, das PFS und das OS der Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren in Arm A (CAPOX + CET). Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine PIK3CA Mutation aufwies und denen ohne Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS und bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren zu erkennen (PFS = 7,1 vs. 6,5 Monate; OS = 25,5 vs. 19,4 Monate). Die Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren zeigten eine ORR von 56,8 %, bei den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren betrug die ORR 61,5%.

PIK3CA			
	CAPOX + CET		p-Wert (nach Fisher)
	WT (n= 44)	MUT (n= 13)	
PD	2,3%	7,7%	0,41
SD	40,9%	30,8%	0,75
PR	47,7%	53,8%	0,76
CR	9,1%	7,7%	> 0,99
DCR	97,7%	92,3%	0,41
ORR	56,8%	61,5%	> 0,99

Tabelle 3-17 Ansprechraten der Patienten in B mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm B

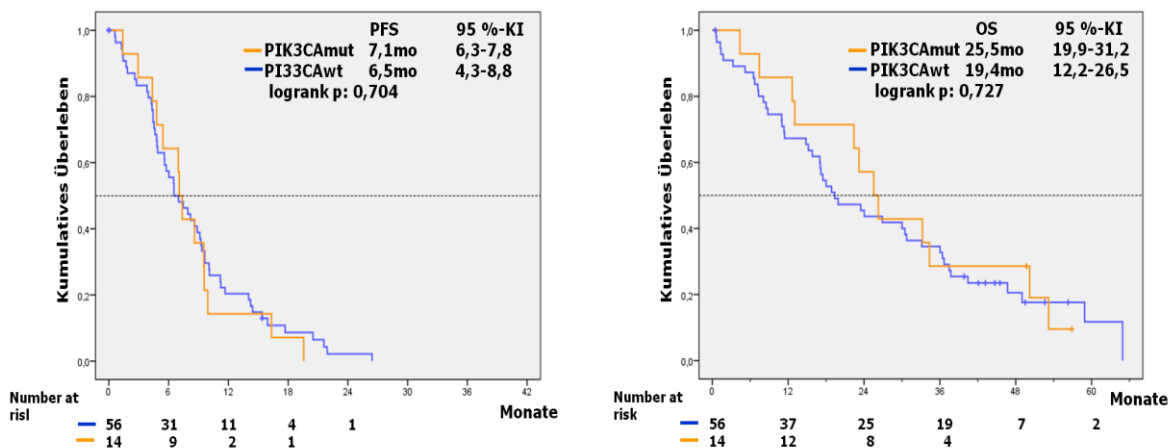


Abbildung 3-23 Progressionsfreies Überleben (PFS) und OS (Gesamtüberleben) der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm B

3.3.18 KRAS / KRAS / BRAF / PIK3CA vs. Wildtyp (CAPIRI + CET und CAPOX + CET)

Die folgenden Grafiken zeigen das PFS und das OS der Patienten, deren Tumore eine Mutation auf mindestens einem der getesteten Gene erwiesen (KRAS / BRAF / PIK3CA) im Vergleich zu den Patienten mit reinen Wildtyptumoren. Es konnte in Bezug auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, deren Tumor eine Mutation aufwies und denen ohne jegliche Mutation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu einem längeren PFS und einem längeren OS bei den Patienten mit reinen Wildtyptumoren zu erkennen (PFS = 7,8 vs. 6,1 Monate; OS = 23,5 vs. 20,0 Monate).

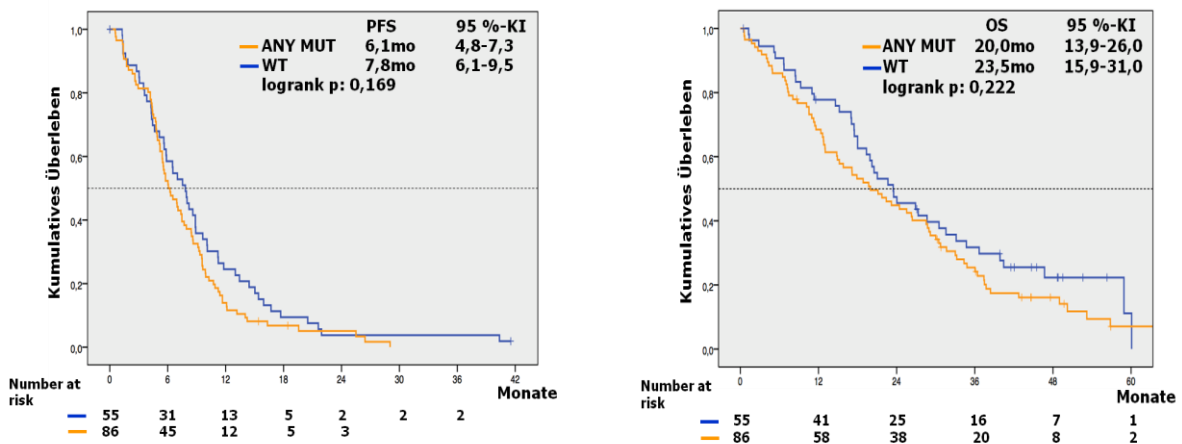


Abbildung 3-24 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit Wildtyptumoren und der Patienten mit mutierten Tumoren (ANY MUT)

4 Diskussion

Die CIOX-Studie (AIO KRK-0104) ist die erste randomisierte Phase-II-Studie, die das Kombinationsschema CAPIRI + CET und das Kombinationsschema Cetuximab CAPOX + CET als Chemotherapie des mKRK gegeneinander untersucht hat.

Es wurden im Zeitraum von September 2004 bis Dezember 2006 insgesamt 185 Patienten mit mKRK in die Studie eingeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch die molekularbiologische Mutationsanalysen der Mutationstatus von 147 Patienten bestimmt werden.

Es wurden folgende Gene untersucht:

- KRAS Codon 12
- KRAS Codon 13
- KRAS Codon 61
- KRAS Codon 146
- BRAF Exon 11
- BRAF Exon 15
- PIK3CA Exon 9
- PIK3CA Exon 20
- AKT
- SRC

Nach Abschluss der Mutationsanalysen konnten durch Auswertung anhand des Statistikprogramms SPSS PASW 18.0 das PFS, das OS und die Ansprechraten (mit Fokussierung auf die ORR) der untersuchten Gene bestimmt und miteinander verglichen werden. Auf diesem Wege war es möglich, den prognostischen Wert sowie die klinische Relevanz der einzelnen Gene in Bezug auf die Therapie des mKRK zu differenzieren und zu beurteilen.

4.1 Diskussion der verwendeten Methodik

Die gesamten Versuche dieser Arbeit wurden im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Mithilfe verschiedener Protokolle von Methoden, die in der Pathologie München bereits etabliert sind, konnten sowohl DNA-Extraktion, PCR und Pyrosequenzierung durchgeführt werden. Somit konnte von 147 der insgesamt 185 Patienten, die an der CIOX-Studie teilgenommen haben, der Mutationsstatus der einzelnen Gene erfolgreich bestimmt werden.

Nach problemloser Durchführung der PCR mit den verschiedenen Primern, hat sich auch das Pyrosequenzing, durchgeführt mithilfe des Pyro Mark Gold Q24 Kits, als effiziente und schnelle Methode zu Mutationsbestimmung von Genen bewiesen. Das Pyrosequenzing stellt eine seit einigen Jahren bereits etablierte, erfolgreiche Methode dar, um den Mutationsstatus verschiedenster Gene zu bestimmen [63-65]. Es konnte vor allem für die KRAS-Analyse durch einige Arbeiten der letzten Zeit gezeigt werden, dass das Pyrosequenzing eine sehr sensitive und spezifische Methode ist, um Mutationen auf dem KRAS Gen aufzudecken [66, 67]. Trotz dieser Vorteile, stellte das Pyrosequenzing auch Herausforderungen dar. So war es zum Beispiel schwierig, bei der Ausführung des von der Firma Biotage vorgegebenen PyroMark Q₂₄ Plate Systems (siehe 2.2.6) ohne Verlust von DNA, diese und den Primer mithilfe des verwendeten Saugsystems auf dem dafür vorgesehenen Tube-Plate zusammenzuführen. Damit es möglichst zu keinem Verlust von DNA während des Pyrosequenzings kam, musste eine ausreichende Menge an DNA (15µl) und Streptavidin Sepharose Beads (52µl) verwendet werden. Ging jedoch trotzdem zu viel Menge an DNA bei Durchführung dieses Schrittes verloren, so waren später die durch die Lichtreaktion erzeugten Peaks der jeweiligen Base zu schwach. Dadurch war eine sichere Interpretation der Basenabfolge nicht immer beim ersten Versuch des Pyrosequenzings möglich. Insgesamt kann das Pyrosequenzing jedoch als eine sehr gute und genaue Methode zur Mutationsaufdeckung von verschiedenen Genen angesehen werden, die großes Potential hat, in Zukunft durch neue instrumentelle und chemische Verbesserungen auf diesem Gebiet noch effizienter zu werden [63, 64].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 KRAS

Eine Mutation auf dem KRAS Gen trat bei 39 % des untersuchten Patientenkollektivs auf und stimmte somit mit den in der Literatur angegebenen Häufigkeiten einer KRAS Mutation beim mKRK überein [17, 18, 44, 45]

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt, konnte in Bezug auf das PFS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren und den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren festgestellt werden. Dies galt sowohl für die gesamte ATE-Population (PFS = 7,0 vs. 6,3 Monate), als auch für den Fall, dass man nur den CAPIRI + CET Arm (PFS = 6,1 vs. 5,8 Monate) oder nur den CAPOX + CET Arm (PFS = 7,1 vs. 6,5 Monate) getrennt voneinander betrachtete (Abbildung 3-7 bis Abbildung 3-9).

Gemäß dieser Ergebnisse konnte man also interessanterweise in der Gesamtpopulation als auch in den beiden Subgruppen der Studienpopulation, nur geringe Unterschiede zwischen den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp Tumoren Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren erkennen. Zwischen diesen beiden Patientengruppen konnte man im Vergleich hierzu in beiden Subgruppen der CRYSTAL-Studie, bezogen auf das PFS, deutlichere Unterschiede erkennen. Die CRYSTAL-Studie verglich bei Patienten mit mKRK eine Irinotecan-basierte Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab (FOLFIRI + CET) mit der gleichen Chemotherapie ohne Cetuximab (FOLFIRI). Sowohl die Chemotherapiekombination FOLFIRI + CET als auch FOLFIRI wurden einerseits bei Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp Tumoren und andererseits bei Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren angewendet. Die Patientengruppe mit KRAS Wildtyp Tumoren profitieren von der Gabe von Cetuximab bezüglich des PFS im Vergleich zu der Patientengruppe mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren festgestellt werden (PFS = 9,9 vs. 7,4 Monate) [18]. In der OPUS-Studie wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt wie in der CRYSTAL-Studie. Die OPUS-Studie stellte bei Patienten mit mKRK eine Oxaliplatin-basierte Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab (FOLFOX + CET) einer Chemotherapie ohne Zugabe von Cetuximab gegenüber (FOLFOX). Im Rahmen dieser Studie wurde der KRAS-Mutationsstatus bestimmt und die verschiedenen Gruppen (Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp Tumoren und Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierte Tumore) erhielten sowohl FOLFOX + CET als auch FOLFOX als Chemotherapie. Sowie in der CRYSTAL-Studie war auch hier der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen, vor allem bei Zugabe von Cetuximab, in Bezug auf das PFS größer als es in dieser Arbeit der Fall war (PFS 7,7 vs. 5,5 Monate) [17].

Die Ergebnisse des Gesamtüberlebens (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp Tumoren ließen sich in den zu erwartenden Bereich einordnen. Es wurden 21,1 Monate bei der Patientengruppe mit der Chemotherapie CAPIRI + CET (Abbildung 3-8) und 23,5 Monate bei der Patientengruppe mit der Chemotherapie CAPOX + CET (Abbildung 3-9) erreicht. Diese Werte stimmen nahezu mit denen überein, welche sowohl in der CRYSTAL-Studie (23,5 Monate) als auch in der OPUS-Studie (22,8 Monate) bei den Patientengruppen, deren Chemotherapie Cetuximab beinhaltete, ermittelt wurden.

Betrachtete man die ORR der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp Tumoren und der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren, so ließ sich kaum ein Einfluss des Mutationsstatus auf das Ansprechen erkennen (Tabelle 3-3 bis Tabelle 3-5). Dieses Ergebnis konnte sowohl bei der Analyse beider gemeinsamer Studienarme erkannt (ORR = 57,4% vs.

52,1%), als auch bei der Analyse der CAPIRI + CET Gruppe (ORR = 52,8% vs. 53,6%) oder der CAPOX + CET Gruppe (ORR = 61,5% vs. 50,0%) beobachtet werden.

In der CRYSTAL-Studie sowie in der OPUS-Studie konnte jedoch bei den Patienten, die mit Cetuximab behandelt wurden, eine bedeutend höhere ORR in der Gruppe der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren beobachtet werden [17, 18].

Die Erkenntnis, dass in der CIOX-Studie der KRAS Mutationsstatus weder einen signifikanten Effekt auf das PFS, noch auf die ORR hat, steht mit den Ergebnissen der COIN-Studie im Einklang. Die COIN-Studie ist eine Phase-III-Studie aus dem Jahr 2011, die suggerierte, dass ein Erweitern der Chemotherapie mit Cetuximab den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren im Vergleich zu den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren keinen therapeutischen Vorteil brachte. Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren erreichten in dieser Studie weder ein bedeutend längeres PFS, noch ein bedeutend längeres OS [68].

Interessanterweise erhielten die Patienten mit mKRK im Rahmen der COIN-Studie auch eine Chemotherapie, welche zum Teil die Kombination Cetuximab und Capecitabin beinhaltete. In der CIOX-Studie kann man anhand der Tatsache, dass die Ergebnisse beider Studienarme (Arm A und Arm B) mit denen von Arm A (CAPIRI + CET) und Arm B (CAPOX + CET) weitgehend übereinstimmen und sich in Bezug auf PFS, OS und ORR die gleichen Tendenzen erkennen lassen, davon ausgehen, dass die Wahl von einerseits Irinotecan in Arm A und Oxaliplatin in Arm B keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Vielmehr werfen die beschriebenen Resultate die Frage auf, ob die Kombination von Cetuximab und Capecitabin als Chemotherapie bei mKRK eher unvorteilhaft ist. Unterstützt werden kann diese Annahme durch die Ergebnisse der CRYSTAL-Studie und der OPUS-Studie, da hier keine der teilnehmenden Patientengruppen eine Kombination von Cetuximab und Capecitabin als Chemotherapie erhielt. Um diese Annahme zu verfestigen, wäre es jedoch notwendig, die Eigenschaften von Cetuximab und Capecitabin genauer zu untersuchen, um eventuelle Wechselwirkungen aufzudecken und daraufhin in zukünftigen Studien zu analysieren.

Obwohl der KRAS Mutationsstatus in dieser Arbeit weder das PFS noch das OS in bedeutendem Ausmaß beeinflusst hat, muss festgehalten werden, dass die Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren im Vergleich zu Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren längere Überlebenszeiten aufwiesen. Aus diesem Grund kann eine KRAS Mutation innerhalb dieses chemotherapeutischen Rahmens trotzdem als negativer prognostischer Faktor aufgefasst werden.

Betrachtet man auf der anderen Seite die KRAS Mutationen getrennt voneinander und vergleicht die Patienten, deren Tumore eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwiesen mit den Patienten, deren Tumore eine Mutation auf KRAS Codon 12 zeigten, so fielen in dieser Arbeit Unterschiede auf. Es zeigte sich, dass Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren im Vergleich zu Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren (Abbildung 3-16) ein signifikant längeres PFS aufwiesen (10,0 vs. 5,6 Monate, p-Wert: 0,04). Betrachtete man das Gesamtüberleben (Abbildung 3-17) so erzielte auch hier die Patientengruppe mit einer KRAS Codon 13 mutierten Tumoren das bessere Ergebnis (27,4 vs. 17,9 Monate). Untermauert wird dieser Trend außerdem durch zwei weitere Analysen, bei denen das Überleben aller drei Patientengruppen miteinander verglichen wurde: KRAS Codon 12 mutierte Tumore vs. KRAS Codon 13 mutierte Tumore vs. Wildtypumore (Abbildung 3-17). Erstaunlicherweise erzielte auch hier die Gruppe mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Bezug auf das PFS sowie auf das OS die besten Werte (PFS = 5,8 vs. 9,9 vs. 7,4 Monate; OS = 17,9 vs. 27,4 vs. 22,7 Monate). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Art der KRAS Mutation einen Einfluss auf die Effektivität der Chemotherapie haben könnte. Eine Phase-III-Studie der jüngsten Vergangenheit, an der mehrere Studienzentren (CO.17, BOND, MABEL, EMR202600, EVEREST, BABEL und SALVAGE) beteiligt waren, ist zu ähnlichen, retrospektiv erhobenen Erkenntnissen gekommen. Hier versuchte man, einen Zusammenhang zwischen Patienten, deren Tumore eine Mutation auf KRAS Codon 13 aufwiesen und dem Anprechen auf eine Cetuximab-basierten Chemotherapie des mKRK herzustellen. Tatsächlich kam man zu dem Ergebnis, dass Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren ein signifikant längeres PFS und OS aufwiesen als die Patienten KRAS Codon 12 mutierten Tumoren [69].

Diese Resultate sprechen für die Vermutung, dass Patienten mit einer KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in einem größeren Maße von einer Cetuximab-basierten Chemotherapie profitieren als Patienten mit einer KRAS Codon 12 mutierten Tumoren. Zur Klärung der Bedeutung der unterschiedlichen Mutationen auf dem KRAS Gen in Bezug auf die Chemotherapie des mKRK wäre es notwendig, diese in größeren, prospektiven Studien eingehender zu untersuchen, um eventuell dadurch den Biomarker KRAS als prognostisch negativen Wert weiter einzuschätzen und eventuell sogar einzuschränken. Dadurch könnte es eventuell möglich werden, das Patientenregime, das voraussichtlich von einer Cetuximab-basierten Chemotherapie profitieren könnten, weiter einzugrenzen.

Die CIOX-Studie ist nicht umfangreich genug, um allein durch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Schlussfolgerung der KRAS Analyse zu formulieren. Es hat sich jedoch auch in dieser Studie sowie in einigen vorherigen Studien bestätigt, dass es sinnvoll ist, vor Beginn einer Cetuximab-

basierten Chemotherapie des mKRR den KRAS Mutationsstatus im Rahmen eines routinierten diagnostischen Schrittes zu testen und KRAS als wichtigen prognostischen Faktor mit einzubeziehen [70].

Dem Aspekt, warum bei dem speziell hier verwendeten Therapieschemata (CAPIRI + CET und CAPOX + CET) der KRAS Mutationsstatus nicht mit einem signifikant längerem bzw. kürzerem PFS sowie mit einem signifikant besseren bzw. schlechteren ORR korreliert hat, sollte durch zukünftige Untersuchungen weiter nachgegangen werden. Auch der Einfluss der einzelnen Mutationen (KRAS Codon 13 bzw. KRAS Codon 12) auf dem KRAS Gen auf den Therapieerfolg der eingesetzten Cetuximab-basierten Chemotherapieschemata bleibt eingehender zu klären.

4.2.2 BRAF

Eine Mutation auf dem BRAF Gen trat bei 13 % des untersuchten Patientenkollektivs auf und ließ sich somit mit den in der Literatur angegebenen Häufigkeiten einer BRAF Mutation beim mKRRK vergleichen [44, 45, 51].

Betrachtet man die statistischen Auswertungen der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und der Patienten mit BRAF mutierten Tumoren, so lassen sich bedeutende Unterschiede erkennen (Abbildung 3-18). So zeigten die Patienten mit BRAF Wildtyptumoren ein signifikant längeres OS als die Patienten BRAF mutierten Tumoren (OS = 23,5 vs. 13,0 Monate; p-Wert: 0,037). Bezogen auf das PFS ließ sich ein ähnlicher Trend erkennen. Auch hier zeigten die Patienten, deren Tumore keine Mutation auf dem BRAF Gen aufwiesen, ein längeres PFS (PFS = 7,1 vs. 4,2 Monate). Wenn man beide Arme (CAPIRI + CET und CAPOX + CET) getrennt voneinander betrachtet, lässt sich eine vergleichbare Tendenz beobachten (Abbildung 3-19, Abbildung 3-20). Sowohl in Arm A (PFS = 6,3 vs. 4,2 Monate, OS = 21,8 vs. 13,0 Monate) als auch in Arm B (PFS = 7,4 vs. 4,0 Monate, OS = 24,0 vs. 12,6 Monate) wurde bei den Patienten mit BRAF Wildtyptumoren das bessere PFS und OS ermittelt. Aufgrund des Studiendesigns der CIOX-Studie ist der prognostische Wert vom prädiktiven Wert hier nicht abzugrenzen. Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten überein, die nach aktuellem Studienstand bezüglich des BRAF Mutationsstatus in der jüngsten Vergangenheit erzielt wurden [51, 54, 55]. Entsprechend dieser Annahme konnte also BRAF in dem Patientenkollektiv der CIOX-Studie als negativer prognostischer Wert bestätigt werden. Wie bereits beschrieben, zeigte sich bezogen auf das OS zwischen den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren kein signifikanter Unterschied. Dass dieser statistisch signifikante Unterschied aber bei den Patienten BRAF Wildtyptumoren und den Patienten mit BRAF mutierten Tumoren zu erkennen war, wirft die Frage nach Erklärungsansätzen auf. Betrachtet man

den EGFR-Rezeptor und die von dem Rezeptor aktivierte Signaltransduktionskaskade (Abbildung 1-2), so tritt die BRAF Mutation innerhalb dieses Signalweges nach der KRAS Mutation auf. Man könnte daher die Hypothese aufstellen, dass diese bestimmte Position in der Kaskade einen Einfluss darauf haben könnte, dass die Patienten mit BRAF Wildtyptumoren in einem bedeutenderem Maße von einer Chemotherapie bestehend CAPIRI + CET oder CAPOX + CET profitieren könnten als die Patienten KRAS Wildtyptumoren. Ein anderer Grund dafür, dass der BRAF Mutationsstatus das OS in so einer entscheidenden Form beeinflusst hat, könnte jedoch auch die Tatsache sein, dass eine BRAF Mutation des mKRK generell mit einer sehr schlechten Prognose des mKRK einhergeht [56]. Da der Einfluss der BRAF Mutation auf eine Cetuximab-basierte Chemotherapie erst im Rahmen sehr weniger Studien untersucht wurde, bleibt die Rolle der BRAF Mutation als negativer Prädiktor für eine Cetuximab-basierte Chemotherapie des mKRK weiter zu erforschen. Ob die BRAF Mutation ein negativer prognostischer Faktor der Cetuximab-basierten Chemotherapie ist, weil eine BRAF Mutation mit einer Resistenz gegenüber eines EGRF-antagonisierenden Chemotherapeutikums einhergeht oder weil eine BRAF Mutation generell mit einer schlechteren Prognose des mKRK vergesellschaftet ist, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig untersucht und geklärt worden [71].

4.2.3 PIK3CA

Eine Mutation auf dem PIK3CA Gen trat bei 16 % des untersuchten Patientenkollektivs auf und stimmte somit mit den in der Literatur angegebenen Häufigkeiten einer PIK3CA Mutation beim mKRK überein [58, 59].

Im Rahmen der statistischen Auswertungen der CIOX-Studie konnte, wie im Ergebnisteil gezeigt, die Vermutung nicht bestätigt werden, dass Patienten mit mKRK, deren Tumore keine Mutation auf dem PIK3CA Gen aufwiesen, mehr von einer Cetuximab-basierten Chemotherapie profitieren würden als Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren. Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren zeigten keineswegs ein längeres PFS oder OS als die die Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren (Abbildung 3-21 bis Abbildung 3-23). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der in Studien der jüngsten Vergangenheit beschriebenen Tendenz, dass bei Patienten mit mKRK ein PIK3CA mutierter Tumor mit einer kürzeren Überlebenszeit und einem schlechteren Ansprechen vergesellschaftet sein könnte [54, 58]. Ob eventuell das Patientenkollektiv der CIOX-Studie zu klein ist, um überhaupt einen bedeutenden Unterschied im Überleben und im Ansprechen zwischen Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und den Patienten mit PIK3CA mutierten Tumoren erzielen zu können, bleibt unklar. Da bis jetzt sehr wenig über die Bedeutung des PIK3CA Gens und dessen Einfluss auf eine Cetuximab-basierte Chemotherapie bekannt ist,

werden in Zukunft sehr wahrscheinlich weitere wissenschaftliche Nachforschungen und Studien über den Mutationsstatus des PIK3CA Gens im Zusammenhang mit der Therapie des mKRK folgen müssen.

4.2.4 KRAS / BRAF / PIK3CA vs. Wildtyp

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, wurden im Zuge der statistischen Auswertungen auch die Patienten, deren Tumore eine Mutation auf mindestens einem der untersuchten Gene (KRAS / BRAF / PIK3CA) aufwiesen und die Patienten mit reinen Wildtyptumoren miteinander verglichen (Abbildung 3-24). Erstaunlicherweise zeigte sich bezogen auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen. In einer großen retrospektiven Studie aus dem Jahr 2010 verglich man ebenfalls Patienten mit Wildtyptumoren und Patienten, deren Tumore eine Mutation auf den untersuchten Genen auswiesen (KRAS / BRAF / PIK3CA / NRAS). Hier zeigten, bezogen auf fast jedes Gen, die Patienten mit Wildtyptumoren ein signifikant längeres PFS und OS. Eine Ausnahme stellte in dieser Studie der Vergleich von Patienten mit Wildtyptumoren und Patienten mit PIK3CA Exon 9 mutierten Tumoren dar. Es zeigte sich bezogen auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen [72]. Auch in der CIOX-Studie konnte, wie bereits beschrieben, kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit PIK3CA Exon 9 Wildtyptumoren und Patienten, deren Tumore eine Mutation auf PIK3CA Exon 9 aufwiesen, festgestellt werden (Abbildung 3-21 bis Abbildung 3-23). Es besteht die Möglichkeit, dass diese Tatsache die Trennschärfe zwischen Patienten mit reinen Wildtyptumoren und Patienten mit mutierten Tumoren negativ beeinflusst hat und sich daher bezogen auf das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied gezeigt hat. Trotzdem muss festgehalten werden, dass die Patienten mit reinen Wildtyptumoren insgesamt die Tendenz zu einem längeren PFS und OS aufwiesen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass neben einer KRAS Mutation auch andere Mutationen wie eine Mutation auf dem BRAF Gen den Therapieerfolg einer Cetuximab-basierten Chemotherapie negativ beeinflussen.

4.3 Ausblick

Verschiedene dargestellte Ergebnisse und Tendenzen in der Arbeit regen dazu an, die Hintergründe und Zusammenhänge dieser in zukünftigen Experimenten und wissenschaftlichen Studien genauer zu erforschen. So bleibt durch Untersuchungen weiterhin zu klären, warum in der CIOX-Studie der KRAS Mutationsstatus nicht mit einem signifikant kürzerem bzw. längerem PFS und einer signifikant schlechteren bzw. besseren ORR korreliert hat. Hierbei wäre es interessant, eine mögliche negative Interaktion zwischen Cetuximab und Capecitabin zu bestätigen oder auch zu widerlegen, um somit eventuell in Zukunft eine Kombination von Cetuximab und Capecitabin bei Patienten mit mKRK als nicht besonders wirksam einstufen zu können. Ferner wäre es außerdem interessant, den Einfluss der einzelnen Mutations des KRAS Gens (Codon 12 und 13) auf die Effizienz einer Cetuximab-basierten Chemotherapie des mKRK näher zu erforschen. Könnte man durch größere zukünftige Studien herausfinden, dass, sowie es in der CIOX-Studie der Fall war, Patienten mit KRAS Codon 13 mutierten Tumoren ein signifikant längeres PFS und ebenfalls ein längeres OS aufweisen, so wäre es ein großer diagnostischer Fortschritt, somit den KRAS Mutationsstatus als negativen prädiktiven Faktor einer Cetuximab-basierten Chemotherapie genauer zu differenzieren und eventuell sogar einzuschränken zu können.

Die Tatsache, dass im Rahmen der CIOX- Studie eine BRAF Mutation im Gegensatz zu einer KRAS Mutation mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben und auch mit einem bedeutend kürzeren PFS korreliert hat, regt zu weiteren Erklärungsversuchen an. Die Bedeutung der BRAF Mutation als negativer prognostischer Faktor der Cetuximab-basierten Chemotherapie des mKRK sollte aufgrund weniger etablierter Forschungsergebnisse zukünftig genauer analysiert und untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Von den 185 Patienten, die an der CIOX-Studie teilgenommen hatten, konnten insgesamt die Tumorproben und Biopsien von 147 Patienten molekular klassifiziert werden.

Hierbei wurde der Mutationsstatus folgender Gene bestimmt: KRAS Codon 12, KRAS Codon 13, KRAS Codon 61, KRAS Codon 146, BRAF Exon 11, BRAF Exon 15, PIK3CA Exon 9, PIK3CA Exon 20, AKT, SRC.

Nach Aufarbeitung und Auswertung der DNA-Proben, konnte bei 39% der Tumorproben eine KRAS-Mutation entdeckt werden, wobei der mit Abstand größte Teil der KRAS Mutationen auf Codon 12 und Codon 13 lokalisiert war (92%). Eine BRAF Mutation trat in 13 % der Fälle auf; alle BRAF Mutationen befanden sich auf Exon 15. PIK3CA war zu 16% mutiert; alle Mutationen des Gens waren auf Exon 20 lokalisiert. Bei den Genen SCR und AKT konnte bei keiner der 147 Proben eine Mutation festgestellt werden. Nach Korrelation der Mutationsergebnisse mit den Effektivitätsparametern (Überleben, Ansprechrate), konnte in Bezug auf das PFS und die ORR kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyp-tumoren und den Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren festgestellt werden (PFS = 7,0 vs. 6,3 Monate, ORR = 57,4% vs. 52,1%). Dies galt sowohl für die gesamte Studienpopulation, bei der eine statistische Analyse durchführbar war (n=141), als auch für den Fall, dass man den CAPIRI + CET Arm oder nur den CAPOX + CET Arm getrennt voneinander betrachtete. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass Patienten mit einer KRAS Codon 13 mutierten Tumoren im Vergleich zu Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren ein signifikant längeres PFS aufwiesen (10,0 vs. 5,6 Monate, p-Wert: 0,04). Betrachtete man die Patienten im Hinblick auf die BRAF Mutation, so zeigte sich bei den Patienten mit BRAF Wildtyp-tumoren ein signifikant längeres OS als bei den Patienten, deren Tumore eine Mutation auf dem BRAF Gen aufwiesen (OS = 23,5 vs. 13,0 Monate; p-Wert: 0,037). Bezogen auf das PFS ließ sich hier eine ähnliche Tendenz erkennen. Beim Vergleich der Patienten, deren Tumore eine Mutation auf mindestens einem der untersuchten Gene (KRAS / BRAF / PIK3CA) aufwiesen und der Patienten mit reinen Wildtyp-tumoren, ließ sich in Bezug auf PFS und OS kein signifikanter Unterschied ermitteln (PFS = 7,8 vs. 6,1 Monate; OS = 23,5 vs. 20,0 Monate). Es zeigte sich jedoch in der Patientengruppe mit reinen Wildtyp-tumoren ein Trend sowohl zu einem längeren PFS als auch zu einem längeren OS.

In Zukunft bleibt weiterhin genauer zu klären, warum in der CIOX-Studie der KRAS Mutationstatus nicht mit einem signifikant kürzeren bzw. längeren PFS und einer signifikant schlechteren bzw. besseren ORR einhergegangen ist. Es wäre außerdem interessant, in weiteren wissenschaftlichen Studien die Bedeutung der einzelnen Mutationen auf dem KRAS Gen im

Zusammenhang mit der Effizienz einer Cetuximab-basierten Chemotherapie des mKRK eingehender zu untersuchen. Außerdem sollte die Rolle eine BRAF-Mutation als negativer prognostischer Faktor einer Cetuximab-basierten Chemotherapie in zukünftigen Studien genauer analysiert werden

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2007. **18**(3): p. 581-92.
2. (Hrsg), R.-K.-I.H.u.d.G.d.e.K.i.D.e.V., *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.*, 2010: Berlin.
3. Schalhorn, A., et al. , *Kolonkarzinom*, in *Manual Gastrointestinale Tumore*2006, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.
4. 1992, American Cancer Society.
5. München, T. *Tumorspezifische Auswertungen*. 2011.
6. Park, Y., et al., *Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2005. **294**(22): p. 2849-57.
7. Bener, A., et al., *Impacts of family history and lifestyle habits on colorectal cancer risk: a case-control study in Qatar*. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 2010. **11**(4): p. 963-8.
8. Orbell, J. and N.J. West, *Proving detection of colorectal cancer*. The Practitioner, 2010. **254**(1733): p. 17-21, 2-3.
9. Safaee, A., et al., *Risk of colorectal cancer in relatives: a case control study*. Indian journal of cancer, 2010. **47**(1): p. 27-30.
10. Farinella, E., et al., *Familial adenomatous polyposis (FAP) and gender. Does gender influence the genetic transmission of FAP?* Familial cancer, 2010. **9**(3): p. 405-6.
11. Schmiegel, W., et al., *Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008*. Z Gastroenterol, 2008. **46**((8)): p. p. 799-840
12. Thirion, P., et al., *Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004. **22**(18): p. 3766-75.
13. de Gramont, A., 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**(16): p. 2938-47.
14. Douillard, J.Y., *Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer*. Oncology, 2000. **14**(12 Suppl 14): p. 51-5.
15. Saltz, L., *Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer*. Oncology, 2000. **14**(12 Suppl 14): p. 47-50.
16. Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2004. **351**(4): p. 337-45.
17. Bokemeyer, C., 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**(5): p. 663-71.
18. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
19. Yamashita, K., et al., *In vitro detection of cross-resistant and non-cross-resistant agents with fluorouracil for patients with colorectal cancer*. International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology, 2005. **10**(5): p. 328-32.
20. Vanhoefer, U., et al., *Phase I study of a weekly schedule of irinotecan, high-dose leucovorin, and infusional fluorouracil as first-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1999. **17**(3): p. 907-13.

21. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group.* The New England journal of medicine, 2000. **343**(13): p. 905-14.
22. Kohne, C.H., et al., *Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(22): p. 4856-65.
23. de Gramont, A., et al., *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**(2): p. 808-15.
24. Klautke, G., et al., *Concurrent chemoradiation with capecitabine and weekly irinotecan as preoperative treatment for rectal cancer: results from a phase I/II study.* British journal of cancer, 2006. **94**(7): p. 976-81.
25. Giacchetti, S., et al., *Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2000. **18**(1): p. 136-47.
26. Grothey, A., et al., *Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004. **22**(7): p. 1209-14.
27. de Gramont, A., et al., *Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer.* European journal of cancer, 1997. **33**(2): p. 214-9.
28. Twelves, C., *Capecitabine as first-line treatment in colorectal cancer. Pooled data from two large, phase III trials.* European journal of cancer, 2002. **38 Suppl 2**: p. 15-20.
29. Hoff, P.M., et al., *Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2001. **19**(8): p. 2282-92.
30. Kerr, D., *Capecitabine/irinotecan in colorectal cancer: European early-phase data and planned trials.* Oncology, 2002. **16**(12 Suppl No 14): p. 12-5.
31. Patt, Y.Z., et al., *Capecitabine plus 3-weekly irinotecan (XELIRI regimen) as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: phase II trial results.* American journal of clinical oncology, 2007. **30**(4): p. 350-7.
32. Bajetta, E., et al., *Randomized multicenter Phase II trial of two different schedules of irinotecan combined with capecitabine as first-line treatment in metastatic colorectal carcinoma.* Cancer, 2004. **100**(2): p. 279-87.
33. Jordan, K., et al., *Phase II trial of capecitabine/irinotecan and capecitabine/oxaliplatin in advanced gastrointestinal cancers.* Clinical colorectal cancer, 2004. **4**(1): p. 46-50.
34. Tewes, M., et al., *Capecitabine and irinotecan as first-line chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: results of an extended phase I study.* Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2003. **14**(9): p. 1442-8.
35. Reynolds, N.A. and A.J. Wagstaff, *Cetuximab: in the treatment of metastatic colorectal cancer.* Drugs, 2004. **64**(1): p. 109-18; discussion 119-121.
36. Karashima, T., et al., *Inhibition of angiogenesis by the anti-epidermal growth factor receptor antibody ImClone C225 in androgen-independent prostate cancer growing*

- orthotopically in nude mice*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2002. **8**(5): p. 1253-64.
37. O'Dwyer P, J. and A.B. Benson, 3rd, *Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer*. Seminars in oncology, 2002. **29**(5 Suppl 14): p. 10-7.
 38. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2003. **21**(14): p. 2787-99.
 39. Needle, M.N., *Safety experience with IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor antibody*. Seminars in oncology, 2002. **29**(5 Suppl 14): p. 55-60.
 40. Lenz, H.J., et al., *Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2006. **24**(30): p. 4914-21.
 41. Stintzing, S., et al., *Prognostic value of cetuximab related skin toxicity in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients and its correlation with parameters of the EGFR signal transduction pathway. Results from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2012.
 42. Jonker, D.J., et al., *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2007. **357**(20): p. 2040-8.
 43. Khosravi-Far, R. and C.J. Der, *The Ras signal transduction pathway*. Cancer metastasis reviews, 1994. **13**(1): p. 67-89.
 44. Baldus, S.E., et al., *Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. **16**(3): p. 790-9.
 45. Richman, S.D., et al., *KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009. **27**(35): p. 5931-7.
 46. Bazan, V., et al., *Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2005. **16 Suppl 4**: p. iv50-55.
 47. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
 48. Lievre, A., 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**(3): p. 374-9.
 49. De Roock, W., et al., *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**(3): p. 508-15.
 50. Kohne, C.H. and H.J. Lenz, *Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal cancer*. The oncologist, 2009. **14**(5): p. 478-88.
 51. Loupakis, F., et al., *KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer*. British journal of cancer, 2009. **101**(4): p. 715-21.
 52. Rajagopalan, H., et al., *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 934.

53. Barault, L., et al., *Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2008. **122**(10): p. 2255-9.
54. Sartore-Bianchi, A., et al., *Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer*. PloS one, 2009. **4**(10): p. e7287.
55. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2008. **26**(35): p. 5705-12.
56. Ogino, S., et al., *CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer*. Gut, 2009. **58**(1): p. 90-6.
57. Tveit, K.M., et al., *Phase III Trial of Cetuximab With Continuous or Intermittent Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (Nordic FLOX) Versus FLOX Alone in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC-VII Study*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2012. **30**(15): p. 1755-62.
58. Perrone, F., et al., *PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2009. **20**(1): p. 84-90.
59. Nosho, K., et al., *PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations*. Neoplasia, 2008. **10**(6): p. 534-41.
60. Parsons, D.W., et al., *Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway*. Nature, 2005. **436**(7052): p. 792.
61. Velho, S., et al., *The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer*. European journal of cancer, 2005. **41**(11): p. 1649-54.
62. Kline, C.L., T.L. Olson, and R.B. Irby, *Src activity alters alpha3 integrin expression in colon tumor cells*. Clinical & experimental metastasis, 2009. **26**(2): p. 77-87.
63. Ahmadian, A., et al., *Analysis of the p53 tumor suppressor gene by pyrosequencing*. BioTechniques, 2000. **28**(1): p. 140-4, 146-7.
64. Garcia, C.A., et al., *Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene*. Gene, 2000. **253**(2): p. 249-57.
65. Berg, L.M., R. Sanders, and A. Alderborn, *Pyrosequencing technology and the need for versatile solutions in molecular clinical research*. Expert review of molecular diagnostics, 2002. **2**(4): p. 361-9.
66. Dufort, S., M.J. Richard, and F. de Fraipont, *Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues*. Analytical biochemistry, 2009. **391**(2): p. 166-8.
67. Sundstrom, M., et al., *KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice*. BMC cancer, 2010. **10**: p. 660.
68. Maughan, T.S., 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**(9783): p. 2103-14.
69. De Roock, W., 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**(16): p. 1812-20.
70. Ciardiello, F., et al., *Uptake of KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal cancer in Europe, Latin America and Asia*. Targeted oncology, 2011. **6**(3): p. 133-45.

71. Rizzo, S., et al., *Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?* Cancer treatment reviews, 2010. **36 Suppl 3**: p. S56-61.
72. De Roock, W., 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**(8): p. 753-62.

7 Anhang

7.1 Materialien und Geräte

7.1.1 Allgemein verwendete Materialien und Geräte

Zentrifuge Centrifuge 5424	Bestellnr. 5424.000.014	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Pipetten, verschiedene Volumina	Bestellnr. 4910.000.018-093	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Thermomixer comfort 2ml	Bestellnr. 5355.000.011	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Objektträger Micro Slider x-tra adhesive Surgipath	Art.Nr 05505654	LABOnord Lehmkuhlenweg 19 41065 Mönchengladbach

Tabelle 7-1 Übersicht über die allgemein verwendeten Materialien und Geräte

7.1.2 DNA-Isolation

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (ATL Puffer = Tissue Lysis buffer) (ATE Puffer = Elution buffer) (AL Puffer = Lysis buffer (AW Puffer = Washing buffer)	Cat.Nr. 56404	QIAGEN GmbH Qiagen Str.1 40724 Hilden
QiaCube Vollautomat zur Auf- reinigung von DNA und RNA	Cat.Nr.9001293	siehe oben
Filtertips 1000 µl für QiaCube	Cat.Nr. 990394	siehe oben
Rotoradapter	Cat.Nr. 990394	siehe oben

Tabelle 7-2 Übersicht über die verwendeten Materialien bei der DNA-Isolation

7.1.3 PCR und Pyrosequenzung

HotStarTaq DNA-Polymerase	Cat.Nr. 203205	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Human Genomic DNA male	Cat.Nr. G1471	PROMEGA, 68298 Mannheim
DNA Loading Dye	Cat.Nr. R0611	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St.Leon-Rot
100bp Plus DNA Ladder 50µg	Cat.Nr. SM0321	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St.Leon-Rot
TBE Puffer (Tris-borate-EDTA)	Cat.Nr. B52	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St.Leon-Rot
Pyro Mark Gold Q24, Reagents	Mat.Nr. 1055263	Biotage GmbH Benrather Schlossallee 49-53, 40597 Düsseldorf
Streptavidin Sepharose 5 ml High Performance	Art.Nr. 1751301	GE Healthcare , Oskar-Schlemmer-Str. 11, 80807 München
Binding Buffer 250 ml	Lot.Nr. 580024	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Annealing Buffer 250ml	Lot.Nr. 400002	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Verschiedene Primer für PCR und Pyrosequenzung	primerabhängig	Biomers Söflinger Str. 100 89077 Ulm

Tabelle 7-3 Übersicht über die verwendeten Materialien bei der PCR und beim Pyrosequenzung

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Relative Überlebensdaten des Kolonkarzinoms nach UICC-Stadien [5]	8
Abbildung 1-2 Der EGF-Rezeptor und die durch ihn aktivierten Signalwege	14
Abbildung 2-1 Beispiel einer Gelelektrophorese mit sieben DNA-Proben	25
Abbildung 2-2 Belegung der Kartusche	27
Abbildung 3-1 Agarosegel zur Bestimmung der Schmelztemperatur von PIK3CA Exon 9	30
Abbildung 3-2 Pyrosequenzierung: KRAS Codon 12 Wildtyp, KRAS Codon 13 Wildtyp	31
Abbildung 3-3 Pyrosequenzierung: KRAS Codon 12 mutiert, KRAS Codon 12 Wildtyp	31
Abbildung 3-4 Anteile der verschiedenen KRAS Mutationen	32
Abbildung 3-5 Anteil der BRAF Mutationen	33
Abbildung 3-6 Anteil der PIK3CA Mutationen	34
Abbildung 3-7 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren	36
Abbildung 3-8 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm A	37
Abbildung 3-9 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm B	38
Abbildung 3-10 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren	39
Abbildung 3-11 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm A	40
Abbildung 3-12 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm B	41
Abbildung 3-13 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren	42
Abbildung 3-14 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm A	43
Abbildung 3-15 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm B	44
Abbildung 3-16 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren	45

Abbildung 3-17 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit KRAS Codon 12 mutierten Tumoren, KRAS Codon 13 mutierten Tumoren und KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren.....	46
Abbildung 3-18 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren	47
Abbildung 3-19 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm A.....	48
Abbildung 3-20 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm B	49
Abbildung 3-21 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren	50
Abbildung 3-22 Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm A.....	51
Abbildung 3-23 Progressionsfreies Überleben (PFS) und OS (Gesamtüberleben) der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm B	52

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Kombinationsschemata der Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms	10
Tabelle 2-1 Mastermix	22
Tabelle 2-2 Zyklen der PCR.....	22
Tabelle 2-3 Verwendete Primer für die PCR	23
Tabelle 2-4 PCR-Produkte	26
Tabelle 2-5 Primeransatz.....	26
Tabelle 2-6 Verwendete Primer für das Pyrosequenzierung.....	28
Tabelle 3-1 Übersicht der Schmelztemperaturen der einzelnen Gene	30
Tabelle 3-2 Lokalisationen der verschiedenen KRAS Codon 12 Mutationen.....	33
Tabelle 3-3 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren	36
Tabelle 3-4 Ansprechraten der Patienten in mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm A	37
Tabelle 3-5 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 und 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 und 13 mutierten Tumoren in Arm B	38

Tabelle 3-6 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren	39
Tabelle 3-7 Ansprechraten der Patienten in mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm A.....	40
Tabelle 3-8 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 12 Wildtyptumoren und KRAS Codon 12 mutierten Tumoren in Arm B	41
Tabelle 3-9 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren	42
Tabelle 3-10 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm A.....	43
Tabelle 3-11 Ansprechraten der Patienten mit KRAS Codon 13 Wildtyptumoren und KRAS Codon 13 mutierten Tumoren in Arm B	44
Tabelle 3-12 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren	47
Tabelle 3-13 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm A.....	48
Tabelle 3-14 Ansprechraten der Patienten mit BRAF Wildtyptumoren und BRAF mutierten Tumoren in Arm B	49
Tabelle 3-15 Ansprechraten der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren	50
Tabelle 3-16 Ansprechraten der Patienten mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm A.....	51
Tabelle 3-17 Ansprechraten der Patienten in B mit PIK3CA Wildtyptumoren und PIK3CA mutierten Tumoren in Arm B.....	52
Tabelle 7-1 Übersicht über die allgemein verwendeten Materialien und Geräte.....	70
Tabelle 7-2 Übersicht über die verwendeten Materialien bei der DNA-Isolation	70
Tabelle 7-3 Übersicht über die verwendeten Materialien bei der PCR und beim Pyrosequenzing	71

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Heinemann (Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern) für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr.med. Sebastian Stintzing (Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern) für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Im Rahmen seiner Betreuung bedanke ich mich auch für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die wertvollen Tipps, die er mir gegeben hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner (Pathologisches Institut der Universität München) für die hervorragende Kooperation und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung (Pathologisches Institut der Universität München) für die geduldige Anleitung des technischen Teils der Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilian-Universität München, die mit freundlicher Unterstützung und Motivation dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema mit Freude bearbeiten konnte.

Ich möchte auch allen Mitarbeitern der Studie sowie allen Probanden, die durch ihre Teilnahme diese Studie erst ermöglicht haben, danken.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Katharina Löhmann-Mook und Dr.iur. Peter Mook, die mir mein Medizinstudium ermöglicht haben und mich während meiner Arbeit in jeder Hinsicht immer unterstützt und ermutigt haben.