

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner)

# Konkordanz von Mutationen von *KRAS* und *BRAF* in Primärtumor und korrespondierender Metastase des kolorektalen Karzinoms

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

vorgelegt von

Laura Wehweck

aus

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Nat. Andreas Jung

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Fiegl

PD Dr. Markus Rentsch

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Jens Neumann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2013

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	5
2. Einleitung .....	7
2.1. Das kolorektale Karzinom .....	7
2.2. Der <i>epidermal growth factor receptor</i> EGFR .....	8
2.3. Anti-EGFR monoklonale Antikörper: Therapieoption beim metastasierten CRC ....	10
2.4. <i>KRAS</i> -Mutationen und Resistenz gegen anti-EGFR-mAbs.....	11
2.5. Bedeutung weiterer Mutationen für die Therapieresistenz .....	16
2.6. Konkordanz von <i>KRAS</i> -Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC .....	17
3. Material und Methoden .....	21
3.1. Material .....	21
3.1.1. Geräte.....	21
3.1.2. Verbrauchsmaterial .....	21
3.1.3. Software .....	21
3.1.4. Patientenkollektiv .....	21
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Optimierung und Validierung der Analyseverfahren.....	25
3.2.1.1. Optimierung der PCR.....	25
3.2.1.2. Bestimmung der Spezifität der Mutationsanalyse .....	25
3.2.1.3. Bestimmung der Sensitivität der Mutationsanalyse .....	26
3.2.1.4. Bestimmung der Testgenauigkeit (accuracy).....	29
3.2.2. Mutationsanalyse in Patientenproben.....	29
3.2.2.1. DNA-Isolation aus Paraffinmaterial .....	29
3.2.2.2. DNA-Amplifikation mittels PCR .....	30
3.2.2.3. Gelelektrophoretische Analyse .....	30
3.2.2.4. Pyrosequenzierung .....	33
3.2.3. Statistische Auswertung.....	35
4. Ergebnisse .....	36

4.1.	Optimierung und Validierung der Analyseverfahren .....	36
4.1.1.	Optimierung der PCR .....	36
4.1.2.	Bestimmung der Spezifität der Mutationsanalyse .....	39
4.1.3.	Bestimmung der Sensitivität der Mutationsanalyse.....	39
4.1.4.	Bestimmung der Testgenauigkeit ( <i>accuracy</i> ) .....	41
4.1.5.	Fortlaufende Überprüfung der DNA- Quantität und –Qualität.....	43
4.2.	Charakteristika des Patientenkollektivs .....	43
4.3.	Häufigkeitsverteilung von <i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> -Mutationen und Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern .....	44
4.3.1.	<i>KRAS</i> -Mutationen.....	44
4.3.2.	<i>BRAF</i> -Mutationen.....	45
4.4.	Korrelation von <i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> - Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase.....	46
5.	Diskussion.....	48
5.1.	Vollständige Übereinstimmung des Mutationsstatus in Primärtumor und Metastase durch Anwendung einer Analyseregeln .....	48
5.2.	Technisch mangelhafte Durchführung der Mutationsanalyse als Ursache für Abweichung des Mutationsstatus in früheren Studien.....	51
5.3.	Qualitätssicherung in der <i>KRAS</i> -Diagnostik durch Standards zur Analyseregeln .....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	57
7.	Anhang.....	70
7.1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	70
7.2.	Danksagung.....	74
8.	Eidesstattliche Versicherung .....	75

## 1. Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (anti-EGFR-mAb) sind eine weitere Option in der Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome (mCRC). Voraussetzung für die Wirksamkeit der Antikörper ist, dass das mCRC keine Mutation des *KRAS* Proto-Onkogens aufweist, einer dem EGFR nachgeschalteten Komponente des *RAS/RAF/MAPK*-Signalwegs (*Rat sarcoma viral oncogene homolog/Murine sarcoma viral oncogene homolog/mitogen-activated protein kinase*). Durch diese Mutationen wird das *KRAS* Proto-Onkogen konstitutiv aktiviert, wodurch der Signalweg autoaktiviert wird und somit die gegen EGFR gerichtete Therapie nicht mehr greift. Daher muss bei jedem Patienten mit mCRC vor der Therapieentscheidung für die zielgerichtete anti-EGFR-Therapie eine *KRAS*-Mutationsanalyse durchgeführt werden und nur Patienten mit mCRC mit *KRAS* WT erhalten die Antikörper-Therapie.

Allerdings sprechen auch in dieser vorselektierten Gruppe nur 61% der Patienten auf eine Monotherapie mit anti-EGFR-mAb an. Es wird daher vermutet, dass weitere Proto-Onkogene, die analog zu *KRAS* dem EGFR im *RAS/RAF/MAPK*-Signalweg nachgeschaltet sind, durch Mutation ebenfalls zur Therapieresistenz führen. In klinischen Studien konnte dieser Zusammenhang bisher vor allem für *KRAS* Codon 61 gezeigt werden. Für *BRAF* wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt. Die während der Durchführung der vorliegenden Arbeit veröffentlichte CRYSTAL-Studie wies jedoch keinen prädiktiven Zusammenhang zwischen *BRAF*-Mutationen und Therapieresistenz nach.

Im Regelfall wird für die *KRAS*-Mutationsanalyse Gewebe des Primärtumors verwendet. Hauptangriffspunkt der Therapie ist hingegen die Metastase. Unterschiede im Mutationsstatus von Primärtumor und Metastase könnten daher die

Therapieresistenz bei Patienten mit *KRAS* WT im Primärtumor erklären. Bisherige Studien, die *KRAS*-Mutationen in Primärtumor und korrespondierenden Metastasen der CRC verglichen, lieferten allerdings widersprüchliche Ergebnisse mit Übereinstimmungsraten zwischen 77 und 100%. Da wenige dieser Studien die möglichen Fehlerquellen bei der Mutationsanalyse an Gewebematerial berücksichtigen, sind Fehler in der Durchführung der Mutationsanalyse eine wahrscheinliche Ursache für diese Abweichungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob sich eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse der Mutationsanalyse von Primärtumor und Metastase erreichen lässt, wenn dazu ein validiertes Analyseverfahren eingesetzt wird. Diese These wurde neben *KRAS* Codon 12/13 auch für Codon 61 und *BRAF* geprüft, die zu Beginn dieser Arbeit als prädiktive Marker galten.

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein hochsensitives und -spezifisches Verfahren zur Mutationsanalyse unter realen Laborbedingungen nach aktuellen Leitlinien etabliert. Mithilfe dieses Verfahrens wurden in einem Kollektiv von 63 Patienten mit mCRC Primärtumor und korrespondierender Metastase auf Mutationen von *KRAS* Codon 12, 13 und 61 sowie *BRAF* untersucht und miteinander verglichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unter Verwendung eines validierten Analyseverfahrens der Mutationsstatus von *KRAS* und *BRAF* in Primärtumor und korrespondierenden Metastasen des CRC vollständig übereinstimmt. Daher ist es zulässig, anhand der Mutationsanalyse in Gewebe des Primärtumors über eine zielgerichtete Therapie mit anti-EGFR-mAbs zu entscheiden, vorausgesetzt das Testverfahren wurde ausreichend validiert. Dadurch wird der Bedarf an validierten Methoden und standardisierten Verfahren in der *KRAS*-Routinediagnostik betont.

## 2. Einleitung

### 2.1. Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC), ein bösartiger epithelialer Tumor von Dickdarm und Mastdarm, ist das zweithäufigste Tumorleiden überhaupt und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern und Frauen in Deutschland und den USA.[1, 2, 56, 97, 98] Im Jahr 2012 wurde in Deutschland bei 37.000 Männern und 31.000 Frauen erstmals die Diagnose CRC gestellt.[1] Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Lebensalter, die Hälfte aller Betroffenen erkrankt jenseits des 70. Lebensjahrs.[2] Während die altersstandardisierten Erkrankungsraten seit den 1980er Jahren stabil sind, steigen die absoluten Fallzahlen aufgrund des demographischen Wandels weiter an.[2] Dies hat zu einer erheblichen Zunahme der Prävalenz des CRC von 80% bei Männern und 40% bei Frauen seit 1990 geführt.[1] In den USA verursachte das CRC im Jahr 2010 Behandlungskosten in Höhe von 14 Milliarden Dollar und Produktivitätsausfälle von 15,3 Milliarden Dollar. Bis 2020 wird mit einem Anstieg der Behandlungskosten auf 20 Milliarden Dollar gerechnet.[81]

15-20% aller CRC werden erst entdeckt, wenn sie bereits Fernmetastasen gebildet haben. Während die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate des CRC innerhalb der letzten zehn Jahre durch die Einführung des Darmkrebs-Früherkennungsprogramms und verbesserte Behandlungsmöglichkeiten von 45% auf 60% stieg, stagnierte sie bei Patienten mit metastasiertem CRC (mCRC) bei weniger als 5%. Das mediane Überleben betrug in diesem Krankheitsstadium unter Polychemotherapie ca. 20 Monate.[52]

Durch die Einführung monoklonaler Antikörper (mAbs) in die Therapie des mCRC zu Beginn des letzten Jahrzehntes wurde eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (*progression-free survival*, PFS) erreicht.[22, 119] Sie

richten sich entweder – wie der Angiogenesehemmer Bevacizumab (Avastin®) – gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*)[17] oder – wie die Präparate Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) – gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*).[27]

## **2.2. Der *epidermal growth factor receptor* EGFR**

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ist ein Membranrezeptor aus der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Bisher sind 13 verschiedene Liganden bekannt, die den EGFR binden. Unter ihnen haben *Amphiregulin* AREG und *Epiregulin* EREG im Dickdarmepithel die größte Bedeutung. Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors führt zur Dimerisierung und Transautophosphorylierung der intrazellulären Domäne durch die Tyrosinkinase-Aktivität. Diese Phosphorylierung stößt die Signaltransduktion über fünf intrazelluläre Signalkaskaden an (Abb. 2.1):

- *RAS/RAF/MAPK-Signalweg (Rat sarcoma viral oncogene homolog/Murine sarcoma viral oncogene homolog/mitogen-activated protein kinase)*
- *PIK3/PTEN/AKT-Signalweg (Phosphatidylinositol-3-kinase/Phosphatase and tensin homolog/Murine thymoma viral oncogene homolog 1)*
- *Phospholipase C $\gamma$ -Signalweg*
- *STAT-Signalweg (Signal transducers and activators of transcription)* und
- *SRC-Signalweg (Sarcoma viral oncogene homolog).*

Diese Signalkaskaden leiten das Signal in den Zellkern weiter und verändern dort über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen. Auf diese Weise reguliert EGFR unter anderem Zellproliferation, Überleben, Invasion, Migration, Adhäsion und Angiogenese in Epithelien.[108]

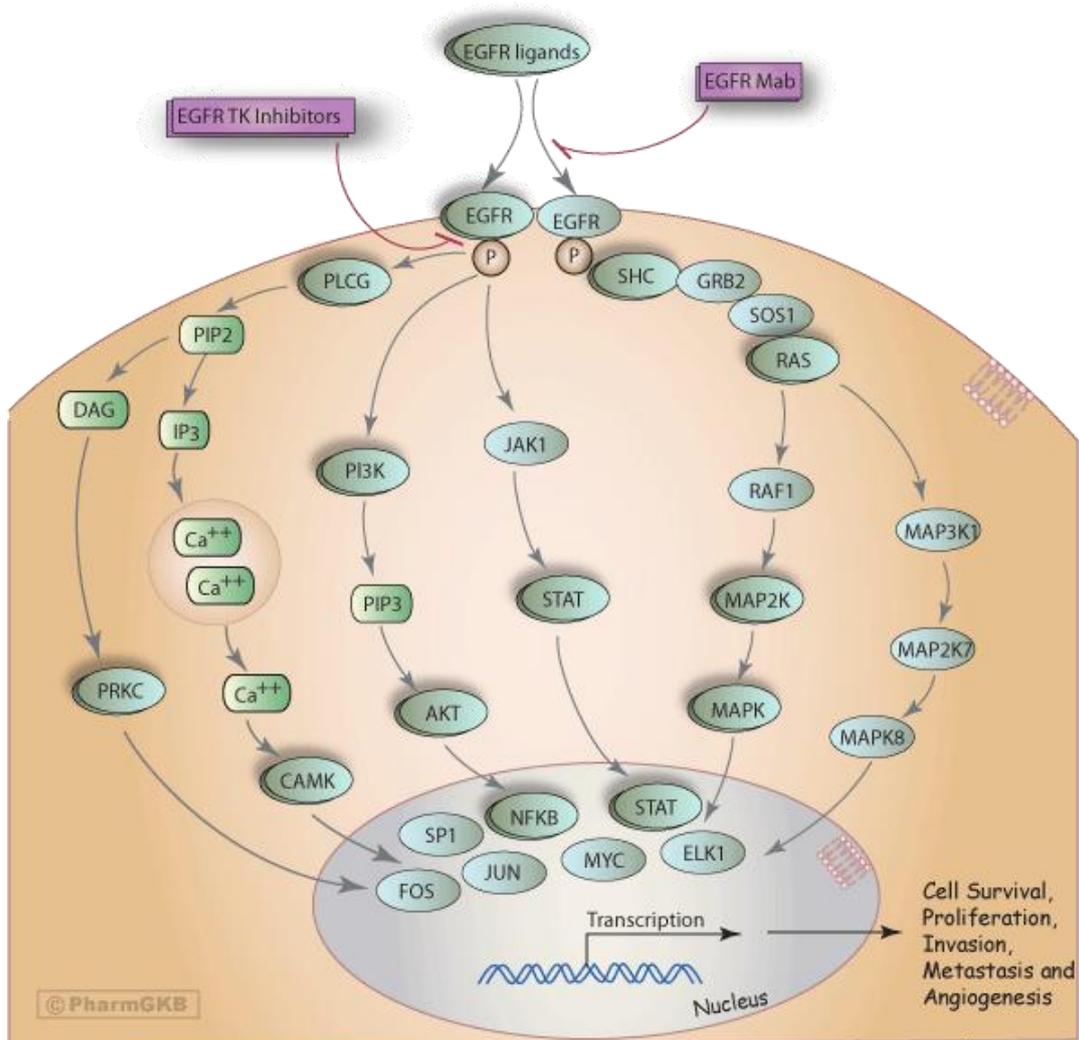


Abbildung 2.1: EGFR-abhängige Signalwege.

Die Deregulation jedes dieser Zelleigenschaften (*hallmarks of cancer*) ist ein zentraler Schritt in der Tumorprogression.[53, 54] Entsprechend ist die funktionelle Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege – durch Amplifikation oder Mutation des Rezeptors selbst oder seiner Mediatoren – maßgeblich an der Entstehung epithelialer Tumore beteiligt.[108] Da CRC EGFR in 85% der Fälle exprimieren, ist der EGFR ein geeigneter Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie kolorektaler Karzinome.[27, 87]

### 2.3. Anti-EGFR monoklonale Antikörper: Therapieoption beim metastasierten CRC

Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) sind gegen den EGFR gerichtete, monoklonale Antikörper (anti-EGFR-mAb). Es handelt sich um humanisierte (Cetuximab) bzw. humane Immunglobuline (Panitumumab) vom Typ IgG. Sie binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR, verhindern so die Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors und hemmen dadurch die Deregulation der *hallmarks of cancer* und somit im Endeffekt Tumorwachstum und -ausbreitung.[27] Die Wirksamkeit von anti-EGFR-mAb wurde zunächst in der Zweitlinientherapie des chemotherapierefraktärer mCRC nachgewiesen.[28, 103]

Studien, die die Wirksamkeit der anti-EGFR-mAb Monotherapie bei Patienten mit nicht vorbehandeltem mCRC untersuchten, zeigten eine signifikante Verlängerung des PFS.[8, 62] In Studien an nicht vorbehandelten mCRC-Patienten zeigte die Kombination von anti-EGFR-mAbs mit konventioneller Chemotherapie eine PFS-Verlängerung von 8,0 (95% CI 7,6-9,0) auf 8,9 (8,0-9,5) Monate (HR=0.85 (0.72–0.99),  $p=0.048$ ), eine Zunahme der Ansprechrate um 10-20% (*overall response rate*, ORR) (OR=1.40 (1.12–1.77),  $p=0,004$ ) gegenüber der alleinigen Chemotherapie.[22, 38, 119] Das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) wurde durch die anti-EGFR-mAb Therapie in keiner der Studien signifikant verlängert. Auf der Grundlage dieser Daten wurden Cetuximab und Panitumumab im Jahr 2004 von der FDA in den USA und von der EMEA in der EU zur Therapie des mCRC zugelassen.

Obwohl die genannten Studien nur solche Patienten einschlossen, deren Tumore immunhistochemisch EGFR-Expression zeigten, lag die ORR bei nur 10% vs. 0% unter anti-EGFR-mAb Monotherapie vs. *best supportive care* (BSC) [8, 61, 62, 118] und bei nur 46% vs. 36% unter anti-EGFR-mAb und Chemotherapie vs.

Chemotherapie alleine.[22, 38, 93, 110, 119] D.h., nur eine Subgruppe von Patienten sprach auf die Therapie mit anti-EGFR-mAb an. Die Mehrzahl der Patienten profitierte nicht von der Therapie, litt aber unter den teils erheblichen Nebenwirkungen[10, 18, 44, 55, 70, 103, 114] und verursachte im Gesundheitssystem Zusatzkosten von ca. 17.500€ pro Patient und Behandlungszyklus.[124] Es wurden also dringend prädiktive Biomarker benötigt, die das Ansprechen des Tumors auf die anti-EGFR-mAb Therapie vorhersagen und zur Patientenselektion herangezogen werden konnten.[76] Ein solcher reproduzierbarer, hochspezifischer prädiktiver Marker für die Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren ist der Mutationsstatus des EGFR-abhängigen Signalmoleküls KRAS.[88]

#### **2.4. KRAS-Mutationen und Resistenz gegen anti-EGFR-mAbs**

Das Signalmolekül KRAS nimmt als „Adapter-Molekül“ eine Schlüsselstellung in der Signalübertragung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie EGFR auf intrazelluläre Signalkaskaden ein.

KRAS-Moleküle sind Guaninnucleotid-bindende oder G-Proteine und funktionieren als „molekulare Schalter“. Sie wechseln zwischen dem aktiven, GTP-bindenden Zustand und dem inaktiven, GDP-bindenden Zustand hin und her. Durch Ligandenbindung wird der EGFR aktiviert und rekrutiert in der Folge Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF). Diese katalysieren den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren so KRAS. KRAS aktiviert seinerseits den *RAS/RAF/MAPK*-Signalweg, der eine Vielzahl zellulärer Eigenschaften wie Zellteilung, -differenzierung und -überleben reguliert. Indem KRAS durch seine schwache intrinsische GTPase-Aktivität GTP zu GDP hydrolysiert, inaktiviert es sich selbst und beendet dadurch die Signalübertragung. Diese Reaktion wird durch

GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt. Die normale KRAS-Aktivität wird also nur unter EGFR-Stimulation aufrecht erhalten und ist dadurch regulierbar.[79]

Aktivierende Mutationen des *KRAS*-Gens zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen epithelialer Tumoren.[9, 104] *KRAS*-Mutationen finden sich in 40-45% aller CRC.[9, 104] Mutationen mit dieser Häufigkeit wurden von Bert Vogelstein als „Mountain“-Mutationen bezeichnet.[128] In der schrittweisen Entwicklung

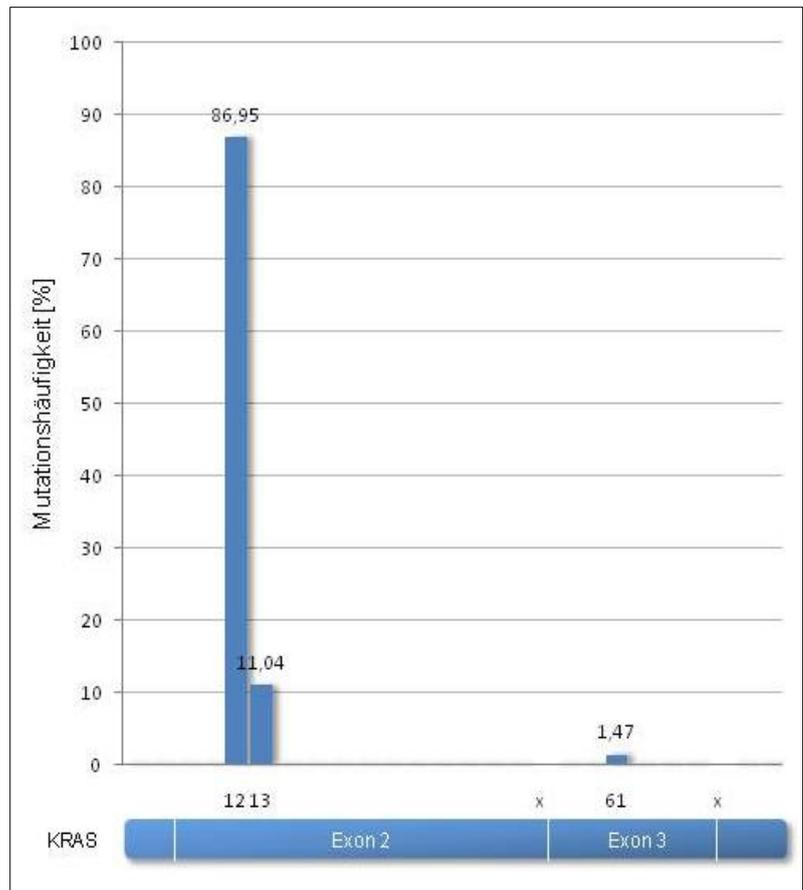


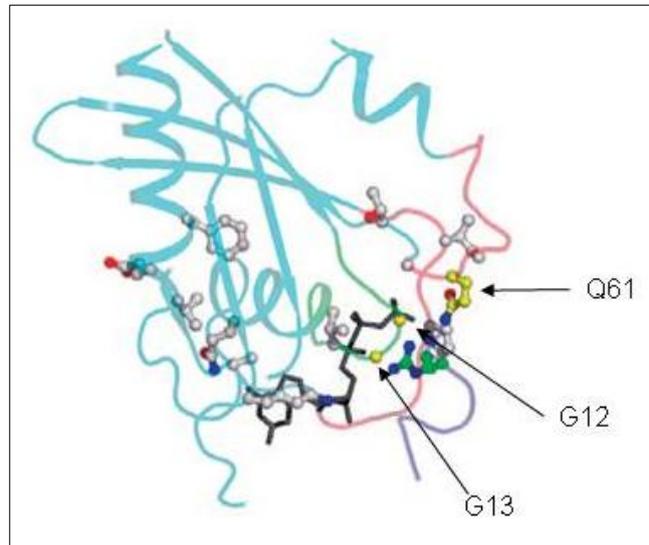
Abbildung 2.2: Häufigkeitsverteilung von *KRAS*-Mutationen im CRC.

eines Karzinoms aus normaler Kolonschleimhaut (Adenom-Karzinom-Sequenz) sind *KRAS*-Mutationen ein frühes Ereignis.[25, 41, 42, 125] 98% der *KRAS*-Mutationen sind somatische Missense-Mutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren in Codon 12, 13 oder 61 von Exon 2 bzw. 3 des *KRAS*-Gens führen (Abb. 2.2).[14, 57] Sieben verschiedene

**Tabelle 2.1: Häufigkeitsverteilung der *KRAS*-Mutationen im mCRC (modifiziert nach Neumann et al., 2009)**

CDS-Mutation	AA-Mutation	mut (%)
c.35G>A	p.G12D	36,0
c.35G>T	p.G12V	21,8
c.38G>A	p.G13D	18,8
c.34G>T	p.G12C	8,0
c.34G>A	p.G12S	6,5
c.35G>C	p.G12A	6,0
c.34G>C	p.G12R	1,3

Mutationstypen machen die Mehrzahl (98,4%) aller *KRAS*-Mutationen aus (Tab. 2.1).[86] Diese Veränderungen beeinträchtigen die intrinsische GTPase-Aktivität (Codon 61) oder führen zur Resistenz gegen GAP (Codon 12, 13) (Abb. 2.3). *KRAS*



**Abbildung 2.3:** Molekulare Struktur des ras-Proteins (modifiziert nach Schubbert et al., 2007)

inaktiviert sich daraufhin nicht mehr und akkumuliert im dauerhaft aktiven

Zustand. Dadurch wird der *RAS/RAF/MAPK-Pathway* EGFR-unabhängig stimuliert und entzieht sich der Regulation durch EGFR-Liganden.[109] Dieser Mechanismus erklärt die Unwirksamkeit von EGFR-Inhibitoren in Tumoren mit *KRAS*-Mutation und wird als *KRAS*-Hypothese bezeichnet.[88]

Die *KRAS*-Hypothese wurde zunächst in einer Reihe kleiner, retrospektiver Studien für die Zweitlinientherapie des chemotherapierefraktären mCRC nachgewiesen.[16, 20, 35, 46, 63, 71, 72] Zwei prospektive Studien belegten die *KRAS*-Hypothese in der anti-EGFR-mAB Monotherapie bei Patienten mit chemotherapierefraktärem mCRC: Amado et al. verglichen die Panitumumab-Monotherapie mit BSC in 463 Patienten mit mCRC. Der *KRAS*-Mutationsstatus wurde bei 427 Patienten bestimmt.[8] In der Studie von Karapetis et al. wurden Cetuximab-Monotherapie und BSC bei 572 Patienten mit mCRC verglichen, von denen in 394 Fällen der *KRAS*-Mutationsstatus bekannt war.[62] In beiden Studien verlängerte die anti-EGFR-mAB Monotherapie PFS und OS signifikant bei Patienten mit *KRAS* WT gegenüber Patienten mit *KRAS* Mutation. Bei Patienten mit *KRAS* Mutation wurde kein Vorteil der anti-EGFR-mAB Monotherapie gegenüber BSC nachgewiesen.[8, 62]

In den letzten Jahren zeigten drei große Studien diesen Zusammenhang auch für die Kombination von anti-EGFR-mABs und konventioneller Chemotherapie in der Erstlinientherapie des mCRC.[22, 38, 119] Die CRYSTAL-Studie verglich die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, Folsäure, Irinotecan (FOLFIRI) und Cetuximab mit FOLFIRI alleine in 1.198 Patienten mit mCRC. Bei 540 Patienten wurde der *KRAS*-Mutationsstatus analysiert.[119] In der OPUS-Studie wurden die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, Folsäure, Oxaliplatin (FOLFOX) und Cetuximab mit FOLFOX alleine verglichen. Eine Analyse des *KRAS*-Mutationsstatus wurde bei 233 von insgesamt 337 Patienten durchgeführt.[22] Die PRIME-Studie untersuchte FOLFOX und Panitumumab im Vergleich zu FOLFOX alleine bei 1.183 Patienten mit mCRC. Eine *KRAS*-Mutationsanalyse lag für 1.096 Patienten vor.[38] Bei Patienten mit *KRAS* WT verbesserten die anti-EGFR-mAbs in Kombination mit Chemotherapie ORR und PFS signifikant gegenüber der alleinigen Chemotherapie, während sich bei Patienten mit *KRAS*-Mutation diese Parameter zwischen Chemotherapie mit oder ohne anti-EGFR-mAb nicht unterschieden.[22, 23, 38, 93, 119, 120] In der PRIME-Studie verlängerte die Zugabe von anti-EGFR-mAbs das OS bei Patienten mit *KRAS* WT, nicht aber bei Patienten mit *KRAS*-Mutation.[38] Die OPUS-Studie deutete sogar einen nachteiligen Effekt der Antikörpertherapie bei Patienten mit *KRAS*-Mutation an, in der PRIME-Studie wurde dieser eindeutig gezeigt.[22, 38] Aufgrund dieser Ergebnisse beschränkten FDA und EMEA die Zulassung von Cetuximab und Panitumumab 2008 auf Patienten mit mCRC, bei denen eine Mutationsanalyse zuvor *KRAS* WT ergab.[7, 39]

Allerdings zeigen auch in der Gruppe der Patienten mit *KRAS* WT nur 13-17% ein partielles Ansprechen gemäß den Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) und nur 61% eine radiologische Verkleinerung der Zielläsion unter

Monotherapie.[8, 62] Nur 59-61% der Patienten mit *KRAS* WT sprechen auf eine Kombinationstherapie mit anti-EGFR-mAb und Chemotherapie an.[22] Neben *KRAS*-Mutationen müssen also noch weitere Resistenzmechanismen bestehen, die die Wirksamkeit der anti-EGFR-mAb einschränken.[73] Aus ihrer Kenntnis ließen sich evtl. zusätzliche Marker für eine bessere Patientenselektion ableiten.

## **2.5. Bedeutung weiterer Mutationen für die Therapieresistenz**

Neben der *KRAS*-Mutation könnten noch weitere Mutationen eine Resistenz gegen anti-EGFR-mAbs vermitteln. Theoretische Überlegungen legen nahe, dass solche Mutationen ebenfalls Mediatoren der EGFR-abhängigen Signalkaskaden betreffen.[69]

Die Serin-Threonin-Kinase BRAF ist wie *KRAS* Bestandteil des *RAS/RAF/MAPK*-Signalwegs. Sie wird direkt durch *KRAS* aktiviert und leitet somit das EGFR-induzierte Signal weiter (Abb 2.1).[29] *BRAF*-Mutationen treten in 5-10% der CRC auf und korrelieren bei Mikrosatelliten-stabilen Karzinomen (MSS) mit einer schlechten Prognose.[105] 92% der Mutationen betreffen Codon 600 in Exon 15 des *BRAF*-Gens, die übrigen Mutationen verteilen sich auf die Codons 463, 465 und 468 in Exon 11.[105] Sie steigern die Kinaseaktivität von BRAF und führen dadurch wie die *KRAS*-Mutation zur EGFR-unabhängigen Aktivierung des *RAS/RAF/MAPK-Pathways*.[29, 116] *BRAF*-Mutationen könnten somit für die Therapieresistenz bei Patienten mit *KRAS* WT verantwortlich sein.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigten frühere Studien eine Assoziation zwischen *BRAF*-Mutationen und Resistenz gegenüber anti-EGFR-mAbs in mCRC.[30, 36, 68, 78, 107, 111, 116] Eine retrospektive Analyse des *BRAF*-Mutationsstatus im Rahmen der CRYSTAL-Studie wies jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen *BRAF*-Mutationen und Resistenz gegenüber

anti-EGFR-mAbs nach.[120] Während der prognostische Wert der *BRAF*-Mutation somit als gesichert gilt, ist ihre Bedeutung als prädiktiver Biomarker bei der anti-EGFR-mAb-Therapie unklar. Daher wurde die Mutationsanalyse von *BRAF* Exon 11 und 15 in diese Arbeit aufgenommen.

Eine weitere mögliche Ursache für die anti-EGFR-mAb Resistenz ist die *KRAS* Codon 61 Mutation. Wie Mutationen in Codon 12 und 13 aktiviert sie *KRAS* konstitutiv.<sup>[33]</sup> In 11% der CRC mit *KRAS* Codon 12/13 WT findet sich eine Codon 61 Mutation.<sup>[6]</sup> Zwei Studien zeigten, dass Patienten mit *KRAS* Codon 61 Mutation nicht auf die Therapie mit anti-EGFR-mAb ansprechen ( $p=0,047$ ). *KRAS* Codon 61 Mutationen waren mit kürzerem PFS unter anti-EGFR-mAb-Therapie assoziiert (3,8 vs. 5,3 Monate, HR=0,45 (0.10–0.85),  $p=0.023$ ).[30, 78]

Bisher werden unter Routinebedingungen ausschließlich Mutationen von *KRAS* Codon 12 und 13 berücksichtigt.<sup>34,35</sup> *KRAS* Codon 61-Mutationen werden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erfasst. Die Evidenz nimmt jedoch zu, dass *KRAS* Codon 61 Mutationen genauso wie die *KRAS* Codon 12/13 Mutationen für die Resistenz gegen anti-EGFR-mAbs verantwortlich sein können. In den nächsten Jahren ist deshalb die Aufnahme dieser Mutation in die Standarddiagnostik denkbar.[32, 107]

## **2.6. Konkordanz von *KRAS*-Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC**

Ein weiterer Erklärungsansatz für Therapieresistenz von Patienten mit *KRAS* WT in der Mutationsanalyse ist, dass bei demselben Patienten das primäre CRC und dessen Metastasen in ihrem Mutationsstatus nicht übereinstimmen.

*KRAS*-Mutationsanalysen werden in der Regel an Gewebe des Primärtumors durchgeführt, denn dieses wurde in den meisten Fällen bereits im Rahmen einer

Koloskopie oder Hemikolektomie gewonnen und im Pathologischen Institut archiviert und ist daher leicht verfügbar.[15] Prognosebestimmend und damit Hauptziel der anti-EGFR-Therapie sind jedoch Metastasen. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist, dass der Mutationsstatus im Primärtumor, der analysiert wird, und in der korrespondierenden Metastase, die therapiert werden soll, übereinstimmen. Diese Annahme wird vom klassischen Modell der linearen Tumorprogression unterstützt. Es beschreibt die Tumorentstehung als mehrstufigen Prozess, in dessen Verlauf die Tumorzellen schrittweise maligne Eigenschaften erwerben. Die Fähigkeit zur Metastasierung ist der letzte dieser Schritte.[24, 41, 42] Folglich trennen Primärtumor und Metastase sich erst spät in ihrer Entwicklung und weisen daher eine weitgehende genetische Übereinstimmung auf.[64]

Andere Theorien wie das Modell der parallelen Progression gehen hingegen davon aus, dass Tumorzellen früh im Verlauf der Tumorigenese disseminieren und sich von diesem Zeitpunkt an getrennt vom Primärtumor entwickeln, mit der Folge genetischer Abweichungen zwischen Primärtumor und Metastase.[19, 64] Auf diese Weise kann der Primärtumor *KRAS* WT aufweisen, während in der Metastase davon abweichend eine *KRAS*-Mutation auftritt. Beim gebräuchlichen Vorgehen würde dieser Patient die anti-EGFR-mAb Therapie erhalten, die das Wachstum der Metastase jedoch nicht beeinflusst. Um vor der Therapieentscheidung eine *KRAS*-Mutation sicher auszuschließen, müssten unter dieser Annahme sowohl Primärtumor als auch Metastase auf Mutationen untersucht werden. Dazu ist eine Probenentnahme aus der Metastase nötig. Diese ist für den Patient mit zusätzlichen Belastungen und Komplikationsrisiken verbunden. Die Mehrfachbestimmung vervielfacht die Kosten der Mutationsanalyse. Pro Patient und *KRAS*-Mutationsanalyse werden in Deutschland mit Kosten von 280€ gerechnet.[124]

Bisherige Studien, die *KRAS* Codon 12/13 Mutationen in Primärtumor und korrespondierenden Metastasen des CRC verglichen, lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Während einige Studien eine vollständige Übereinstimmung ergaben,[40, 43, 49, 74, 112, 127, 129] berichteten andere Abweichungen des Mutationsstatus mit Diskordanzraten zwischen 1% und 23% (Tab. 5.1).[4, 5, 11, 13, 26, 48, 59, 65, 80, 84, 91, 92, 94, 106, 117] Aufgrund der unsicheren Datenlage ist somit bisher kein abschließendes Urteil über die Übereinstimmung von *KRAS*-Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC möglich. Aktuelle Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des CRC geben daher bislang keine Empfehlung darüber ab, ob für die *KRAS*-Mutationsanalyse vor der Therapie mit anti-EGFR-mAbs Gewebe von Primärtumor oder Metastase verwendet werden soll und ob Mehrfachbestimmungen notwendig sind.[7, 39, 122]

Eine noch schwächere Datenlage besteht für *KRAS* Codon 61 und *BRAF*-Mutationen. Nur zwei Studien, eine davon aus dem Jahr 1991, widmeten sich bisher der Konkordanz von *KRAS* Codon 61 Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC.[91, 117] Die Ergebnisse für *KRAS* Codon 12,13 und 61 wurden nicht einzeln aufgeschlüsselt (Tab. 5.1). Die Konkordanz von *BRAF*-Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC wurde in bisher acht Studien mit meist geringer Fallzahl untersucht.[5, 13, 59, 80, 84, 92, 94, 117] Hier ergaben sich Übereinstimmungsraten zwischen 82% und 100% (Tab 5.2).

Unter der Annahme des klassischen Progressionsmodells, dass die Konkordanz in Wirklichkeit beinahe 100% beträgt, könnten die hohen Diskordanzraten in einigen Studien unter Anderem durch Fehler bei der Mutationsanalyse verursacht sein.[15] Die Mutationsanalyse in Gewebeproben ist ein vielschrittiger, störanfälliger

Arbeitsprozess, bei dem in verschiedenen Phasen Fehler unterlaufen können.

Fehlerquellen sind unter anderem:

- Tumorheterogenität[82]
- Zu geringe Menge an Tumorgewebe[37]
- Verunreinigung durch Normalgewebe[43]
- Analyseverfahren mit niedriger Sensitivität[60, 85]
- Nicht optimiertes und validiertes Analyseverfahren.[15, 121, 122]

Wenige der bisherigen Publikationen zur Untersuchung der Konkordanz von *KRAS*-Mutationen in Primärtumor und Metastase des CRC erwähnen Maßnahmen, um diese Störfaktoren bei der Mutationsanalyse auszuschalten (Tab. 5.1). Fehler bei der Mutationsanalyse sind daher eine mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse und teilweise hohen Diskordanzraten in diesen Arbeiten. Daraus ergibt sich folgende Arbeitshypothese: Wenn Fehler bei der Mutationsanalyse durch die sorgfältige Optimierung und Validierung der Analytik vermieden werden, lässt sich eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse der Mutationsanalyse von Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC erreichen. Die vorliegende Arbeit prüft diese Hypothese neben *KRAS* Codon 12/13 auch für Codon 61 und *BRAF*, die zu Beginn der Studie als prädiktive Marker galten.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Geräte**

Die verwendeten Geräte sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

#### **3.1.2. Verbrauchsmaterial**

Die verwendeten Gebrauchsmaterialien sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

#### **3.1.3. Software**

Die verwendete Software ist in Tab. 3.3 aufgelistet.

#### **3.1.4. Patientenkollektiv**

63 Patienten mit metastasiertem CRC, die zwischen 1995 und 2008 am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München behandelt wurden und von denen im Pathologischen Institut der Universität München Gewebeproben sowohl des Primärtumors als auch der korrespondierenden Metastase vorlagen, wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben (*formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE*) wurden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts entnommen. Die zugehörigen Patientendaten wurden vom Tumorzentrum München (TzM) bereitgestellt. Von allen Patienten lag eine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme vor. Die Studie wurde gemäß den Empfehlungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU durchgeführt.

<b>Tab. 3.1: Geräte</b>		
<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Alpha-Kamera	Multimage Light Cabinet	Alpha Inotec Corp., San Leandro, USA
Arbeitsstation für Pyrosequenzierung	PyroMark TM Q24 Vacuum Prep Workstation	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Drucker für Gelbilder	Digital Graphic Printer UP-D897	Sony Corp., Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Feinwaage	Kern KB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Ballingen, D
Halterung für 24-Well-Platte	PyroMark Q24 Plate Holder	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Heizplatte	Präzitherm LHG	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, D
Sterile Arbeitsbank	HeraSave HS12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Inkubator	Forma Scientific CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kartusche (Sequenzierer)	PyroMark Q24 Cartridge	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Mirkowellengerät	Modell 8201-1	Miele & Cie. KG, Gütersloh, D
Mirkozentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetten	Eppendorf Research 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pyrosequenzer	PyroMark TM Q24 Instrument	Biotage AB, Uppsala, Schweden
QIACube	QIACube	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Schüttler	Monoshake	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D
Spannungsquelle für Elektrophoresekammer	Power Pac Basic	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Thermocycler (PCR-Gerät)	MBS 0.2 G ThermalCycler	ThermoHybaid, Ashford, GB
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischzentrifuge	C1301B-230V	Labnet International Inc., Edison, USA
Vakuumpumpe	2511 Dry Vacuum Pump/Compressor	Gardner Denver Welch Vacuum Technology Inc., Skokoe, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

**Tab. 3.2: Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
24-PCR-plate not skirted	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
6x DNA Loading Dye 1ml	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, D
Aqua bidest. 10l	H. Kerndl GmbH, Feldkirchen, D
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
DMEM/Ham's F12 (1:1)	Biochrom AG, Berlin, D
Ethanol $\geq$ 99,5 %, Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
FBS	Biochrom AG, Berlin, D
GeneRuler™ Low Range	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, D
Hot Star Taq® DNA Polymerase (1000 units)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Human Genomic DNA: male ; Exp 6/12	Promega Corp., Fitchburg, USA
Multiply®-µStrip 8er Kette (PCR-Probengefäße)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Oligonukleotide (Primer)	biomers.net GmbH, Ulm, D
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, D
PyroMark Annealing Buffer (250ml)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Binding Buffer (200ml)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Denaturation Solution (500ml)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Control Oligo, version 1	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Q24 Gold Reagents (5x24)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Q24 Troughs	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs (12)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
PyroMark Washing Buffer (10x conc., 200ml)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
QIAamp DNA Micro Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Rotiphorese® 10x TBE Buffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, D
Safe Seal-Tips® professional; 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1250 µl (Pipettenspitzen)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Safe Seal-Tube 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf-)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02%	Biochrom AG, Berlin, D
Vacuum Prep Tool Filter Probes	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Xylol, $\geq$ 98,5 %, Ph.Helv., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Programm	Hersteller	Anwendung
PyroMark Q24 Software	Biotage AB, Uppsala, Schweden	Auswertung Pyrosequenzierung
IBM SPSS Statistics	IBM Corp., Armonk, USA	Statistische Auswertung
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA	Statistische Auswertung

Das Durchschnittsalter der Patienten bei Erstdiagnose betrug 60,9 Jahre. 63,5% der Untersuchten waren männlich. In 56 Fällen war der Primärtumor bei Diagnosestellung lokal fortgeschritten (T3: 41 Fälle, 65,1%, T4: 15 Fälle, 23,8%), in vier Fällen lokal begrenzt (T2, 6,3%, kein T1). Ein Befall der Lymphknoten lag in 46 Fällen vor (N1/2: 73,1%). In allen untersuchten Fällen wies der Primärtumor einen mäßigen bis niedrigen Differenzierungsgrad auf (G2: 30 Fälle, 47,6%, G3: 33 Fälle, 52,4%). In 39,7% der Fälle war der Primärtumor rechts- und in 60,3% der Fälle linksseitig lokalisiert, wobei Rektum und Sigmoid mit jeweils 27,0% der Fälle die häufigsten Lokalisationen darstellten. In drei bzw. vier Fällen enthielt die Patientenakte keine Informationen über Tumorgröße bzw. Lymphknotenstatus.

Die korrespondierende Metastase betrafen in der Mehrzahl der Fälle die Leber (40 Fälle,

**Tab 3.4: Charakteristika des Kollektivs**

Charakteristika	total
Alle Patienten	63 (100)
Alter in Jahren	median 60,9
≤60	25 (39,7)
≥61	38 (60,3)
Geschlecht	
männlich	40 (63,5)
weiblich	23 (36,5)
Tumorgröße (UICC)	
T2	4 (6,3)
T3	41 (65,1)
T4	15 (23,8)
Daten nicht verfügbar	3 (4,8)
Lymphknotenstatus	
N0	13 (20,6)
N+	46 (73,1)
Daten nicht verfügbar	4 (6,3)
Tumor Grading (WHO)	
G2	30 (47,6)
G3	33 (52,4)
Lokalisation des Primärtumors	
rechtsseitiges Kolon	25 (39,7)
Zäkum	6 (9,5)
Ascendens	14 (22,2)
Flexura hepatica	1 (1,6)
Transversum	4 (6,3)
linksseitiges Kolon	38 (60,3)
Flexura splenica	3 (4,8)
Descendens	1 (1,6)
Sigmoid	17 (27,0)
Rectum	17 (27,0)
Lokalisation der Metastase	
Leber	40 (63,5)
Peritoneum	11 (17,5)
Lunge	3 (4,8)
Andere	9 (14,3)

63,5%), gefolgt von Peritoneum (17,5%) und Lunge (4,8%). In neun Fällen traten Metastasen in seltenen Lokalisationen auf (Ovar, Prostata, Haut, nicht-regionale Lymphknoten). In drei Fällen lagen zwei korrespondierenden Metastasen desselben Primärtumors vor. Diese lagen in zwei Fällen in Peritoneum und Ovar, in einem Fall in Leber und Lunge (Tab. 3.4).

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Optimierung und Validierung der Analyseverfahren**

#### **3.2.1.1. Optimierung der PCR**

Für die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) sollte die optimale Schmelztemperatur ( $T_M$ ) während der Bindung der Primer an die Template DNA bestimmt werden. Dazu wurde für jedes der vier Primer-Paare eine Optimierungs-PCR mit einem Temperaturgradienten während der Bindungsphase der Primer (*annealing*) durchgeführt. Die Schmelztemperatur lag dabei in jeweils einem von acht Reaktionsgefäßen bei 55,8, 57,8, 59,5, 61,4, 63,4, 65,4, 67,6 bzw. 69,8 °C. Als Template diente human genomic DNA (Tab. 3.2). Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert (s. Punkt 3.2.2.3). Die Schmelztemperatur  $T_M$ , bei der sich in der gelelektrophoretischen Analyse die stärkste Bande zeigte, wurde als Optimum in den PCRs für die Mutationsanalyse verwendet.

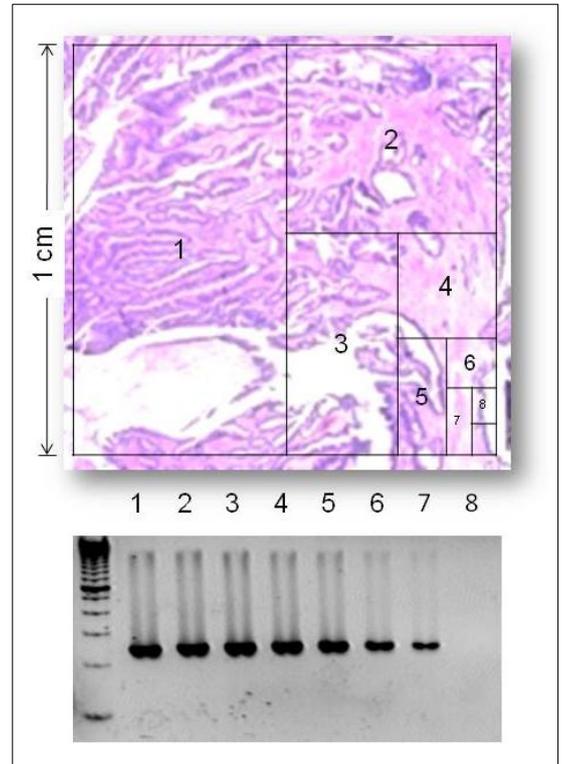
#### **3.2.1.2. Bestimmung der Spezifität der Mutationsanalyse**

Die Spezifität eines Mutationsanalyseverfahrens beschreibt die Genauigkeit, mit der WT als solcher erkannt wird oder die Rate der falsch-positiven Fälle. In einem ersten Schritt wurde die Spezifität des Analyseverfahrens geprüft. Als Template wurde DNA von kindlichen Tonsillen eingesetzt, denn hier werden keine *KRAS*- bzw. *BRAF*-Mutationen erwartet. Um das zufällige Auftreten von Mutationen ausschließen zu

können wurden jeweils fünf Ansätze von acht verschiedenen kindlichen Tonsillen (jünger als zehn Jahre) durchgeführt. Die maximale Anzahl an PCR-Zyklen, bei denen in gesundem Gewebe keine Mutation nachweisbar war, wurde als spezifisch gewertet.

### 3.2.1.3. Bestimmung der Sensitivität der Mutationsanalyse

Um die Tumormenge zu bestimmen, die gerade noch ausreicht, um daraus genügend DNA für die anschließende PCR zu isolieren, wurde für jeden der vier Genloci ein sog. 1cm<sup>2</sup>-Test durchgeführt. Dazu wurde Tumorgewebe aus 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 bzw. 0,0078125 cm<sup>2</sup> großen Arealen eines FFPE-Schnitts makrodisseziert (Abb. 3.1). Aus den so gewonnenen Gewebeproben wurde DNA isoliert und in PCR-Reaktionen für *KRAS* Codon 12/13 und 61 sowie *BRAF* Codon 11 und 15 eingesetzt.



Die resultierende DNA-Menge wurde mittels Gelelektrophorese evaluiert (s. Punkte 3.2.2.1-

**Abbildung 3.1:** Bestimmung der minimalen Gewebemenge für die DNA-Gewinnung mittels 1cm<sup>2</sup>-Test.

3.2.2.3). Als minimale Gewebemenge wurde diejenige Gewebemenge festgelegt, bei der nach PCR in der Gelelektrophorese gerade noch eine Bande erkennbar war.

Um den minimalen Anteil mutierter DNA in einem Gemisch aus mutierter und WT DNA zu bestimmen, ab dem die Mutation noch detektiert werden kann, wurden Verdünnungsreihen aus mutierter und WT DNA hergestellt. Dazu wurden acht Tumorzelllinien mit den sieben häufigsten Mutationen von *KRAS* Codon 12/13 bzw. der häufigsten Mutation von *BRAF* Exon 15 in der COSMIC-Datenbank ermittelt[14,

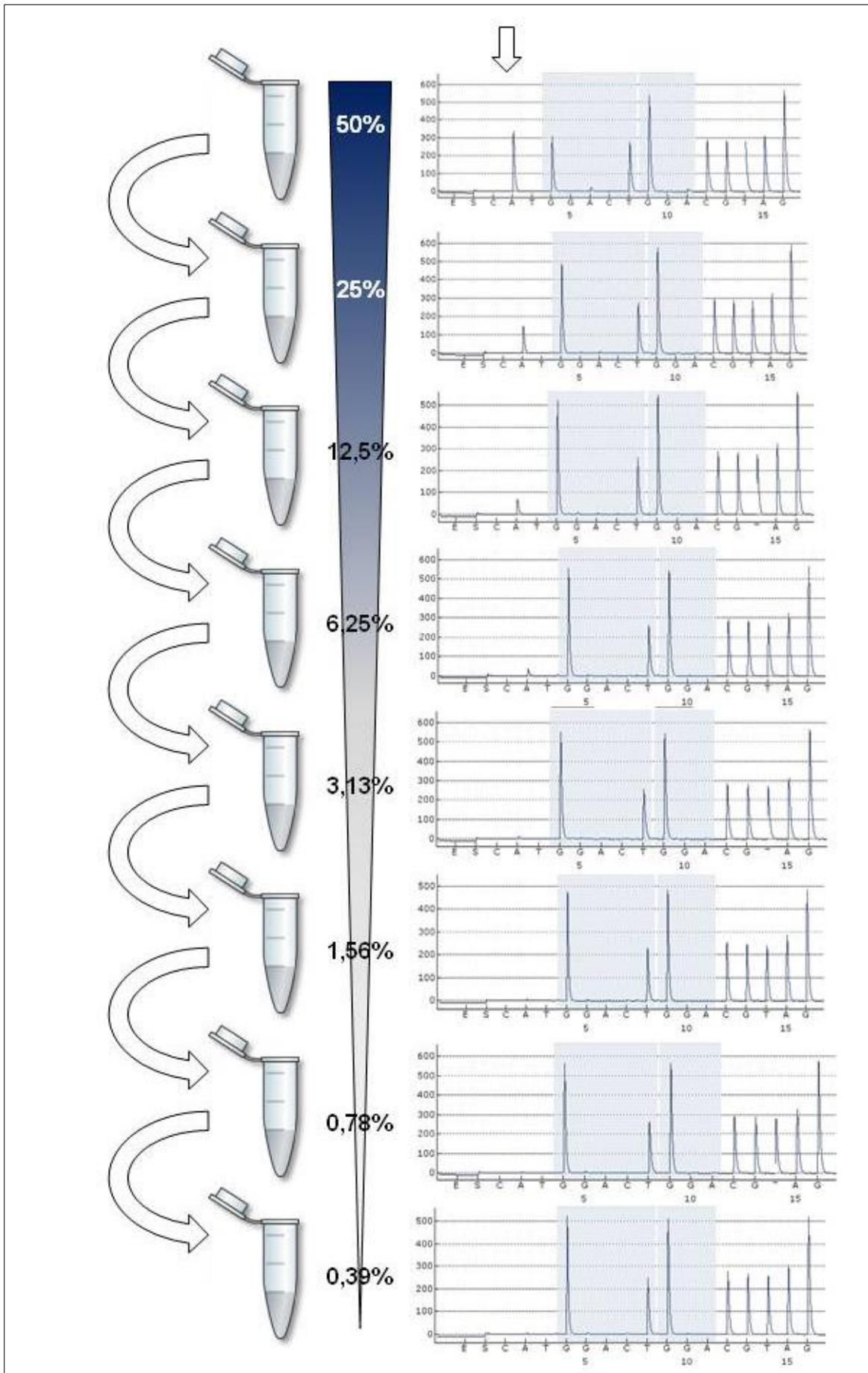
57] und bei DMSZ GmbH, Braunschweig, D (A549, HCT116, HT29, HUP-T3, KYSE, SW480), ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, D (LS174-T) und ECACC, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA (RPMI-8226) bestellt (Tab. 3.5). Es lagen keine geeigneten Zelllinien vor, um die Spezifität des Testverfahrens für Mutationen von *KRAS* Codon 61 und *BRAF* Exon 11 zu bestimmen. Die Zellen wurden nach gängigen Protokollen kultiviert.[95]

**Tab 3.5: Sensitivitätstest für *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen**

Gen	Mutation	Zelllinie	Organ	Grenzwert (%)
<i>KRAS</i> Codon 12/13	c.34G>A	SW480	Dickdarm	6,25
	c.34G>C	HUP-T3	Pankreas	6,25
	c.34G>T	KYSE401	Ösophagus	6,25
	c.35G>A	LS174T	Dickdarm	6,25
	c.35G>C	RPMI-8226	Multipl. Myelom	12,50
	c.35G>T	A549	Lunge	6,25
	c.38G>A	HCT116	Dickdarm	6,25
	<i>BRAF</i> Exon 15	c.1799T>A	HT29	Dickdarm

Um Zellextrakte zu gewinnen, wurde das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2ml 0,05% Trypsin zugegeben und die Zellen bei 37°C für 3 min. inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in einem 1,5 ml Röhrchen gesammelt und für 5 min. bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Aus den Zellen wurde DNA mithilfe des QIAamp® DNA Micro Kits und des QIAcube gemäß Herstellerangaben extrahiert.

Die auf diese Weise gewonnene DNA mit bekannten *KRAS*- oder *BRAF*-Mutationen wurde mit zunehmenden Mengen an human genomic DNA in einem Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 bzw. 1:128 gemischt. Die auf diese Weise erzeugten DNA-Gemische wurden in die Mutationsanalyse (s. Punkt 3.2.2)



**Abbildung 3.2:** Bestimmung der Sensitivität der Mutationsanalyse mithilfe einer Verdünnungsreihe.

eingesetzt. Eine Mutation war bei absteigender Konzentration im Pyrogramm bis zu einem Verhältnis von 6,25% zwischen dem Peak des mutierten Allels und dem Peak des WT Allels eindeutig vom Hintergrundrauschen unterscheidbar. Als Cut-off Wert für die Unterscheidung zwischen Mutation und WT wurde daher das Zwei- bis Dreifache dieses Wertes definiert, d.h. ein Verhältnis von 20% zwischen dem Peak des mutierten Allels und dem Peak des WT Allels. Als untere Grenze der Testsensitivität wurde dasjenige Verhältnis von mutierter zu WT DNA festgelegt, bei dem dieser Cut-off Wert gerade noch überschritten wurde (s. Abb. 3.2).

#### **3.2.1.4. Bestimmung der Testgenauigkeit (accuracy)**

Um nachzuweisen, dass das verwendete Testverfahren bei *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen den genauen Mutationstyp zuverlässig erkennt, wurden DNA-Extrakte aus Zelllinien mit bekannter *KRAS*- bzw. *BRAF*-Mutation gewonnen (s. Punkt 3.2.1.3, Tab. 3.5). Diese wurde in gleicher Weise wie die Patientenproben auf Mutationen untersucht (s. Punkte 3.2.2.2-3.2.2.4). Das Analyseverfahren galt als spezifisch für eine Mutation, wenn der in der Mutationsanalyse detektierte Mutationstyp mit dem in der Literatur für die jeweilige Zelllinie beschriebenen Mutationstyp übereinstimmte.

### **3.2.2. Mutationsanalyse in Patientenproben**

#### **3.2.2.1. DNA-Isolation aus Paraffinmaterial**

Das Vorgehen bei der DNA-Isolation aus Paraffinmaterial richtete sich nach Standard-Protokollen.[51] Zur Anreicherung von Tumorgewebe wurde auf einem H&E-gefärbten Schnitt des jeweiligen Gewebeblocks das Tumorareal markiert und dieses als Schablone für die anschließende Makrodissektion verwendet. Aus einem ungefärbten Gewebeschnitt wurde Paraffin durch je drei jeweils zehnmütige Inkubationsschritte in 100% Xylol und 100% Ethanol gelöst und entfernt. Anschließend wurde das im H&E-Schnitt markierte Areal auf den ungefärbten Schnitt

übertragen und dieses unter mikroskopischer Kontrolle mithilfe einer Skalpellklinge disseziert. Schließlich wurde die Qualität der Dissektion nach H&E-Färbung des Schnitts durch Vergleich mit der Vorlage bestimmt. Das gewonnene Gewebematerial wurde mit 180  $\mu$ l ATL-Puffer und 20  $\mu$ l Proteinase K aus dem QIAamp® FFPE Tissue Kit gemischt und im Thermo-Mixer für 1 h bei 56°C und anschließend für 5 min. bei 90°C inkubiert. Aus dem Zellysat wurde DNA mithilfe des QIAamp® FFPE Tissue Kit und des QIAcube Roboters gemäß Herstellerangaben gereinigt.

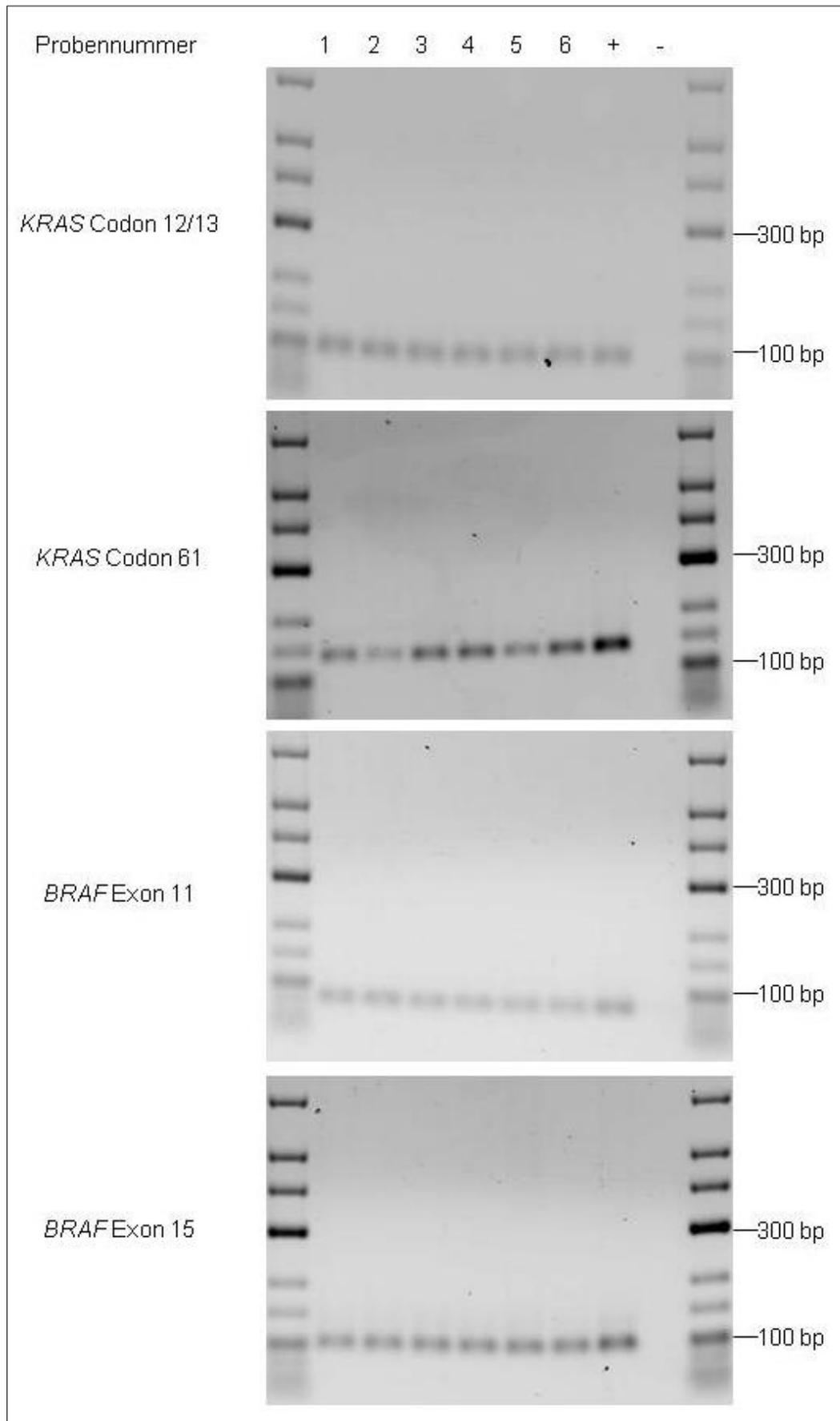
### **3.2.2.2. DNA-Amplifikation mittels PCR**

Die PCR wurde gemäß Standardprotokollen durchgeführt.<sup>[67]</sup> Lyophilisierte Primer (Tab. 3.2) wurden als 100  $\mu$ M Stammlösungen in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Für die PCR-Reaktionen wurde ein Master Mix aus je 400  $\mu$ M Primer-Lösung, 2,0  $\mu$ l DNA-Extrakt, 0,2  $\mu$ l Hot Star Taq® DNA Polymerase, 200  $\mu$ M dNTPs, 1x Reaktionspuffer und 32,2  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Die PCR-Reaktion wurde mithilfe eines Thermocyclers durchgeführt. Nach einem initialen Aktivierungsschritt bei 94°C für 15 min. wurden die PCR-Produkte unter den in Tab. 4.1 zusammengefassten Bedingungen generiert. Jeder Zyklus setzte sich aus einem Denaturierungsschritt (94°C, 30 sec.) einem Bindungsschritt ( $T_M$ , 30 sec.) und einem Elongationsschritt (72°C, 30 sec.) zusammen. Am Ende der Amplifikation wurde ein terminaler Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. angeschlossen. Als Positivkontrolle diente genomische DNA, als Negativkontrolle Wasser.

### **3.2.2.3. Gelelektrophoretische Analyse**

Um 3% Agarose-Gel herzustellen, wurden 3 g Agarose durch Aufkochen in 100 ml 0,5% TBE-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde mit 3  $\mu$ l 1% Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelschale ausgegossen. Nach 30-minütigem Aushärten wurde das Gel in eine mit 0,5% TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer transferiert, sodass sie

vollständig mit Puffer bedeckt war. 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas) gemischt und in die Geltaschen eingebracht. Zur Abschätzung der Amplifikatlänge wurden zusätzlich beidseits 3 µl eines Standardmarkers (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Anschließend wurde die DNA bei einer Spannung von 120 V über 1 h aufgetrennt. Mittels des Alpha-Kamera-Systems wurden Gelbilder dokumentiert und das PCR-Bandenmuster anschließend auf korrekte Länge, Bandenstärke und Verunreinigungen hin beurteilt. Abb. 3.3 zeigt exemplarisch die Ergebnisse je einer Elektrophorese für *KRAS* Codon 12/13 und 61 sowie *BRAF* Exon 11 und 15.



**Abbildung 3.3:** Gelelektrophoretische Analyse von jeweils sechs Patientenproben einschließlich Positiv- und Negativkontrolle nach der PCR für *KRAS* Codon 12/13 und 61 sowie *BRAF* Exon 11 und 15.

### 3.2.2.4. Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung ist schematisch in Abb. 3.4 dargestellt und wird im Folgenden grob umrissen. Die Pyrosequenzierung erfordert einzelsträngige Template DNA. Dazu wird das zu analysierende DNA-Fragment mit zwei Primern amplifiziert, von denen einer biotinyliert ist. Über den Biotin-Rest wird die DNA an Streptavidin-Sepharose-Beads gebunden. Mithilfe einer NaOH-haltigen Denaturierungslösung erfolgt die Strangtrennung. Durch ein Unterdrucksystem wird die Lösung mit diesem Einzelstrang abgesaugt, während der Biotin-gekoppelte

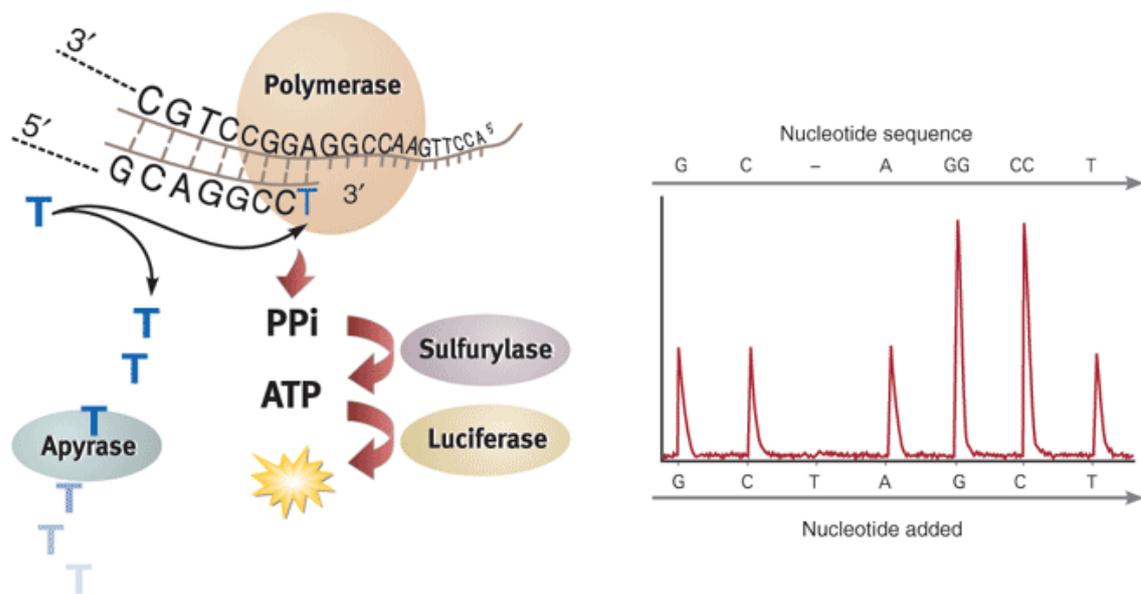


Abbildung 3.4: Prinzip der Pyrosequenzierung.

Einzelstrang über die Biotin-Streptavidin-Bindung an den Sepharose-Beads zurückgehalten wird. Für die eigentliche Sequenzierung wird ein Sequenzierprimer an die einzelsträngige Template DNA gebunden und mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase sowie den Substraten Adenosin-5'-Phosphodisulfat ( $APS_2$ ) und Luziferin inkubiert. dNTPs werden dem Reaktionsgemisch in einer in einer Injektionsliste festgelegten Reihenfolge zugesetzt. Ist das zugesetzte Nukleotid komplementär zur jeweiligen Base der template DNA,

dann wird es von der DNA-Polymerase in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Dabei wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, das von der ATP-Sulphyrase in Anwesenheit von APS in ATP umgewandelt wird. ATP treibt die Luziferase-abhängige Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin an, bei der Licht entsteht. Dieses Lichtsignal wird von einem Messgerät erfasst und als sog. Peak im Pyrogramm dargestellt (Abb. 3.4). Bevor ein neues dNTP zugesetzt wird, werden überschüssige dNTPs von Apyrase gespalten. Im Lauf dieses Vorgangs wird aus den zugesetzten dNTPs ein neuer, komplementärer DNA-Strang aufgebaut, dessen Sequenz an den Peaks im Pyrogramm abgelesen werden kann.[89, 101, 102]

Das Vorgehen bei der Pyrosequenzierung erfolgte nach Angaben der Erfinder bzw. des Herstellers.[90, 96] Dazu wurde zunächst mithilfe der PyroMark™ Q24 Software ein Analyse-Assay erstellt. Um die DNA an Sepharose-Beads zu binden wurden 2 µl Beads, 20 µl PCR-Produkt und 40 µl Binding Buffer gemischt und in einem Schüttler für 10 min. bei 1400 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle diente das PyroMark Q24 Control Oligonukleotid. Um die DNA-Stränge zu trennen wurden an der PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation die Beads an eine Membran angesaugt, für 5 sec. in 70% Ethanol, für 5 sec. in Denaturation Solution und für 10 sec. in Washing Buffer gespült und dann für 5 sec. luftgetrocknet. Anschließend wurde das System belüftet, sodass sich die Beads von der Membran lösten und in ein PyroMark™ Q24 Plate fielen, dessen Näpfe mit 0,3 µM Sequenzierprimer in 25 µl Annealing Buffer gefüllt waren. Im folgenden zweiminütigen Inkubationsschritt bei 80°C wurden die Überstrukturen der einzelsträngigen PCR-Produkte aufgelöst, sodass die Sequenzierprimer an die DNA binden konnten. Für die eigentliche Pyrosequenzierung wurde die Kartusche des PyroMark™ Q24 Instruments mit

Enzym, Substrat und dNTPs beladen. Das Ergebnis der Sequenzanalyse wurde mithilfe der PyroMark™ Q24 Software ausgewertet.

### **3.2.3. Statistische Auswertung**

Um die Konkordanz zwischen Mutationen von Primärtumor und Metastase auszuwerten, wurde der Cohen'sche  $\kappa$ -Koeffizient mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 errechnet, der Werte zwischen 1,0 (perfekte Übereinstimmung) und 0,0 (keine Übereinstimmung) annehmen kann. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde das Konfidenzintervall für Quoten eingesetzt, um die Sicherheit zu bestimmen, mit der Ergebnisse vom untersuchten Kollektiv mit 63 Fällen auf die Gesamtheit der Fälle übertragen werden können.[3] Für alle Test wurde ein einseitiger p-Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angenommen.

Die Signifikanz der Korrelation klinisch-pathologischer Eigenschaften wurde mittels  $\chi^2$ -Tests unter Zuhilfenahme von SPSS bestimmt.

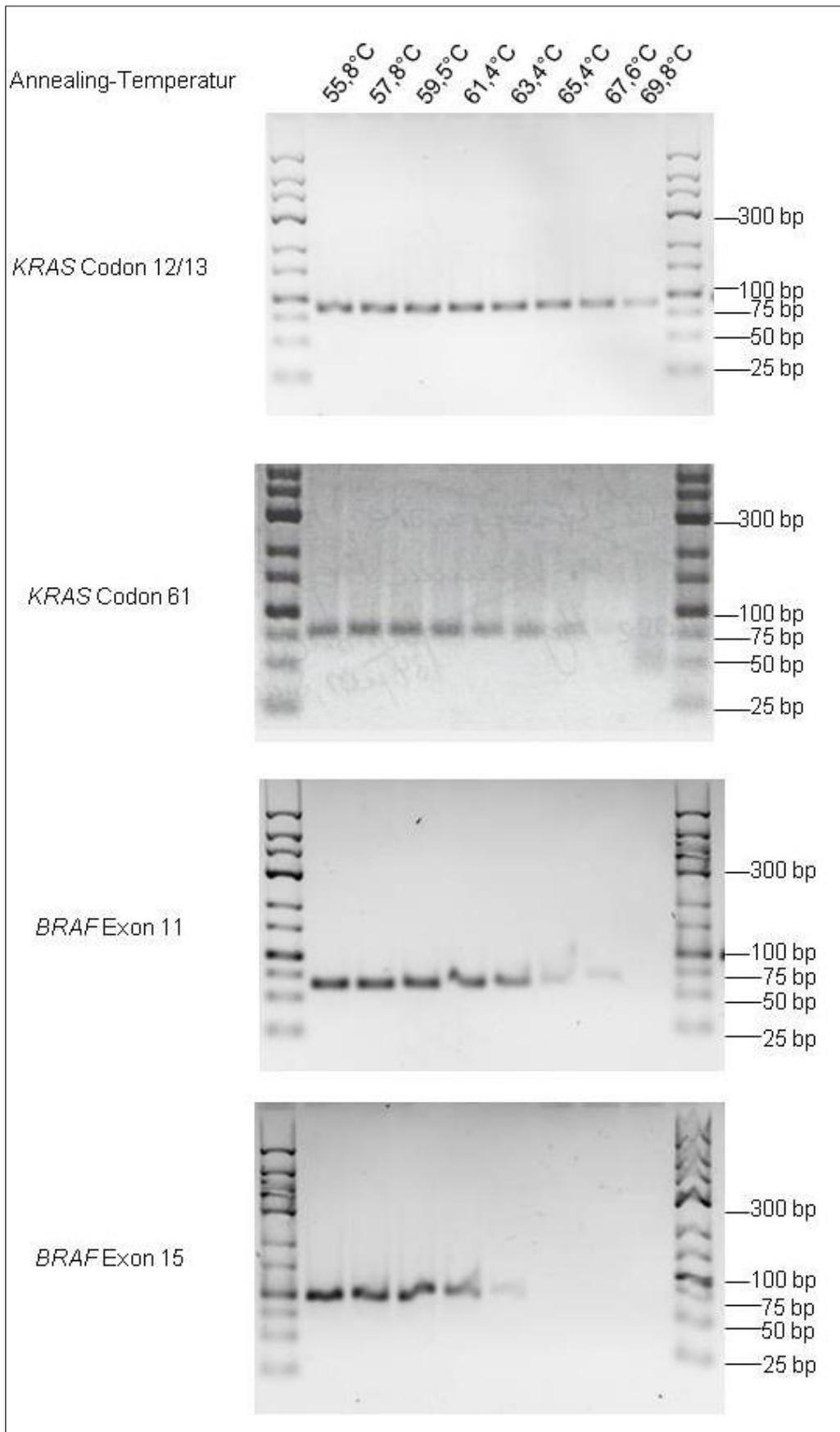
## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Optimierung und Validierung der Analyseverfahren**

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Übereinstimmung des Mutationsstatus von Primärtumor und Metastase des mCRC mit einem Verfahren zu untersuchen, dessen Analysegenauigkeit zuvor bestimmt worden war. Dazu wurden alle Analyseschritte nach Maßgaben der Europäischen Gesellschaft für Pathologie (ESP) unter Laborbedingungen optimiert, validiert und kontrolliert.[122] Im Einzelnen wurden die Bedingungen der PCR optimiert, die minimale Tumorgewebemenge für die DNA-Extraktion, Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit des Analyseverfahrens bestimmt und Menge und Qualität der eingesetzten DNA sowie die Erfolgsrate der Mutationsanalyse kontinuierlich überwacht.

#### **4.1.1. Optimierung der PCR**

Um die Effizienz der PCR bei höchstmöglicher Sensitivität und Spezifität zu maximieren, wurden für jede PCR die optimale Schmelztemperatur  $T_M$ , die Spezifität und Sensitivität bestimmt (Abb. 4.1, Tab. 4.1). Unter den gegebenen Laborbedingungen ließen sich mit den so ermittelten Protokollen in den PCRs maximale Ausbeuten erzielen.



**Abbildung 4.1:** Optimierung der Schmelztemperatur der PCR für KRAS Codon 12/13 sowie BRAF Exon 11 und 15 mittels Temperaturgradient.

**Tab. 4.1: Optimierte PCR-Bedingungen**

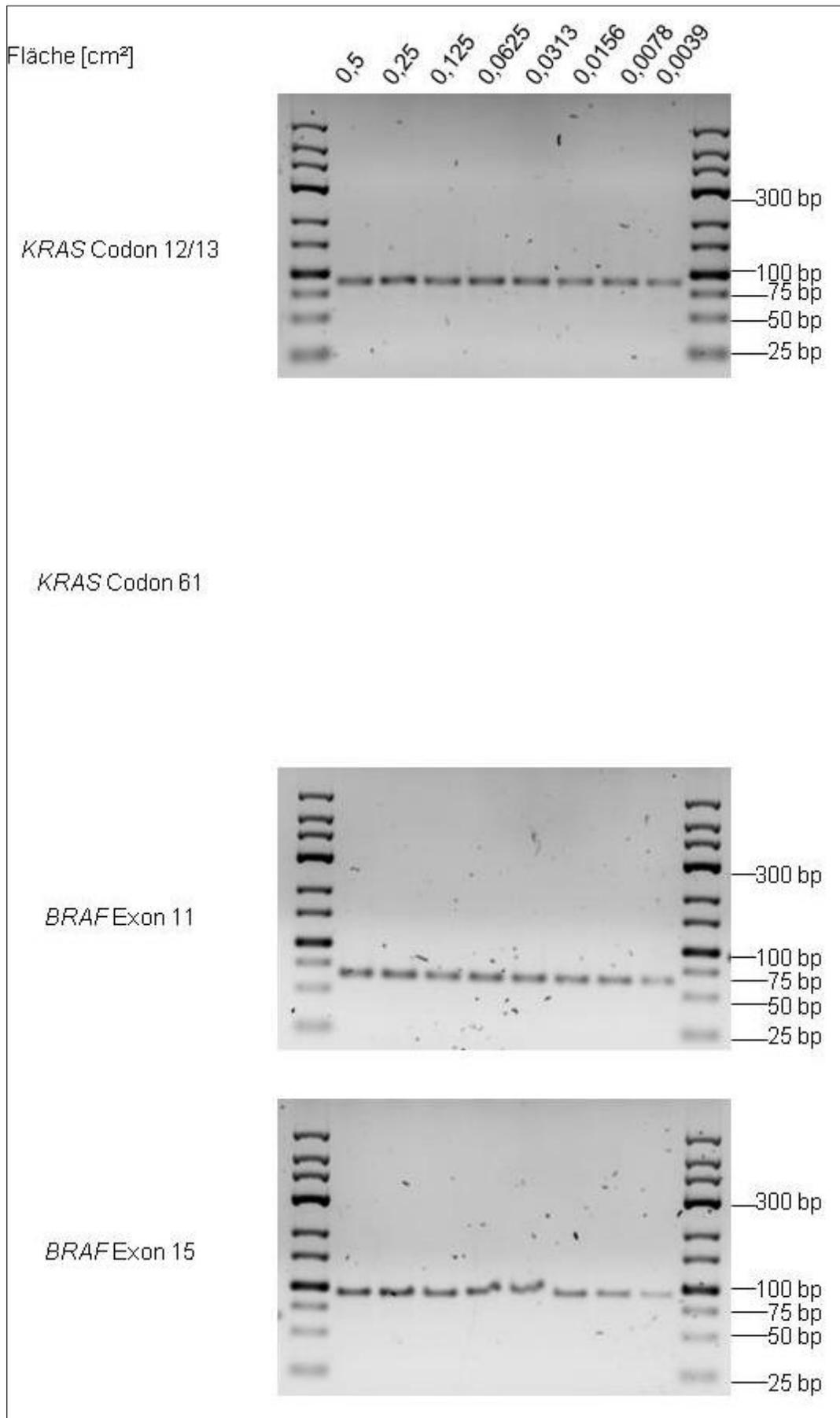
Gen	Primer-Sequenz	TM [°C]	Anzahl der Zyklen	PCR- Bedingungen	Polymerase	Länge des PCR- Produkts [bp]
<b>KRAS Codon 12/13</b>						
5-Primer	NNGGCCCTGCTGAAATGACTGAA	60	50	30" 94°C	Qiagen HotStar Taq	82
3-Primer	Biofin~TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT			30" Tm		
Sequenzierprimer	TGTGGTAGITGGAGCT			30" 72°C		
analysierte Sequenz	GNTGRCGTAGGCCAA					
<b>KRAS Codon 61</b>						
5-Primer	CAGACTGTGTTCTCCCTTCTCA	65	50	30" 95°C	Fermentas Taq	140
3-Primer	Biofin~CTCATGTACTGGTCCCTCATTG			30" Tm		
Sequenzierprimer	ATATTCTCGACACAGCAG			30" 72°C		
analysierte Sequenz	GTC/AAT/GAC/TGAGGAGTACAGTG					
<b>BRAF Exon 11</b>						
5-Primer	Biofin~CAGTGGGACAAAGAATGGATCTG	60	40	30" 94°C	Qiagen HotStar Taq	61
3-Primer	CCATGCCACTTCCCTTGTAGA			30" Tm		
Sequenzierprimer	ACTTCCCTTGTAGACTGT			30" 72°C		
analysierte Sequenz	TC/GCAAAATGATCCA					
<b>BRAF Exon 15</b>						
5-Primer	TGAAGACCTCACAGTAAATAGG	60	40	30" 94°C	Qiagen HotStar Taq	91
3-Primer	Biofin~TCCAGACAAGTTCMAACTGAT			30" Tm		
Sequenzierprimer	GTAAAAATAGGTGATTTTGG			30" 72°C		
analysierte Sequenz	TC/GTAGCTACAGT/AGAA					
<b>TM = Schmelztemperatur</b>						

#### **4.1.2. Bestimmung der Spezifität der Mutationsanalyse**

Zunächst wurde die Spezifität der PCR bestimmt. Dazu wurde die maximale Anzahl der Zyklen bestimmt, bei der WT DNA keine Mutation (falsch-positiv) ergab. Um sicherzustellen, dass die zur Bestimmung der Spezifität eingesetzten Gewebeproben keine Mutationen in den untersuchten Onkogenen enthielten, wurden Tonsillen von unter zehnjährigen Kindern verwendet. Um eventuelle Mutationen in einzelnen Gewebeproben von falsch-positiven Ergebnissen unterscheiden zu können, wurden von jedem Ansatz Multiplikate analysiert. Insgesamt wurden 40 Ansätze (acht Tonsillen, Pentaplikate) untersucht. Es zeigte sich, dass bis zu einer Anzahl von 50 (KRAS Codon 12/13 und 61) bzw. 40 (BRAF Exon 11 und 15) PCR-Zyklen das Testverfahren keine Mutationen in den wildtypischen Gewebeproben (Tab. 4.1) detektierte. Somit ist die Mutationsanalyse in diesem Bereich spezifisch.

#### **4.1.3. Bestimmung der Sensitivität der Mutationsanalyse**

Gewebeproben enthalten, gerade wenn es sich um Biopsien oder Proben eines neoadjuvant therapierten Tumors handelt, oft nur wenig Tumorgewebe. Daher wurde in einem weiteren Schritt mithilfe des 1cm<sup>2</sup>-Experiments die minimale Tumormenge bestimmt, aus der noch ausreichend DNA für die Mutationsanalyse extrahiert werden kann (Abb. 4.2). Für alle untersuchten Genloci reichte Gewebe aus einem Tumorareal von ca. 2<sup>-8</sup> cm<sup>2</sup> aus, um in der anschließenden PCR ausreichend große Mengen an PCR-Produkt für die Mutationsanalyse zu erhalten.



**Abbildung 4.2:** Bestimmung der minimalen Gewebemenge für die DNA-Extraktion mithilfe des 1cm<sup>2</sup>-Tests.

Tumorgewebe enthält neben den Tumorzellen Stroma, das sich aus einer azellulären Komponente, der ECM (extrazelluläre Matrix) und Zellen, wie Entzündungszellen, mesenchymalen Zellen oder Endothelzellen zusammensetzt. Um den geringstmöglichen Anteil an Tumorzellen für die Detektion einer Mutation zu bestimmen wurden Verdünnungsreihen mit bekannten Mengen an WT DNA und DNA aus Zelllinien mit bekannter *KRAS*- oder *BRAF*-Mutation hergestellt. Abb. 3.2 zeigt das Ergebnis der Sensitivitätstestung exemplarisch für die Mutation *KRAS* c.34G>A. Alle sieben untersuchten Mutationen von *KRAS* Codon 12/13 und die Mutation *BRAF* c.1799T>A wurden vom verwendeten Testverfahren bis zu einem Verhältnis von mutierter zu WT DNA von 1:10 zuverlässig erkannt.

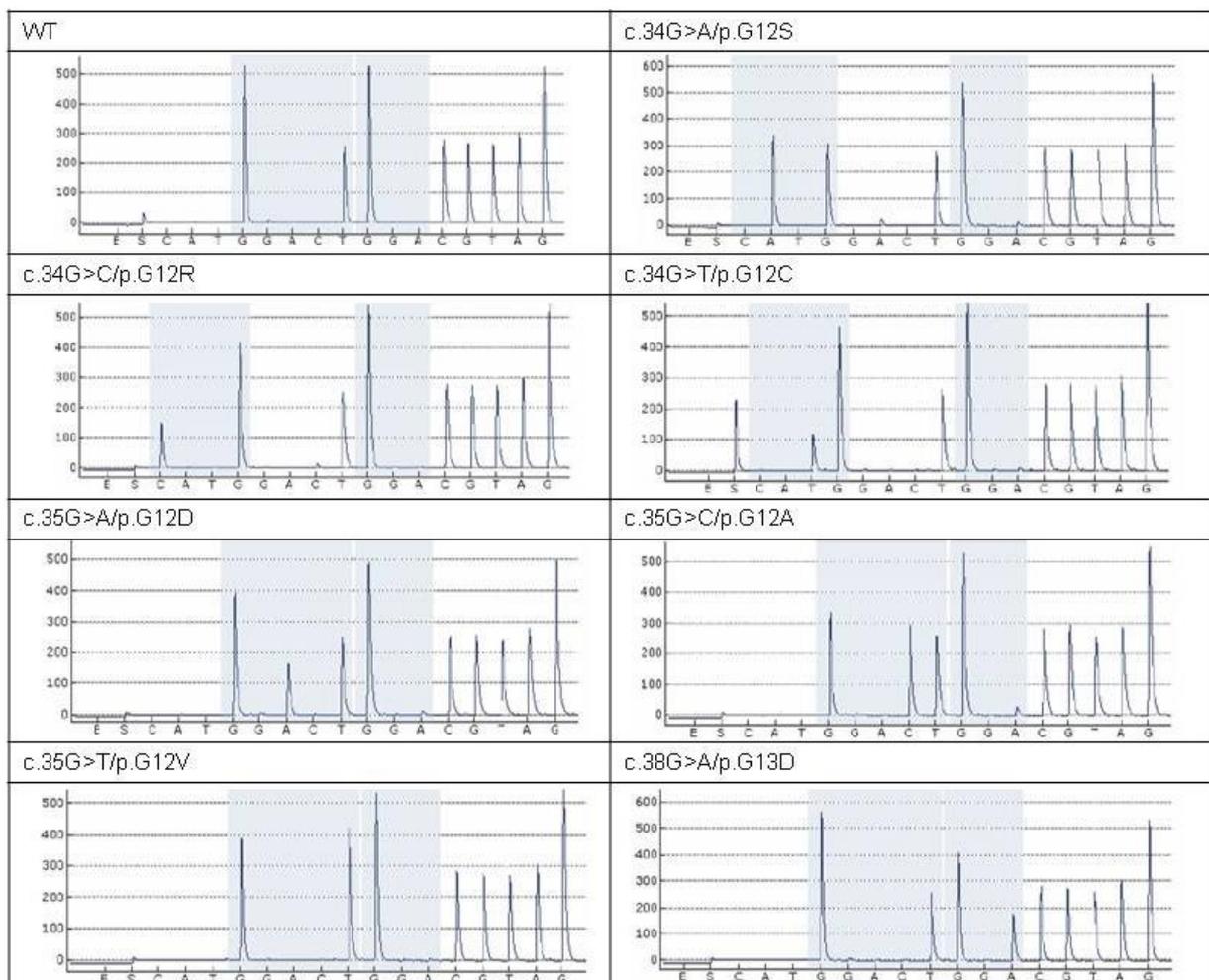
Um diesen Anteil an Tumorzellen bei der Probengewinnung zu erreichen, wurde Tumorgewebe mittels Makrodissektion unter Sichtkontrolle entnommen. Um die Einhaltung der Mindestmenge zu überprüfen, wurden die Gewebeschnitte im Anschluss an die Makrodissektion mit H&E gefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Es zeigte sich, dass ein Tumorareal von mindestens  $2^{-8}$  cm<sup>2</sup> und ein Tumoranteil von mindestens 10% in allen Fällen entnommen worden war. Somit waren die durch Makrodissektion gewonnenen Gewebeproben ausreichend, um die nötige DNA-Menge für die Mutationsanalyse zu erzielen.

#### **4.1.4. Bestimmung der Testgenauigkeit (*accuracy*)**

In CRC treten verschiedene Typen der *KRAS* Codon 12/13 Mutation mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Eine Studie von De Roock et al. belegt, dass Patienten mit *KRAS* Codon 13 Mutationen im Gegensatz zu Patienten mit *KRAS* Codon 12 und 61 Mutationen auf eine Therapie mit anti-EGFR-mAbs ansprechen.[31, 115] Daher hat die Unterscheidung verschiedener *KRAS*-Mutationstypen eine potenzielle Bedeutung für die Therapieentscheidung bei

Patienten mit mCRC. Um die Fähigkeit des Analyseverfahrens zu prüfen, die sieben häufigsten Mutationen von *KRAS* Codon 12/13 zu unterscheiden (engl. *accuracy*, Genauigkeit, Treffsicherheit), wurde DNA von sieben Zelllinien mit bekannter *KRAS*-Mutation analysiert.

Diese sieben häufigsten *KRAS* Codon 12/13 Mutationen c.34G>A/p.G12S, c.34G>C/p.G12R, c.34G>T/p.G12C, c.35G>A/p.G12D, c.35G>C/p.G12A, c.35G>T/p.G12V und c.38G>A/p.G13D wurden eindeutig nachgewiesen (Abb. 4.3). Folglich ist das verwendete Analyseverfahren dazu geeignet, die häufigsten im CRC vorkommenden *KRAS*-Mutationen unterscheiden zu können.



**Abbildung 4.3:** Pyrogramme von *KRAS* WT sowie der sieben häufigsten Mutationen des *KRAS*-Gens.

#### **4.1.5. Fortlaufende Überprüfung der DNA- Quantität und –Qualität**

Um die Funktionalität der jeweiligen PCR zu testen und Falsch-Positivität durch Kontamination auszuschließen, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Im Gel trat in allen Fällen eine einzelne, kräftige Bande in der erwarteten Höhe auf, die Negativkontrolle war stets negativ. Zusätzlich zeigten sich in der Pyrosequenzierung für die Positivkontrolle WT Sequenzen und für die Negativkontrolle keine Sequenzergebnisse. Dadurch konnten Verunreinigungen während des Analyseprozesses ausgeschlossen werden.

#### **4.2. Charakteristika des Patientenkollektivs**

Die Übereinstimmung des Mutationsstatus von Primärtumor und Metastase des mCRC sollte in einem ausreichend großen, für die Gesamtheit der Patienten repräsentativen Kollektiv untersucht werden. Dafür stand ein Kollektiv von 63 Patienten mit mCRC, von denen Gewebeproben sowohl des Primärtumors als auch der korrespondierenden Metastase verfügbar waren, zur Verfügung. Da es sich aus statistischer Sicht bei dem Vergleich zwischen Primärtumor und korrespondierender Metastase um eine Quote handelt, wurde das Konfidenzintervall für eine Kollektivgröße von 63 Paaren bestimmt.[3] Dieses lag bei  $CI=[0,9921;1,000]$ . Somit ist die Unsicherheit bei der Übertragung der Ergebnisse von dem Kollektiv mit 63 Fällen auf die Grundgesamtheit der Patienten kleiner als 1%. Daher kann von einer sehr sicheren Übertragbarkeit bei dem vorliegenden Kollektiv ausgegangen werden.

Das Patientenkollektiv glich in Alter, Geschlecht, lokalem Tumorstadium, Grading und Lokalisation von Primärtumor und Metastase in etwa der Gesamtheit der Patienten mit mCRC (s. Tab. 3.4),[56] sodass die Ergebnisse als repräsentativ gewertet werden können. Damit ist eine Übertragung der Ergebnisse der Arbeit auf die Gesamtheit der Patienten mit mCRC legitim.

### 4.3. Häufigkeitsverteilung von *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen und Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

#### 4.3.1. *KRAS*-Mutationen

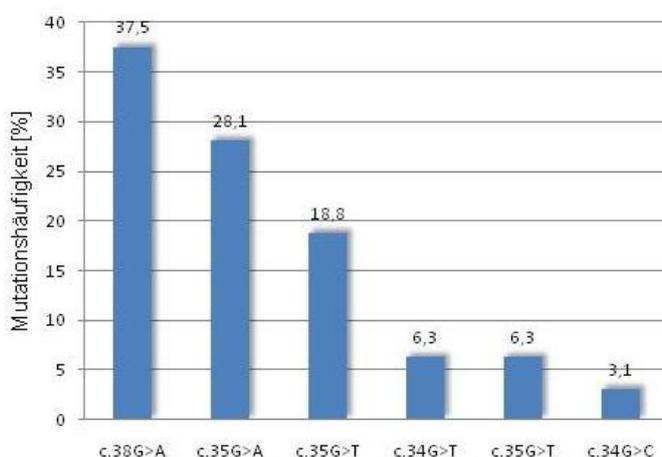
Um die Häufigkeit von *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen im untersuchten Patientenkollektiv zu bestimmen und mit der vorbeschriebenen Häufigkeitsverteilung zu vergleichen, wurden *KRAS* Codon 12/13 und *BRAF* Exon 15 Mutationen zunächst in den Primärtumoren analysiert.

*KRAS* Codon 12/13 Mutationen fanden sich in 32 von 63 Fällen (50,8%). Diese Mutationshäufigkeit stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von 40-45 in etwa überein.[42, 86, 123] Es traten sechs verschiedene Missense- oder

**Tab. 4.2: Häufigkeitsverteilung der *KRAS*-Mutationstypen**

CDS-Mutation	AA-Mutation	mut (%)
c.38G>A	p.G13D	12 (37,5)
c.35G>A	p.G12D	9 (28,1)
c.35G>T	p.G12V	6 (18)
c.34G>T	p.G12C	2 (6,3)
c.35G>C	p.G12V	2 (6,3)
c.34G>C	p.G12R	1 (3,1)

Austauschmutationen auf. Die häufigsten Mutationstypen waren die Glyzin zu Aspartat Austauschmutation in Codon 13 (c.38G>A, p.G13D, 37,5% aller Mutationen, elf von 32 Fällen), die Glyzin zu Aspartat Austauschmutation in Codon 12 (c.35G>A, p.G12D, 28,1% aller Mutationen, neun von 32 Fällen) und Glyzin zu Valin Austauschmutation in Codon 12 (c.35G>T, p.G12V, 18,8% aller Mutationen, sechs von 32 Fällen). Andere Mutationstypen wurden nur in einzelnen Fällen



**Abbildung 4.4:** Häufigkeitsverteilung der *KRAS*-Mutationstypen.

nachgewiesen (Tab. 4.2, Abb 4.4). In einem Fall traten zwei *KRAS* Codon 12/13 Mutationen zugleich auf (c.34G>T und c.35G>C). Alle sechs Mutationstypen sind in

der Literatur als onkogen beschrieben.[83, 113] Die COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)-Datenbank des Sanger-Instituts, Cambridge führt alle sechs Mutationstypen im Rahmen des CRC auf. Die Häufigkeitsverteilung der Mutationstypen in unserem Kollektiv entspricht in etwa der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit.[86] Diese Übereinstimmung der Häufigkeit von *KRAS*-Mutationen im untersuchten Patientenkollektiv unterstreicht die Repräsentativität des Studienkollektivs.

Fälle mit *KRAS*-Mutation bzw. WT unterschieden sich nicht hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter wie Alter, Geschlecht, Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Tumor-Grading, Lokalisation des Primärtumors oder der Metastase. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Forschungsergebnissen überein, wonach mutiertes *KRAS* kein unabhängiger prognostischer Marker bei CRC ist.[126]

Mutationen in Codon 61 des *KRAS* Gens wurden im untersuchten Kollektiv nicht beobachtet. Mit einer Häufigkeit von 2,1% sind sie im CRC relativ selten.<sup>[42, 123]</sup> Für ihren Nachweis wäre daher ein größeres Patientenkollektiv nötig.

#### **4.3.2. *BRAF*-Mutationen**

Mutationen in Exon 15 des *BRAF*-Gens traten in 7,9% der untersuchten Fälle auf (fünf von 63 Fällen). Diese Verteilung liegt im Rahmen der vorbeschriebenen Häufigkeit von 2-13%.[42, 123] Bei allen fünf Mutationen handelte es sich um Valin zu Glutamat Austauschmutationen des Codon 600 (c.1799T>A, p.V600E). Entsprechend den Ergebnissen früherer Studien schlossen sich *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen in unserer Studie gegenseitig aus.<sup>[99]</sup> Die mit <1% im CRC insgesamt seltene Mutation von *BRAF* Exon 11 trat im untersuchten Kollektiv nicht auf.<sup>[42, 123]</sup>

Die Übereinstimmung der Häufigkeit von *BRAF*-Mutationen in früheren Publikationen und im untersuchten Patientenkollektiv ist ein weiterer Beleg für dessen

Repräsentativität. Sie belegt, dass die Ergebnisse der Mutationsanalyse von diesem Kollektiv auf die Gesamtheit der Patienten übertragen werden können.

Im untersuchten Kollektiv waren *BRAF*-Mutationen mit höherem Tumorgrading (G3, G4) assoziiert ( $p = 0.026$ ). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Studien, die einen Zusammenhang zwischen *BRAF*-Mutationen und schlechter Prognose zeigen, die mit hohem Tumorgrading assoziiert ist.<sup>[105]</sup>

#### 4.4. Korrelation von *KRAS*- und *BRAF*- Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase

Das eigentliche Ziel der vorliegenden Studie war die Bestimmung der Übereinstimmungsraten von *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen in Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC. Dazu wurden Mutationsanalysen in Gewebe von Primärtumor und Metastase durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

**Tab 4.3: Konkordanz zwischen Primärtumor und korrespondierender Metastase**

Mutation	Primärtumor (%)	Metastase (%)	Konkordanz (%)	$\kappa$	CI
<i>KRAS</i> Codon 12/13	32 (50,8)	32 (50,8)	100,0	1,0	[0.8911;1]
<i>KRAS</i> Codon 61	0 (0)	0 (0)	-	-	-
<i>BRAF</i> Exon 11	0 (0)	0 (0)	-	-	-
<i>BRAF</i> Exon 15	5 (7,9)	5 (7,9)	100,0	1,0	[0.4782;1]

Der Mutationsstatus von *KRAS* Codon 12/13 und 61 und *BRAF* Exon 11 und 15 stimmte in allen 63 untersuchten Fällen in Primärtumor und Metastase überein (Konkordanz 100%,  $\kappa=1,0$ ) (Tab. 4.3). Aufgrund der kleinen Zahlen ist die Sicherheit der Mutationsdetektion gemessen als Konfidenzintervall nicht sehr hoch. In keinem Fall fand sich bei *KRAS*- oder *BRAF* WT im Primärtumor eine Mutation des entsprechenden Genlocus in der korrespondierenden Metastase. Bei *KRAS*-Mutationen war der Mutationstyp in Primärtumor und Metastase identisch. In einem

Fall mit zwei gleichzeitigen Mutationen von *KRAS* Codon 12 und 13 ließen sich beide Mutationen sowohl in Primärtumor als auch Metastase nachweisen. In drei Fällen mit jeweils zwei Metastasen waren in einem Fall der Primärtumor und beide Metastasen *KRAS* und *BRAF* wildtypisch. In zwei Fällen wiesen Primärtumor und beide Metastasen identische *KRAS*-Mutationen auf (c.35G>A bzw. c.38G>A).

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie, dass für *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen eine vollkommene Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastase besteht und diese gefunden werden kann, wenn die Analysebedingungen kontrolliert werden. Somit ist lediglich eine einmalige Mutationsanalyse anhand von Gewebe entweder des Primärtumors oder der Metastase ausreichend, um den Mutationsstatus des Tumors vollständig zu erfassen, wenn die Analysebedingungen kontrolliert werden. Auf diese Weise sind keine zusätzlichen Biopsien nötig. Darüber hinaus entfallen die Kosten für Doppelanalysen. Zugleich demonstriert die Studie, dass Diskordanz von *KRAS*-Mutationen zwischen Primärtumor und Metastase des CRC als mögliche Ursache für die Resistenz gegen anti-EGFR-mAb-Therapie bei ca. 40% der Patienten mit *KRAS* WT nicht in Frage kommt.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Vollständige Übereinstimmung des Mutationsstatus in Primärtumor und Metastase durch Anwendung einer Analyseregeln**

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Hypothese, dass eine vollständige Konkordanz des Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC erreicht wird, wenn Mängel bei der technischen Durchführung der Mutationsanalyse durch die Festlegung und Einhaltung einer Analyseregeln vermieden werden. Dazu muss lediglich experimentell eine Regeln erarbeitet werden, nach der die Untersuchung auf Mutationen durchgeführt wird. Hierfür müssen Sensitivität, Spezifität und Testgenauigkeit der Mutationsanalyse optimiert werden. Durch Anwendung dieser Analyseregeln bei der Mutationsanalyse eines Kollektivs von Patienten mit korrespondieren Primärtumoren und Metastasen konnte die Hypothese verifiziert werden. Denn hier stimmten die Ergebnisse der Mutationsanalyse von Primärtumor und korrespondierender Metastase in 100% der Fälle überein.

Ziel der Analyseregeln ist es, die technische Durchführung der Mutationsanalyse kontrollierbar werden zu lassen.[122] Dazu wurden erstens in einer Reihe von Optimierungsexperimenten individuelle Grenzwerte für die Anzahl der PCR-Zyklen, die eingesetzte Gewebemenge und den Tumoranteil am Gesamtgewebe definiert. Zweitens wurden Maßnahmen festgelegt, um diese Grenzwerte bei der Mutationsanalyse zu erreichen. Drittens wurden Kontrolluntersuchungen festgeschrieben, um die Einhaltung der Grenzwerte während der Mutationsanalyse zu überprüfen. Konkret umfasste dieses Vorgehen folgende Einzelmaßnahmen:

1. Die Spezifität der Mutationsanalyse oder die Vermeidung falsch positiver Ergebnisse (Mutation bei bestehendem WT), hängt von der Anzahl der PCR-Zyklen ab. Sie nimmt mit zunehmender Zykluszahl ab, während Effizienz und

Sensitivität der Mutationsanalyse steigen. Um eine Spezifität von 100% bei optimaler Effizienz und Sensitivität sicherzustellen, wurde das Analyseverfahren anhand einer Serie von wildtypischen Gewebeproben getestet und die maximale Anzahl an PCR-Zyklen ermittelt, bis zu der alle Proben richtig als WT erkannt wurden.

2. Die Sensitivität eines Analyseverfahrens bestimmt die Mindestmenge an mutierter DNA, die eingesetzt werden muss, um die Mutation sicher nachzuweisen, also die Vermeidung falsch negativer Fälle (WT bei bestehender Mutation).[37] Die Sensitivität sinkt bei geringen Gewebemengen oder Anteil an Tumorzellen. Oft ist die Gewebemenge der Proben, aus der DNA isoliert wird, gering, insbesondere bei Tumoren nach neoadjuvanter Radio- oder Chemotherapie (ausgedehnte Nekrose- und Fibroseareale) oder bei Biopsien.[21] Des Weiteren ist der Anteil der Tumorzellen an der Gesamtzellzahl der Probe variabel, da Tumorgewebe neben den Tumorzellen selbst auch normale Zellen, wie Entzündungszellen, mesenchymalen Zellen, Endothelzellen und andere mehr enthält.[43] Weiterhin ist das Tumorgewebe nicht homogen aufgebaut, sondern setzt sich aus unterschiedlichen Subpopulationen mit individuellen Mutationsprofilen zusammen.[82] Untersuchungen zeigen, dass *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen in bis zu 20% aller CRC heterogen verteilt sind und nur ein Teil der Tumorzellen die jeweilige Mutation aufweisen.[4, 12, 13, 43, 47, 50, 58, 65, 66, 75, 80, 100] Daher wurde, um ausreichende Mengen mutierter DNA für die Mutationsanalyse sicherzustellen, zum einen mit Hilfe des *1cm<sup>2</sup>-Tests* die minimale Gewebemenge bestimmt, bei der eine DNA-Extraktion gerade noch genügend DNA für die PCR liefert.[122] Zum anderen wurde anhand von

Verdünnungsreihen die untere Nachweisgrenze für Mutationen durch Einsatz eines Gemischs aus mutierter und WT-DNA ermittelt.[122] Anhand dieser Ergebnisse konnten Grenzwerte für die minimale Gewebemenge und den minimalen prozentualen Tumoranteil am Gesamtgewebe definiert werden.[122] Um den Tumoranteil bei der Probengewinnung zu erhöhen und die Verunreinigungen der Probe durch Normalgewebe zu minimieren, wurde Tumorgewebe mittels Makrodissektion unter mikroskopischer Kontrolle entnommen.[21, 45] Um die Einhaltung der Analyseregeln zu prüfen, wurden die histologische Schnitte, von denen Gewebe ausgekratzt worden war, HE gefärbt und anschließend mit den H&E gefärbten Serienschnitten, die zu Anfang als Blaupause für die Bestimmung relevanter Tumorareale dienten, lichtmikroskopisch verglichen.[122]

3. Der Begriff *accuracy* (Testgenauigkeit) beschreibt die Fähigkeit der Mutationsanalyse unterschiedliche Mutationstypen sicher voneinander zu unterscheiden. Sie ist klinisch relevant, da die verschiedenen KRAS-Mutationstypen sich in ihrer prädiktiven Bedeutung für die anti-EGFR-mAb Therapie unterscheiden können.[31, 115] Um eine Testgenauigkeit von 100% zu erreichen, wurde das Analyseverfahren anhand von DNA mit bekannten Mutationen getestet.[122]

Alle oben genannten Maßnahmen gingen in die Definition der individuellen Analyseregeln ein. Auf diese Weise wurden maximale Sensitivität, Spezifität und Testgenauigkeit bei der Mutationsanalyse erreicht. Unter diesen Bedingungen, also Einhaltung der Analyseregeln zeigt sich, dass der Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase bei mCRC in 100% der Fälle übereinstimmen.

## 5.2. Technisch mangelhafte Durchführung der Mutationsanalyse als Ursache für Abweichung des Mutationsstatus in früheren Studien

Die 100%-ige Konkordanz des Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC ist die essentielle Voraussetzung, dass eine Entscheidung für oder gegen eine zielgerichtete anti-EGFR-mAb Therapie bei Patienten mit mCRC sicher anhand der Mutationsanalyse des Primärtumors getroffen werden kann.[7] Sie ist daher von entscheidender Bedeutung für die korrekte Therapie und wurde von einer Reihe früherer Arbeiten untersucht, die jedoch widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse von sieben früheren Publikationen, die ebenfalls eine vollständige Übereinstimmung des *KRAS*-Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC ergaben (Tab. 5.1).[40, 43, 49, 74, 112, 127, 129] Vier Arbeiten wiesen eine vollständige Übereinstimmung des *BRAF*-Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC nach (Tab. 5.2).[13, 80, 84, 117] Im Gegensatz dazu traten in 16 früheren Arbeiten in bis zu 23% der Fälle Abweichungen des *KRAS*- bzw. *BRAF*-Mutationsstatus von Primärtumor und Metastase auf (Tab. 5.1 und 5.2).[4, 5, 11, 13, 26, 48, 59, 65, 77, 80, 84, 91, 92, 94, 106, 117] Hinzu kommt, dass die Wahrscheinlichkeit eine Konkordanz von 100% bei 63 untersuchten Fällen zufällig zu erreichen, bei unter 1% ( $CI=[0,9921;1,000]$ ) liegt. Da die klinisch-pathologischen Eigenschaften des untersuchten Kollektivs repräsentativ für die Gesamtheit der Patienten mit mCRC sind, hat das hier erzielte Ergebnis allgemeine Gültigkeit. Überträgt man diesen Gedanken auch auf die anderen Arbeiten mit einer Konkordanz von 100%, so wird das zufällige Auftreten dieser Konkordanz noch unwahrscheinlicher. Umgekehrt ist es eher wahrscheinlich, dass in den Arbeiten ohne vollständige Konkordanz Fehler unterlaufen sind, zudem sich die Diskordanzraten in den einzelnen Arbeiten

**Tab. 5.1: Studien über die Konkordanz des *KRAS*-Status in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC**

Author	Jahr	Analysiertes Gen	n	Lokalisation der Metastase	<i>KRAS</i> -Mutation im PT (%)	Konkordanz (%)	Validierung
Albanese et al.	2004	<i>KRAS</i> Codon 12/13	30	Leber	14/30 (47%)	23/30 (77%)	k.A.
Al-Mulla et al.	1998	<i>KRAS</i> Codon 12/13	26	Leber	10/26 (38%)	21/26 (80%)	k.A.
Artale et al.	2008	<i>KRAS</i> Codon 12/13	48	diverse (v.a. Leber)	11/48 (23%)	45/48 (94%)	k.A.
Baldus et al.	2010	<i>KRAS</i> Codon 12/13	20	diverse	9/20 (45%)	18/20 (90%)	ja
Cejas et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	110	Leber, Lunge	37/110 (34%)	103/110 (94%)	k.A.
Etienne-Grimaldi et al.	2008	<i>KRAS</i> Codon 12/13	48	Leber (Biopsie)	16/48 (33%)	16/16 (100%)	k.A.
Finkelstein et al.	1993	<i>KRAS</i> Codon 12/13	7	diverse (v.a. Leber)	k.A.	k.A. (100%)	ja
Garm Spindler et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	31	k.A.	11/31 (35%)	29/31 (94%)	ja
Gattenlöhner et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	106	k.A.	k.A.	k.A. (100%)	k.A.
Italiano et al.	2010	<i>KRAS</i> Codon 12/13	59	k.A.	23/59 (39%)	56/59 (95%)	k.A.
Knijn et al.	2011	<i>KRAS</i> Codon 12/13	305	Leber	108/305 (22%)	299/305 (98%)	k.A.
Losi et al.	1992	<i>KRAS</i> Codon 12/13	16	diverse (v.a. Leber)	13/16 (81%)	16/16 (100%)	k.A.
Loupakis et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	43	Leber	k.A.	41/43 (95%)	k.A.
Mariani et al.	2010	<i>KRAS</i> Codon 12/13	38	diverse (v.a. Leber)	20/38 (53%)	37/38 (97%)	k.A.
Molinari et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	37	diverse (v.a. Leber)	16/37 (43%)	34/37 (92%)	k.A.
Oudejans et al.	1991	<i>KRAS</i> Codon 12/13, 61	31	Leber, Lunge	13/31 (42%)	29/31 (94%)	k.A.
Park et al.	2011	<i>KRAS</i> Codon 12/13	22	k.A.	5/22 (23%)	18/22 (82%)	k.A.
Perrone et al.	2009	<i>KRAS</i> Codon 12/13	10	diverse (v.a. Leber)	3/10 (30%)	8/10 (80%)	k.A.
Santini et al.	2008	<i>KRAS</i> Codon 12/13	99	diverse (v.a. Leber)	38/99 (38%)	95/99 (96%)	k.A.
Suchy et al.	1992	<i>KRAS</i> Codon 12	23	k.A.	15/23 (65%)	23/23 (100%)	k.A.
Vakiani et al.	2012	<i>KRAS</i> Codon 12, 13, 22, 61, 117, 146	84	diverse (v.a. Leber)	43/84 (51%)	83/84 (99%)	k.A.
Weber et al.	2006	<i>KRAS</i> Codon 12/13	36	Leber	14/36 (39%)	36/36 (100%)	k.A.
Zauber et al.	2003	<i>KRAS</i> Codon 12/13	42	diverse (v.a. LK)	22/42 (52%)	42/42 (100%)	k.A.

k.A. = keine Angaben, LK = Lymphknoten, M = Metastase, PT = Primärtumor, WT = Wild-Typ

**Tab 5.2: Studien über die Konkordanz des *BRAF*-Status in Primärtumor und korrespondierender Metastase des CRC**

Author	Jahr	Analysiertes Gen	n	Lokalisation der Metastase	<i>BRAF</i> -Mutation im PT (%)	Konkordanz (%)	Validierung
Artale et al.	2008	<i>BRAF</i> Exon 15	48	diverse (v.a. Leber)	2/48 (4%)	47/48 (98%)	k.A.
Baldus et al.	2010	<i>BRAF</i> Exon 15	20	diverse	1/20 (5%)	20/20 (100%)	ja
Italiano et al.	2010	<i>BRAF</i> Exon 15	48	k.A.	1/48 (2%)	47/48 (98%)	k.A.
Mariani et al.	2010	<i>BRAF</i> Exon 15	38	diverse (v.a. Leber)	0/38 (0%)	38/38 (100%)	k.A.
Molinari et al.	2009	<i>BRAF</i> Exon 15	36	diverse (v.a. Leber)	2/36 (6%)	36/36 (100%)	k.A.
Park et al.	2011	<i>BRAF</i> Exon 15	22	k.A.	5/22 (23%)	20/22 (90%)	k.A.
Perrone et al.	2009	<i>BRAF</i> Exon 11, 15	11	diverse (v.a. Leber)	2/11 (18%)	9/11 (82%)	k.A.
Vakiani et al.	2012	<i>BRAF</i> Exon 15	84	diverse (v.a. Leber)	4/84 (4%)	4/4 (100%)	k.A.

k.A. = keine Angaben, M = Metastase, PT = Primärtumor, WT = Wild-Typ

voneinander unterscheiden. Zusammengefasst kann die vollständige Übereinstimmung des Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC nach aktuellem Kenntnisstand als gesichert gelten. Somit

muss der Mangel an Übereinstimmung in den 15 oben genannten Publikationen andere, technische Ursachen haben, was genau die Hypothese der vorliegenden Arbeit war.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konkordanz von 100% der Ergebnisse der Mutationsanalyse von Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen erzielt, indem für die Mutationsanalyse eine Analyseregul erarbeitet wurde. In Analogie dazu etablierten Finkelstein *et al.* bereits 1993 eine Regel zur Durchführung der *KRAS*-Mutationsanalyse und erzielten auf diese Weise eine vollständige Übereinstimmung des Mutationsstatus von Primärtumor und korrespondierender Metastase des mCRC.[43] Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit bestimmten Finkelstein *et al.* die untere Nachweisgrenze (Sensitivität) des Analyseverfahrens anhand von Gemischen aus mutierter und wildtypischer DNA, steigerten die Probenreinheit durch mikroskopisch gesteuerte Probenentnahme und kontrollierten die Genauigkeit der Probenentnahme durch den Vergleich von H&E-gefärbten Schnitten desselben Gewebblocks vor und nach der Probeentnahme.[43] Eine Analyseregul für die optimale technische Durchführung der Mutationsanalyse scheint somit die Voraussetzung zu sein, um bei der Mutationsanalyse identische Ergebnisse für Primärtumor und korrespondierende Metastase des mCRC zu erhalten. Umgekehrt scheinen die Arbeiten, die keine vollständige Konkordanz aufweisen, technisch mangelhaft durchgeführt worden zu sein.

Die meisten bisherigen Publikationen zu diesem Themenkomplex erwähnten keine Maßnahmen, um Sensitivität, Spezifität und Testgenauigkeit der Mutationsanalyse zu optimieren. In diesen Fällen muss also davon ausgegangen werden, dass mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung der Mutationsanalyse, wie niedrige Spezifität, zu

geringe Gewebemenge, zu geringer Tumoranteil oder Tumorheterogenität nicht berücksichtigt wurden.

Ein Teil der früheren Arbeiten stellte zwar Analyseregeln auf, die jedoch z. T. willkürlich gewählt oder nicht ausreichend waren. So wurde in einigen Arbeiten der Tumoranteil der Gewebeproben anhand histologischer Schnitte evaluiert und ausschließlich Proben mit einem bestimmten Mindestanteil an Tumorgewebe verwendet, um ausreichende Tumormengen für die Mutationsanalyse sicherzustellen.[4, 5, 13, 26, 59, 65, 80, 84, 91, 94, 129] Allerdings bestimmten nur drei dieser Arbeiten den erforderlichen minimalen Tumoranteil ihres Testverfahrens experimentell.[13, 43, 48] In allen übrigen Arbeiten wurde der Grenzwert für den Tumoranteil willkürlich zwischen 20% und 95% festgelegt (Tab. 5.1 und 5.2). Darüber hinaus zeigt eine aktuelle Arbeit, dass die Abschätzung der Tumormenge durch den Pathologen stark variiert und daher kein zuverlässiger Parameter für den Tumorgehalt der Gewebeprobe ist.[15] Die Makrodissektion zur Erhöhung der Probenreinheit kam ebenfalls nur in einem Teil der Arbeiten zum Einsatz (Tab. 5.1 und 5.2). [43, 65, 74, 94, 112, 117, 129]

In den früheren Arbeiten, die keine Analyseregeln anwandten, könnte der Mutationsstatus von Primärtumor oder korrespondierende Metastase falsch negativ oder positiv bestimmt worden sein. Dadurch könnte im Vergleich der Eindruck von Abweichungen entstanden sein. Die technisch mangelhafte Durchführung ist somit eine mögliche Erklärung für Konkordanzraten von weniger als 100% in früheren Arbeiten.

### 5.3. Qualitätssicherung in der KRAS-Diagnostik durch Standards zur Analyseregulierung

Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Mutationsanalyse beschränken sich bisher im Wesentlichen auf die Durchführung von Ringversuchen. Dazu wurde in Deutschland von der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) und dem Bundesverband Deutscher Pathologien (BDP) im Rahmen von QulP (Qualitätsinitiative Pathologie) ein Ringversuch entwickelt, indem von 10 Fällen mCRC jeweils drei Gewebeschnitte für einen Mutationstest angeboten werden. In der Analyse müssen alle Fälle richtig bewertet werden, um die Qualitätssicherung zu bestehen. Dieses System wurde durch das *European Quality Assurance Program* EQA der ESP übernommen. An diesen und anderen ähnlichen Qualitätssicherungsmaßnahmen nehmen in jährlichen Abständen Diagnostiklabors aus Deutschland und anderen europäischen Ländern teil.[15] Bestimmt man für dieses Verfahren erneut die Sicherheit, die sich aus einer Quote von null Fehlern bei zehn Fällen im besten Fall ergeben kann, so erreicht man ein 95%-Konfidenzintervall von lediglich  $CI=[0,69;1,00]$ , d.h. eine Übereinstimmung in allen zehn Fällen zwischen Test- und Referenzlabor schließt eine Fehlerrate des Testlabors von bis zu 31% nicht aus.[3] Um eine für die Routinediagnostik vertretbare Testgenauigkeit zu garantieren, wäre daher eine wesentlich größere Probenanzahl nötig, die sich aus logistischen Gründen jedoch nicht umsetzen lässt. Daher ist es ratsam aus der Gesamtheit der analysierten Fälle die gesamte Mutationsrate und die Frequenz der einzelnen Mutationen zu bestimmen, um diese mit Vorgaben aus großen Analysegruppen zu vergleichen.[14, 57, 86] Ergeben sich hier signifikante Abweichungen, so scheinen Fehler im gesamten Analyseverfahren vorzuliegen.

Nachdem die vorliegende Studie zeigt, dass sich eine hohe Testgenauigkeit erzielen lässt, wenn vor der Durchführung der Messungen Maßnahmen zur Optimierung und

Validierung des Analyseverfahrens ergriffen werden, könnte eine Maßnahme der Qualitätssicherung darin bestehen, einen allgemeinen Maßnahmenkatalog zur Optimierung und Validierung des Analyseverfahrens zu vorgeben und diesen abzufragen. Solche Maßnahmenkataloge existieren zum Teil bereits, z.B. in Form der Empfehlungen der ESP.[122] Auf deren Grundlage sollten Labors individuelle Analyseregeln festlegen, die den konkreten Laborbedingungen Rechnung tragen.

Bisher fehlt in den vorhandenen Zertifizierungsverfahren für die *KRAS*-Mutationsdiagnostik die Aufnahme des Nachweises individueller Analyseregeln, wie sie in anderen Bereichen der Medizin bereits seit Jahren praktiziert wird[34] und wie sie für die Zertifizierung und Akkreditierung von Behandlungszentren durch medizinische Fachgesellschaften üblich sind. Auf diese Weise ließe sich die Qualität der Molekularen Diagnostik, die in der Patientenversorgung zunehmend an Bedeutung gewinnt, in Zukunft noch weiter verbessern und sichern.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2010) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes., Berlin
2. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) RK-IHudGdeKiDeV (ed) (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008, Berlin
3. AG. C-G (1977) Wissenschaftliche Tabellen Geigy: Teilband Körperflüssigkeiten : Einheiten im Messwesen, Körperflüssigkeiten, Organe, Energiehaushalt, Ernährung
4. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD (1998) Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 185:130-138
5. Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, Colomba P, Tagliavia M, La Farina M (2004) Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 325:784-791
6. Albitar M, Yeh C, Ma W (2009) K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:834; author reply 835-836
7. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL (2009) American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27:2091-2096
8. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626-1634
9. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Truongos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton

D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urošević N (2001) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85:692-696

10. Arnold D, Hohler T, Dittrich C, Lordick F, Seufferlein T, Riemann J, Woll E, Herrmann T, Zobel A, Schmoll HJ (2008) Cetuximab in combination with weekly 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin (FUFOX) in untreated patients with advanced colorectal cancer: a phase Ib/II study of the AIO GI Group. *Ann Oncol* 19:1442-1449

11. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S (2008) Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:4217-4219

12. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J (2001) Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 93:346-352

13. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE (2010) Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 16:790-799

14. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR, Wooster R (2004) The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 91:355-358

15. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K, Edsjo A, Gorgoulis V, Hofler G, Jung A, Kotsinas A, Laurent-Puig P, Lopez-Rios F, Hansen TP, Rouleau E, Vandenberghe P, van Krieken JJ, Dequeker E (2011) External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a European program and report of the first joined regional quality assessment rounds. *Oncologist* 16:467-478

16. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 67:2643-2648

17. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410

18. Berlin J, Posey J, Tchekmedyian S, Hu E, Chan D, Malik I, Yang L, Amado RG, Hecht JR (2007) Panitumumab with irinotecan/leucovorin/5-fluorouracil for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6:427-432

19. Bernards R, Weinberg RA (2002) A progression puzzle. *Nature* 418:823

20. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frebourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissiere-Michot F (2009) Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 27:1122-1129
21. Boissiere-Michot F, Lopez-Crapez E, Frugier H, Berthe ML, Ho-Pun-Cheung A, Assenat E, Maudelonde T, Lamy PJ, Bibeau F (2012) KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. *Mod Pathol* 25:731-739
22. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:663-671
23. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, Celik I, Schlichting M, Koralewski P (2011) Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 22:1535-1546
24. Cairns J (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255:197-200
25. Calvert PM, Frucht H (2002) The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137:603-612
26. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C, Barriuso J, Moreno Garcia V, Larrauri J, Lopez R, Casado E, Gonzalez-Baron M, Feliu J (2009) KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 4:e8199
27. Ciardiello F, Tortora G (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358:1160-1174
28. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345
29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R,

Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954

30. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M, Tejpar S (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11:753-762

31. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcborg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S (2010) Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304:1812-1820

32. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S (2011) KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12:594-603

33. Der CJ, Finkel T, Cooper GM (1986) Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44:167-176

34. DGHO (ed) (2010) Grundsatzpapier „Onkologische Zentren“ Version 2.4 vom 31.3.2010

35. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 96:1166-1169

36. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A (2008) Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:5705-5712

37. Dijkstra JR, Heideman DA, Meijer GA, Boers JE, Hart NA, Diebold J, Hirschmann A, Hoefler G, Winter G, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Richman SD, Quirke P, Rouleau EL, Guinebretiere JM, Tejpar S, Biesmans B, van Krieken JH (2012) KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Arch*

38. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, Blasinska-

- Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J (2010) Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 28:4697-4705
39. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, 3rd, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, Covey A, Dilawari RA, Early DS, Enzinger PC, Fakih MG, Fleshman J, Jr., Fuchs C, Grem JL, Kiel K, Knol JA, Leong LA, Lin E, Mulcahy MF, Rao S, Ryan DP, Saltz L, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous C, Thomas J, Venook AP, Willett C (2009) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 7:778-831
40. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, Francois E, Formento P, Renee N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G (2008) K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 14:4830-4835
41. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767
42. Fearon ER (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6:479-507
43. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA (1993) Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 71:3827-3838
44. Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Kohne CH (2006) Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 17:450-456
45. Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA (2010) KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn* 12:43-50
46. Freeman DJ, Juan T, Reiner M, Hecht JR, Meropol NJ, Berlin J, Mitchell E, Sarosi I, Radinsky R, Amado RG (2008) Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer* 7:184-190
47. Fukunari H, Iwama T, Sugihara K, Miyaki M (2003) Intratumoral heterogeneity of genetic changes in primary colorectal carcinomas with metastasis. *Surg Today* 33:408-413

48. Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, Lindebjerg J, Andersen RF, Cruger D, Jakobsen A (2009) The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 20:879-884
49. Gattenlohner S, Germer C, Muller-Hermelink HK (2009) K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:835; author reply 835-836
50. Giaretti W, Monaco R, Pujic N, Rapallo A, Nigro S, Geido E (1996) Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 149:237-245
51. Gilbert JR, Vance JM (2001) Isolation of genomic DNA from mammalian cells. *Curr Protoc Hum Genet* Appendix 3:Appendix 3B
52. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ (2004) Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 22:1209-1214
53. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
54. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
55. Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, Venook A, Malik I, Tchekmedyian S, Navale L, Amado RG, Meropol NJ (2007) Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer* 110:980-988
56. Howlader N NA, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (Hrsg.) (ed) (2012) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). National Cancer Institute, Bethesda
57. Institute S (2013) Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer - COSMIC. Cambridge
58. Ishii M, Sugai T, Habano W, Nakamura S (2004) Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 39:544-549
59. Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, Fabas T, Benchimol D, Evrard S, Gugenheim J, Becouarn Y, Brunet R, Fonck M, Francois E, Saint-Paul MC, Pedeutour F (2010) KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 17:1429-1434
60. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG (2009) KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in

colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 27:1130-1136

61. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ (2007) Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357:2040-2048

62. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359:1757-1765

63. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA, 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ (2007) Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25:3230-3237

64. Klein CA (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9:302-312

65. Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Borger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID (2011) KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 104:1020-1026

66. Komaki K, Sano N, Tangoku A (2006) Problems in histological grading of malignancy and its clinical significance in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer* 13:249-253

67. Kramer MF, Coen DM (2001) Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 15:Unit 15 11

68. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouche O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F (2009) Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 27:5924-5930

69. Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H (2009) Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 15:1133-1139

70. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK (2006) Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic

colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 24:4914-4921

71. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:3992-3995

72. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-379

73. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, Papadimitriou CA, Murray S (2008) Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 9:962-972

74. Losi L, Benhattar J, Costa J (1992) Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 28A:1115-1120

75. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J (2005) Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 26:916-922

76. Loupakis F, Vasile E, Santini D, Masi G, Falcone A, Graziano F (2008) EGF-receptor targeting with monoclonal antibodies in colorectal carcinomas: rationale for a pharmacogenomic approach. *Pharmacogenomics* 9:55-69

77. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I, Cascinu S, Falcone A (2009) PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:2622-2629

78. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F (2009) KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101:715-721

79. Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459-465

80. Mariani P, Lae M, Degeorges A, Cacheux W, Lappartient E, Margogne A, Pierga JY, Girre V, Mignot L, Falcou MC, Salmon RJ, Delattre O, De Cremoux P (2010) Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis. *Anticancer Res* 30:4229-4235
81. Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML (2011) Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *J Natl Cancer Inst* 103:117-128
82. Marusyk A, Almendro V, Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12:323-334
83. McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD (1984) Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 310:644-649
84. Molinari F, Martin V, Saletti P, De Dosso S, Spitale A, Camponovo A, Bordoni A, Crippa S, Mazzucchelli L, Frattini M (2009) Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer* 100:1087-1094
85. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN (2009) The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133:1600-1606
86. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A (2009) Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 205:858-862
87. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS (2003) Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10:1-21
88. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F (2009) Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 6:519-527
89. Nyren P, Pettersson B, Uhlen M (1993) Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* 208:171-175
90. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS (2005) Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 7:413-421
91. Oudejans JJ, Slebos RJ, Zoetmulder FA, Mooi WJ, Rodenhuis S (1991) Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int J Cancer* 49:875-879

92. Park JH, Han SW, Oh DY, Im SA, Jeong SY, Park KJ, Kim TY, Bang YJ, Park JG (2011) Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 68:1045-1055
93. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J (2010) Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28:4706-4713
94. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S (2009) PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 20:84-90
95. Phelan MC (2006) Techniques for mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Mol Biol Appendix 3:Appendix 3F*
96. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R (2007) K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 203:489-497
97. Prevention CfDCa (2011) Vital Signs: Colorectal Cancer Screening, Incidence, and Mortality—United States, 2002-2010. *JAMA* 306:701-703
98. Prevention CfDCa (2013) Centers for Disease Control and Prevention.
99. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934
100. Richman SD, Chambers P, Seymour MT, Daly C, Grant S, Hemmings G, Quirke P (2011) Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst)* 34:61-66
101. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242:84-89
102. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363, 365
103. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-1208

104. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML (2000) Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1193-1197
105. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML (2005) Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 65:6063-6069
106. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A (2008) High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 13:1270-1275
107. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, Martini M, Cipani T, Marrapese G, Mazzucchelli L, Lamba S, Veronese S, Frattini M, Bardelli A, Siena S (2009) Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 4:e7287
108. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:5268-5272
109. Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:295-308
110. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, Kroning H, Lupp G, Kisker O, Zubel A, Langer C, Kopit J, Burris HA, 3rd (2008) EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:2311-2319
111. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, Silver J, Ogino S, Hooshmand S, Kwak E, Freed E, Meyerhardt JA, Saridaki Z, Georgoulas V, Finkelstein D, Fuchs CS, Kulke MH, Shivdasani RA (2009) Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101:465-472
112. Suchy B, Zietz C, Rabes HM (1992) K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 52:30-33
113. Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M (1984) The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311:273-275
114. Tabernero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, Andre T, Van Laethem JL, Soulie P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, Kisker O, de Gramont A (2007) Phase II trial of cetuximab in combination with

fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25:5225-5232

115. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E (2012) Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 30:3570-3577

116. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ (2009) BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 361:98-99

117. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, Cercek A, Kemeny N, D'Angelica M, Viale A, Heguy A, Paty P, Chan TA, Saltz LB, Weiser M, Solit DB (2012) Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol* 30:2956-2962

118. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG (2007) Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25:1658-1664

119. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:1408-1417

120. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F (2011) Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29:2011-2019

121. van Krieken H, Tol J (2009) Setting future standards for KRAS testing in colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 10:1-3

122. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flejou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A (2008) KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453:417-431

123. Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS (2011) Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 50:307-312

124. Vijayaraghavan A, Efrusy MB, Goke B, Kirchner T, Santas CC, Goldberg RM (2012) Cost-effectiveness of KRAS testing in metastatic colorectal cancer patients in the United States and Germany. *Int J Cancer* 131:438-445
125. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532
126. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9:489-499
127. Weber C (2006) [Screening and prevention of carcinoma of the colon and rectum]. *Ther Umsch* 63:333-337
128. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318:1108-1113
129. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT (2003) Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 56:137-140

## 7. Anhang

### 7.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA	<i>Amino acid</i>
Abb.	Abbildung
AKT	<i>Murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
anti-EGFR-mAb	Monoklonale Antikörper gegen EGFR
APS <sub>2</sub>	Adenosin-5'-Phosphodisulfat
AREG	<i>Amphiregulin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair</i>
BRAF	<i>V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSC	<i>Best supportive care</i>
CDS	<i>Consensus of protein coding regions</i>
CI	Konfidenzintervall
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRC	Kolorektales Karzinom
CRYSTAL	<i>Cetuximab Combined with Irinotecan in First-Line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer</i>
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECM	extrazelluläre Matrix
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	European Medicines Agency

engl.	Englisch
EQA	<i>European Quality Assurance Program</i>
EREG	<i>Epiregulin</i>
ESP	<i>European Society of Pathology</i>
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FDA	US Food and Drug Administration
FFPE	<i>Formalin-fixed, paraffin-embedded</i>
FOLFIRI	5-Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan
FOLFOX	5-Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatin
<i>g</i>	<i>gravity</i>
G	Grading
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanosine triphosphate exchange factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H&E	Hämatoxylin&Eosin
HR	Hazard ratio
IgG	Immungobulin G
k. A.	keine Angaben
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Metastase
mAb	Monoklonaler Antikörper
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mCRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
min.	Minute
MSS	mikrosatellitenstabil

N	Lymphknoten
NaOH	Natriumhydroxid
OPUS	<i>Oxaliplatin and Cetuximab in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer</i>
OR	<i>Overall response</i>
ORR	<i>Overall response rate</i>
OS	<i>Overall survival</i>
$p$	<i>probability</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFS	<i>Progression-free survival</i>
PIK3	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PPi	Pyrophosphat
PRIME	<i>Panitumumab Randomized Trial in Combination With Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer to Determine Efficacy</i>
PT	Primärtumor
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	<i>Murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
SRC	<i>Sarcoma viral oncogene homolog</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur

TZM	Tumorzentrum München
UICC	Union internationale contre le cancer
USA	United States of America
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

## 7.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Andreas Jung für die Überlassung dieses Themas, seine fachliche Unterstützung sowie sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jens Neumann danke ich für seine unschätzbare Zusammenarbeit und seine unermüdliche Unterstützung in wissenschaftlichen und technischen Fragen.

Ich danke Herrn Professor Thomas Kirchner für die freundliche Aufnahme am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität und seine Anregungen zu dieser Arbeit.

Frau Professor Jutta Engel vom Tumorzentrum München danke ich für die Bereitstellung der Patientendaten. Mein besonderer Dank geht an die Mitarbeiterinnen des Labors für Molekulare Diagnostik und der Arbeitsgruppe Jung, allen voran Frau Jutta Hügel-Tegge, Frau Gabrielle Carrell, Frau Alexandra Schindler, Frau Martina Brandt und Frau Sabine Pfeiffer für die Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung bei technischen Problemen. Auch den anderen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Jung möchte ich für Hilfe und Anregungen danken, besonders Herrn Silvio Scheel, Frau Jana Reiche und Herrn Achim Schöffauer.

Stellvertretend für die Mitarbeiter des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität möchte ich Herrn Professor Jürgen Heesemann und Frau Petra Kleuker für die ideelle und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

## 8. Eidesstattliche Versicherung

Wehweck, Laura

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Konkordanz von Mutationen von KRAS und BRAF in Primärtumor und korrespondierender Metastase des kolorektalen Karzinoms**

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

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

München, den 25.03.2013

---

(Laura Wehweck)