

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

Korrelation der EGFR Liganden Amphiregulin und Epiregulin mit  
der therapeutischen Effizienz bei Patienten mit metastasiertem  
kolorektalen Karzinom, die im Rahmen der FIRE-3 Studie  
(AIO-KRK 0306) behandelt wurden

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

vorgelegt von  
Anna-Katharina Ruth  
aus  
Heilbronn  
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. Jens Neumann  
Priv. Doz. Dr. med. Johann Spatz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Sebastian Stintzing

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2017

### **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie .....	1
1.2 Ätiologie .....	2
1.3 Pathogenese .....	2
1.4 TNM-Klassifikation nach UICC.....	4
1.5 Diagnostik .....	4
1.6 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms .....	5
1.6.1 Chemotherapieschemata.....	6
1.6.2 <i>Targeted Therapy</i> mit monoklonalen Antikörpern .....	7
1.7 Prognostische und prädiktive Faktoren.....	8
1.8 Bedeutung des EGF-Rezeptors und seiner Liganden .....	9
1.8.1 Amphiregulin (AREG).....	11
1.8.2 Epiregulin (EREG).....	11
1.8.3 Relevanz von AREG und EREG in der Signaltransduktion beim Kolonkarzinom .....	11
2 Zielsetzung .....	13
3 Material und Methoden .....	14
3.1 Erhebung des Patientenkollektivs .....	14
3.1.1 Studiendesign und Behandlungsgruppen .....	14
3.1.2 Einschlusskriterien .....	15
3.1.3 Ausschlusskriterien .....	15
3.1.4 Tumorassessment .....	15
3.1.5 Studienziele .....	16
3.2 Methoden .....	16
3.2.1 RNA Isolation aus in Paraffin-eingebettetem Gewebe .....	16
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	17
3.2.3 Reverse Transkription .....	18
3.2.4 Erstellen einer Standardreihe .....	19
3.2.5 Quantitative Real-Time-PCR im LightCycler.....	20
3.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	24

3.2.7 Statistische Berechnungen.....	24
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Allgemeine Analyse des Ansprechens und des Überlebens .....	26
4.2 Verteilung der AREG/EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit.....	27
vom RAS-Status .....	27
4.3 Verteilung der AREG/EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit.....	28
vom BRAF-Status.....	28
4.4 Verteilung der AREG/ EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit.....	29
von der primären Tumorlokalisation .....	29
4.5 Korrelationen der Liganden-Expression mit dem Ansprechen.....	29
4.5.1 Amphiregulin in der RAS-Wildtyp Subgruppe.....	29
4.5.2 Amphiregulin in der RAS & BRAF-Wildtyp Subgruppe .....	33
4.5.3 Amphiregulin in der RAS mutierten Subgruppe.....	36
4.5.4 Epiregulin in der RAS-Wildtyp Subgruppe .....	37
4.5.5 Epiregulin in der RAS mutierten Subgruppe .....	41
4.6 Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen.....	43
4.7 CIOX- Score für die Therapieentscheidung .....	47
5 Diskussion .....	50
5.1 Einfluss der EGFR-Liganden auf das Therapieansprechen.....	51
5.2 AREG und EREG als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie.....	53
5.2.1 Wt- und Mt-Signalkaskaden und ihre prädiktive Bedeutung.....	53
5.2.2 Amphiregulin und Epiregulin als zukünftige Prädiktoren .....	54
5.3 Einfluss der EGFR-Genkopienzahl auf das Therapieansprechen.....	55
5.4 Validierung eines in der CIOX-Studie generierten Scores für die .....	57
Therapieentscheidung .....	57
5.5 Ausblick .....	58
6 Zusammenfassung .....	59
7 Anhang .....	61
7.1 Materialien .....	61
7.1.1 Geräte .....	61
7.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	62

## Inhaltsverzeichnis

---

7.1.3 Chemikalien .....	62
7.1.4 Kits und fertige Lösungen .....	62
7.1.5 Enzyme.....	63
7.1.6 TaqMan Sonden .....	63
7.1.7 Oligonukleotide.....	63
7.1.8 Größenmarker.....	64
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	65
7.3 Tabellenverzeichnis .....	68
7.4 Literaturverzeichnis .....	71
7.5 Danksagung .....	79
7.6 Eidesstattliche Versicherung.....	80

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AREG	Amphiregulin
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASCO	American Society of Clinical Oncology
APC	Adenomatous polyposis coli
BRAF	RAS Associated Factor B
BSC	best supportive care
CAPOX	Kombination aus: <b>Ca</b> pecitabin, <b>Ox</b> aliplatin
CAPIRI	Kombination aus: <b>Ca</b> pectiabin, <b>Iri</b> notecan
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Karzinoembryonales Antigen
CIN	Chromosomeninstabilität
CISH	Chromogen in situ-Hybridisierung
Cp	Crossing point
CR	Complete Remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EREG	Epiregulin
EtOH	Ethanol
F	Multiplikationsfaktor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOLFIRI	Kombination aus: <b>Fol</b> insäure, <b>Flu</b> oruracil, <b>IRI</b> notecan
FOLFOX	Kombination aus: <b>Fol</b> insäure, <b>Flu</b> oruracil, <b>Ox</b> aliplatin
FOLFOXIRI	Kombination aus: <b>Fol</b> insäure, <b>Flu</b> oruracil, <b>Ox</b> aliplatin, <b>IRI</b> notecan
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN	Gene copy number
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
i.v.	intravenös
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	Kolorektales Karzinom

LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen Activated ProteinKinase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mRNA	Messenger RNA
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung Cancer
OD	Optische Dichte
ORR	Overall Response Rate
ORR-P	Wahrscheinlichkeit für Therapieansprechen
OS	Overall Survival
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Progressiv Disease
PFS	Progression-free survival
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PLCy	Phospholipase Cy
PR	Partial Remission
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
RKI	Robert Koch- Institut
ROC	Receiver Operating Characteristics
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
RT- qPCR	Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion
SD	Stable Disease
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE-Puffer	<b>TRIS-Borat-EDTA-Puffer</b>
TNM	Tumorinfiltrationstiefe-Lymphknotenbefall-Metastasierung
UICC	Union International Contre Le Cancer
UPL	Universal Probe Library
V	Verdünnungsfaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
XELOX	Kombination aus: Xeloda, Oxaliplatin

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von über 65.000 pro Jahr und ca. 25.000 Sterbefällen pro Jahr allein in Deutschland ist das kolorektale Karzinom mit 16% die zweithäufigste Krebserkrankung und mit 12% bis 14% nach dem Prostatakarzinom auch die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen.

Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms wird für die bundesdeutsche Bevölkerung mit 6% angegeben [44].

Zwischen 1980 und 2004 hat die altersstandardisierte Inzidenz an Darmkrebs bei Männern um 45 % und bei Frauen um 25 % zugenommen, während die altersstandardisierten Sterberaten bei Frauen um 35 % und bei Männern um 20 % abgenommen haben [7].

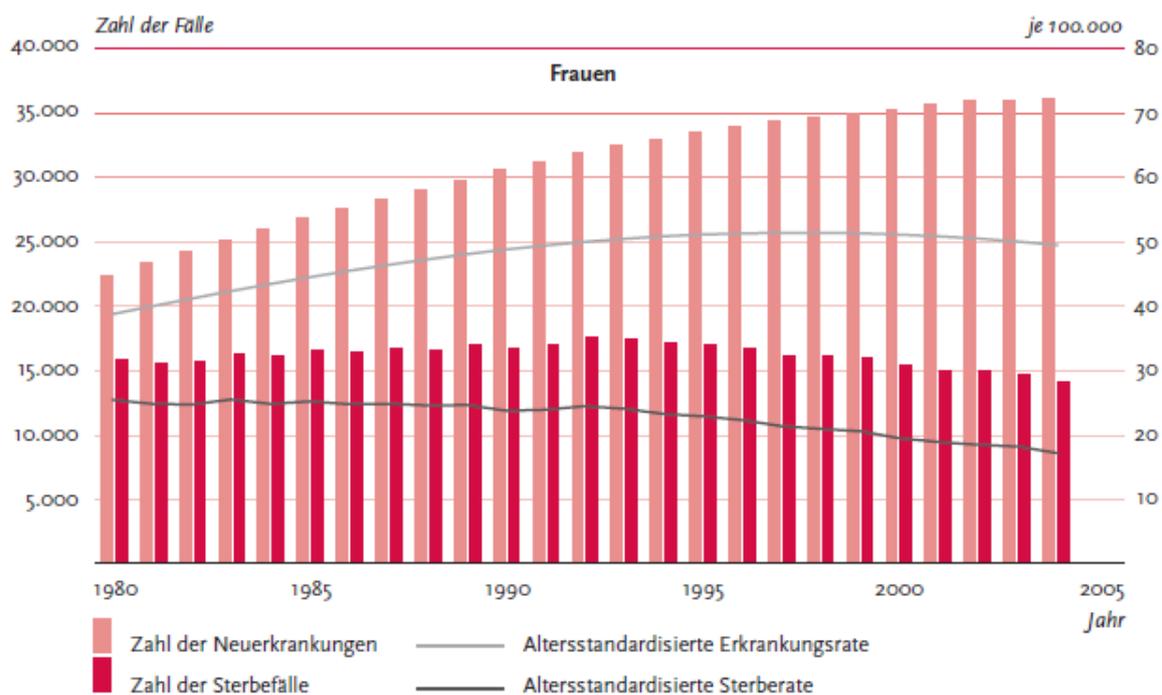


Abb. 1.1: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten Frauen, Deutschland 1980 – 2004, RKI [7]

Männer erkranken im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Hereditäre Formen des Kolonkarzinoms können sich jedoch früher manifestieren. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms variiert weltweit erheblich. So ist sie in den Industriestaaten höher als in den Entwicklungsländern, wobei die westlichen Industriestaaten in Nordamerika, Australien und Nordwesteuropa eine höhere Inzidenz aufweisen als die Industriestaaten in Asien, Afrika oder Südamerika.

### 1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des sporadischen, welches durch erworbene Genmutationen entsteht, kolorektalen Karzinoms ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine komplexe Interaktion zwischen genetisch prädisponierenden Faktoren und äußeren Einflüssen wird als Auslöser diskutiert. Als exogene Faktoren werden Übergewicht, Bewegungsmangel und ernährungsbedingte Faktoren, wie ballaststoffarme Nahrung [8] mit einem hohen Anteil an rotem Fleisch (Schwein, Rind) und verarbeiteten Wurstwaren angesehen. Auch regelmäßiger Alkoholkonsum [60], insbesondere bei reduzierter Folsäureeinnahme, sowie Tabakkonsum [65] tragen zur Risikosteigerung bei.

Zu den endogenen Faktoren zählen kolorektale Adenome. Abhängig von Größe und Form (villös> tubulovillös> tubulär) der Adenome nimmt die Entartungswahrscheinlichkeit zu [6]. Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs erkranken häufiger [78], Vorerkrankungen, wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, vor allem die Colitis ulcerosa, weniger der Morbus Crohn, steigern ebenfalls das Erkrankungsrisiko.

Zu den selteneren Risikofaktoren, die schon in jüngeren Jahren zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms führen, gehören einige autosomal-dominant erblichen Erkrankungen. Diese hereditären Formen der kolorektalen Karzinome werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP-Syndrom) und das Hereditäre Nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) sind für bis zu 5% der kolorektalen Karzinome verantwortlich.

### 1.3 Pathogenese

Obwohl ungefähr 70 % der kolorektalen Karzinome sporadisch auftreten, bis zu 25 % ein erhöhtes familiäres Risiko aufweisen und nur circa 5% hereditär bedingt sind, haben gerade Untersuchungen bei hereditären kolorektalen Tumoren, wesentliche allgemeine Erkenntnisse zur kolorektalen Karzinogenese geliefert.

Histologisch und makroskopisch entwickelt sich das kolorektale Karzinoms aus normalen Epithel über den adenomatösen Polypen und das Adenom mit intraepithelialer Neoplasie (Dysplasie) bis zum invasiven kolorektalen Karzinom, sodass 1975 durch Morson et al. aus dem St.Mark's Hospital in London der Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ eingeführt wurde [58]. Die histologische Entwicklung der Neoplasie und deren Fortschreiten bis zum Karzinom wurden nach Fearon und Vogelstein durch die Mutation eines oder mehrerer Gene verursacht [26]. So entstand das klassische Beispiel einer Multistepkarzinogenese [38].

In der Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms sind mehrere molekulare Mechanismen beteiligt. Die beiden wichtigsten sind: Die chromosomale Instabilität (CIN) und die Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Die erste Gruppe, der sogenannte Gatekeeper Pathway, umfasst Gene mit Zellzyklus regulierender Funktion, Protoonko- und Tumorsuppressorgene [46]. Die CIN-Gruppe wird durch eine Mutation und/oder den Verlust der Heterozygotie (Loss of heterozygosity, LOH) auf Chromosom 5 im Bereich des APC Tumorsuppressorgens (adenomatous polyposis coli)

charakterisiert. Die Karzinogenese schreitet durch eine Serie von genetischen Veränderungen, welche die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie des DCC (deleted in colon cancer) sowie die Aktivierung der Proto-Onkogene c-myc und k-ras (Chromosom 12q), beinhaltet. Verantwortlich für den Übergang in ein manifestes Karzinom sind eine weitere LOH von Chromosom 17p und eine Mutation von p53.

CIN lässt sich bei etwa 80% der kolorektalen Karzinome nachweisen und ist für die familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP), bei der eine Keimbahnmutation des APC-Gens zugrunde liegt, verantwortlich.

Neben dem Gatekeeper Pathway entstehen etwa 10 - 15 % aller sporadischen KKR und bis zu 86% der HNPCC-Tumore über den sogenannten Mutator-Pathway [54]. Durch einen Defekt der Mismatch-Reparaturgene (z.B. MSH2, MLH1, MSH6, PMS1/2), die während der Replikation entstandene Basenfehlpaarungen korrigieren, beispielsweise durch Keimbahnmutationen oder durch andere Mechanismen wie Methylierungen, wird eine fehlerhafte DNA-Replikation im Bereich der Mikrosatellitenloci verursacht [27]. Betreffen die beschriebenen Mutationen Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene, kann die Adenom-Karzinom-Sequenz ausgelöst werden

Im Mittel dauert es etwa 10-15 Jahre, bis sich aus einem kolorektalen Adenom ein Karzinom entwickelt. Abbildung 1.2 veranschaulicht die kolorektale Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein.

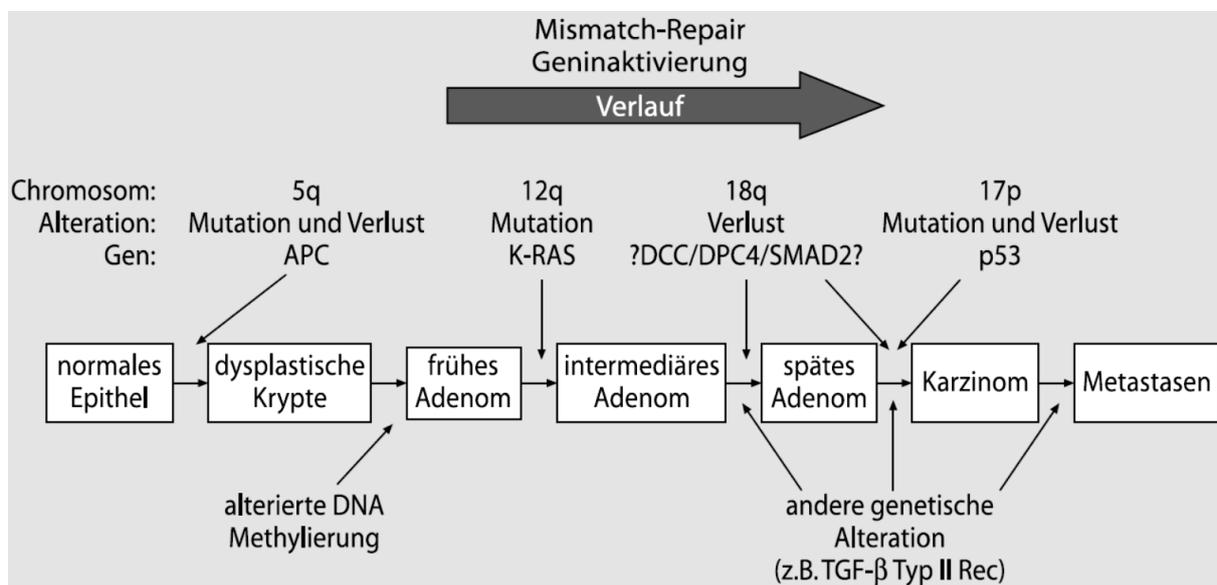


Abb. 1.2: Adenom-Karzinom-Sequenz [81]

## 1.4 TNM-Klassifikation nach UICC

Anhand der pathologischen und klinischen Ausbreitung des Tumors kann das Risiko für ein Tumorrezidiv abgeschätzt werden und entschieden werden, ob eine Indikation für eine adjuvante Therapie besteht. Bereits vor 80 Jahren untersuchten Dukes et al. den Zusammenhang zwischen pathologischen Charakteristika und der Prognose von Patienten mit einem Rektumkarzinom. Hieraus ergab sich die Dukes-Klassifikation, die bis heute Anwendung findet [24]. In Deutschland hat sich auch die TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) durchgesetzt. Das jeweilige Tumorstadium (0–IV) wird aus der Kombination der T-, N- und M-Kategorie ermittelt.

Tab. 1.1: Übersicht der UICC-Stadien (2010) [86]

<b>UICC-Stadium</b>	<b>T-Stadium</b>	<b>N-Stadium</b>	<b>M-Stadium</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium I	T2	N0	M0
Stadium Ia	T3	N0	M0
Stadium Ib	T4a	N0	M0
Stadium Ic	T4b	N0	M0
Stadium IIIa	T1, T2	N1a	M0
	T1, T2	N1b	
Stadium IIIa/ IIIb	T1, T2	N2a	M0
Stadium IIIb	T3, T4a	N1a	M0
	T3, T4a	N1b	
	T1, T2	N2b	
	T3	N2a	
Stadium IIIc	T4a	N2a, N2b	M0
	T3, T4a, T4b	N2b	
	T4b	N1a, N1b, N2a	
Stadium Iva	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium Ivb	Jedes T	Jedes N	M1b

## 1.5 Diagnostik

Insbesondere bei Lokalisation im proximalen Kolon können kolorektale Karzinome über lange Zeit asymptomatisch bleiben. Da die Prognose abhängig vom Tumorstadium ist, kann durch Früherkennungsmaßnahmen und insbesondere durch die Vorsorgekoloskopie die Prognose der Patienten erheblich verbessert werden. Symptome sind Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Wechsel von Obstipation und Diarrhoe, sowie Blutbeimengungen und intermittierende Bauchschmerzen. Chronische Blutungen mit verstärkter Ermüdbarkeit und Gewichtsverlust sind Zeichen der fortgeschrittenen Erkrankung [31]. Mechanische Obstruktion kann Ileuszustände hervorrufen. Da die KRK-Inzidenz ab einem Alter von 50 Jahren deutlich ansteigt, werden in Deutschland Vorsorgeuntersuchungen ab diesem Zeitpunkt empfohlen [85] und von den Kostenträgern (Krankenkassen) bezahlt [9].

Ca. 30% der kolorektalen Tumoren sind bei der digital rektalen Untersuchung tastbar. Auf okkultes Blut im Stuhl wird mithilfe des Haemoccult-Tests in drei aufeinanderfolgenden Stuhlproben gescreent [30]. Als Goldstandard gilt die vollständige Koloskopie, diese ist nach analem Blutabgang, sowie bei Abklärung eines positiven Stuhltests auf okkultes fäkales Blut unverzichtbar, um auch nicht blutende Karzinome und Adenome nachweisen zu können.

Gesichert wird die Diagnose eines Kolonkarzinoms durch die histologische Untersuchung des endoskopisch gewonnenen Biopsiematerials. Zusätzlich können Adenome und Karzinome im Frühstadium durch eine therapeutische Polypektomie entfernt werden. Ist der Befund unauffällig, sollte die Koloskopie nach 10 Jahren wiederholt werden. Die weitere präoperative Diagnostik dient dazu, eine lokale Infiltration des Tumors in Umgebungsstrukturen oder die Metastasierung zu überprüfen.

Neben digital-rektaler Untersuchung und kompletter Koloskopie mit Biopsie sind folgende Untersuchungen präoperativ indiziert:

- Abdomensonographie zur Beurteilung der Leber [64]
- Röntgenaufnahme des Thorax zum Nachweis bzw. Ausschluss von Lungenmetastasen
- Bestimmung des CEA-Titers als Referenzwert für postoperative Verlaufskontrollen und nicht als Screeningverfahren oder zur Ausschlussdiagnose [23]

Im Falle eines unklaren Befundes oder des Verdachtes auf Fernmetastasen oder Infiltration von Nachbarorganen oder umgebenden Strukturen soll ein Mehrzeilen-CT des Abdomens und Beckens bzw. im Falle des Verdachtes auf Lungenmetastasen ein CT des Thorax durchgeführt werden.

Der Verdacht auf HNPCC kann durch die molekulargenetische Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität abgeklärt werden.

### **1.6 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms**

Die Leitlinienkonferenz „kolorektales Karzinom 2013“ sieht eine chemotherapeutische Behandlungsindikation bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom vor [72]. Auch in nicht kurativer Situation sollte überprüft werden, ob sich nach Vorbehandlung und gegebenenfalls darauf folgender Metastasentherapie ein kurativer Ansatz ergeben kann. Die Intensität der Primärtherapie hängt vom Therapieziel und individuellen Kriterien, insbesondere Komorbiditäten ab. Therapieziele können sein:

- Kuration bei sekundärer Metastasenresektion
- Rasche maximale Remission bei tumorbedingten Symptomen und drohenden Organkomplikationen
- gute Lebensqualität und möglichst langes Überleben

Bei Patienten mit potentiell kurativem Ansatz durch eine Metastasenresektion sollte eine maximal remissionsinduzierende, aktive Therapie gewählt werden. Auch bei Patienten mit

tumorbedingten Symptomen, hoher Tumorlast, raschem Progress sowie drohenden Organkomplikationen sollte mit einer intensiven Primärtherapie begonnen werden. Hochaktive Protokolle sind derzeit:

- FOLFOX (5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin); XELOX (Capecitabin, Oxaliplatin); FOLFIRI (5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan); CAPIRI (Capecitabin, Irinotecan) +/- Bevacizumab
- FOLFIRI oder FOLFOX + Cetuximab (nur bei RAS-Wt)
- FOLFOX + Panitumumab (nur bei RAS-Wt)
- FOLFOXIRI (5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin)

Für Patienten, bei denen multiple Metastasen bestehen, die auch bei sehr guter Remission nicht für eine sekundäre Resektion in Frage kommen, die nicht symptomatisch sind und eine hohe Tumorlast haben oder schwere Komorbiditäten aufweisen, kann auch eine weniger intensive Primärtherapie gewählt werden.

### 1.6.1 Chemotherapieschemata

Die Erstlinientherapie sollte 5-Fluorouracil (i.v. 5-FU oder orale Fluoropyrimidine) enthalten. Im Vergleich zu rein supportiven Maßnahmen im Stadium UICC IV, sind die medianen Überlebenszeiten mit 5-FU in der Kombination mit Folinsäure ungefähr doppelt so lang (6 versus 12 Monate) [62]. Dabei sollte der oralen Gabe mit Capecitabin der Vorzug gegenüber der intravenösen 5-FU-Gabe gegeben werden, da Capecitabine mit weniger Arztbesuchen und damit einer höheren Lebensqualität einhergehen [51].

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Irinotecan als auch Oxaliplatin innerhalb von Kombinationsprotokollen einer Monotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) signifikant überlegen sind. Die Zugabe von Oxaliplatin zu infusionalen 5-FU/FS-Regimen (FOLFOX) oder zu Capecitabin (XELOX) ergab eine hochsignifikante Verbesserung der therapeutischen Ergebnisse [28, 63].

Die Kombination von infusionalem 5-FU/FS mit Oxaliplatin führte in der von De Gramont durchgeführten Studie zu einer signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gegenüber einer alleinigen infusionalen 5-FU Therapie (medianes PFS von 9 Monaten versus 6,2 Monaten bei alleiniger 5-FU/FS Therapie;  $p=0.0003$ ). Durch die intensiveren Therapien wurden auch bessere Ansprechraten erreicht (50.7 vs 22.3%,  $p=0.0001$ ) [18]. Das Gesamtüberleben war nicht signifikant verlängert (16.2 vs 14.7 Monate,  $p=0.12$ ).

Eine Therapie mit Irinotecan und einem wöchentlichen 5-FU Schema nach AIO Protokoll wurde in einer Phase III Studie mit dem alleinigen AIO Schema von Köhne et al. verglichen. Die Ansprechraten von 34.4% mit 5-FU/FS und 62.2 % in der Kombination mit Irinotecan unterschieden sich signifikant ( $p < 0.0001$ ). Das progressionsfreie Überleben (PFS) verlängerte sich ebenfalls von 6.4 auf 8.5 Monate;  $p < 0.001$ , das mediane Gesamtüberleben dagegen verlängerte sich, nicht signifikant, von 16.9 auf 20.1 Monate ( $p=0.278$ ) [47].

FOLFOX und FOLFIRI weisen eine ähnliche Aktivität, aber ein unterschiedliches Toxizitätsprofil. Eine im Jahr 2004 durchgeführte, randomisierte Phase-III-Studie hat

FOLFIRI und FOLFOX6 in der Erstlinientherapie verglichen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied für die Remissionsraten, das progressionsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben für die beiden Therapiearme FOLFIRI/FOLFOX6 und FOLFOX6/FOLFIRI nachgewiesen werden. In beiden Therapiearmen wurde ein medianes OS um 20 Monate (21.5 Monate für FOLFIRI → FOLFOX6 vs 20.6 Monate FOLFOX6 → FOLFIRI) erreicht [81].

Die Kombinationstherapie aus allen drei aktiven Chemotherapeutika des kolorektalen Karzinoms (5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin = FOLFOXIRI) sollte aufgrund der höheren Nebenwirkungen nur bei medizinisch fitten Patienten zur Konversionstherapie bei potenziell resektablen Metastasen eingesetzt werden [25]. Eine jüngst publizierte retrospektive Metaanalyse zeigte insbesondere eine Wirksamkeit von FOLFOXIRI bei BRAF mutierten Tumoren [52]. Daher sollte bei jüngeren Patienten mit einem BRAF mutierten Tumor eine FOLFOXIRI Therapie diskutiert werden.

### 1.6.2 Targeted Therapy mit monoklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper wie Cetuximab, Panitumumab und Bevacizumab stellen eine wirksame therapeutische Erweiterung der Behandlung der metastasierten kolorektalen Karzinomkrankung dar. Mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix®) lässt sich eine EGFR-Blockade erreichen, jedoch nur, wenn keine aktivierende Mutation von RAS vorliegt. Die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion hemmen dabei angiogenetisch wirksame Faktoren und beeinträchtigen Tumorinvasion und Metastasierung. Eine typische Nebenwirkung ist ein akneiformer, stammbetonter Hautausschlag, auch auf anaphylaktische Reaktionen muss geachtet werden. Die Ausprägung des akneiformen Exanthems korreliert mit dem Ansprechen und wird als prädiktiver biologischer Marker gewertet.

Bei KRAS-Wildtyp-Patienten wurde durch Zugabe von Cetuximab zu FOLFIRI eine signifikante Steigerung der Ansprechrate (46.9 % versus 38.7% bei FOLFIRI) erreicht [83].

Durch Zugabe von Cetuximab zu FOLFOX4 kann eine signifikante Verbesserung der Ansprechrate (45.6 % versus 35.7 %) sowie des progressionsfreien Überlebens (7.7 Monate versus 7.2 Monate) erreicht werden [10].

In der Kombination mit FOLFOX und FOLFIRI führte die Gabe des anti-EGFR Antikörper Panitumumab (Vectibix®) zu einer signifikanten Steigerung der Tumoransprechrate, des PFS und OS und ist bei Patienten, die einen RAS-Wildtyp Tumor haben, in dieser Kombination zugelassen.

Bevacizumab (Avastin®) ist ein gegen VEGF gerichteter monoklonaler Antikörper, der in Kombination mit Chemotherapie über eine Hemmung der tumorassoziierten Angiogenese das Tumowachstum und die Metastasierung blockiert und somit das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert [37, 42, 69]. Bevacizumab findet auch bei RAS mutierten Tumoren Anwendung. Bevacizumab-bezogene Nebenwirkungen sind arterielle Hypertonien, venöse Thrombembolien, Wundheilungsstörungen und gastrointestinale Perforationen.

## 1.7 Prognostische und prädiktive Faktoren

In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, um mögliche prädiktive Biomarker zu identifizieren, die eine individuelle Vorhersage über ein Therapieansprechen vor der Behandlung treffen können. Dies ist vor allem auch im Hinblick auf das Nebenwirkungsspektrum und die hohen Kosten der Antikörpertherapie bedeutsam [49].

Unabhängig von der Verabreichung einer zytostatischen Therapie gelten nach Resektion des Primärtumors das TNM-Stadium, der Differenzierungsgrad und die R0-Resektion, als gesicherte prognostische Indikatoren [29]. Zu den am besten untersuchten prognostischen und prädiktiven Faktoren gehört der Verlust der Heterozygotie am Chromosom 18q, die Mutation von p53, die RAS-Mutation, die Mikrosatelliteninstabilität und die Thymidilatsynthese. 2008 wurde die KRAS-Mutation auf Exon 2 als erster prädiktiver Biomarker für die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Bei der Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab binden die anti-EGFR Antikörper an den EGFR und verdrängen die Liganden. Bei KRAS-Wildtyp und intaktem Signalweg können die Antikörper den Signalweg blockieren. Eine aktivierende KRAS-Mutation, die in etwa 30 bis 49 % aller kolorektalen Karzinome nachgewiesen werden kann [70], bewirkt, dass der RAS-RAF-MAPK-Signalweg vom EGFR unabhängig aktiv ist und die Ansprechrate eines Dickdarmkarzinoms auf die Anti-EGFR-Antikörpertherapie beinahe 0% beträgt [5, 50]. Hinzukommend haben Studien gezeigt, dass bei KRAS mutierten Tumoren die Zugabe eines EGFR-Antikörpers zu FOLFOX4 zu einer Verkürzung des Überlebens führt [10, 20].

Aufgrund dieser eindeutigen Datenlage wurde vor der Gabe einer anti-EGFR-Antikörpertherapie der molekulargenetische KRAS-Mutationstest, der am paraffineingebetteten Tumorgewebe durchgeführt wird, eingeführt, um eine KRAS-Mutation sicher auszuschließen. Aus der Subgruppe der KRAS-Wildtyp-Patienten profitierten jedoch nur 60% der Patienten von der Antikörpertherapie [1].

Ende 2013 wurde die Zulassungsbeschränkung von Cetuximab auf einen RAS-Wildtyp-Status (Exons 2, 3 und 4 von KRAS und NRAS) erweitert, so dass heutzutage etwa 50% der Patienten für eine anti-EGFR Therapie qualifizieren. Die Überprüfung des RAS-Mutationsstatus sollte in Deutschland von einem von der Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie zertifizierten Labor vorgenommen werden.

## 1.8 Bedeutung des EGF-Rezeptors und seiner Liganden

Da die RAS Mutation nicht der alleinige Grund für ein Nichtansprechen sein kann, wird gegenwärtig intensiv nach weiteren prädiktiven Biomarkern gesucht. Geeignete Kandidaten sind Schlüssel-moleküle in weiteren Signalwegen, die durch den EGFR aktiviert werden (z.B. Mutationen von BRAF und PI3K sowie PTEN-Expressionsverluste), oder eine hohe Expression von Liganden des EGFR (Amphiregulin oder Epiregulin).

Der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor besitzt eine extrazelluläre, eine transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Er gehört zur Familie der ErbB-Wachstumsfaktor-Rezeptoren, welche bedeutend für das Wachstum von Epithelzellen sind. Es existieren vier Rezeptoren und verschiedene Liganden: EGFR (HER1, ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) [87]. Eine EGFR-Expression kann beim metastasierten kolorektalen Karzinom bei etwa 70 % der Tumoren nachgewiesen werden, der Grad der immunhistochemisch nachgewiesenen EGFR-Expression korreliert nicht mit der Effektivität der anti-EGFR-Therapie [55, 68].

Heute kennt man sieben Liganden, die an den EGFR binden. Der bedeutsamste von ihnen ist EGF. Außerdem fungieren TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF, Epiregulin und Neuregulin G2 $\beta$  als Liganden.

Bindet ein Ligand an den EGF-Rezeptor, so kommt es zur Dimerisierung mit einem zweiten Molekül EGFR (Homodimerisierung) oder mit einem Molekül von HER-2, HER-3 oder HER-4 (Heterodimerisierung). Durch die daraus folgende Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt. Die wichtigsten sind der RAS/RAF-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg, der Phospholipase C-Signalweg, der JNK/STAT-Signalweg, sowie der SCR/FAK-Signalweg, von denen der Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase-Weg (MAPK) einen Hauptsignaltransduktionsweg darstellt, in dem RAS Proteine eine wichtige Rolle spielt. Endpunkte dieser Signalkaskaden führen zu Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die an der Regulierung der Proliferation, der Migration, der Invasion, der Angiogenese und der Apoptose beteiligt sind.

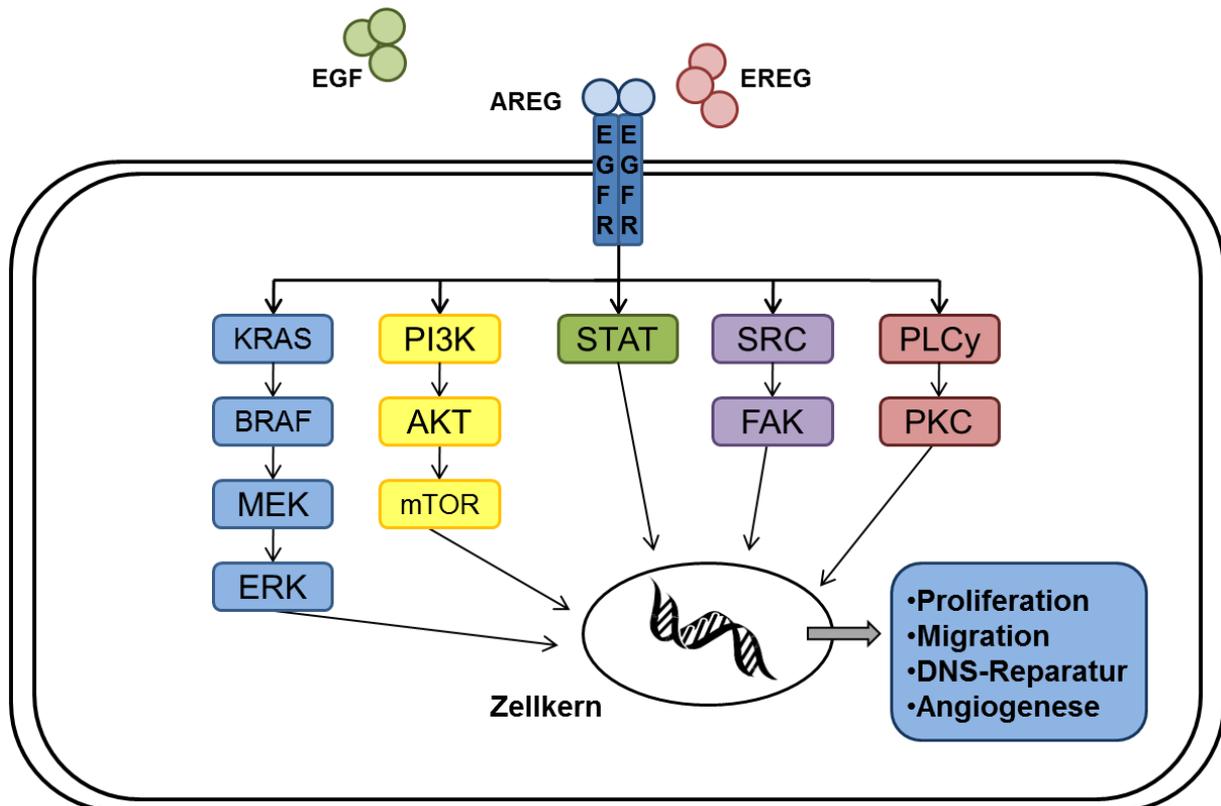


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der EGFR-Signalwege

Amphiregulin und Epiregulin gehören zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und wirken als mitogene Stimulatoren, indem sie an den EGFR binden [39]. Zwar binden Amphiregulin und Epiregulin schwächer als EGF an den EGFR und erb4, jedoch sind sie potenter und führen zu einer verlängerten Rezeptoraktivierung [75]. In Dickdarmkarzinomen werden verstärkt Liganden wie Amphiregulin und Epiregulin gebildet, wodurch über eine transkriptionelle Aktivierung Proliferation, anti-Apoptose, Angiogenese und Migration angeregt werden. Zwei unabhängige Gruppen berichteten, dass eine erhöhte Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin stark mit einem therapeutischen Nutzen einer Cetuximab Therapie bei mKRC assoziiert ist: Die Gruppe um Khambata-Ford hat 2007 die Expression von Amphiregulin und Epiregulin im mKRC untersucht und konnte bei Patienten mit erhöhter Expression der beiden Liganden eine Tendenz zu besserem Ansprechen in Zweit- oder Drittlinientherapie mit Cetuximab feststellen [45]. Jacobs et al. untersuchten 220 Patienten mit mKRC, die mit Cetuximab und Irinotecan behandelt wurden [40]. Sie bestätigten das bessere Ansprechen auf eine Kombination aus Cetuximab und Irinotecan bei mKRC bei KRAS-Wt Patienten, nicht jedoch bei Patienten mit KRAS-Mutation. Die Ergebnisse der beiden Gruppen geben Hinweise dafür, dass die bisherige Patientenselektion für Cetuximab durch die Expression von Amphiregulin und Epiregulin erweitert werden könnte.

Interessanterweise ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der EGFR-Expression und dem Ansprechen auf eine Cetuximab Therapie feststellen [32]. Mittels Immunhistochemie ließ sich bei bis zu 25% der Patienten keine EGFR Expression messen, die dennoch auf eine Antikörper Therapie ansprechen [48, 14]. Dagegen gibt es Anzeichen dafür, dass die Kopienzahl des EGFR-Gens, die mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung gemessen werden kann, mit besserem Ansprechen assoziiert ist [12, 57]. Jedoch sind die bisher erhobe-

nen Daten aufgrund von Unterschieden in den Untersuchungsmethoden schlecht vergleichbar und lassen die Frage nach dem Einsatz der EGFR-Genkopienzahl als prädiktiver Biomarker offen [48, 50, 61, 71].

### **1.8.1 Amphiregulin (AREG)**

AREG ist ein Ligand des EGFR und wurde erstmals 1988 im Medium MCF-7 (humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie) entdeckt [77]. Der Bestandteil „amphi“ steht für stimulierende Einflüsse wie Differenzierung, Apoptose und Tumorgenese auf Fibroblasten einerseits und wachstumshemmende Effekte auf Neuroblastom- und Adenokarzinomzelllinien andererseits.

AREG ist bei vielen physiologischen Prozessen beteiligt wie der Regeneration von Nerven und der Implantation von Blastozysten. Jedoch ist auch eine pathologische Expression von AREG in Tumorgewebe gemessen worden: So hemmt AREG in NSCLC über die Ras/Mek/Erk-Kaskade und die PI3-K-Kaskade die Apoptose [35]. Im Kolonkarzinom ist die AREG-Expression erhöht, eine Entfernung von AREG aus dem Medium resultierte in einer 40%igen Wachstumsinhibition [15].

### **1.8.2 Epiregulin (EREG)**

Der EGFR Ligand EREG wurde 1995 erstmals in der Tumorzelllinie NIH3T3/ clone T7 (transformierte Fibroblasten- Zelllinie) gefunden. Während, mit Ausnahme von Makrophagen und Plazenta, Epiregulin in menschlichem Gewebe nur sehr gering exprimiert wird, sind die meisten epithelialen Tumoren durch eine hohe Expression an Epiregulin gekennzeichnet. Epiregulin weist bifunktionelle Regulationseigenschaften auf [82]: Zum einen hemmt EREG das Wachstum einiger epithelialer Tumorzelllinien wie HeLa, A431, zum anderen regt Epiregulin das Wachstum von Fibroblasten an. Eine erhöhte Epiregulin Expression ließ sich in Brust-, Lungen- und Kolonkarzinomen feststellen [2]. Obwohl EREG viel schwächer als EGF am EGFR von Epidermoid Karzinomzellen bindet, ist er ein wirksameres Mitogen für Hepatozyten von Ratten.

### **1.8.3 Relevanz von AREG und EREG in der Signaltransduktion beim Kolonkarzinom**

Die Gene für Amphiregulin und Epiregulin liegen ko-lokalisiert auf Chromosom 4q13.3. Sie kodieren für EGFR-Liganden und haben eine zentrale Rolle bei physiologischen und pathologischen Wachstumsprozessen. Über eine erhöhte Expression der AREG- und EREG-mRNA in Tumorzellen, aber nicht im umliegenden Stromagewebe, Muskulatur oder Endothelzellen wurde wiederholt berichtet [67], im Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom wurde AREG erstmals 1991 von Ciardiello et al. erwähnt [15]. Johnson et al. stellten fest, dass eine Wegnahme von AREG aus dem Medium zur Kultivierung von Zellen zu einer 40% Wachstumsinhibition führte [41]. Eine vermehrte Expression von Amphiregulin und Epiregulin könnte somit eine wichtige Rolle im Tumorwachstum und Überleben spielen. In einer Reihe von Tumoren, wie Brust-, Leber-, Pankreastumoren und Kolonkarzinomzellen sind posi-

tiv autokrine Rückkopplungsschleifen zwischen Amphiregulin und EGFR beschrieben [84]. Hierunter versteht man eine Wirkung des in einer Zelle produzierten EGFR-Liganden auf die Zelle selbst.

## 2 Zielsetzung

Ziel der hier vorgestellten Untersuchung war es, anhand von paraffineingebettetem Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten im UICC Stadium IV, die im Rahmen der FIRE-3 Studie [33], einer randomisierten Studie zur Wirksamkeit von FOLFIRI in Kombination mit Cetuximab versus Bevacizumab in der Erstlinienbehandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms behandelt wurden, die Expression von Schlüsselproteinen und -genen des EGFR Pathways zu untersuchen. Hierbei sollte die relative mRNA-Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin mittels Real-Time PCR (QRT-PCR) bestimmt werden. Dazu wurden die Patienten in zwei Subgruppen mit RAS-Wildtyp und RAS-Mutation eingeteilt.

Desweiteren sollte die Zahl der EGFR-Genkopien mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung ermittelt werden.

In einer abschliessenden Untersuchung sollte ein in der CIOX-Studie [56] generierte Score für oder gegen die Einleitung einer Cetuximabtherapie in der vorliegenden FIRE-3 Studie validiert werden.

Die so gewonnenen Ergebnisse sollten in einer orientierenden Analyse abschließend mit den klinischen Parametern (wie der Zeit bis zur Tumorprogression und dem Gesamtüberleben) bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom korreliert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Erhebung des Patientenkollektivs

#### 3.1.1 Studiendesign und Behandlungsgruppen

Untersucht wurden Gewebeproben von Patienten aus der FIRE-3 Studie, einer randomisierten Phase-III-Studie, die die Antitumorwirksamkeit der additiven Gabe von Cetuximab versus Bevacizumab, zweier monoklonaler Antikörper, in Kombination mit der Basischemotherapie FOLFIRI in der Erstlinien-Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinom vergleicht.

#### FIRE-3 Studie (AIO-KRK 0306)

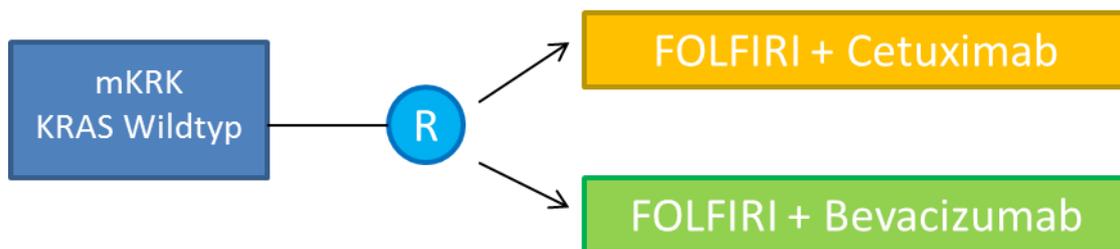


Abb. 3.1: FIRE-3 Studie

Patienten wurden randomisiert den verschiedenen Behandlungsarmen zugeteilt:

Tab. 3.1: Behandlungsgruppen

1 Zyklus besteht aus: FOLFIRI (Tournigand Regime), alle 2 Wochen	
Arm A	Arm B
Tag 1: Irinotecan 180 mg/m <sup>2</sup> i.v., 30 - 90 min	Tag 1: Irinotecan 180 mg/m <sup>2</sup> i.v., 30 - 90 min
Tag 1: Folinsäure 400 mg/m <sup>2</sup> i.v., 120 min	Tag 1: Folinsäure 400 mg/m <sup>2</sup> i.v., 120 min
Tag 1: 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> Bolus	Tag 1: 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> Bolus
Tag 1 - 2: 5-FU 2400 mg/m <sup>2</sup> i.v. über 46 h	Tag 1 - 2: 5-FU 2400 mg/m <sup>2</sup> i.v. über 46 h
Tag 1+ 8: Cetuximab initial 400 mg/m <sup>2</sup> , danach jeweils 250 mg/m <sup>2</sup> i.v.	Tag 1: Bevacizumab 5 mg/kgKG i.v. über 30-90 min

Die Therapie wurde fortgesetzt bis:

- Progression des Tumors
- Beobachtung einer inakzeptablen Toxizität
- Erreichen einer bestätigten CR
- Erreichen eines Status der Operabilität
- Patientenwunsch zur Beendigung der Therapie

- Notwendigkeit des Behandlungsabbruchs gemäß Einschätzung des behandelnden Arztes

Das Studienprotokoll wurde von den Ethik Kommissionen aller 177 beteiligter deutscher und österreichischer Zentren genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten vor Studieneintritt eingeholt. Die Patienten mussten folgende Ein- und Ausschlusskriterien (gekürzt) gemäß dem Studienprotokoll [89] aufweisen:

### 3.1.2 Einschlusskriterien

**Die wichtigsten Einschlusskriterien waren:**

- Histologisch gesichertes Adenokarzinom des Kolons oder Rektums
- Nachweis des KRAS-Wildtyp-Status im Tumor (Primärtumor oder Metastase)
- Stadium IV
- Allgemeinzustand: 0 - 2 (ECOG/WHO)
- Für die Applikation einer Chemotherapie geeignet
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten (Erst- und Zweitlinientherapie)
- Alter 18 - 75 Jahre

### 3.1.3 Ausschlusskriterien

**Die wichtigsten Ausschlusskriterien waren:**

- Nachweis einer KRAS-Mutation
- Vorangegangene Behandlung mit einem gegen das EGFR-Target gerichteten Therapie
- Vorangegangene Behandlung mit Bevacizumab
- Vorangegangene Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms mit Ausnahme einer adjuvanten Therapie, die mindestens 6 Monate vor Studieneintritt beendet wurde
- Experimentelle medikamentöse Behandlung innerhalb von 30 Tagen vor Aufnahme
- Bekannte oder klinisch vermutete Hirnmetastasen
- Akuter oder subakuter Darmverschluss oder chronisch-entzündliche Darmerkrankung in der Anamnese oder chronische Diarrhoe

### 3.1.4 Tumorassessment

Das Tumorassessment erfolgte nach Abschluss von Zyklus 3 (nach 6 Behandlungswochen) und Zyklus 6 (nach 12 Behandlungswochen), danach alle 10 Behandlungswochen (CT Abdomen / Becken, ggf. Röntgen-Thorax, bei Verdacht auf pulmonale Metastasen zusätzlich Thorax-CT). Darüber hinaus erfolgte die Erfassung und Dokumentation der übrigen Tumormanifestationen sowie der Tumormarker CEA und / oder CA 19-9.

### 3.1.5 Studienziele

Primäres Studienziel war die vergleichende Bestimmung der Antitumorwirksamkeit (gemessen anhand der objektiven Remissionsrate, complete plus partial response) der additiven Gabe eines monoklonalen Antikörpers (Cetuximab vs. Bevacizumab) in Kombination mit der Basischemotherapie FOLFIRI im intent-to-treat-Kollektiv.

Zu den sekundären Studienzielen zählten die Erfassung der progressionsfreien Überlebenszeit, der Gesamtüberlebenszeit, der Rate an sekundären Resektionen von Lebermetastasen mit potentiell kurativem Ansatz sowie die Erfassung der Sicherheit und Verträglichkeit.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 RNA Isolation aus in Paraffin-eingebettetem Gewebe

Von den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) Gewebeproben wurden jeweils zehn 10 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf Objektträgern fixiert, von welchen einer mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt wurde, auf welchem das Tumorareal aufgesucht und eingezeichnet werden konnte, ein weiterer wurde für die FISH Analyse verwendet.



Abb. 3.2: HE-Färbung mit markiertem Tumorareal

#### Entparaffinisierung:

Zur RNA-Gewinnung mussten die Präparate mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert werden, um ein Zerreißen und Schrumpfen des zuvor fixierten Gewebes zu verhindern. Hierzu wurden die Schnitte erst entparaffiniert, indem sie dreimal für jeweils 10 Minuten in das Intermedium Xylol gebettet wurden. Im Anschluss wurden sie dreimal für jeweils 10 Minuten in Ethanol (100% - 70% - 70%) gegeben und somit wieder in ein wässriges Milieu (Aqua dest.) überführt.

#### RNeasy-Technologie:

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde der RNeasy FFPE Kit von Qiagen verwendet. Die RNeasy-Technologie basiert auf der Kombination der Guanidinhydrochlorid-Lyse, einem chaotrophen Salz, welches Proteine denaturiert und inaktiviert, und der Aufreinigung über Silicagel-Membranen.

Zunächst wurde das markierte Tumorareal aus den acht Schnitten per sterilem Skalpell ausgekratzt und in ein auf Eis gekühltes 2 ml RNase freies Eppendorf Gefäß gegeben, welches 150µl PKD Lysepuffer enthielt. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K wurde die Probe gevortext und bei 55 °C für 15 Minuten im Thermoblock inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei 80°C. Im nächsten Schritt wurden die Proben, nachdem sie zentrifugiert worden waren, in den QIAcube gegeben.

Dort wurde das Lysat mit einem Guanidinhydrochlorid enthaltenden RBC Puffer gemischt, einem chaotrophen Salz zur Denaturierung und Inaktivierung von Proteinen, selbst RNasen. Das Lysat wurde anschließend mit Ethanol versetzt, wodurch optimale Bedingungen geschaffen wurden, um die RNA an die Silica-Membran der RNeasy MinElute Säule zu binden. In mehreren Waschschrritten wurden Kontaminationen (z.B. Polysaccharide, DNA) entfernt. In einem weiteren Schritt wurde die RNA durch RPE Puffer von der Hochsalzlösung und dem restlichen Ethanol gereinigt. Am Ende der Prozedur konnte die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden.

So erhielt man am Ende ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA(mRNA) und anderen. Die mRNA machte hierbei nur etwa 2 % der Gesamt-RNA aus. Für die quantitative Real-time PCR ist das ausreichend. Die extrahierte RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80 °C eingefroren.

### **3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Um mit der kompetitiven PCR quantitative Aussagen machen zu können, ist die exakte Konzentrationsbestimmung der zuvor isolierten Gesamt-RNA notwendig.

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop Spektrophotometers. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dort erreichen die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren die maximale Absorption, der Verdünnung (V) und einem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor (F):

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times F \times V$$

$$V = \text{Verdünnungsfaktor, } F = \text{Multiplikationsfaktor: } 40 \text{ für RNA} \\ 50 \text{ für Doppelstrang-DNA}$$

Beim Vorliegen von RNA entspricht eine  $\text{OD}_{260}$  von 1.0 einer Konzentration von 40 µg/ml (DNA: 50 µg/ml). Zum Ermitteln von Verunreinigungen durch Proteine, wurde ebenfalls die Wellenlänge bei  $\lambda = 280$  nm gemessen, so dass die Reinheit anhand einer Ratio (Verhältnis

OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub>) geprüft werden konnte. Eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist demnach ein Verhältnis von 1.8-2.0 auf. Als Referenzwert dienten 2 µl Nuklease free water, mit welchem das Gerät vor den eigentlichen Messungen geeicht wurde.

Beim NanoDrop Spektrophotometer reichte ein Probenvolumen von nur 1.5 µl zur Messung von RNA-Konzentrationen von 2 bis 3000 ng/µl. In Abbildung 1 ist ein typisches Spektrum von gemessenen, reinen RNA Proben dargestellt.

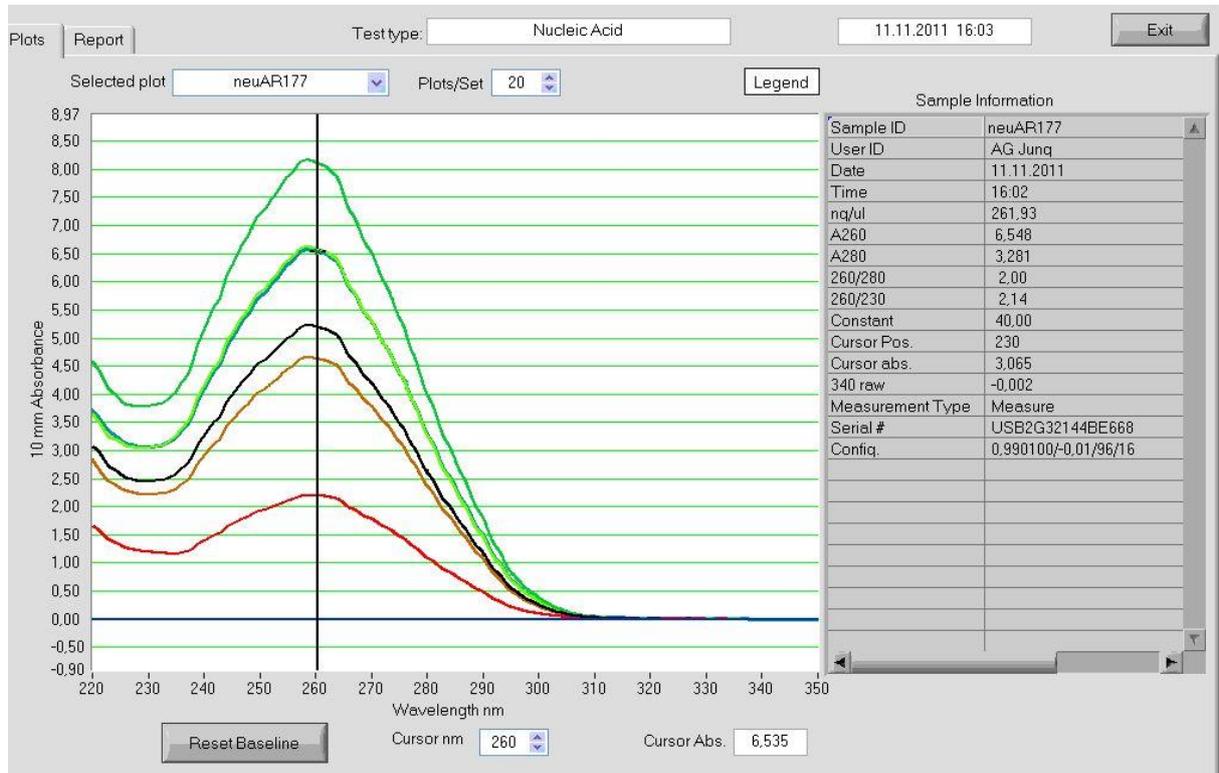


Abb. 3.3: Spektrale Darstellung von RNA-Proben nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop

### 3.2.3 Reverse Transkription

Für eine Quantifikation der Proben mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann nur DNA als Ausgangsmaterial verwendet werden und nicht RNA.

Somit wurde hier ein Zwischenschritt nötig, der die isolierte RNA in cDNA (complementary DNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase umschreibt.

Zur Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde der Fermentas Reverse Transcription Kit verwendet. Nachdem die Reagenzien und die RNA auf Eis aufgetaut worden waren, wurde die Reaktion in zwei Schritten durchgeführt:

- Pro Probe wurden 150 ng-500 ng RNA eingesetzt, mit 1µl Random Hexamers versetzt und mit Nuklease free water in einem 0.2 ml Eppendorf PCR Tube auf ein Gesamtvolumen von 12.5 µl aufgefüllt. Nachdem die Proben gevortext und zentrifugiert wurden, wurde zunächst im Thermocycler die RNA 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Zur Hybridisierung der Primer wurde der Ansatz anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

- Währenddessen wurde ein Mastermix vorbereitet und der Probe ein Volumen von 7.5 µl gemäß dem unten angegebenen Pipettierschema hinzugefügt. Im Thermocycler wurde die Probe 10 min bei 25°C inkubiert, die Umschreibung erfolgte für eine Stunde bei 42 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt um die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms zu stoppen. Der zugefügte RNase Inhibitor sollte eventuell vorhandene RNAsen am RNA-Abbau hindern.

Tab. 3.2: Pipettierschema des Mastermix

<b>Ansatz pro Probe</b>	
RNase Inhibitor	0.5 µl
5x Reaction Buffer	4.0 µl
dNTPs	2.0 µl
Reverse Transcriptase RT	1.0 µl

Dem Reaktionsprodukt wurden 13µl Nuklease free water hinzugesetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 33µl vorlag. Dieses wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.2.4 Erstellen einer Standardreihe

Um eine genaue Quantifizierung unbekannter DNA durchzuführen, wurden Standardkurven mit bekannter Kopienzahl für jede zu untersuchende Zielsequenz erstellt. Für die Erstellung der Standardkurven für AREG, EREG, sowie für die Housekeeper Gene β-Actin und GAPDH wurde cDNA aus verschiedenen Zellpopulationen verwendet, die die nachzuweisenden Gensequenzen enthielt. Der cDNA-Mix wurde photometrisch vermessen und die genaue Kopienzahl bestimmt. Danach wurde eine logarithmische Verdünnung des cDNA-Mixes hergestellt, die zur Real-Time PCR eingesetzt wurde.

#### Auswahl der primerspezifischen Temperaturoptima mittels PCR

Um die optimale Annealingtemperatur für die einzelnen Primerpaare zu ermitteln, wurde eine konventionelle Gradienten-PCR bei acht verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt. In den Vertiefungen des Heizblocks wurden jeweils folgende Temperaturen erreicht: 55.8°C, 57.8°C, 59.5°C, 61.4°C, 63.4°C, 65.4°C, 67.6°C, 69.8°C.

Der Reaktionsansatz für die PCR ist in Tabelle 13 dargestellt:

Tab. 3.3: PCR-Reaktionsansatz

<b>Mastermix für 9 Ansätze</b>	<b>9 x [µl]</b>
PCR- H <sub>2</sub> O	169.2
10x PCR buffer	22.5
MgCl <sub>2</sub>	13.5
dNTPs (je 10 mM)	4.5
Primer	4.5
Taq-Polymerase	1.8
Template	9.0

Pro Eppendorf PCR Tube wurden 25 µl MasterMix hinzugefügt, gemischt und zentrifugiert.

#### Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die Gradienten-PCR wurde zur Kontrolle der Qualität der isolierten DNA eine Gelelektrophorese durchgeführt. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung, welches in die Doppelhelix der DNA interkaliert, fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (254-366 nm), da der eingebaute Farbstoff durch UV-Licht angeregt wird.

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in einem 2%igen Agarosegel. Die hierfür benötigte Menge Agarose von 2g wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100ml TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) in einem Mikrowellengerät bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung auf Handwärme wurden 3 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt. Das Gel wurde blasenfrei in einen horizontalen Gelschlitten gegossen und durch Eintauchen eines Probekamms (12 Zähne) geformt. Die Elektrophoreskammer wurde dann mit TBE Puffer aufgefüllt bis das ausgehartete Gel knapp bedeckt war. Der Probenkamm wurde vorsichtig entfernt, und anschließend erfolgte das pipettieren der Taschen. Dazu wurden 5 µl PCR Produkt mit 1 µl Blaupuffer, der die Dichte erhöhte, gemischt in die Geltaschen gegeben. Ein Ultra Low Range DNA Ladder (25-300bp) wurde in eine separate Geltasche pipettiert und diente der Längenbestimmung der DNA-Fragmente.

Die Elektrophorese wurde über 30 Minuten bei 120 V Spannung durchgeführt. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel unter UV-Licht-Bestrahlung (100%) mit einer Digitalkamera aufgenommen und das Temperaturoptimum anhand des intensivsten Signals ermittelt.

#### Aufreinigung der PCR- Produkte

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels DyeEx Spin Kit von den nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf Gelfiltrationschromatographie. Die Auftrennung erfolgte nach der Größe, wobei große Moleküle passieren konnten, hingegen kleine zurückgehalten wurden. Hierfür wurden „Collection Tubes“ mit flüssigem Gelfiltrationsharz durch Zentrifugation bei 750 rcf für 3 Minuten von der flüssigen in die feste Phase überführt. Diese Kugeln bildeten die stationäre Phase. Die Harzsäule wurde in ein Tube transferiert. Der mobilen Phase entsprachen die PCR-Proben. Nach Auftragen von 20 µl PCR-Probe auf die Chromatographiesäule und Zentrifugation bei 750 rcf für 3 Minuten wurde der DNA-Anteil im Eluat gesammelt, wohingegen Salze, freie Nukleotide oder ungebundene Primer oder Polymerase-Reste in die Poren des Gels eindringen und dort verblieben.

### **3.2.5 Quantitative Real-Time-PCR im LightCycler**

Will man statt DNA mRNA aus Zellen oder Geweben quantifizieren, gerät man in Schwierigkeiten. Zwar kann man eine Reverse Transkription durchführen und die gewünschte cDNA anschließend über einen externen oder internen Standard quantifizieren, doch liefert das nur eine Aussage über die Menge an cDNA im Ansatz, nicht aber über die Menge an

mRNA im Ausgangsmaterial. Das Problem ist, dass die cDNA-Synthese höchst unterschiedlich verlaufen kann- ihre Effizienz liegt zwischen 5 und 90 %.

Deswegen verwendet man als externen Standard ein Haushaltsgen, welches in einer konstanten Menge exprimiert wird und bezieht die Menge an spezifischem Produkt dann auf dieses housekeeping gene.

#### Detektion der PCR Produkte

Der Nachweis der PCR Produkte erfolgte mithilfe des UPL-Systems (Universal Probe Library) von Roche.

Auf dem TaqMan-Prinzip basierend, wurde hierbei eine Sonde mit einer spezifischen Sequenz verwendet, welche in dem von den verwendeten Primern begrenzten DNA-Abschnitt bindet. Beim TaqMan-Prinzip sitzen ein mit dem fluoreszierenden Reporterfarbstoff Fluoreszein und ein Quencher auf demselben Oligonucleotid. Solange die Sonde intakt ist, wird die von außen zugeführte Energie vom angeregten Reporter, der sich am 5'-Ende befindet, zu dem benachbarten Quencher am 3'-Ende transferiert, ohne dass dabei Strahlung abgegeben wird, sog. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET. Im ersten Schritt der PCR lagern sich Sonde und Primer sequenzspezifisch an den Matrizen-Strang der cDNA an. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde Base für Base hydrolysiert wird, während das PCR-Produkt vollständig synthetisiert wird. Die dadurch bedingte räumliche Trennung von Reporter und Quencher und der unterbrochene FRET führen dazu, dass der von außen angeregte Reporterfarbstoff ein detektierbares Fluoreszenzsignal abstrahlt.

Die auf der Homepage der Firma Roche angebotene Plattform ermöglichte die Ermittlung der zu verwendenden Primersequenzen sowie der dazugehörigen Sonden.

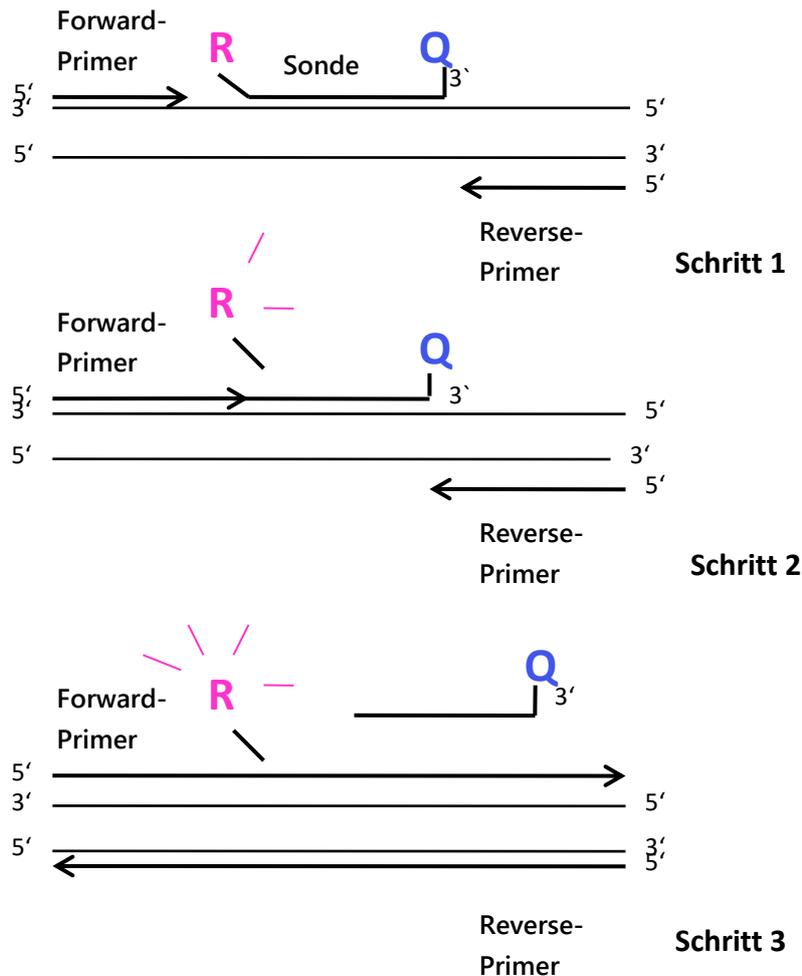


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der TaqMan-PCR [66]  
 Schritt 1: Bindung der Sonde. Die Fluoreszenz des Reporters (R) wird durch FRET vom Quencher (Q) unterdrückt  
 Schritt 2: Taq-Polymerase (5'-Nukleaseaktivität) spaltet während der Elongation den Reporter ab;  
 Schritt 3: Mit zunehmendem Abstand zwischen Reporter und Quencher nimmt die Intensität des fluoreszierenden Signals zu und wird aufgezeichnet.

### Datenanalyse TaqMan-RT-PCR

Es ergibt sich eine sigmoide Amplifikationskurve, in welcher die nach jedem Zyklus gemessenen Reportersignale gegen die Zykluszahl aufgetragen werden:

Zu Beginn der Amplifikation ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Primer, Template und Polymerase treffen, suboptimal, in der dritten Phase dagegen nimmt die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart zu, dass es zur Hemmung durch diese kommt, die Substrate werden verbraucht und die Polymerasen und Nucleotide gehen durch die Hitze zugrunde. Zwischen diesen beiden Phasen findet sich ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg der DNA-Fragmente. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz ist dann direkt proportional zur eingesetzten Template-Menge. Eine beispielhafte Darstellung eines erhaltenen Kurvenverlaufs gibt Abbildung 3.5.

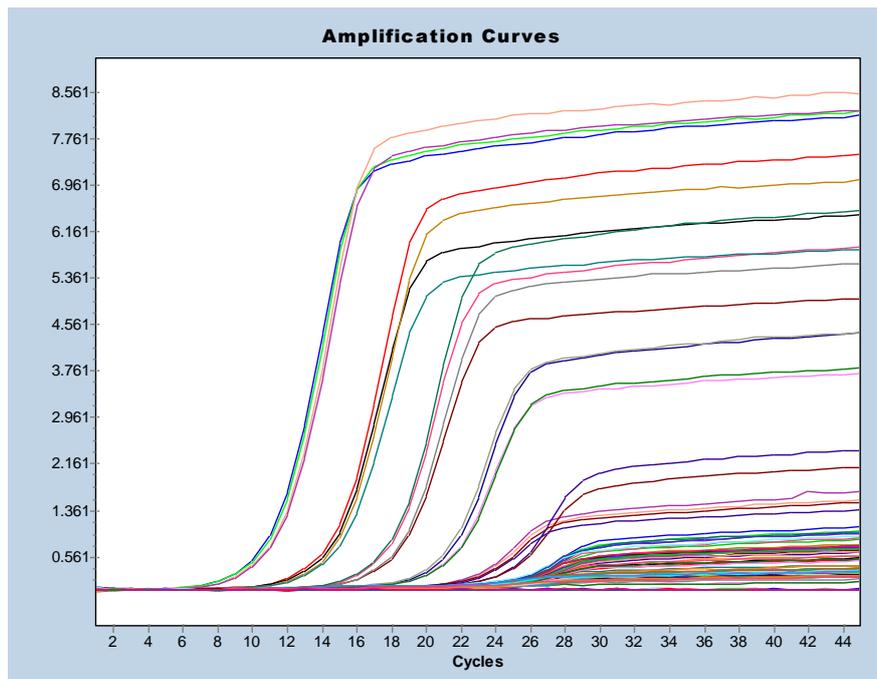


Abb. 3.5: AREG- Kurvenverlauf eines LightCycler Durchgangs

Mithilfe eines  $C_p$ -Werts (Crossing Point), welcher den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, wird immer am Anfang der exponentiellen Phase gemessen. Ein niedriger  $C_p$ -Wert geht mit einer höheren Ausgangskonzentration der in cDNA umgeschriebenen Ziel-mRNA einher. Um Unterschiede bei der Menge der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurde die Genexpression der Zielgene Amphiregulin und Epiregulin auf einen Housekeeping-Index der nicht regulierten Gene  $\beta$ -Actin und GAPDH derselben Proben bezogen.

#### LightCycler RT-PCR Experimente

Die Proben für die Light Cycler Analyse wurden auf Eis unter einer Sterilbank vorbereitet. In auf Eis gekühlte PCR-Platten wurden je Well 8  $\mu$ l Master Mix, sowie 2  $\mu$ l cDNA-Matrize pipettiert. Der Mastermix für eine Platte mit 24 Proben, am Beispiel der Expressionsanalyse von EREG, setzte sich zusammen aus:

Tab. 3.4: RT- qPCR Reaktionsansatz

<b>Ansatz für 70 Proben</b>		
UPL # 86		7 $\mu$ l
Roche Probes Master		350 $\mu$ l
A 2264 (100 $\mu$ M)	bei 900:	6.3 $\mu$ l
A 2265 (100 $\mu$ M)	bei 300:	2.1 $\mu$ l
PCR- Wasser	bei 900 300:	194.6 $\mu$ l

Der Probes Master enthielt neben den Nukleotiden (dUTP anstatt dTTP) die HotStart-Polymerase. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O (PCR Reinheit) verwendet und als Standard für die Quantifizierung der jeweiligen PCR Produkte diente eine 1:10 Verdünnungsreihe mit definierter Kopienzahl. Es wurden zwei Replikate von jeder Probe und jeder Verdünnungsstufe in der Standardkurve verwendet.

Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und für 10 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert. Im LightCycler wurden 45 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C und einer Elongations-Temperatur von 72°C durchgeführt.

#### **3.2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Zum quantitativen Nachweis des EGF-Rezeptors im Zellkern wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in Kooperation mit Herrn PD Daniel Neureiter, Salzburger Landeskliniken Universitätsklinikum, durchgeführt.

Initial wurden die zellulären Proteine durch Proteasen aufgespalten, damit die Hybridisierungssonden in die Zelle und den Zellkern eindringen konnten. Die Denaturierung zellulärer DNA durch Kombination von Hitze, Formamid und Säure führte zur Öffnung des DNA-Doppelstranges. Die fluoreszenzmarkierten Sequenzen der FISH Probe lagerten sich im nächsten Schritt an die komplementäre Stelle der betreffenden Chromosomen an. Überschüssige Probenanteile wurden nach der Hybridisierung durch einen Waschschrift entfernt und man band an die verbliebenen Sonden einen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper.

Die markierten Sonden waren nun unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop sichtbar, das mit einem geeigneten Rot- und Grün-Multi-Bandpass-Filterset ausgestattet war. Für den Nachweis einer spezifischen Genamplifikation benötigte man eine Sonde des nachzuweisenden Gens und eine weitere Sonde, mit der die Zentromerregion des Chromosoms nachgewiesen werden konnte. So war es möglich, die Häufigkeit der roten und grünen Signale zu bestimmen und den Quotienten zu ermitteln. Dabei entsprach jeweils ein grünes Signal einem EGFR-Genamplikon, ein rotes Signal markierte dagegen jeweils die zugehörige Zentromerregion des Chromosoms 7. Von jedem Präparat wurde eine durchschnittliche Gen-Signalzahl (gene copy number, GCN) und das durchschnittliche Verhältnis von EGFR-Gen zu Chromosom 7 (EGFR/Chromosom 7) berechnet.

#### **3.2.7 Statistische Berechnungen**

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Häufigkeiten wurden mit Kreuztabellen bewertet, zur Überprüfung von Korrelationen zwischen klinischen Parametern und experimentell ermittelten Ergebnissen, wurde der zweiseitige Fisher exact Test angewandt.

Zur Trennung der Tumoren, bei der die Expression der untersuchten Genen hoch- bzw. niedrigreguliert wurde, sowie zur Bestimmung des prädiktiven Wertes der EGFR-Genkopienzahl wurde der Median ermittelt.

Kaplan-Meier-Kurven zeigen Unterschiede im Gesamtüberleben, beginnend vom Zeitpunkt der Randomisierung, zwischen Patienten mit über oder unter dem Median gelegenen Werten. Alle Patienten, die nicht tumorbedingt verstorben waren oder weggezogen waren, wurden als

zensierte Daten behandelt. Die Methode nach Kaplan-Meier berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind, aber für ein Maximum von fünf Jahren. Ebenfalls mit der Methode nach Kaplan-Meier wurde das progressionsfreie Überleben berechnet.

Unterschiede bezüglich der Überlebenskurven wurden mit dem Log-rank-Test bestimmt.

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und ein Alpha von  $p \leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Analyse des Ansprechens und des Überlebens

Von Januar 2007 bis September 2012 wurden 752 Patienten in die FIRE-3 Studie rekrutiert und in zwei Behandlungsarme randomisiert. Seit Oktober 2008 wurde die anti-EGFR Behandlung auf Patienten mit KRAS Exon-2 Wildtyp Tumoren eingeschränkt.

Die Intention-to-treat Population umfasste 592 KRAS-Wt (Exon 2) Patienten. Davon wurden 297 Patienten in Arm A (FOLFIRI+ Cetuximab) und 295 Patienten Arm B (FOLFIRI+ Bevacizumab) randomisiert. Es standen 488 Tumorproben zur Verfügung, in 407 Proben (69%) war die Analyse aller RAS-Mutationen (KRAS Exon 2, 3, 4 und NRAS Exon 2, 3, 4) möglich.

Die Ergebnisse der FIRE-3 Studie wurden kürzlich publiziert [33]. Zusammengefasst ergaben sich folgende Effektivitätsdaten:

Die overall response rate (ORR, Summe aus kompletter und partieller Remission) war 62% (95% KI: 56.2-67.5) im FOLFIRI plus Cetuximab Arm, 58,0% (95% KI: 52.1-63.7) im FOLFIRI plus Bevacizumab Arm (einseitiger Fisher Exakt Test  $p=0.18$ ). Das progressionsfreie Überleben lag bei 10 (95% KI 8.8-10.8) Monaten in Arm A und 10.3 (95% KI 9.8-11.3) Monaten in Arm B (Logrank-Test  $p=0.55$ ) und das Gesamtüberleben betrug 28.7 (95% KI 24.0-36.6) Monate in der Cetuximab Gruppe, im Gegensatz zu 25.0 (95 KI 22.7-27.6) Monate in der Bevacizumab Gruppe ( $p= 0.017$ ).

In der RAS-Mt-Subgruppe, bestehend aus 113 Patienten mit KRAS-Mutation auf Exon 2 und weiteren 65 Patienten mit „neuen“ RAS-Mutationen, konnte bezüglich der ORR und des OS kein Unterschied zwischen den zwei Therapieregimes beobachtet werden. Patienten mit Bevacizumab wiesen ein im Trend längeres PFS (10.1 Monate) als mit Cetuximab (7.5 Monate,  $p=0.085$ ) auf.

In der RAS-Wt Gruppe (342 Patienten) zeigte sich dagegen ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von 7.5 Monaten im FOLFIRI + Cetuximab Arm mit 33.1 Monaten (95% KI: 24.5-39.4) gegenüber 25.6 Monaten (95% KI: 22.7-28.6;  $p=0.011$ ) im FOLFIRI + Bevacizumab Arm.

Die Charakteristika der Patienten sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tab. 4.1: Patientencharakteristika der Gesamtpopulation und der untersuchten Population

<b>Charakteristika</b>	<b>KRAS-Wt Exon 2 Population</b>	<b>Untersuchte RAS Population</b>
<b>Patienten (n)</b>	592	407
<b>Geschlecht</b>		
Weiblich	30.7%	31.7%
Männlich	69.3%	68.3%
<b>Alter</b>		
Median	64.0	64.0
> 65 Jahre	46.3%	49.4%
<b>Lokalisation des Primarius</b>		
Kolon	58.3%	59.2%
Rektum	37.2%	36.4%
Kolon & Rektum	3.5%	3.7%
<b>frühere Therapie</b>		
adj. Chemotherapie	20.6%	18.7%
Bestrahlung	13.4%	11.6%
Operation	82.6%	85.5%

## 4.2 Verteilung der AREG/EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit vom RAS-Status

Der Kurvenverlauf der amplifizierten PCR Produkte entsprach einer logarithmischen Verteilung mit einer steilen log-Phase, so dass für die Proben ein crossing point ermittelt werden konnte. Durch den Vergleich zwischen Referenzgenen (GAPDH und  $\beta$ -Actin) und dem Zielgen (AREG, EREG) konnte der relative mRNA-Gehalt berechnet werden.

Von insgesamt 445 Tumoren wurde die RNA extrahiert, hiervon zeigten bei EREG 338 und bei AREG 405 Proben eine ausreichende Qualität der RNA: Werte mit einer Standardabweichung von <75% in der Summe der Standardabweichungen von  $\beta$ -Actin und AREG bzw EREG wurden ebenso ausgeschlossen wie Proben, bei denen der  $C_p$ -Wert bei >35 lag. Da hier von einer zu geringen Menge an RNA auszugehen ist. Insgesamt wurden bei EREG 24% (107 Proben) und bei AREG 16.5% (40 Proben) von 445 Proben nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen.

Der relative mRNA-Gehalt von AREG ohne RAS-Mutation erreichte Werte im Bereich von 0.07 bis 2938.77, der Median lag bei 45.02.

Der relative mRNA-Gehalt von EREG erstreckte sich über einen Bereich von 2.91 bis 69274.3 in der RAS-Wildtyp Subgruppe. Der Median lag hier bei 315.94.

Bei EGFR-FISH lag das Minimum bei 0.67, das Maximum bei 1.39. Interessanterweise waren die Mediane für EGFR zwischen RAS-Wt und RAS-Mt nicht gleich ( $p=0.001$ ).

Einen Überblick über die erhaltenen Medianwerte gibt die nachfolgende Tabelle.

Tab. 4.2 Mediane in Abhängigkeit vom RAS-Status

	Gesamt		RAS-Wt		RAS-Mt		p*
	N	Median	n	Median (95% KI)	N	Median (95% KI)	
<b>AREG</b>	405	44.65	276	45.02 (37.25-66.89)	109	42.14 (24.66-62.15)	0.974
<b>EREG</b>	338	267.21	221	315.94 (230.4-430.0)	98	214.87 (127.5-352.5)	0.194
<b>EGFR</b>	150	1.03	62	1.00 (0.939-1.014)	87	1.05 (1.032-1.069)	0.001

p\*= Wilcoxon Test p

### 4.3 Verteilung der AREG/EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit vom BRAF-Status

Bei Betrachtung der AREG/EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit vom BRAF-Status, konnte man signifikante Unterschiede bezüglich der AREG-Expression feststellen:

Tab. 4.3 Mediane in Abhängigkeit vom BRAF-Status

	BRAF-Wt		BRAF-Mt		p*
	N	Median (95% KI)	n	Median (95% KI)	
<b>AREG</b>	362	54.29 (42.14-67.71)	37	9.96 (3.89-23.90)	<0.001
<b>EREG</b>	311	282.18 (216.6-399.0)	23	113.81 (65.4-1070.8)	0.387
<b>EGFR</b>	137	1.03 (1.01-1.04)	9	1.01 (0.88-1.18)	0.491

p\*= Wilcoxon Test p

## 4.4 Verteilung der AREG/ EREG und EGFR-Expression in Abhängigkeit von der primären Tumorlokalisation

Betrachtet man die Verteilung der Expression der EGFR-Liganden und des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von der primären Tumorlokalisation im Enddarm (Hindgut) oder Mitteldarm (Midgut), so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede wie die nachfolgende Tabelle zeigt:

Tab. 4.4 Mediane in Abhängigkeit von der prim. Tumorlokalisation

	Hindgut		Midgut		p*
	N	Median (95% KI)	n	Median (95% KI)	
<b>AREG</b>	306	50.02 (37.16-65.56)	95	35.99 (23.89-53.55)	0.181
<b>EREG</b>	256	269.28 (211.9-403.0)	78	294.09 (125.6-496.2)	0.131
<b>EGFR</b>	116	1.030 (1.01-1.05)	34	1.014 (0.95-1.05)	0.330

p\*= Wilcoxon Test p

## 4.5 Korrelationen der Liganden-Expression mit dem Ansprechen

### 4.5.1 Amphiregulin in der RAS-Wildtyp Subgruppe

Bei Betrachtung der RAS-Wt Subgruppe ließ sich bei AREG-Werten oberhalb des Median eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen (ORR 82.8 % vs. 73.6 %, p=0.054) und einer längeren medianen krankheitsfreien Zeit (PFS 11.3 Monate vs. 9.7 Monate, p=0.101) feststellen. Im OS zeigten die Patienten mit 30.8 Monaten ein längeres Überleben als Patienten mit einer AREG-mRNA-Expression unterhalb des Medians mit 24.5 Monaten. Diese Abweichung war statistisch signifikant (Log Rank: p=0.048).

Tab. 4.5: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt

AREG RAS- Wt	Median		p
	low (n=119)	high (n=126)	
<b>CR</b>	2.2%	5.7%	0.199
<b>PR</b>	52.9%	61.4%	
<b>SD</b>	27.9%	18.6%	
<b>PD</b>	4.4%	4.3%	
<b>ORR</b>	63.0%	74.6%	0.054

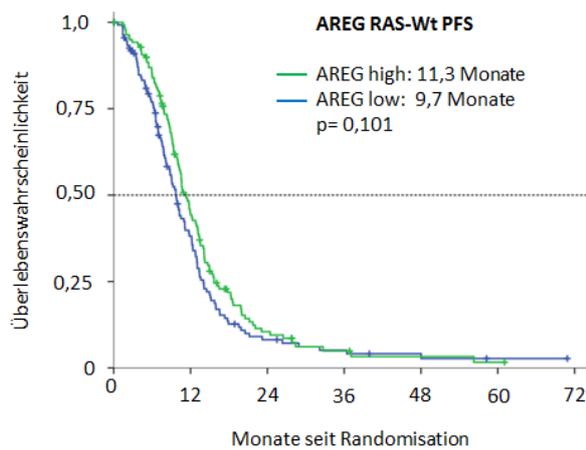


Abb. 4.1: Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt

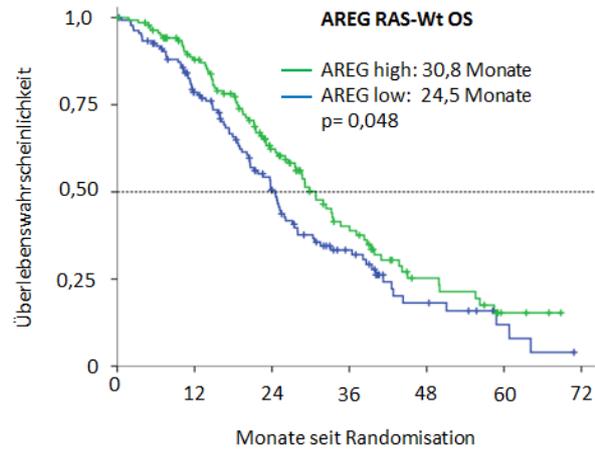


Abb. 4.2 Gesamtüberleben bei RAS-Wt

Betrachtet man die Population getrennt nach Behandlungsarmen, bleibt die statistische Signifikanz im OS nur in Arm A erhalten.

Patienten in Arm A (FOLFIRI + Cetuximab) mit einem größeren Verhältnis von AREG zu den Referenzgenen zeigen ein längeres OS (39.4 Monate vs. 24.6 Monate,  $p=0.043$ ) und einen Trend zu einem längeren PFS (11.8 Monate vs. 9.5 Monate,  $p=0.078$ ).

In Arm B (FOLFIRI + Bevacizumab) zeigt sich eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen der Patienten mit hohen AREG-Werten (ORR: 67.6 % vs. 54.5%,  $p=0.156$ ) und annähernd gleichem PFS (10.7 Monate vs. 9.8 Monate bei niedrigen AREG-Werten,  $p=0.520$ ).

Tab. 4.6: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A

AREG Arm A	Median		p
	low (n=53)	high (n=58)	
CR	3.1%	10.1%	0.137
PR	57.8%	59.4%	
SD	18.8%	7.2%	
PD	3.1%	15.9%	
ORR	73.6%	82.8%	0.258

Tab. 4.7: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm B

AREG Arm B	Median		p
	low (n=66)	high (n=68)	
CR	1.4%	1.4%	0.334
PR	48.6%	63.4%	
SD	36.1%	29.6%	
PD	5.6%	1.4%	
ORR	54.5%	67.6%	0.156

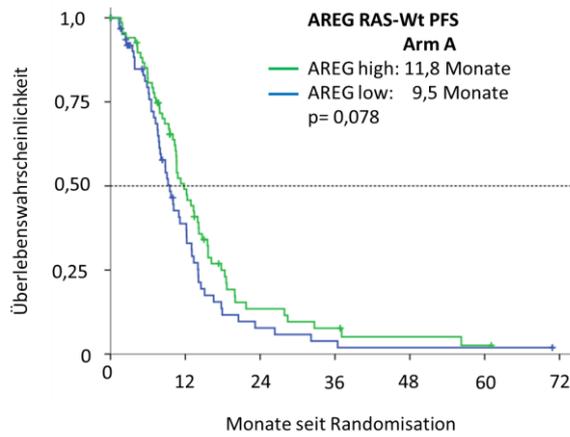


Abb. 4.3: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt

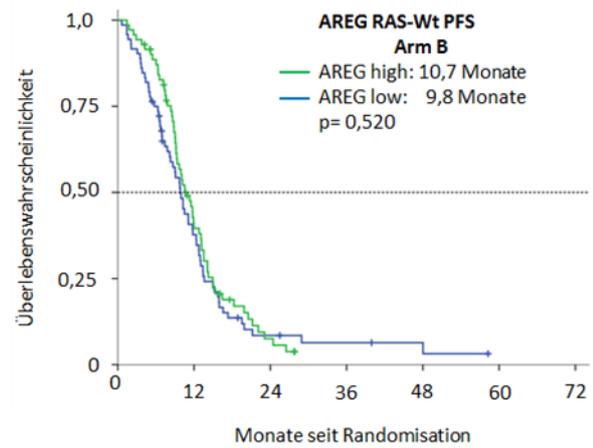


Abb. 4.4: Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Wt

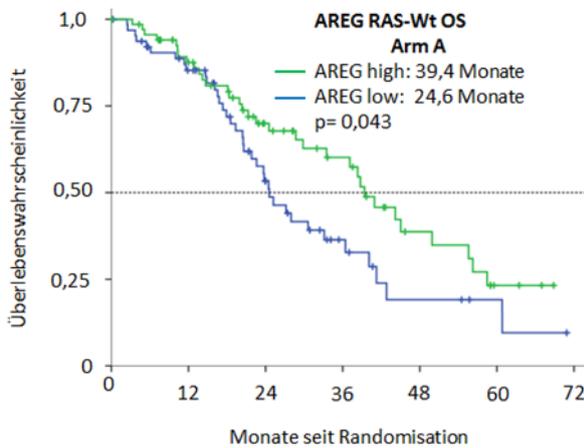


Abb. 4.5: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt

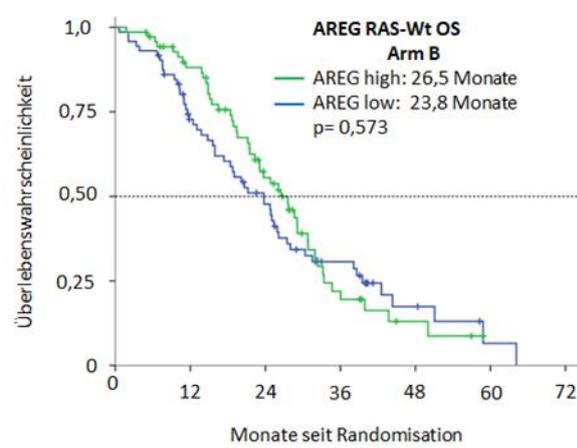


Abb. 4.6 Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Wt

Trennte man nach AREG niedrig- und hochreguliert und betrachtete die beiden Arme, so zeigte sich bei hochreguliertem AREG im Cetuximab-Arm eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen (82.8% vs. 67.6%,  $p=0.065$ ), sowie ein signifikant längeres Gesamtüberleben (39.4 Monate vs. 26.5 Monate,  $p=0.005$ ) als im Bevacizumab Arm. Bei niedrigreguliertem AREG ließ sich ein signifikant besseres Ansprechen im Cetuximab-Arm (73.6% vs. 54.5%,  $p=0.037$ ) eruieren.

## 4 Ergebnisse

Tab. 4.8: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei hohem AREG

AREG high	Arm		p
	A (n=58)	B (n=68)	
CR	10.1%	1.4%	<0.001
PR	59.4%	63.4%	
SD	7.2%	29.6%	
PD	7.2%	1.4%	
ORR	82.8%	67.6%	0.065

Tab. 4.9: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei niedrigem AREG

AREG low	Arm		p
	A (n=53)	B (n=66)	
CR	3.1%	1.4%	0.124
PR	57.8%	48.6%	
SD	18.8%	36.1%	
PD	3.1%	5.6%	
ORR	73.6%	54.5%	0.037

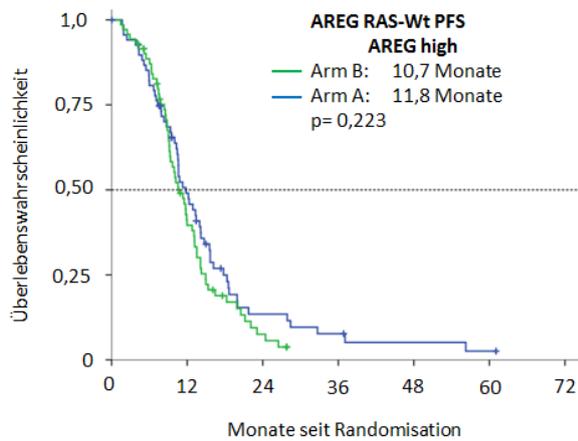


Abb. 4.7: Progressionsfreies Überleben bei hohem AREG bei RAS-Wt

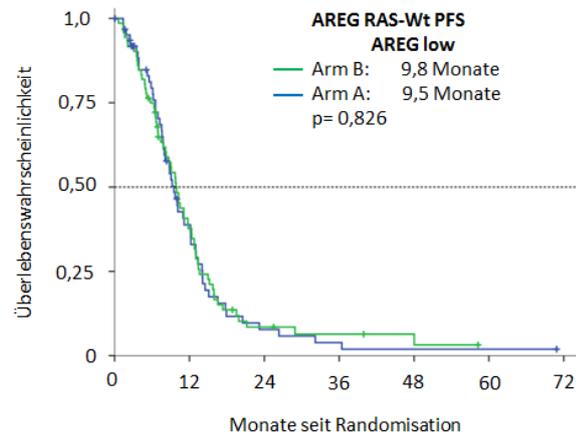


Abb. 4.8: Progressionsfreies Überleben bei niedrige AREG bei RAS-Wt

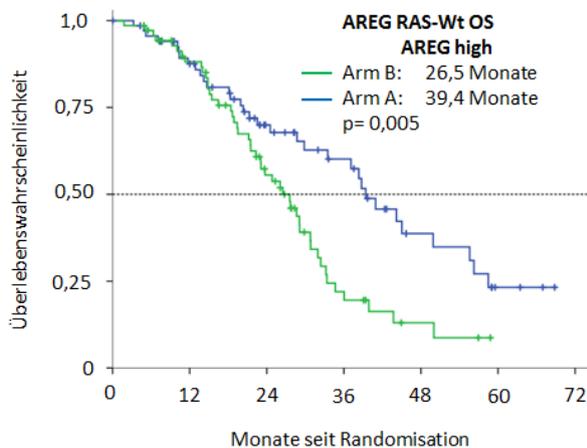


Abb. 4.9: Gesamtüberleben bei hohem AREG bei RAS-Wt

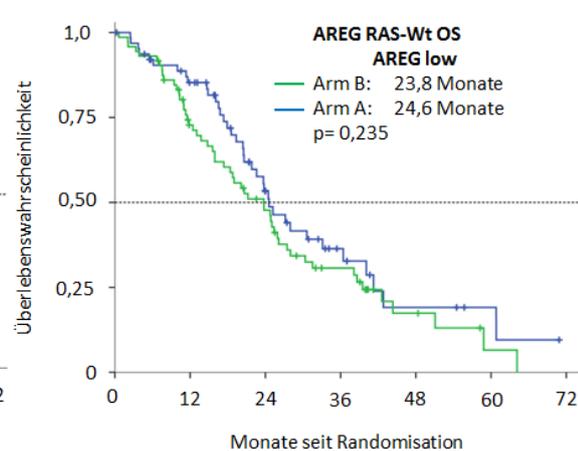


Abb. 4.10: Gesamtüberleben bei niedrige AREG bei RAS-Wt

#### 4.5.2 Amphiregulin in der RAS & BRAF-Wildtyp Subgruppe

Da die AREG-Expression signifikant unterschiedlich zwischen BRAF-Wt und BRAF-Mt war, wurde das Ansprechen auch für die RAS & BRAF-Wildtyp Population untersucht.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben, lediglich eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen bei hohen AREG-Werten (ORR: 76.7% vs. 66.0%,  $p=0.093$ ).

Tab. 4.10: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt

AREG RAS & BRAF- Wt	Median		p
	low (n=53)	high (n=58)	
CR	0.9%	6.0%	0.019
PR	56.5%	63.2%	
SD	29.6%	18.0%	
PD	0.0%	3.0%	
ORR	66.0%	76.7%	0.093

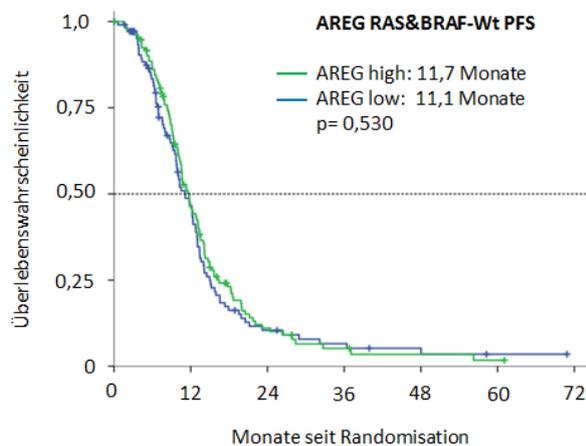


Abb. 4.11: Progressionsfreies Überleben bei RAS & BRAF-Wt

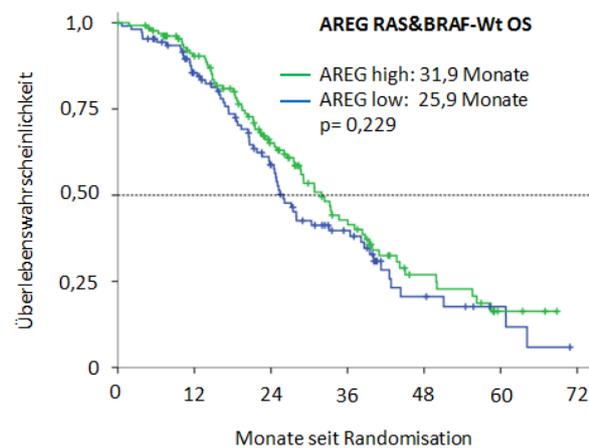


Abb. 4.12: Gesamtüberleben bei RAS & BRAF-Wt

Getrennt nach Behandlungsarmen zeigte sich im FOLFIRI + Cetuximab Arm eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen und längerem PFS, sowie ein signifikant verlängertes Überleben bei hohen AREG-Werten (OS: 44.2 Monate vs. 25.2 Monate,  $p=0.034$ ).

Im FOLFIRI + Bevacizumab Arm zeigten sich bei hohen AREG-Werten ein ähnliches Ansprechen und Überleben wie bei niedrigen AREG-Werten.

Tab. 4.11: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt in Arm A

AREG Arm A	Median		p
	low (n=44)	high (n=54)	
CR	0.0%	10.9%	0.013
PR	60.4%	60.9%	
SD	22.6%	7.8%	
PD	0.0%	4.7%	
ORR	72.7%	85.2%	0.140

Tab. 4.12: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt in Arm B

AREG Arm B	Median		p
	low (n=50)	high (n=66)	
CR	1.8%	1.4%	0.486
PR	52.7%	65.2%	
SD	36.4%	27.5%	
PD	0.0%	1.4%	
ORR	60.0%	69.7%	0.326

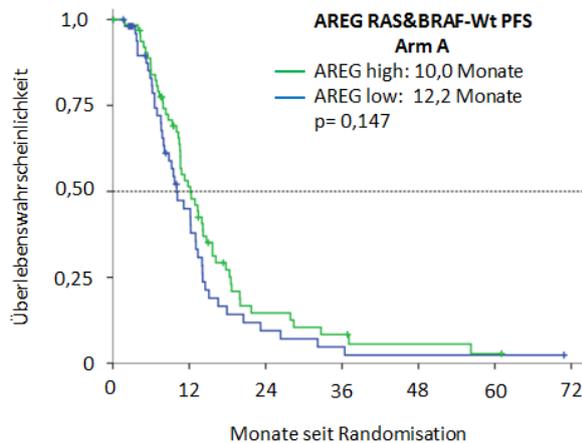
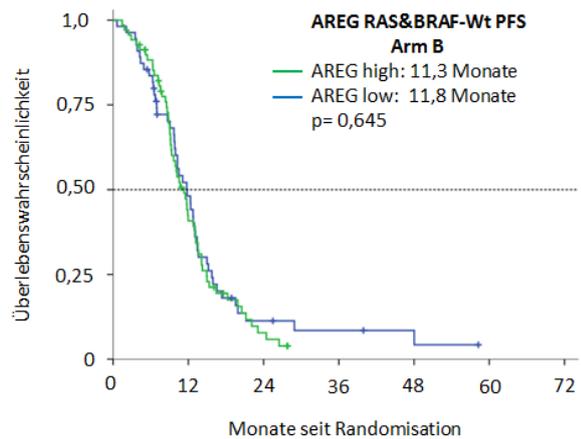


Abb. 4.13: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS & BRAF-Wt



4.14: Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS & BRAF-Wt

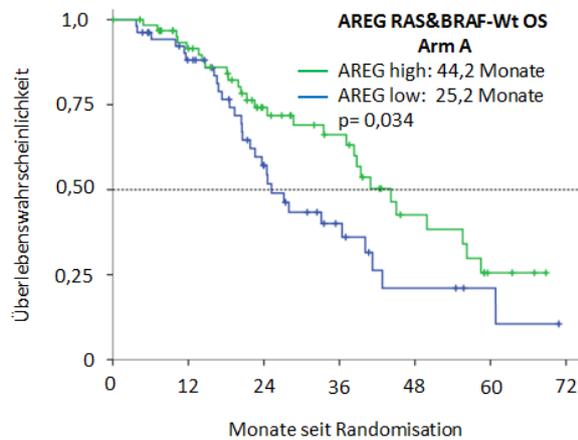


Abb. 4.15: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS & BRAF-Wt

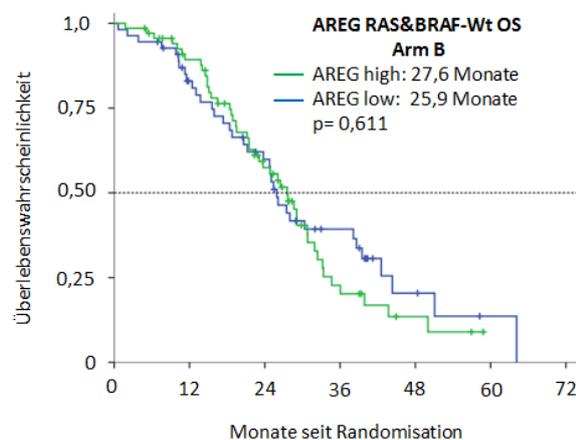


Abb. 4.16: Gesamtüberleben in Arm B bei RAS & BRAF-Wt

Betrachtete man die RAS & BRAF-Wt Subgruppe nach AREG niedrig- und hochreguliert, so fiel bei hohen AREG-Werten in Arm A eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen, sowie ein verlängertes Gesamtüberleben gegenüber Arm B auf (OS: 44.2 Monate vs. 27.6 Monate,  $p=0.001$ ). Bei niedrigreguliertem AREG glichen Ansprechen und Überleben in Arm A dem in Arm B.

## 4 Ergebnisse

Tab. 4.13: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt bei hohem AREG

AREG high	Arm		p
	A (n=54)	B (n=66)	
CR	10.9%	1.4%	0.001
PR	60.9%	65.2%	
SD	7.8%	27.5%	
PD	4.7%	1.4%	
ORR	85.2%	69.7%	0.053

Tab. 4.14: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt bei niedrigem AREG

AREG low	Arm		p
	A (n=44)	B (n=50)	
CR	0.0%	1.8%	0.235
PR	60.4%	52.7%	
SD	22.6%	36.4%	
PD	0.0%	0.0%	
ORR	72.7%	60.0%	0.275

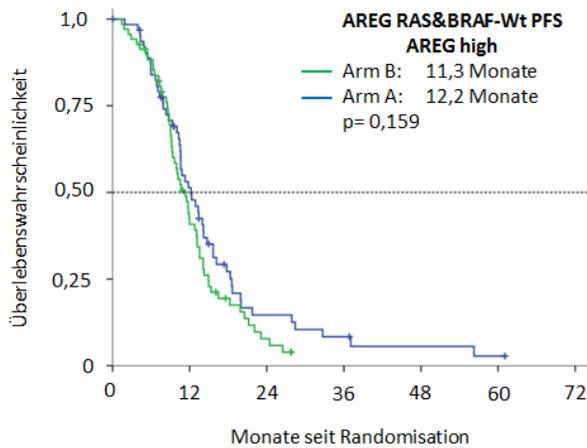


Abb. 4.17: Progressionsfreies Überleben bei hohem AREG bei RAS & BRAF-Wt

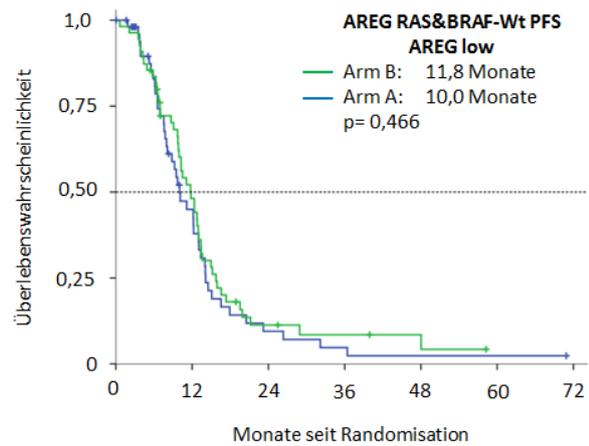


Abb. 4.18: Progressionsfreies Überleben bei niedrigem AREG bei RAS & BRAF-Wt

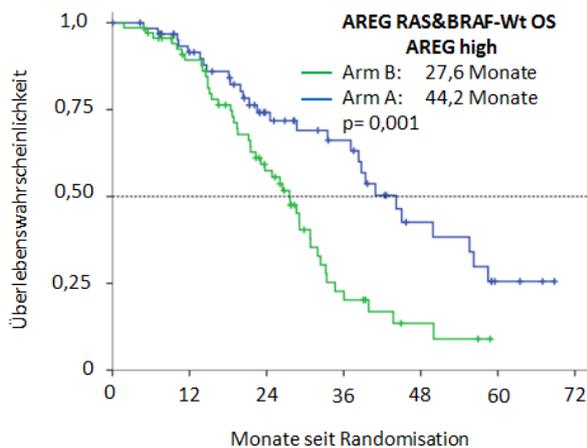


Abb. 4.19: Gesamtüberleben bei hohem AREG bei RAS & BRAF-Wt

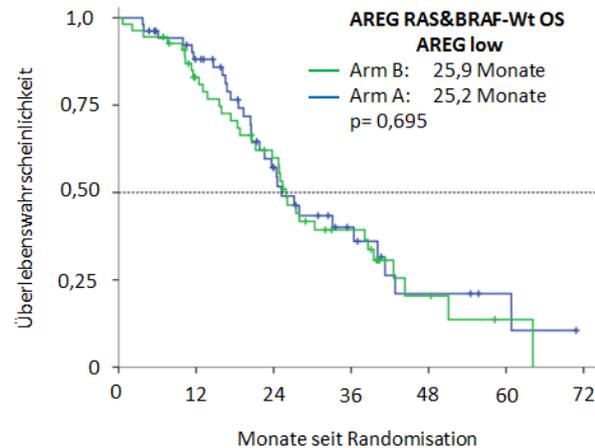


Abb. 4.20: Gesamtüberleben bei niedrige AREG bei RAS & BRAF-Wt

### 4.5.3 Amphiregulin in der RAS mutierten Subgruppe

In der Subgruppe mit RAS-Mutation zeigten Patienten mit höheren AREG-Werten im OS (AREG  $\geq$  Median vs. AREG < Median 20.6 vs. 21.5 Monate,  $p=0.554$ ) und PFS (AREG  $\geq$  Median vs. AREG < Median 10.1 vs 8.9 Monate,  $p=0.530$ ) ein ähnliches Überleben und Ansprechen wie Patienten mit niedrigen AREG-Werten.

Tab. 4.15: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt

AREG RAS- Mt	Median		P
	low (n=46)	high (n=48)	
CR	3.7%	3.7%	0.973
PR	40.7%	46.3%	
SD	31.5%	29.6%	
PD	9.3%	9.3%	
ORR	52.2%	56.3%	0.836

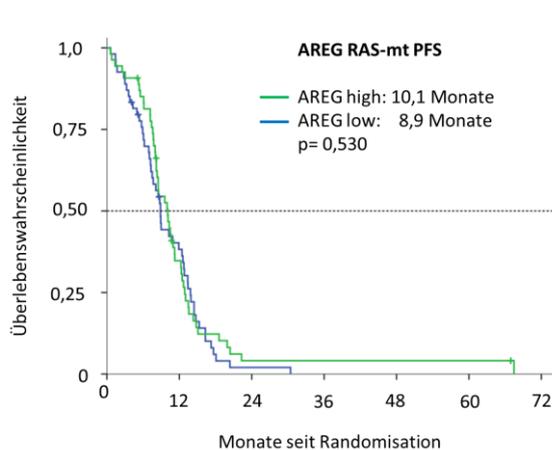


Abb. 4.21: Progressionsfreies Überleben bei RAS-Mt

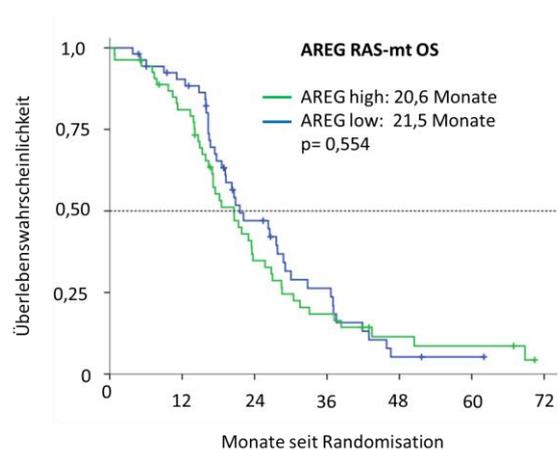


Abb. 4.22: Gesamtüberleben bei RAS-Mt

Betrachtet man die Subgruppe mit RAS-Mutation getrennt nach Behandlungsarmen, so trennt der Median auch hier nicht signifikant.

Sowohl in Arm A als auch in Arm B zeigten sich weder im Ansprechen noch im Überleben deutliche Unterschiede zwischen niedrigen und hohen AREG-Werten.

Tab. 4.16: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A

AREG Arm A	Median		p
	low (n=26)	high (n=19)	
CR	0.0%	4.3%	0.721
PR	33.3%	34.8%	
SD	30.3%	34.8%	
PD	15.2%	8.7%	
ORR	42.3%	47.4%	0.770

Tab. 4.17: Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm B

AREG Arm B	Median		p
	low (n=20)	high (n=29)	
CR	9.5%	3.2%	0.523
PR	52.4%	54.8%	
SD	33.3%	25.8%	
PD	0.0%	9.7%	
ORR	65.0%	62.1%	>0.99

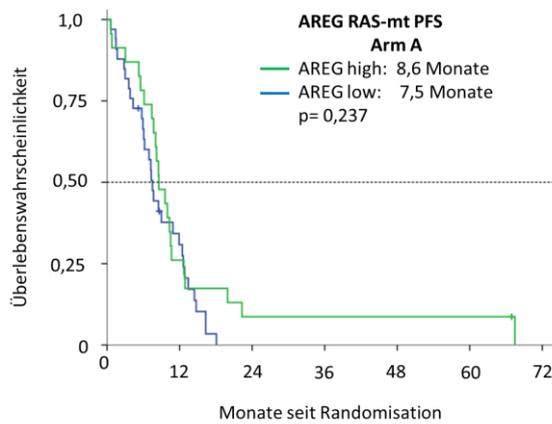


Abb. 4.23: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt

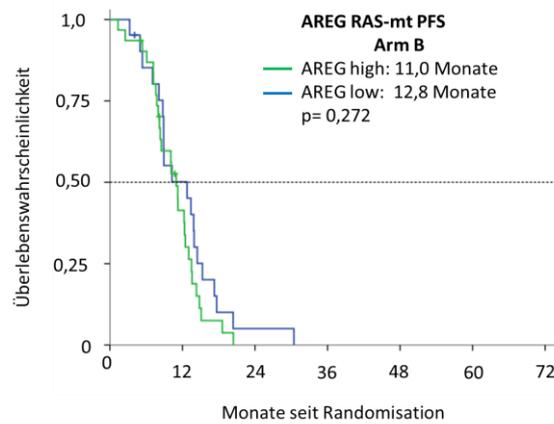


Abb. 4.24: Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Mt

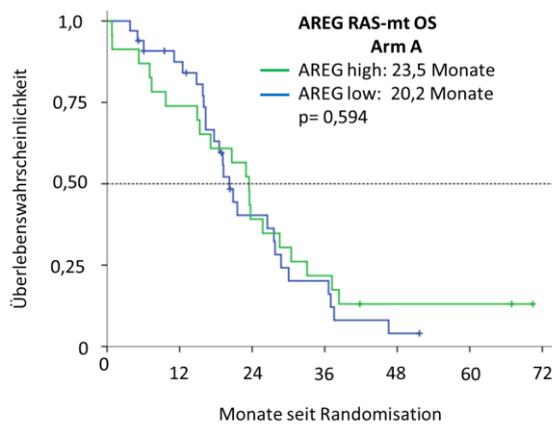


Abb. 4.25: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt

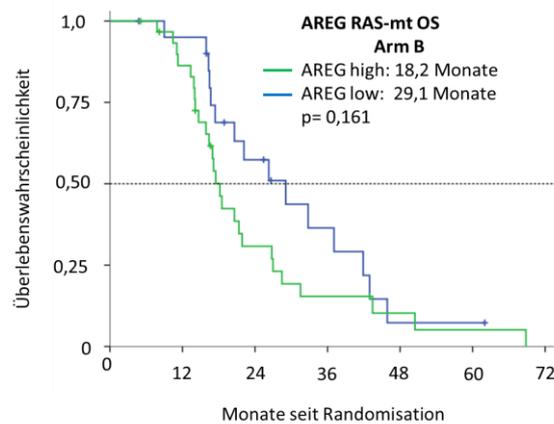


Abb. 4.26: Gesamtüberleben in in Arm B bei RAS-Mt

#### 4.5.4 Epiregulin in der RAS-Wildtyp Subgruppe

Bei Betrachtung der RAS-Wt Subgruppe ließ sich kein Unterschied zwischen dem Ansprechen, sowie dem Gesamtüberleben und der EREG-Expression feststellen.

Beim progressionsfreien Überleben zeigte sich eine Tendenz zu einem längeren Überleben bei hohen EREG-Werten (12.3 Monate vs. 10.2 Monate, p=0.064).

Tab. 4.18: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt

EREG RAS- Wt	Median		P
	low (n=91)	high (n=104)	
<b>CR</b>	4.8%	3.4%	0.829
<b>PR</b>	54.8%	62.4%	
<b>SD</b>	24.0%	20.5%	
<b>PD</b>	3.8%	2.6%	
<b>ORR</b>	68.1%	74.0%	0.428

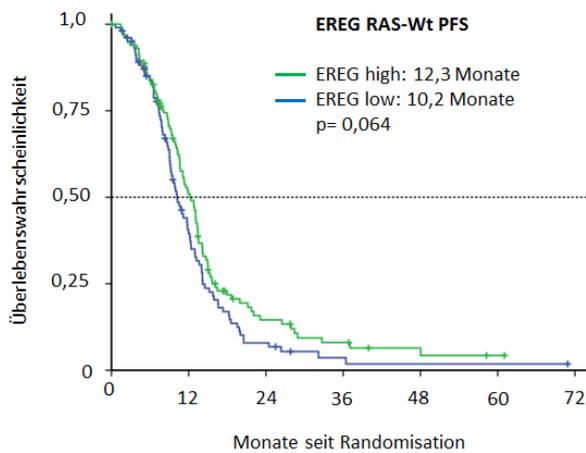


Abb. 4.27: Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt

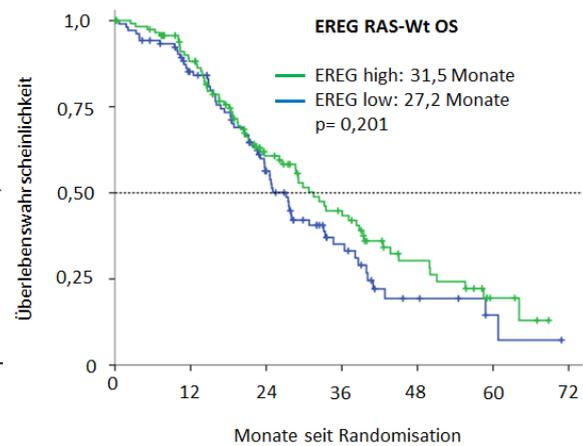


Abb. 4.28: Gesamtüberleben bei RAS-Wt

Getrennt nach Behandlungsarmen ergab sich in Arm A (FOLFIRI + Cetuximab) kein Unterschied, weder im Ansprechen noch im Überleben.

In Arm B zeigte sich eine Tendenz zu einer besseren ORR (EREG < Median vs. EREG  $\geq$  Median 56.9% vs. 66.7%,  $p=0.198$ ) und einem längeren OS (EREG < Median vs. EREG  $\geq$  Median 24.8 Monate vs. 29.1 Monate,  $p=0.142$ ), sowie ein statistisch signifikantes längeres progressionsfreies Überleben (EREG < Median vs. EREG  $\geq$  Median 9.8 Monate vs. 12.8 Monate,  $p=0.032$ ).

Tab. 4.19: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A

EREG Arm A	Median		p
	low (n=40)	high (n=47)	
CR	8.3%	6.8%	0.979
PR	60.4%	59.3%	
SD	10.4%	8.5%	
PD	4.2%	5.1%	
ORR	82.5%	83.0%	>0.99

Tab. 4.20: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm B

EREG Arm B	Median		p
	low (n=51)	high (n=57)	
CR	1.8%	0.0%	0.127
PR	50.0%	65.5%	
SD	35.7%	32.8%	
PD	3.6%	0.0%	
ORR	56.9%	66.7%	0.326

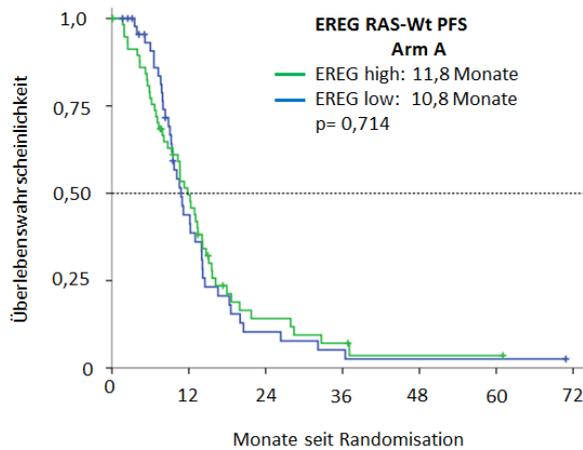


Abb. 4.29: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt

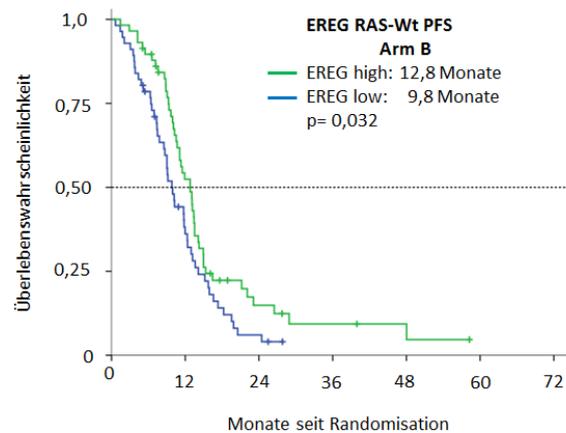


Abb. 4.30: Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Wt

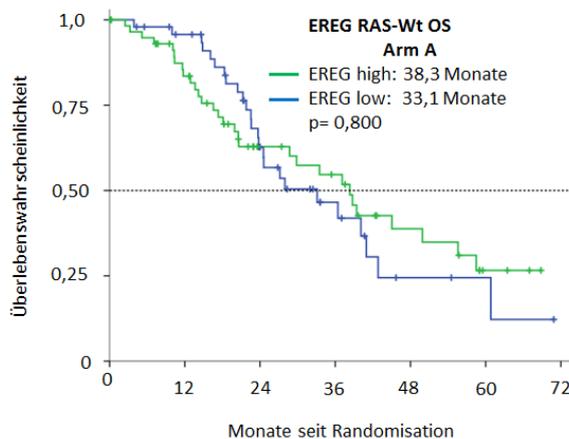


Abb. 4.31: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt

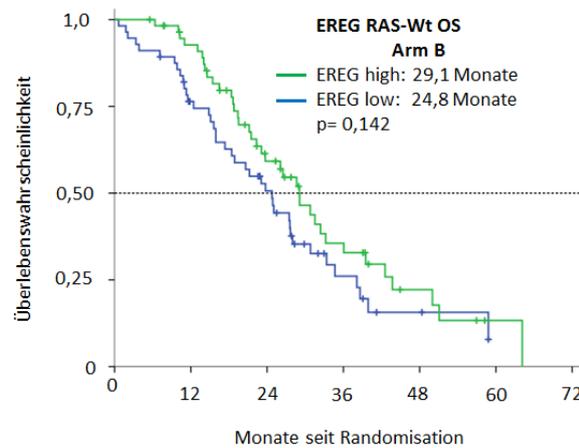


Abb. 4.32: Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Wt

Trennte man nach EREG < Median und EREG ≥ Median und betrachtete die beiden Arme (Arm A: FOLFIRI + Cetuximab und Arm B: FOLFIRI + Bevacizumab), so ergab sich in der Behandlung mit Cetuximab (Arm A) jeweils ein besseres Ansprechen und längeres Gesamtüberleben, welches bei niedrigen EREG-Werten (ORR: 82.5% vs. 56.9%, p=0.012; OS: 33.1 Monate vs. 24.8 Monate, p=0.033) jeweils das Signifikanzniveau erreichte.

## 4 Ergebnisse

Tab. 4.21: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei hohem EREG

EREG high	Arm		p
	A (n=47)	B (n=57)	
CR	6.8%	0.0%	<0.001
PR	59.3%	65.5%	
SD	8.5%	32.8%	
PD	5.1%	0.0%	
ORR	83.0%	66.7%	0.074

Tab. 4.22: Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei niedrigem EREG

EREG low	Arm		p
	A (n=40)	B (n=51)	
CR	8.3%	1.8%	0.027
PR	60.4%	50.0%	
SD	10.4%	35.7%	
PD	4.2%	3.6%	
ORR	82.5%	56.9%	0.012

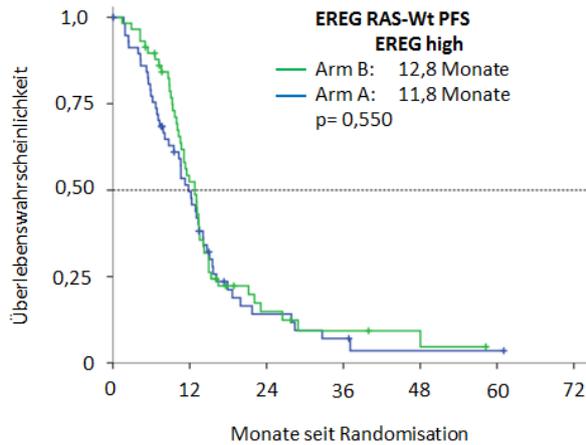


Abb. 4.33: Progressionsfreies Überleben bei hohem EREG bei RAS-Wt

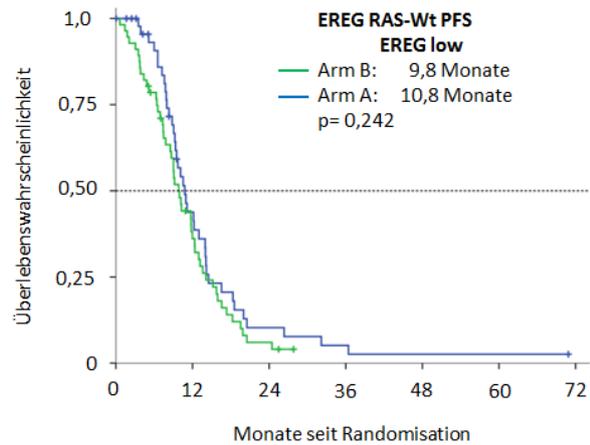


Abb. 4.34: Progressionsfreies Überleben bei niedrige EREG bei RAS-Wt

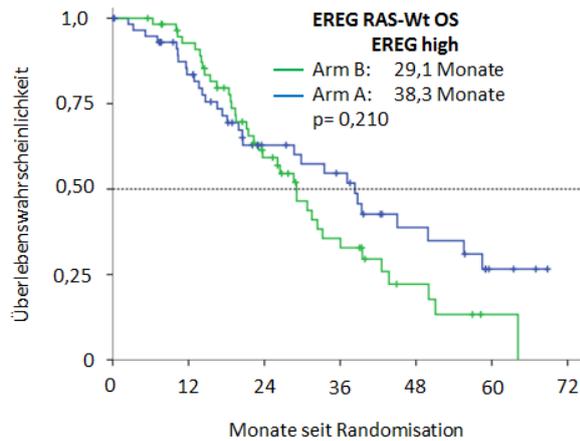


Abb. 4.35: Gesamtüberleben bei hohem EREG bei RAS-Wt

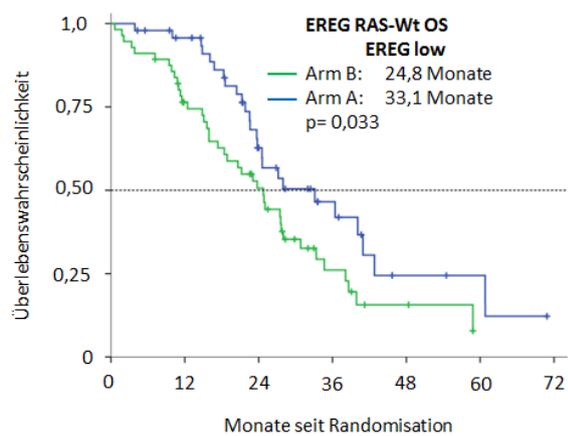


Abb. 4.36: Gesamtüberleben bei niedrigem EREG bei RAS-Wt

### 4.5.5 Epiregulin in der RAS mutierten Subgruppe

In der Subgruppe mit RAS-Mutation konnte kein Unterschied zwischen EREG-Expression und der ORR, dem PFS sowie dem OS festgestellt werden.

Tab. 4.23: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt

EREG RAS- Mt	Median		P
	low (n=46)	high (n=38)	
CR	1.9%	2.3%	0.997
PR	47.2%	50.0%	
SD	30.2%	27.3%	
PD	7.5%	6.8%	
ORR	56.5%	60.5%	0.825

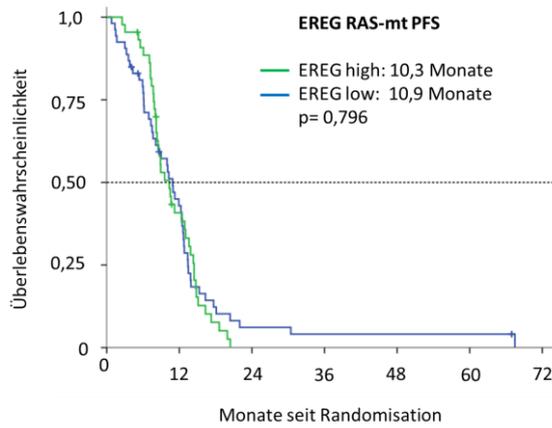


Abb. 4.37: Progressionsfreies Überleben bei RAS-Mt

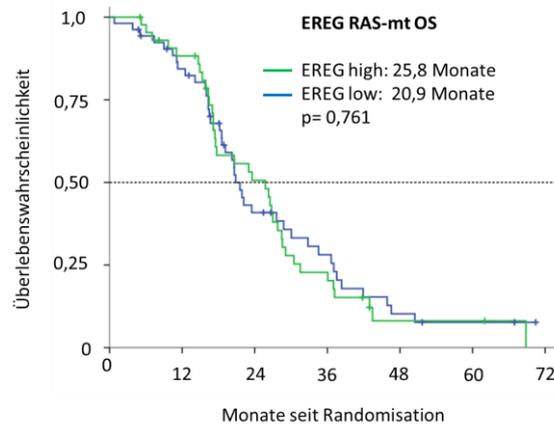


Abb. 4.38: Gesamtüberleben bei RAS-Mt

Die folgenden Grafiken zeigen die ORR, sowie das PFS und das OS der Patienten in Arm A (FOLFIRI + Cetuximab) und Arm B (FOLFIRI + Bevacizumab). Es konnte in Bezug auf die ORR, das PFS und das OS kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit EREG-Werten oberhalb des Medians und unterhalb des Medians festgestellt werden.

## 4 Ergebnisse

Tab. 4.24: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A

EREG Arm A	Median		p
	low (n=25)	high (n=16)	
CR	0.0%	0.0%	0.924
PR	38.7%	45.0%	
SD	32.3%	30.0%	
PD	9.7%	5.0%	
ORR	48.0%	56.3%	0.751

Tab. 4.25: Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm B

EREG Arm B	Median		p
	low (n=21)	high (n=22)	
CR	4.5%	4.2%	0.965
PR	59.1%	54.2%	
SD	27.3%	25.0%	
PD	4.5%	8.3%	
ORR	66.7%	63.6%	1.000

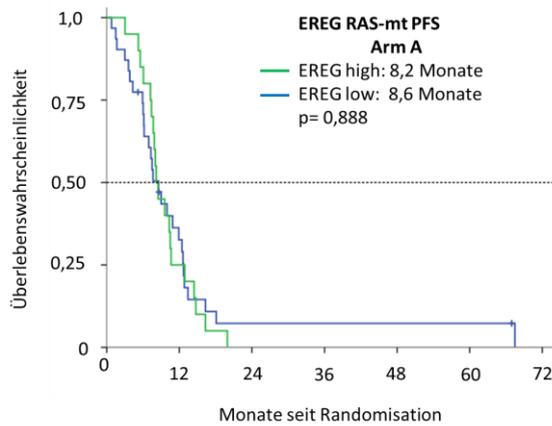


Abb. 4.39: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt

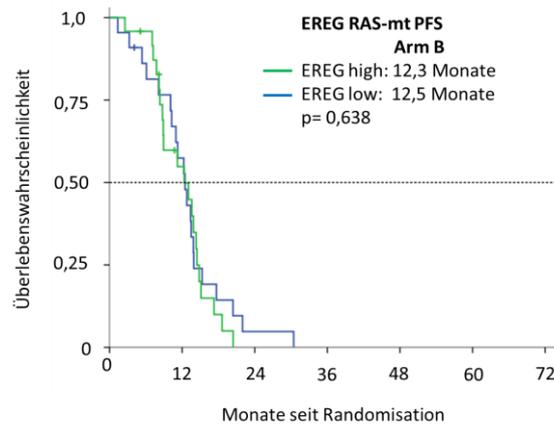


Abb. 4.40: Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Mt

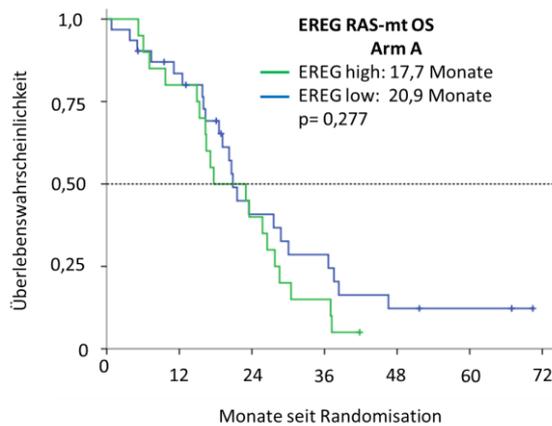


Abb. 4.41: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt

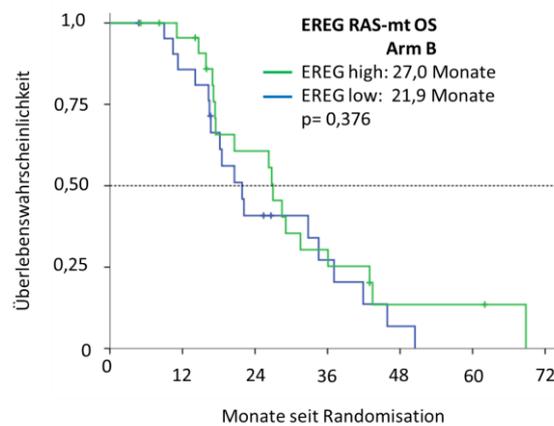


Abb. 4.42: Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Mt

## 4.6 Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen

Es wurde für jedes Präparat die durchschnittliche EGFR-Signalzahl pro Zellkern und die Anzahl des Chromosom 7 mit Hilfe einer FISH-Analyse bestimmt. Eine Eusomie mit zwei roten (Zentromer) und zwei grünen Signalen (EGFR-Gen) konnte nie im gesamten Tumorgewebe, sondern nur gruppiert in Gewebeabschnitten festgestellt werden.

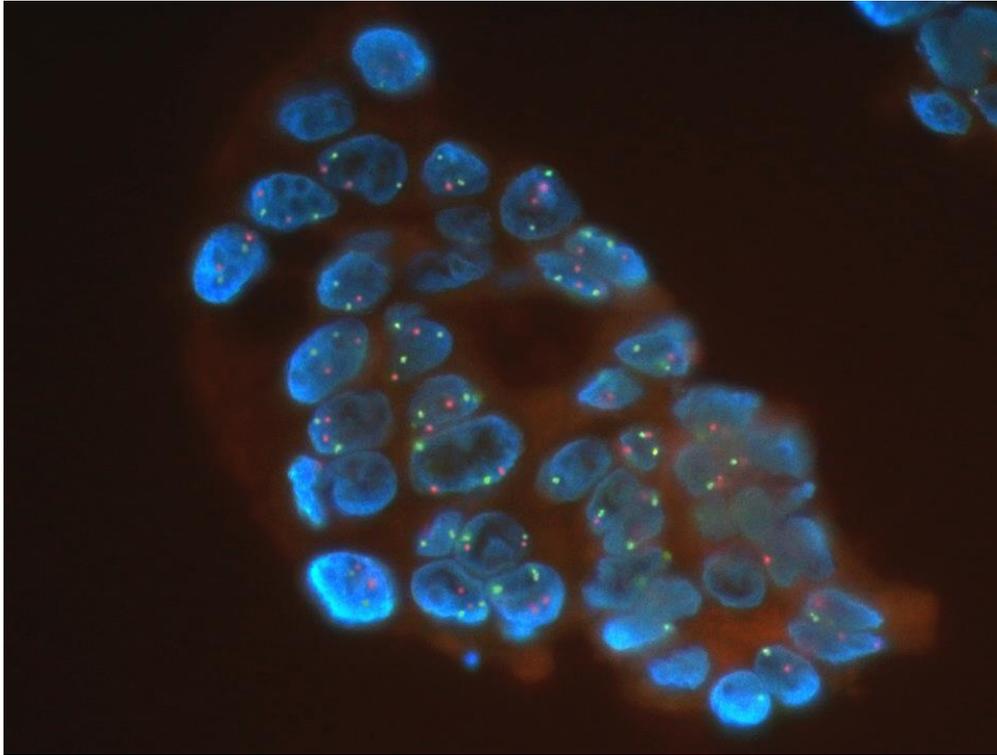


Abb. 4.43: Gewebeabschnitt mit Eusomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)

Da die untersuchten Proben eine Erhöhung des EGFR-Gens in unterschiedlichem Ausmaß zeigten, wurden sie nach Cappuzzo et al. in drei Gruppen eingeteilt [13]:

1. schwache Polysomie ( $\geq 4$  Kopien in  $< 10\%$  der Zellen)

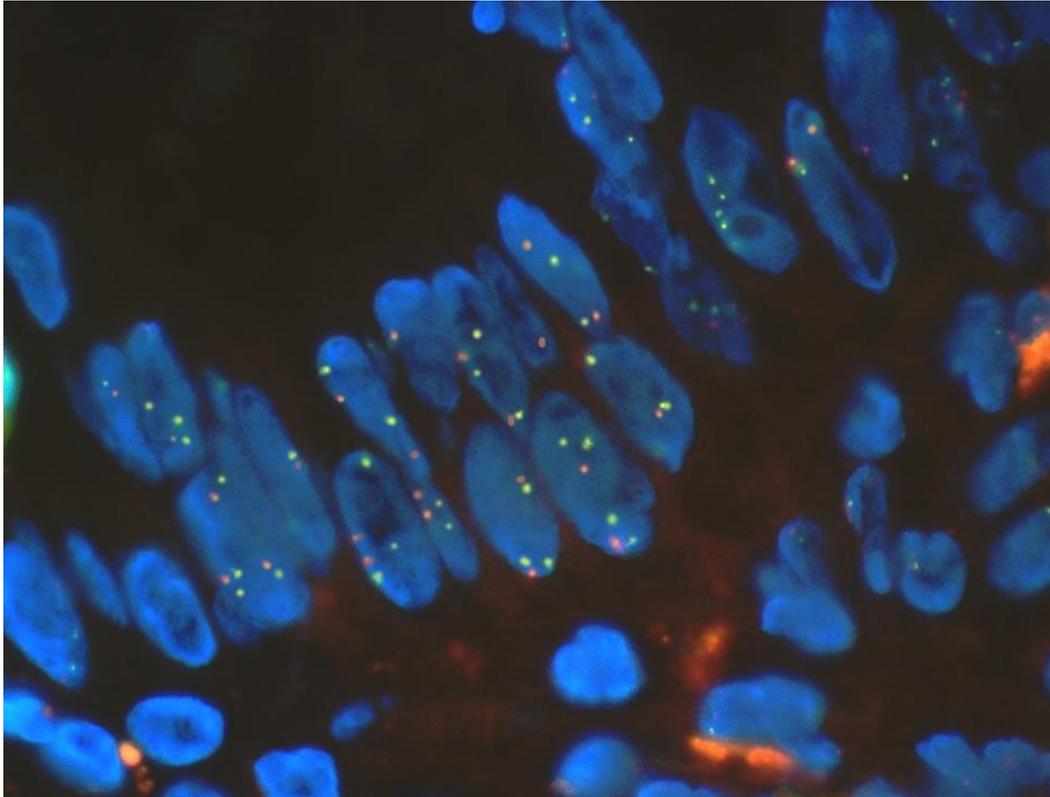


Abb. 4.44: schwache Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)

2. mittlere Polysomie ( $\geq 4$  Kopien in 10-40% der Zellen)

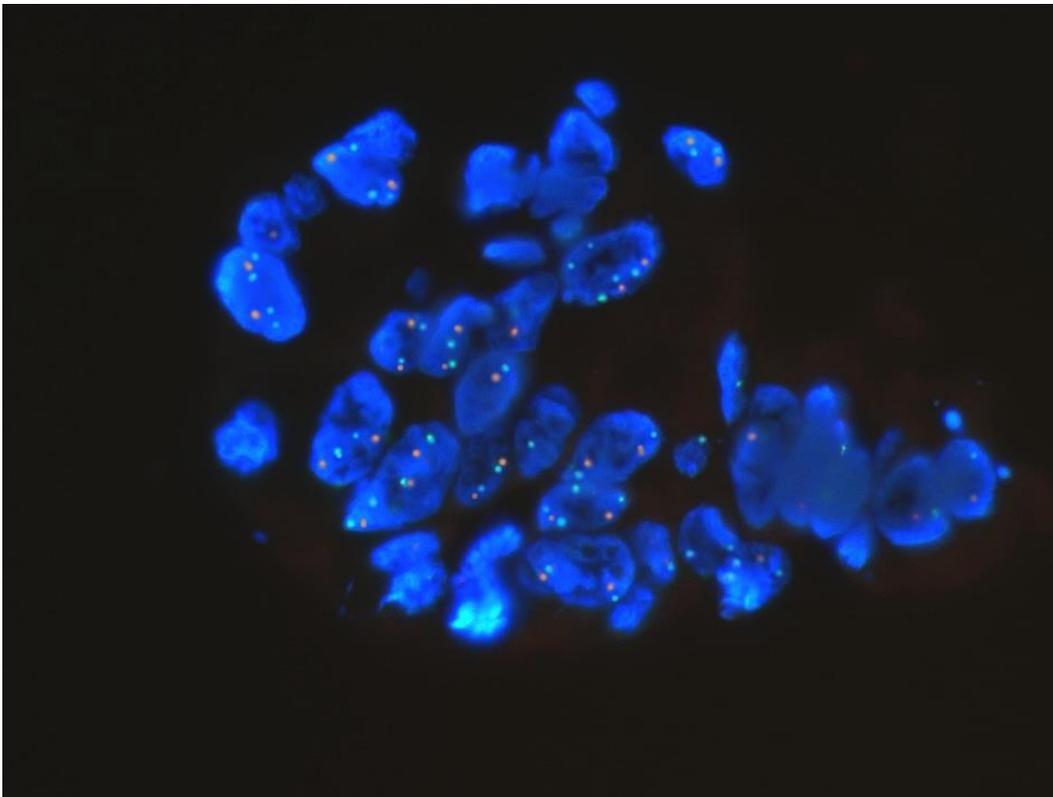


Abb. 4.45: mittlere Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)

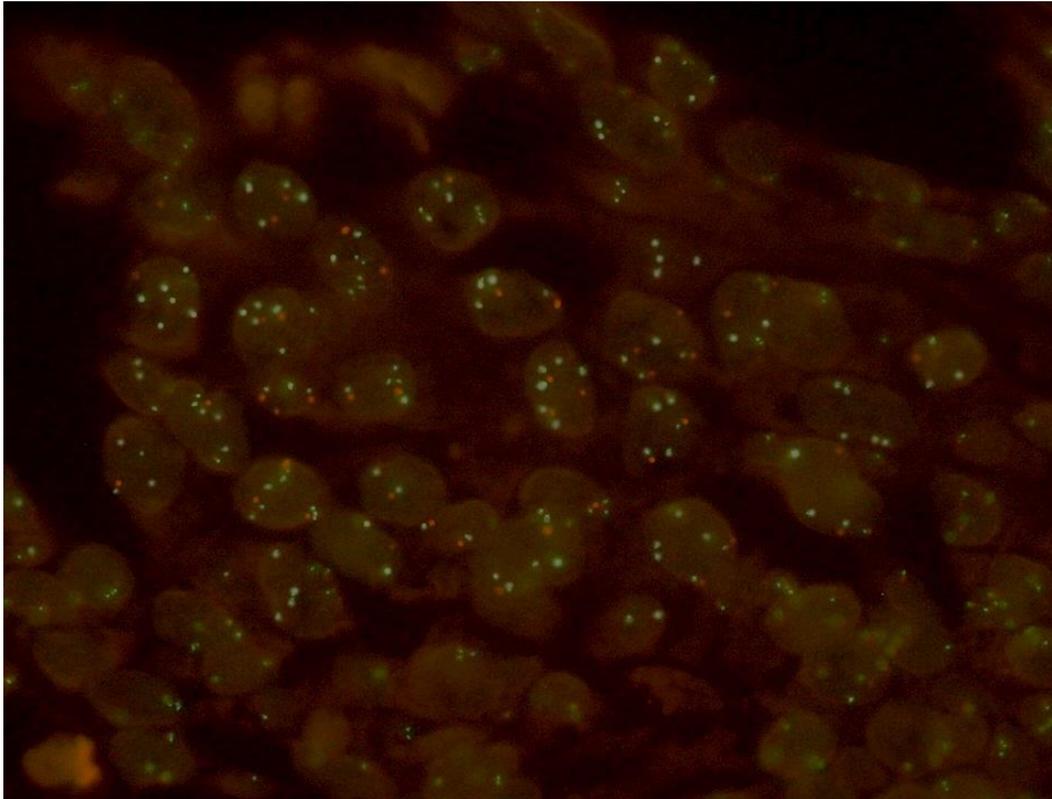
3. hohe Polysomie ( $\geq 4$  Kopien in  $\geq 40\%$  der Zellen)

Abb. 4.46: hohe Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)

Zur Abschätzung der Bedeutung des Verhältnis EGFR-Genkopienzahl zu Chromosom 7 wurde eine univariate Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt und Kreuztabellen erstellt. Die Korrelation zwischen EGFR-Expression und Ansprechen wurde nur im Cetuximab-Arm untersucht.

In der RAS-Wildtyp Gruppe betrug die mediane Überlebenszeit für Patienten mit Tumoren, die einen unterhalb des Median gelegenen FISH-Befund aufwiesen, 36.7 Monate und 42.2 Monate für die Gruppe oberhalb des Median. Der Test nach Log Rank ( $p= 0.753$ ) war nicht signifikant.

Bezüglich der medianen progressionsfreien Überlebenszeit konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Tab. 4.26: Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A

EGFR RAS- Wt	Median		P
	low (n=29)	high (n=32)	
CR	3.3%	9.4%	0.383
PR	60.0%	65.6%	
SD	26.7%	12.5%	
PD	6.7%	12.5%	
ORR	65.5%	75.0%	0.575

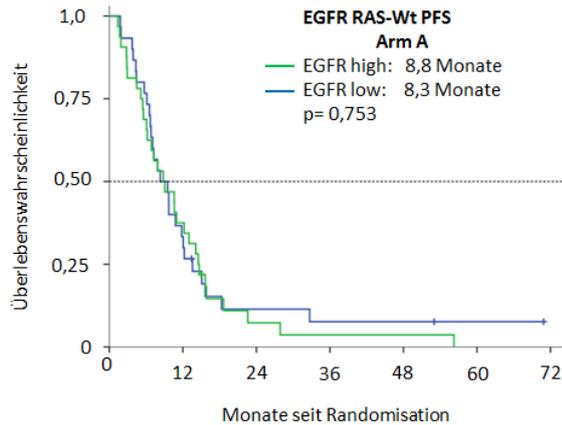


Abb. 4.47: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt

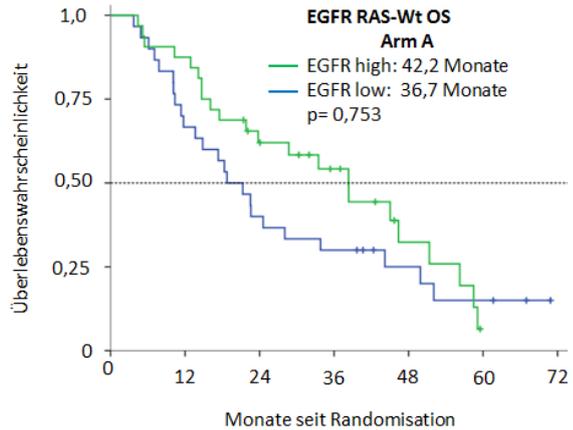


Abb. 4.48: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt

In der Gruppe mit RAS-Mutation zeigte das EGFR/ Chromosom 7 Verhältnis keinen Einfluss auf das Ansprechen und PFS. Es fiel eine Tendenz zu einem kürzeren Überleben bei Werten  $\geq$  Median auf (16.3 Monate vs. 20.2 Monate,  $p=0.111$ ).

Tab. 4.27: Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A

EGFR RAS- Mt	Median		P
	Low (n=45)	high (n=34)	
CR	2.0%	0.0%	0.603
PR	38.0%	44.4%	
SD	34.0%	41.7%	
PD	16.0%	8.3%	
ORR	44.4%	47.1%	0.824

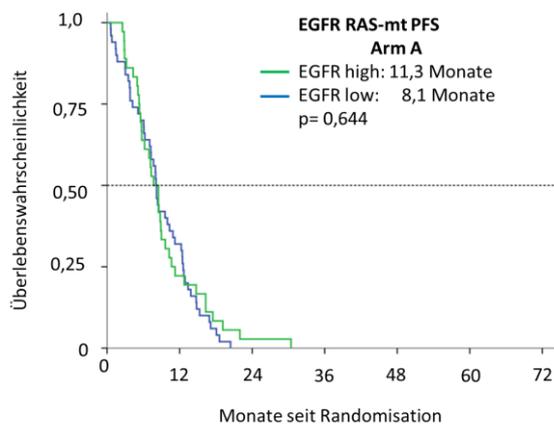


Abb. 4.49: Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt

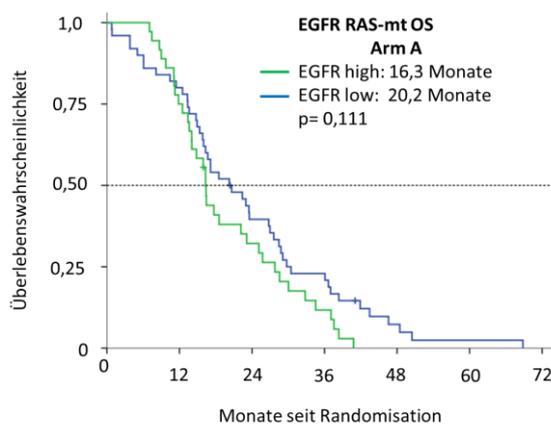


Abb. 4.50: Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt

## 4.7 CIOX- Score für die Therapieentscheidung

Der in der CIOX-Studie generierte Score für oder gegen die Einleitung einer Cetuximabtherapie, sollte in der vorliegenden FIRE-3 Studie validiert werden.

Mit Hilfe dieses Scores wurde die individuelle Wahrscheinlichkeit eines Patienten für das Therapieansprechen (ORR-P) auf eine Cetuximabbehandlung evaluiert, welches sich wie folgt berechnet:

$$\text{ORR-P} = \exp(\text{LP}) / [1 + \exp(\text{LP})]$$

Der lineare Prädiktor (LP) wurde aus der AREG-Expression und dem Verhältnis von EGFR zu Chromosom 7, die den Score am meisten beeinflussenden Größen, gebildet:

$$\text{LP} = -7.63 + (0.35 \times \log[\text{AREG}]) + (6.58 \times [\text{EGFR}/\text{Chromosom 7}])$$

Für die ORR-P können sich Werte zwischen 0% und 100% ergeben. Mittels einer ROC-Analyse wurde eine individuelle Wahrscheinlichkeit (ORR-P) von 50% als Cut-off festgelegt, bei welchem die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximal war. Die ORR-P wurde hierbei als kontinuierliche Variable für eine ROC-Kurven-Analyse eingesetzt.

Aufgrund der Zulassungsbeschränkung von Cetuximab für Patienten mit RAS-Wildtyp, wurde die Untersuchung auf drei Subgruppen beschränkt. In keiner der drei Subgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede im Ansprechen und Überleben hinsichtlich der individuellen Wahrscheinlichkeit für ein Therapieansprechen (ORR-P).

### 1. KRAS Exon 2-Wildtyp Subgruppe

Tab. 4.28 Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei KRAS Exon 2-Wt

<b>KRAS Exon2- Wt</b>	<b>Score</b>		<b>P</b>
	<b>Low (n=53)</b>	<b>high (n=51)</b>	
<b>CR</b>	7.1%	1.8%	0.708
<b>PR</b>	50.0%	50.9%	
<b>SD</b>	26.8%	30.9%	
<b>PD</b>	10.7%	9.1%	
<b>ORR</b>	60.4%	56.9%	0.842

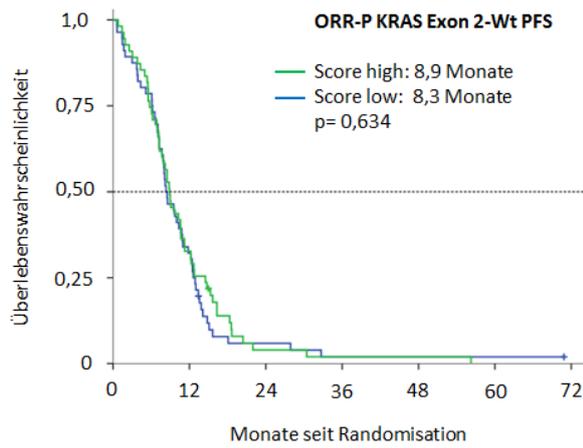


Abb. 4.51: Progressionsfreies Überleben bei KRAS Exon 2-Wt

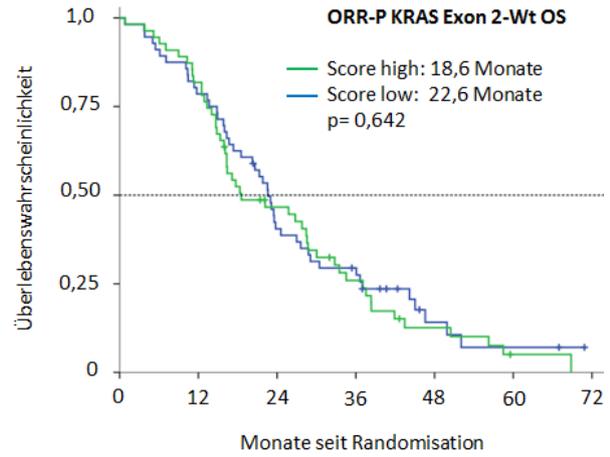


Abb. 4.52: Gesamtüberleben bei KRAS Exon 2-Wt

2. RAS-Wildtyp Subgruppe

Tab. 4.29 Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei RAS-Wt

RAS-Wt	Score		p
	Low (n=28)	high (n=17)	
CR	10.3%	5.9%	0.762
PR	58.6%	70.6%	
SD	20.7%	11.8%	
PD	6.9%	11.8%	
ORR	71.4%	76.5%	>0.99

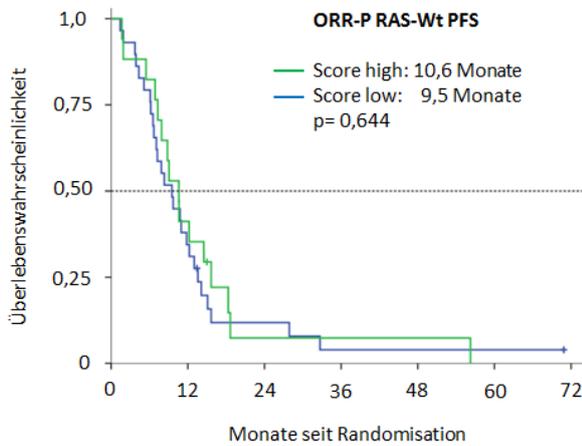


Abb. 4.53: Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt

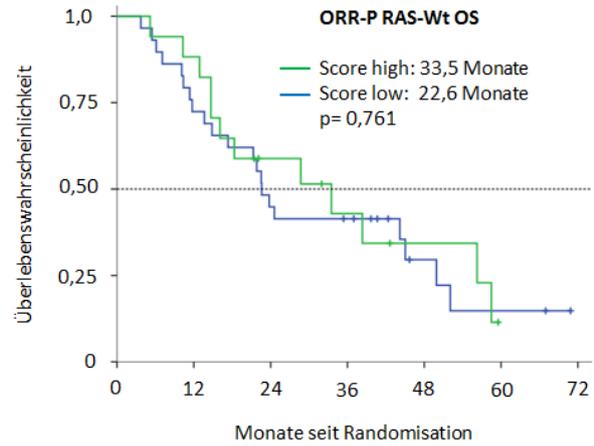


Abb. 4.54: Gesamtüberleben bei RAS-Wt

3. RAS & BRAF-Wildtyp Subgruppe

Tab. 4.30 Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt

RAS & BRAF-Wt	Score		p
	Low (n=24)	high (n=14)	
CR	8.0%	0.0%	0.476
PR	60.0%	85.7%	
SD	24.0%	14.3%	
PD	4.0%	0.0%	
ORR	70.8%	85.7%	0.438

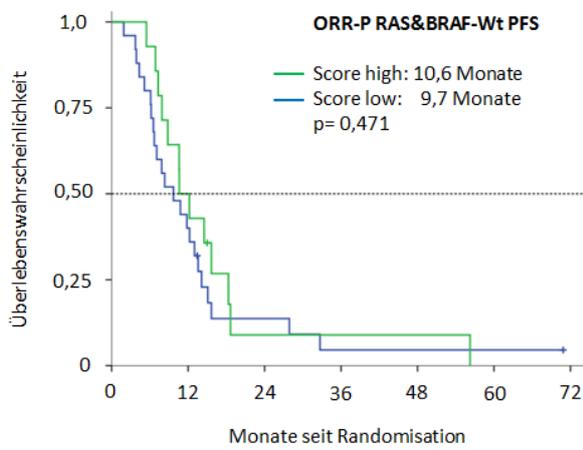


Abb. 4.55: Progressionsfreies Überleben bei RAS & BRAF-Wt

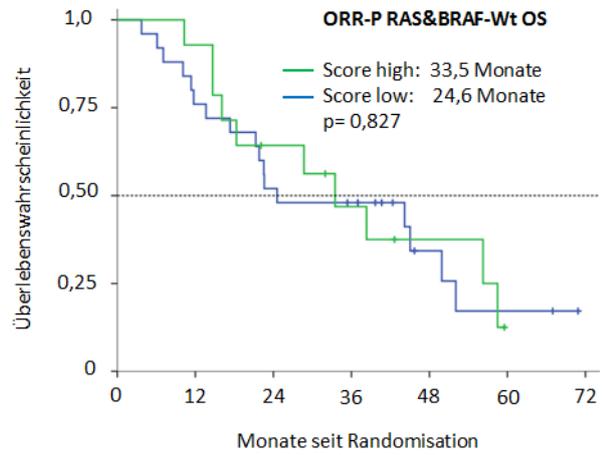


Abb. 4.56: Gesamtüberleben bei RAS & BRAF-Wt

## 5 Diskussion

Therapien, die auf molekularer Ebene gegen verschiedenste maligne Erkrankungen gerichtet sind, gewinnen im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung. Das kolorektale Karzinom weist mit der erhöhten Expression des epidermalen Wachstumsfaktors Eigenschaften auf, die einen Angriffspunkt für eine gezielte, das Tumorstadium hemmende, medikamentöse Therapie bieten. Jedoch profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von einer zielgerichteten Antikörpertherapie. Welche Therapie jedem einzelnen Patienten unter Berücksichtigung der Nebenwirkungen den größten Erfolg verspricht, kann zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vorausgesagt werden. Die Identifikation neuer Marker für die individuelle Vorhersage des Ansprechens der medikamentösen Tumorthherapie stellt daher eine aktuelle Herausforderung für die Tumorforschung dar.

In der vorliegenden Untersuchung wurden aus einem Kollektiv von 752 Patienten Proben von 345 in paraffin-eingebetteten Tumorsektaten mit RAS-Wildtyp, sowie von 178 Tumorsektaten mit RAS-Mutation evaluiert. Die Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom wurden in der Erstlinientherapie mit Cetuximab (Arm A)/ Bevacizumab (Arm B) additiv zu FOLFIRI im Rahmen der FIRE-3 Studie (AIO KRK-0306) behandelt. Im Besonderen wurden die Expression von Schlüsselproteinen des EGFR Pathways, nämlich die Liganden des EGF-Rezeptors Amphiregulin und Epiregulin, sowie die Genkopienzahl des EGF-Rezeptors untersucht.

Es gelang, aus paraffin-eingebettetem Tumorgewebe mit zuvor analysiertem RAS-Status die mRNA-Expression von Amphiregulin und Epiregulin mittels Real-time qRT-PCR, normiert auf die Housekeeping-mRNA von  $\beta$ -Aktin und GAPDH derselben Proben, zu quantifizieren. Weiter wurde mit Hilfe einer FISH-Analyse die EGFR-Genkopienzahl bestimmt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit dem Therapieansprechen korreliert.

## 5.1 Einfluss der EGFR-Liganden auf das Therapieansprechen

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in der RAS-Wt Subgruppe Patienten mit AREG-Werten oberhalb des Median ein signifikant längeres OS aufwiesen als Patienten mit niedrigen AREG-Werten (30.8 Monate vs. 24.5 Monate,  $p=0.048$ ), welches sich getrennt nach Behandlungsarmen auch im **FOLFIRI + Cetuximab Arm** (OS: 39.4 Monate vs. 24.6 Monate,  $p=0.043$ ) feststellen ließ. Bei hochreguliertem AREG ließ sich zudem eine Tendenz zu einem besseren Ansprechen (82.8%) und ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (39.4 Monate) im **Cetuximab Arm** gegenüber dem **Bevacizumab Arm** (67.6%,  $p=0.065$  bzw. 26.5 Monate,  $p=0.005$ ) feststellen.

Bei Überprüfung der EREG-Expression fand sich im **FOLFIRI + Bevacizumab Arm** bei einer EREG-Expression  $\geq$  Median ein signifikanter Vorteil im progressionsfreien Überleben (12.8 Monate) gegenüber EREG-Werten, die unterhalb des Medians lagen (9.8 Monate,  $p=0.032$ ). Trennte man nach niedrig- und hochregulierten Liganden und betrachtete die beiden Arme, so zeigte sich bei niedrigen EREG-Werten im **Cetuximab Arm** ein längeres Gesamtüberleben (33.1 Monate) und besseres Ansprechen (82.5%) als im **Bevacizumab Arm** (24.8 Monate,  $p=0.033$  bzw. 56.9%,  $p=0.012$ ).

Diese Ergebnisse konnten teilweise mit den aus früheren Studien gewonnenen Erkenntnissen in Einklang gebracht werden: Khambata-Ford et al. konnten 2011 zeigen, dass von 110 mit einer Cetuximab Monotherapie behandelten Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom vom KRAS-Wt, diejenigen mit hoher EREG/AREG Expression eine signifikant längere progressionsfreie Überlebenszeit und eine signifikante höhere Wahrscheinlichkeit einer *disease control* aufwiesen als diejenigen mit niedriger Gen-Expression [45]. Als Grenzwert wurde auch hier der Median definiert. In dieser Studie wurden Biopsien aus Metastasen verwendet, es wurde keine Assoziation zwischen Primärtumor und Metastase untersucht.

Die Gruppe um Baker wiederum führte bei 326 Patienten, die in drei Studien (IMC CP02-0144, IMC CP02-0141 und BMS CA225-045) mit Cetuximab Monotherapie behandelt wurden, eine Genexpressions-Analyse mittels qRT-PCR durch [3]. Unter diesen 326 Proben konnte bei 82 eine KRAS-Mutation auf Kodon 12 oder 13 identifiziert werden. Eine erhöhte Expression von AREG und EREG in der KRAS-Wt Gruppe war mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine kontrollierte Erkrankung assoziiert. Ein prädiktiver Score aus vier Genen wurde etabliert, zu denen neben AREG und EREG auch DUSP6 und SLC26A3 zählten. Mit Hilfe des Scores wurde ein *Cutpoint* ausgewählt, bei welchem KRAS-Wt Patienten mit darüber liegenden Werten sehr wahrscheinlich von einer Cetuximab Behandlung profitieren. Hinsichtlich der ORR würden 84 Patienten nach der Wahl des *Cutpoints* behandelt werden und 28 (33%) davon ansprechen, 60 Patienten würden nicht behandelt werden, von welchen 3 (5%) ansprechen würden. Das mediane PFS bei Patienten mit Werten oberhalb des *Cutpoints* beträgt 163 Tage, während Patienten mit Werten unterhalb des *Cutpoints* lediglich ein PFS von 40 Tagen aufwiesen, welches dem der KRAS mutierten Gruppe entspricht.

Neuere Studienergebnisse zeigen [74], dass eine hohe Expression von AREG/EREG einen prädiktiven Marker für ein längeres PFS durch das Zufügen des anti-EGFR Antikörpers Panitumumab zur alleinigen Irinotecan Therapie darstellt. Als hohe Expression wurden Werte

im oberen Drittel festgelegt. RAS-Wildtyp Patienten mit einer hohen Expression von AREG/EREG wiesen ein signifikant längeres PFS (8.3 Monate) durch die zusätzliche Gabe von Panitumumab zu Irinotecan auf als Patienten mit alleiniger Irinotecan Therapie (4.4 Monate,  $p < 0.001$ ). Dagegen zeigte sich bei einer niedrigen Ligandenexpression kein Überlebensvorteil durch das Zufügen von Panitumumab zu Irinotecan (3.2 Monate) versus Irinotecan Monotherapie (4.0 Monate). Wie auch in der vorliegenden Studie, war eine alleinig hohe AREG-Expression mit einem signifikant besseren PFS assoziiert, während eine singular erhöhte EREG-Expression lediglich eine Tendenz zu einem verbessertes PFS aufwies.

In der Subgruppe mit RAS-Mutation ergab sich in der vorliegenden Arbeit für die EGFR-Liganden keine Korrelation zwischen der mRNA-Expression ober-/unterhalb des Median (AREG 42.14; EREG 214.87) und dem Ansprechen und Überleben.

Auch Jacobs et al. untersuchten eine Subgruppe von 91 Patienten mit KRAS-Mutation aus 220 Patienten mit Irinotecan refraktärem metastasiertem kolorektalem Karzinom, die in einer der folgenden Studien (EVEREST, BOND, SALVAGE, und BABEL) mit Irinotecan und Cetuximab behandelt wurden. Wie in der vorliegenden Studie war unter diesen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der AREG-/EREG-Expression und dem progressionsfreiem Überleben, dem Gesamtüberleben oder dem Ansprechen erkennbar [40]. Dagegen wurde in KRAS-Wildtyp Tumoren eine signifikante Relation zwischen Gen-Expression und Ansprechen, sowie progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben festgestellt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass AREG und EREG in KRAS-Wildtyp Tumoren stärker exprimiert wurden als in KRAS mutierten Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem ein im Trend höherer EREG-Median bei RAS-Wildtyp Tumoren (315.94) gegenüber RAS mutierten Tumoren (214.87) festgestellt werden, er erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ( $p = 0.194$ ).

Cetuximab wirkt über die kompetitive Verdrängung von Liganden am EGF-Rezeptor. Bei der üblichen Dosierung von Cetuximab wird eine Sättigung des EGF-Rezeptors erreicht, so dass eine erhöhte Expression von AREG und EREG, wie sie in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde, nicht zu einer Verdrängung von Cetuximab führt. Gerade die Tumoren mit erhöhter Liganden-Expression scheinen stark EGFR abhängig zu sein, so dass eine Bindung von Cetuximab an den EGF-Rezeptor und nachfolgender Inhibition weniger gut über andere Wege kompensiert werden kann und sie somit empfindlicher gegenüber einer Cetuximab-Therapie macht.

## **5.2 AREG und EREG als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie**

### **5.2.1 Wt- und Mt-Signalkaskaden und ihre prädiktive Bedeutung**

Eine KRAS-Mutation führt zu einer dauerhaften Aktivierung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade. Diese aktivierende KRAS-Mutationen, die in 30-40% auf Kodon 12 oder 13 beim kolorektalen Karzinom zu finden sind, führen zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber den anti-EGFR-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab [43]. Dies führte dazu, dass nur Patienten mit KRAS-Wt Zugang zu einer anti-EGFR-Therapie erhielten. Trotz der Einschränkung der Zulassung der beiden therapeutischen Antikörpern für Patienten deren Tumor keine KRAS Mutation in den Kodons 12 und 13 aufwies, zeigten nur etwa 60% der behandelten Tumoren ein Tumorsprechen [11, 83]. Daher wurde nach weiteren Prädiktionsfaktoren gesucht.

Aus den Ergebnissen der PRIME Studie, welche die Kombination von FOLFOX mit dem anti-EGFR Antikörper Panitumumab untersuchte, wurde ersichtlich, dass auch Patienten mit den seltenen NRAS und KRAS Mutationen in Exon 2, 3 und 4 nicht von einer anti-EGFR Therapie profitierten [20, 21]. In der Kombination mit Oxaliplatin konnte sogar ein negativer Einfluss auf die Überlebenszeiten für die Kombination mit dem anti-EGFR Antikörper nachgewiesen werden. Dies führte zu einer Zulassungsänderung mit entsprechender Indikationseinschränkung für Panitumumab und in Konsequenz auch für Cetuximab.

Für Cetuximab sind Daten aus den Zulassungsstudien OPUS, CRYSTAL sowie der hier vorliegenden FIRE-3 Studie maßgeblich. Die OPUS-Studie, eine randomisierte, multizentrische Phase 2 Studie verglich die Zugabe von Cetuximab zu FOLFOX4 zur alleinigen FOLFOX4-Therapie [80]. Von den 179 KRAS Kodon 12/13 Wildtyp Patienten, wiesen 31% neue Mutationen auf KRAS Exon 3, 4 und NRAS Exon 2, 3, 4 auf. Bei Einschluss der neuen Mutationen zeigte sich in der RAS-Wt Gruppe ein signifikanter Nutzen aus der Zugabe von Cetuximab hinsichtlich des PFS gegenüber FOLFOX4 alleine (12,0 Monate vs. 5,8 Monate,  $p=0,018$ ) und der ORR (61,1 % vs. 30,4%,  $p=0,008$ ). In der RAS-Mt Population zeigte sich dagegen ein geringeres OS sowie PFS (5,6 Monate vs. 7,7 Monate,  $p=0,018$ ) und ein schlechteres Ansprechen bei Kombination von Cetuximab und FOLFOX4 als bei alleiniger FOLFOX4 Therapie. Für die Behandlung mit Cetuximab und Panitumumab ist nun eine erweiterte RAS-Mutationsanalyse mit dem Nachweis eines RAS-Wt Status (KRAS und NRAS Exon 2, 3, 4) erforderlich.

Die Frage, ob Patienten mit RAS-Mt von der Bevacizumab-Zugabe zu FOLFIRI profitieren, ist noch nicht beantwortet, da bisher keine Daten aus randomisierten Studien vorliegen: Die Hurwitz Studie konnte die höhere Wirksamkeit von Bevacizumab nur in der veralteten Kombination mit IFL (Irinotecan, Leucovorin und Fluorouracil) beweisen [36]. Eine retrospektive Untersuchung des KRAS-Status war nur in einer kleinen, nicht repräsentativen Subpopulation von etwa 30% der Studienpopulation möglich. Bei Zugabe von Bevacizumab zeigte sich in dieser Subpopulation ein Anstieg der ORR von 37% auf 60% bei KRAS-Wt Patienten, während bei Patienten mit KRAS-Mutation keine Auswirkung festgestellt werden

konnte [37]. Andere Daten zeigten keinen Nutzen von Bevacizumab in Kombination mit 5-FU/Leucovorin und Irinotecan [79]. Ein Versuch, die Daten der vorliegenden Studie zu interpretieren, ist die Annahme, dass FOLFIRI/ Cetuximab als Kontrollarm angesehen werden kann, da in der CRYSTAL Studie, die Zugabe von Cetuximab zu FOLFIRI Patienten mit KRAS-Mutation weder Nutzen noch Schaden zugefügt hat. So betrachtet verbesserte die Zugabe von Bevacizumab nicht das Ansprechen im Vergleich zum Kontrollarm FOLFIRI.

Weiterer Bestandteil der RAS/RAF/MAPK-Kaskade ist BRAF, eine Serin-Threonin-Kinase. Mehr als 80% aller aktivierenden Mutationen im kolorektalen Karzinom bestehen aus einer V600E Substitution und liegen fast ausschließlich bei KRAS-Wildtyp vor [17]. Verschiedene Studien haben geprüft, ob aktivierende BRAF-Mutationen, welche in 10% beim sporadischen kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden können, auch einen Einfluss auf das Ansprechen auf eine anti-EGFR Therapie haben. In einer von Di Nicolantonio durchgeführten Studie zeigte keiner der 22 Patienten mit mKRK, die auf eine Cetuximab- oder Panitumumab-Therapie ansprachen, eine BRAF-Mutation, während 11 von 79 Patienten, die nicht ansprachen, eine BRAF-Mutation aufwiesen [19]. Patienten mit BRAF mutiertem Tumor zeigten desweiteren ein kürzeres PFS und OS auf als BRAF-Wt Patienten. Auch Loupakis stellte fest, dass keiner der untersuchten 13 BRAF-mutierten Patienten auf eine Cetuximab + Irinotecanbehandlung ansprachen, während 24 von 74 BRAF-Wt Patienten ansprachen. Eine BRAF-Mutation war außerdem mit einem Trend zu einem kürzeren PFS assoziiert [52]. Eine retrospektive Analyse der CRYSTAL-Studie, in welcher Patienten mit mKRK randomisiert 5FU und Irinotecan mit oder ohne Cetuximab zugeteilt wurden, zeigte dagegen, dass Patienten mit BRAF-Mutation eine schlechte Prognose aufwiesen, egal welche Therapie sie erhielten [83]. Dabei hatten Patienten mit BRAF-Mutation ein schlechteres Outcome im Ansprechen und Überleben als solche mit BRAF-Wildtyp. Aufgrund der kleinen Fallzahlen sind hier noch weitere Untersuchungen notwendig bevor man zu einem abschließenden Ergebnis kommen kann.

### **5.2.2 Amphiregulin und Epiregulin als zukünftige Prädiktoren**

Während in der vorliegenden Arbeit in der RAS-Mt Subgruppe keine signifikante Beziehung zwischen Liganden-Expression und Outcome festgestellt werden konnte, ergab sich teilweise eine Beziehung zwischen hoher Expression von AREG/EREG und besserem Outcome in der RAS-Wt Subgruppe. Diese Beobachtungen der Liganden-Expression haben eine Auswirkung auf die Anwendung als prädiktive Biomarker, um das Ansprechen auf eine EGFR-Inhibierung bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms vorherzusagen. Auch in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien wurde AREG im Zusammenhang mit Gefitinib oder Cetuximab eine positive prädiktive Funktion zugeschrieben [88].

Die Beziehung zwischen Liganden-Expression und Ansprechen und Überleben muss in weiteren, prospektiven Studien untersucht werden, da die hier gewonnenen Ergebnisse die Anforderungen für die Anwendung in der klinischen Praxis noch nicht erfüllen.

### 5.3 Einfluss der EGFR-Genkopienzahl auf das Therapieansprechen

Die EGFR-Genkopienzahl im Verhältnis zu Chromosom 7 wurde mit Hilfe der FISH-Analyse an Paraffinschnitten bestimmt. Ein HE-Schnitt diente zur Identifikation der Tumorzellen. Es wurden nur Stellen mit nicht überlappenden Nuclei ausgezählt. Daher durfte die Schnittdicke nicht zu groß sein. Als Schnittdicke wurden 4µm gewählt, da eine geringere Dicke als der Durchmesser eines Nukleus nur Teile dessen enthält und somit die Gefahr besteht, zu wenige Signale zu zählen. Das EGFR-Gen, lokalisiert auf Chromosom 7, wurde als grünes Signal wahrgenommen, während das Zentromer des Chromosom 7 ein rotes Licht entsendete. Der EGFR-Status wurde beurteilt nach dem Verhältnis zwischen EGFR grünen Signalen und den roten Signalen des Zentromer, welche gruppiert in einzelnen Gewebeabschnitten und nicht im gesamten Gewebe detektiert werden konnten. Bei einigen Präparaten konnte keine Auswertung erfolgen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Da es sich um formalinfixiertes Material aus einer multizentrischen Studie handelte, wurden unterschiedlichste Fixierungsmedien und Einwirkzeiten benutzt. Dies hatte Auswirkungen auf die Durchführbarkeit der FISH Analyse. Immunhistochemisch zeigen etwa 60-80% der Fälle des kolorektalen Karzinoms eine erhöhte EGFR Expression. Diese ist allerdings in mehreren Studien nicht mit der Effektivität einer Cetuximab Therapie korreliert gewesen [16].

In verschiedenen Studien wurde über ein inhomogenes Vorkommen der EGFR-Genkopienzahl im mKRK berichtet, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, gewonnen mit Hilfe der FISH-Analyse, erschwert [59, 76]. Anders als bei HER-2 im Falle des Mammakarzinoms, in welchem erhöhte Genkopienzahlen homogen präsentiert werden, scheint die Expression von EGFR im mKRK nur in bestimmten Tumoranteilen vorzuliegen [71]. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis aus EGFR-Gen zum Chromosom 7 gewählt, um die technische Qualität zu verbessern. In vorhergehenden Studien wurde dagegen alleinig die EGFR-GCN in Betracht gezogen.

In den untersuchten Subgruppe mit **RAS-Mutation** ergab sich im FOLFIRI + Cetuximab Arm keine signifikante Korrelation für PFS oder OS mit dem Verhältnis des EGFR-Gens zum Chromosom 7 in Abhängigkeit des Medians. Es fiel eine Tendenz zu einem kürzeren Überleben bei Werten größer als der Median auf (16.3 Monate vs. 20.2 Monate,  $p=0.111$ ). In der **RAS-Wildtyp** Population zeigte sich eine Tendenz zu einem längeren Überleben bei Werten oberhalb des Median (36.7 Monate vs. 42.2 Monate,  $p=0.753$ ).

Dies spiegelt die Ergebnisse von einer Gruppe um Personeni wieder [61]: Personeni beurteilte Irinotecan refraktäre Patienten, die in vier Studien (BOND, SALVAGE, Babel und Everest) mit Cetuximab allein oder in Kombination mit Irinotecan therapiert wurden. Von 96 Patienten konnte bei 87 erfolgreich der EGFR-Status gemessen werden, alle diese Patienten wurden auf eine KRAS-Mutation untersucht. Keiner der 29 mutierten Patienten antwortete auf eine Cetuximabbehandlung. Somit konnte kein Einfluss der EGFR-GCN beobachtet werden. Umgekehrt reagierten unter 58 KRAS-Wildtyp Patienten 63% (17 von 27) mit einer EGFR-GCN über dem *Cutoff* von 2.83 auf eine Antikörpertherapie, im Gegensatz zu 26% (8 von 31) mit einem Wert  $< 2.83$ . In KRAS-Wildtyp Patienten war ein positiver FISH Status mit einem

längerem Überleben (13.3 versus 8.4 Monate;  $p=0.019$ ) und einer nicht signifikant verlängerten PFS (6.9 versus 4.4 Monate) assoziiert. Patienten mit KRAS-Mutation dagegen zeigten bei einer EGFR-Genkopienzahl  $\geq 2.83$  ein kürzeres PFS (2.8 versus 3.9 Monate) und ein kürzeres Überleben.

Lenz et al. maß die Menge an EGFR-Gen in der quantitativen PCR in Bezug auf ein Kontrollgen VEST1 bei 34 intensiv vortherapierten Patienten [48]. Es konnte kein Bezug zwischen EGFR-Genkopienzahl und Ansprechen sowie PFS bei Patienten festgestellt werden, die mit einer Cetuximab Monotherapie behandelt wurden und refraktär zu Irinotecan, Oxaliplatin und Fluoropyrimidinen waren. Jedoch zeigte sich eine Assoziation zu einem signifikant längeren Überleben bei erhöhter EGFR-Expression.

Auch Moroni et al. berichteten, dass eine hohe EGFR-Genkopienzahl ( $\geq 3$  Kopien pro Zellkern) dazu neigt, besser auf eine EGFR-Antikörpertherapie anzusprechen [57]. Dagegen wies nur ein einziger von den 21 Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprachen, eine erhöhte EGFR-Kopienzahl auf ( $p < 0.0001$ ). Diese Daten wurden jedoch anders als bei Lenz, mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erhoben.

Später analysierte die gleiche Gruppe um Moroni mit Hilfe der FISH-Analyse 58 Patienten, behandelt mit Panitumumab versus best supportive care (BSC) [71]. Die Möglichkeit auch Patienten zu untersuchen, die nur BSC erhielten, erlaubte die Rolle der EGFR-Kopienzahl als prognostischen Marker zu bewerten. In dieser Studie unterschied ein Cut-off von  $< 2.47$  EGFR Kopien pro Zelle die Nonresponder. Keiner der Patienten  $< 43\%$  Tumorzellen mit Chromosom 7 Polysomie zeigte eine Therapieantwort. Patienten, die mit Panitumumab behandelt wurden, wiesen bei einer EGFR-Genkopienzahl von  $< 2.5$  pro Nucleus ein signifikant schlechteres PFS und OS auf. Patienten, welche nur mit BSC behandelt wurden, zeigten keine Assoziation zwischen EGFR-Genkopienzahl oder Chromosom 7 Polysomie mit PFS.

In der Studie, die von Lievre et al durchgeführt wurde, war eine gesteigerte EGFR-Genkopienzahl mit einem signifikant besseren Ansprechen auf Cetuximab assoziiert. Jedoch verhinderte die geringe Zahl an positiven Ergebnissen (3 Fälle), gewonnen mittels chromogener-in-situ-Hybridisierung, eine aussagekräftige Schlussfolgerung [50].

In einer retrospektiven Untersuchung wurden 85 Patienten mit chemorefraktärem Karzinom mittels FISH-Untersuchung von Capuzzo et al. analysiert [12], die mit Cetuximab behandelt wurden. Als *Cutoff* wurde ein Wert von 2.92 EGFR-Kopien pro Zelle definiert. Patienten mit Werten oberhalb dieses *Cutoffs* wurden als EGFR positiv klassifiziert (50.6%). Die Ansprechrate war bei positivem FISH-Befund mit 32.6% (versus 2.4% bei EGFR negativ), ebenso wie die progressionsfreie Überlebenszeit mit 6.6 Monaten (versus 3.5 Monaten bei EGFR negativ) signifikant höher. Außerdem wurde die Studiengruppe hinsichtlich der früher entwickelten Score-Systeme, über welche beim kolorektalen Karzinom und Bronchialkarzinom berichtet wurde, untersucht. Bei der Anwendung des von Sartore-Bianchi et al. erstellten Scores [71] mit positivem FISH bei  $\geq 2.47$  Gensignalen pro Nucleus fielen ebenfalls eine signifikant höhere Ansprechrate (23.7% versus 3.8%) und eine Tendenz zu längerem progressionsfreiem Überleben (6.1 versus 3.0 Monate) auf.

Wendete man den von der eigenen Gruppe für das Lungenkarzinom erstellten Score (FISH positiv: 4 Kopien in  $\geq 40\%$  der Zellen) an, ergab sich keine Assoziation zwischen positivem FISH-Befund und klinische Parametern.

Das Vorkommen einer erhöhten EGFR-Genkopienzahl im kolorektalen Karzinom scheint höchst unterschiedlich zu sein, es werden Prävalenzen zwischen 6%-88.9% beschrieben [50, 57]. Das Vorhandensein einer RAS-Mutation könnte der Grund dafür sein, warum Tumoren in der vorliegenden Arbeit trotz erhöhter EGFR-Genkopienzahl nicht auf Cetuximab antworten, da eine dauerhafte Aktivierung des RAS/MAPK-Signalwegs zu einer Zellproliferation führt, die nicht signifikant durch Cetuximab inhibiert werden kann, welches oberhalb der RAS-Mutation seinen Angriffspunkt besitzt. Aufgrund der limitierten Patientenzahl und der Inhomogenität der einzelnen Studiengruppen (Antikörpertherapie mit oder ohne Chemotherapie, Erstlinien- oder nachfolgende Therapie), hat bisher noch kein prädiktiver Marker bezüglich der EGFR-Genkopienzahl den klinischen Alltag erreicht. Unterschiede in der Struktur und dem Wirkmechanismus zwischen Cetuximab und Panitumumab könnten Grund für die Schwankungen der Cutoffs sein. Auch wenn Cetuximab und Panitumumab an den gleichen Rezeptor binden, gibt es bisher keine Studien, welche die Frage beantwortet haben, ob die beiden Antikörper gleich wirksam sind.

Auch der Gebrauch verschiedener Techniken in den einzelnen Studien, PCR und FISH, könnte zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben. Dies macht einen direkten Vergleich und die Einschätzung in der klinischen Anwendbarkeit nicht möglich. Auch wenn die FISH-Analyse weniger anfällig für Kontaminationen mit normalem Stromagewebe und überlegener bei geringen EGFR-Genkopienzahlen ist, wurde in der PCR ein Kontrollgen eingesetzt und die Ergebnisse waren reproduzierbar. Jedoch könnte es in der PCR zur Dilution von Tumorslysat durch nicht-neoplastisches Gewebe gekommen sein. Für die Etablierung der EGFR-Genkopienzahl als prädiktiver Marker in der Klinik ist es somit von Nöten, die Bestimmungsmethoden zu vereinheitlichen.

### **5.4 Validierung eines in der CIOX-Studie generierten Scores für die Therapieentscheidung**

Mit Hilfe eines in der CIOX-Studie [56] generierten Scores wurde die individuelle Wahrscheinlichkeit eines Patienten für das Therapieansprechen (ORR-P) auf eine Cetuximab-Behandlung errechnet. Es wurde hierfür eine logistische Regression angewendet, in welche die AREG-Expression und das Verhältnis von EGFR zu Chromosom 7 miteinflussen.

In der FIRE-3 Studie konnte bei Anwendung dieses Scores in der RAS-Wildtyp Population und in der RAS & BRAF-Wildtyp Population eine Tendenz zu einem längeren Überleben festgestellt werden, welches aber aufgrund der Kohortengröße das Signifikanzniveau nicht erreichte. Anders als in der CIOX-Studie, welche die Wirksamkeit von Capecitabin plus Irinotecan plus Cetuximab (Arm A) im Vergleich zu Capecitabin plus Oxaliplatin plus Cetuximab (Arm B) untersuchte, wurden die Patienten in der vorliegenden FIRE-3 einheitlich mit FOLFIRI, sprich Folinsäure, 5-FU i.v. und Irinotecan, behandelt.

Denkbare Ursache für das nicht Zutreffen des Scorings in der FIRE-3 Studie können die unterschiedlichen Wirkmechanismen von Oxaliplatin und Irinotecan sein: Anders als Irinotecan, welches die Topoisomerase hemmt, wirkt Oxaliplatin über eine DNA-Quervernetzung. Die Hemmung des EGFR-Signalwegs durch Cetuximab macht Zellen über eine Downregulation von DNA-Reparaturgenen, welche mit einer Oxaliplatinresistenz in Verbindung gebracht werden, empfindlicher gegenüber Oxaliplatin [4].

### 5.5 Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie aufgezeigt werden, dass eine RNA Isolation und deren quantitative Analyse aus Formalin-fixiertem und in paraffin-eingebettetem Tumorgewebe für die untersuchten Enzyme technisch möglich ist. Ebenfalls gelang es, die EGFR-Genkopienzahl mit Hilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachzuweisen. Beide Methoden eröffnen so die Möglichkeit auch archiviertes Material größerer Kollektive auszuwerten.

Zur Verbesserung des Einsatzes einer anti-EGFR-Therapie, sollten Patienten aufgrund der hier erhobenen Daten nach der Expression der Biomarker AREG und EREG sowie dem Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 stratifiziert werden. Besonders profitieren RAS-Wt Patienten ohne BRAF-Mutation mit einer erhöhten AREG und EREG Expression sowie einem hohen Verhältnis von EGFR/ Chromosom 7 von einer anti-EGFR Therapie. Eine hohe AREG Expression nimmt dabei den höchsten Stellenwert ein, da ihr sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Wert zugutekommt. Bei niedrig regulierten Liganden dagegen scheint eine EGFR-Therapie keinen Überlebensvorteil zu erzielen. Liegt ein RAS-Mt Subtyp vor, haben die drei Parameter keinen Einfluss auf das Outcome einer anti-EGFR Therapie.

Würden die in dieser Arbeit erhobenen Befunde über ein verbessertes Outcome bei erhöhter EGFR-Liganden Expression in weiteren Studien bestätigt werden, so wäre es denkbar, dass in Zukunft für jeden Patienten ein individuelles genetisches Tumorprofil erstellt werden könnte. Durch die Identifikation von „Hochrisikopatienten“ könnte auf eine Antikörpertherapie mit Cetuximab verzichtet werden.

Auch wenn eine erhöhte EGFR-Genkopienzahl bei RAS-Wt Patienten mit einem besseren Gesamtüberleben auf eine Cetuximab-Behandlung assoziiert zu sein scheint, ist der klinische Nutzen dieses Biomarkers noch nicht gesichert: Noch verhindern zum einen heterogene Scoring-Systeme den Einsatz im klinischen Alltag. Zum anderen leidet die Auszählung der EGFR-Genkopienzahl unter einer schlechten Vergleichbarkeit, bedingt durch das heterogene, gruppierte Vorliegen in einzelnen Gewebeabschnitte, welches zu Missklassifikationen führen kann, sowie technische Faktoren wie unterschiedliche Untersuchungsmethoden und Unterschiede in der Dicke der Tumorschnitte. Hinzukommend waren die Fallzahlen in den veröffentlichten Studien stets klein, was zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben könnte. Deswegen besteht zur Durchführung weiterer Untersuchungen die Notwendigkeit, validierte Protokolle und Leitlinien zur Ermittlung der EGFR-Genkopienzahl zu erstellen. Als einheitliche Untersuchungsmethode scheint die FISH-Analyse geeignet zu sein, da sie wenig anfällig für Kontaminationen ist.

## 6 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome zählen zu den häufigsten malignen Erkrankungen und den häufigsten krebbedingten Todesursachen der westlichen Welt. Neben der Dysregulation des Wnt-Pathways ist der Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase-Weg (MAPK), ein wichtiges Signalnetzwerk, das häufig von Veränderungen betroffen ist. Der MAPK Pathway kann über die Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) aktiviert werden. Der EGFR gehört zu dem ErbB-Netzwerk, welches aus vier Rezeptoren besteht und über 12 bisher bekannte Liganden (darunter auch Amphiregulin und Epiregulin) aktiviert werden kann. Der EGFR besitzt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Differenzierung und Proliferation von Epithelzellen. Ein pathologisch hyperaktivierter EGFR Signalweg trägt zur Tumorentstehung und -progression bei und bietet daher Strukturen für diagnostische Marker und Angriffspunkte für antiproliferative Therapien. Für die Entwicklung solcher gezielter onkologischer Therapiestrategien ist das detaillierte Verständnis der molekularen Grundlagen der Tumorentstehung unabdingbar. So ist der gegen den EGF-Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab in Europa seit 2004 für die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen. Das Vorhandensein einer aktivierenden Mutation auf dem RAS-Gen, welche im EGFR abhängigen Signalweg eine zentrale Rolle hat, führt zu einer andauernden Stimulation der Zellen und führt zu einer Resistenz gegenüber einer anti-EGFR Antikörperbehandlung. Daher ist die Therapie mit Cetuximab auf den Einsatz bei Patienten mit RAS-Wildtyp Tumoren beschränkt. KRAS Exon 2 Mutationen, die in 30-40% der Patienten mit KRK zu finden sind, und die weniger häufigen Mutationen in Exon 3, 4 von KRAS und Exon 2, 3, 4 von NRAS sind bisher als einzige prädiktive Marker in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms etabliert. Mit deren Hilfe kann die Wirksamkeit einer Behandlung das Ansprechen einzelner Patienten vorhergesagt werden. Da jedoch auch in Patienten mit RAS-Wildtyp nur etwa 50% auf eine Monotherapie mit Cetuximabbehandlung ansprechen, ist die Suche nach weiteren prädiktiven Biomarkern notwendig um einen noch gezielteren Einsatz dieser Medikamente zu ermöglichen. Hierbei bieten sich zum einen die Zielstruktur der EGFR-Antikörper, also die Expression des EGFR, zum anderen dessen Liganden als mögliche prädiktive Parameter an.

Ziel der Arbeit war es, die Expression von Schlüsselproteinen des EGFR-Pathways wie den Liganden des EGF-Rezeptors Amphiregulin und Epiregulin, sowie die Genkopienzahl des EGF-Rezeptors im Verhältnis zu Chromosom 7 zu messen und die so gewonnenen Ergebnisse mit den klinischen Parametern zu korrelieren. Die Untersuchungen wurden an 520 Tumorproben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom, welche im Rahmen der FIRE-3 Studie (AIO KRK-0306) mit FOLFIRI plus Bevacizumab oder Cetuximab behandelt wurden, durchgeführt.

Dazu wurde nach RNA-Isolation aus FFPE-Schnitten mittels Real-time qRT-PCR die mRNA-Expression von Amphiregulin und Epiregulin bestimmt:

Wurden die Patienten unabhängig von der Behandlung betrachtet, zeigte sich ein signifikanter prognostischer Wert für hohe AREG Expression. Patienten mit höheren AREG Werten hatten ein signifikant längeres medianes Gesamtüberleben ( $p=0.048$ ) und ein im Trend verlängertes progressionsfreies Überleben ( $p=0.101$ ). Diese Beobachtung war innerhalb der Cetuximab behandelten Gruppen deutlich stärker, so dass neben dem prognostischen Wert auch ein prädiktiver Wert postuliert werden kann.

Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit einer hohen EREG-Expression, unabhängig von der Behandlung, eine Tendenz zu einem längeren progressionsfreien Überleben ( $p=0.064$ ). Diese Tendenz erreichte innerhalb der Bevacizumab behandelten Gruppe das Signifikanzniveau ( $p=0.032$ ).

In der Subgruppe mit RAS-Mutation ließen sich weder mit hohen EREG Werten noch mit hohen AREG Werten Vorteile bezüglich Gesamtüberleben oder progressionsfreiem Überleben finden.

Die EGFR-Genkopienzahl im Verhältnis zu Chromosom 7 wurde mit Hilfe der FISH-Analyse an Paraffinschnitten bestimmt. Weder in der Subgruppe mit RAS-Mutation, noch in der Subgruppe mit RAS-Wildtyp konnte ein Zusammenhang zwischen dem EGFR/ Chromosom 7 Verhältnis und dem PFS nachgewiesen werden. Bei RAS-Wt Patienten zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einem längeren Gesamtüberleben bei Werten  $\geq$  Median.

In der CIOX-Studie wurde mit Hilfe einer logistischen Regression die individuelle Ansprechwahrscheinlichkeit eines Patienten auf eine Cetuximab Therapie berechnet. Hierzu wurden die AREG-Expression und das Verhältnis aus EGFR zu Chromosom 7 hinzugezogen. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde das in der CIOX-Studie begründete Scoring auf die FIRE-3 Studie angewendet. Jedoch zeigten sich in keiner der drei Subgruppen (KRAS Exon 2-Wt, RAS-Wt und RAS & BRAF-Wt) signifikante Unterschiede im Ansprechen und Überleben hinsichtlich der individuellen Wahrscheinlichkeit für ein Therapieansprechen (ORR-P) von über oder unter 50%. Unter Zugrundelegung eines infusionalen Fluoropyrimidin-Regimes und einer durchgängigen Behandlung mit Irinotecan eignet sich dieser Score nicht für die Patientenselektion der FIRE-3-Studie.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Geräte

Tab. 7.1: verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Name	Hersteller	Firmensitz
„spin-column“ Präparation	QIACube	QIAGEN	Hilden
Spektralphotometer	Nano Drop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie	Erlangen
MultiBlock System	MBS Satellite 0.2S Thermal Cycler	Thermo Scientific	Waltham, USA
MutliBlock System	MBS Satellite 0.2G Thermal Cycler	Thermo Scientific	Waltham, USA
Dokumentationsanlage	MultiImage FC Light Cabinet	Alpha Innotech	San Leandro, USA
Dokumentationssoftware	AlphaEase FC	Alpha Innotech	San Leandro, USA
Real- Time PCR- System	LightCycler® 480 Real- Time PCR System	Roche Diagnostics	Mannheim
Real- Time Software	LightCycler® 480 Software	Roche Diagnostics	Mannheim
Spannungsgerät	PowerPac Basic	Bio-Rad	München
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad	München
Mehrfachdispenser	HandyStep electronic	Brand	Wertheim
Pipetten	Research	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	Mikro-Zentrifuge für Reaktionsgefäße	neoLab	Heidelberg
Zentrifuge	Mikro-Zentrifuge für PCR-Strips	neoLab	Heidelberg
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg
Vortexer	Vortex- Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wärmeblock	Thermomixer comfort 2ml	Eppendorf	Hamburg
Mikrowelle		Miele	Gütersloh
Mikroskop		Leica	Wetzlar
Software	SPSS PASW 18.0	SPSS Inc.	Chicago, USA
Autoklav		WTB Binder	Tuttlingen
Flockeneisbereiter	NordCap SPR 80	NordCap	Bremen
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau

## 7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7.2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Produktname/ Größe	Hersteller	Firmensitz
Adaptoren	Rotor Adaptoren für QIAcube	QIAGEN	Hilden
	Filtertips 1000µl für QIAcube	QIAGEN	Hilden
Skalpellklingen	Skalpellklingen steril Fig. 16	neoLab	Heidelberg
	LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics	Mannheim
Pipettenspitzen, mit Filter	SafeSeal Tips (10 µl, 100 µl, 1250 µl)	Biozym Scientific	Hessisches Oldendorf
Pipettenspitzen	Combitips plus 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße	SafeSeal 2,0 ml	Sarstedt	Nürmbrecht
Reaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt	Nürmbrecht
PCR- Strips	Multiply-uStrip Pro 8er Kette	Sarstedt	Nürmbrecht
Deckgläser		Langenbrinck	Emmendingen
Einbettkassetten		Roth	Karlsruhe
Handschuhe	Purple Nitrile	Kimtech Science	Reigate, UK
Papiertücher	Kimwipe Lite	Kimberly Clark	Dallas, USA

## 7.1.3 Chemikalien

Tab. 7.3: verwendete Chemikalien

Substrat	Hersteller	Firmensitz
0,5 x TBE-Puffer	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe
LE Agarose	Biozym Scientific	Hessisches Oldendorf
RNase Zap	Ambion	Huntingdon, UK

## 7.1.4 Kits und fertige Lösungen

Tab. 7.4: verwendete Kits und fertige Lösungen

Methode	Produktname	Hersteller	Firmensitz
RNA- Extraktion	RNeasy FFPE Kit	Qiagen	Hilden
DNA- Aufreinigung	DyeEx™ Spin Kit 2.0	Qiagen	Hilden
Gradienten-PCR	MgCl <sub>2</sub>	Fermentas	St. Leon- Rot
Gradienten-PCR	PCR buffer	Fermentas	St. Leon- Rot

Gradienten-PCR	dNTP Mix, 10 mM each	Fermentas	St. Leon- Rot
Reverse Transkription	dNTP Mix, 10 mM each	Fermentas	St. Leon- Rot
Reverse Transkription	5 x Reaction Buffer	Fermentas	St. Leon- Rot
Real-Time PCR	LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics	Mannheim

### 7.1.5 Enzyme

Tab. 7.5: verwendete Enzyme

Method	Produktname	Hersteller	Firmensitz
Reverse Transkription	RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas	St. Leon-Rot
Reverse Transkription	RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas	St. Leon-Rot
Gradienten-PCR	Maxima™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas	St. Leon-Rot

### 7.1.6 TaqMan Sonden

Tab. 7.6: verwendete Sonden

Method	Produktname	Hersteller	Firmensitz
Real-Time PCR	Universal ProbeLibrary Probes - Probe #38	Roche Diagnostics	Mannheim
Real-Time PCR	Universal ProbeLibrary Probes - Probe #60	Roche Diagnostics	Mannheim
Real-Time PCR	Universal ProbeLibrary Probes - Probe #64	Roche Diagnostics	Mannheim
Real-Time PCR	Universal ProbeLibrary Probes - Probe #86	Roche Diagnostics	Mannheim

### 7.1.7 Oligonukleotide

Tab. 7.7: verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	Bezugsquelle
Random Hexamer Primer	5'-d(NNNNNN)-3' N = G, A, T or C	Fermentas
A2264 Epiregulin	5'-tgg tct cac tca ggt ctc a-3'	Biomers
A2265 Epiregulin	5'-cgt gag ttg gca tag gga ac-3'	Biomers
A2023 GAPDH	5'-agc cac atc gct cag aca c-3'	Biomers

A2024 GAPDH	5'-gcc caa tac gac caa atc c-3'	Biomers
A2262 Amphiregulin	5'-cgg aga atg caa ata tat aga gca c-3'	Biomers
A2263 Amphiregulin	5'-cac cga aat att ctt gct gac a-3'	Biomers
A1791 Beta-Actin	5'-cca acc gcg aga aga tga-3'	Biomers
A 1792 Beta-Actin	5'-cca gag gcg tac agg gat ag-3'	Biomers

### 7.1.8 Größenmarker

Tab. 7.8: verwendete Größenmarker

---

<b>DNA-Größenmarker</b>	<b>Bezugsquelle</b>
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas

---

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten Frauen, Deutschland 1980–2004, RKI [7]	1
Abb. 1.2:	Adenom-Karzinom-Sequenz [73]	3
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der EGFR-Signalwege	9
Abb. 3.1:	FIRE-3 Studie	13
Abb. 3.2:	HE-Färbung mit markiertem Tumorareal	15
Abb. 3.3:	Spektrale Darstellung von RNA-Proben nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop	17
Abb. 3.4:	Schematische Darstellung der TaqMan-PCR	21
Abb. 3.5:	AREG- Kurvenverlauf eines LightCycler Durchgangs	22
Abb. 4.1:	Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt	29
Abb. 4.2:	Gesamtüberleben bei RAS-Wt	29
Abb. 4.3:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt	30
Abb. 4.4:	Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Wt	30
Abb. 4.5:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt	30
Abb. 4.6:	Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Wt	30
Abb. 4.7:	Progressionsfreies Überleben bei hohem AREG bei RAS-Wt	31
Abb. 4.8:	Progressionsfreies Überleben bei niedrigem AREG bei RAS-Wt	31
Abb. 4.9:	Gesamtüberleben bei hohem AREG bei RAS-Wt	31
Abb. 4.10:	Gesamtüberleben bei niedrigem AREG bei RAS-Wt	31
Abb. 4.11:	Progressionsfreies Überleben bei RAS & BRAF-Wt	32
Abb. 4.12:	Gesamtüberleben bei RAS & BRAF-Wt	32
Abb. 4.13:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS & BRAF-Wt	33

Abb. 4.14:	Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS & BRAF-Wt	33
Abb. 4.15:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS & BRAF-Wt	33
Abb. 4.16:	Gesamtüberleben in Arm B bei RAS & BRAF-Wt	33
Abb. 4.17:	Progressionsfreies Überleben bei hohem AREG bei RAS & BRAF-Wt	34
Abb. 4.18:	Gesamtüberleben bei hohem hohem AREG bei RAS & BRAF-Wt	34
Abb. 4.19:	Progressionsfreies Überleben bei niedrigem AREG bei RAS & BRAF-Wt	34
Abb. 4.20:	Gesamtüberleben bei niedrigem AREG bei RAS & BRAF-Wt	34
Abb. 4.21:	Progressionsfreies Überleben bei RAS-Mt	35
Abb. 4.22:	Gesamtüberleben bei RAS-Mt	35
Abb. 4.23:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt	36
Abb. 4.24:	Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Mt	36
Abb. 4.25:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt	36
Abb. 4.26:	Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Mt	36
Abb. 4.27:	Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt	37
Abb. 4.28:	Gesamtüberleben bei RAS-Wt	37
Abb. 4.29:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt	38
Abb. 4.30:	Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Wt	38
Abb. 4.31:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt	38
Abb. 4.32:	Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Wt	38
Abb. 4.33:	Progressionsfreies Überleben bei hohem EREG bei RAS-Wt	39
Abb. 4.34:	Progressionsfreies Überleben bei niedrigem EREG bei RAS-Wt	39

Abb. 4.35:	Gesamtüberleben bei hohem EREG bei RAS-Wt	39
Abb. 4.36:	Gesamtüberleben bei niedrigem EREG bei RAS-Wt	39
Abb. 4.37:	Progressionsfreies Überleben bei RAS-Mt	40
Abb. 4.38:	Gesamtüberleben bei RAS-Mt	40
Abb. 4.39:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt	41
Abb. 4.40:	Progressionsfreies Überleben in Arm B bei RAS-Mt	41
Abb. 4.41:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt	41
Abb. 4.42:	Gesamtüberleben in Arm B bei RAS-Mt	41
Abb. 4.43:	Gewebeabschnitt mit Eusomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)	42
Abb. 4.44:	schwache Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)	43
Abb. 4.45:	mittlere Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)	43
Abb. 4.46:	hohe Polysomie im Dualbandfilter (EGFR-FISH-Analyse)	44
Abb. 4. 47	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Wt	45
Abb. 4. 48:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Wt	45
Abb. 4. 49:	Progressionsfreies Überleben in Arm A bei RAS-Mt	45
Abb. 4. 50:	Gesamtüberleben in Arm A bei RAS-Mt	45
Abb. 4. 51:	Progressionsfreies Überleben bei KRAS Exon 2-Wt	47
Abb. 4. 52:	Gesamtüberleben bei KRAS Exon 2-Wt	47
Abb. 4.53:	Progressionsfreies Überleben bei RAS-Wt	47
Abb. 4.54:	Gesamtüberleben bei RAS-Wt	47
Abb. 4.55:	Progressionsfreies Überleben bei RAS & BRAF-Wt	48
Abb. 4.56:	Gesamtüberleben bei RAS & BRAF-Wt	48

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Übersicht der UICC Stadien (2010) [85]	4
Tab. 3.1:	Behandlungsgruppen	13
Tab. 3.2:	Pipettierschema des Mastermix	18
Tab. 3.3:	PCR-Reaktionsansatz	19
Tab. 3.4:	RT- qPCR Reaktionsansatz	23
Tab. 4.1:	Patientencharakteristika der Gesamtpopulation und der untersuchten Population	26
Tab. 4.2:	Mediane in Abhängigkeit vom RAS-Status	27
Tab. 4.3:	Mediane in Abhängigkeit vom BRAF-Status	27
Tab. 4.4:	Mediane in Abhängigkeit von der prim. Tumorlokalisation	28
Tab. 4.5:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt	28
Tab. 4.6:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A	29
Tab. 4.7:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm B	29
Tab. 4.8:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei hohem AREG	31
Tab. 4.9:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei niedrigem AREG	31
Tab. 4.10:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt	32
Tab. 4.11:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt in Arm A	33
Tab. 4.12:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt in Arm B	33
Tab. 4.13:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt bei hohem AREG	34
Tab. 4.14:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt bei niedrigem AREG	34

Tab. 4.15:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt	35
Tab. 4.16:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A	36
Tab. 4.17:	Korrelation der AREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm B 36	
Tab. 4.18:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt	37
Tab. 4.19:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A	38
Tab. 4.20:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm B	38
Tab. 4.21:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei hohem EREG	39
Tab. 4.22:	Korrelation der Behandlungsarme mit dem Ansprechen bei RAS-Wt bei niedrigem EREG	39
Tab. 4.23:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt	40
Tab. 4.24:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A	41
Tab. 4.25:	Korrelation der EREG-Expression mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm B 41	
Tab. 4.26:	Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen bei RAS-Wt in Arm A	44
Tab. 4.27:	Korrelation des Verhältnis EGFR/ Chromosom 7 mit dem Ansprechen bei RAS-Mt in Arm A	45
Tab. 4.28:	Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei KRAS Exon 2-Wt	46
Tab. 4.29:	Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei RAS-Wt	47
Tab. 4.30:	Korrelation der ORR-Wahrscheinlichkeit mit dem Ansprechen bei RAS&BRAF-Wt	48



## 7.4 Literaturverzeichnis

- [1] Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626–1634.
- [2] Baba I, et al. Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 6886–6889.
- [3] Baker JB, Dutta D, Watson D, et al. Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 488-95.
- [4] Balin-Gauthier D, Delord JP, Pillaire MJ, et al. Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br J Cancer* 2008; 98: 120-8.
- [5] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al. 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* 2007; 67: 2643-8.
- [6] Bertario L, et al. Predictors of metachronous colorectal neoplasms in sporadic adenoma patients. *Int J Cancer* 2003; 105: p. 82-7.
- [7] Bertz Joachim, et al. Verreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut 2010.
- [8] Bingham SA, Day NE, Luben R, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496–1501.
- [9] Birkner BR. Evidence-based prevention of colorectal carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2598–2603.
- [10] Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663–671.
- [11] Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011; 22: 1535-46.
- [12] Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2008; 19: 717–723.

- [13] Cappuzzo F, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643–655.
- [14] Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803–1810.
- [15] Ciardiello F, Kim N, Saeki T et al. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7792-7796.
- [16] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337–345.
- [17] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949–954
- [18] De Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938–2947.
- [19] Di Nicolantonio, F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5705-12.
- [20] Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4697-705.
- [21] Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Final results from PRIME: randomized phase 3 study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014; 25: 1346–55.
- [22] Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369: 1023–34.
- [23] Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47: 624–630.
- [24] Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323-32.
- [25] Falcone A, Ricci S, Brunetti I et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for

- metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670–1676.
- [26] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–767.
- [27] Fishel R., Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 382-395.
- [28] Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 136–147.
- [29] Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22: 1797–1806.
- [30] Gregor DH. Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer. *Cancer*, 1971; 28: 131-4.
- [31] Hamilton W, Round A, Sharp D, et al. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study *Br J Cancer* 2005; 93: 399-405.
- [32] Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, et al. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 262-71.
- [33] Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 1470-2045: 70330-4.
- [34] Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3351–3357.
- [35] Hurbin A, Dubrez L, Coll JL et al. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1010: 354-7.
- [36] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335–42.
- [37] Hurwitz HI, Yi J, Ince W, et al. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2009; 14: 22-28.

- [38] Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, et al. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35: 335–351.
- [39] Inatomi O, Andoh A, Yagi Y, Bamba S, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Regulation of amphiregulin and epiregulin expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med* 2006; 18: 497-503.
- [40] Jacobs B, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5068-74.
- [41] Johnson GR, Saeki T, et al. Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol* 1992; 118: 741-751.
- [42] Kabbinavar FF, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3697-705.
- [43] Karapetis CS, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757–1765.
- [44] Kaatsch P, et al. Krebs in Deutschland 2009/2010 - Häufigkeiten und Trends. Berlin: Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 9. Ausgabe, 2013
- [45] Khambata-Ford S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230-3237.
- [46] Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-763.
- [47] Köhne CH, et al. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4856-65.
- [48] Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914–4921.
- [49] Lièvre A, Laurent-Puig P. Predictive factors of response to anti-EGFR treatments in colorectal cancer. *Bull Cancer* 2008; 95: 133-40.
- [50] Lievre A, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 374-9.

- [51] Liu G, et al. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997; 15: 110-5.
- [52] Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2014; 50: 57-63.
- [53] Loupakis F, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 715-21.
- [54] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
- [55] Mayer A, Takimoto M, Fritz E et al. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 2454–60
- [56] Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, et al. Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104--a randomized trial of the German AIO CRC study group. *JCO* 2011; 29: 1050-8.
- [57] Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al: Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: A cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6: 279-286.
- [58] Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251–2270.
- [59] Ooi A, Takehana T, Li X, et al. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: An immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004; 17: 895-904.
- [60] Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 2003; 52: 861–867.
- [61] I N, Fieuws S, Piessevaux H, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5869–5876.
- [62] Petrelli N, Douglass HO Jr, Herrera L et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1419–1426.

- [63] Porschen R, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4217-23.
- [64] Rafaelsen SR and Jakobsen A. Contrast-enhanced ultrasound vs multidetector-computed tomography for detecting liver metastases in colorectal cancer: a prospective, blinded, patient-by-patient analysis. *Colorectal Dis* 2011; 13: 420-5.
- [65] Reid ME, Marshall JR, Roe D, et al. Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1006–1011.
- [66] Reinecke A. Grundlagen, Methoden und Anwendungen, hg. von UTB, Stuttgart, 1. Auflage, 2004.
- [67] Saeki T, Stromberg K, Qi CF, et al. Differential immunohistochemical detection of amphiregulin and cripto in human normal colon and colorectal tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 3467–3473.
- [68] Saltz LB Meropol NJ, Loehrer PJ Sr et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201–8.
- [69] Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013–2019.
- [70] Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1193-7.
- [71] Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3238-3245.
- [72] Schmiegel W, et al. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2013.
- [73] Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. Teil I: Epidemiologie, Tumorbiologie, Zytostatika, Prinzipien der Tumorthherapie, Supportive Maßnahmen. Teil II: Therapiekonzepte maligner Tumoren. Teil III: Indikationen und Therapiekonzepte Kurzversion. Vol. 4. Aufl. 2006: Springer. 6853.
- [74] Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, et al. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer ONLINE FIRST.

- [75] Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC et al. Epiregulin Is a Potent Pan-ErbB Ligand That Preferentially Activates Heterodimeric Receptor Complexes. *J Biol Chem* 1998; 273: 10496-505.
- [76] Shia J, Klimstra DS, Li AR, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2005; 18:1350-1356.
- [77] Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG et al. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6528-6532.
- [78] St John, DJ, et al. Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Int Med*, 1993; 118: 785-90.
- [79] Stathopoulos GP, Batziou C, Trafalis D, et al. Treatment of colorectal cancer with and without bevacizumab: a phase III study. *Oncology* 2010; 78: 376-381.
- [80] Tejpar S, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *J Clin Oncol*. 2014;32 (suppl 3; abstr LBA444).
- [81] Tournigand C, Andre T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229–237.
- [82] Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D et al. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 7495-500.
- [83] Van Cutsem E, Köhne CH, Lang I, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2011-9.
- [84] Willmarth NE, Ethier SP. Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 37728-37737.
- [85] Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112: 594–642.
- [86] Wittekind C, Meyer HJ. TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 2010.
- [87] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.

- [88] Yonesaka K, Zejnullahu K, et al. Autocrine Production of Amphiregulin Predicts Sensitivity to Both Gefitinib and Cetuximab in EGFR Wild-type Cancers. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6963-73.
- [89] [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/CCCLMU-Krebszentrum-Muenchen/de/studien/darmkrebsstudien\\_med3\\_ag-onkologie/darmkrebsstudien/abgeschlossen/fire-3/index.html](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/CCCLMU-Krebszentrum-Muenchen/de/studien/darmkrebsstudien_med3_ag-onkologie/darmkrebsstudien/abgeschlossen/fire-3/index.html) (22.05.2014)

## **7.5 Danksagung**

An erster Stelle geht mein ganz herzlicher Dank an Herrn Professor Dr. med. Volker Heinemann für die Betreuung und die Bereitstellung des interessanten Themas.

Ohne die Kooperation mit dem pathologischen Institut wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen, deswegen gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Thomas Kirchner, dem Leiter des Pathologischen Instituts, sowie Herrn Professor Dr. rer. nat. Andreas Jung, dem Leiter der Arbeitsgruppe, welcher mich bestens in die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden eingearbeitet hat.

Für die herzliche Aufnahme und die unermüdliche Hilfsbereitschaft und Geduld danke ich allen Mitgliedern der AG Jung, im Besonderen Stefanie Jaitner und Alexandra Schindler, welche mir nicht nur bei fachlichen Problemen stets mit Rat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei Herr PD Dr. med. Sebastian Stintzing bedanken, seine stets geduldige und hilfsbereite Betreuung trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

## 7.6 Eidesstattliche Versicherung

Ruth, Anna-Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

”Korrelation der EGFR Liganden Amphiregulin und Epiregulin mit der therapeutischen Effizienz bei Patienten mit metastasierten, kolorektalen Karzinom, die im Rahmen der FIRE-3 Studie behandelt wurden”

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 14.10.2017