

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

MOLEKULARE PRÄDIKTION DES ANSPRECHENS AUF CETUXI-  
MAB IM RAHMEN DER FIRE-3 STUDIE. UNTERSUCHUNGEN AM  
EGFR („EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR“) -  
SIGNALTRANSDUKTIONSWEG

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

vorgelegt von  
Lisa Miller-Phillips, geb. Rossius  
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Hermeking  
Prof. Dr. Markus Rentsch  
Prof. Dr. Jörg Schirra

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Sebastian Stintzing

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	6
2	Einleitung.....	8
2.1	Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms.....	8
2.2	Therapieschemata des metastasierten kolorektalen Karzinoms.....	10
2.2.1	Leitlinie zur Chemotherapie.....	10
2.2.2	Leitlinie zur Antikörpertherapie mittels EGFR-Blockade .....	12
2.2.2.1	Der EGF-Rezeptor und seine Signaltransduktionswege.....	12
2.2.2.2	Antikörper gegen den EGF-Rezeptor .....	14
2.2.3	Leitlinie zur Antikörpertherapie mittels Angiogeneseinhibitoren.....	16
2.3	Ziele der FIRE-3 Studie.....	18
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Patienten der FIRE-3 Studie .....	20
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien der FIRE-3 Patienten.....	20
3.1.2	Randomisierung und Verblindung.....	21
3.1.3	Therapieschemata der FIRE-3 Patienten.....	21
3.1.4	Untersuchungsvorgaben in der FIRE-3 Studie.....	23
3.2	Methodik.....	24
3.2.1	Isolierung des Tumorzellgewebes und DNA-Aufbereitung .....	24
3.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	25
3.2.2.1	Prinzip .....	25
3.2.2.2	Durchführung.....	26
3.2.3	Erfolgskontrolle mittels Gelelektrophorese .....	30
3.2.3.1	Prinzip .....	30
3.2.3.2	Durchführung und Auswertung.....	30
3.2.4	Pyrosequenzierung.....	31
3.2.4.1	Prinzip .....	31
3.2.4.2	Durchführung.....	32
3.2.5	Auswertung der Ergebnisse.....	35
3.2.5.1	Primäre und sekundäre Endpunkte .....	35
3.2.5.2	Statistische Auswertung .....	35
4	Ergebnisteil.....	36
4.1	Methodik.....	36
4.2	Mutationen in der FIRE-3 Studie.....	38
4.2.1	Verteilung der FIRE-3 Patienten.....	38

4.2.2	RAS-Mutationsverteilung .....	39
4.2.2.1	KRAS Mutationsverteilung .....	41
4.2.2.1.1	KRAS Exon 3, Codon 59-61 .....	41
4.2.2.1.2	KRAS Exon 4, Codon 117 und 146 .....	42
4.2.2.2	NRAS Mutationsverteilung .....	44
4.2.2.2.1	NRAS Exon 2, Codon 12-13 .....	44
4.2.2.2.2	NRAS Exon 3, Codon 59-61 .....	45
4.2.2.2.3	NRAS Exon 4, Codon 117 .....	45
4.2.2.3	Statistische Auswertung der RAS Population .....	46
4.2.2.3.1	Statistische Auswertung der RAS WT Population .....	46
4.2.2.3.2	Statistische Auswertung der RAS mutierten Population .....	48
4.2.3	BRAF Mutationsverteilung .....	50
4.2.3.1	Statistische Auswertung der BRAF mutierten Population .....	52
4.2.4	PIK3CA Mutationsverteilung .....	54
4.2.4.1	Statistische Auswertung der PIK3CA mutierten Population .....	57
4.2.5	AKT Mutationsverteilung .....	59
4.2.6	Therapieansprechen in der FIRE-3 Studie abhängig vom Mutationsstatus .....	59
4.2.7	Doppelmutationen in der FIRE-3 Studie .....	61
5	Diskussion .....	62
5.1	Diskussion der Methodik .....	62
5.1.1	Evaluation der extrahierten Zellen .....	62
5.1.2	Der „Sensitivitäts-Cut-Off“ in der FIRE-3 Studie .....	62
5.2	Diskussion der RAS-Ergebnisse .....	63
5.2.1	RAS-WT Ergebnisse und deren Bedeutung .....	63
5.2.2	Ergebnisse der RAS mutierten Patientenpopulation und deren Bedeutung .....	66
5.3	Ergebnisse der BRAF mutierten Patientenpopulation und deren Bedeutung .....	68
5.4	Ergebnisse der PIK3CA mutierten Patientenpopulation, Doppelmutationen und deren Bedeutung .....	70
5.5	Ausblick zu weiteren Markern in der Therapie des mKRRK .....	72
6	Zusammenfassung .....	73
7	Literaturverzeichnis .....	75
8	Anhang .....	82
8.1	Material und Geräte .....	82
8.1.1	Allgemein verwendete Materialien und Geräte .....	82
8.1.2	DNA-Isolation .....	82

8.1.3	PCR und Pyrosequenzierung.....	83
8.1.4	Gelkontrolle.....	83
9	Abbildungsverzeichnis .....	85
10	Tabellenverzeichnis.....	86
11	Danksagung .....	87

## 1 Abkürzungsverzeichnis

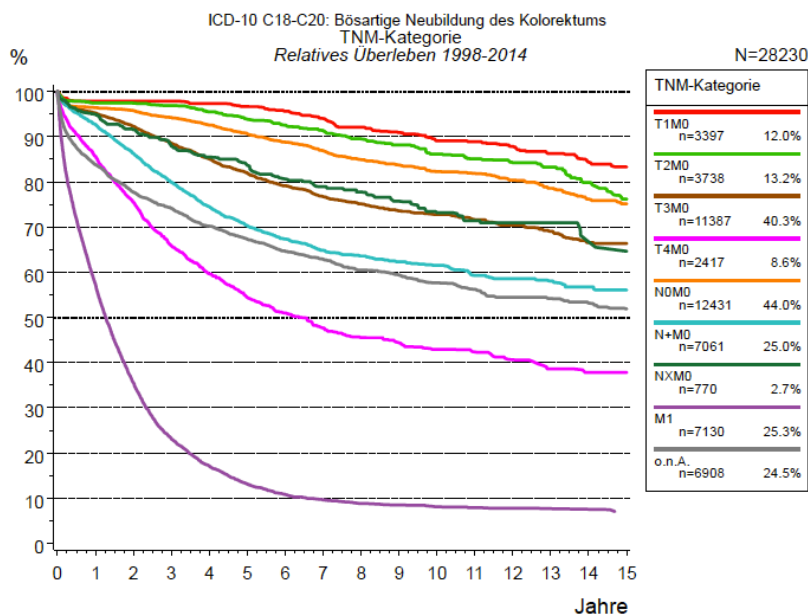
A	Adenin
AKT	Proteinkinase B; AKT serine/threonine kinase 1
APC	Adenomatous-polyposis-coli
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C	Cytosin
CIN	Chromosomal instable
CIMP	CpG-island methylated phenotype
CMS	Consensus molecular subtype
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DpR	Depth of response
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ETS	Early tumor shrinkage
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FOLFIRI	Kombinationschemotherapie: Irinotecan, Kombination aus Bolus und infusionalem 5-Fluorouracil, Folinsäure
FOLFOX	Kombinationschemotherapie: 5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin
FS	Folinsäure
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2	Growth-factor-receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Hazard Ratio
IFL	Kombinationschemotherapie: Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase; Kirsten ras oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
mC	Millicoulomb
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mFOLFOX6	Modified FOLFOX6
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mKRR	Metastasiertes kolorektales Karzinom
MSI	Microsatellite instable
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mut	Mutiert
M0/1	Fernmetastasen (0 = keine Anzeichen; 1 = vorhanden)
n	Anzahl
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase; Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
ORR	Overall response rate (Tumoransprechrte)
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
p	P-Wert/ Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PFS	Progression free-survival (Progressionsfreies Überleben)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
SOS	Son of Sevenless
VEGF-A	Vaskular endothelial growth factor A
VEGFR-2	Vaskular endothelial growth factor receptor 2
WT	Wildtyp
T	Tymin
TNM-Klassifikation	Klassifikation von malignen Tumoren in verschiedenen Stadien (T = Tumor, N = Nodus, M = Metastasen)
5-FU	5-Fluorouracil

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland. Es ist nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste Karzinom der Frau und steht beim Mann nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom an dritter Stelle. Im Jahr 2012 zählte das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Institutes in Deutschland 33.740 Neuerkrankungen bei Männern und 28.490 Neuerkrankungen bei Frauen. Hierbei wurden die Krebserkrankung des Kolons, des Rektums und die selteneren Analkarzinome zusammengefasst. Die relative 5-Jahresüberlebensrate nach Erstdiagnose lag 2011 über alle Krankheitsstadien und bei beiden Geschlechtern bei 63% [1]. Es bestehen jedoch deutliche Unterschiede in der Überlebensrate. So haben Patienten mit Fernmetastasen einen drastisch schlechteren Therapieverlauf. Die Zahlen des Tumorregisters München für das KRK in der Zeitspanne von 1998 - 2014 verdeutlichen den Unterschied im Therapieverlauf bei der Erkrankung mit und ohne Fernmetastasen (Abbildung 2-1). Im Patientenkollektiv mit 28.230 Erkrankten, zeigten Patienten ohne Fernmetastasen (M0 nach TNM-Klassifikation) ein relatives 5-Jahres-Überleben von 54,4-96,7% abhängig vom jeweiligen Tumorstadium, wo hingegen Patienten mit Fernmetastasen (M1 nach TNM-Klassifikation) nur ein relatives 5-Jahresüberleben von 13,1% erreichten [2].



**Abbildung 2-1 Bösartige Neubildung des Kolorektums (Relatives Überleben 1998-2014)**

T = Tumor; N = Nodus; M = Metastasen

[2]



Um die Entstehung des KRK zu vermeiden bzw. das Fortschreiten der Erkrankung zu unterbinden, empfiehlt die S3 Leitlinie des KRK eine Darmkrebs-Vorsorge/Früherkennung für die asymptomatische Bevölkerung ab einem Alter von 50 Jahren [3]. Die Inzidenz für das KRK steigt ab diesem Alter deutlich an [4, 5]. Die Koloskopie besitzt hierbei die höchste Sensitivität und Spezifität und entspricht dem Goldstandard. Polypen, welche Vorstufen von Karzinomen darstellen, werden so abgetragen und Karzinome in einem frühen Stadium entdeckt und therapiert [3]. Dies wird in den kommenden Jahrzehnten die Anzahl der Patienten mit kolorektalem Karzinom vermutlich deutlich verringern [6].

Die S3 Leitlinie für das KRK empfiehlt zudem zur Risikoreduktion eine ballaststoffreiche Diät und eine Vermeidung bzw. Reduktion im Konsum von rotem Fleisch, Tabak und Alkohol. Weitere Risikofaktoren stellen chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das Peutz-Jeghers-Syndrom und ein gehäuftes familiäres Vorkommen dar [3]. Das Verständnis der molekularpathologischen Entstehung des KRK ist dabei von großer Bedeutung, um das individuelle Risiko und Verhalten des Karzinoms einschätzen zu können. Neben einigen hereditären Syndromen wie der FAP, bei der es zu einer Mutation in dem APC (Adenomatous-polyposis-coli)-Tumorsuppressor-Gen kommt oder das HNPCC bei dem es durch Mutationen in den DNA-Reparaturgenen zur Mikrosatelliteninstabilität kommt, treten die meisten Karzinome sporadisch auf [7].

Der Großteil der kolorektalen Karzinome entsteht auf dem Boden der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz [8]. Dieser Karzinogeneseweg beruht auf dem „Stufen-Modell“ von Vogelstein. Es kommt zunächst zu einer Mutation im APC-Gen, welches das APC-Protein, einen Tumorsuppressor kodiert und damit den Zellzyklus und die Apoptose kontrolliert. Dieses ist gleichzeitig ein fester Bestandteil des Wnt-Signalwegs. Die normale Dickdarmmukosa transformiert dadurch zu einem benignen Adenom. KRAS (kirsten ras oncogene homolog) Mutationen folgen und begründen weiteres Wachstum. Durch Akkumulation von Mutationen kommt es zu einem Verlust der Heterozygotie und es entsteht ein zunehmend dysplastischeres Adenom. Deletionen auf dem Chromosom 18q und ein p53 Verlust können zu einer Weiterentwicklung führen, welche dann im Adenokarzinom der Dickdarmschleimhaut enden können [9, 10]. Der serratierte Karzinogeneseweg (serrated pathway) beschreibt ein weiteres Modell zur

Karzinomentwicklung, wobei unter anderem die BRAF Mutation eine wichtige Rolle spielt [10-13].

Durch neue Technologien wird das Sequenzieren von Genen auch von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Archivmaterial möglich, welches das Spektrum von nachweisbaren Mutationen erweitert und die Komplexität der Karzinogenesewege verdeutlicht [7].

Während die oben genannten klassischen Karzinogenesewege aktuell die Therapieentscheidung im metastasierten KRK (mKRK) beeinflussen, gibt es weitere Klassifikationen zur molekularen Einteilung, welche vor allem einen deskriptiven Wert besitzen. So können beim KRK auf genomischer Grundlage u.a. Subgruppen wie CIN (chromosomal instable), CIMP (CpG-island methylated phenotype) oder MSI (microsatellite instable) identifiziert werden [14, 15]. Basierend auf dem Muster der Genexpression kann das KRK nach neueren Untersuchungen auch in vier prognostisch relevante CMS (consensus molecular subtype) – Subgruppen (CMS 1-4) untergliedert werden [7, 16, 17].

## **2.2 Therapieschemata des metastasierten kolorektalen Karzinoms**

### **2.2.1 Leitlinie zur Chemotherapie**

Wie oben bereits erwähnt hat die Patientengruppe mit einem metastasierten KRK (mKRK) einen besonders dramatischen Therapieverlauf. Rund 20% der KRK-Patienten zeigen bei Erstdiagnose bereits Metastasen (synchrone Metastasierung) und etwa ein Drittel der Patienten mit KRK entwickelt im Verlauf Metastasen (metachrone Metastasierung) [18]. Bei nachgewiesener Metastasierung liegt die durchschnittliche Lebenserwartung ohne Therapie bei etwa sechs Monaten [7].

Die Effektivität von Medikamenten im Rahmen von Studien wird mit der Tumoransprechrates (ORR = overall response rate), dem progressionsfreien Überleben (PFS = progression-free survival) und dem Gesamtüberleben (OS = overall survival) gemessen. Dabei ist nach RECIST Kriterien (response evaluation criteria in solid tumors) ein Tumoransprechen erreicht, wenn sich der Tumor unter Therapie um mindestens 30% im Durchmesser verkleinert. Das PFS ist definiert als Zeitintervall zwischen Randomisierung und erstem Nachweis eines Fortschreitens der Krankheit oder Tod des Patienten und das OS ist definiert als Zeitintervall zwischen Randomisierung und Tod des Patienten.

Seit Beginn der 60iger Jahre war das Uracil-Nucleosid Analogon 5-Fluorouracil (5-FU) das Standardmedikament in der Therapie des kolorektalen Karzinoms mit einer Remissionsrate von 10-15% und einem medianen Gesamtüberleben von sechs bis neun Monaten [3]. 30 Jahre später konnte durch die additive Gabe von Folsäure (FS) zu der Bolustherapie von 5-FU das mediane Gesamtüberleben auf ca. zwölf Monate angehoben und eine Remissionsrate von rund 20% erreicht werden [19, 20].

Das zweiwöchige 5-FU Infusionsprotokoll von de Gramont war durch eine signifikant verbesserte Ansprechrate und PFS der Bolustherapie überlegen. Zudem traten weniger Nebenwirkungen auf [21]. In den letzten Jahren konnte dann in einigen großen Phase III Studien für die Erstlinientherapie des mKRC gezeigt werden, dass bei einer Kombinationstherapie aus 5-FU, FS und Irinotecan (FOLFIRI) oder 5-FU, FS und Oxaliplatin (FOLFOX) im Vergleich zu einer Fluoropyrimidin Monotherapie ein Vorteil im Therapieergebnis besteht [22-24]. So konnte in der Studie von de Gramont und Kollegen im Jahr 2000 in der FOLFOX Gruppe eine signifikant erhöhte ORR (50,7% versus 22,3%;  $p = 0,0001$ ) und ein signifikant erhöhtes PFS (9,0 versus 6,2 Monate;  $p = 0,0003$ ) erreicht werden im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5-FU und FS. Das mediane OS war mit 16,2 und 14,7 Monaten ( $p = 0,12$ ) vergleichbar [22]. Das Chemotherapieschema mit infusionalem 5-Fluorouracil, Folsäure und Irinotecan zeigte signifikante Vorteile in der ORR (35% vs. 22%;  $p < 0,005$ ), dem PFS (6,7 vs. 4,4 Monate;  $p < 0,001$ ) und im OS (17,4 vs. 14,1 Monate;  $p = 0,031$ ) im Vergleich zu einer Fluoropyrimidin Monotherapie [24].

Auch in der Studie von Saltz konnte die Kombinationstherapie aus Bolus 5-FU/FS und Irinotecan signifikant verbesserte Ergebnisse in dem ORR, PFS und OS im Vergleich zu der Bolustherapie 5-FU/FS allein zeigen. Die ORR betrug dabei 39% vs. 21% ( $p < 0,001$ ) [25]. Die Zugabe von Irinotecan und 5-FU/FS ist eindeutig von Vorteil, jedoch zeigen Variationen in der Gabe der Therapeutika verschiedene Ergebnisse. Bei der Zusammenstellung eines 14-tägigen Therapieschema mit Irinotecan, einer Kombination aus Bolus und infusionalem 5-FU und FS als Infusion, abgekürzt FOLFIRI, konnte die ORR auf 56% angehoben werden im Vergleich zu einer ORR von 39% im Saltz Protokoll [24-26].

Die aktuelle Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms erfolgt nach den Empfehlungen der jeweils aktuellen S3-Leitlinie für das kolorektale Karzinom. Zu Beginn der Therapie muss die Resektabilität der Metastasen geprüft werden. Diejenigen Patienten, bei denen *keine* primäre chirurgische Entfernung möglich ist, sollten eine

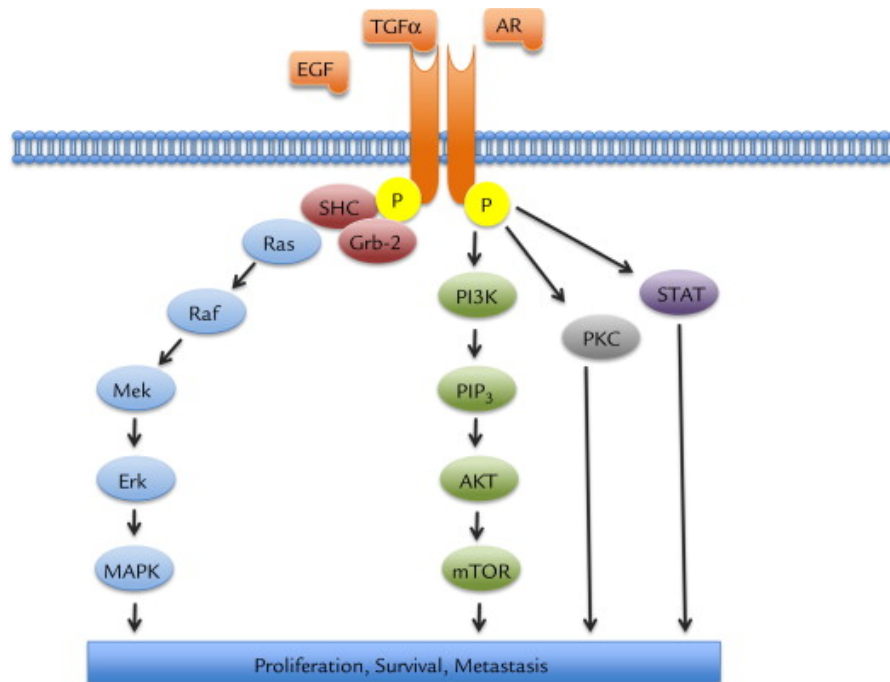
systemische Chemotherapie bekommen. Erste Wahl ist die Kombinationschemotherapie. Dabei dürfen unter anderem FOLFOX oder FOLFIRI in der Erstlinientherapie eingesetzt werden. Bei vergleichbaren Ergebnissen für das Gesamtüberleben werden beide Kombinationstherapien als gleichwertig angesehen. Die Therapie sollte daher abhängig vom Patienten und dem Nebenwirkungsprofil ausgesucht werden [27, 28].

## **2.2.2 Leitlinie zur Antikörpertherapie mittels EGFR-Blockade**

### **2.2.2.1 Der EGF-Rezeptor und seine Signaltransduktionswege**

Der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ist ein transmembraner Wachstumsfaktorrezeptor der in der heutigen patientenorientierten Medizin ein viel untersuchtes Ziel zur spezifischen Therapie von Tumoren ist. Er wird den Thyrosinkinaserzeptoren der ErbB (Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene) Homolog Familie zugeordnet. Er liegt am Anfang von komplexen Signaltransduktionswegen und beeinflusst die Zellproliferation, Apoptose, Adhäsion, Migration, Invasion und die Differenzierung der Zelle. Eine veränderte Aktivität scheint eine Schlüsselrolle in der Entstehung und im Wachstum von Tumorzellen zu spielen [29].

Abbildung 2-2 veranschaulicht die für das KRK wichtigsten Signaltransduktionskaskaden des EGFR. In dieser Arbeit wird speziell auf den RAS (rat sarcoma)-RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma)-MEK (mitogen-activated protein kinase kinase)-ERK (extracellular signal-regulated kinase) Signalweg und auf den PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-AKT (protein kinase B) Signalweg eingegangen.



**Abbildung 2-2 Schlüsselmoleküle im EGFR-Signaltransduktionsweg**

AKT = protein kinase B; AR = amphiregulin; ERK = extracellular signal-regulated kinase; GRB-2 = growth-factor-receptor-bound protein 2; MAPK = mitogen-activated protein kinase; Mek = mitogen-activated protein kinase kinase; mTOR = mammalian target of rapamycin; P = phosphorylated tyrosine; PI3K = phosphatidylinositol-3-kinase; PIP<sub>3</sub> = phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; PKC = protein kinase C; Raf = rapidly accelerated fibrosarcoma; Ras = rat sarcoma; SHC = Src homology 2 domain containing protein; STAT = signal transducer and activator of transcription proteins; TGF- $\alpha$  = transforming growth factor  $\alpha$

[30]

Bei Bindung eines Liganden an der extrazellulären Domäne des EGFR kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und nachfolgender Bindung von GRB2 (growth-factor-receptor-bound protein 2). Dies führt schließlich zu einer Aktivierung des Proteins SOS (Son of Sevenless) und stellt somit die Voraussetzung für den RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg dar. Es folgt ein Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat), was eine RAS-Aktivierung bedingt, welche wiederum die Proteinkinase RAF aktiviert. RAF phosphoryliert und aktiviert MEK. Dieses Protein kann nun die MAPK, ursprünglich ERK genannt, aktivieren, welche dann Einfluss auf Transkriptionsfaktoren und somit Einfluss auf die Zelltranskription hat. Ein weiterer Signalweg wird durch die oben beschriebene RAS-Aktivierung eingeleitet. Dabei bindet das RAS-GTP an PI3K, welches weiter unten im Signalweg sitzende Enzyme wie PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase-1) und AKT kontrolliert und so unter anderem Mitose stimuliert und Apoptose inhibiert [30-32].

Im Gegensatz zu gesunden Zellen, welche strenge Kontrollmechanismen für den EGFR-Mechanismus besitzen, kommt es in Tumorzellen durch Dysregulation zu Proliferation von Zellen, zur Invasion von umgebendem Gewebe und erhöhter Angiogenese.

### **2.2.2.2 Antikörper gegen den EGF-Rezeptor**

Auf Basis einer leitliniengerechten Chemotherapie wurden in den letzten Jahren große Studien zur Einführung von zielgerichteten Antikörpern beim mKRK veröffentlicht. Ein Hauptziel war dabei die Blockade des EGFR mittels monoklonaler Antikörper wie Cetuximab oder Panitumumab. Cetuximab (Erbix®) ist ein chimärer monoklonaler Antikörper und gehört zur Gruppe der IgG1-Immunglobuline. Er bindet am EGFR und verhindert somit das Binden von Liganden und die damit verbundene Aktivierung der darunterliegenden Signaltransduktionswege [33]. Die Studienergebnisse waren zunächst nicht überzeugend. Es konnte kein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben gezeigt werden. Auffällig war jedoch, dass die zusätzliche Antikörpergabe bei einigen Patienten einen deutlichen Vorteil im Krankheitsverlauf zeigte und andere Patientenpopulationen kaum profitierten [34].

Durch Sequenzierung des Protoonkogens KRAS in Höhe der „Hotspotregion“ Codon 12 und 13 im Exon 2 konnten Mutationen in diesem Bereich als negativer Prädiktor für die Anti-EGFR Therapie des mKRK identifiziert werden. Therapieschemata wurden an das molekulargenetische Profil der Patienten angepasst und die Behandlung mit Cetuximab bzw. Panitumumab ausschließlich auf Patienten mit einem KRAS Exon 2 (Codon 12, 13) WT (Wildtyp) beschränkt [34-37].

Durch eine Selektion der Patienten nach KRAS Codon 12 und 13 WT zeigte die Phase III Studie CRYSTAL einen signifikanten Vorteil in der FOLFIRI plus Cetuximab Gruppe im Vergleich zu der FOLFIRI Gruppe allein mit einer ORR von 57,3% vs. 39,7% ( $p < 0,001$ ), einem PFS von 9,9 vs. 8,4 Monaten ( $p = 0,0012$ ) und einem OS von 23,5 vs. 20,0 Monaten ( $p = 0,0093$ ) [38]. Neue Hypothesen zu möglichen Resistenzen gegen die Anti-EGFR Therapie wurden gestellt und mittels neuen und besseren DNA Sequenzierungsmöglichkeiten kam es schließlich zu weiteren molekulargenetischen Untersuchungen in den „Hotspotregionen“ des KRAS Gens, aber auch in dem zur selben Familie gehörenden Gen NRAS (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog). Anschließend wurde die Patientenpopulation für die Anti-EGFR Therapie weiter eingeschränkt auf die all RAS WT Population (KRAS Codon 12, 13, 59, 61, 117, 146; NRAS Codon 12, 13, 59, 61, 117, 146). Diese neue, erweiterte RAS WT Population zeigt in

der CRYSTAL-Studie, in der die Chemotherapie FOLFIRI mit und ohne Cetuximab verglichen wurde, einen signifikanten Vorteil in der ORR, dem PFS und im OS bei Zugabe von Cetuximab [39].

In der OPUS Studie, einer randomisierten Phase II Studie, konnte in der KRAS Codon 12 und 13 WT Population bei Patienten mit mKRK eine signifikant erhöhte ORR (57% versus 34%,  $p = 0,0027$ ) und ein signifikant erhöhtes PFS durch eine zusätzliche Gabe von Cetuximab zu FOLFOX im Vergleich zu FOLFOX allein erreicht werden. In einer weiteren Untersuchung innerhalb der OPUS Studie für die all RAS WT Population zeigte die FOLFOX plus Cetuximab Gruppe eine signifikant verbesserte ORR (58% versus 29%,  $p = 0,0084$ ). Im PFS und OS konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier ist zu beachten, dass die zu untersuchende all RAS WT Population mit einer Patientenanzahl von 87 sehr klein war [40].

Die PRIME Studie eine randomisierte Phase III Studie, in der die Anti-EGFR-Therapie mit dem Antikörper Panitumumab plus FOLFOX mit einer einfachen FOLFOX-Therapie verglichen wurde, zeigte in der KRAS WT Gruppe ein besseres Therapieansprechen. Das PFS in der Gruppe mit Antikörper betrug zehn Monate, im Vergleich zu der alleinigen Chemotherapie mit 8,6 Monaten ( $p = 0,01$ ). Auch das OS zeigte mit 23,9 Monaten im Vergleich zu 19,7 Monaten einen Vorteil in der Panitumumab Gruppe ( $p = 0,17$ ). Dieser konnte durch eine erweiterte RAS Testung auf 26,0 vs. 20,2 Monate weiter verbessert werden ( $p = 0,04$ ) [41].

Es wurde immer deutlicher, dass eine molekularspezifische Genuntersuchung in der Therapie mit EGFR-Antikörpern nötig ist, um einen genauen Überblick über das Wirkungsspektrum zu bekommen.

Neben den RAS-Mutationen sind weitere molekulare Marker, wie BRAF und PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), Bestandteil der aktuellen Forschung um deren Einfluss auf die Therapiewirksamkeit zu ermitteln. BRAF Mutationen, die ungefähr bei 10-15% der Patienten mit KRK vorliegen, werden oft mit einem besonders schlechten Therapieergebnis in Verbindung gebracht [38, 42, 43]. Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage stellt sich die Frage, ob eine generelle BRAF-Mutationstestung, neben der bereits für sinnvoll erachteten RAS-Sequenzierung, durchgeführt werden sollte, um eine für den Patienten optimale Therapie zu gewährleisten. So werden BRAF Testungen auch von den „ESMO (European Society for Medical Oncology) Practical Guidelines 2016“ zur prognostischen Bewer-

tung empfohlen [44] und die kürzlich veröffentlichte S3-Leitlinie empfiehlt eine BRAF-Testung bei Erstdiagnose [3].

Neben den BRAF- könnten auch PIK3CA-Mutationen Einfluss auf eine EGFR-Antikörper Therapie haben [45]. PIK3CA stellt dabei die katalytische Untereinheit der PI3K dar und ist somit ein Teil des PI3K/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) Signalweges. Mutationen werden in kolorektalen Tumoren regelmäßig gefunden [46]. Die Literatur zeigt konträre Studienergebnissen. So stellten in einigen Studien die PIK3CA Mutationen einen negativen Prädiktor bis hin zu einer signifikanten Resistenz gegen eine EGFR Therapie dar [47-49]. Im Gegensatz dazu zeigte die Studie von Prenen et al. keinen Einfluss der PIK3CA-Mutation auf eine EGFR Therapie [50]. Die Arbeit von de Roock et al. stellte einen möglichen Erklärungsansatz durch eine weitere Differenzierung der Mutationen in die „Hotspotregionen“ Exon 9 und 20 dar. Die PIK3CA-Mutation im Exon 20 zeigte im Vergleich zum WT ein schlechteres Ansprechen in der Anti-EGFR Therapie, während eine Mutation im Exon 9 keinen Einfluss darstellte [51]. Aufgrund der nicht ausreichenden Studienlage sind hier jedoch noch weitere Untersuchungen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg notwendig.

Als regelmäßige Nebenwirkung von Cetuximab sind neben der Hypomagnesiämie die Hautreaktionen zu nennen. Studien haben gezeigt, dass eine Reaktion der Haut mit einem besseren Therapieansprechen und einer längeren Überlebenszeit korreliert. Es konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Zusammenhang zwischen Nebenwirkungen und Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg gefunden werden [52].

### **2.2.3 Leitlinie zur Antikörpertherapie mittels Angiogeneseinhibitoren**

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®) ist neben den EGFR-Antikörpern ein fester Bestandteil in der Therapie des mKRR. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der IgG1-Immunglobuline und bindet zielgerichtet an den VEGF-A (vaskular endothelial growth factor A) und verhindert so das Binden von VEGF-A an seinen Rezeptor (VEGFR-2). Eine überschießende Angiogenese wird verhindert und das Wachstum des Tumors gehemmt [53, 54].

Die erste große Phase III Studie wurde 2004 von Hurwitz et al. veröffentlicht, in der die Kombinationschemotherapie Irinotecan, Fluorouracil und Leucovorin (IFL) mit Bevacizumab oder Placebo bei Patienten mit unbehandeltem mKRR verglichen wurde. Die Addition von Bevacizumab zeigte signifikante Verbesserungen im ORR, PFS und OS. Bei den 813 randomisierten Patienten betrug die ORR im Bevacizumab Arm 44,8% und



34,8% im Placebo Arm ( $p = 0,004$ ). Das PFS konnte durch die zusätzliche Antikörpergabe von 6,2 auf 10,6 Monate angehoben werden ( $p < 0,001$ ) und das mediane Gesamtüberleben zeigte 20,3 Monate in der IFL plus Bevacizumab Gruppe im Vergleich zu 15,6 Monaten in der IFL plus Placebo Gruppe ( $p < 0,001$ ) [55]. Dies führte zu einer Zulassung von Bevacizumab mit 5FU/FS mit oder ohne Irinotecan für die Erstlinientherapie des mKRC [3]. In der BICC-Studie wurde Bevacizumab mit FOLFIRI oder Irinotecan plus Bolus FU/FS (mIFL) verglichen. Aufgrund der besseren Therapieergebnisse, aber auch aufgrund der deutlich besseren Verträglichkeit des infusionalen 5-FU Protokolls (FOLFIRI), sollte dieses gegenüber IFL plus Bevacizumab bevorzugt werden [56]. In der multizentrischen Studie NO16966, welche die Chemotherapie Capecitabin und Oxaliplatin (XELOX-Protokoll) mit FOLFOX4 vergleichen sollte, wurde das ursprüngliche Studiendesign nach dem oben beschriebenen signifikanten Lebensvorteil in der Studie von Hurwitz auf ein 2x2 faktorielles Design geändert und um Bevacizumab versus Placebo erweitert. Das PFS in der XELOX oder FOLFOX + Bevacizumab Gruppe mit 9,4 Monaten war signifikant länger im Vergleich zur XELOX oder FOLFOX + Placebo Gruppe mit 8,0 Monaten ( $p = 0,0023$ ). Das OS konnte in der Bevacizumab Gruppe mit 21,3 Monaten versus 19,9 Monaten keine signifikant verlängerte Überlebensdauer zeigen ( $p = 0,077$ ). Bezüglich der ORR wurden vergleichbare Ergebnisse in beiden Therapiegruppen beschrieben [57].

Im Gegensatz zum Antikörper Cetuximab scheint das Therapieansprechen auf Bevacizumab in deutlich geringerem Maße von KRAS und BRAF Mutationen abhängig zu sein [58-60]. Allerdings liegen zu diesem Thema noch keine wirklich belastbaren Daten aus prospektiven Untersuchungen vor.

Zusammenfassend zeigt sich Bevacizumab als verträglicher Partner verschiedener Chemotherapien. In der aktuellen S3-Leitlinie (Stand 2017) wird unter Berücksichtigung der meta-analytischen Aufbereitung der Studiendaten darauf hingewiesen, dass die aktuell zugelassenen infusionalen Kombinationschemotherapien in Kombination mit Bevacizumab zu einer signifikanten Verbesserung des PFS, jedoch nicht der ORR und OS in der Behandlung von Patienten mit mKRC, führen [3].

### 2.3 Ziele der FIRE-3 Studie

Wie bereits beschrieben, ist eine Kombinationschemotherapie, wie FOLFIRI, Therapie der Wahl in der Erstlinientherapie des mKRR. Die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab sind für die Erstlinientherapie des mKRR zugelassen und zeigen signifikant verbesserte Therapieverläufe.

Die FIRE-3 Studie vergleicht als randomisierte Phase III Studie beide Antikörper auf Basis der Chemotherapie FOLFIRI in der Erstlinienbehandlung des mKRR. Dabei wird der Therapiearm A (FOLFIRI plus Cetuximab) mit dem Therapiearm B (FOLFIRI plus Bevacizumab) verglichen.

In dieser Arbeit sollen innerhalb der FIRE-3 Studie folgende Fragen geklärt werden:

1. Welchen Einfluss hat das molekulargenetische Profil des RAS-Gens auf den Therapiearm A und B bezüglich ORR, PFS und OS? Zeichnet sich abhängig von dem Mutationsstatus ein Unterschied im Therapieansprechen zwischen den beiden Armen ab? Hierbei soll auf folgende Mutationslokalisationen eingegangen werden:
  - KRAS Exon 2, Codon 12 und 13
  - KRAS Exon 3, Codon 59 und 61
  - KRAS Exon 4, Codon 117 und 146
  - NRAS Exon 2, Codon 12 und 13
  - NRAS Exon 3, Codon 59 und 61
  - NRAS Exon 4, Codon 117 und 146
  
2. Welchen Einfluss hat das molekulargenetische Profil des BRAF-Gens auf den Therapiearm A und B bezüglich ORR, PFS und OS? Zeichnet sich abhängig von dem Mutationsstatus ein Unterschied im Therapieansprechen zwischen den beiden Armen ab? Hierbei soll auf folgende Mutationslokalisationen eingegangen werden:
  - BRAF Exon 11
  - BRAF Exon 15

3. Welchen Einfluss hat das molekulargenetische Profil des AKT- und PIK3CA-Gens auf den Therapiearm A und B bezüglich ORR, PFS und OS? Zeichnet sich abhängig vom Mutationsstatus ein Unterschied im Therapieansprechen zwischen den beiden Armen ab? Hierbei soll auf folgende Mutationslokalisationen eingegangen werden:

- PIK3CA Exon 9
- PIK3CA Exon 20
- AKT

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patienten der FIRE-3 Studie**

##### **3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der FIRE-3 Patienten**

Die Patienten der FIRE-3 Studie (AIO KRK-0306; NCT00433927) wurden im Zeitraum vom 23.01.2007-19.09.2012 aus 116 Krankenhäusern, Tageskliniken und privaten Arztpraxen in Deutschland und Österreich rekrutiert.

Zusammengefasst galten hierbei folgende Haupteinschlusskriterien [61, 62]:

- Alter: 18-75 Jahre
- Stadium IV
- Histologisch gesichertes Adenokarzinom des Kolons oder Rektums
- ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) - Status: 0-2
- Geschätzte Lebenserwartung größer drei Monate
- Adäquate Organfunktionen: Leukozyten  $\geq 3,0 \times 10^9/l$  mit neutrophilen Granulozyten  $\geq 1,5 \times 10^9/l$ , Thrombozyten  $\geq 100 \times 10^9/l$ , Hämoglobin  $\geq 9g/dl$ , Serumbilirubin  $\leq 1,5$ -mal obere Normwertgrenze, ALAT und ASAT  $\leq 2,5$ -mal obere Normwertgrenze, bei Vorliegen von Lebermetastasen ALAT und ASAT  $\leq 5$ -mal obere Normwertgrenze, Serumkreatinin  $\leq 1,5$ -mal obere Normwertgrenze
- Keine Operation innerhalb der letzten vier Wochen vor Therapiestart
- Vorliegen mindestens einer messbaren Indikatorläsion entsprechend der RECIST-Kriterien 1.0
- Nachweis eines KRAS Exon 2 Wildtyp im Tumor

Zudem sind unter anderem folgende Hauptausschlusskriterien zu nennen [61, 62]:

- Bekannte oder klinisch vermutete Hirnmetastase
- Vorangegangene Behandlung einer EGFR-Target gerichteten Therapie oder mit Bevacizumab
- Vorangegangene Chemotherapie des KRK mit Ausnahme einer adjuvanten Therapie, die mindestens sechs Monate vor Studieneintritt beendet wurde
- Experimentelle medikamentöse Behandlung innerhalb der letzten 30 Tage vor Studienaufnahme
- Klinisch relevante koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt innerhalb der letzten zwölf Monate oder hohes Risiko unkontrollierter Arrhythmien

- Akuter oder subakuter Darmverschluss oder chronisch-entzündliche Darmerkrankung in der Anamnese oder chronische Diarrhoe
- Symptomatische Peritonealkarzinose
- Schwere, nicht heilende Wunden, Ulcera oder Knochenfrakturen
- Unkontrollierte Hypertonie
- Ausgeprägte Proteinurie (nephrotisches Syndrom)
- Arterielle Thromboembolie oder schwere Blutungen innerhalb von sechs Monaten vor Aufnahme in die Studie (Ausnahme Tumorblutung vor der Tumorresektionsoperation)
- Hämorrhagische Diathese oder Thromboseneigung
- Bekannter DPD-Mangel oder bekannter Glukuronidierungsdefekt (Gilbert-Meulengracht-Syndrom)
- Zweitmalignom in der Anamnese während der letzten fünf Jahre mit Ausnahme eines Basalioms oder eines in-situ-Karzinoms der Cervix uteri, soweit diese kurativ behandelt wurden
- Therapeutische Antikoagulation

### **3.1.2 Randomisierung und Verblindung**

Die Patienten der FIRE-3 Studie wurden im Verhältnis 1:1 auf den Therapiearm A (FOLFIRI plus Cetuximab) und den Therapiearm B (FOLFIRI plus Bevacizumab) verteilt. Weder die Patienten, noch die behandelten Ärzte und Radiologen wurden verblindet. Es handelt sich bei der FIRE-3 Studie um eine offene randomisierte Phase III Studie [61, 62].

### **3.1.3 Therapieschemata der FIRE-3 Patienten**

Das Therapieregime der FIRE-3 Patienten wurde als Erstlinientherapie pro Zyklus (14-tägig) wie folgt verabreicht [61, 62]:

Arm A+B	Chemotherapie FOLFIRI:	
	Irinotecan	180 mg/m <sup>2</sup> i.v., 30-90 min, Tag 1
	Folinsäure (racemisch)	400 mg/m <sup>2</sup> i.v., 120 min, Tag 1
	5-FU	400 mg/m <sup>2</sup> als Bolus, Tag 1
	5-FU	2400 mg/m <sup>2</sup> i.v. über 46 h, Tag 1-2

**Tabelle 3-1 Therapieschema: Chemotherapie FOLFIRI**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Folinsäure/Leucovorin, Irinotecan; 5-FU = 5-Fluorouracil

Arm A	Cetuximab initial	400 mg/m <sup>2</sup> als 120 min Infusion,
	danach jeweils	250 mg/m <sup>2</sup> als 60 min Infusion, Tag eins und acht
Arm B	Bevacizumab	5 mg/kgKG i.v. über 30-90* min, Tag eins
	*1. Gabe 90 min, bei guter Verträglichkeit 2. Gabe 60 min, alle weiteren Gaben 30 min	

**Tabelle 3-2 Therapieschema: Antikörpergabe**

Die Behandlung wurde fortgeführt bis es zu einem kompletten Ansprechen, einer Progression der Erkrankung, einer inakzeptablen toxischen Wirkung oder einer Möglichkeit der chirurgischen Resektion kam. Die Therapie konnte zudem bei Patientenwunsch oder durch Entscheidung des Arztes beendet werden. Die Cetuximabgabe wurde bei einer allergischen Reaktion Grad III und IV sofort beendet und die Bevacizumabtherapie konnte auch ohne Empfehlung bei einer Grad III Toxizität zu einem späteren Zeitpunkt gegeben werden [61].

Zur Evaluation des Tumoransprechens folgten in der sechsten und zwölften Woche nach Therapiebeginn CT-Untersuchungen, die dann alle zehn Wochen bis zur Abschlussuntersuchung am Therapieende wiederholt wurden. Anschließend erfolgte ein „Follow-Up“ alle drei Monate für maximal fünf Jahre oder bis zum Tod des Patienten. Verträglichkeit und Toxizität wurden bis zum Ende der Studientherapie analog den CTCAE Kriterien (Version 3.0) dokumentiert [61].

### **3.1.4 Untersuchungsvorgaben in der FIRE-3 Studie**

Zwischen Januar 2007 und September 2008 wurden 336 Patienten unabhängig von ihrem KRAS-Status in die FIRE-3 Studie aufgenommen. Durch die zunehmende Evidenz, dass KRAS Exon 2 Mutationen einen negativen Einfluss auf die Therapie mit Cetuximab haben und die daraus folgende Zulassungsänderung für Cetuximab, kam es am 07.10.2008 zu einer Änderung des Studienprotokolls, wobei ein KRAS Exon 2 WT als Einschlusskriterium definiert wurde. Bereits aufgenommene Patienten wurden retrospektiv auf eine KRAS Exon 2 Mutation getestet. Dies erfolgte unter Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München mit der Projekt-Nummer 370-06. Bei vorhandener Mutation wurde der Proband von weiteren Untersuchungen in der Studie ausgeschlossen und bei Patienten welche Cetuximab erhielten, wurde die Cetuximabgabe beendet. Von Oktober 2008 bis September 2012 wurden Patienten ausschließlich mit KRAS Exon 2 WT in die Studie aufgenommen. Es erfolgten daraufhin weitere retrospektive Untersuchungen aller Patienten auf ihren RAS-, BRAF-, PIK3CA- und AKT-Status unter Einverständnis der Ethikkommission mit der Projekt-Nummer 186-15 [61, 63].

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Isolierung des Tumorzellgewebes und DNA-Aufbereitung

Das Tumorgewebe der FIRE-3 Patienten wurde bereits als schneidefertiger Paraffinblock an die Organisatoren der FIRE-3 Studie geschickt. In der Pathologie der LMU München wurden unter Zuhilfenahme eines Mikrotoms etwa 4µm dünne Schnitte von den Paraffinblöcken gelöst und auf Objektträger fixiert. Es wurden insgesamt sechs Schnitte pro Block angefertigt. Ein Schnitt wurde daraufhin mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) behandelt. Hierbei werden basophile und azidophile Strukturen der Zelle angefärbt, was das Tumorzellgewebe unter dem Mikroskop von den gesunden Zellen abgrenzbar macht. Auf diese Weise konnte das Tumorgewebe von dem Restgewebe unterschieden und unter dem Mikroskop markiert werden.

Die DNA-Isolierung erfolgte aus den nicht gefärbten Schnitten, welche zur weiteren Verarbeitung entparaffiniert wurden. Die Objektträger wurden hierbei dreimal zehn Minuten in reines Xylol getaucht, gefolgt von einem dreimaligen zehn-minütigen 100%igen Alkoholbad. Unter Zuhilfenahme des gefärbten Schnittes konnte das Tumorgewebe in den nicht gefärbten Schnitten markiert werden und Tumorzellen wurden mit einem Skalpell (Größe 28) makroskopisch und mikroskopisch von den entparaffinierten Objektträgern gelöst. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Geräte und Lösungen ist im Anhang aufgeführt.

Die Reinigung der DNA aus dem gelösten Tumorgewebe erfolgte mit Hilfe des „QIAmp DNA FFPE Tissue Kits“ der Firma Qiagen und einer standardisierten Methodik (SOP = standard operation procedure) des Pathologischen Instituts der LMU München. Die Tabelle 3-3 zeigt die Bestandteile des „QIAmp DNA FFPE Tissue Kits“.

Zunächst wurde eine Lyse des entfernten Tumorzellgewebes durchgeführt, indem das Material in ein mit 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinase gefülltes Eppendorf-Gefäß gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation des Gewebelysats in einem Thermomixer, um eine ständige Durchmischung und Temperierung zu gewährleisten. So wurden die Proben für fünf Stunden auf 56°C erhitzt – bei einer Mischfrequenz von 450rpm, gefolgt von zehn Minuten bei 95 °C ohne Durchmischung.

Im letzten Schritt der Gewebelyse und Aufreinigung wurde der Qiacube der Firma Qiagen mit den Bestandteilen des „QIAmp DNA FFPE Tissue Kits“ bestückt. Zusätzlich wurde 100%iger Alkohol benutzt. Nach einem bereits vom Hersteller etablierten einstündigen Programm im Qiacube lag die DNA der gelösten Zellen frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Verunreinigungen vor.



<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit</b>	
Anzahl der Proben	50
QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2 ml)	3 x 50
Buffer ATL	14 ml
Buffer AL	12 ml
Buffer AW1 (Konzentrat)	19 ml
Buffer AW2 (Konzentrat)	13 ml
Buffer ATE	20 ml
Proteinase K	1,25 ml
Selection Guide	1

**Tabelle 3-3 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit**

Bei nicht sofortiger Weiterverarbeitung konnte die aufgereinigte DNA bei -20 °C aufbewahrt werden.

### **3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion**

Da die Menge der purifizierten DNA nicht für die gewünschte Sequenzierung reichte, musste im nächsten Schritt die DNA vervielfältigt werden.

#### **3.2.2.1 Prinzip**

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction) kann in vitro eine spezifische Nukleinsäuresequenz vervielfältigt werden. Es handelt sich um eine exponentielle Kettenreaktion, da das Produkt der vorherigen Reaktion als Ausgangsstoff für die nächste Reaktion dient. Jeder Zyklus der PCR kann in drei Schritte zusammengefasst werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Tumor-DNA erhitzt und somit denaturiert. Ziel dieser Reaktion ist die Herstellung von Einzelsträngen. Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer an die DNA Einzelstränge. Hierbei wird eine primerspezifische Temperatur für kurze Zeit gehalten. Die Elongation durch die Taq (Thermus aquaticus) -Polymerase bei einer bestimmten Temperatur stellt den letzten Schritt dar. Hierbei lagert sich die DNA-Polymerase an den auf dem Einzelstrang sitzenden Primer am 3'-Ende und stellt einen komplementären Strang mittels freien Nukleotiden her.

### 3.2.2.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte entsprechend den SOP-Leitlinien des Pathologischen Instituts der LMU München. Im ersten Schritt wurde ein Primer-Mix für die verschiedenen Gene nach dem Protokoll (Tabelle 3-4) angesetzt. Die genspezifischen Primernamen und Sequenzen können der Tabelle 3-5 entnommen werden.

<b>Primer-Mix</b>	
Primer 1	20 µl
Primer 2	20 µl
Destilliertes Wasser	60 µl
Primer-Mix Gesamtvolumen	100 µl

**Tabelle 3-4 Primer-Mix für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

<b>GEN</b>	<b>Name Primer 1 (PCR) Primersequenz</b>	<b>Name Primer 2 (PCR) Primersequenz</b>
PIK3CA Exon 9	A 1957 PIK3CA Ex9-F-BIO 5'-aac agc tca aag caa ttt cta cac g-3'	A 1958 PIK3CA Ex9-R 5'-acc tgt gac tcc ata gaa aat ctt t- 3'
PIK3CA Exon 20	A 1960 PIK3CA Ex20-F-BIO 5'-caa gag gct ttg gag tat ttc a-3'	A 1961 PIK3CA Ex20-R 5'-caa tcc att ttt gtt gtc ca -3'
AKT	A 2061 AKT c.49G>A F2~BIO 5'-gag ggt ctg acg ggt aga gtg-3'	A 2062 AKT c.49G>A R2 5'-gcc gcc agg tct tga tgt -3'
NRAS Exon 2, Codon 12-13	A 2346 NRAS Codon 12,13 F4 5'-ctt gct ggt gtg aaa tga ctg ag- 3'	A 2347 NRAS Codon 12,13 R6~BIO 5'-tgg att gtc agt gcg ctt tt-3'
NRAS Exon 3, Codon 59-61	A 2734 NRAS Codon 61 Pyro F1~BIO 5'-gaa acc tgt ttg ttg gac ata ctg -3'	A 2735 NRAS Codon 61 Pyro R1 5'-gta ttg gtc tct cat ggc act gta - 3'

NRAS Exon 4, Codon 117	D0554 NRAS Ex4 p117 F1~Bio 5'- atg atg tac cta tgg tgc tag tgg -3'	D0555 NRAS Ex4 p117 R1 5'- cgt acc tct tgg cca gtt cg -3'
NRAS Exon 4, Codon 146	D0557 NRAS Ex4 p146 F1 5'-cga act ggc caa gag tta cg-3'	D0558 NRAS Ex4 p146 R1~BIO 5'-tga aag ctg tac cat acc tgt ctg-3'
KRAS Exon 3, Codon 59-61	D0548 KRAS Ex3 p59, p61 F3 5'-aat tga tgg aga aac ctg tct ctt- 3'	D0549 KRAS Ex3 p59, p61 R2~Bio 5'-tcc tca tgt act ggt ccc tca tt-3'
KRAS Exon 4, Codon 117	D0542 KRAS Ex4 p117 F1 5'-ctg aag atg tac cta tgg tcc tag- 3'	D0543 KRAS Ex4 p117 R1~BIO 5'-ctg agc ctg ttt tgt gtc tac tg-3'
KRAS Exon 4, Codon 146	A 2269 KRAS 146#2 U 5'-agg ctc agg act tag caa gaa ggt-3'	A2270 KRAS 146 #2 L~BIO 5'-gca taa ttg aga gaa aaa ctg ata tat taa atg -3'
BRAF Exon 11	A1951 BRAF-Ex11-Pyro-F1- BIO 5'-cag tgg gac aaa gaa ttg gat ctg-3'	A 1952 BRAF-Ex11-Pyro-R1 5'-cca tgc cac ttt ccc ttg tag a-3'
BRAF Exon 15	A1954 BRAF-Ex15-Pyro-F1 5'-tga aga cct cac agt aaa aat agg-3'	A1955 BRAF-Ex15-Pyro-R1-BIO 5'-tcc aga caa ctg ttc aaa ctg at-3'

### **Tabelle 3-5 Primernamen und -sequenzen für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; NRAS = Neuroblastoma RAS Viral oncogene homolog; BRAF = proto-oncogene B-Raf; PIK3CA=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT = protein kinase B; PCR= polymerase chain reaction

Nach der Anfertigung des Primer-Mixes konnte der Mastermix entsprechend den SOP-Leitlinien pipettiert werden. Hierzu wurde das „HotStarTaq DNA-Polymerase Kit“ der Firma Qiagen (Tabelle 3-6) und Nukleotide (Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP)-Mix, 10mM jeweils) der Firma Thermo Scientific verwendet.

<b>HotStarTaq DNA-Polymerase Kit</b>	
HotStarTaq DNA Polymerase	4 x 250 units
PCR Puffer 10x (beinhaltet 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	4 x 1,2 ml
Q-Solution 5x	4 x 2 ml
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4x 1,2 ml
Handbuch	1

**Tabelle 3-6 HotStarTaq DNA- Polymerase Kit**

MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid; PCR = polymerase chain reaction

Die Tabelle 3-7 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes mit Mengenangaben. Der Mastermix besteht bei den verschiedenen Genuntersuchungen, abgesehen von dem jeweiligen Primer-Mix, aus den gleichen Bestandteilen. Im letzten Schritt konnte dann die zu vervielfältigende DNA und der Mastermix nach dem in Tabelle 3-8 beschriebenen Verhältnis pipettiert werden.

<b>Mastermix PCR</b>	<b>1x Ansatz (in µl)</b>	<b>26x Ansätze (in µl)</b>
Destilliertes Wasser	32.2	837.2
PCR Puffer, 10x	4	104
dNTP	0.8	20.8
Primer-Mix	0.8	20.8
Taq-Polymerase	0.2	5.2
Gesamtvolumen Mastermix	38	988

**Tabelle 3-7 Mastermix für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

PCR = polymerase chain reaction, dNTP = Desoxyribonucleosidtriphosphat

<b>DNA-Mastermix</b>	
Mastermix	38 µl
DNA	2 µl
Gesamtvolumen	40 µl

**Tabelle 3-8 DNA-Mastermix für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

Der mit DNA versetzte Mastermix wurde daraufhin in einen Thermocycler gegeben. Das Gerät kann vorgegebene Temperaturzyklen einer PCR selbstständig durchlaufen

und ermöglicht den in 3.2.2.1 beschriebenen Vorgang der Vervielfältigung. In dieser Studie wurden die in Tabelle 3-9 aufgelisteten Temperatur-Zyklen durchlaufen. Die Temperatur-Zyklen waren bereits im Labor etabliert. Das Standardprogramm (Tabelle 3-9) wurde für die Genuntersuchung KRAS, BRAF, PIK3CA und AKT verwendet. Für das NRAS Gen wurde das Programm „Hyb 40x58C\_NRAS-pyr“ (Tabelle 3-10) verwendet.

<b>Standardprogramm: Hyb 50x60C-pyr</b>		
1x	95 °C	15 min
50x	95 °C	30 sec
	60 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
1x	72 °C	2 min
	20 °C	1 sec

**Tabelle 3-9 Standardprogramm: Hyb 50x60C-pyr**

<b>NRAS-Programm: Hyb 40x58C_NRAS_pyr</b>		
1x	95 °C	15 min
40x	95 °C	30 sec
	58 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
1x	72 °C	2 min
	20 °C	1 sec

**Tabelle 3-10 NRAS-Programm: Hyb 40x58C\_NRAS\_pyr**

NRAS = Neuroblastoma RAS Viral oncogene homolog

In jedem Lauf wurde zusätzlich eine Positivkontrolle (2µl „Human Genomic DNA male“) und eine Negativkontrolle (2µl destilliertes Wasser) mitgeführt, um mögliche Fehler in der Durchführung aufzudecken.

### **3.2.3 Erfolgskontrolle mittels Gelelektrophorese**

#### **3.2.3.1 Prinzip**

Das Ziel der PCR ist es eine bestimmte Nukleinsäurefrequenz zu vervielfältigen. Dies kann mittels einer Gelelektrophorese kontrolliert werden. Das Prinzip der hier angewendeten Agarose-Gelelektrophorese ist eine Auftrennung der Nukleinsäurestränge nach der jeweiligen Größe. Das Agarosegel dient dabei als Gelmatrix, das eine Siebfunktion besitzt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel Richtung Anode, wobei sich die kleineren Moleküle schneller durch das Gel bewegen können als die größeren. Diese Tatsache macht die Aufteilung nach Größe möglich.

#### **3.2.3.2 Durchführung und Auswertung**

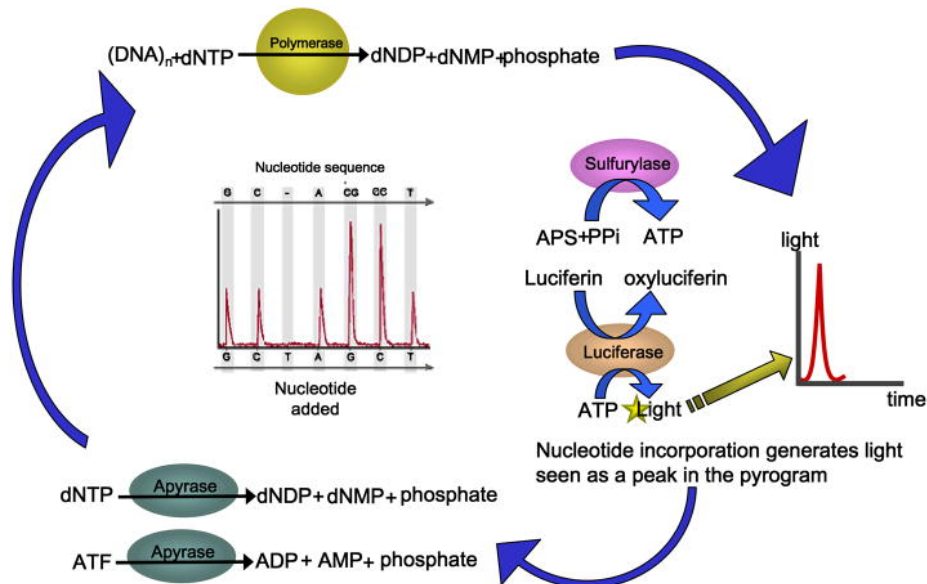
Zunächst wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde 100ml TBE-Puffer zusammen mit 2g Agarose in einen Glaskolben gegeben und 2 Minuten in der Mikrowelle bei 900 Watt erhitzt. Daraufhin wurde 5µl von dem Farbstoff Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in einen passenden Gelständer gegossen. Nach einer halben Stunde hatte sich das Gel verfestigt und es konnte in die entstandenen Geltaschen ein DNA-Gemisch aus 5µl PCR-Produkt und 1µl „DNA Loading Dye“ gegeben werden. Der „DNA Loading Dye“ bindet an die DNA und beschwert diese, sodass sie in den Geltaschen bleibt. Zudem färbt er die DNA an und macht somit deren Verlauf sichtbar. In die äußeren Geltaschen wurden 3µl eines überblickgebenden Markers der Größe 100 Basenpaare (Fermentas GeneRuler) pipettiert, der in der Auswertung zur Größenbestimmung des PCR-Produkts hinzugezogen werden konnte. Es wurde eine Spannung von 120 - 140 Volt für 30 Minuten angelegt und das Ergebnis konnte dann mit Hilfe einer UV-Lichtkamera (Alpha Ease FC Ordner/Fluor Chem FC) ausgewertet und fotografisch festgehalten werden.

Bei erfolgreicher Gelkontrolle und nicht sofortiger Weiterverarbeitung konnten die PCR-Produkte bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 3.2.4 Pyrosequenzierung

#### 3.2.4.1 Prinzip

Die Abbildung 3-1 illustriert die chemischen Vorgänge der Pyrosequenzierung und erklärt die Entstehung der Lichtreaktion.



**Abbildung 3-1 Chemische Reaktionen bei der Pyrosequenzierung**

ATP = adenosine triphosphate; ADP = adenosine diphosphate; AMP = adenosine monophosphate; dNTP = deoxy-nucleotidyl triphosphate; dNDP = deoxy-nucleotidyl diphosphate; dNMP = deoxy-nucleotidyl monophosphate; PPi = pyrophosphate

[64]

Zur Analyse des DNA-Einzelstranges wird ein Gegenstrang synthetisiert. Die Strangelongation geschieht mit Hilfe einer DNA-Polymerase, eines spezifischen Sequenzierprimers und durch Zugabe der vier verschiedenen dNTP. Die Nukleotide werden nacheinander der Reaktion zugegeben. Die Reihenfolge ist durch das eingestellte Programm im Pyrosequenzer vorgegeben. Die Zugabe des passenden Nukleotids führt zum Einbau in den DNA-Einzelstrang und einer damit verbundenen Freisetzung von Pyrophosphat (PPi). Das entstandene Pyrophosphat wird im nächsten Schritt zu Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Das hergestellte ATP generiert mittels der Luciferase eine Lichtreaktion. Das Lichtsignal wird durch eine spezielle Kamera detektiert und im Pyrogramm als Peak dargestellt.

Auf diese Weise kann durch die Herstellung eines Gegenstrangs der Einzelstrang Base für Base untersucht werden. Die Peak-Höhe entspricht der Anzahl der eingebauten Nukleotide und verhält sich proportional. Nach Ablauf jeder Einzelreaktion werden

nicht eingebaute Nukleotide und ATP mittels dem Enzym Apyrase degradiert. Dies führt zu einem Erlöschen des Lichtsignals, was die Basis für den nächsten Reaktionsablauf darstellt.

### 3.2.4.2 Durchführung

Die Arbeitsvorgänge wurden entsprechend dem Protokoll der Pathologie der LMU München ausgeführt. Im ersten Schritt wurde ein „Beads“ (Streptavidin Sepharose High Performance) -Mastermix (Tabelle 3-11) und ein Primer-Mix (Tabelle 3-12, 3-13) nach den unten aufgeführten Tabellen hergestellt. Die verwendeten Primer können der Tabelle 3-14 entnommen werden.

<b>Beads-Mastermix</b>	<b>1x Ansatz (in µl)</b>	<b>24x Ansätze (in µl)</b>
Beads	1	24
Binding buffer	40	960
PCR-Produkt	15	15
Destilliertes Wasser	24	576
Gesamtvolumen	80	1560

**Tabelle 3-11 Beads-Mastermix**  
PCR = polymerase chain reaction

<b>Primer-Mix</b>	<b>1x Ansatz in µl</b>	<b>24x Ansätze in µl</b>
Primer (10x; 3µM)	2,5	60
Annealing buffer	22,5	540
Gesamtvolumen	25	650

**Tabelle 3-12 Primer-Mix für Pyrosequenzierung**

<b>Primer (10x; 3µM)</b>	
Annealing buffer	97 µl
100 µM Primer 3	3 µl

**Tabelle 3-13 Primerherstellung: Primer (10x; 3µM)**



<b>GEN</b>	<b>Name Primer 3 (Pyrosequenz) Primersequenz</b>
PIK3CA Exon 9	A 1959 PIK3CA Ex9-S 5'- cca tag aaa atc ttt ctc ct - 3'
PIK3CA Exon 20	A 1962 PIK3CA Ex20-S 5'- gtt gtc cag cca cca - 3'
AKT	A 2063 AKT c.49G>A S2 5'- ccg cca ggt ctt gat - 3'
NRAS Exon 2, Codon 12-13	A 2348 NRAS codon 12,13 S 5'- tgg tgg tgg ttg gag - 3'
NRAS Exon 3, Codon 59-61	A 2736 NRAS Codon 61 Pyro S2 5'- cat ggc act gta ctc ttc - 3'
NRAS Exon 4, Codon 117	D0556 NRAS Ex4 p117 S1 5'- tcc ttg ttg gca aat c -3'
NRAS Exon 4, Codon 146	D0559 NRAS Ex4 p146 S1 5'- tcc att cat tga aac ct - 3'
KRAS Exon 3, Codon 59-61	D0550 KRAS Ex3 p59, p61 S5 5'- tct ctt gga tat tct cga c - 3'
KRAS Exon 4, Codon 117	D0544 KRAS Ex4 p117 S1 5'- acc tat ggt cct agt agg aa - 3'
KRAS Exon 4, Codon 146	A2271 KRAS 146 #2 S 5'- aat tcc ttt tat tga aac at -3'
BRAF Exon 11	A1953 BRAF-Ex11-Pyro-S1 5'- act ttc cct tgt aga ctg t - 3'
BRAF Exon 15	A1956 BRAF-Ex15-Pyro-S1 5'- gta aaa ata ggt gat ttt gg - 3'

**Tabelle 3-14 Primernamen und -sequenzen für die Pyrosequenzierung**

KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; NRAS = Neuroblastoma RAS Viral oncogene homolog; BRAF = proto-oncogene B-Raf; PIK3CA=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT = protein kinase B; PCR= polymerase chain reaction

In die von der Firma Qiagen hergestellten „Plattentubes“ wurden in 23 der 24 Nöpfchen jeweils 65µl des Beads-Mastermixes und 15µl PCR-Produkt pipettiert und daraufhin zehn Minuten auf einen Schüttler zur Inkubation gegeben.

Währenddessen wurden 23 von 24 Nöpfchen einer weiteren Platte mit 25µl Primer-Mix befüllt. In das 24te Nöpfchen wurden 25µl eines „Control Oligos“ der Firma Qiagen pipettiert. Das „Control Oligo“ der Firma Qiagen zeigt im Pyrogramm eine spezifische Peak-Reihenfolge und prüft das korrekte Sequenzieren der Maschine während jedem Lauf.

Das Gemisch, bestehend aus PCR-Produkt und Beads-Mastermix, wurde nach der zehnmütigen Inkubationszeit mit Hilfe einer Vakuumpumpe aufgesaugt, durch die von der Firma Qiagen vorgegebenen Waschstationen getragen und im letzten Schritt mit dem Primer-Mix zusammengeführt. Dieses Gemisch wurde daraufhin für zwei Minuten auf 80°C erhitzt, was zu einer Denaturierung der DNA führte und letztendlich das Sequenzieren des Einzelstrangs ermöglichte.

Währenddessen konnte die Kartusche des Pyrosequenzers nach der Abbildung 3-2 befüllt und in den Pyrosequenzer gegeben werden. Die zu pipettierenden Mengen sind dabei von den verschiedenen Gensequenzen und der Probenzahl abhängig und wurden von dem Programm der Firma Qiagen automatisch berechnet.

E	A	S
T		C
	G	
LABEL		

**Abbildung 3-2 Befüllung des Cartridge**

(E = Enzym; S = Substrat; A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin; G = Guanin)

Die verwendeten Materialien sind alle Bestandteile des „PyroMark Q24 Gold-Kits Accessories and Reagents“ von Qiagen. Die Platte wurde nach einer fünfminütigen Abkühlungsphase bei Raumtemperatur im Pyrosequenzer befestigt. Je nach Gen konnten verschiedene Programme im Pyrosequenzer mit Hilfe des Softwareprogramms von Qiagen ausgewählt und die Ergebnisse auf einem USB-Stick gespeichert werden.

### **3.2.5 Auswertung der Ergebnisse**

#### **3.2.5.1 Primäre und sekundäre Endpunkte**

Um die Antitumorwirksamkeit der additiven Gabe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab oder Bevacizumab in Kombination mit der Basischemotherapie FOLFIRI zu vergleichen, wurde das Tumoransprechen (ORR = Overall Response Rate) als primärer Endpunkt definiert. Dafür wurden Patienten eingeschlossen, die nach den RECIST Kriterien (Version 1.0) ein partielles oder ein komplettes Ansprechen zeigten. Die ORR wurde als primärer Endpunkt definiert, da es einerseits zum Zeitpunkt der Studiendesignerstellung keine Daten zum Gesamtüberleben in diesem Setting gab und zum anderen hier der größte Unterschied hinsichtlich des Therapieergebnisses der verschiedenen Antikörpertherapiearme erwartet wurde.

Zu den sekundären Endpunkten zählen das progressionsfreie Überleben (PFS), das Gesamtüberleben (OS), die Rate der sekundären Resektionen von Lebermetastasen mit potentiell kurativem Ansatz und die Erfassung von Sicherheit und Verträglichkeit der Medikation [61].

In dieser Arbeit wird auf den primären Endpunkt, die ORR, eingegangen, sowie auf die sekundären Endpunkte PFS und OS. Diese werden dann abhängig vom jeweiligen Mutationsstatus betrachtet.

#### **3.2.5.2 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SAS Version 9.2 und 9.4 bzw. SPSS Version 23.0. Die ORR, das PFS und das OS wurden in der „intention-to-treat“ Population (ITT-Population) berechnet. Die ITT-Population beinhaltet alle randomisierten Patienten, die einen KRAS Exon 2 WT aufzeigen und mindestens eine Dosis der Studientherapie erhalten haben. Der zweiseitige Fisher Exakt Test war Basis für die Berechnung der ORR. Das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben wurde mittels der Kaplan-Meier Methode analysiert und mit dem Log-Rank-Test verglichen. Das Signifikanzniveau betrug 5%. Zudem wurde die Odds Ratio (OR) und die Hazard Ratio (HR) für FOLFIRI plus Cetuximab im Vergleich zu FOLFIRI plus Bevacizumab berechnet [61, 63].

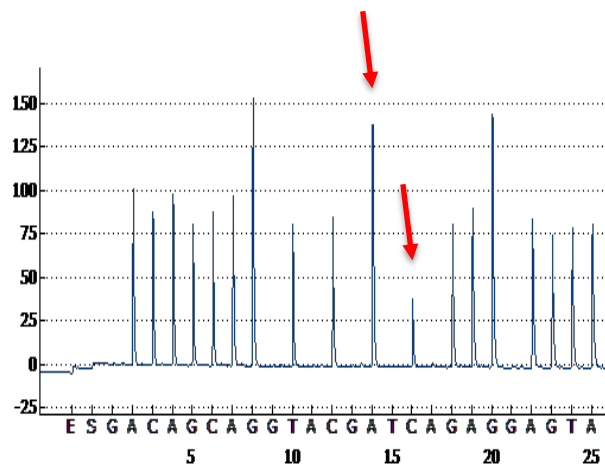
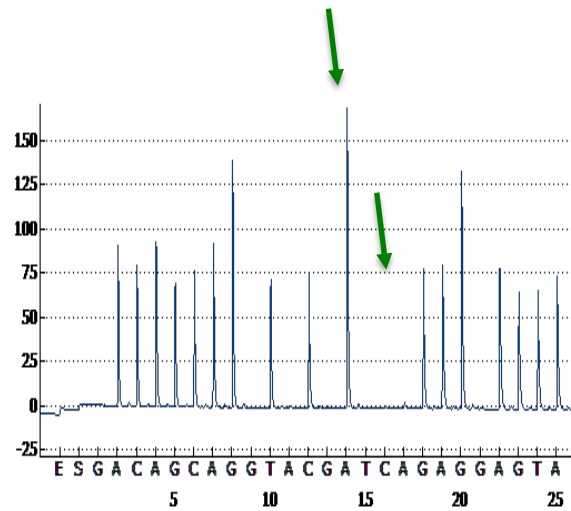
## 4 Ergebnisteil

### 4.1 Methodik

Die Tumorproben der FIRE-3 Studie wurden im Pathologischen Institut der LMU-München, nach den dort in der Molekularbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Andreas Jung entwickelten und getesteten SOPs (Stand 12.06.2012), bearbeitet. Nachdem die Tumorblöcke geschnitten und auf Objektträger fixiert wurden, konnte das Tumorgewebe extrahiert, gereinigt und mittels PCR vervielfältigt werden. Die darauffolgende Gelkontrolle diente als Erfolgskontrolle der PCR und die mitgeführte Positivkontrolle als Kontrolle zur richtigen Durchführung. Eine Kontaminierung konnte durch die mitgeführte Negativkontrolle aufgezeigt werden und Arbeitsschritte wurden bei positiver Negativkontrolle wiederholt. Das Sequenzieren der DNA erfolgte mittels Pyrosequenzierung und wurde anhand vorgegebener SOP-Leitlinien durchgeführt. Ein in jedem Lauf mitgeführtes „Control Oligo“ der Firma Qiagen diente der Kontrolle des Sequenzierungsvorgangs des Gerätes.

Die entstandene Lichtreaktion zeigt sich als Peak im Pyrogramm über der entsprechenden Base. So kann die genaue Gensequenz anhand des Pyrogramms abgelesen werden. Dies soll bildlich an dem KRAS Gen in Höhe von Codon 59-61 veranschaulicht werden. Die Codone 59-61 entsprechen folgender Basenfolge: GCAGGTCAA.

Um ein möglichst großes Spektrum der verschiedenen Mutationen zu detektieren wurden folgende Basenreihenfolge sequenziert: ACAGCAGGTACGATCAGAGGAGTA. Das obere Pyrogramm in der Abbildung 4-1 zeigt einen Wildtypen und dazu im Vergleich das untere Pyrogramm mit einer Mutation c.183 A>C. Bei dieser Mutation ist das Adenin auf Position 183 durch ein Cytosin ersetzt worden. Dies führt zu einem Verlust der Lichtreaktion über dem doppelten Adenin und zu einer neu entstandenen Lichtreaktion und damit Peak über dem Cytosin. Die Mutation wird dann als c.183A>C Mutation beschrieben.



**Abbildung 4-1 Pyrogramm Wildtyp und KRAS c.183A>C Mutation**

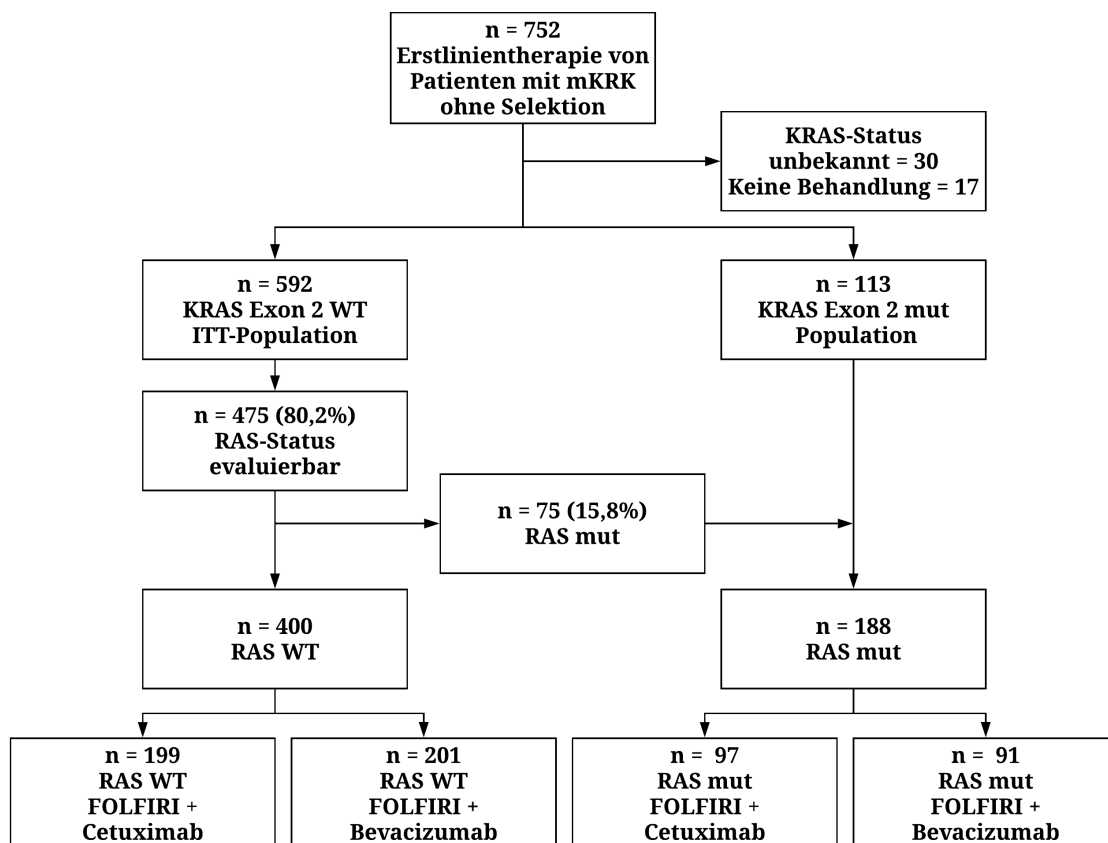
A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin; G = Guanin

Die Buchstaben kürzen die Basennamen ab, so ist das A ein Adenin, das T ein Thymin, das C ein Cytosin und das G ein Guanin. A>C beschreibt den Austausch der Base, wobei zuerst die ursprüngliche Base genannt wird, also die Base, die bei einem Wildtyp auf dieser Position liegt. Die zweite genannte Base beschreibt die Base, die in der entsprechenden Mutation die ursprüngliche Base ersetzt. 183 beschreibt die genaue Stelle der Mutation auf der DNA, hier liegt diese auf Position des Basenpaares 183. Durch die veränderte Basenreihenfolge kann sich zudem die codierende Aminosäure verändern. In diesem Beispiel codiert der Wildtyp mit der Basenreihenfolge CAA die Aminosäure Q (Glutamin). Durch die oben beschriebene Mutation ändert sich die Basenreihenfolge zu CAC und es wird nun die Aminosäure H (Histidin) codiert. Abgekürzt wird das als p.Glutamin61Histidin bzw. p.Q61H.

## 4.2 Mutationen in der FIRE-3 Studie

### 4.2.1 Verteilung der FIRE-3 Patienten

Die genaue Verteilung der FIRE-3 Patienten auf die Therapiearme A und B kann der Abbildung 4-2 entnommen werden. In der ITT Population von 592 Proben mit KRAS Exon 2 WT war eine erfolgreiche Testung in KRAS Exon 3 und 4, sowie in NRAS Exon 2, 3 und 4 in 475 Patientenproben möglich. Die Differenz von 117 Proben kam durch eine fehlende Rückmeldung der FIRE-3 Patienten behandelnden pathologischen Institute (n = 78) zustande. Dazu kamen Gewebeblöcke ohne bzw. mit nicht ausreichendem Tumorgewebe (n = 24). In 15 Fällen war eine RAS Testung, trotz vorhandenem Tumorgewebe, in allen zu untersuchenden Regionen nicht möglich.



**Abbildung 4-2 Verteilung der FIRE-3 Patienten**

n = Anzahl; RAS = rat sarcoma; BRAF = proto-oncogene B-Raf; FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; ITT= intent-to-treat; KRAS= Kirsten RAS, "RAS mut" = RAS Mutationen in KRAS Exon 3, 4 und NRAS Exon 2, 3, 4

#### 4.2.2 RAS-Mutationsverteilung

Die Abbildung 4-3 gibt einen Überblick über die analysierten RAS-Gene und den genauen Sequenzierungsort.

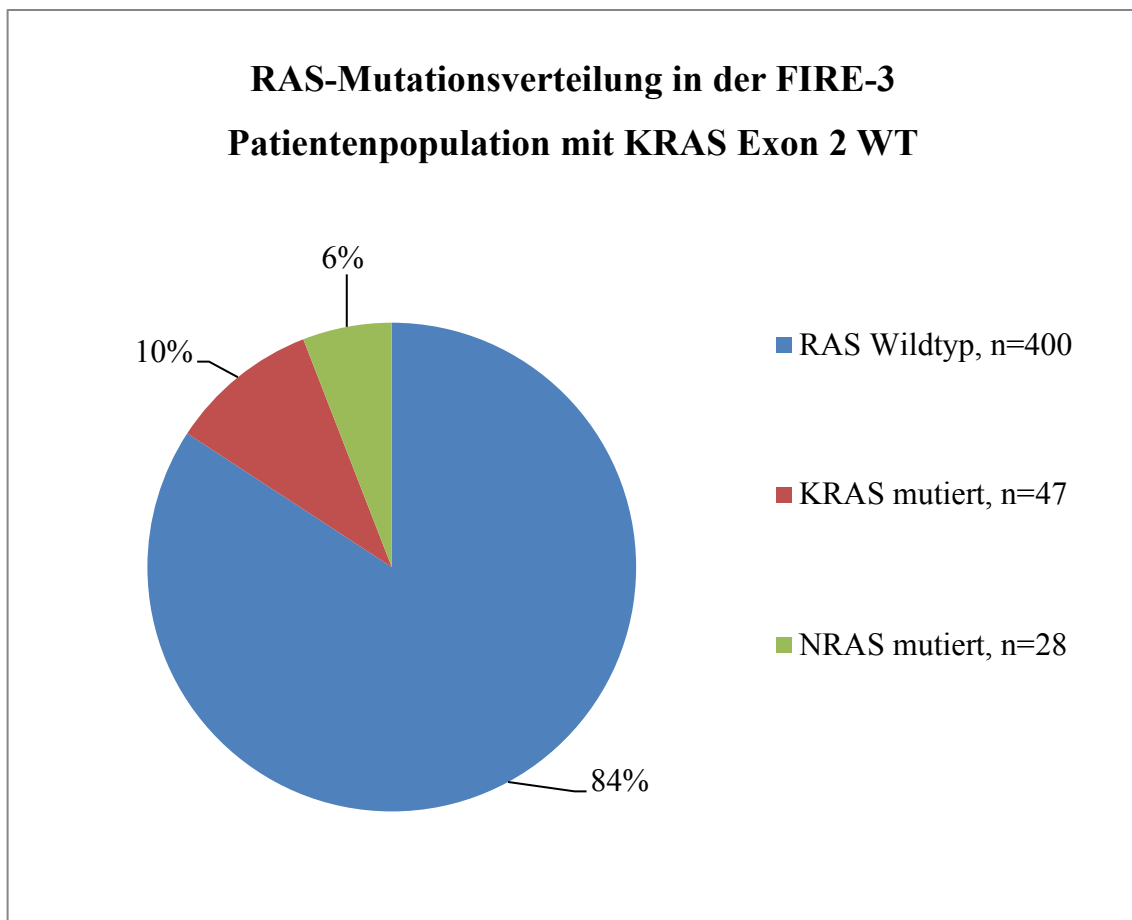
KRAS	EXON 1	EXON 2	EXON 3	EXON 4
Codon		12-13	59-61	117,146
Mutationsverteilung		WT	4,0%	5,9%

NRAS	EXON 1	EXON 2	EXON 3	EXON 4
Codon		12-13	59-61	117,146
Mutationsverteilung		3,6%	2,1%	0,2%

**Abbildung 4-3 Das NRAS und KRAS Gen im Überblick**

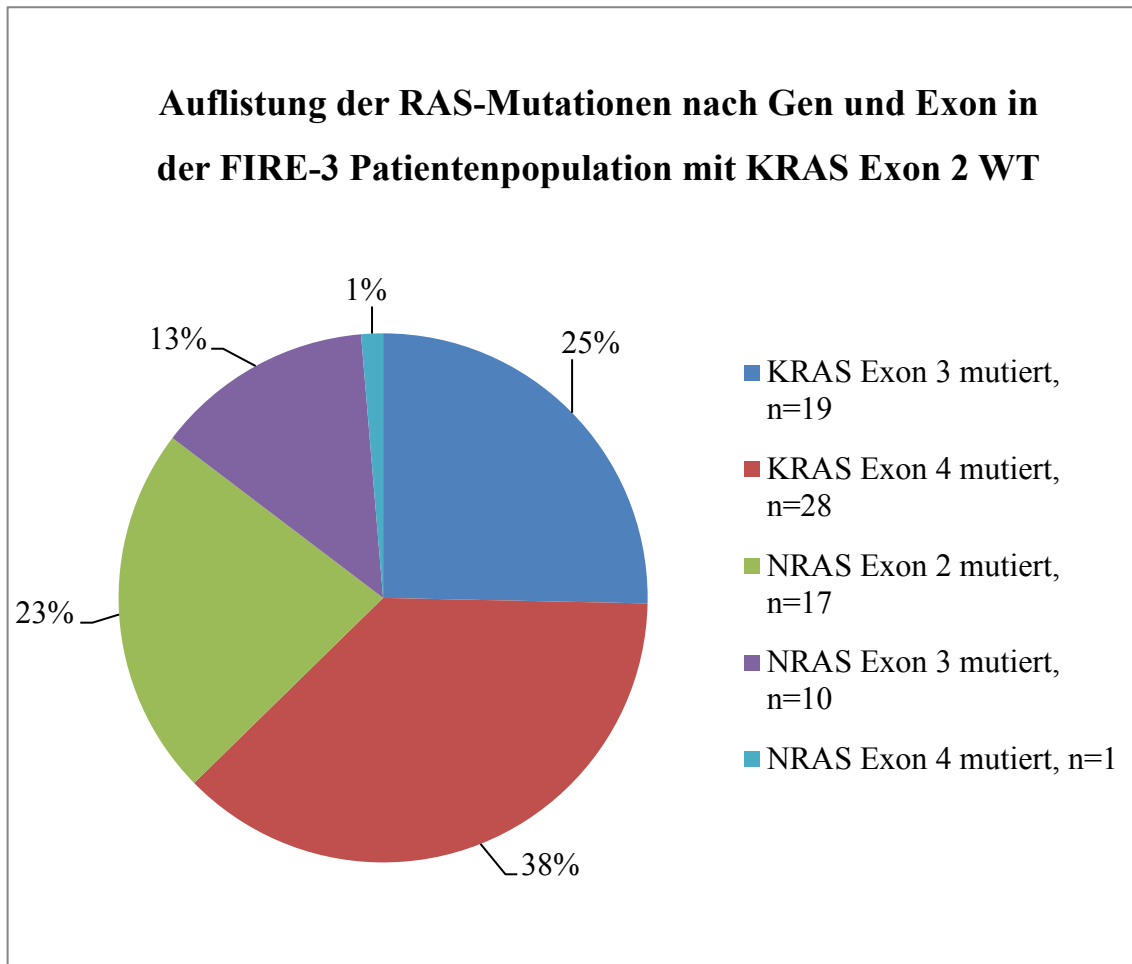
Die Abbildung 4-4 zeigt die RAS-Mutationsverteilung der ITT-Population mit KRAS Exon 2 WT.



**Abbildung 4-4 RAS Mutationsverteilung**

RAS = rat sarcoma; KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; NRAS = Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog; WT = Wildtyp, n = Anzahl

Die Abbildung 4-5 veranschaulicht bildlich die Verteilung der verschiedenen RAS Mutationen, sortiert nach Gen und Exon in der Patientenpopulation mit einem KRAS Exon 2 WT. Im KRAS Exon 4 konnten quantitativ die meisten KRAS Mutationen gefunden werden. Im NRAS Gen zeigt sich das Exon 2 als häufigster Mutationsort.



**Abbildung 4-5 RAS Mutationsverteilung nach Gen und Exon**

RAS = rat sarcoma; KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; NRAS = Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog; WT = Wildtyp, n = Anzahl

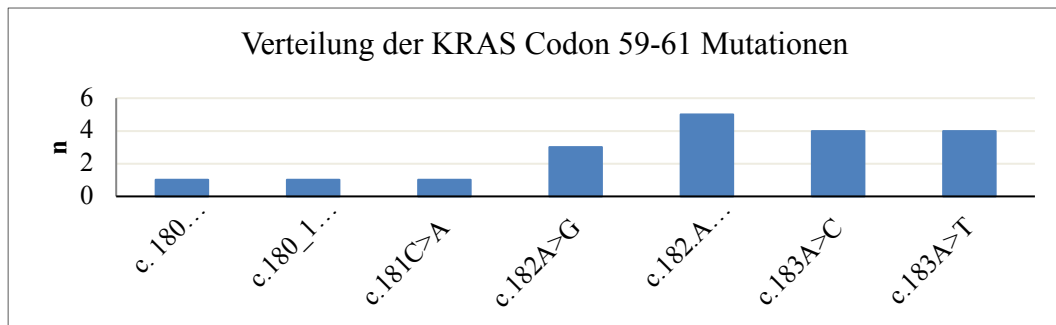


#### 4.2.2.1 KRAS Mutationsverteilung

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit einer KRAS Codon 12-13 WT Population gearbeitet und weitere Genlocis sequenziert. Die untersuchten KRAS „Hotspotmutationen“ werden in folgenden Punkten veranschaulicht.

##### 4.2.2.1.1 KRAS Exon 3, Codon 59-61

Im KRAS Gen Exon 3, Codon 59-61 mit der Genfrequenz GCAGGTCAA wurden 19 Mutationen sequenziert. Ihre genaue Verteilung kann der Abbildung 4-6 entnommen werden.



**Abbildung 4-6 Verteilung der KRAS Codon 59-61 Mutationen**

KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

In der Tabelle 4-1 sind die Mutationen mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch tabellarisch aufgelistet.

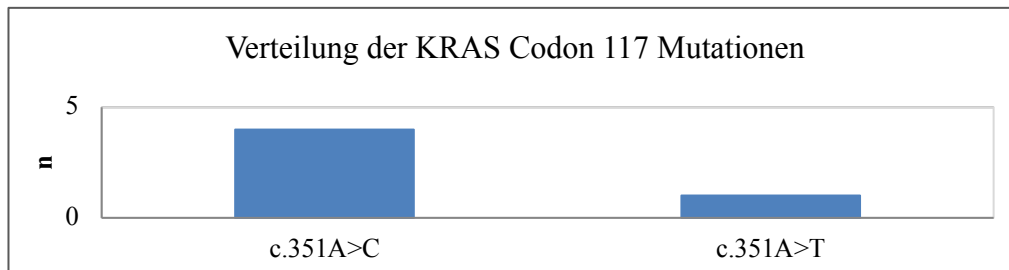
Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c. 180 T>A	p.Glycin60Glycin	1x
c.180-181delTC179_180inAA	p.Glutamin61Lysin	1x
c.181C>A	p.Glutamin61Lysin	1x
c.182A>G	p.Glutamin61Arginin	3x
c.182.A>T	p.Glutamin61Leucin	5x
c.183A>C	p.Glutamin61Histidin	4x
c.183A>T	p.Glutamin61Histidin	4x

**Tabelle 4-1 Verteilung der KRAS Codon 59-61 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

#### 4.2.2.1.2 KRAS Exon 4, Codon 117 und 146

Im KRAS Gen Exon 4, Codon 117 mit der Gensequenz AAA wurden fünf Mutationen sequenziert. Es konnten zwei verschiedene Mutationen gefunden werden. Das Verhältnis ist in Abbildung 4-7 bildlich veranschaulicht.



**Abbildung 4-7 Verteilung der KRAS Codon 117 Mutationen**

KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

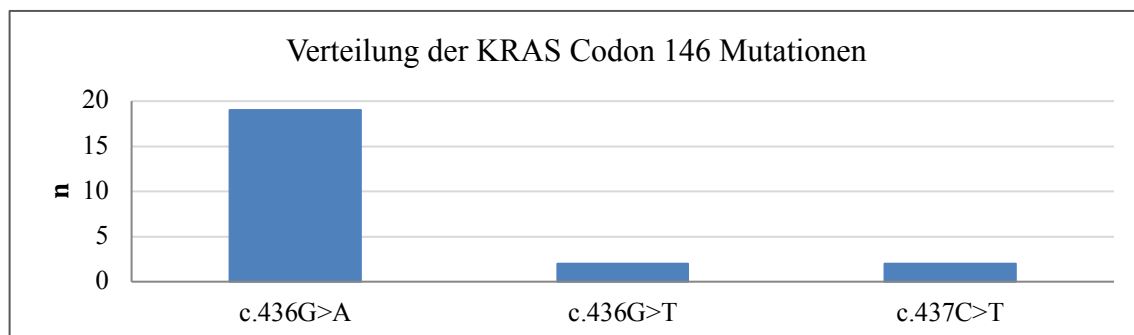
In der Tabelle 4-2 sind die Mutationen mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch im Codon 117 tabellarisch aufgelistet.

Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.351 A>C	p.Lysin117Asparagin	4x
c.351 A>T	p.Lysin117Asparagin	1x

**Tabelle 4-2 Verteilung der KRAS Codon 117 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

Im KRAS Gen Exon 4, Codon 146 mit der Sequenz GCA konnten 23 Mutationen gefunden werden. Die Abbildung 4-8 zeigt die Mutationsverteilung.



**Abbildung 4-8 Verteilung der KRAS Codon 146 Mutationen**

KRAS = Kirsten ras oncogene homolog; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

In der Tabelle 4-3 sind die Mutationen mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch im Codon 146 tabellarisch aufgelistet.

<b>Lokalisation der Mutation, Basenaustausch</b>	<b>Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch</b>	<b>Anzahl der Mutationen (n)</b>
c.436G>A	p.Alanin146Threonin	19
c.436G>T	p.Alanin146Serin	2
c.437C>T	p.Alanin146Valin	2

**Tabelle 4-3 Verteilung der KRAS Codon 146 Mutationen**

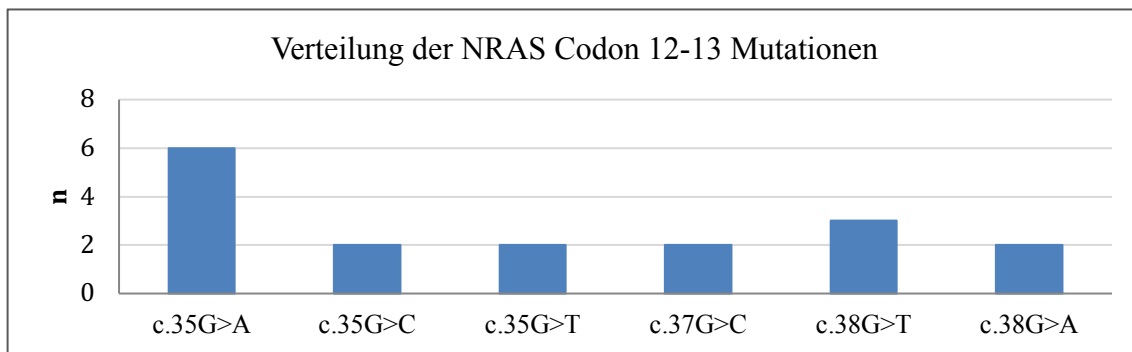
A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

#### 4.2.2.2 NRAS Mutationsverteilung

Unter den 75 RAS Mutationen befanden sich 28 Mutationen auf dem Gen NRAS. Genauer konnten 17 auf dem Codon 12-13, zehn auf dem Codon 59-61 und eine Mutation auf dem Codon 117 sequenziert werden. Die 475 sequenzierten Patientenproben zeigten im NRAS Gen Exon 4, Codon 146 ausschließlich Wildtypen.

##### 4.2.2.2.1 NRAS Exon 2, Codon 12-13

Im NRAS Gen Exon 2, Codon 12-13 mit der Gensequenz GGTGTT, konnten 17 Mutationen gefunden werden. Die Abbildung 4-9 zeigt die genaue Verteilung der Mutationen und der Tabelle 4-4 kann der jeweilige Aminosäureaustausch entnommen werden.



**Abbildung 4-9 Verteilung der NRAS Codon 12-13 Mutationen**

NRAS = Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

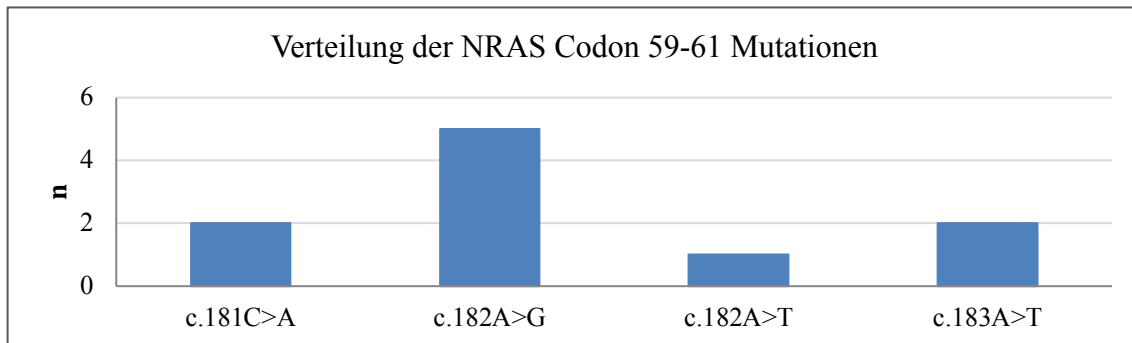
Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.35G>A	p.Glycin12Asparginsäure	6
c.35G>C	p.Glycin12Alanin	2
c.35G>T	p.Glycin12Valin	2
c.37G>C	p.Glycin13Arginin	2
c.38G>T	p.Glycin13Valin	3
c.38G>A	p.Glycin13Asparginsäure	2

**Tabelle 4-4 Verteilung der NRAS Codon 12-13 Mutationen**

A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

#### 4.2.2.2.2 NRAS Exon 3, Codon 59-61

Zudem wurde in der „Hotspotregion“ NRAS Exon 3, Codon 59-61 mit der Gensequenz GCTGGACAA, zehn Mutationen detektiert. Die Abbildung 4-10 und die Tabelle 4-5 geben einen Überblick.



**Abbildung 4-10 Verteilung der NRAS Codon 59-61 Mutationen**

NRAS = Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.181C>A	p.Glutamin61Lysin	2
c.182A>G	p.Glutamin61Arginin	5
c.182A>T	p.Glutamin61Leucin	1
c.183A>T	p.Glutamin61Histidin	2

**Tabelle 4-5 Verteilung der NRAS Codon 59-61 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

#### 4.2.2.2.3 NRAS Exon 4, Codon 117

Auf dem NRAS Gen Exon 4 im Codon 117 konnte eine Mutation gefunden werden. Die Tabelle 4-6 zeigt die genaue Lokalisation und den dazugehörigen Aminosäureaustausch.

Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.351G>T	p.Lysin117Asparagin	1

**Tabelle 4-6 Verteilung der NRAS Codon 117 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

### 4.2.2.3 Statistische Auswertung der RAS Population

#### 4.2.2.3.1 Statistische Auswertung der RAS WT Population

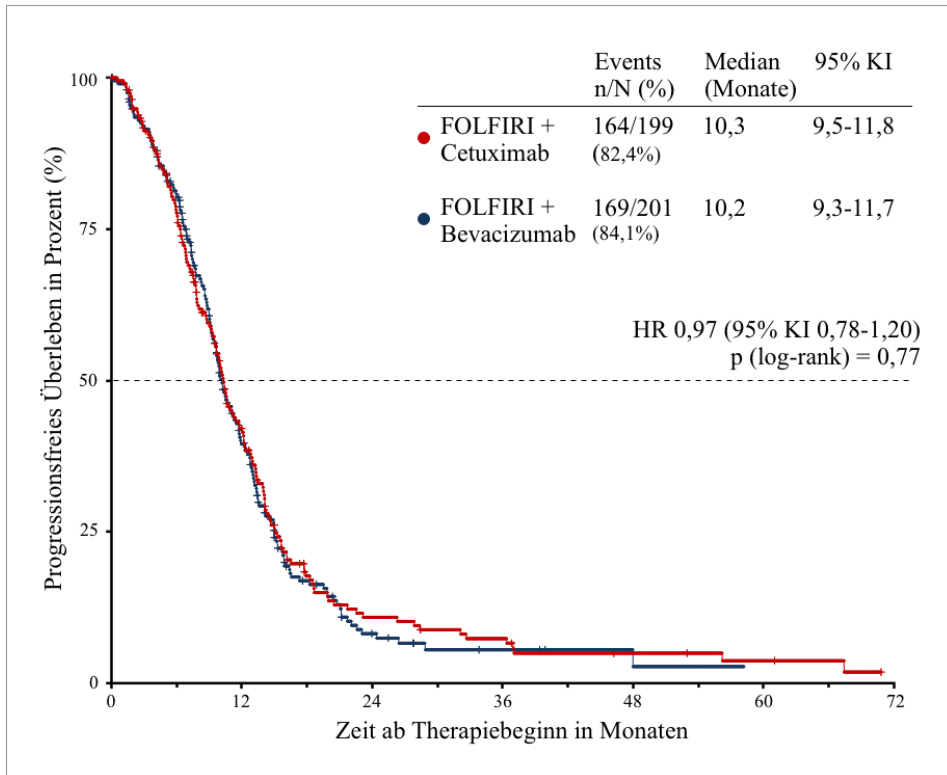
400 Patienten der FIRE-3 Studie zeigten einen all RAS (KRAS Codon 12 - 13, Codon 59-61, Codon 117, Codon 146 und NRAS Codon 12-13, Codon 59-61, Codon 117, Codon 146) Wildtypen. Genauer wurden 199 der Patienten mit Cetuximab behandelt und 201 Patienten mit Bevacizumab. Das mediane „Follow-Up“ betrug in der ITT-Population in der FIRE-3 Studie 40,3 Monate (Interquartilsabstand (IQR) 28,2-58,9). Die ORR betrug im FOLFIRI plus Cetuximab Arm 65,3% und im FOLFIRI plus Bevacizumab Arm 58,7%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiearmen aufgezeigt werden. Die Tabelle 4-7 zeigt die statistische Auswertung einschließlich Konfidenzintervall (KI) und Signifikanzwert (p-Wert).

/	FOLFIRI + Cetuximab (n = 199)	FOLFIRI + Bevacizumab (n = 201)	OR bzw. HR (95% KI)	p-Wert
ORR (%) (95% KI)	65,3 (58,3-71,9)	58,7 (51,6-65,6)	OR = 1,33 (0,88-1,99)	0,18
PFS (Monate) (95% KI)	10,3 (9,5-11,8)	10,2 (9,3-11,7)	HR = 0,97 (0,78-1,20)	0,77
OS (Monate) (95% KI)	33,1 (24,5-39,4)	25,0 (23,0-28,1)	HR = 0,697 (0,54-0,90)	0,0059

**Tabelle 4-7 ORR, PFS und OS in der RAS WT Population**

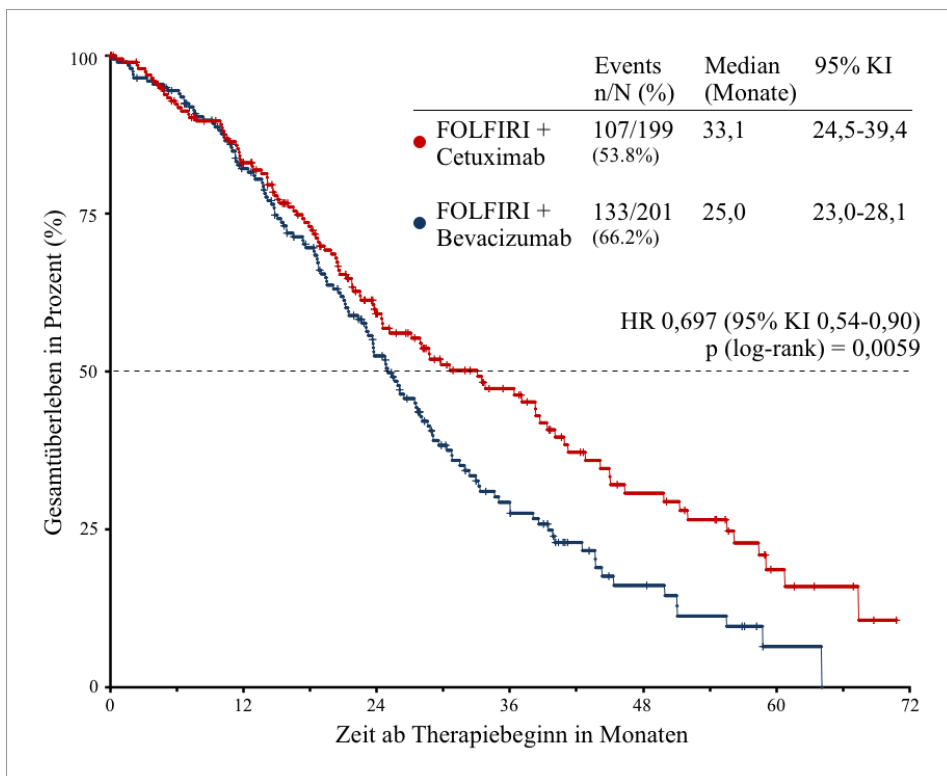
ORR = Overall Response Rate; PFS = Progressionsfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; HR = Hazard Ratio; p-Wert = Signifikanzwert

Das PFS zeigte in beiden Therapiearmen einen vergleichbaren Verlauf mit 10,3 Monaten im Cetuximab Arm und 10,2 Monate im Bevacizumab Arm. Durch eine erweiterte RAS-Testung konnte das OS in der RAS WT Patientenpopulation mit der Therapie FOLFIRI plus Cetuximab auf 33,1 Monate angehoben werden. Im Vergleich dazu erreichte FOLFIRI plus Bevacizumab 25,0 Monate. Es besteht ein signifikanter Unterschied in beiden Therapiearmen ( $p = 0,0059$ ), welcher den EGFR-Antikörper favorisiert. Genauere Angaben können den Abbildungen 4-11 und 4-12 entnommen werden.



**Abbildung 4-11 Progressionsfreies Überleben, RAS WT Population**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio



**Abbildung 4-12 Gesamtüberleben, RAS WT Population**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio

#### 4.2.2.3.2 Statistische Auswertung der RAS mutierten Population

75 der 475 Patienten mit KRAS Exon 2 WT zeigten eine RAS Mutation. Dazu kamen die 113 KRAS Codon 12 und 13 mutierten Patienten. 97 Patienten wurden mit FOLFIRI plus Cetuximab behandelt, 91 mit FOLFIRI plus Bevacizumab. Die mittlere Behandlungszeit betrug in der RAS mutierten Population in der Bevacizumabgruppe 5,3 Monate und 3,5 Monate in der Cetuximabgruppe (Wilcoxon rank-sum test  $p = 0,0006$ ). Das mediane „Follow-Up“ lag in der RAS mutierten Gruppe bei 19,2 Monaten.

Die Tabelle 4-8 zeigt die ORR, PFS und OS in der RAS mutierten Patientenpopulation.

/	FOLFIRI + Cetuximab (n = 97)	FOLFIRI + Bevacizumab (n = 91)	OR bzw. HR (95% KI)	p-Wert
ORR (%) (95% KI)	38,1 (28,5-48,6)	50,5 (39,9-61,2)	OR = 0,60 (0,34-1,08)	0,11
PFS (Monate) (95% KI)	7,4 (5,7-8,5)	9,7 (8,5-11,2)	HR = 1,27 (0,94-1,70)	0,12
OS (Monate) (95% KI)	19,1 (16,3-22,2)	20,1 (17,4-26,0)	HR = 1,05 (0,78-1,42)	0,73

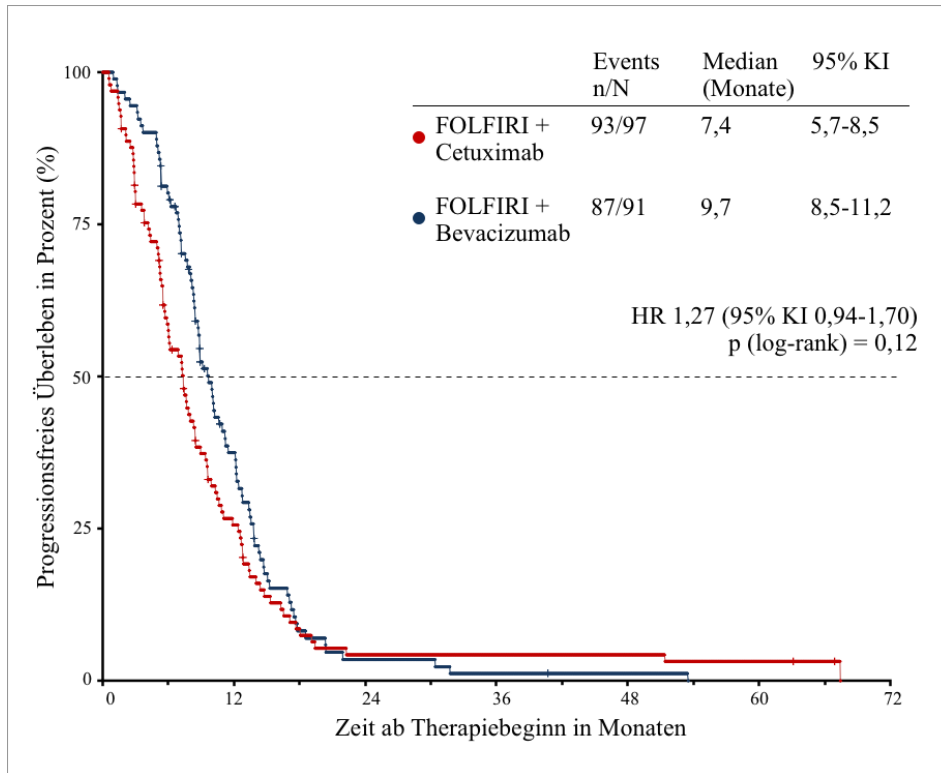
**Tabelle 4-8 ORR, PFS und OS in der RAS mutierten Patientenpopulation**

ORR = Overall Response Rate; PFS = Progressionsfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; HR = Hazard Ratio; p-Wert = Signifikanzwert

Das PFS erreichte in der Cetuximabgruppe 7,4 Monate und in der Bevacizumabgruppe 9,4 Monate ( $p = 0,12$ ). Das OS zeigte mit 19,1 Monaten im Cetuximab Arm und mit 20,1 Monaten im Bevacizumab Arm einen ähnlichen Verlauf in beiden Therapiearmen ( $p = 0,73$ ).

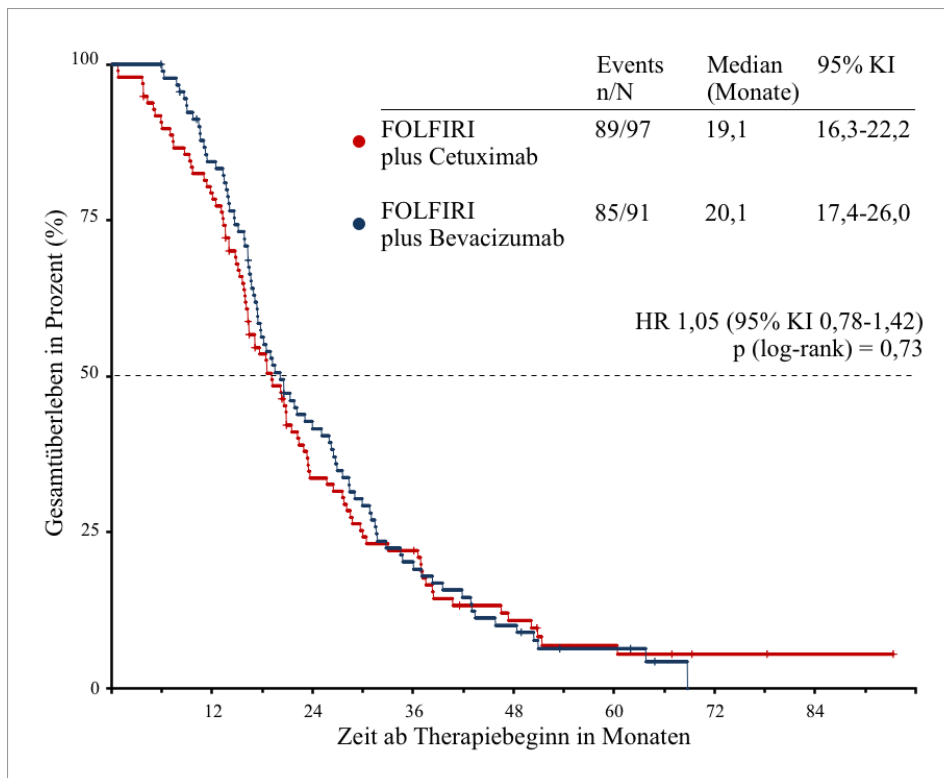
Genauere Angaben können den Abbildungen 4-13 und 4-14 entnommen werden.





**Abbildung 4-13 Progressionsfreies Überleben, RAS mutierte Patientenpopulation**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio



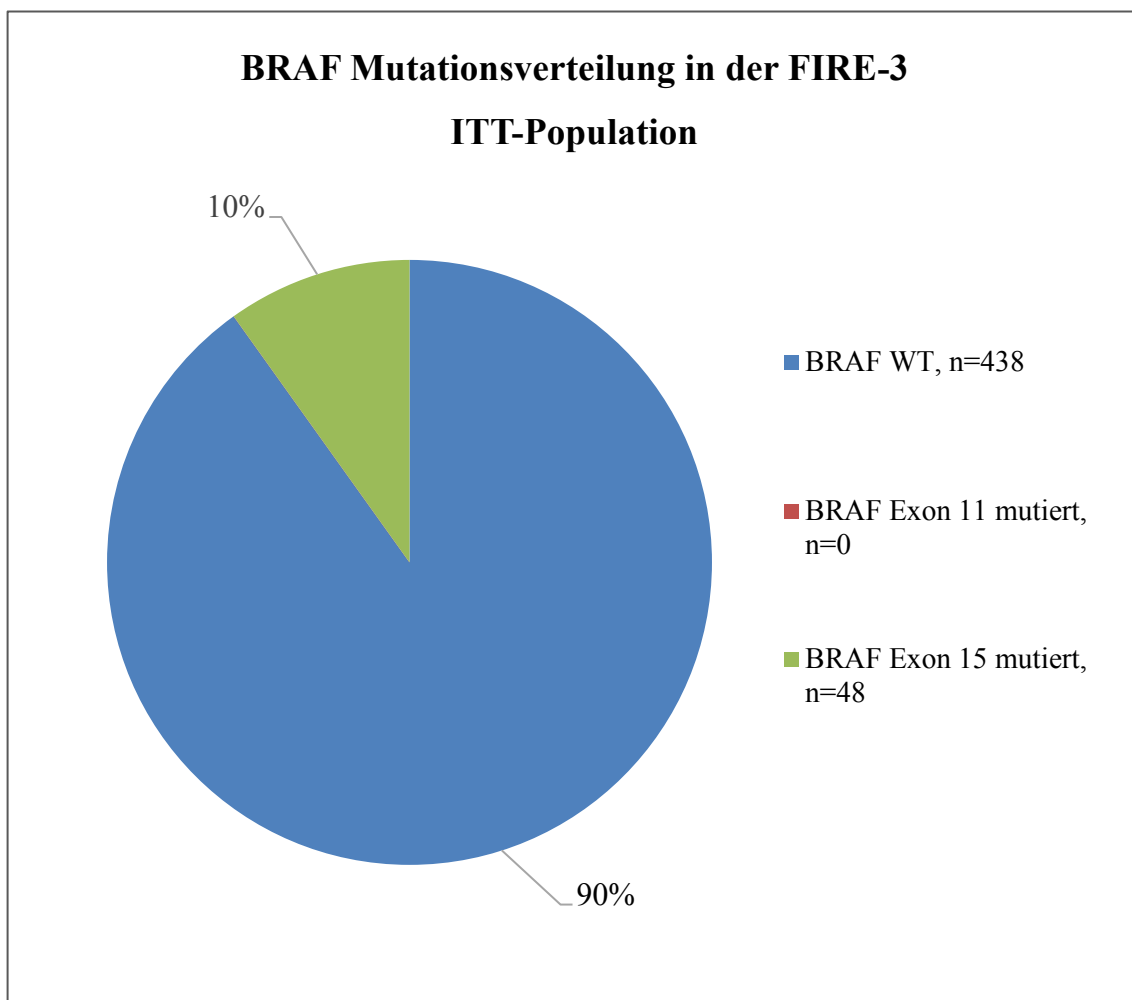
**Abbildung 4-14 Gesamtüberleben, RAS mutierte Patientenpopulation**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio

### 4.2.3 BRAF Mutationsverteilung

Bei 599 Patienten der FIRE-3 Studie konnte das BRAF Gen in Höhe des Exons 11 und bei 601 Patienten das Exon 15 nach den oben beschriebenen Standards der Pathologie München sequenziert werden. 53 Patienten zeigten eine Mutation im BRAF Gen.

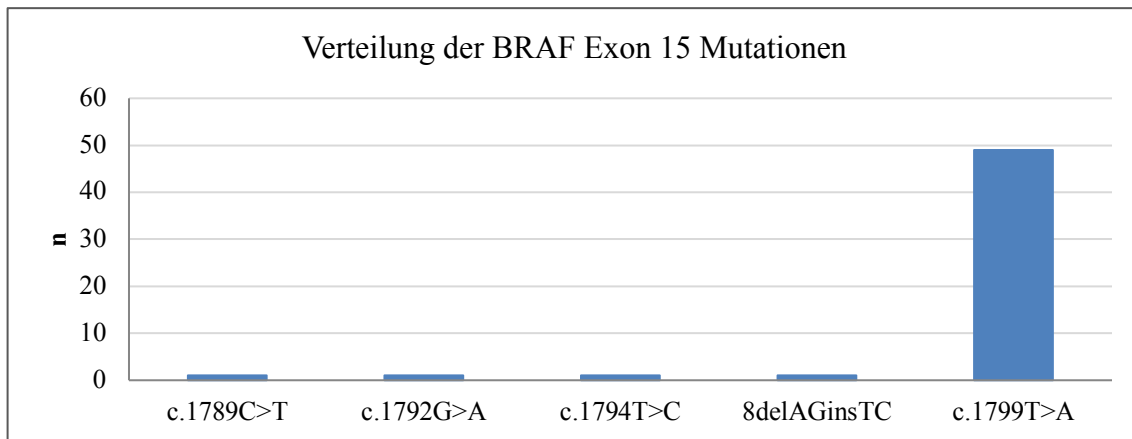
In der ITT-Population konnten bei 487 Patienten das Exon 11 und bei 486 Patienten das Exon 15 erfolgreich sequenziert werden. 48 Proben zeigten eine Mutation im BRAF Gen. Das Verhältnis ist in der Abbildung 4-15 veranschaulicht.



**Abbildung 4-15 BRAF Mutationsverteilung**

ITT = intention-to-treat; BRAF = proto-oncogene B-Raf

In Höhe BRAF Exon 11 konnten ausschließlich Wildtypen sequenziert werden. 48 der 53 BRAF Exon 15 mutierten Probanden lagen in der ITT-Population der FIRE-3 Studie. Die Mutationsverteilung ist in Abbildung 4-16 und Tabelle 4-9 aufgelistet. Hervorzuheben ist die Dominanz der c.1799T>A Mutation.



**Abbildung 4-16 Verteilung der BRAF Exon 15 Mutationen**

BRAF = proto-oncogene B-Raf; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

<b>Lokalisation der Mutation, Basenaustausch</b>	<b>Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch</b>	<b>Anzahl der Mutationen (n)</b>
c.1789C>T	p.Leucin597Leucin	1
c.1792G>A	p.Alanin598Threonin	1
c.1794T>C	p.Alanin598Alanin	1
c.1797_1798delAGinsTC		1
c.1799T>A	p.Valin600Glutaminsäure	49

**Tabelle 4-9 Verteilung der BRAF Exon 15 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

#### 4.2.3.1 Statistische Auswertung der BRAF mutierten Population

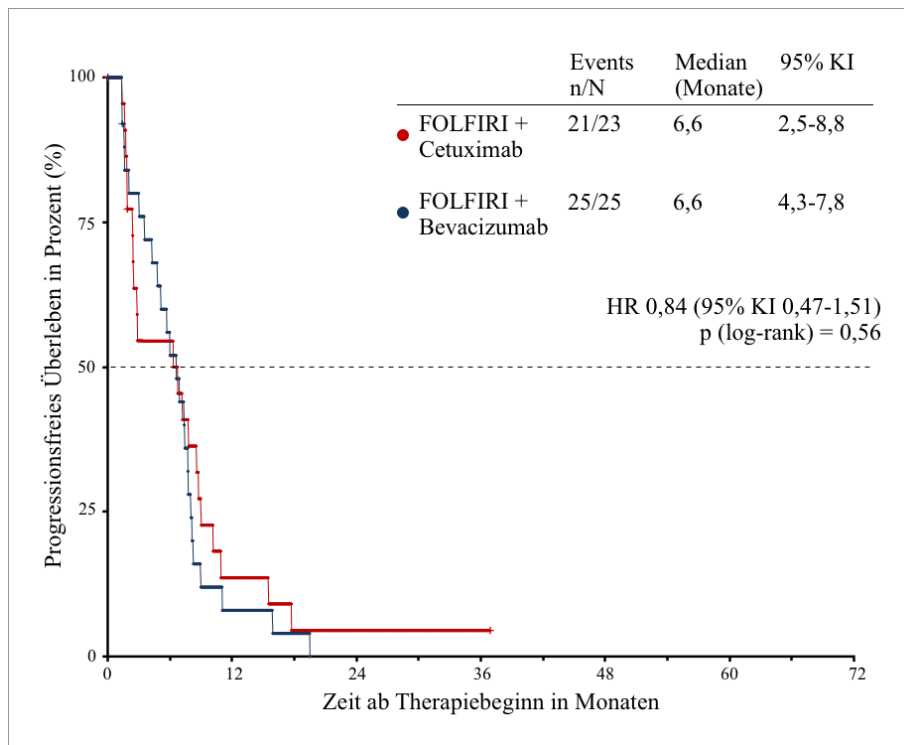
48 der BRAF mutierten Patienten befanden sich in der ITT Population. Davon wurden 23 mit FOLFIRI plus Cetuximab und 25 mit FOLFIRI plus Bevacizumab behandelt. Die mittlere Behandlungsdauer war mit 4,3 Monaten in der Bevacizumabgruppe länger als in der Cetuximabgruppe mit 2,4 Monaten (Wilcoxon rank-sum test  $p = 0,28$ ). Das mediane „Follow-Up“ in der BRAF mutierten Patientengruppe betrug 12,3 Monate. Die statistische Auswertung des primären Endpunktes (Tabelle 4-10) zeigte in der BRAF mutierten FIRE-3 Population eine ORR in der FOLFIRI plus Cetuximab-Gruppe von 52,2 % und in der FOLFIRI plus Bevacizumab-Gruppe von 40,0 % ( $p = 0,56$ ).

/	FOLFIRI + Cetuximab (n = 23)	FOLFIRI + Bevacizumab (n = 25)	OR bzw. HR (95% KI)	p-Wert
ORR (%) (95% KI)	52,2 (30,6-73,2)	40,0 (21,1-61,3)	OR = 1,64 (0,52-5,14)	0,56
PFS (Monate) (95% KI)	6,6 (2,5-8,8)	6,6 (4,3-7,8)	HR = 0,84 (0,47-1,51)	0,56
OS (Monate) (95% KI)	12,3 (5,5-23,8)	13,7 (7,8-19,5)	HR = 0,79 (0,43-1,46)	0,45

**Tabelle 4-10 ORR, PFS und OS in der BRAF mutierten Patientenpopulation**

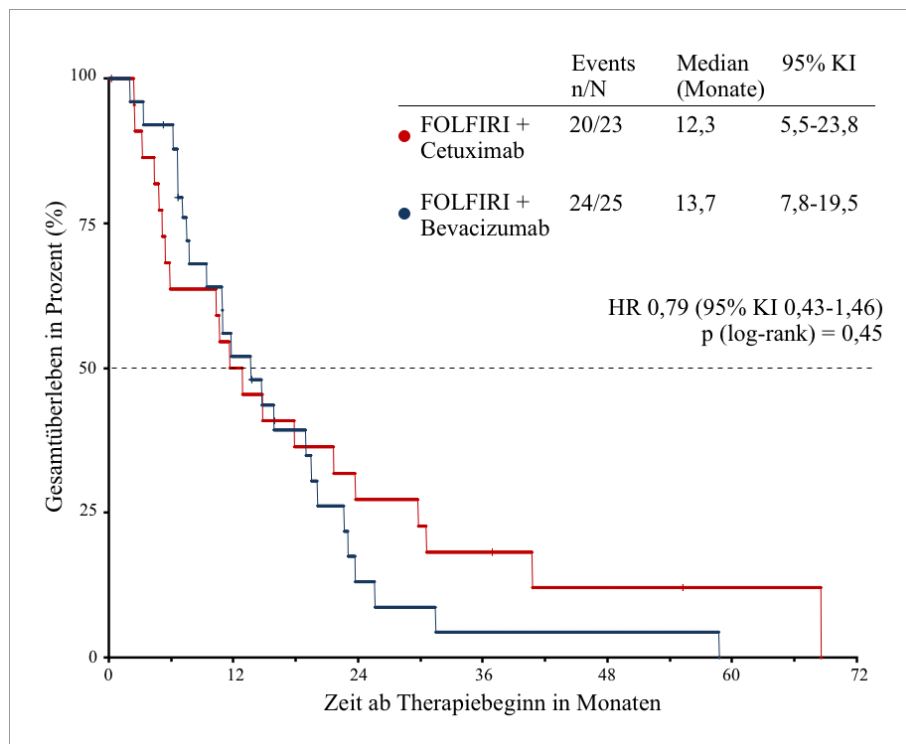
ORR = Overall Response Rate; PFS = Progressionsfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; HR = Hazard Ratio

Das progressionsfreie Überleben in der BRAF mutierten Patientengruppe ergab vergleichbare Ergebnisse ( $p = 0,56$ ). Das OS zeigte mit 12,3 Monaten im Cetuximab Arm und 13,7 Monaten im Bevacizumab Arm einen ähnlichen Verlauf in beiden Therapiearmen ( $p = 0,45$ ). Genauere Angaben können der Abbildung 4-17 und 4-18 entnommen werden.



**Abbildung 4-17 Progressionsfreies Überleben, BRAF mutierte Patientenpopulation**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio

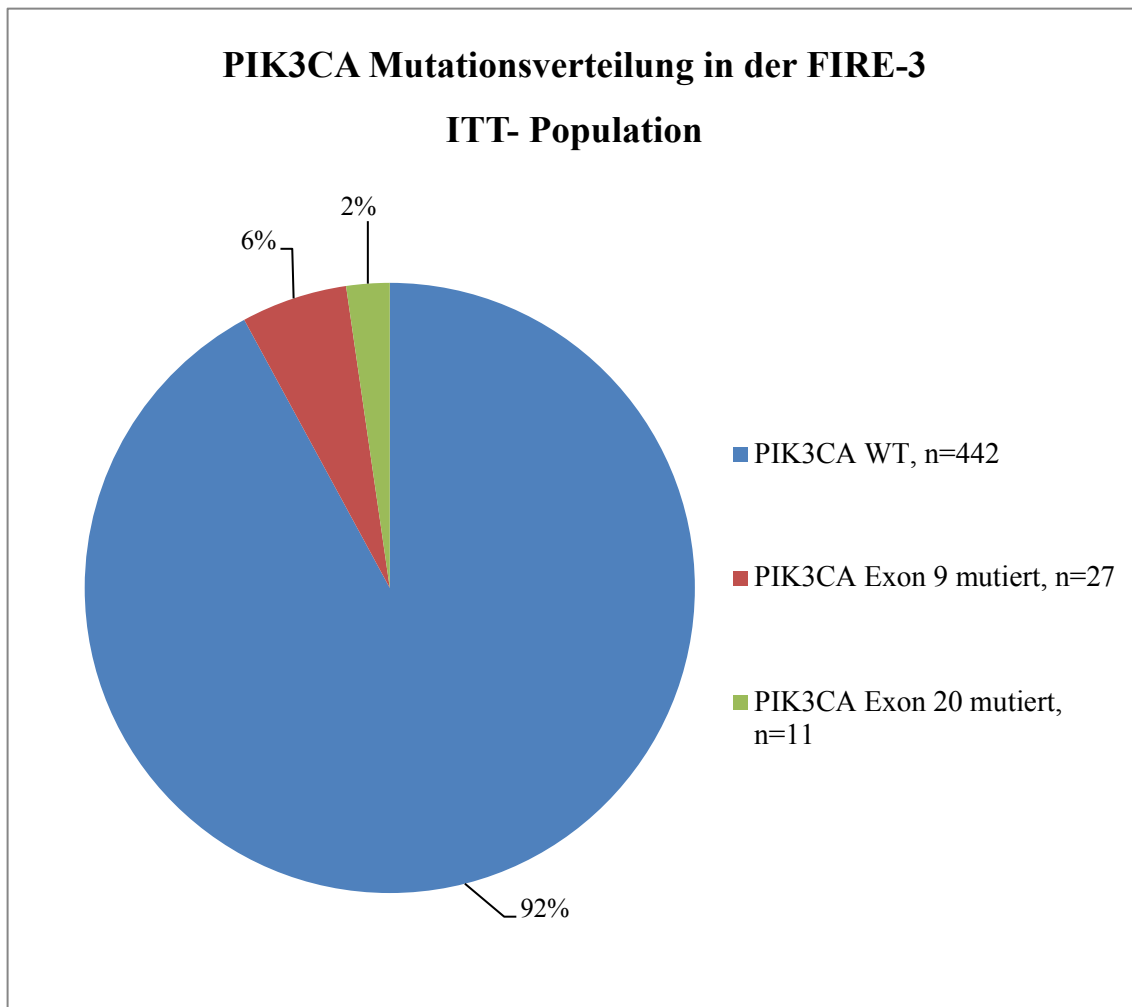


**Abbildung 4-18 Gesamtüberleben, BRAF mutierte Patientenpopulation**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio

#### 4.2.4 PIK3CA Mutationsverteilung

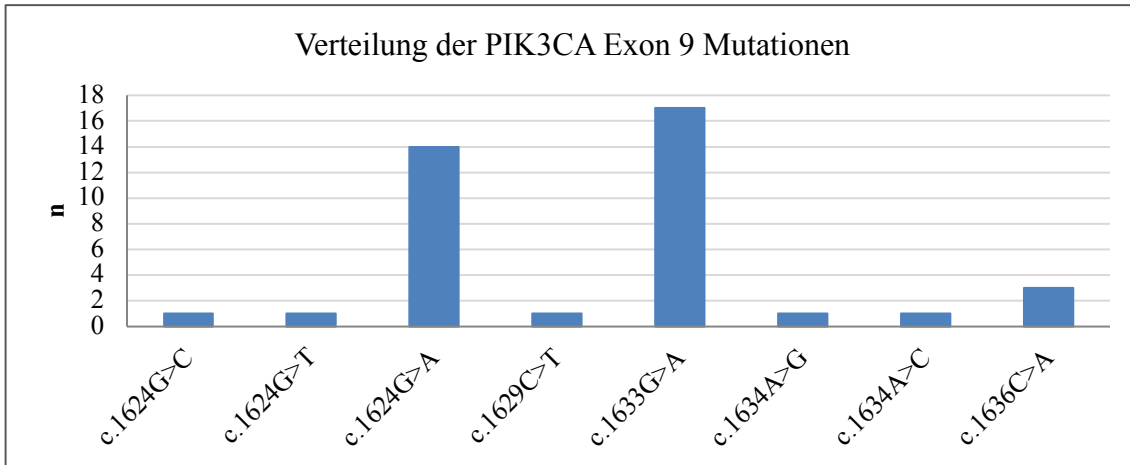
Die Abbildung 4-19 gibt einen Überblick über die Mutationsverteilung im Gen PIK3CA, wobei die „Hotspotregion“ des Exons 9 und 20 sequenziert wurden.



**Abbildung 4-19 PIK3CA Mutationsverteilung**

PIK3CA = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; WT = Wildtyp; ITT = intention to treat

Eine „Hotspot“-Sequenzierung im Exon 9 war bei 601 Patienten möglich, 487 der Patienten lagen in der ITT Population. Es konnten 38 Mutationen detektiert werden, davon 27 in der ITT-Population. Die Abbildung 4-20 und die Tabelle 4-11 geben eine Übersicht.



**Abbildung 4-20 Verteilung der PIK3CA Exon 9 Mutationen**

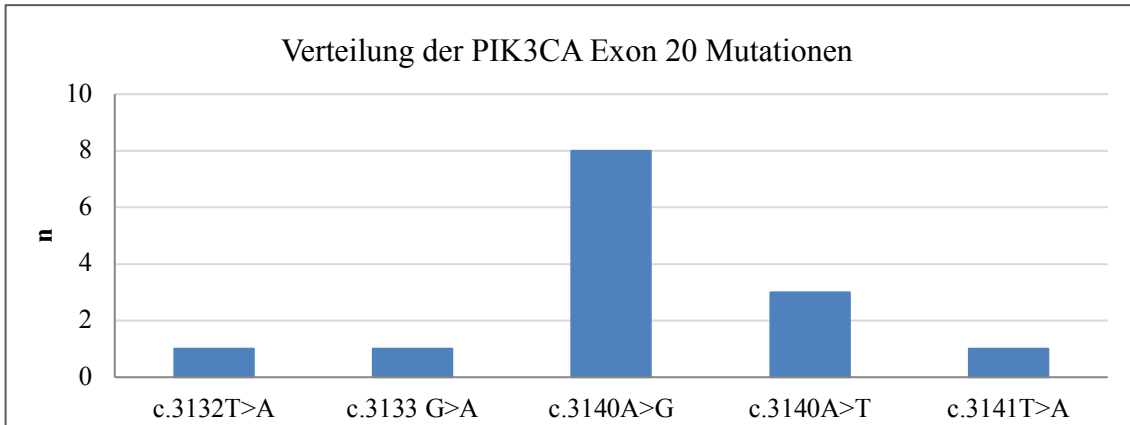
PIK3CA = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin

Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.1624G>C	p.Glutaminsäure542Glutamin	1
c.1624G>T	Stopp(UAA)	1
c.1624G>A	p.Glutaminsäure542Lysin	14
c.1629C>T	p.Isoleucin1627Isoleucin	1
c.1633G>A	p.Glutaminsäure545Lysin	17
c.1634A>G	p.Glutaminsäure545Glycin	1
c.1634A>C	p.Glutaminsäure545Alanin	1
c.1636C>A	p.Gltamin546Lysin	3

**Tabelle 4-11 Verteilung der PIK3CA Exon 9 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

Im Exon 20 konnten 592 Patienten sequenziert werden, wobei 480 in der ITT Population lagen. 14 Mutationen wurden gefunden, davon elf in der ITT-Population. Die Abbildung 4-21 und Tabelle 4-12 veranschaulichen das Ergebnis und geben einen genauen Überblick.



**Abbildung 4-21 Verteilung der PIK3CA Exon 20 Mutationen**

PIK3CA = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil

Die Tabelle 4-12 zeigt den jeweiligen Basen- und Aminosäureaustausch bei den in der FIRE-3 sequenzierten Mutationen im PIK3CA Gen auf Höhe des Exons 20.

Lokalisation der Mutation, Basenaustausch	Lokalisation der Mutation, Aminosäureaustausch	Anzahl der Mutationen (n)
c.3132T>A	p.Asparagin1044Lysin	1
c.3133 G>A	p.Asparaginsäure1045Asparagin	1
c.3140A>G	p.Histidin1047Arginin	8
c.3140A>T	p.Histidin1047Leucin	3
c.3141T>A	p.Histidin1047Glutamin	1

**Tabelle 4-12 Verteilung der PIK3CA Exon 20 Mutationen**

A = Adenin; T = Tymin; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil



#### 4.2.4.1 Statistische Auswertung der PIK3CA mutierten Population

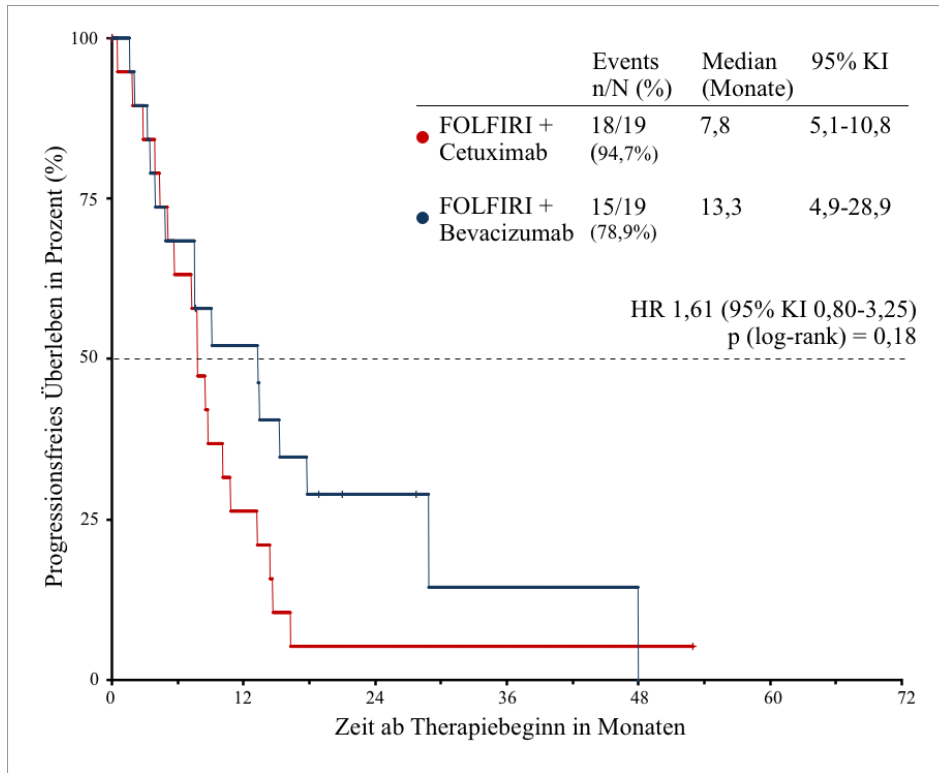
38 Patienten in der ITT-Population zeigten, unabhängig von ihrem RAS/RAF-Status, eine PIK3CA Mutation. Die Tabelle 4-13 gibt einen Überblick bezüglich ORR, PFS und OS in den beiden Therapiegruppen.

/	FOLFIRI + Cetuximab (n=19)	FOLFIRI + Bevacizumab (n=19)	OR bzw. HR (95% KI)	p-Wert
ORR (%) (95% KI)	47,4 (24,4-71,1)	57,9 (33,5-79,7)	OR = 0,65 (0,18-2,36)	0,84
PFS (Monate) (95% KI)	7,8 (5,1-10,8)	13,3 (4,9-28,9)	HR = 1,61 (0,80-3,25)	0,18
OS (Monate) (95% KI)	26,5 (14,2-30,6)	25,9 (21,0-33,2)	HR = 1,08 (0,48-2,43)	0,86

**Tabelle 4-13 ORR, PFS und OS in der PIK3CA mutierten Patientenpopulation**

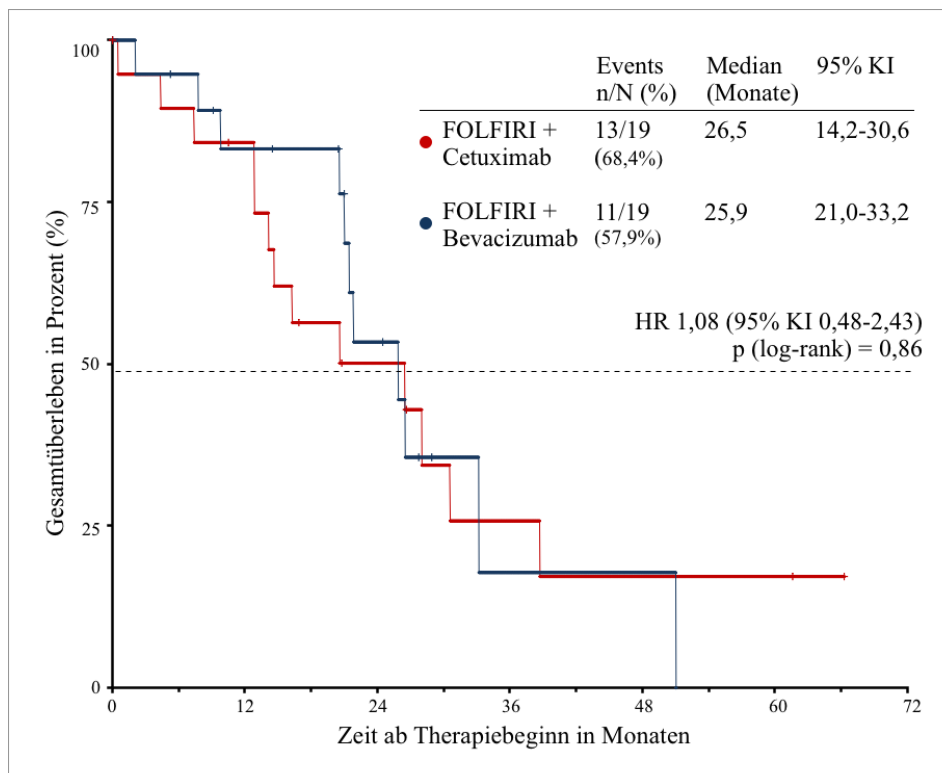
ORR = Overall Response Rate; PFS = Progressionsfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; HR = Hazard Ratio

Das progressionsfreie Überleben (Abbildung 4-22) war im FOLFIRI plus Bevacizumab Arm mit 13,3 Monaten länger als im FOLFIRI plus Cetuximab Arm mit 7,8 Monaten, erreichte jedoch keine Signifikanz (p = 0,18). Das Gesamtüberleben (Abbildung 4-23) zeigte einen vergleichbaren Verlauf in beiden Therapiearmen.



**Abbildung 4-22 Progressionsfreies Überleben, PIK3CA**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio



**Abbildung 4-23 Gesamtüberleben, PIK3CA**

FOLFIRI = 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan; KI = Konfidenzintervall; OR = Odds Ratio; p-Wert = Signifikanzwert; HR = Hazard Ratio

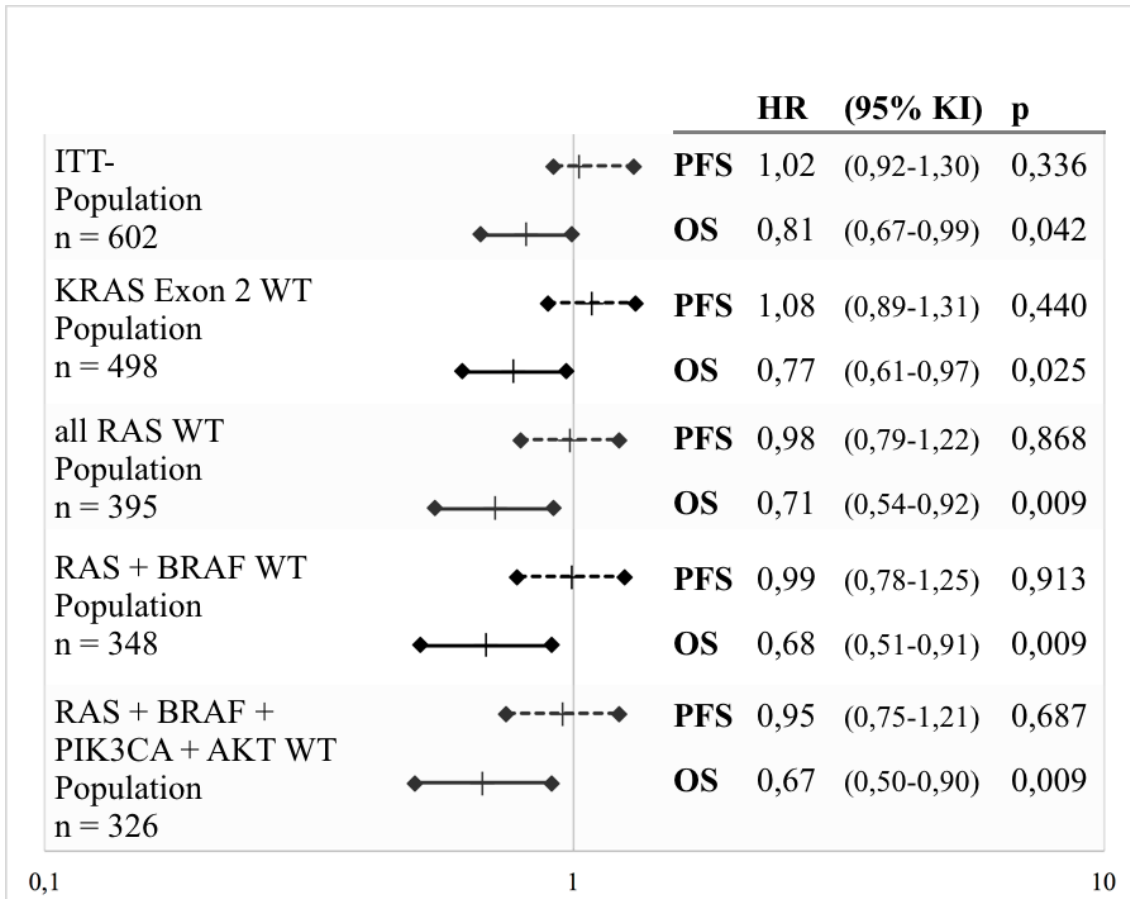
#### 4.2.5 AKT Mutationsverteilung

Im Gen AKT konnten vier Mutationen gefunden werden, wovon drei Mutationen in der ITT-Population lagen.

Aufgrund der geringen Mutationsrate konnte keine statistische Auswertung der Therapiearme bezüglich ORR, PFS und OS unter Berücksichtigung der AKT Mutationen erfolgen.

#### 4.2.6 Therapieansprechen in der FIRE-3 Studie abhängig vom Mutationsstatus

Eine Zusammenfassung der bereits aufgelisteten Ergebnisse bietet Abbildung 4-24. Es wurde die Hazard Ratio (HR) für PFS und OS mit den zugehörigen Konfidenzintervallen für verschiedene Patientenpopulationen berechnet (Stand Dezember 2017). In der Abbildung 4-24 favorisiert ein Abweichen  $<1$  eine EGFR-Therapie, ein Abweichen  $>1$  eine VEGF-Therapie. In der untersuchten Patientengruppe wurden weitere Ausschlusskriterien definiert und die Population immer weiter eingegrenzt. Zunächst wurden alle Patienten aus der ursprünglichen ITT-Population, unabhängig von ihrem Mutationsstatus, eingeschlossen. Es konnte kein Unterschied bezüglich des PFS zwischen beiden Therapiearmen festgestellt werden (HR = 1,02; 95% KI = 0,92-1,30;  $p = 0,336$ ). Das OS favorisierte eine EGFR-Therapie (HR = 0,81; 95% KI = 0,67-0,99;  $p = 0,042$ ). Daraufhin wurden Patienten mit einer KRAS Exon 2 Mutation ausgeschlossen und erneut die HR von PFS und OS berechnet. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied im OS (HR = 0,77; 95% KI = 0,61-0,97;  $p = 0,025$ ), der den EGFR-Arm favorisiert. Im weiteren Verlauf wurde dann die KRAS Exon 2 WT Population weiter zu einer all RAS WT Population definiert. Das PFS zeigte weiterhin keinen signifikanten Unterschied (HR = 0,98; 95% KI = 0,79-1,22;  $p = 0,868$ ), das OS konnte zugunsten des Cetuximab Arms weiter ausgebaut werden (HR = 0,71; 95% KI = 0,54-0,92;  $p = 0,009$ ). Durch einen weiteren Ausschluss von Patienten mit einer BRAF Mutation konnte ein signifikanter Unterschied im OS zwischen beiden Therapiearmen erreicht werden (HR = 0,69; 95% KI = 0,51-0,91;  $p = 0,009$ ), das PFS zeigte keinen signifikanten Unterschied. Zuletzt ist die HR für PFS und OS dargestellt in einer RAS, BRAF, PIK3CA und AKT WT Population. Im PFS konnte auch hier kein Unterschied festgestellt werden (HR = 0,95; 95% KI = 0,75-1,21;  $p = 0,687$ ), das OS (HR = 0,67; 95% KI = 0,50-0,90;  $p = 0,009$ ) verbesserte sich zugunsten des EGFR-Arms weiter.



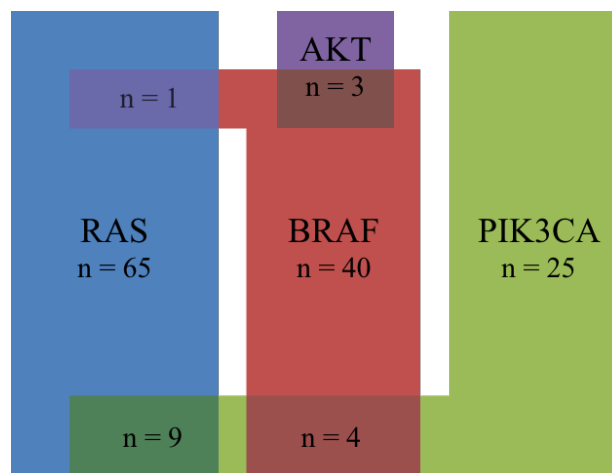
**Abbildung 4-24 PFS und OS in der FIRE-3 abhängig vom Mutationsstatus**

RAS = rat sarcoma; BRAF = proto-oncogene B-Raf; PIK3CA=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT = protein kinase B; ITT = intention-to-treat, HR = Hazard Ratio, PFS = Progressionsfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; p = Signifikanzwert; n = Anzahl

#### 4.2.7 Doppelmutationen in der FIRE-3 Studie

Die Abbildung 4-25 zeigt die Verteilung von Doppelmutationen in der ITT-Population der FIRE-3 Studie. Insgesamt konnten 17 Doppelmutationen in der Patientenpopulation mit KRAS Exon 2 WT gefunden werden. Die verschiedenen Blöcke in der Abbildung 4-25 stellen die Mutationsverteilung in der FIRE-3 Studie dar, überlappende Blöcke beschreiben Doppelmutationen. Zehn der RAS mutierten Patienten zeigten eine Doppelmutation, neun davon eine RAS-PIK3CA Doppelmutation. Zudem konnte ein Patient mit einer RAS-BRAF Doppelmutation detektiert werden. Alle AKT mutierten Patientenproben zeigten auch eine BRAF Mutation.

Eine statistische Auswertung der doppelt mutierten Patienten konnte aufgrund der geringen Probenanzahl nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 4-25 Doppelmutationen in der FIRE-3 Studie**

RAS = rat sarcoma; BRAF = proto-oncogene B-Raf; PIK3CA=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT = protein kinase B; n = Anzahl

## **5 Diskussion**

Die FIRE-3 Studie wurde als multizentrische randomisierte Phase III Studie durchgeführt, die basierend auf einer Chemotherapie mit FOLFIRI eine antiangiogenetische Therapie mit Bevacizumab einer gegen den EGFR gerichteten Behandlung mit Cetuximab gegenüberstellte. Die vorliegende Arbeit untersucht das molekulargenetische Profil der Patienten und analysiert dessen Einfluss auf die Effektivität der beiden Therapien.

Im Rahmen der FIRE-3 Studie erfolgte eine prospektive Sammlung der Tumorproben der beteiligten Patienten. Deren Aufbereitung erfolgte im Pathologischen Institut der LMU München. Die Mutationsanalyse wurde mittels Pyrosequenzierung durchgeführt. Dabei wurden die Genabschnitte KRAS (Codon 59-61, 117, 146), NRAS (Codon 12-13, 59-61, 117, 146), BRAF (Exon 11, 15), PIK3CA (Exon 9, 20) und AKT (E17K) sequenziert.

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Evaluation der extrahierten Zellen**

Die Vervielfältigung und Sequenzierung der Tumor-DNA wurde auf Basis von etablierten Leitlinien des molekularpathologischen Labors im Pathologischen Institut der LMU München durchgeführt. Insgesamt zeigt sich die Pyrosequenzierung zur Ermittlung von KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA und AKT Mutationen von in Formalin fixiertem Material als sensitive und in der Praxis gut durchführbare Methode.

#### **5.1.2 Der „Sensitivitäts-Cut-Off“ in der FIRE-3 Studie**

In der Literatur wird das beschriebene Sequenzierungsverfahren mit einem „Sensitivitäts-Cut-Off“ von 5% geführt [65-67]. Es muss davon ausgegangen werden, dass neben dem Tumorgewebe auch normale Zellen sequenziert und analysiert wurden. Es ist daher fraglich, ob Tumoren bei denen 5% aller Tumorzellen mutiert sind, im Pyrogramm immer sichtbar sind. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Zusammenhang zwischen mutiertem Tumoranteil und dessen Einfluss auf die Anti-EGFR Therapie darzulegen. Erst dann kann geklärt werden, ob eine genauere Sequenzierung, wie beispielsweise in der OPUS-Studie, notwendig ist, oder ob hier eine Anti-EGFR Therapie trotz prozentual kleinem mutierten Anteil vertretbar wäre und der

Patient mit einem großen Anteil an nicht mutiertem Tumor von einer Anti-EGFR Therapie profitieren würde. Die folgende Übersicht zeigt Studien zu Erstlinientherapien beim mKRC und ihre „Cut-Off-Werte“ [65]:

Studie	Patienten <sup>1</sup>	Methode	Sensitivität Cut-off in %	RAS- Mutationen in %
CRYSTAL	430	BEAMing <sup>2</sup>	≤ 5	14,7
OPUS	118	BEAMing <sup>2</sup>	0,1	26,3
FIRE-3 <sup>3</sup>	407	Pyrosequenzierung	5	16,0
PRIME <sup>5</sup>	620	Sanger	10-20	17,4
		Wave-based Surveyor <sup>4</sup>	1	
PEAK	221	Sanger	10-20	23,1
		Wave-based Surveyor <sup>4</sup>	1	

**Tabelle 5-1 "Sensitivitäts-Cut-Off"**

<sup>1</sup>auswertbare Patienten für die erweiterte RAS-Testung; <sup>2</sup>5% mutiert/WT Allele diagnostisches "Cut-Off"; <sup>3</sup>KRAS Codon 59 und 117 nicht eingeschlossen; <sup>4</sup>Wave-based Surveyor Scan Kit (Transgenomic); <sup>5</sup>KRAS und NRAS Codon 59 nicht eingeschlossen  
[65]

Im Rahmen der Auswertungen der CRYSTAL Studie wurden Cut-Off Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit für ORR, PFS und OS von der RAS Mutationsfrequenz, so dass ein Cut-Off von 5% sinnvoll erscheint [39].

## 5.2 Diskussion der RAS-Ergebnisse

### 5.2.1 RAS-WT Ergebnisse und deren Bedeutung

In der FIRE-3 Studie wurden zu Beginn Probanden unabhängig von ihrem KRAS-Mutationsstatus rekrutiert. Das Protoonkogen KRAS Exon 2 konnte im Verlauf als negativer Prädiktor für die Anti-EGFR Therapie des mKRC identifiziert werden. Eine Anti-EGFR Therapie zeigte sich bei KRAS mutierten Patienten als nicht wirksam [68, 69]. Die Zulassung von Cetuximab bzw. Panitumumab wurde ausschließlich auf Patienten mit einem KRAS Exon 2 (Codon 12,13) WT beschränkt [34-37]. Auch in der FIRE-

3 Studie wurde im Oktober 2008 eine Änderung der Einschlusskriterien vorgenommen und das Patientenkollektiv auf eine KRAS Exon 2 WT Population eingeschränkt [26]. In dieser KRAS Exon 2 WT Population zeigte die ORR im Cetuximab Arm 62,0% und im Bevacizumab Arm 58,0% ( $p = 0,18$ ). Auch das PFS erreichte keinen signifikanten Unterschied mit 10,0 Monaten im EGFR Arm vs. 10,3 Monate im Bevacizumab Arm ( $p = 0,55$ ). Im OS konnte hingegen ein signifikanter Unterschied mit 28,7 Monaten im Cetuximab Arm und 25,0 Monaten im Bevacizumab Arm festgestellt werden ( $p = 0,017$ ).

Im Verlauf konnten weitere Mutationen in den Genen KRAS und NRAS Exon 2, 3 und 4 als negative Prädiktoren in der EGFR Therapie identifiziert werden, was zu einer weiteren Einschränkung des Patientenkollektivs auf eine all RAS WT Population für die Anti-EGFR Therapie führte [39, 41].

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Effekt der erweiterten RAS Testung in der EGFR Therapie der FIRE-3 Studie untersucht und mit einer antiangiogenetischen Therapie verglichen. Das Patientenkollektiv der FIRE-3 Studie wurde auf eine Patientengruppe mit ausschließlich RAS WT Tumoren weiter eingeschränkt. Berechnet man das Therapieansprechen, so zeigt die ORR im FOLFIRI plus Cetuximab Arm 65,3% und im FOLFIRI plus Bevacizumab Arm 58,7% ( $p = 0,28$ ). Das PFS war in beiden Armen vergleichbar (10,3 versus 10,2 Monate;  $p = 0,77$ ). Betrachtet man das Gesamtüberleben, so zeigt der FOLFIRI plus Cetuximab Arm in der all RAS WT Testung ein OS von 33,1 Monaten – im Vergleich zu FOLFIRI plus Bevacizumab mit 25,0 Monaten ( $p = 0,0059$ ). Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiearmen, der den EGFR-Antikörper favorisiert. Das OS im Cetuximab Arm konnte durch Ausschluss der RAS mutierten FIRE-3 Patienten nochmals angehoben werden. So zeigt die KRAS Exon 2 WT Population ein OS von 28,7 Monaten und die erweiterte all RAS WT Population ein OS von 33,1 Monaten. Dies steht im Einklang mit Studien wie CRYSTAL, OPUS, PEAK und PRIME Studie, welche allesamt verbesserte Therapieergebnisse in der Anti-EGFR Therapie durch eine erweiterte RAS Testung erzielten [39-41, 70].

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der FIRE-3 Studie, dass eine erweiterte RAS-Testung und ein damit verbundener Ausschluss von RAS mutierten Patienten in der Anti-EGFR Therapie als sinnvoll einzustufen ist. Diese gesteigerte Selektion zeigt unter Anbetracht des Gesamtüberlebens eine erhöhte Effektivität im Cetuximab Arm im Vergleich zum Bevacizumab Arm.



Um jedoch eine definitive Entscheidung zwischen Anti-EGFR und Anti-VEGF Therapie in der all RAS WT Gruppe zu treffen, müssen die Ergebnisse der PEAK und der CALGB/SWOG 80405 Studie mitdiskutiert werden. Die PEAK-Studie ist eine randomisierte Phase II Studie, die auf Basis der Chemotherapie mFOLFOX6 den EGFR-Antikörper Panitumumab mit Bevacizumab in der Erstlinientherapie des mKRK vergleicht. Den primären Endpunkt stellte das PFS dar. Auch hier kam es zur weiteren Eingrenzung von KRAS Exon 2 WT zur all RAS WT Patientenpopulation. Bei Betrachtung der all RAS WT Patienten konnte das PFS in der Panitumumab Gruppe auf 13 Monate signifikant verbessert werden – im Vergleich zur Bevacizumabgruppe mit 9,5 Monaten ( $p = 0,029$ ). Das Gesamtüberleben konnte durch Zugabe des EGFR-Antikörpers in der all RAS WT Gruppe im Vergleich zu Bevacizumab verlängert werden (41,3 Monate vs. 28,9 Monate,  $p = 0,058$ ), erreichte jedoch keine Signifikanz. Die ORR zeigte keinen relevanten Unterschied durch eine weitere Selektion [70].

Konträr hierzu ist die amerikanische Phase III Studie CALGB/SWOG 80405 zu nennen, welche die Antikörper Cetuximab und Bevacizumab auf Basis der Chemotherapie FOLFIRI oder FOLFOX verglich. Auch hier wurde die ursprüngliche KRAS Exon 2 WT Population auf eine all RAS WT Population weiter beschränkt. Der primäre Endpunkt der Studie, das OS, zeigte in der KRAS Exon 2 WT Population mit 30,0 Monaten in der Chemotherapie plus Cetuximabgruppe und 29,0 Monaten in der Chemotherapie plus Bevacizumabgruppe keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,08$ ; HR = 0,88). Das PFS zeigte vergleichbare Ergebnisse mit 10,5 Monaten in der Chemotherapie plus Cetuximabgruppe und 10,6 Monaten in der Chemotherapie plus Bevacizumabgruppe ( $p = 0,45$ , HR = 0,95). In der Cetuximabgruppe war die ORR mit 59,6% höher als mit 55,2% in der Bevacizumabgruppe, erreichte jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,13$ ). Die Ergebnisse der erweiterten RAS-Analyse zeigten vergleichbare Ergebnisse zur ursprünglichen Kohorte und erreichten ebenfalls keine Signifikanz [71].

Die verschiedenen Studienergebnisse zeigen, dass eine klare Aussage über das Tumorverhalten unter Therapie noch nicht gemacht werden kann. Weitere Untersuchungen zur genauen Wirkung der Therapie sind notwendig. Die 2015 veröffentlichte Metaanalyse von Khattak et al., in der die drei Studien (CALGB/SWOG 80405, PEAK und FIRE-3) zusammengefasst wurden, zeigt eine signifikant bessere ORR in der Anti-EGFR therapierten Gruppe in der KRAS WT Population und einen weiteren Vorteil in der RAS WT Gruppe im Vergleich zur Bevacizumab-Gruppe. Das OS war signifikant länger in der KRAS WT- und all RAS WT-Gruppe im Anti-EGFR Arm. Im PFS konnte weder in der

KRAS WT- noch in der all RAS WT-Population ein Unterschied festgestellt werden [72].

In Anbetracht der Therapieergebnisse der FIRE-3 Studie stellt sich die Frage, wie ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben mit vergleichbaren Ergebnissen in der ORR und dem PFS einhergehen kann. Tatsächlich wird es immer deutlicher, dass es eine Diskussion über die RECIST Kriterien als Parameter für das Therapieansprechen im metastasierten kolorektalen Karzinom geben muss [73]. So werden unter anderem für eine verbesserte Übersicht des temporalen und quantitativen Therapieansprechens, ETS (early tumor shrinkage) und DpR (depth of response) als sensitive Marker besprochen [74-78].

Diese Thematik wurde in der FIRE-3 Studie aufgegriffen und eine unabhängige radiologische Begutachtung der FIRE-3 Computertomographieschnitte durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der ORR (72.0% vs. 56.1%;  $p = 0.003$ ), dem ETS (68,2% vs. 49,1%;  $p = 0,0005$ ) und im medianen DpR (-48,9% vs. -32,3%;  $p < 0,0001$ ) ein signifikanter Vorteil zugunsten des Cetuximab plus FOLFIRI Arms im Vergleich zu Bevacizumab plus FOLFIRI. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem signifikant längerem OS in der Cetuximab-Gruppe der FIRE-3 Studie. Zudem ist zu beachten, dass die ORR im erneuten Überblick auch einen signifikanten Vorteil zugunsten der Cetuximab-Therapie zeigt [79].

Retrospektive Analysen der CRYSTAL, OPUS, PEAK und PRIME Studie zeigten übereinstimmende Ergebnisse, in welchen es unter Zusatz von einem EGFR-Antikörper zu einem verbesserten ETS und DpR kam [74, 80-82].

### **5.2.2 Ergebnisse der RAS mutierten Patientenpopulation und deren Bedeutung**

In der FIRE-3 Studie konnten insgesamt 188 RAS mutierte Patienten identifiziert werden. In der KRAS Exon 2 WT Gruppe wurden durch eine erweiterte RAS Sequenzierung zusätzlich 15,8% Patienten mit einer RAS-Mutation gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit der OPUS (26,3%), CRYSTAL (14,7%) und PRIME (17,4%) Studie überein [39, 83, 84]. Die Tabelle 5-1 gibt dazu eine Übersicht.

Die RAS mutierten Patienten in der Bevacizumab Gruppe zeigten ein im Trend längeres PFS (9,7 Monate vs. 7,4 Monate) im Vergleich zur Cetuximab Gruppe ( $p = 0,12$ ). Das OS erreichte in der FIRE-3 Studie vergleichbare Ergebnisse mit 19,1 Monaten in der Cetuximab Gruppe und 20,1 Monaten in der Bevacizumab Gruppe. Die ORR war in der RAS mutierten Patientenpopulation mit 50,5% im Bevacizumab Arm höher als im

Cetuximab Arm mit 38,1%, es konnte auch hier kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p = 0,11$ ). Es zeigt sich ein deutlich schlechteres Therapieergebnis im Cetuximab Arm zwischen den RAS mutierten und RAS WT Patienten, welches die weitere Selektion nach RAS WT unterstützt.

Die Literatur spiegelt die obigen Ergebnisse wider. So zeigt die CRYSTAL Studie in der KRAS mutierten Patientenpopulation ein PFS von 7,4 Monaten und ein OS von 16,2 Monaten in dem FOLFIRI plus Cetuximab Arm [39]. In der TRIBE Studie zeigt der FOLFIRI plus Bevacizumab Arm in der RAS mutierten Population ein PFS von 9,5 Monaten und ein OS von 23,9 Monaten [85].

Es ist zu beachten, dass Cetuximab nicht mehr für das RAS mutierte KKRK zugelassen ist, da es keine ausreichende Wirkung in dieser Patientenpopulation zeigt. Die Ergebnisse des VEGF-Antikörpers im Vergleich zur Therapie mit dem EGFR-Antikörper zeigen jedoch auf Basis der Chemotherapie FOLFIRI keinen signifikanten Vorteil. So muss die Frage gestellt werden, ob Bevacizumab eine ausreichende Wirkung in der Therapie von RAS mutierten Patienten mit mKRK auf Basis der Chemotherapie FOLFIRI zeigt?

Hurwitz et al. zeigte in einer kleinen Subgruppe der ursprünglichen Studie, dass der Zusatz von Bevacizumab zu der Chemotherapie IFL von Vorteil ist. So konnte in der RAS WT und RAS mutierten Gruppe ein signifikant verbessertes PFS erreicht werden. Das OS erreichte in der WT Gruppe Signifikanz, in der mutierten Patientenpopulation nicht [59]. In der ML18147 Studie von Kubicka et al. wurde nach einer Bevacizumab enthaltenen Erstlinientherapie eine weitere Bevacizumabgabe plus Chemotherapie mit einer alleinigen Zweitlinienchemotherapie verglichen. Die Ergebnisse wurden unter Einbezug des retrospektiv ermittelten KRAS-Status erstellt. Die KRAS WT-Gruppe zeigte einen deutlichen Vorteil in der Bevacizumabgruppe im OS und PFS im Vergleich zur Chemotherapie alleine. In der KRAS mutierten Patientengruppe konnte im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie ein signifikanter Vorteil in Hinblick auf das PFS im Vergleich zur Chemotherapie allein festgestellt werden. Interessanterweise konnte auch hier in der mutierten Patientengruppe kein signifikanter Vorteil im OS in der Therapie mit Bevacizumab im Vergleich zur Chemotherapie alleine gefunden werden [86].

Weitere Ergebnisse zeigt die AIO-Studie von Hegewisch-Becker und Mitarbeitern. Hier wurde Bevacizumab allein mit Bevacizumab in Kombination mit einer Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapie und mit „best supportive care“ in der Erhaltungstherapie nach Bevacizumab- und einer Kombinationschemotherapie aus Fluoropyrimidinen und

Oxaliplatin in der Erstlinientherapie verglichen. Die RAS/RAF mutierte Patientengruppe zeigt im Vergleich zum RAS WT einen deutlich schlechteren Verlauf im PFS im Vergleich zum WT und Bevacizumab alleine konnte sich hier kaum von der „best supportive care“ unterscheiden [87].

Zu beachten ist, dass genannte Studienergebnisse meist auf kleinen Fallzahlen beruhen, retrospektiv erhoben wurden und nicht immer eine Erstlinientherapie darstellten. Es sind daher weitere Studien notwendig, um die Wirkung von Bevacizumab in der RAS mutierten Patientenpopulation zu untersuchen.

Einen weiteren Therapieansatz präsentiert die TRIBE-Studie in der die Therapie mit der Dreifachchemotherapie FOLFOXIRI (5-FU/Folinsäure+Oxaliplatin+Irinotecan) plus Bevacizumab ein PFS von zwölf Monaten und ein OS von 27,3 Monaten in der RAS mutierten Population erreichen konnte [85]. Zudem zeigen auf dem ASCO 2016 präsentierte Studien neue Therapieansätze für das KRK mit einer Kombinationstherapie aus dem MEK-Inhibitor Cobimetinib und dem PD-L1 (programmed cell death-ligand 1) Antikörper Atezolizumab und lassen auf weitere Behandlungsoptionen hoffen [88].

### **5.3 Ergebnisse der BRAF mutierten Patientenpopulation und deren Bedeutung**

Neben den RAS Mutationen, bei denen eine EGFR Therapie nicht wirksam ist, wird in dieser Arbeit nach weiteren Gen-Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg gesucht, um mögliche Resistenzen und negative Prädiktoren aufzudecken. In der FIRE-3 Studie haben zehn Prozent der Patienten eine BRAF Mutation. In der Literatur werden acht bis zwölf Prozent beschrieben [44] und das Ergebnis liegt damit im erwarteten Bereich. In der FIRE-3 Studie konnten hauptsächlich V600E Mutationen sequenziert werden. Die Studie von Cremolini et al. zeigt, dass BRAF Mutationen im Codon 594 und 596, im Vergleich zu V600E Mutationen, ein erheblich längeres OS zeigen [89]. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte solch eine Aufteilung in dieser Studie nicht erfolgen.

BRAF mutierte Patienten, unabhängig von ihrem Therapiearm, erzielten in der FIRE-3 Studie ein schlechteres Therapieergebnis im Vergleich zu der ITT-Population und der RAS mutierten Patientenpopulation. Definiert man die RAS WT Population weiter zu einer RAS/BRAF WT Population, so lässt sich das OS im EGFR-Arm im Vergleich zum VEGF-Arm weiter verbessern (HR = 0,69; 95% KI = 0,51-0,91; p = 0,009). Das PFS zeigt weiterhin keinen Unterschied. Die BRAF mutierten Patienten zeigten im

Cetuximab und Bevacizumab Arm vergleichbare Ergebnisse. Im Einklang mit der FIRE-3 Studie stehen die Ergebnisse der 2015 veröffentlichten Metaanalyse von Pietrantonio, Petrelli et al.. Die Metaanalyse zeigt keinen signifikanten Vorteil in der zusätzlichen Gabe eines EGFR-Antikörpers in dem RAS WT und BRAF mutiertem Patientenkollektiv [90]. In einer retrospektiven Analyse von den Studien OPUS und CRYSTAL konnte gezeigt werden, dass die BRAF mutierte Patientengruppe im Vergleich zu BRAF-WT Patienten eine besonders schlechte Prognose hatte. Aufgrund der kleinen Fallzahl konnte jedoch keine Klarheit über den Nutzen von Cetuximab in der Therapie von BRAF mutierten Patienten erzielt werden [84]. Die Metaanalyse von Rowland et al. macht jedoch darauf aufmerksam, dass ein genereller Ausschluss der BRAF mutierten Patienten von einer EGFR-Therapie verfrüht wäre und dass eine genaue Erklärung für das Verhalten der BRAF mutierten Tumore unter EGFR-Therapie weiterhin fraglich bleibt [91].

Zu nennen wären zudem die Untersuchungen von Barras et al., welche aufgrund einer Genexpressionsanalyse zumindest zwei distinkt unterschiedliche Gruppen von BRAF mutierten Tumoren unterscheiden kann. Die eine Gruppe wäre hiernach EGFR-Antikörper sensibel, die andere hingegen refraktär [92].

Durch eine erneute unabhängige CT-Begutachtung von 38 (17 im Cetuximab und 21 im Bevacizumab Arm) der 48 BRAF mutierten Patienten in der FIRE-3 Studie hoffte man durch genaue Beobachtung der Tumordynamik unter Therapie auf weitere Lösungsansätze. ETS wurde zu 53% im Cetuximab Arm und zu 33% im Bevacizumab Arm erreicht. Patienten, welche ETS erreichten, zeigten im Cetuximab Arm ein signifikant längeres PFS (9,0 vs. 1,9 Monate;  $p = 0,002$ ) und OS (29,8 vs. 5,9 Monate;  $p = 0,047$ ) im Vergleich zu Patienten, die ETS nicht erreichten [63]. ETS könnte ein in der Zukunft vielversprechender Marker sein, um gezielt Patienten zu selektieren, die von einer FOLFIRI plus Cetuximabtherapie profitieren. Aufgrund der geringen Fallzahlen sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um das unterschiedliche Ansprechen weiter zu untersuchen und mögliche Einflussfaktoren zu definieren.

Die TRIBE-Studie präsentiert auch hier einen weiteren Therapieansatz. In der Studie wurde die Subgruppe der BRAF mutierten Patienten mit der Dreifachchemotherapie FOLFOXIRI plus Bevacizumab mit FOLFIRI plus Bevacizumab Gruppe verglichen. Die Dreifachchemotherapie erreichte in Kombination mit dem VEGF-Antikörper ein OS von 19,0 Monaten, während FOLFIRI plus Bevacizumab ein OS von 10,7 Monaten

erzielte [85]. Ob eine Dreifachchemotherapie jedoch als Standard bei einem schwer kranken Patientenkollektiv hinzugezogen werden kann bleibt fraglich.

Behandlungsstrategien neben der Chemotherapie sind Bestand aktueller Forschung. Während die Einfachtherapie mit BRAF-Inhibitoren keine Wirkung zeigte [93], konnte die Kombination aus MEK-Inhibitoren und BRAF-Inhibitoren positive Ergebnisse erzielen [94]. Eine Dreifachtherapie aus EGFR-Antikörpern, BRAF-Inhibitoren und MEK-Signalweginhibitoren zeigen in der Phase I/II Studie von Bendell et al. ermutigende Ergebnisse in der Therapie der BRAF mutierten Patienten und lassen auf weitere Ansätze in der Therapie des mKRK hoffen [95].

Zusammenfassend stellt sich die Therapie der BRAF mutierten Patienten beim mKRK weiterhin schwierig da. Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage empfehlen die 2016 veröffentlichten ESMO Leitlinien und die aktuelle deutsche S3-Leitlinie eine BRAF-Testung neben der RAS-Testung. Dies soll zum einen die prognostische Bewertung, aber auch die Zuordnung in klinischen Studien erleichtern [3, 44].

#### **5.4 Ergebnisse der PIK3CA mutierten Patientenpopulation, Doppelmutationen und deren Bedeutung**

Das PIK3CA Gen liegt in einem der Signaltransduktionswege des EGF-Rezeptors und muss als potentiell negativer Prädiktor in der EGFR-Therapie diskutiert werden. In der FIRE-3 Studie konnten in etwa acht Prozent der Patientenpopulation eine PIK3CA Mutation nachgewiesen werden. Genauer beziffert konnten 27 Mutationen im Exon 9 und 11 Mutationen im Exon 20 sequenziert werden. In der Literatur zeigen ungefähr 10-20% der Patienten mit KRK eine PIK3CA Mutation, wobei die Exon 9 Mutation drei bis fünf Mal häufiger vorkommt [46]. Das Ergebnis der FIRE-3 Studie und auch das Verhältnis der Mutationen liegt damit leicht unter dem Durchschnitt, jedoch noch im erwarteten Bereich. Es lassen sich in der Literatur Studien finden, die PIK3CA aufgrund von signifikant schlechteren Therapieergebnissen als negativen Prädiktor für eine EGFR-Therapie einstufen [47-49]. Definiert man die Patientenpopulation in der FIRE-3 Studie zu einer RAS, BRAF und PIK3CA WT Population, so kann ein signifikant verlängertes OS (HR = 0,67; 95% KI = 0,50-0,90; p = 0,009) im Cetuximab Arm im Vergleich zum Bevacizumab Arm beobachtet werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die weitere Einschränkung auf PIK3CA WT aufgrund von Doppelmutationen nur 25 Patienten umfasst, da von 38 PIK3CA mutierten Patienten 13 Proben zusätzlich eine RAS oder BRAF Mutation aufzeigen.

Die PIK3CA mutierten Patienten zeigen in der FIRE-3 Studie keinen signifikanten Unterschied im Therapieergebnis zwischen einer Anti-EGFR und einer Anti-VEGF Therapie. Das PFS ist im Bevacizumab Arm länger, erreichte jedoch keine Signifikanz. Zu beachten ist hier die sehr kleine Fallzahl, so dass eine eindeutige Aussage zur PIK3CA Mutationen und deren Einfluss auf eine Cetuximab- aber auch auf eine Bevacizumabtherapie nicht getroffen werden kann. Da in der Studie von de Roock et al. die PIK3CA Mutation Exon 20 im Vergleich zum WT ein schlechteres Ansprechen in der Anti-EGFR Therapie zeigt, während die Exon 9 Mutation keinen Einfluss darstellt, könnte eine weitere Differenzierung in Exon 9 und 20 einen weiteren Aufschluss erbringen [51]. Aufgrund der geringen Fallzahl ist solch eine Auswertung in der FIRE-3 Studie nicht sinnvoll möglich.

Wie oben bereits beschrieben treten PIK3CA Mutationen oft zusammen mit RAS und BRAF Mutationen auf. In der ITT-Population zeigten 13 Patienten neben der PIK3CA Mutation eine weitere Mutation. In der FIRE-3 Studie konnten insgesamt 17 Doppelmutationen gefunden werden. Dabei ließ sich quantitativ am häufigsten eine PIK3CA Mutation in Kombination mit einer RAS Mutation finden ( $n = 9$ ). Eine RAS/BRAF Mutation konnte dagegen nur einmal sequenziert werden. Die Anzahl der gefundenen Doppelmutationen stimmt prozentual mit den Ergebnissen der CAPRI GOIM Studie überein. Hier wurden 340 KRAS Exon 2 WT Patienten mit FOLFIRI plus Cetuximab behandelt. Mittels Next Generation Sequencing wurden 22 Gene untersucht, unter anderem auch KRAS, NRAS, BRAF und PIK3CA. Auch hier sieht man in der RAS mutierten Patientenpopulation vor allem Doppelmutationen mit einer zusätzlichen PIK3CA Mutation und in einer deutlich geringeren Anzahl mit einer BRAF Mutation. In der Studie wird deutlich, dass das komplexe heterogene Mutationsprofil bei der Bestimmung von Resistenzen gegen eine EGFR Therapie beachtet werden muss und womöglich eine Kombination aus verschiedenen zielgerichteten Therapien in der Behandlung des mKRK notwendig ist [96]. Die Veröffentlichung von Ciardiello et al. zu der CAPRI GOIM Studie zeigt ein besseres Ansprechen in der EGFR Therapie in der RAS/BRAF/PIK3CA WT Population im Vergleich zu Patienten mit Mutationen in diesen Genen. Diese Ergebnisse stimmen mit der FIRE-3 Studie überein. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass BRAF und PIK3CA Mutationen nicht unbedingt negative Prädiktoren in der Anti-EGFR Therapie darstellen müssen, sondern auch der

prognostische Effekt der BRAF und PIK3CA Mutationen zumindest zum Teil das schlechte Therapieansprechen erklären könnte [97].

### **5.5 Ausblick zu weiteren Markern in der Therapie des mKRR**

Auf der Suche nach weiteren prognostischen und prädiktiven Markern in der Therapie des mKRR, insbesondere in der EGFR-Therapie, findet man neben dem molekulargenetischen Profil des Tumors die Tumorlokalisierung als bedeutenden Einflussfaktor. Die Studie von Holch et al. macht deutlich, dass das rechtsseitige KRR, im Vergleich zum linksseitigen KRR, eine signifikant schlechtere Prognose hat. Zudem wird deutlich, dass das linksseitige KRR mit einem RAS WT bevorzugt mit einer Anti-EGFR Therapie behandelt werden sollte [98]. Die Studie von Cremolini et al. zeigt, dass sich das molekulargenetische Untersuchungsergebnis im KRR abhängig von der Tumorlokalisierung als sehr heterogen darstellt. Es muss daher weitere Untersuchungen geben, um einen genauen Zusammenhang zwischen der Lokalisation, dem molekulargenetischen Profil und der optimalen Behandlung aufzudecken [98, 99].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich eine einfache und klare Einordnung des mKRR in verschiedene Therapiegruppen als schwierig darstellt. Die Subklassifikationen auf dem Boden der Genexpression (CMS 1-4) schließt epigenetische und molekulargenetische Aspekte mit ein und stellt somit eine mögliche Kategorisierung dar. Dabei wird deutlich, wie vielschichtig die Pathogenese und die möglichen Einflussfaktoren dieses Karzinoms sind.

Es sollte in Zukunft in der Therapie des mKRR beispielsweise auch der Einfluss von den EGFR-Liganden (EREG, AREG) und der EGF-Rezeptor selbst, als Prädiktor für die anti-EGFR Aktivität ausführlich diskutiert werden.



## 6 Zusammenfassung

Die FIRE-3 Studie, eine randomisierte Phase III Studie, vergleicht den EGFR-Antikörper Cetuximab und den VEGF-Antikörper Bevacizumab jeweils in Kombination mit der Chemotherapie FOLFIRI in der Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Diese Arbeit innerhalb der FIRE-3 Studie beschreibt den Einfluss des molekulargenetischen Profils der Tumore auf das Therapieergebnis. Die ORR wurde als primärer Endpunkt definiert, das PFS und das OS als sekundäre Endpunkte. Speziell wurde der Zusammenhang zwischen Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg und dem Therapieansprechen, mit besonderem Augenmerk auf die EGFR-Therapie, beschrieben. Hierbei wurden auf Mutationslokalisationen im KRAS (Exon 2, 3, 4), NRAS (Exon 2, 3, 4), BRAF (Exon 11, 15), PIK3CA (Exon 9, 20) und AKT Gen eingegangen. Im Pathologischen Institut der LMU München wurden die Tumorblöcke der FIRE-3 Patienten aufbereitet, die Tumor DNA vervielfältigt und mittels Pyrosequenzierung analysiert.

Die KRAS Exon 2 Mutation wurde als negativer Prädiktor für die EGFR Therapie identifiziert und es kam in der FIRE-3 Studie zu einer Erweiterung der Einschlusskriterien auf eine KRAS Exon 2 WT Patientenpopulation. In dieser KRAS Exon 2 WT Population zeigte die ORR im Cetuximab Arm 62,0% und im Bevacizumab Arm 58,0% ( $p = 0,18$ ). Auch das PFS erreichte keinen signifikanten Unterschied mit 10,0 Monaten im EGFR Arm vs. 10,3 Monate im Bevacizumab Arm ( $p = 0,55$ ). Im OS konnte hingegen ein signifikanter Unterschied mit 28,7 Monaten im Cetuximab Arm und 25,0 Monaten im Bevacizumab Arm festgestellt werden ( $p = 0,017$ ).

Zwischen 2007 und 2012 wurden 592 Patienten mit KRAS Exon 2 WT untersucht. Es konnten 19 KRAS Exon 3 Mutationen und 28 Mutationen im KRAS Exon 4 gefunden werden. Im Gen NRAS konnten 17 Mutationen im Exon 2, zehn Mutationen im Exon 3 und eine Mutation im Exon 4 gefunden werden. Durch die weitere Selektion auf eine all RAS WT Population und durch den damit verbundenen Ausschluss von RAS mutierten Patienten erreichte die ORR 65,3% im FOLFIRI plus Cetuximab Arm und im FOLFIRI plus Bevacizumab Arm 58,7% ( $p = 0,18$ ). Das PFS zeigte einen ähnlichen Verlauf in der all RAS WT Population mit 10,3 Monaten im Cetuximab und mit 10,2 Monaten im Bevacizumab Arm ( $p = 0,77$ ). Das OS in der all RAS WT Testung war in der FOLFIRI plus Cetuximab Gruppe mit 33,1 Monaten signifikant länger, im Vergleich zu FOLFIRI plus Bevacizumab mit 25,0 Monaten ( $p = 0,0059$ ).

In der RAS mutierten Patientenpopulation konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiearmen in der ORR, dem PFS und im OS nachgewiesen werden.

Im Gen BRAF Exon 11 traten ausschließlich Wildtypen auf, im Exon 15 waren 48 Proben in der ITT-Population mutiert. Die ORR in der BRAF mutierten Gruppe ergab 52,2% in der Cetuximab plus FOLFIRI und 40,0% in der Bevacizumab plus FOLFIRI Gruppe ( $p = 0,56$ ). Das PFS zeigte vergleichbare Ergebnisse. Das OS zeigte in der BRAF mutierten Population im FOLFIRI plus Cetuximab Arm 12,3 Monate im Vergleich zu 13,7 Monaten im Bevacizumab Arm ( $p = 0,45$ ).

Das PIK3CA Gen zeigte in der ITT-Population 27 Mutationen im Exon 9 und 11 Mutationen im Exon 20. In der PIK3CA mutierten Population stellte sich die ORR und das OS in beiden Therapiearmen ähnlich dar. Lediglich im PFS konnte ein nicht signifikanter Unterschied im FOLFIRI plus Cetuximab Arm mit 7,8 Monaten im Vergleich zu 13,3 Monaten im Bevacizumab plus FOLFIRI Arm festgestellt werden ( $p = 0,18$ ). Im AKT-Gen konnten drei Mutationen nachgewiesen werden. Aufgrund der gering mutierten Patientenproben konnte keine statistische Analyse zum AKT-Gen durchgeführt werden. In der FIRE-3 Studie konnten insgesamt 17 Doppelmutationen gefunden werden. Jedoch konnte auch hier aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Auswertung erfolgen.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der FIRE-3 Studie, dass eine erweiterte RAS-Testung und ein damit verbundener Ausschluss von RAS mutierten Patienten in der EGFR Therapie beim mKRK als sinnvoll einzustufen ist. RAS Mutationen zeigen sich als negative Prädiktoren in der Behandlung mit Cetuximab. Zudem haben Patienten mit einem all RAS WT Tumor einen signifikanten Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens, wenn sie mit FOLFIRI plus Cetuximab im Vergleich zu FOLFIRI plus Bevacizumab behandelt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut (Hrsg) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.): Berlin. p. 38-41.
2. *Tumorregister München des Tumorzentrums München, C18-20: Darmtumor, Survival*; <http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC1820G-ICD-10-C18-C20-Darmtumor-Survival.pdf> [abgerufen am 31.05.2016].
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 04.03.2018].
4. Birkner, B.R., [Evidence-based prevention of colorectal carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2003. **128**(49): p. 2598-603.
5. Winawer, S.J., et al., *Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(2): p. 594-642.
6. Brenner, H., et al., *Expected long-term impact of the German screening colonoscopy programme on colorectal cancer prevention: analyses based on 4,407,971 screening colonoscopies*. *Eur J Cancer*, 2015. **51**(10): p. 1346-53.
7. Stintzing, S., *Management of colorectal cancer*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 108.
8. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. *Nature*, 1992. **359**(6392): p. 235-7.
9. Konishi, M., et al., *Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(2): p. 307-17.
10. Szyllberg, L., et al., *Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review*. *Gastroenterol Res Pract*, 2015. **2015**: p. 573814.
11. Yamane, L., et al., *Serrated pathway in colorectal carcinogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(10): p. 2634-40.
12. Noffsinger, A.E., *Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 343-64.
13. Ruschoff, J., D. Aust, and A. Hartmann, [Colorectal serrated adenoma: diagnostic criteria and clinical implications]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2007. **91**: p. 119-25.
14. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
15. Ilyas, M., et al., *Genetic pathways in colorectal and other cancers*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(14): p. 1986-2002.
16. Guinney, J., et al., *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. *Nat Med*, 2015. **21**(11): p. 1350-6.
17. Dienstmann, R., et al., *Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes*. *Journal of Clinical Oncology*, 2014. **32**(15\_suppl): p. 3511-3511.
18. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(1): p. 9-29.
19. Petrelli, N., 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**(10): p. 1419-26.

20. Poon, M.A., et al., *Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma*. J Clin Oncol, 1989. **7**(10): p. 1407-18.
21. de Gramont, A., et al., *Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 808-15.
22. de Gramont, A., et al., *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2938-47.
23. Giacchetti, S., 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**(1): p. 136-47.
24. Douillard, J.Y., et al., *Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial*. Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1041-7.
25. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 905-14.
26. Stintzing, S., et al., *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer-subgroup analysis of patients with KRAS: mutated tumours in the randomised German AIO study KRK-0306*. Ann Oncol, 2012. **23**(7): p. 1693-9.
27. Colucci, G., et al., *Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 4866-75.
28. Tournigand, C., et al., *FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study*. J Clin Oncol, 2004. **22**(2): p. 229-37.
29. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. European Journal of Cancer, 2001. **37**, **Supplement 4**: p. 3-8.
30. Goffin, J.R. and K. Zbuk, *Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline*. Clin Ther, 2013. **35**(9): p. 1282-303.
31. Normanno, N., et al., *Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(9): p. 519-27.
32. Walker, F., et al., *Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7192-204.
33. Humblet, Y., *Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours*. Expert Opin Pharmacother, 2004. **5**(7): p. 1621-33.
34. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
35. Lievre, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
36. Benvenuti, S., 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**(6): p. 2643-8.

37. Sartore-Bianchi, A., et al., *Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab*. J Clin Oncol, 2007. **25**(22): p. 3238-45.
38. Van Cutsem, E., 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**(15): p. 2011-9.
39. Van Cutsem, E., et al., *Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(7): p. 692-700.
40. Bokemeyer, C., et al., *FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2015. **51**(10): p. 1243-52.
41. Douillard, J.Y., et al., *Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2014. **25**(7): p. 1346-55.
42. Prahallad, A., et al., *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR*. Nature, 2012. **483**(7387): p. 100-3.
43. Corcoran, R.B., et al., *EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib*. Cancer Discov, 2012. **2**(3): p. 227-35.
44. Van Cutsem, E., et al., *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(8): p. 1386-422.
45. Huang, L., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody-based therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of PIK3CA mutations in KRAS wild-type patients*. Arch Med Sci, 2014. **10**(1): p. 1-9.
46. Cathomas, G., *PIK3CA in Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 35.
47. Sartore-Bianchi, A., et al., *PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1851-7.
48. Perrone, F., et al., *PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients*. Ann Oncol, 2009. **20**(1): p. 84-90.
49. Sood, A., et al., *PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2012. **11**(2): p. 143-50.
50. Prenen, H., et al., *PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 3184-8.
51. De Roock, W., et al., *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis*. Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 753-62.
52. Stintzing, S., et al., *Prognostic value of cetuximab-related skin toxicity in metastatic colorectal cancer patients and its correlation with parameters of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway: results*

- from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group. *Int J Cancer*, 2013. **132**(1): p. 236-45.
53. Los, M., J.M. Roodhart, and E.E. Voest, *Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer*. *Oncologist*, 2007. **12**(4): p. 443-50.
  54. Strickler, J.H. and H.I. Hurwitz, *Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. *Oncologist*, 2012. **17**(4): p. 513-24.
  55. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
  56. Fuchs, C.S., J. Marshall, and J. Barrueco, *Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(4): p. 689-90.
  57. Saltz, L.B., 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**(12): p. 2013-9.
  58. Price, T.J., et al., *Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(19): p. 2675-82.
  59. Hurwitz, H.I., 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**(1): p. 22-8.
  60. Ince, W.L., et al., *Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(13): p. 981-9.
  61. Heinemann, V., 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. **15**(10): p. 1065-75.
  62. *Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik III, FIRE-3, Synopsis; [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Darmzentrum/de/darmkrebs-studien/darmkrebs-studien/abgeschlossen/fire-3/fire3\\_synopsis/index.html](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Darmzentrum/de/darmkrebs-studien/darmkrebs-studien/abgeschlossen/fire-3/fire3_synopsis/index.html) [abgerufen am 31.05.2018].*
  63. Stintzing, S., et al., *Impact of BRAF and RAS mutations on first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab: analysis of the FIRE-3 (AIO KRK-0306) study*. *European Journal of Cancer*. **79**: p. 50-60.
  64. Petrosino, J.F., et al., *Metagenomic pyrosequencing and microbial identification*. *Clin Chem*, 2009. **55**(5): p. 856-66.
  65. Van Cutsem, E., et al., *O-0021: Outcome according to tumor RAS mutation status in CRYSTAL study patients with metastatic colorectal cancer randomized to FOLFIRI with or without cetuximab as first-line treatment*. *Ann Oncol* (2014) **25** (suppl\_2). ii113, 2014.
  66. Berg, L.M., R. Sanders, and A. Alderborn, *Pyrosequencing technology and the need for versatile solutions in molecular clinical research*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002. **2**(4): p. 361-9.
  67. Lee, H.S., et al., *Molecular Testing for Gastrointestinal Cancer*. *J Pathol Transl Med*, 2017. **51**(2): p. 103-121.

68. Bokemeyer, C., et al., *KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15\_suppl): p. 4000-4000.
69. Cutsem, E.V., et al., *KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15\_suppl): p. 2-2.
70. Schwartzberg, L.S., et al., *PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2014. **32**(21): p. 2240-7.
71. Venook, A.P., et al., *Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2017. **317**(23): p. 2392-2401.
72. Khattak, M.A., et al., *Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Clin Colorectal Cancer, 2015. **14**(2): p. 81-90.
73. Venook, A.P. and J. Tabernero, *Progression-free survival: helpful biomarker or clinically meaningless end point?* J Clin Oncol, 2015. **33**(1): p. 4-6.
74. Piessevaux, H., et al., *Use of early tumor shrinkage to predict long-term outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. J Clin Oncol, 2013. **31**(30): p. 3764-75.
75. Modest, D.P., et al., *Early tumor shrinkage in patients with metastatic colorectal cancer receiving first-line treatment with cetuximab combined with either CAPIRI or CAPOX: an analysis of the German AIO KRK 0104 trial*. Acta Oncol, 2013. **52**(5): p. 956-62.
76. Claret, L., et al., *Model-based prediction of phase III overall survival in colorectal cancer on the basis of phase II tumor dynamics*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4103-8.
77. Claret, L., et al., *Evaluation of tumor-size response metrics to predict overall survival in Western and Chinese patients with first-line metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(17): p. 2110-4.
78. Sharma, M.R., et al., *Resampling the N9741 trial to compare tumor dynamic versus conventional end points in randomized phase II trials*. J Clin Oncol, 2015. **33**(1): p. 36-41.
79. Stintzing, S., et al., *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(10): p. 1426-1434.
80. Douillard, J.Y., et al., *Impact of early tumour shrinkage and resection on outcomes in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2015. **51**(10): p. 1231-42.
81. Rivera, F., et al., *First-line treatment with modified FOLFOX6 (mFOLFOX6) + panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) in wild-type (WT) RAS metastatic colorectal carcinoma (mCRC): Tumor response outcomes beyond RECIST*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(3\_suppl): p. 660-660.

82. Mansmann, U.R., et al., *Deepness of response: A quantitative analysis of its impact on post-progression survival time after first-line treatment in patients with mCRC*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(4\_suppl): p. 427-427.
83. Douillard, J.Y., et al., *Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2013. **369**(11): p. 1023-34.
84. Bokemeyer, C., et al., *Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials*. Eur J Cancer, 2012. **48**(10): p. 1466-75.
85. Cremolini, C., et al., *FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1306-15.
86. Kubicka, S., et al., *Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2342-9.
87. Hegewisch-Becker, S., et al., *Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1355-69.
88. Bendell, J., et al., *Clinical activity and safety of cobimetinib (cobi) and atezolizumab in colorectal cancer (CRC)*. J Clin Oncol, 2016. **34**: p. 2016.
89. Cremolini, C., et al., *BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis*. Ann Oncol, 2015. **26**(10): p. 2092-7.
90. Pietrantonio, F., et al., *Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis*. Eur J Cancer, 2015. **51**(5): p. 587-94.
91. Rowland, A., et al., *Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2015. **112**(12): p. 1888-94.
92. Barras, D., et al., *BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(1): p. 104-115.
93. Kopetz, S., et al., *Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(34): p. 4032-8.
94. Corcoran, R.B., et al., *Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(34): p. 4023-31.
95. Bendell, J.C., et al., *Efficacy and tolerability in an open-label phase I/II study of MEK inhibitor trametinib (T), BRAF inhibitor dabrafenib (D), and anti-EGFR antibody panitumumab (P) in combination in patients (pts) with BRAF V600E mutated colorectal cancer (CRC)*. 2014, American Society of Clinical Oncology.
96. Normanno, N., et al., *Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1710-4.



97. Ciardiello, F., et al., *Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial*. *Annals of Oncology*, 2014. **25**(9): p. 1756-1761.
98. Holch, J.W., et al., *The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials*. *Eur J Cancer*, 2017. **70**: p. 87-98.
99. Cremolini, C., et al., *Negative hyper-selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR monoclonal antibodies: the PRESSING case-control study*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(12): p. 3009-3014.

## 8 Anhang

### 8.1 Material und Geräte

#### 8.1.1 Allgemein verwendete Materialien und Geräte

Mini-Zentrifuge	Katalognummer: C1301B-230V	neoLab; Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Rischerstr. 7-9, 69123 Heidelberg
Pipetten, verschiedene Volumina (SafeSeal-Tips Professional)	Katalognummer: 770100, 770200, 770020, 770600	Biozym Scientific GmbH Steinbrinksweg 27, 31840 Hessisch Oldendorf
Safe-Lock Tubes, verschiedene Größen	Bestellnummer: 0030120086, 0030121023, 0030124359	Eppendorf; Barkhauserweg 1, 22339 Hamburg
Thermomixer comfort 2ml	Bestellnummer: 5355000.011	Eppendorf; Barkhauserweg 1, 22339 Hamburg
Objektträger Superfrost Plus, Thermo Scientific	Katalognummer: 10143352 Artikelnummer: J1800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH Saarbrückener Str. 248 38116 Braunschweig
Skalpells steril Fig. 28	Artikelnummer: 1-1562	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Rischerstr. 7-9, 69123 Heidelberg
Ethanol absolut zur Analyse	Bestellnummer: A1613,2500PE	PanReac AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt
Xylol-Isomergemisch reinst (PanReac AppliChem)	Bestellnummer: A0636,2500	PanReac AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt

#### 8.1.2 DNA-Isolation

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Katalognummer: 56404	QIAGEN GmbH Qiagen Str.1 40724 Hilden
QiaCube Vollautomat zur Aufreinigung von DNA und RNA	Katalognummer: 9001293	QIAGEN GmbH Qiagen Str.1 40724 Hilden
Filtertips 1000µl für QiaCube	Katalognummer: 990352	QIAGEN GmbH Qiagen Str.1 40724 Hilden
Rotator Adapter (10 x 24)	Katalognummer: 990394	QIAGEN GmbH Qiagen Str.1 40724 Hilden

### 8.1.3 PCR und Pyrosequenzierung

HotStarTaq DNA-Polymerase	Katalognummer: 203205	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
dNTP Mix, 10 mM each	Katalognummer: R0192	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St. Leon-Rot
Primer	Abhängig vom untersuchten Gen	Biomers.net; Söflinger Straße100, 89077 Ulm
Mastercycler pro	Katalognummer: 6321000019	Eppendorf; Barkhauserweg 1, 22339 Hamburg
PyroMark Q24 Advanced System	Katalognummer: 9002270	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Pyro Mark Gold Q24, Reagents	Katalognummer: 970802 (971802)	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Streptavidin Sepharose High Performance, 5 ml	Katalognummer: 17511301	GE Healthcare; Oskar-Schlemmer-Str. 11, 80807 München
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Katalognummer: 979306	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Katalognummer: 979309	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
Pyromark Denaturation Solution (500 ml)	Katalognummer: 979307	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Wash Buffer concentrate (200 ml)	Katalognummer: 979308	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Katalognummer: 9001515	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Q24 Plate (100)	Katalognummer: 979301	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Q24 Vacuum Prep Through	Katalognummer: 979206	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Q24 Cartridge	Katalognummer: 979302	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden
PyroMark Q24 Control Oligo	Katalognummer: 979303	QIAGEN GmbH, Qiagen Str.1, 40724 Hilden

### 8.1.4 Gelkontrolle

Human Genmic DNA: Male	Katalognummer: G1471 LOT-Nummer: 0000159358	Promega Corporation; 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399, USA
DNA Loading Dye (Thermo Scientific)	Katalognummer: R0611	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St. Leon-Rot
GenRuler 100 bp, Plus DNA Ladder 0,1 µg/µl, 50 µg (Thermo Scientific)	Katalognummer: SM0321	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St. Leon-Rot

TBE Puffer (Tris-borate-EDTA) (Thermo Scientific)	Katalognummer: B52	Fermentas GmbH Opel Str. 9 68789 St. Leon-Rot
UV-Lichtkamara	Model: FluorChem FC2	Alpha Innotech Corp., 2401 Merced Street, San Leandro, CA 94577-4210

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Bösartige Neubildung des Kolorektums (Relatives Überleben 1998-2014) .....	8
Abbildung 2-2 Schlüsselmoleküle im EGFR-Signaltransduktionsweg.....	13
Abbildung 3-1 Chemische Reaktionen bei der Pyrosequenzierung .....	31
Abbildung 3-2 Befüllung des Cartridge.....	34
Abbildung 4-1 Pyrogramm Wildtyp und KRAS c.183A>C Mutation .....	37
Abbildung 4-2 Verteilung der FIRE-3 Patienten.....	38
Abbildung 4-3 Das NRAS und KRAS Gen im Überblick.....	39
Abbildung 4-4 RAS Mutationsverteilung .....	39
Abbildung 4-5 RAS Mutationsverteilung nach Gen und Exon.....	40
Abbildung 4-6 Verteilung der KRAS Codon 59-61 Mutationen .....	41
Abbildung 4-7 Verteilung der KRAS Codon 117 Mutationen.....	42
Abbildung 4-8 Verteilung der KRAS Codon 146 Mutationen.....	42
Abbildung 4-9 Verteilung der NRAS Codon 12-13 Mutationen .....	44
Abbildung 4-10 Verteilung der NRAS Codon 59-61 Mutationen .....	45
Abbildung 4-11 Progressionsfreies Überleben, RAS WT Population.....	47
Abbildung 4-12 Gesamtüberleben, RAS WT Population.....	47
Abbildung 4-13 Progressionsfreies Überleben, RAS mutierte Patientenpopulation.....	49
Abbildung 4-14 Gesamtüberleben, RAS mutierte Patientenpopulation .....	49
Abbildung 4-15 BRAF Mutationsverteilung.....	50
Abbildung 4-16 Verteilung der BRAF Exon 15 Mutationen.....	51
Abbildung 4-17 Progressionsfreies Überleben, BRAF mutierte Patientenpopulation ...	53
Abbildung 4-18 Gesamtüberleben, BRAF mutierte Patientenpopulation .....	53
Abbildung 4-19 PIK3CA Mutationsverteilung .....	54
Abbildung 4-20 Verteilung der PIK3CA Exon 9 Mutationen .....	55
Abbildung 4-21 Verteilung der PIK3CA Exon 20 Mutationen .....	56
Abbildung 4-22 Progressionsfreies Überleben, PIK3CA .....	58
Abbildung 4-23 Gesamtüberleben, PIK3CA .....	58
Abbildung 4-24 PFS und OS in der FIRE-3 abhängig vom Mutationsstatus .....	60
Abbildung 4-25 Doppelmutationen in der FIRE-3 Studie .....	61

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Therapieschema: Chemotherapie FOLFIRI .....	22
Tabelle 3-2 Therapieschema: Antikörpergabe .....	22
Tabelle 3-3 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit .....	25
Tabelle 3-4 Primer-Mix für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	26
Tabelle 3-5 Primernamen und -sequenz für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	27
Tabelle 3-6 HotStarTaq DNA- Polymerase Kit .....	28
Tabelle 3-7 Mastermix für die Polymerase-Ketten-Reaktion .....	28
Tabelle 3-8 DNA-Mastermix für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	28
Tabelle 3-9 Standardprogramm: Hyb 50x60C-pyr.....	29
Tabelle 3-10 NRAS-Programm: Hyb 40x58C_NRAS_pyr.....	29
Tabelle 3-11 Beads-Mastermix .....	32
Tabelle 3-12 Primer-Mix für Pyrosequenzierung.....	32
Tabelle 3-13 Primerherstellung: Primer (10x; 3µM).....	32
Tabelle 3-14 Primernamen und -sequenz für das Pyrosequenzierung .....	33
Tabelle 4-1 Verteilung der KRAS Codon 59-61 Mutationen .....	41
Tabelle 4-2 Verteilung der KRAS Codon 117 Mutationen .....	42
Tabelle 4-3 Verteilung der KRAS Codon 146 Mutationen .....	43
Tabelle 4-4 Verteilung der NRAS Codon 12-13 Mutationen .....	44
Tabelle 4-5 Verteilung der NRAS Codon 59-61 Mutationen .....	45
Tabelle 4-6 Verteilung der NRAS Codon 117 Mutationen .....	45
Tabelle 4-7 ORR, PFS und OS in der RAS WT Population.....	46
Tabelle 4-8 ORR, PFS und OS in der RAS mutierten Patientenpopulation.....	48
Tabelle 4-9 Verteilung der BRAF Exon 15 Mutationen.....	51
Tabelle 4-10 ORR, PFS und OS in der BRAF mutierten Patientenpopulation.....	52
Tabelle 4-11 Verteilung der PIK3CA Exon 9 Mutationen .....	55
Tabelle 4-12 Verteilung der PIK3CA Exon 20 Mutationen .....	56
Tabelle 4-13 ORR, PFS und OS in der PIK3CA mutierten Patientenpopulation.....	57
Tabelle 5-1 "Sensitivitäts-Cut-Off" .....	63

## **11 Danksagung**

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Volker Heinemann für die Überlassung des Themas bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. med. Sebastian Stintzing für die hilfreiche Begleitung in der Bearbeitung des Themas, für die zuverlässige Beantwortung aller Fragen und für seine kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner für die hilfreiche Kooperation mit dem Pathologisches Institut der Universität München und bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung für die geduldige Anleitung bei der Bearbeitung des Themas im Labor bedanken. Hier gilt auch mein außerordentlicher Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU München für Ihre mühevollen Einarbeitung der Probenbearbeitung und der ausgesprochen netten Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich zudem bei den Ärzten, die bei der Rekrutierung der FIRE-3 Patienten mitgeholfen haben, bei den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. med. Volker Heinemann für die gesamte organisatorische Arbeit und natürlich bei allen Probanden herzlich bedanken, die diese Studie ermöglicht haben.

Darüber hinaus gilt mein ganz herzlicher Dank meiner Familie, die mir mein Medizinstudium ermöglicht hat und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützend und liebevoll zur Seite stand.

# Eidesstattliche Versicherung

Miller-Phillips, Lisa

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
**MOLEKULARE PRADIKTION DES ANSPRECHENS AUF CETUXIMAB IM RAHMEN  
DER FIRE-3 STUDIE. UNTERSUCHUNGEN AM EGFR ("EPIDERMAL GROWTH  
FACTOR RECEPTOR") -SIGNALTRANSDUKTIONSWEG**

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, 06.06.19

---

Ort, Datum

**Lisa Miller-Phillips**

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand