

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

„Die Rolle der Amphiregulin und Epiregulin Genexpression bei Oxaliplatin/Fluoropyrimidin plus Bevacizumab behandelten Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom – eine Analyse der Phase III AIO KRK-0207 Studie“

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

vorgelegt von
Boryana Andreeva David
aus Sofia

Jahr

2024

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Stintzing

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Jörg Kumbrink

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKRRK).....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie.....	3
1.2	Tumorbiologie.....	3
1.2.1	Kolorektale Karzinogenese.....	4
1.3	Therapie.....	7
1.3.1	Aktuelle Therapieoptionen des kolorektalen Karzinoms (KRRK).....	7
1.3.2	Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern	10
1.3.3	Die Bedeutung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern.....	11
1.4	Die Rolle von EGFR und seinen Liganden	13
2	Zielsetzung.....	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Untersuchungsmaterial	18
3.1.1	AIO KRRK 0207 Studie.....	18
3.1.2	Materialgewinnung und Verarbeitung.....	19
3.2	Methoden	20
3.2.1	RNA-Isolation	20
3.2.2	Reinheitsmessung und Konzentrationsbestimmung	21
3.2.3	cDNA – Synthese.....	22
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24

3.2.5	Statistische Analysen.....	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Ergebnisse der AIO KRK 0207 Studie.....	29
4.2	Bearbeitung der Gewebeproben und Expressionsmessung	31
4.3	Einfluss der Tumorlokalisation und des Mutationsstatus auf die Expression von Amphiregulin und Epiregulin.....	32
4.3.1	Einfluss der Tumorlokalisation auf die Expression von Amphiregulin und Epiregulin.....	32
4.3.2	Einfluss der Tumorlokalisation auf den Mutationsstatus.....	34
4.3.3	Zusammenhang zwischen der Expression von Amphiregulin und Epiregulin und dem Mutationsstatus	36
4.4	Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf das Therapieansprechen, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben	36
4.4.1	Einfluss der Expression von Amphiregulin und Epiregulin auf das Therapieansprechen	36
4.4.2	Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Outcome.....	37
4.4.3	Einfluss der Amphiregulin Expression auf das progressionsfreie Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie.....	38
4.4.4	Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Gesamtüberleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie.....	39
4.4.5	Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Überleben, aufgeteilt nach Mutationsstatus.....	40
4.4.6	Einfluss der Epiregulin Expression auf das Outcome.....	41
4.4.7	Einfluss der Epiregulin Expression auf das progressionsfreie Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie	42

4.4.8	Einfluss der Epiregulin Expression auf das Gesamtüberleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie.....	43
4.4.9	Einfluss der Epiregulin Expression auf das Überleben, aufgeteilt nach Mutationsstatus.....	44
4.5	Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf die Effektivität der einzelnen Behandlungsarme	45
4.5.1	AREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab plus FP Erhaltung.....	45
4.5.2	AREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab Erhaltung.....	46
4.5.3	AREG-Einfluss auf das Überleben im Watch & Wait Arm	47
4.5.4	EREG-Einfluss auf das Überleben im Bevacizumab plus FP Arm	48
4.5.5	EREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab Erhaltung.....	48
4.5.6	EREG-Einfluss auf das Überleben im Watch & Wait Arm	51
4.5.7	Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf das Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie in der Doppelwildtyp Studiensubpopulation.....	51
5	Diskussion.....	54
5.1	Diskussion der verwendeten Methodik.....	54
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	54
5.2.1	BRAF V600E Mutation ist mit niedriger AREG/EREG Expression und schlechterem Outcome assoziiert	56
5.2.2	AREG und EREG haben keinen prognostischen Wert für das Ansprechen auf Oxaliplatin / Fluoropyrimidin-Bevacizumab.....	57
5.2.3	AREG und EREG Expressionen korrelieren mit dem Gesamtüberleben	58
5.3	Fehlende Daten der AIO KKK 0207 Studie	59
5.4	Ausblick	60
6	Zusammenfassung/Schluss	61

7	Abkürzungsverzeichnis	62
8	Abbildungsverzeichnis	66
9	Tabellenverzeichnis	68
10	Danksagung.....	69
11	Lebenslauf	70
12	Eidesstattliche Erklärung	71
13	Literaturverzeichnis	72
14	Publikation	79

1 Einleitung

Die bösartigen Tumore belegen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen den zweiten Platz unter den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Trotz weiterhin insgesamt schlechter Prognose können zunehmend, durch den Einsatz von hochaktiven Chemotherapeutika und ihrer Kombination mit immunologisch wirksamen Substanzen, das Gesamtüberleben und die Lebensqualität bei vielen Krebsarten deutlich gesteigert werden. Um möglichst noch vor dem Verabreichen einer Erstlinienbehandlung das verträglichste und wirksamste Behandlungskonzept vorhersagen zu können, müssen dringend zuverlässige prädiktive Biomarker erkannt und in der klinischen Routine etabliert werden.

1.1 Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKRK)

1.1.1 Epidemiologie

Laut des aktuellen Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland des Robert-Koch-Instituts liegt die jährliche Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) bei etwa 60.000 neu diagnostizierten Patienten (2018). Damit stellt das KRK die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern dar. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit zunehmendem Lebensalter. Mit insgesamt etwa 23.000 Sterbefällen im Jahr 2018 ist es die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache sowohl bei Männern (nach dem Bronchial- und Prostatakarzinom) als auch bei Frauen (dem Mamma - und dem Lungenkarzinom folgend) [1]. Das mittlere Erkrankungsalter ist bei beiden Geschlechtern annähernd gleich und liegt bei über 70 Jahren, das Lebenszeitrisko beträgt in Deutschland etwa 6% [1, 2]. Weltweit weisen sowohl Inzidenz als auch Mortalität eine geographische Abhängigkeit auf – während die meisten Neuerkrankungen in den Industrieländern in Westeuropa und Nordamerika registriert werden, ist die Sterblichkeit in Entwicklungsländern besonders hoch [3].

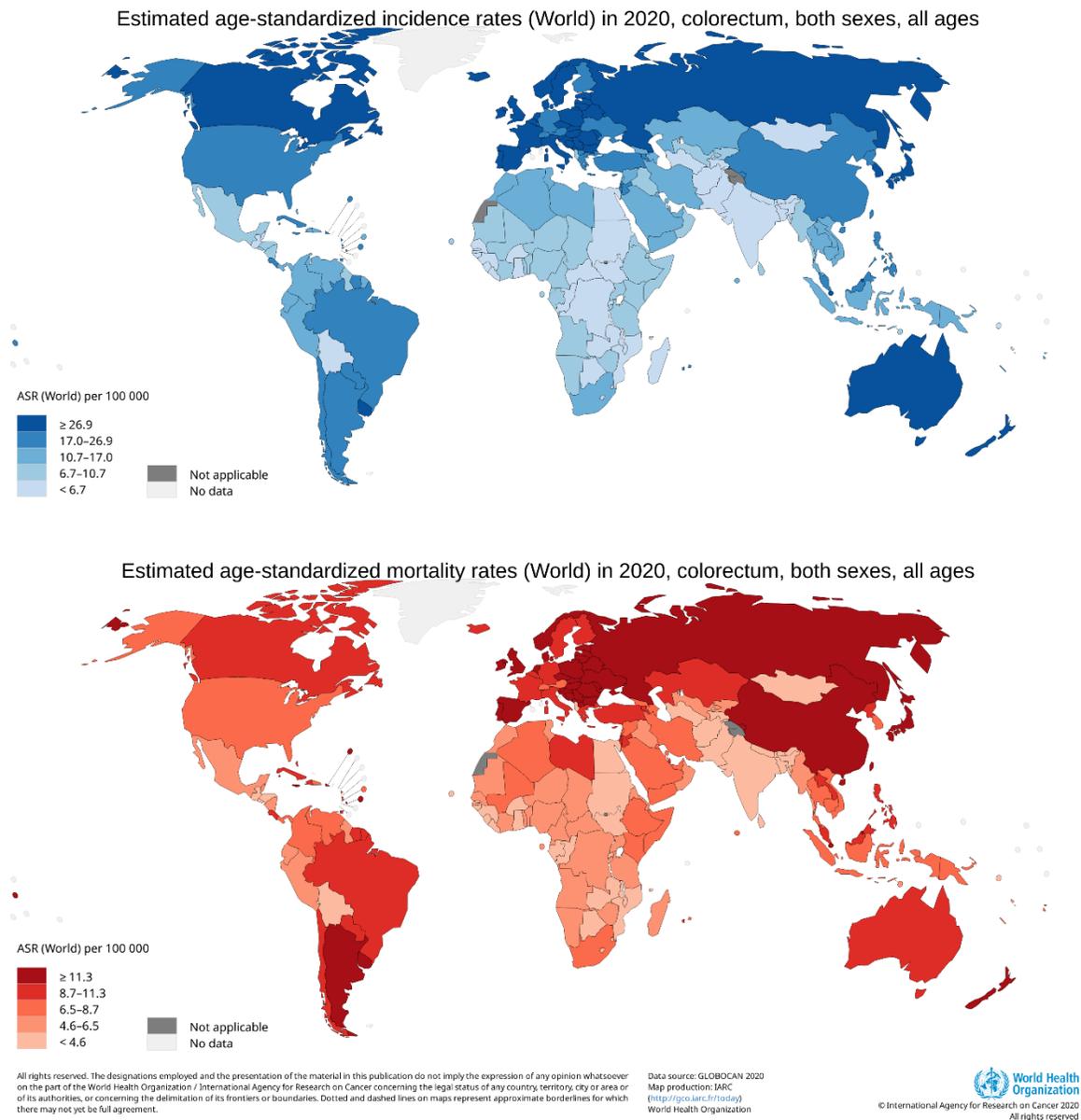


Abbildung 1: Inzidenz (oben) und die Mortalität (unten) des KRK weltweit. [4]

Die Prognose hängt stark von der Ausbreitung bei Erstdiagnose ab. Diese wird durch die Einteilung nach UICC (*Union internationale contre le cancer*) – beschrieben, welche auf der TNM (Tumor, Nodus/ Lymphknoten, Metastase) - Klassifikation basiert. Mit steigendem UICC Stadium sinkt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit rapide und beträgt im UICC

IV nur noch etwa 10% [5]. Leider werden trotzdem immer noch etwa 20% der Patienten im bereits metastasierten Stadium diagnostiziert [6].

1.1.2 Ätiologie

Wegen des heterogenen Charakters des kolorektalen Karzinoms ist die eindeutige Abklärung seiner Ätiologie besonders schwer. Zwischen 70 und 85% aller KRK entstehen sporadisch und sind nicht durch familiäre Assoziation oder hereditäre Erkrankung erklärt. Damit haben nur 15 bis 30% der KRK eine gewisse vererbare genetische Komponente [7]. Hinweisend darauf ist die familiäre Häufung, was aber nicht mit den hereditären Formen des kolorektalen Karzinoms verwechselt werden darf. Dazu zählen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC oder Lynch-Syndrom), deren Anteil ist mit ungefähr 5% jedoch verhältnismäßig gering.

Große epidemiologische Studien haben den Zusammenhang zwischen den Ernährungsgewohnheiten („westlicher Lebensstil“) und der Entstehung von KRK belegt. Die ballaststoffarme Ernährung in Kombination mit übermäßigem Konsum von rotem Fleisch und thermisch verarbeiteten Fleischwaren werden als Risikofaktoren diskutiert [8]. Daneben sind Tabak- und Alkoholkonsum, Bewegungsmangel und ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) als risikosteigernd zu sehen [9, 10].

Eine besondere Risikogruppe machen die Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) aus. Sie haben ein zwei- bis vierfach erhöhtes Erkrankungsrisiko als die Normalbevölkerung [11].

1.2 Tumorbiologie

Das Verständnis der Tumorentstehung und das Erkennen von potenziellen Angriffspunkten sind grundlegende Voraussetzungen für die Entwicklung effektiver Behandlungsstrategien.

In ihrem weltweit bekannten Artikel „*The Hallmarks of cancer*“ postulierten im Jahre 2000 Douglas Hanahan und Robert Weinberg sechs Veränderungen genetischen Ursprungs, die für die Entstehung von jeder Tumorart verantwortlich gemacht werden [12]. Diese sind:

- Selbstversorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren
- Resistenz gegen wachstumsinhibierende Signale
- Umgehung der Apoptose
- Potential zur unbegrenzten Replikation
- Aufrechterhalten von Angiogenese
- Gewebeinvasion und Metastasierung

2011 wurden in der Neuauflage „*The hallmarks of cancer: the next generation*“ [13] weitere zwei Kennzeichen durch die beiden Autoren hinzugefügt:

- Reprogrammieren des Energiemetabolismus
- Vermeiden der Zerstörung durch das Immunsystem

Durch das Verständnis der Karzinogenese ergeben sich spezifische therapeutische Angriffspunkte.

1.2.1 Kolorektale Karzinogenese

Das Darmepithel ist großer Beanspruchung ausgesetzt und muss dementsprechend kontinuierlicher regeneriert werden. Diese Regeneration erfolgt aus den Darmkrypten in denen sich Stammzellen befinden. Durch WNT-Pathway kontrollierte Zellteilung bilden sich zunächst ruhende Stammzellen welche sich durch weitere Zellteilung (Proliferation), Verschiebung (Migration) in Richtung Darmzotte (Villi) und Differenzierung zu Drüsenzellen (Gobletzellen), neuroendokrinen Zellen oder, in der überwiegenden Mehrzahl, zu resorptiven Epithelzellen entwickeln. Im Bereich des Villi sterben diese Zellen dann durch kontrollierten Zelltod (Apoptose) ab und werden durch die nächste Zellegeneration ersetzt.

Im Falle von Fehlern in den Kontrollmechanismen der Proliferation der Stammzellen und der Apoptose der alten Epithelzellen, entstehen zunächst gutartige Polypen, welche Vorstufen von Darmkrebs sein können. Die Einführung der Koloskopie hat es ermöglicht, die Entwicklung des KRK über mehrere Jahre aus diesen ursprünglich gutartigen Läsionen zu beobachten, was zur Entstehung des Begriffs „Adenom-Karzinom-Sequenz“ führte [14].

Die molekulare Basis für diese Veränderungen wurde erst durch das von Bert Vogelstein entwickelte Modell weitestgehend geklärt. Er machte die Akkumulation von genetischen Mutationen in einer bestimmten Reihenfolge für den Erwerb von malignen Eigenschaften der Zellen verantwortlich [15]. Am häufigsten erfolgt nach Vogelstein zuerst eine Mutation im APC (*adenomatous polyposis coli*) – Tumorsuppressorgen, welche zur Inaktivierung seiner *gatekeeper*-Funktion führt. Die weiteren Schritte bis zum manifesten Karzinom umfassen Mutationen im Protoonkogen KRAS und im Tumorsuppressorgen p53.

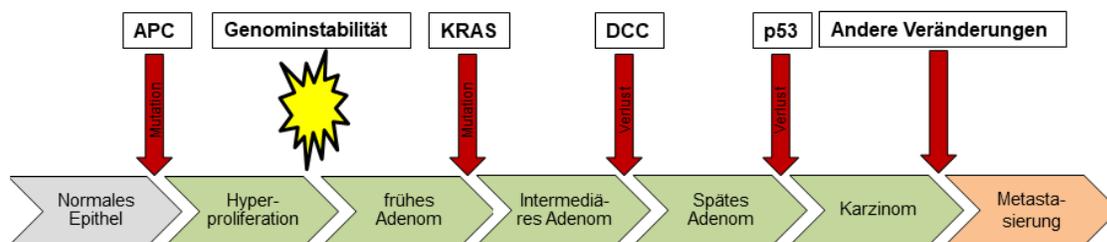


Abbildung 2: Vogelstein-Modell. APC = *adenomatous polyposis coli*, KRAS = *Kirsten rat sarcoma*, DCC = *deleted in colorectal cancer*

Das Jass-Modell stellt eine Ergänzung zum Vogelstein-Modell dar und beschreibt alternative Pathogenesewege [16, 17]. Demnach kann das kolorektale Karzinom als heterogene Erkrankung verstanden werden, dessen Entstehung u.a. auch auf genetischen Mustern wie der DNA Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der chromosomalen Instabilität (CIN) beruht. Das Vogelstein-Modell ist hier ein Karzinogeneseweg im Rahmen der chromosomalen Instabilität.

Mikrosatelliten, auch *short tandem repeats* genannt, sind kurze (1-6 Basenpaare) repetitive DNA-Sequenzen, die eine Anfälligkeit für Replikationsfehler aufweisen. Die Veränderung

dieser Mikrosatelliten Abschnitte ist auf Mutationen in Genen der DNA-Reparatursysteme (*mismatch repair, MMR*) zurückzuführen, sodass Replikationsfehler nicht korrigiert werden. Meistens sind Komponenten des MMR Systems wie die MLH1- (*mutL homolog 1*) und MSH2- (*mutS homolog 2*) Gene durch Mutationen inaktiviert [18]. Dieser Mechanismus liegt der Entstehung von HNPCC sowie von bis zu 15% der sporadisch auftretenden KRK zugrunde [19].

Die chromosomale Instabilität ist das Ergebnis von Mutationen in den Genen, die DNA-Reparaturproteine kodieren. Nachfolgende Mutationen können also nicht effektiv korrigiert werden, es kommt zu Chromosomenstrangbrüchen. Charakteristisch für Tumore mit CIN ist der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity, LOH*) [20]. Der Begriff beschreibt das Ausschalten des zweiten Allels von Tumorsuppressorgenen, dessen anderes Allel bereits durch eine Keimbahnmutation inaktiviert worden ist. Die typische Abfolge dieser Ereignisse beginnt mit einer Mutation des APC Gens auf Chromosom 5 [21]. Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Protoonkogenen wie KRAS und PIK3CA zu Onkogenen und zum Ausfall weiterer Tumorsuppressorgene wie p53 und DCC (*deleted in colon cancer*). Die CIN ist an der Entstehung von etwa 80% der KRK beteiligt, auch in der Genese der FAP ist sie ein fester Bestandteil [22].

Zunehmend wird auch die Rolle von epigenetischen Einflüssen diskutiert. Zum Beispiel liegt in etwa 30% der KRK der CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) vor, der durch Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promoterbereichen von Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet ist. Dadurch wird die Transkription dieser Gene inhibiert, was wiederum den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zur Folge hat [22].

Wichtig zu bedenken ist, dass die oben beschriebenen Mechanismen keine einzeln auftretenden Phänomene sind. Sie sind vielmehr als miteinander kommunizierende und sich gegenseitig verstärkende Schritte in der Tumorgenese zu betrachten.

1.3 Therapie

1.3.1 Aktuelle Therapieoptionen des kolorektalen Karzinoms (KRK)

Die Therapieindikation wird meistens bei der Erstdiagnose eines KRK gestellt. Hierbei wird zwischen einem potentiell kurativen und einem palliativen Ansatz unterschieden. Das genaue Vorgehen ergibt sich meistens aus dem erreichten Krankheitsstudium. Dieses wird nach der Union internationale contre le cancer (UICC) Klassifikation als Zusammenfassung der T- (Tumorgröße), N- (Lymphknotenmetastasen) und M- (Fernmetastasen) angegeben. Eine Auflistung der UICC Stadien findet sich in Tabelle 1.

UICC	Tumorein- dringtiefe	Lymphknoten- status	Fernmetasta- sen	Therapie
Stadium 0	Tis	N0	M0	Operation
Stadium I	T1-2	N0	M0	Operation
Stadium II A	T3	N0	M0	Operation
Stadium II B	T4	N0	M0	Operation
Stadium IIIA	T1-2	N1	M0	Operation + Adjuvante
Stadium IIIB	T3-4	N1-2	M0	Chemotherapie
Stadium IIIC	alle T	N3	M0	
Stadium IV	alle T	alle N	M1	Systemtherapie

Tabelle 1: Stadieneinteilung der UICC

Ein kurativer Ansatz ist für den Fall eines lokalen Kolonkarzinoms (UICC Stadien I-III) vorgesehen. Es ist dadurch gekennzeichnet, dass keine Fernmetastasen vorhanden sind und sich der Patient in gutem Allgemeinzustand befindet [23]. In diesen Stadien wird eine En-bloc-

Resektion des betroffenen Darmabschnitts inklusive der versorgenden Blut- und Lymphgefäße vorgenommen. Die weitere Behandlung erfolgt nach histologischer Bestimmung nach TNM-Klassifikation und Einteilung nach UICC Stadium. Ist der Tumor lokal fortgeschritten (T4) und/oder die lokalen Lymphgefäße befallen (N+) sind, ist eine adjuvante Therapie meist als Kombination aus dem Pyrimidinanalogon 5-Fluoruracil (5-FU) mit Folinsäure (FA) und Oxaliplatin (Ox) indiziert. Eine 6-monatige adjuvante Chemotherapie mit dem Platinderivat Oxaliplatin + 5-FU + Folinsäure (FOLFOX) erhöht die 3-Jahresüberlebensrate im Stadium UICC III um 7% - 9% [24].

Beim metastasierten KRK (mKRK) ist gemäß der aktuell gültigen S3 Leitlinie sowohl eine palliative als auch unter Umständen eine kurative Behandlung möglich. Die Planung und die Zielsetzung sollen im interdisziplinären Tumorboard erfolgen. Primäre Ziele der Diskussion im Tumorboard sind die Steigerung der Lebensqualität, das Vermeiden von Organkomplikationen, die Symptomlinderung, vor allem aber die Lebensverlängerung. Endoskopische Stents oder die Anlage von Umgehungsanastomosen haben sich als wirksame palliative Maßnahmen beim mKRK mit Symptomen bei der Stuhlpassage bewährt [25].

Die Frage der bestmöglichen Therapieauswahl und -sequenz in diesem Kontext ist Thema von erstrangiger Bedeutung für die klinische Forschung. Anders als in der adjuvanten Situation ist das Ergebnis der molekularpathologischen Untersuchung entscheidend für die Auswahl der effektivsten Erstlinienstrategie. Dabei ist es essentiell vor Therapiebeginn den Mutationstatus bzgl. der KRAS und NRAS Gene (jeweils Exon 2 (Codon 12 und 13), Exon 3 (Codon 59 und 61) und Exon 4 (Codon 117 und 146)) zusammengefasst als „RAS Status“ zu kennen. Daneben muss bekannt sein ob das BRAF Gen bzgl. V600E (Exon 15, Codon 600) mutiert ist wie auch ob ein instabiler Mikrosattelitenstatus (MSIh) vorliegt [26]. Ist weder BRAF noch die RAS Gene mutiert wird von einem Doppelwildtyp (DWT) gesprochen. Diese mKRK Patienten haben mit die beste Prognose.

Für die systemische Erstlinien-Chemotherapie im Stadium UICC IV stehen vier hochwirksame Substanzen zur Verfügung, die im Rahmen von etablierten Protokollen untereinander kombiniert werden –5-FU und seine oral verfügbare Vorstufe Capecitabin, Oxaliplatin und

der Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan. Der Vorteil einer Kombinationstherapie gegenüber einer Monotherapie ergibt sich daraus, dass auf diese Weise mehrere Angriffspunkte mit niedriger dosierten Zytostatika erfasst werden können. Damit ergibt sich eine höhere Wirksamkeit und damit ein längeres Gesamtüberleben [27].

Zu den häufig angewendeten Protokollen zählen FOLFOX (5-FU/Folinsäure + Oxaliplatin), FOLFIRI (5-FU/Folinsäure + Irinotecan), CAPOX (Capecitabin + Oxaliplatin) und CAPIRI (Capecitabin + Irinotecan). Seltener kommt IrOx (Irinotecan + Oxaliplatin) zum Einsatz. Für junge Patienten und Patienten in besonders gutem Allgemeinzustand und bei hohem Remissionsdruck kann der Einsatz der nebenwirkungsreicheren dreifach-Kombination FOLFOXIRI (5-FU/Folinsäure + Oxaliplatin + Irinotecan) diskutiert werden [28].

Als Erstes wurde 5-FU für die chemotherapeutische Behandlung des mKRRK zugelassen, nachdem im Vergleich zu rein supportiven Maßnahmen eine Verdoppelung des medianen Überlebens von etwa 6 Monaten ohne Therapie auf etwa 12 Monate unter 5-FU Monotherapie gezeigt werden konnte [29]. Mehrere Jahre später wurde der Effekt einer Modulation mit Folinsäure untersucht und es konnte eine Erhöhung des Gesamtansprechens um 20% (30,3% vs. 12,1%, $p < 0,01$) im Vergleich zur Monotherapie erzielt werden [30]. Weitere klinischen Studien haben die Ergänzung dieser chemotherapeutischen Basis mit den neuentwickelten Substanzen Irinotecan und Oxaliplatin überprüft. Ohne die Lebensqualität wesentlich zu vermindern, konnten durch den Zusatz von Oxaliplatin ein um 2,8 Monate längeres progressionsfreies Intervall (9,0 vs. 6,2 Monate, $p = 0,0003$) und ein um 28,4% besseres Therapieansprechen (50,7% vs. 22,3%, $p = 0,0001$) erreicht werden [31]. Ähnlich gute Wirksamkeit konnte durch die Kombination von Oxaliplatin und Capecitabin erlangt werden [32]. Der Vorteil einer Irinotecan enthaltenden Therapie gegenüber 5-FU/ Folinsäure allein konnte ebenfalls klinisch belegt werden. Das Therapieansprechen war um 17,7% höher (40,8% vs. 23,1%, $p < 0,001$) und sowohl die Zeit bis zur Progression als auch das mediane Gesamtüberleben ließen sich ebenfalls nach Irinotecan enthaltender Therapie steigern (PFS 6,7 vs. 4,4 Monate, $p < 0,001$, OS 17,4 vs. 14,1 Monate $p = 0,03$) [33].

Während der Therapie muss das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen regelmäßig, vor jedem Zyklus der medikamentösen Therapie überwacht werden. In Abhängigkeit der

aufgetretenen Nebenwirkungen kann es im Rahmen der Therapie immer wieder zu Dosisanpassungen kommen. Daneben sollen klinische Anamnese, körperliche Untersuchung und Laborkontrollen erfolgen. Das Ansprechen auf die Therapie wird je nach Ermessen des behandelnden Onkologen alle 2 bis 3 Monate durch bildgebende Verfahren (meist CT Thorax und Abdomen mit Kontrastmittel) evaluiert.

1.3.2 Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern

Die Einführung von monoklonalen Antikörpern (mAKs) stellt eine zielgerichtete Erweiterung der systemischen Chemotherapie dar. Indem sie spezifisch Zellen angreifen, die das Antikörper-Epitop überexprimieren, bleiben körpereigene Strukturen weitestgehend verschont.

Proliferationshemmung durch EGFR-Antikörpertherapie

Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) sind gegen eine im mKRR überexprimierte transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase, den EGFR (*epidermal growth factor receptor*), gerichtete Antikörper. Die Antikörper binden kompetitiv und hochaffin an den Rezeptor und verdrängen seine Liganden. Die Aktivität der nachfolgenden Signaltransduktions-Kaskaden (s. Kap. 1.4), die Prozesse wie Proliferation und Invasion sowie Metastasierung und Apoptosehemmung unterstützen, wird dadurch reduziert. Die Erweiterung von Standardprotokollen wie FOLFOX und FOLFIRI durch Cetuximab resultierte in höheren Gesamtansprechraten in mKRR-Patienten [46% vs. 36% ($p=0,064$) bzw. 57,3% vs. 39,7% ($p<0,001$)] [34, 35]. Eine aktivierende KRAS- oder NRAS-Mutation (RAS Mutationsstatus) in den Exonen 2,3 oder 4 gilt als Kontraindikation für die Gabe von Cetuximab oder Panitumumab, da sie nachweislich nicht nur unwirksam sind, sondern in Kombination mit Oxaliplatin auch zu einem kürzeren Überleben im Vergleich zur reinen Chemotherapie mit FOLFOX geführt haben [36, 37].

Angiogenesehemmung durch VEGF-Antikörpertherapie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Patientenproben untersucht, die aus einem mit Bevacizumab (Avastin®) behandelten Patientenkollektiv stammen. Dieser Antikörper wirkt

inhibitorisch auf den VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) und unterbindet das Tumorwachstum durch Hemmung seiner Angiogenese [38]. Durch die Zugabe von Bevacizumab zu FOLFOX konnte ein längeres progressionsfreies Intervall (9,4 vs. 8,0 Monate, $p=0,0023$) erreicht werden als durch FOLFOX alleine [39]. Die Kombination mit Irinotecan und 5-FU/FA in dem heutzutage nicht mehr gebräuchlichen IFL Regime führte darüber hinaus noch zu besserem Gesamtansprechen (44,8% vs. 34,8%, $p=0,004$) und längerem Überleben (20,3 vs. 15,6 Monate, $p<0,001$) [40]. Keine Zulassungseinschränkungen ergeben sich durch den RAS- oder BRAF-Mutationsstatus [41].

1.3.3 Die Bedeutung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern

Mithilfe von prognostischen Markern lässt sich der Erkrankungsverlauf eines Patienten abschätzen. Zu den aussagekräftigsten zählen eine R0- Resektion, d.h. eine vollständige Resektion des Tumors, und das Krankheitsstadium nach UICC. Weiterhin sind auch genetische Mutationen, z.B. im p53- oder im BRAF- Gen, mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [42].

Prädiktive Faktoren geben Auskunft über die Verträglichkeit und die Wirksamkeit einer Therapie noch bevor sie verabreicht wurde. Durch ihre Bestimmung kann das optimale Konzept für jeden Patienten noch im Rahmen der Erstlinienbehandlung gefunden werden. Durch die Anwendung von Biomarkern kann durch entsprechende Auswahl der Therapie also die Gesamtüberlebenszeit maximiert werden zum Medikamentenkosten eingespart werden. Die Schlüsselrolle von prädiktiven Biomarkern soll im Folgenden am Beispiel des RAS- Mutationsstatus verdeutlicht werden.

Der erweiterte RAS- Mutationsstatus wurde als erster prädiktiver Biomarker in der Behandlung des mKRK identifiziert. Initial konnte gezeigt werden, dass eine Mutation auf Exon 2 des KRAS-Gens den Tumor zur kontinuierlichen Aktivierung des RAS – RAF – MAPK – Signalwegs befähigt, welcher dem EGF – Rezeptor nachgeschaltet ist. Dies führt zur Umgehung der Blockade durch EGFR-Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab. Die retrospektiv gewonnenen Ergebnisse zweier großer Phase-3 Studien (CRYSTAL und PRIME), die

die Abhängigkeit der Effektivität einer EGFR-gerichteten Antikörpertherapie in Kombination mit einer Polychemotherapie von der RAS Mutation untersucht haben, führten zu der Zulassungseinschränkung von Cetuximab und Panitumumab.

Die CRYSTAL Studie verglich die Überlebenszeiten von Patienten mit mKRK, die in der Erstlinie entweder FOLFIRI und Cetuximab erhielten, oder nur FOLFIRI. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cetuximabgabe nur in der Patientengruppe ohne Mutation im RAS-Gen (RAS Wildtyp) zu einer Verbesserung des Therapieansprechens führte ($p=0,03$) [43]. Das Patientenkollektiv, welches mit dem Antikörper behandelt wurde, wies auch ein längeres Gesamtüberleben auf (23,5 vs. 20,0 Monate, $p=0,0093$) [34].

In der PRIME Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die anti-EGFR-Therapie von Nachteil für Patienten mit RAS-Mutation sein kann. In der Subgruppe der RAS-Mutierten kam es durch die Zugabe von Panitumumab zu FOLFOX zu einem kürzeren medianen Überleben (15,5 Monate vs. 19,3 Monate, $p=0,068$) [44].

Der Mutationsstatus von KRAS und NRAS hat sich zwar als ein guter prädiktiver Faktor in der klinischen Routine bewährt, jedoch zeigen nur etwa 60% der RAS – Wildtyp Patienten ein Tumoransprechen nach RECIST auf eine anti-EGFR-Therapie [45]. Weitere prädiktive Biomarker werden also benötigt, um die Therapie weiter zu präzisieren und das Therapieansprechen zu erhöhen. Außerdem fehlt es immer noch an jeglichen prädiktiven Markern, welche die Behandlung von mKRK außerhalb eines Cetuximab-haltigen Protokolls optimieren können. Potentielle Kandidaten werden unter den Liganden von EGFR und den Komponenten der nachgeschalteten Signalkaskaden gesucht.

1.4 Die Rolle von EGFR und seinen Liganden

Die ErbB-Familie umfasst vier membranständige Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität – EGFR (ErbB1), Her2/neu (ErbB2), Her 3 (ErbB3) und Her 4 (ErbB4). Die insuffiziente Expression von diesen Rezeptoren wurde mit einer Anzahl an neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. multiple Sklerose und Alzheimer in Verbindung gebracht [46]. Die Überexpression von EGFR oder von seinen Liganden wurde andererseits bei mehreren soliden Tumoren beschrieben, z.B. bei dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom [47], den Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals [48], und dem Magenkarzinom [49]. Eine erhöhte EGFR-Expression konnte auch bei etwa 75% der KRK nachgewiesen werden, was diesen Rezeptor zu einem wichtigen therapeutischen Angriffspunkt macht [50].

Der EGF-Rezeptor wird durch die Bindung von seinen Liganden (u.a. EGF – *epidermal growth factor*, TGF α – *transforming growth factor alpha*, Epiregulin und Amphiregulin) an seine extrazellulären Domänen aktiviert. Dadurch wird die Homodimerisierung der EGFR oder Heterodimerisierung des EGFR mit einem anderen Rezeptor aus der ErbB-Familie, meist Her2/neu, induziert. Durch diese Kreuzvernetzung wird die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität in Gang gesetzt und es kommt zur Autophosphorylierung von Tyrosinsequenzen am C-Terminus. An diese phosphorylierten Aminosäurreste können weitere Signalmoleküle binden, wodurch weitere Signaltransduktions-Kaskaden stimuliert werden. Im Grunde werden fünf wichtige Kaskaden aktiviert:

- der RAS / RAF / MAPK (*mitogen activated protein kinase*) - Signalweg,
- der PI3K (*phosphatidyl-inositol-3-kinase*) / AKT (*proteinkinase B*) / mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) – Signalweg
- der PLC (*phospholipase C*) - γ – Signalweg
- der JNK (*Janus kinase*) / STAT (*signal transducer and activator of transcription*) – Signalweg, sowie der
- c-Src (*cellular sarcoma inducing*) / FAK (*focal adhesion kinase*) – Signalweg.

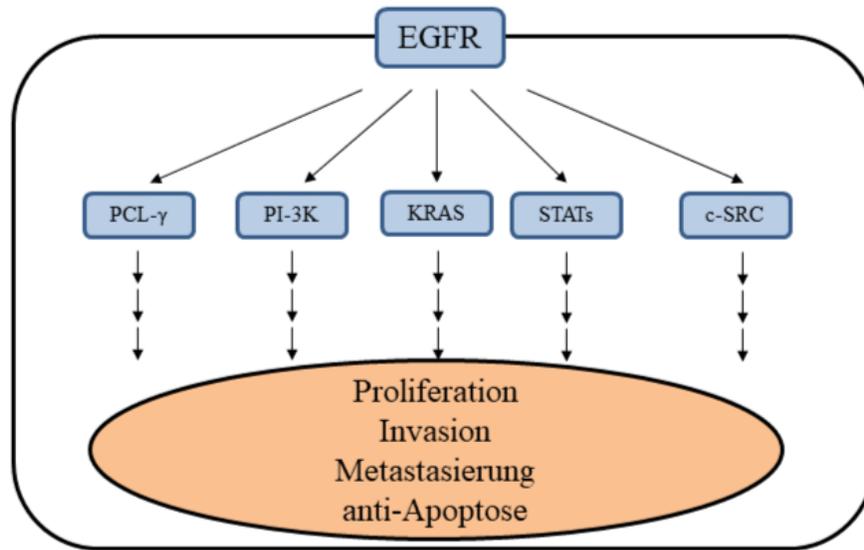


Abbildung 3: EGFR-Signalwege

Durch die Signalübertragung kommt es zur Änderung im Expressionsmuster von vielen Genen, die für tumorstimulierende Prozesse von Bedeutung sind. So werden Mechanismen verstärkt, die für Proliferation, Invasion, Metastasierung und anti-Apoptose zuständig sind [51, 52].

Amphiregulin (AREG)

Amphiregulin wird unter physiologischen Bedingungen in multiplen Geweben wie Plazenta, Pankreas, Ovar, Brustdrüse und Dickdarmmukosa exprimiert. Es gibt Hinweise, dass er an mehreren physiologischen Prozessen beteiligt ist, wie z.B. an der Brustdrüsenentwicklung während der Pubertät, oder an der Reifung von Oozyten [53]. Darüber hinaus konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass AREG protektiv auf die Magenschleimhaut wirkt, während die Expression anderer EGFR-Liganden (wie TGF α) diesbezüglich keine Rolle spielt [54]. Eine erhöhte AREG-Konzentration im Serum nach akutem Leberschaden und während der nachfolgenden Regeneration gibt Hinweise auf eine hepatoprotektive Funktion [55, 56].

Weiterhin trägt AREG zur Aufrechterhaltung der Hauthomöostase durch Stimulation der Keratinozytenproliferation und Wundheilung bei [57, 58].

Andererseits wird von einer unangemessen hohen AREG-Expression im Rahmen von immunologischen Prozessen berichtet. Es wird vermutet, dass Asthma-Mediatoren wie IgE, IL-3 und Histamin seine Expression stimulieren können [59]. In rheumatoider Arthritis wird eine AREG-Überexpression mit der Synthese von proinflammatorischen Substanzen in Verbindung gebracht [60].

Die Rolle von AREG in malignen Prozessen ist vielseitig untersucht, jedoch noch nicht weitestgehend geklärt. Eine erhöhte AREG-Expression wurde schon in mehreren Tumorarten gemessen – unter Anderem im KRK, Mamma-, Lungen-, Ovar-, Magen-, und Prostatakarzinom [59]. Es gibt Hinweise darauf, dass AREG die Karzinogenese unterstützt, indem er das Wachstum und die Antiapoptose fördert [61]. Dies ist besonders in Tumoren erforscht, dessen Entwicklung auf entzündlichen Prozessen zurückgeführt werden kann, z.B. im KRK [62]. Im hepatozellulären Karzinom (HCC) fördert AREG auch die Synthese von anderen Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF 19 (*fibroblast growth factor 19*) [63]. Darüber hinaus moduliert AREG das Ansprechen auf mehrere Chemotherapeutika. Es konnte gezeigt werden, dass die hohe AREG-Expression eine Resistenz gegenüber Doxorubicin im HCC und cis-Platin im Mammakarzinom begünstigt [64, 65].

Epiregulin (EREG)

Die Epiregulin Expression ist insgesamt niedriger im gesunden Gewebe im Vergleich zu AREG. Dennoch wurde seine Überexpression in mehreren Tumoren epithelialen Ursprungs nachgewiesen – im Urothel-, Mamma- und Lungenkarzinom. Interessant ist auch der Zusammenhang zwischen hoher Epiregulin Expression und dem erhöhten Metastasierungspotential [66, 67]. Die Bedeutung von Epiregulin für die Invasivität wurde in Lungenkarzinom-Zelllinien belegt. Durch Ausschalten des kodierenden Gens konnte das Wachstum lokal unterbun-

den werden [68]. Die EREG-Überexpression wird außerdem in Verbindung mit aggressiven und schneller fortschreitenden Tumoren gebracht, z.B. bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich und bei HCC [69, 70].

Epiregulin ist auch durch AREG-ähnliche Funktionen gekennzeichnet. So übt es auch einen stimulierenden Einfluss auf die Keratinozyten aus, seine Wirkung auf regenerative Prozesse wird jedoch als unbedeutend eingeschätzt [71]. Darüber hinaus wird die Rolle von EREG in der Angiogenese diskutiert, besonders bei Entzündungen. Es gibt Hinweise, dass durch EREG vermittelte EGFR – Wirkung an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sein kann [72].

Korrelation der AREG und EREG-Expression mit Therapieansprechen im KRK

Zum ersten Mal hat die Gruppe um Khambata – Ford von einer positiven Korrelation zwischen hoher AREG und EREG Expression im KRK und längere progressionsfreie Zeit (EREG – 103,5 vs. 57 Tage, $p=0,0002$, AREG – 115,5 vs. 57 Tage, $p<0,0001$) unter Cetuximab-Therapie in der Zweit- und Drittlinienbehandlung berichtet [73]. Dies bestätigte sich später in Untersuchungen von anderen mit anti-EGFR-Antikörpern behandelten Patientenkollektiven [74, 75]. Die Ergebnisse wurden der kompetitiven Bindung durch die Antikörper und dem Verdrängen der natürlichen Liganden zugeschrieben. In späteren retrospektiven Studien an Patienten, die nur mit Polychemotherapie behandelt wurden, zeigte sich jedoch erneut eine prädiktive Wertigkeit für die beiden Liganden (PFS EREG – 9,4 vs. 6,8 Monate, $p=0,002$, AREG – 10,0 vs. 8,0 Monate, $p=0,03$) [76]. Das liefert Hinweise, dass die mRNA-Expressionsmuster von AREG und EREG therapieunabhängige Biomarker sein könnten, von dessen Messung ein größeres Patientenkollektiv profitieren könnte.

Der Stellenwert von AREG und EREG als prognostische und prädiktive Faktoren für Patienten, die mit Bevacizumab behandelt werden, ist bisher noch nicht untersucht worden.

2 Zielsetzung

Biomarker spielen in der Onkologie eine große Rolle. Insbesondere in der Entwicklung einer immer mehr individualisierten Präzisionstherapie sind Biomarker unersetzlich. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom (mKRK) sind heutzutage RAS Mutationen, die BRAF V600E Mutation sowie der MSIh Status als therapeutisch wichtige Biomarker etabliert. Für die Therapie mit den EGFR-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab haben sich die RAS Mutationen als negative prädiktive Biomarker herausgestellt. Daneben werden die beiden EGFR Liganden Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) als prädiktive Marker zunehmend diskutiert. Für die Therapie mit Bevacizumab, einem VEGF Antikörper welcher auf die Neo-Angiogenese von Tumoren wirkt, gibt es bisher noch keine etablierten Biomarker.

Ziel dieser Arbeit ist es den prognostischen und prädiktiven Wert der Expression der EGFR Liganden AREG und EREG auf die Wirksamkeit einer Chemotherapie oder der Kombination aus Chemotherapie plus Bevacizumab zu bestimmen. Hierfür wurden Daten und Biomaterial der MAINTENANCE (AIO-KRK-0207) Phase-III Studie verwendet.

Konkret wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Hat die Lokalisation des Primärtumors, der RAS-Mutationsstatus oder der BRAF V600E Mutationsstatus Einfluss auf die AREG und/oder EREG Expressionen?
2. Welchen Einfluss haben die Expressionen von AREG und/oder EREG auf das Therapieansprechen (ORR), das progressionsfreie (PFS) oder das Gesamtüberleben (OS)?
3. Haben die Expressionslevel von AREG und/oder EREG Einfluss auf die Effektivität der einzelnen Behandlungsarme der Studie (watch & wait vs. Chemotherapie vs. Chemotherapie plus Bevacizumab)?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 AIO KRK 0207 Studie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Tumorproben aus der AIO KRK-0207 (NCT00973609) Studie untersucht. Dabei handelt es sich um eine randomisierte Phase-III-Studie, die die Wirksamkeit von drei Erhaltungstherapien in der Erstlinienbehandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) vergleicht. Im Anschluss einer 24-wöchigen Induktionstherapie mit 5-Fluoruracil (oder der Vorstufe Capecitabin), Oxaliplatin und dem Antikörper Bevacizumab wurden die Patienten randomisiert und einem der drei Behandlungsarmen zugewiesen.

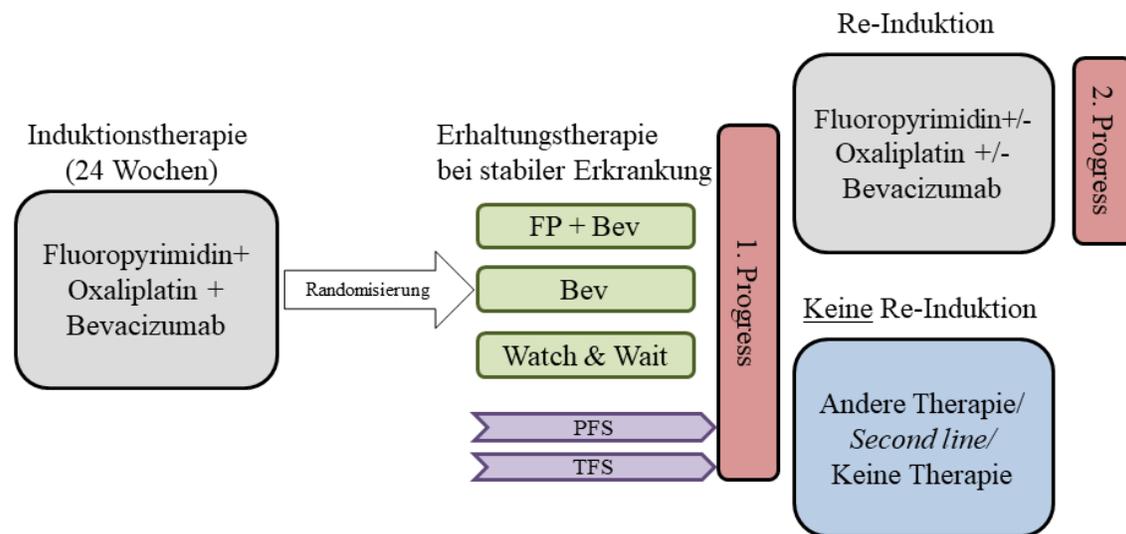


Abbildung 4: AIO KRK-0207 Studiendesign

Im Zeitraum zwischen September 2009 und Februar 2013 wurden insgesamt 837 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon wurden 472 1:1:1 randomisiert. Das genaue Protokoll für die Induktionstherapie lag im Ermessen des behandelnden Arztes und das Ansprechen

wurde in Woche 12 und 23 nach RECIST 1.0 ausgewertet. Randomisierte Patienten im Behandlungsarm A (n=158) erhielten 5-FU oder Capecitabin alle zwei bzw. drei Wochen (nach Standardprotokoll) zusätzlich zu Bevacizumab - 7,5 mg/kg dreiwöchentlich oder 5 mg/kg zweiwöchentlich. Die Patienten im Behandlungsarm B (n=156) erhielten Bevacizumab Monotherapie in den oben genannten Dosen, die restlichen 158 Patienten (Behandlungsarm C) bekamen keine Erhaltungstherapie. Das Konzept wurde bis zur Progression, bis zum Auftreten von inakzeptablen Nebenwirkungen oder bis zum Erreichen von Operabilität fortgeführt.

Primäres Ziel der Studie war die Untersuchung der Nichtunterlegenheit einer Erhaltungstherapie mit Bevacizumab allein oder einer Behandlungspause gegenüber der Kombinationstherapie mit 5- Fluoruracil und Bevacizumab. Als sekundäre Endpunkte wurden u.a. das progressionsfreie Überleben (*progression free survival*, PFS) und das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) definiert.

Von allen Patienten lag die schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie vor. Das aktuelle Forschungsvorhaben wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Projektnummer: 738-16).

3.1.2 Materialgewinnung und Verarbeitung

Für die Analyse der mRNA-Expression von Amphiregulin und Epiregulin konnten Tumorproben von 371 Patienten gesammelt werden. Die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorböcke (*formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) stammten aus dem Primärtumor.



Abbildung 5: drei ungefärbte Tumorpräparate, das Tumorareal wurde eingezeichnet.

Aus den Tumorblöcken wurden mittels Mikrotom jeweils 4 Serienschritte (Schnittdicke 3 bis 5 μm) angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Einer davon wurde als Referenzschnitt verwendet und nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung einem Facharzt für Pathologie zur Identifikation der Tumorbereiche vorgelegt. Nach Identifikation und Einzeichnen des Tumoreals unter mikroskopischer Sicht (siehe Abbildung 5) wurde der Referenzschnitt benutzt, um auf den unbearbeiteten Schnitten gesundes Gewebe vom Tumor abzugrenzen. Anschließend wurden die Tumoranteile mit einem Skalpell per Hand abgetragen und in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Um die Degradation der instabilen RNA zu verhindern, sollten die Schnitte nicht älter als drei Monate bei der weiteren Verarbeitung sein.

3.2 Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Gewebe erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll. Der erste Arbeitsschritt bestand in der Zugabe der Entparaffinierungslösung (Qiagen, Hilden) zu den Gewebefragmenten. Nach Schütteln und kurzzeitigem Vortexen wurden die Proben zentrifugiert und für drei Minuten bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde PKD Puffer zu den Proben gegeben und eine Minute lang bei 11.000 x g zentrifugiert. Der PKD Puffer ist essentiell für die Funktion der Proteinase K, welche als nächstes zu der unteren, durchsichtigen Phase pipettiert wurde. Daraufhin folgten zwei Inkubationsschritte im Thermomixer bei 56°C und 80°C für jeweils 15 Minuten. Anschließend wurde die untere, durchsichtige Phase von der blauen, paraffinhaltigen Phase getrennt werden und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach einer dreiminütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten, um nicht lysierbare Zellbestandteile und DNA Fragmente abzutrennen. Danach wurde der Überstand vorsichtig, ohne das Sediment zu resuspendieren, in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß übertragen. Die so vorbereiteten Proben

konnten für die nächsten Schritte der RNA-Isolation im QiaCube Gerät (Qiagen, Hilden) eingesetzt werden.

Dort wurden die Proben zunächst mit DNase behandelt, um eine Kontamination mit DNA zu verhindern. Darauf folgten Waschschrte mit RBC Puffer, Ethanol und RPE Puffer in Abwechslung mit kurzen Zentrifugationsschritten. Die Zugabe vom Guanidinthiocyanat enthaltendem RBC Puffer unterstützte die Bindung der RNA an die Silica-Membran der RNeasy MinElute Säule und die Denaturierung von Zellproteinen. Der RPE Puffer wurde hingegen erst gegen das Ende des Vorgangs eingesetzt und diente der Aufreinigung des Lysats von Salzen. Anschließend wurde die RNA in RNase freiem Wasser gelöst und von der Säule eluiert. Das total RNA-Eluat setzt sich aus Transfer-RNA (tRNA), ribosomaler RNA (rRNA), messenger RNA (mRNA) und weiteren zusammen. Der Anteil an mRNA ist dabei mit etwa 2% verhältnismäßig gering, aber für Methoden wie die quantitative Real-Time PCR ausreichend.

Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Reinheitsmessung und Konzentrationsbestimmung

Um standardisierte Bedingungen bei der späteren cDNA (complementary DNA) –Herstellung erreichen zu können, musste die Konzentration der isolierten RNA bekannt sein. Ihre Bestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) des RNA-Eluats mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophometers (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Nach Eichen des Geräts mit 1 µl RNase freiem Wasser wurden die Messungen mit jeweils 1µl der zuvor isolierten RNA durchgeführt. Die optische Dichte der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt. Optimal sollte das Verhältnis der beiden Messwerte (OD_{260} / OD_{280}) bei 2,0 liegen, ein Wert über 1,80 schließt jedoch Verunreinigungen mit Proteinen und aromatischen Substanzen aus.

Eine OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml RNA, dementsprechend lässt sich die Konzentration mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die DNA-Konzentration lässt sich mit der gleichen Formel berechnen. Dabei muss mit 50 $\mu\text{g/ml}$ multipliziert werden, da dies einer OD_{260} von 1 entspricht.

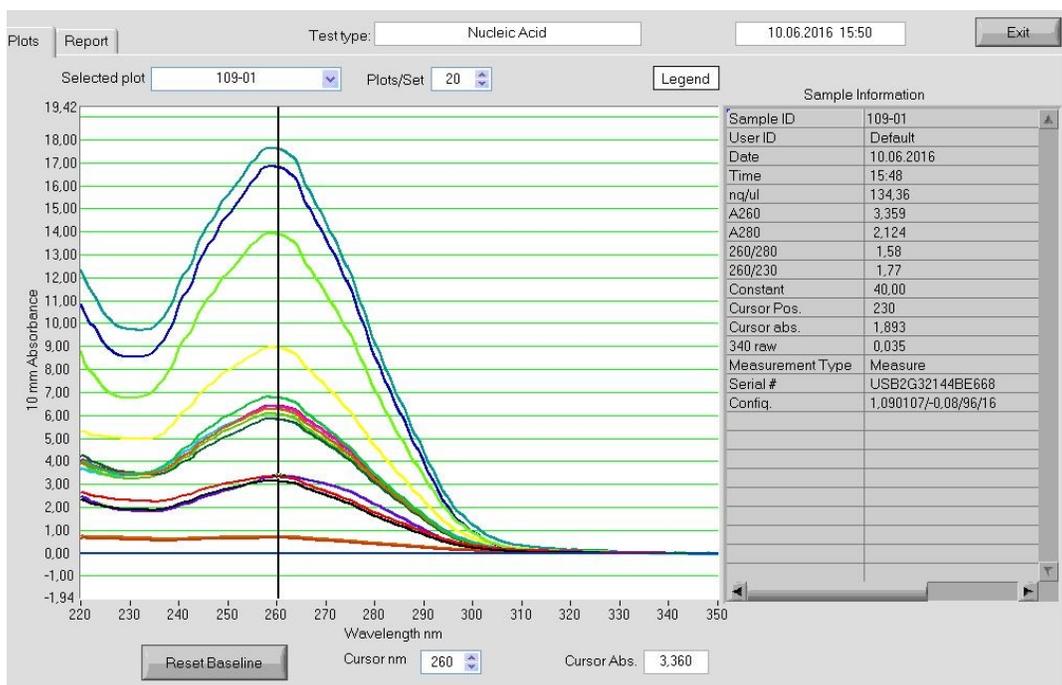


Abbildung 6: optische RNA-Konzentrationsmessung im NanoDrop

3.2.3 cDNA – Synthese

Zur reversen Transkription der RNA wurde das RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von *random hexamer* Primern benutzt. Um die Degradation der mRNA zu verhindern, wurden alle Reagenzien schonend aufgetaut, auf Eis gehalten und alle Schritte der reversen Transkription auf Eis pipettiert. Da RNasen ubiquitär

vorhanden und bei den verwendeten Reaktionstemperaturen aktiv sind, diente der rekombinante RNase Inhibitor (RiboLock) zum Schutz vor RNA-Abbau.

Um bei der späteren Durchführung der RT-qPCR standardisierte Bedingungen und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, wurde für die Reaktion bei allen Proben eine RNA-Menge von 1.000 ng eingesetzt. Falls die PCR keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, wurde die cDNA-Synthese (wenn noch genug Ausgangsmaterial vorhanden war) mit 2.000 ng RNA wiederholt. Der Standardansatz der reversen Transkription ist in Tab. 1 gezeigt.

Reagenz	Volumen
5x Reaction Buffer	8 μ l
RiboLock RNase Inhibitor	1 μ l
10 mM dNTP Mix	4 μ l
Primer (<i>random hexamers</i>)	2 μ l
RevertAid Reverse Transkriptase	2 μ l
RNA	
RNase freies H ₂ O	
Gesamtvolumen	40 μ l

Tabelle 2: Pipettierschema Mastermix reverse Transkription

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in den Thermocycler gegeben. Dort erfolgte zunächst das Erhitzen bei 65°C über 5 Minuten, was dem Lösen eventuell vorhandener Sekundärstrukturen diente. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 25°C zur Anlagerung der *random hexamer* Primer inkubiert, woran sich die eigentliche Transkription durch das Enzym Reverse Transkriptase (1h, 42°C) anschloss. Anschließend wurde der Ansatz zum Abbruch der Reaktion für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Die neusynthetisierte cDNA konnte kurzfristig bei 4°C, oder nach dem Abkühlen bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemeines Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die der exponentiellen Vervielfältigung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen dient. Sie findet Anwendung in einem breiten medizinischen Spektrum – bei Vaterschaftstests, Diagnosesicherung einer Vielzahl an genetischen und infektiösen Krankheiten und dem Erstellen des sog. genetischen Fingerabdrucks.

Als Ausgangssubstanz (*Template*) der Reaktion dient DNA in Form von cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-DNA. Benötigt werden außerdem zwei DNA- Oligonukleotide (*Primer*), die den zur Vervielfältigung bestimmten DNA-Abschnitt spezifisch abgrenzen und ein freies 3'-OH-Ende für den Ansatz der zur Verlängerung der DNA-Sequenz verwendeten thermostabilen Polymerase bieten. Die Reaktion durchläuft mehrere Zyklen, wobei die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Substrate für den nächsten dienen. So wird optimal eine annähernd exponentielle Vermehrung der spezifischen DNA-Sequenz erreicht. Ein solcher Zyklus umfasst drei Schritte:

- Denaturierung bei 94°C - Auftrennen der beiden Stränge der DNA-Template durch Auflösung der H²-Brückenbindungen
- Primerhybridisierung (annealing) bei primerspezifischen Temperaturen (55-60°C) - Anlagerung der Primerpaare an ihre komplementären DNA-Abschnitte
- Elongation (amplification) bei 72°C - Einfügen von Nukleotiden durch die Polymerase in 5'- 3' Richtung.

Die konventionelle PCR wird im Thermocycler durchgeführt und dient dem qualitativen Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz. Die PCR-Produkte werden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und nach ihrer Wanderungslänge beurteilt.

Aussagen über die Quantität der untersuchten Basenreihenfolge können hiermit nur bedingt getroffen werden. Dafür verwendet man die Methode der Real-Time quantitative PCR.

Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Für das Bearbeiten der Fragestellung in der vorliegenden Studie bietet sich die Methode der RT-qPCR an. Damit konnte die Expression der beiden Zielgene [*genes of interest* (GOI)] Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) erfasst werden und über Referenzgene quantifiziert werden.

Bei der qPCR werden dem Reaktionsansatz Fluoreszenzfarbstoffe beigelegt und nach jedem Zyklus die in Abhängigkeit der PCR-Produktmenge freigesetzte Fluoreszenz, von dem Gerät detektiert und gemessen. Der sog. Cp-Wert (*crossing point cycle*) wird ermittelt. Dieser stellt den Zyklus dar, bei dem der Fluoreszenz-Grenzwert überschritten wird. Je früher dieser Grenzwert überschritten wird, desto mehr mRNA war im qPCR- Ansatz vorhanden.

Die Funktion der UPL (*Universal probe library*) – Sonden, die dem Reaktionsgemisch zugefügt werden, lässt sich durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) erklären. Die Sonden sind Oligonukleotide, die so konstruiert sind, dass sie an das DNA-Template zwischen den Bindungsstellen der beiden Primer haften. An ihrem 5'-Ende sind sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) versehen, an ihrem 3'-Ende tragen sie einen nicht fluoreszierenden Farbstoff (sog. Quencher). Angeregt durch eine Lichtquelle, überträgt das FAM Teile seiner Energie an den Quencher. Solange sich die Farbstoffe noch nah aneinander befinden, wird durch diesen Prozess die FAM-Fluoreszenz "gelöscht". Wenn die Polymerase die Sonde erreicht, entfernt sie den Donor und den Akzeptor durch ihre Nukleaseaktivität immer weiter voneinander. Dabei wird die Energie detektiert, die zwischen den beiden Teilen der Sonde transferiert wird. Der Zeitpunkt, an dem eine relevante Menge an Fluoreszenz abgegeben wird, bestimmt den Cp-Wert.

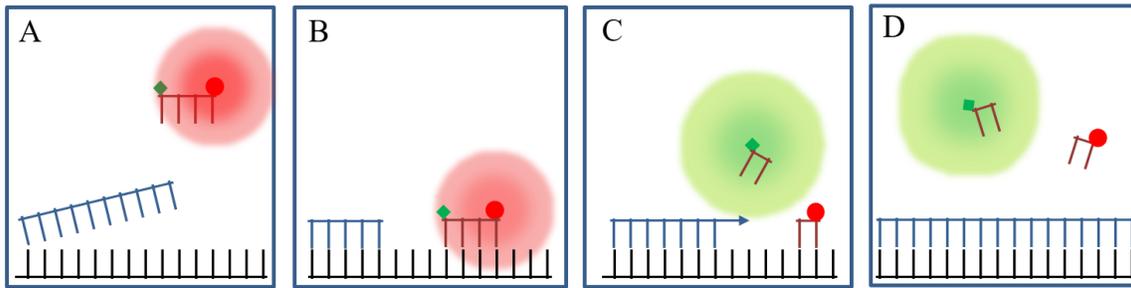


Abbildung 7: Real-time quantitative PCR mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher. A: Anlagerung der Primer an ihre komplementären DNA-Abschnitte. B: Bindung der Sonde, die Fluoreszenz des FAM (grün) wird durch den Quencher (rot) unterdrückt. C: Abspaltung des Sondenteils mit FAM. D: Abspaltung der Sonde, zunehmende Fluoreszenz des FAM je größer die Entfernung zum Quencher. Aufzeichnung des Signals.

Die PCR läuft theoretisch als exponentielle Funktion ab und folgt einem sigmoidalen Verlauf. Sie gliedert sich in exponentielle, lineare und Plateau-Phase. Am Anfang ist die DNA-Menge sehr gering und die Chance, dass die notwendigen Reagenzien aufeinandertreffen, entsprechend klein. Am Ende der Reaktion sind andererseits die Substrate schon aufgebraucht und die Bedingungen wieder suboptimal (Plateau). Die Phase dazwischen wird durch exponentielle Vervielfältigung der DNA-Abschnitte und entsprechend hohe Reaktionsgeschwindigkeit ausgezeichnet. Die detektierte Fluoreszenz ist in dieser Phase direkt proportional zur Template-Menge im Ansatz.

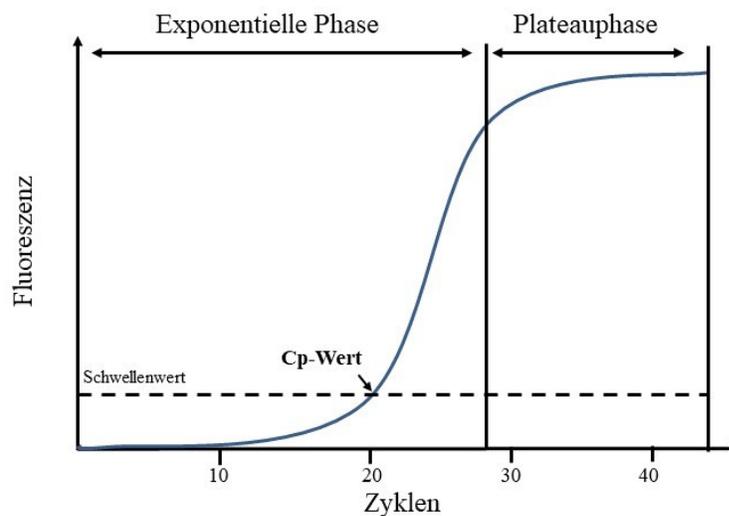


Abbildung 8: exponentielle PCR-Kurve

Die cDNA-Synthese verläuft auch unter standardisierten Bedingungen unterschiedlich effizient. Weiterhin spielt die Fixierung gerade bei FFPE- Material eine große Rolle. Unter der Einwirkung von Formalin bilden sich in der DNA Schiff'sche Basen, welche als Block für die Polymerase wirken. Die durch die qPCR erfassten Cp-Werte sind dementsprechend nur für jede einzelne Person gültig. Um die Expression von AREG und EREG in einem Patientenkollektiv zu vergleichen wird ein externer Standard gebraucht. Hierfür bieten sich die sog. *housekeeping* Gene, für welche angenommen wird, dass sie bei allen Menschen das gleiche Expressionsniveau aufweisen und deren Expression weitestgehend unbeeinflusst durch extrazelluläre Stimuli sind. GAPDH und YWHAZ erfüllen diese Bedingungen und wurden daher als interne Referenz mitgemessen.

Durchführung

Im Sinne der Reproduzierbarkeit und der Qualitätssicherung wurde ein Reaktionsansatz für jeweils 26 Patientenproben verwendet. So wurde bei den z.T. kleinen Pipettierolumina sichergestellt, dass für alle Proben im Ansatz die gleichen Bedingungen herrschen.

Als Positivkontrolle dienten aufgereinigte PCR-Produkte des Ziel-Gens mit einer bekannten Konzentration (50.000 Kopien/ μ l). Für die Negativkontrolle wurden 2 μ l - nukleasefreies Wasser statt cDNA zum Mastermix dazugegeben. Die Expressionsbestimmung mittels qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Der Pipettieransatz setzte sich aus 8 μ l Mastermix und 2 μ l cDNA zusammen. Nach dem Pipettieren wurde die 96-Lochplatte mit Folie zugeklebt und nach einem kurzen Zentrifugationsschritt in den LightCycler480 von Roche gegeben. Dort erfolgten 45 Messzyklen, ein Cp-Wert von oder über 38 wurde jedenfalls als negative Expression gewertet. Alle Reagenzien wurden auf Eis pipettiert, um einer vorzeitigen Reaktion vorzubeugen. Die UPL-Sonden wurden außerdem lichtgeschützt behandelt.

3.2.5 Statistische Analysen

Für die Durchführung der statistischen Analysen wurden die Programme SPSS PASW 23.0 (SPSS, Chicago, IL) und SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina) verwendet. Die Expressionsmessungen wurden in Triplikaten durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichungen wurden ermittelt. Um Patienten mit niedriger bzw. hoher AREG und EREG-Expression voneinander zu trennen, wurde der Medianwert der Population berechnet. Da die AREG und EREG Werte nicht normverteilt waren erfolgte zum Ausgleich eine Logarithmierung der Werte und parametrische Korrelationen durchführen zu können. Die experimentell ermittelten Daten und die klinisch-pathologischen Parameter der Patienten wurden mithilfe des zweiseitigen exakten Tests nach Fischer auf Korrelation überprüft. Der Zusammenhang zwischen den Expressionsdaten und dem Mutationsstatus der Patienten (RAS und BRAF Wildtyp, bzw. mutiert) wurde mittels des Spearman Rho Koeffizienten erfasst. Die Überlebenszeiten wurden mithilfe von Kaplan-Meier Kurven dargestellt, die Unterschiede wurden mit dem Log-rank-Test, sowie mit uni- und multivariater COX Regression berechnet. Die statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden von mir als Koautorin gemeinsam mit meinem Betreuer in Stintzing et al. 2018 in *Frontiers in Oncology* veröffentlicht [77]. Die Arbeit ist im Anhang dieser Doktorarbeit zu finden.

4.1 Ergebnisse der AIO KRK 0207 Studie

Die klinischen Ergebnisse der AIO KRK 0207 Studie wurden 2015 publiziert [78]. Von den insgesamt 837 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, wurden 472 in die drei Behandlungsarme randomisiert. Die Patientendaten wurden in Tabelle 2 bis 5 dargestellt.

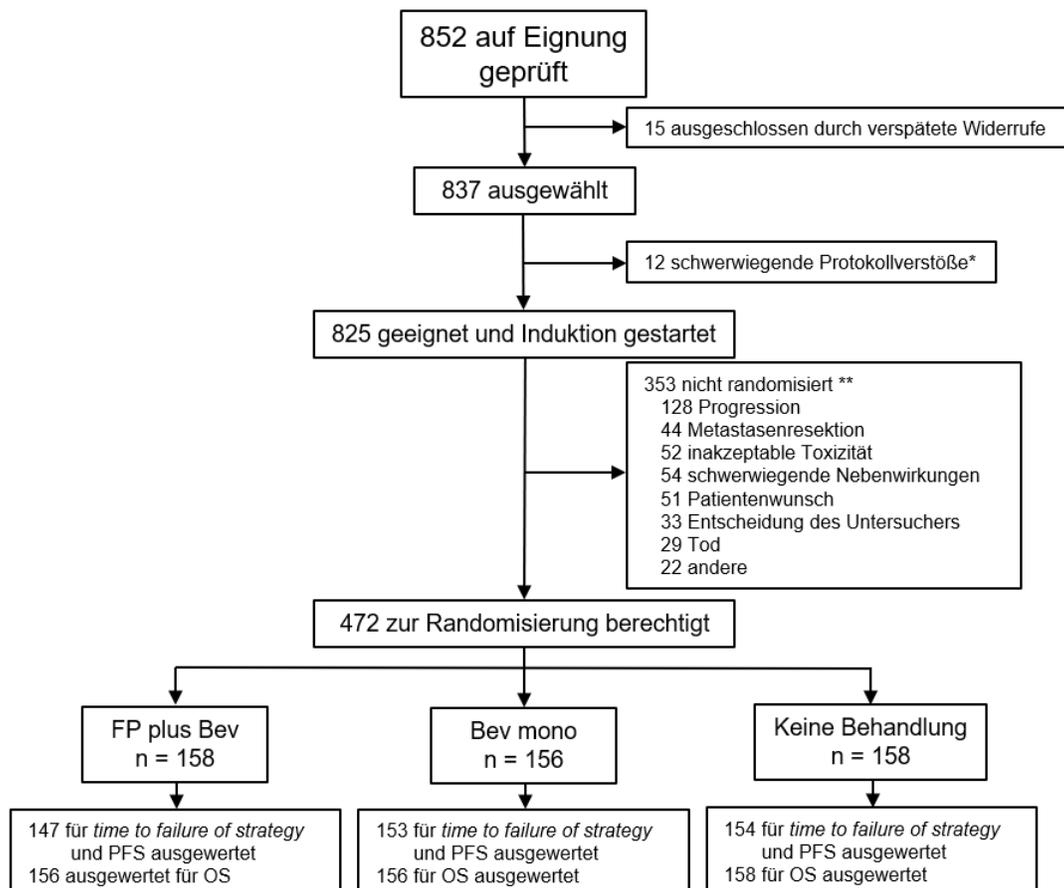


Abbildung 9: Consort-Flussdiagramm der AIO KRK 0207.

*Verletzung wesentlicher Auswahlkriterien: palliative Vorbehandlung; Abstand seit adjuvanter Chemotherapie zu kurz; keine auswertbare metastatische Läsion; unangemessene diagnostische Verfahren; große Verzögerung nach Induktionsende; hohe GOT >5xNorm oder Bilirubin >1,5x Norm; oder frühere andere Malignität.

**es konnten mehrere Gründe angegeben werden.

Legende: OS = Gesamtüberleben (overall survival); PFS = progressionsfreies Überleben (progression free survival); FP = Fluoropyrimidin, Bev = Bevacizumab. [78]

Im Median betrug die Nachbeobachtungszeit (*follow up*) 17,0 Monate (IQR = 9,5 – 25,4). Der primäre Endpunkt der Studie war definiert als die Zeit zwischen der Randomisierung und der zweiten Progression der Erkrankung nach Reinduktion. Die Patienten im Behandlungsarm A (Erhaltungstherapie mit 5-Fluoruracil oder Capecitabin plus Bevacizumab) erreichten den Endpunkt nach 6,9 Monaten (95% KI 6,1 – 8,5). Für die Patienten im Behandlungsarm B (Erhaltungstherapie mit Bevacizumab) betrug die Zeit bis zum zweiten Erkrankungsprogress 6,1 Monate (95% KI 5,3 – 7,4) und im Behandlungsarm C (keine Erhaltungstherapie) 6,4 Monate (95% KI 4,8 – 7,6) [78]. Eine Nichtunterlegenheit konnte für die Bevacizumab Monotherapie gegenüber der Standardtherapie mit 5-Fluoruracil plus Bevacizumab gezeigt werden (HR 1,08 [95% KI 0,85-1,37]).

Das Studienprotokoll sah eine Reinduktionstherapie nach dem ersten Erkrankungsprogress vor. Diese wurde jedoch nur bei 36% der Patienten durchgeführt. Aufgrund dessen erwies sich der primäre Endpunkt der Studie als wenig informativ [78].

Die aktiver behandelten Patientengruppen zeichneten sich durch ein längeres progressionsfreies Überleben (*progression free survival*) aus. Im Behandlungsarm A lag die Zeit bis zum Erkrankungsprogress im Median bei 11,7 Monaten (95% KI 10,8 – 13,2). Für die Patienten in den Behandlungsarmen B und C dauerte es 10,0 Monate (95% KI 9,4 – 10,6) und 9,0 Monate (95% KI 8,4 – 9,6) respektive [78]. Daraus ergibt sich, dass eine Erhaltungstherapie in Kombination mit 5-Fluoruracil und Bevacizumab vorteilhafter sein könnte.

4.2 Bearbeitung der Gewebeproben und Expressionsmessung

Für die vorliegende Arbeit lagen Gewebeproben von 371 Patienten zur Verfügung. Aus der endgültigen Auswertung wurden insgesamt 40 (10,8%) Patienten herausgenommen. Bei 5 (1,3%) von den 40 herausgenommenen Proben war nach Einschätzung des mitbetreuenden Pathologen kein Tumoreareal nachweisbar. Bei 13 (3,5%) von den Patientenproben war die extrahierte RNA unzureichend zur Herstellung von cDNA. Die Bearbeitung der restlichen 22 (5,9%) Proben lieferte trotz guter RNA- Konzentration keine verwertbaren Ergebnisse im qPCR. Bei einem Cp-Wert über 38 wurde von einer negativen Expression ausgegangen.

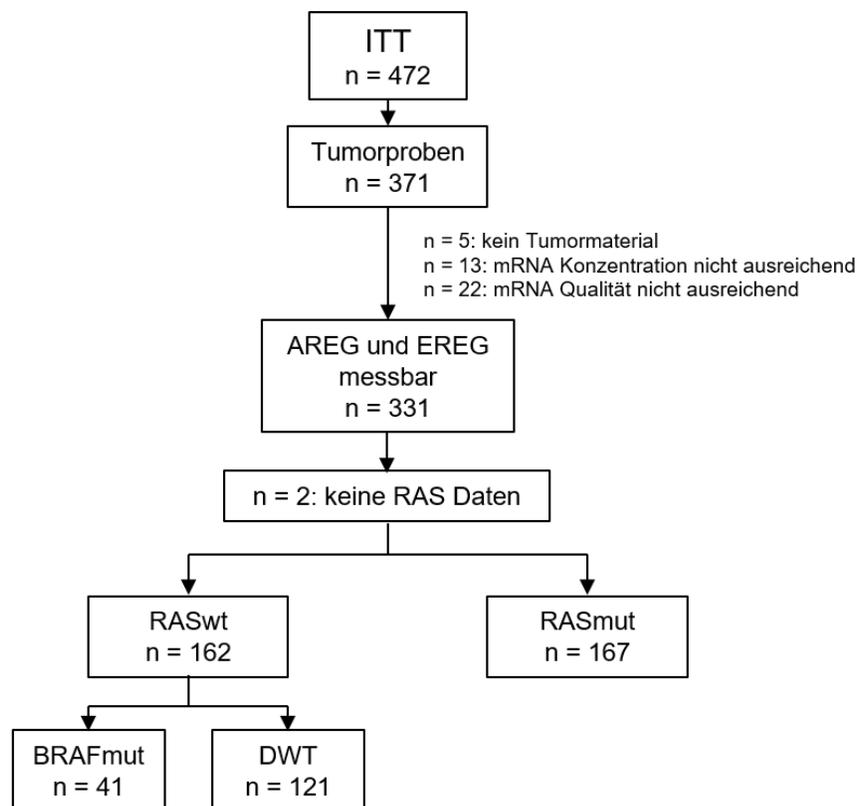


Abbildung 10: Consort-Flussdiagramm. Legende: ITT= intent-to-treat Population, n= Patientenzahl mRNA= Messenger RNA, RAS = rat sarcoma Gen, BRAF= RAS associated factor B Gen, , mut= mutiert, wt= Wildtyp, DWT= Doppelwildtyp (RAS and BRAF Wildtyp).

Patienten, die eine hohe AREG-Expression aufwiesen, wiesen häufig auch eine hohe EREG-Expression auf- die logarithmierten Expressionswerte von AREG und EREG korrelierten stark (Korrelationskoeffizient 0,66; $p < 2 \times 10^{-16}$).

4.3 Einfluss der Tumorlokalisation und des Mutationsstatus auf die Expression von Amphiregulin und Epiregulin

4.3.1 Einfluss der Tumorlokalisation auf die Expression von Amphiregulin und Epiregulin

Die Patientendaten wurden hinsichtlich der AREG- und EREG-Expression dichotomisiert, das heißt die Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt- eine mit hoher AREG- und EREG-Expression und eine mit niedriger AREG- und EREG-Expression. In der gesamten Studienpopulation konnte kein Unterschied bezüglich Alter oder ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) - Einstufung beobachtet werden.

	Gesamt n=331	EREG hoch n=166	EREG niedrig n=165	AREG hoch n=165	AREG niedrig n=166
Alter (Median) in Jahren	65	65	66	65	65
ECOG (%)					
0	53,2	51,8	54,5	53,3	53,0
1	40,5	39,8	41,2	37,6	43,4
2	3,6	3,6	3,6	4,2	3,0
Nicht verfügbar	2,7	4,8	0,6	4,8	0,6
Kolon/Rektum (%)					
Kolon	67,7	57,8	77,7	59,4	75,9
Rektum	32,3	42,2	22,4	40,6	24,1
Seite					
Rechtsseitig	32,0	20,5	43,6	26,1	38,0
Linksseitig	65,6	77,7	53,3	72,1	59,0
Nicht verfügbar	2,4	1,8	3,0	1,8	3,0
Mutationen (%)					

DWT	36,6	42,8	30,3	43,6	29,5
RAS mutiert	50,4	52,4	67,3	52,2	48,8
BRAF mutiert	12,4	4,2	20,6	3,6	21,1
Nicht verfügbar	0,6	0,6	0,6	0,6	2,4

Tabelle 3: Basismerkmale des Gesamtstudienkollektivs in Bezug auf AREG- und EREG-Expression

Der Altersmedian liegt in allen Gruppen zwischen 65 und 66 Jahren, die Gruppenverteilung ist mit n = 166 für hohe EREG und niedrige AREG-Expression und n=165 für niedrige EREG und hohe AREG-Expression ausgewogen. Gruppenübergreifend hatte die Mehrheit ECOG 0 und 1 sowie ein linksseitiges Kolonkarzinom. Rechtsseitige Tumoren hatten eher eine niedrige EREG/AREG-Expression. Eine RAS-Mutation findet sich in mehr als der Hälfte der Patienten in allen Gruppen bis auf der mit niedriger AREG-Expression, dort ist sie mit 48,8% jedoch die größte Untergruppe. In der BRAF-Mutation findet sich vorwiegend eine niedrige EREG/AREG-Expression.

	DWT n=121	EREG hoch n=61	EREG niedrig n=60	AREG hoch n=61	AREG niedrig n=60
Alter (Median) in Jahren	65	65	66	65	66
ECOG (%)					
0	52,1	57,4	46,7	59,0	45,0
1	42,1	34,4	50,0	31,1	53,3
2	4,1	4,9	3,3	6,6	1,7
Nicht verfügbar	1,7	3,3		3,3	
Kolon/Rektum (%)					
Kolon	59,5	57,4	61,7	52,5	66,7
Rektum	40,5	42,6	38,3	47,5	33,3
Seite					
Rechtsseitig	16,5	13,1	20,0	13,1	20,0
Linksseitig	81,8	85,2	78,3	85,2	78,3
Nicht verfügbar	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7
Mutationen (%)					
DWT	100	100	100	100	100

Tabelle 4: Basismerkmale der Patienten mit Doppelwildtyp Status in Bezug auf AREG- und EREG-Expression.

Der Altersmedian in der Wildtyppopulation liegt bei 65 Jahren. Die Gruppen sind mit n = 61 für hohe EREG und AREG-Expression und n = 60 für niedrige EREG und AREG-Expression ausgeglichen. Über 90% Patienten weisen gruppenübergreifend einen ECOG 0-1 auf. In der Mehrheit der Fälle ist das Kolon betroffen, das Rektumkarzinom findet sich jedoch fast gleich oft in der Gruppe mit hoher AREG-Expression. In ungefähr 80% ist die linke Seite betroffen, bei niedriger EREG/AREG-Expression zeigten sich 20% rechtsseitige Tumoren (vgl. 13,1% bei hoher EREG/AREG-Expression).

4.3.2 Einfluss der Tumorlokalisation auf den Mutationsstatus

	RAS mut n=166	EREG hoch n=83	EREG niedrig n=83	AREG hoch n=83	AREG niedrig n=83
Alter (Median) in Jahren	66	64	67	66	67
ECOG (%)					
0	53,0	50,6	55,4	50,6	55,4
1	40,4	39,8	41,0	39,8	41,0
2	3,0	2,4	3,6	2,4	3,6
Nicht verfügbar	3,6	7,2		7,2	
Kolon/Rektum (%)					
Kolon	68,1	60,2	75,9	60,2	75,9
Rektum	31,9	39,8	24,1	39,8	24,1
Seite					
Rechtsseitig	34,1	25,3	43,4	31,3	37,3
Linksseitig	63,3	72,3	54,2	66,3	60,2
Nicht verfügbar	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Mutationen (%)					
RAS mutiert	100	100	100	100	100

Tabelle 5: Basismerkmale der Patienten mit Mutation im RAS-Gen in Bezug auf AREG- und EREG-Expression

Der Altersmedian der Patienten mit RAS-Mutation liegt bei 66 Jahren. Die Gruppenverteilung ist mit jeweils n=83 ausgeglichen. Der ECOG ist bei über 90% gruppenübergreifend 0 (über 50%) oder 1 (ca. 40%). Zu über 60% ist das Kolon betroffen und linksseitig lokalisiert bei 54,2% (EREG niedrig) bis 72,3% (EREG hoch).

	BRAF mut n=41	EREG hoch n=21	EREG niedrig n=20	AREG hoch n=21	AREG niedrig n=20
Alter (Median) in Jahren	63	63	64	59	64
ECOG (%)					
0	53,7	52,4	55,0	52,4	55,0
1	39,0	47,6	30,0	42,9	35,0
2	4,9		10,0	4,8	5,0
Nicht verfügbar	2,4		5,0		5,0
Kolon/Rektum (%)					
Kolon	90,2	81,0	100	85,7	95,0
Rektum	9,8	19,0		14,3	5,0
Seite					
Rechtsseitig	70,7	66,7	75,0	66,7	75,0
Linksseitig	24,4	28,6	20,0	28,6	20,0
Nicht verfügbar	4,9	4,8	5,0	4,8	5,0
Mutationen (%)					
BRAF mutiert	100	100	100	100	100

Tabelle 6: Basismerkmale der Patienten mit Mutation im BRAF-Gen in Bezug auf AREG- und EREG-Expression

Der Altersmedian der Patienten mit BRAF-Mutation liegt bei 59 bis 64. Die Gruppenverteilung ist mit n = 21 für hohe EREG und AREG-Expression und n = 20 für niedrige EREG und AREG-Expression ausgeglichen. Der ECOG beträgt überwiegend 0-1. In über 80% ist das Kolon betroffen (100% bei EREG niedrig), zu über 66% die rechte Seite.

Zusammenfassend fanden sich in der Subpopulation der Doppelwildtypumoren bei den Kolonkarzinomen vorwiegend linksseitige Tumore verglichen zu BRAF und RAS mutierten Tumoren sowohl für hohe als auch niedrige AREG/EREG Spiegel. (Tab. 3). In der BRAF V600E mutierten Untergruppe zeigte sich ein insgesamt niedriges Expressionsniveau der beiden Liganden und häufiger eine rechtsseitige Tumorlokalisation (Tab. 5).

4.3.3 Zusammenhang zwischen der Expression von Amphiregulin und Epiregulin und dem Mutationsstatus

Mithilfe von einfaktorieller Varianzanalyse wurde der Zusammenhang zwischen den logarithmierten AREG- und EREG-Expressionswerten und dem Mutationsstatus der Studienpatienten untersucht. Im Anschluss wurden paarweise Mehrfachvergleiche ausgeführt. Es zeigten sich signifikant niedrigere AREG- und EREG-Expressionswerte in Tumorproben mit BRAF V600E Mutation im Vergleich zu den BRAF Wildtyp Tumoren.

4.4 Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf das Therapieansprechen, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben

4.4.1 Einfluss der Expression von Amphiregulin und Epiregulin auf das Therapieansprechen

Als Nächstes wurde der Einfluss der AREG- und EREG-Expression auf das Therapieansprechen (ORR- *Overall Response Rate*) untersucht wie in Tabelle 6 gezeigt.

AREG		ORR in %	p	EREG		ORR in %	p
Alle Patienten	niedrig	47,7	0,07	Alle Patienten	niedrig	50,0	0,36
	hoch	58,4			hoch	56,0	
DWT	niedrig	53,4	0,35	DWT	niedrig	58,6	>0,99
	hoch	63,2			hoch	57,9	
RAS mut	niedrig	50,0	0,51	RAS mut	niedrig	53,4	>0,99
	hoch	56,8			hoch	53,3	
BRAF mut	niedrig	27,8	0,73	BRAF mut	niedrig	42,1	0,17
	hoch	35,3			hoch	18,8	

Tabelle 7: Einfluss von AREG- und EREG-Expression auf das Therapieansprechen (ORR)

Das Expressionsniveau von AREG und EREG wurde dichotomisiert in ‚hoch‘ und ‚niedrig‘ eingeteilt, wobei der Median den *cut-off* Wert darstellte. Es konnte weder in der gesamten Studienpopulation noch in den mutationsbezogenen Untergruppen ein Zusammenhang zwischen dem AREG- und EREG-Expressionsniveau und dem Therapieansprechen (ORR- *Overall Response Rate*) mithilfe den zweiseitigen exakten Test nach Fisher beobachtet werden. Die niedrigste Ansprechrates unabhängig von der AREG-/EREG-Expression fand sich in der BRAF-Mutation mit 18,8% (EREG hoch) (vgl. 42,1% (EREG niedrig), $p = 0,17$) bzw. 27,8% (AREG niedrig) (vgl. 35,3% (AREG hoch), $p = 0,73$).

4.4.2 Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Outcome

Einfluss von AREG auf das progressionsfreie (PFS) und Gesamtüberleben (OS)

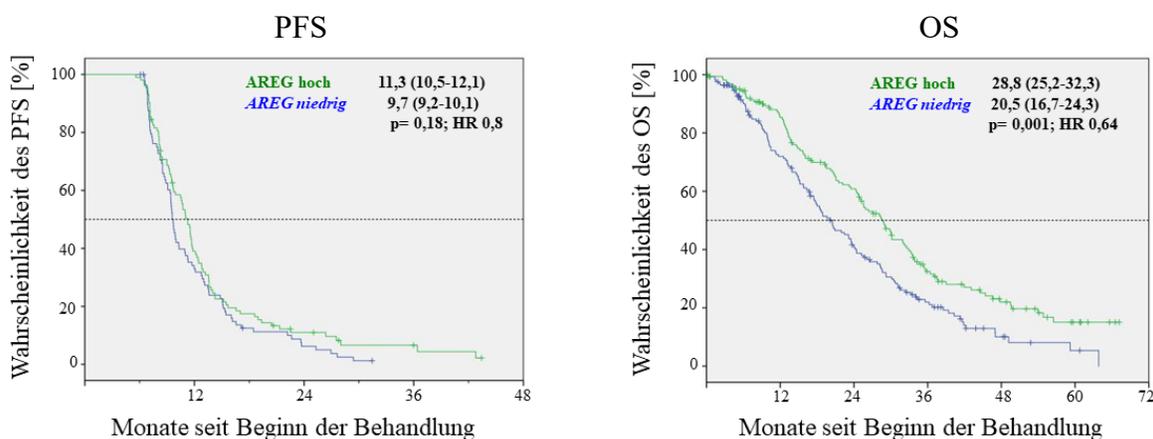


Abbildung 11: Einfluss von AREG auf das PFS (links) und das OS (rechts) hinsichtlich der Gesamtpopulation.

Der Einfluss der AREG-Expression auf das Gesamtüberleben (*OS- overall survival*) und auf das progressionsfreie Überleben (*PFS- progression free survival*) wurde in einem nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt und mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, die die Expression von AREG wurde in ‚hoch‘ und ‚niedrig‘ eingeteilt, wobei der Median der *cut-off* Wert darstellte. Es scheint, dass ein längeres Gesamtüberleben mit einem erhöhtem AREG-Expressionsniveau signifikant korreliert. Das Gesamtüberleben lag in der Untergruppe mit höherer AREG-Expression mit 28,8 Monaten

(95% KI 25,2- 32,3) höher im Vergleich zur Untergruppe der niedrigen AREG- Expression mit 20,5 Monaten (95% KI 16,7- 24,3) ($p = 0,001$). Dieser Effekt konnte für das progressionsfreie Überleben nicht gezeigt werden.

4.4.3 Einfluss der Amphiregulin Expression auf das progressionsfreie Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie

Einfluss von AREG auf das progressionsfreie Überleben (PFS)

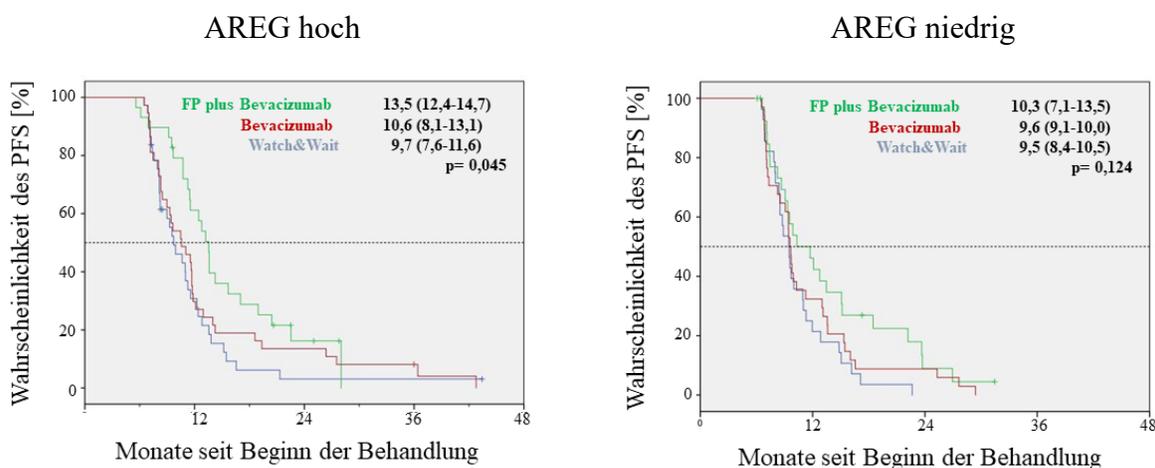


Abbildung 12: Einfluss von AREG auf das PFS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in AREG hoch/high (links) und AREG niedrig/low (rechts).

Für AREG ‚hoch‘ zeigte sich ein signifikanter Unterschied für das mittlere PFS. Dieses war ohne Erhaltungstherapie am kürzesten mit 9,7 Monaten (95% KI 7,6-11,6) und am längsten mit 13,5 Monaten im Behandlungsarm A (FP plus Bevacizumab, 95% KI 12,4-14,7) ($p = 0,045$). Bei AREG ‚niedrig‘ zeigte sich für das mittlere PFS kein Unterschied zwischen den Behandlungsarmen, das niedrigste PFS war bei 9,5 Monaten (keine Erhaltung, 95% KI 8,4-10,5), das höchste mittlere PFS lag bei 10,3 Monaten (FP plus Bevacizumab, 95% KI 7,1-13,5) ($p = 0,12$).

4.4.4 Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Gesamtüberleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie

Einfluss von AREG auf das Gesamtüberleben (OS)

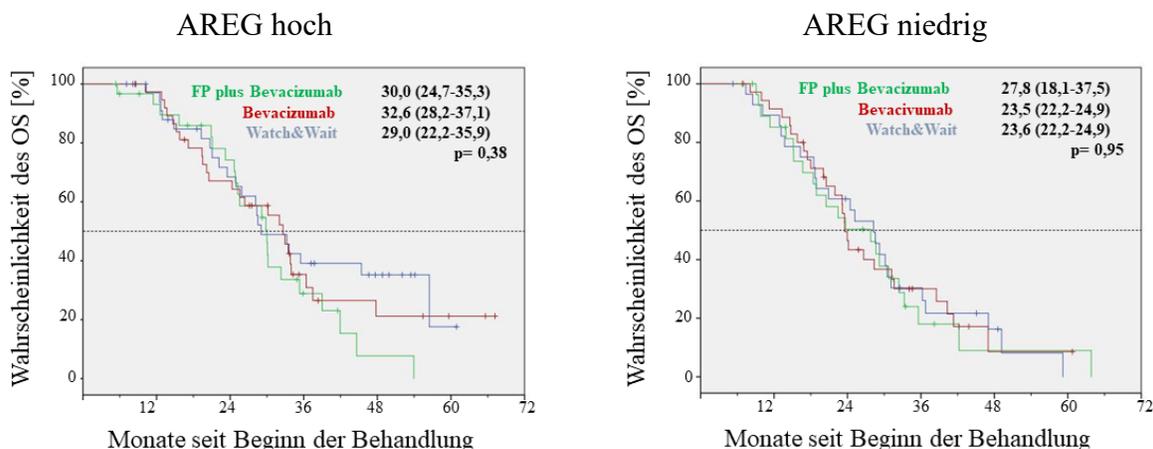


Abbildung 13: Einfluss von AREG auf das OS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in AREG hoch (links) und AREG niedrig (rechts).

Der Einfluss der AREG-Expression auf das Gesamtüberleben in den drei Erhaltungstherapiearmen wurde untersucht. Betrachtet man die gesamte Studienpopulation, so erkennt man keine Unterschiede in der Überlebenszeit weder bei einer hohen noch bei einer niedrigen AREG-Expression. Das längste OS für AREG ‚hoch‘ lag bei 32,6 Monaten (Bevacizumab, 95% KI 28,2-37,1) vs. 30,0 Monate (FP plus Bevacizumab, 95% KI 24,7-35,3) vs. 29,0 Monate (keine Erhaltung, 95% KI 22,2-35,9) ($p = 0,38$). Das längste OS für AREG ‚niedrig‘ lag bei 27,8 Monaten (FP plus Bevacizumab, 95% KI 18,1-37,5) vs. 23,5 Monaten (Bevacizumab, 95% KI 22,2-24,9) vs. 23,6 Monaten (keine Erhaltung, 95% KI 22,2-24,9) ($p = 0,95$).

4.4.5 Einfluss der Amphiregulin Expression auf das Überleben, aufgeteilt nach Mutationsstatus

Eine BRAF V600E-Mutation wird mit niedrigen AREG- und EREG-Spiegeln assoziiert. Es wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, bei der wir AREG- und EREG-Level als logarithmierte kontinuierliche Variablen benutzten und passten sie an das Alter, Geschlecht und Lokalisation des Primärtumors an.

Effekt von logAREG auf das progressionsfreie (PFS) und das Gesamtüberleben (OS)

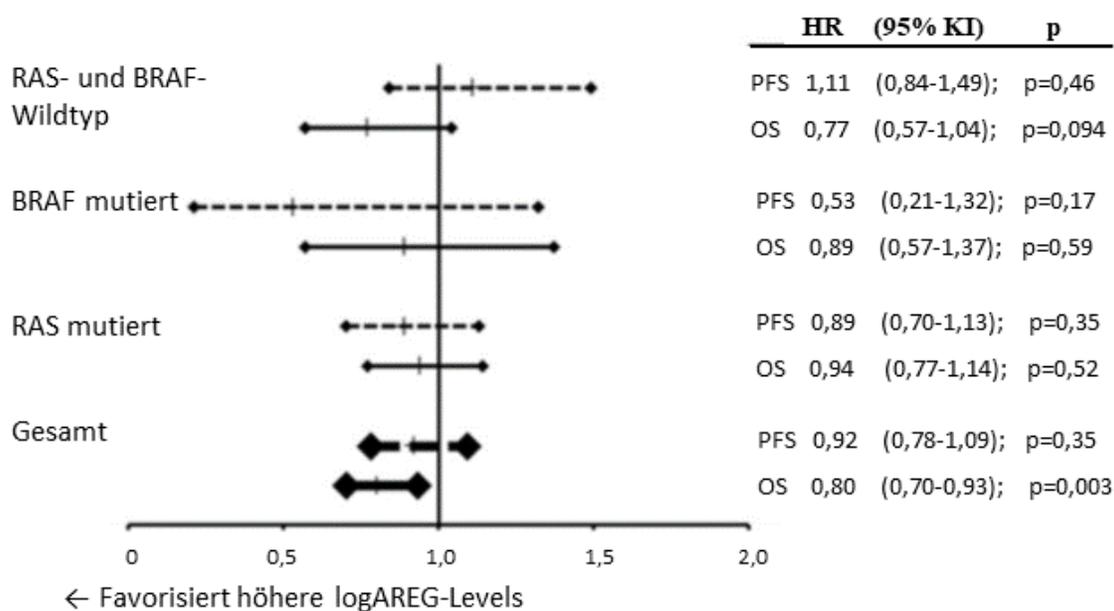


Abbildung 14: Effekt von logAREG auf PFS und OS.

Im gezeigten Forest-Plot konnte kein Effekt von logAREG auf das PFS gezeigt werden, der Einfluss auf das Gesamtüberleben OS in der Gesamtpopulation ist jedoch signifikant ($p = 0,003$). Diese Signifikanz verschwindet, betrachtet man die Gruppen einzeln.

4.4.6 Einfluss der Epi-regulin Expression auf das Outcome

Einfluss von EREG das progressionsfreie (PFS) und Gesamtüberleben (OS)

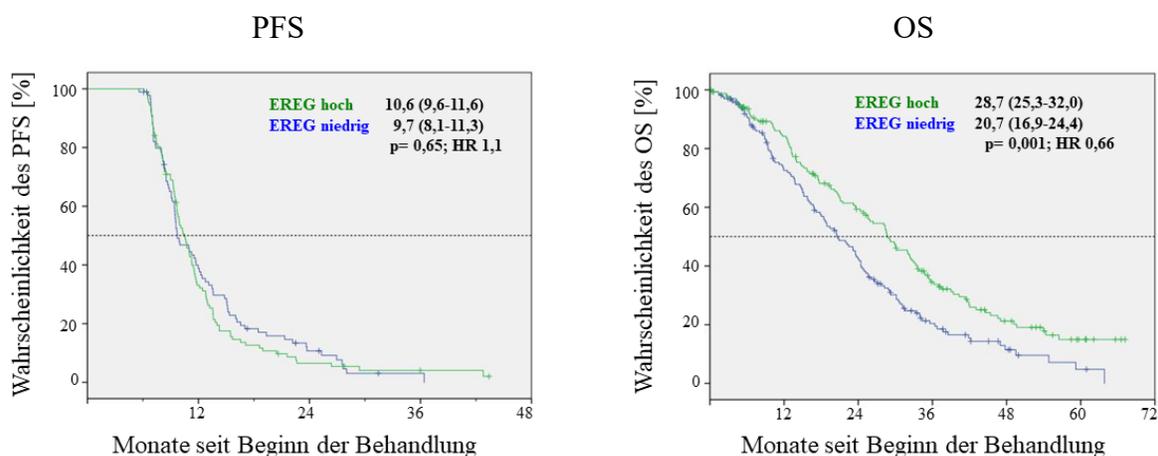


Abbildung 15: Einfluss von EREG auf das PFS (links) und das OS (rechts) hinsichtlich der Gesamtpopulation.

Es wurde auch der Einfluss der EREG-Expression auf das Gesamtüberleben und auf das progressionsfreie Überleben untersucht. Hier konnte ebenfalls ein signifikant längeres Gesamtüberleben in Verbindung mit höherer EREG-Expression gebracht werden. In der Untergruppe mit hoher Expression betrug das Gesamtüberleben 28,7 Monate (95% KI 25,3-32,0), in der Untergruppe mit niedriger Expression waren es hingegen nur 20,7 Monate (95% KI 16,9-24,4) ($p = 0,001$). Das PFS wies hier ebenfalls keine Unterschiede bezogen auf die EREG-Expression auf.

4.4.7 Einfluss der Epiregulin Expression auf das progressionsfreie Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie

Einfluss von EREG auf das progressionsfreie Überleben (PFS)

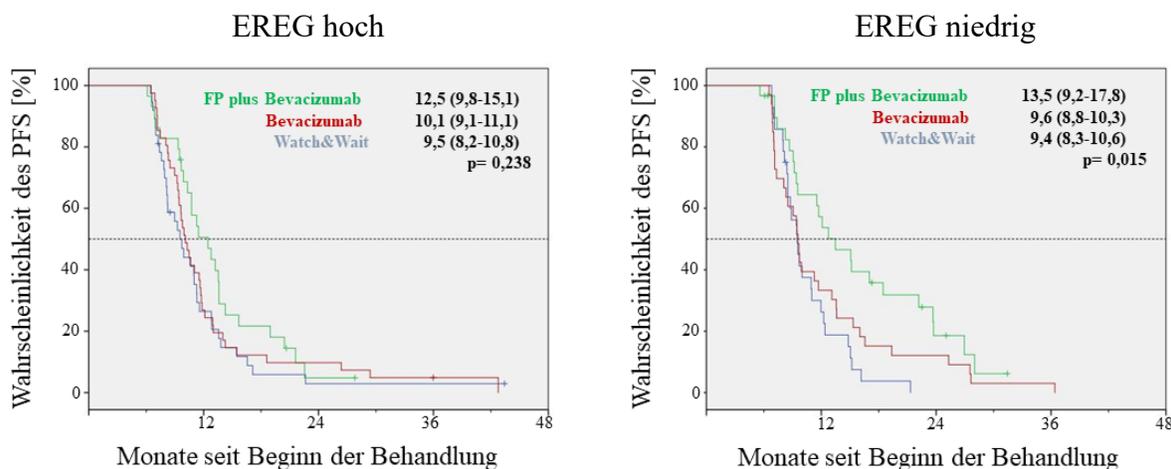


Abbildung 16: Einfluss von EREG auf das PFS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in EREG hoch/high (links) und EREG niedrig/low (rechts).

Für EREG ‚hoch‘ zeigte im mittleren PFS kein Unterschied zwischen den Behandlungsarmen, das niedrigste PFS lag bei 9,5 Monaten (keine Erhaltung, 95% KI 8,2-10,8), das höchste PFS bei 12,5 Monaten (FP plus Bevacizumab, 95% KI 9,8-15,1) ($p = 0,24$). Bei EREG ‚niedrig‘ hingegen konnte für das mittlere PFS ein signifikanter Unterschied gezeigt werden, das niedrigste PFS lag bei 9,4 Monaten (keine Erhaltung, 95% KI 8,3-10,6), das höchste PFS bei 13,5 Monaten (FP plus Bevacizumab, 95% KI 9,2-17,8) ($p = 0,015$).

4.4.8 Einfluss der Epiregulin Expression auf das Gesamtüberleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie

Einfluss von EREG auf das Gesamtüberleben (OS)

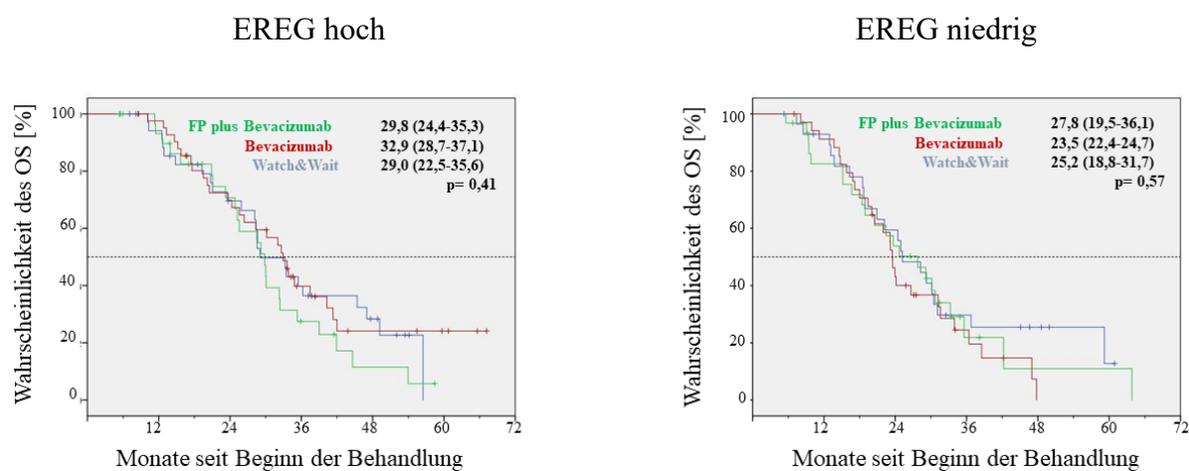


Abbildung 17: Einfluss von EREG auf das OS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in EREG hoch/high (links) und EREG niedrig/low (rechts).

Der Einfluss der EREG-Expression auf das Gesamtüberleben in den drei Erhaltungstherapiearmen wurde ebenfalls untersucht. Es ergab sich kein Hinweis darauf, dass eine höhere oder eine niedrige Expression eine Auswirkung auf das Gesamtüberleben hat. Das mittlere Überleben bei EREG ‚hoch‘ lag gemittelt zwischen 29,0 Monaten (keine Erhaltung, 95% KI 22,5-35,6) und bestenfalls 32,9 Monaten (Bevacizumab, 95% KI 28,7-37,1) ($p = 0,41$). Für EREG ‚niedrig‘ lag das OS zwischen 23,5 Monaten (Bevacizumab, 95% KI 22,4-24,7) und bestenfalls bei 27,8 Monaten (FP plus Bevacizumab, 95% KI 19,5-36,1) ($p = 0,57$).

4.4.9 Einfluss der Epiregulin Expression auf das Überleben, aufgeteilt nach Mutationsstatus

Effekt von logEREG auf das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS)

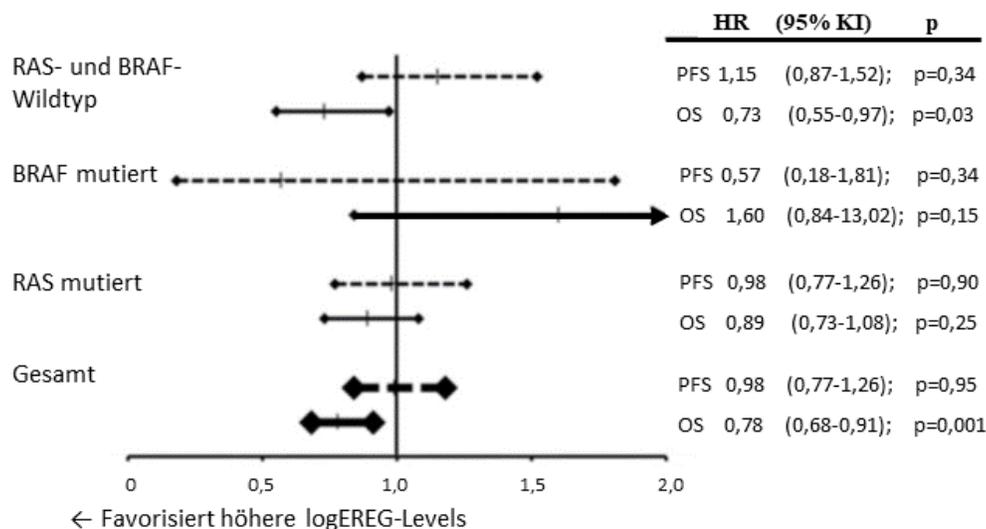


Abbildung 18: Effekt von logEREG auf PFS und OS.

Die in 4.4.5 gezeigte Analyse wurde auch für logEREG durchgeführt, hier zeigte sich ebenfalls kein Einfluss auf das PFS, weder in der Gesamtpopulation noch in einer der Untergruppen. Es konnte jedoch ein signifikanter Einfluss von logEREG auf das Gesamtüberleben sowohl der Gesamtpopulation ($p = 0,001$) als auch der Doppelwildtyp-Gruppe ($p = 0,03$) dargestellt werden. Auf die BRAF und RAS mutierten Tumoren hat logEREG keinen Einfluss hinsichtlich OS und PFS. Zusammengefasst konnte ein prognostischer Effekt auf das OS sowohl für AREG als auch EREG lediglich für die BRAF und RAS-Wildtyp Untergruppen gezeigt werden (Abbildung 14 und 18).

4.5 Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf die Effektivität der einzelnen Behandlungsarme

Wir untersuchten nun den Effekt der AREG- und EREG-Expression auf die einzelnen Behandlungsarme, indem wir die Biomarker in hohe und niedrige Expression aufteilten. Von Interesse waren hierbei erneut das PFS und OS.

4.5.1 AREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab plus FP Erhaltung

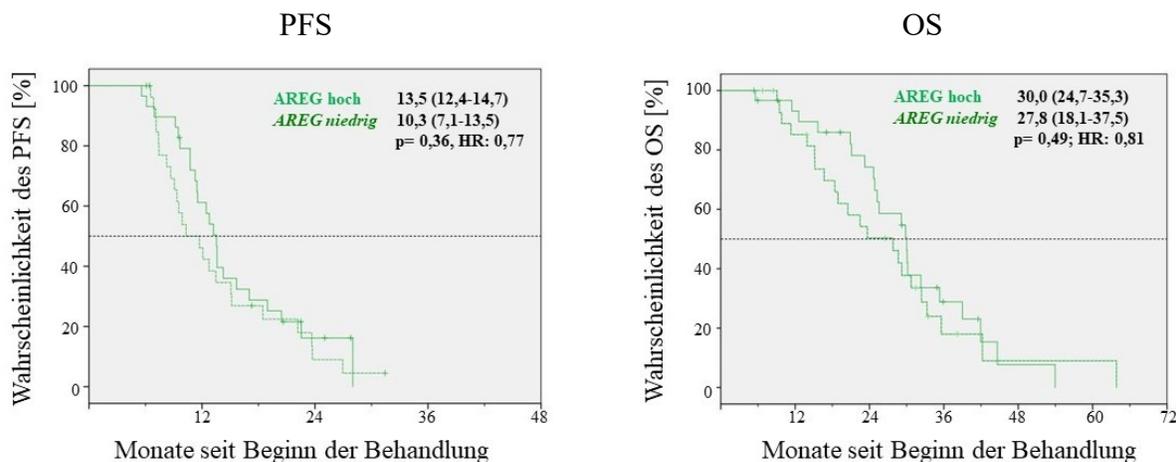


Abbildung 19: AREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab plus FP hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).

Wir konnten für die das PFS und OS unter Bevacizumab plus FP keine Unterschiede sehen. Die mittlere PFS beträgt 13,5 Monate (95% KI 12,4-14,7) vs. 10,3 Monate (95% KI 7,1-13,5) (hoch vs. niedrig; $p = 0,36$, HR: 0,77). Das OS unterschied sich ebenfalls nicht mit 30,0 Monaten (95% KI 24,7-35,3) vs. 27,8 Monaten (95% KI 18,1-37,5) (hoch vs. niedrig; $p = 0,49$, HR: 0,81).

4.5.2 AREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab Erhaltung

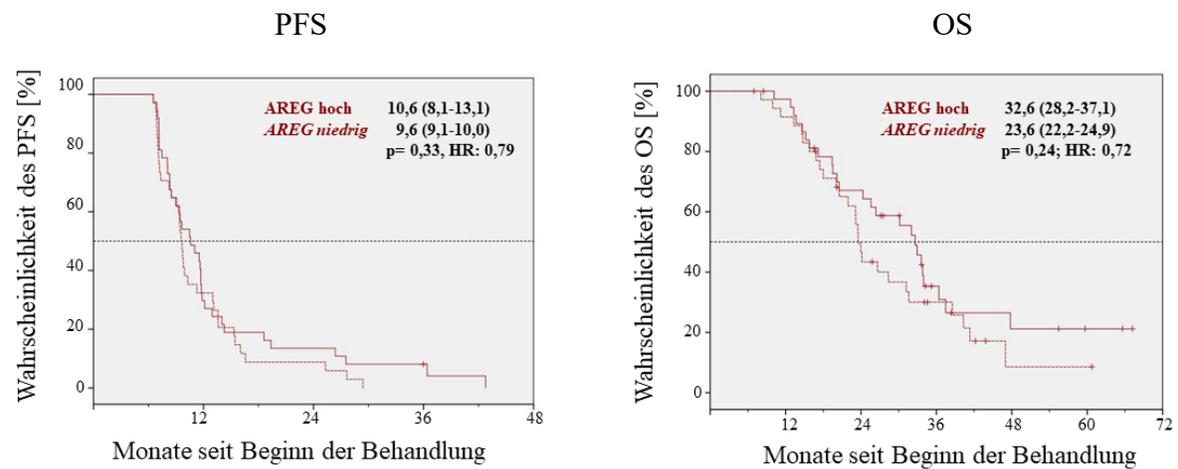


Abbildung 20: AREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).

Wir konnten für das PFS und OS unter Bevacizumab Monotherapie ebenfalls keine Unterschiede sehen. Die mittlere PFS beträgt 10,6 Monate (95% KI 8,1-13,1) vs. 9,6 Monate (95% KI 9,1-10,0) (hoch vs. niedrig; $p = 0,33$, HR: 0,79). Das mittlere OS unterschied sich ebenfalls nicht mit 32,6 Monaten (95% KI 28,2-37,1) vs. 23,6 Monaten (95% KI 22,2-24,9) (hoch vs. niedrig; $p = 0,24$, HR: 0,72).

4.5.3 AREG-Einfluss auf das Überleben im Watch & Wait Arm

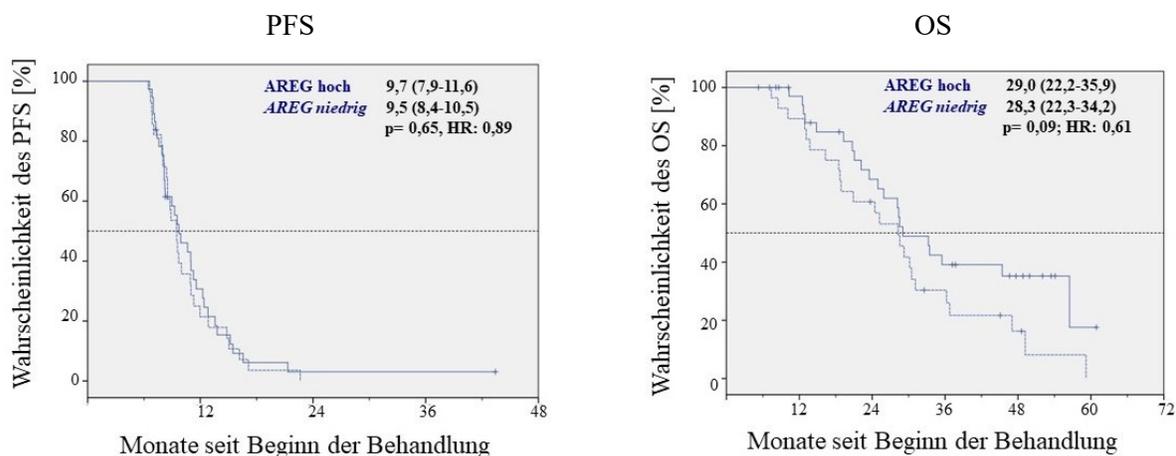


Abbildung 21: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts) Abbildung 22: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).

Auch im Watch & Wait Arm konnten wir für die das PFS und OS keine signifikanten Unterschiede sehen. Die mittlere PFS beträgt 9,7 Monate (95% KI 7,9-11,6) vs. 9,5 Monate (95% KI 8,4-10,5) (hoch vs. niedrig; $p = 0,65$, HR: 0,89). Das mittlere OS unterschied sich ebenfalls nicht mit 29,0 Monaten (95% KI 22,2-35,9) vs. 28,3 Monaten (95% KI 22,3-34,2), dennoch zeigte sich hier ein Trend, welcher längeres Überleben bei hoher AREG Expression favorisiert (hoch vs. niedrig; $p = 0,09$, HR: 0,61). Betrachtet man jeden Behandlungsarm einzeln, so zeigte sich für das PFS kein signifikanter Unterschied zwischen AREG hoch und AREG niedrig, im OS zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

4.5.4 EREG-Einfluss auf das Überleben im Bevacizumab plus FP Arm

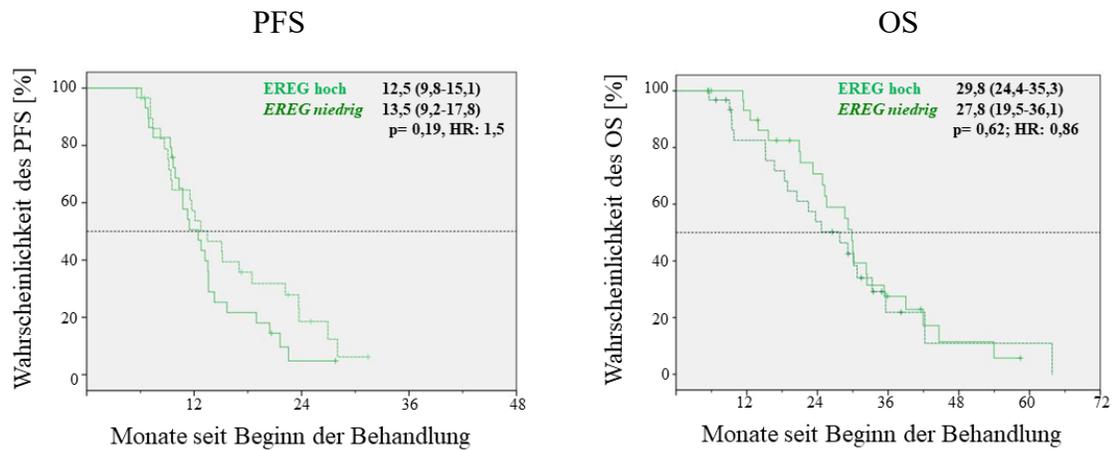


Abbildung 23: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab plus FP im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).

Wir konnten für die das PFS und OS unter Bevacizumab plus FP keine Unterschiede sehen. Die mittlere PFS beträgt 12,5 Monate (95% KI 9,8-15,1) vs. 13,5 Monate (95% KI 9,2-17,8) (hoch vs. niedrig; $p = 0,19$, HR: 1,5). Das OS unterschied sich ebenfalls nicht mit 29,8 Monaten (95% KI 24,4-35,3) vs. 27,8 Monaten (95% KI 19,5-36,1) (hoch vs. niedrig; $p = 0,62$, HR: 0,86).

4.5.5 EREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab Erhaltung

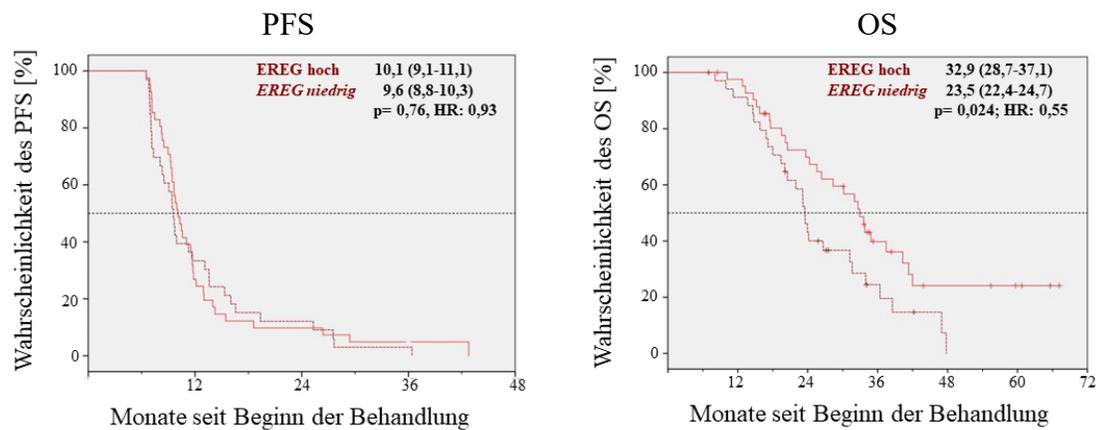


Abbildung 24: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).

Wir konnten für das PFS unter Bevacizumab Monotherapie ebenfalls keine Unterschiede sehen. Die mittlere PFS beträgt 10,1 Monate (95% KI 9,1-11,1) vs. 9,6 Monate (95% KI 8,8-10,3) (hoch vs. niedrig; $p = 0,76$; HR: 0,93). Das mittlere OS zeigte sich bei hoher EREG Expression mit 32,9 Monaten (95% KI 28,7-37,1) vs. 23,5 Monaten (95% KI 22,4-24,7) signifikant verlängert (hoch vs. niedrig; $p = 0,024$; HR: 0,55).

Wir teilten nun die Subpopulation des Bevacizumab Behandlungsarms nach RAS-Mutationsstatus auf und untersuchten erneut PFS und OS hinsichtlich der EREG-Expression.

4.5.5.1 EREG-Einfluss auf das Überleben unter Bevacizumab Erhaltung bei RAS-Wildtyp

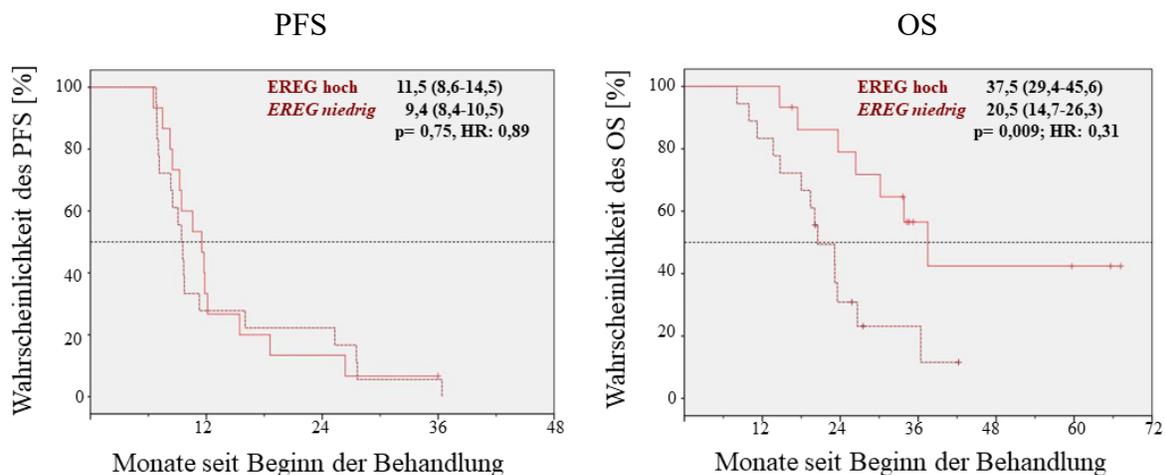


Abbildung 25: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab in der RAS-Wildtyp Subpopulation im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).

Das PFS unterschied sich innerhalb der RAS-Wildtyp Population mit 11,5 Monaten (95% KI 8,6-14,5) vs. 9,4 Monaten (95% KI 8,4-10,5) nicht (hoch vs. niedrig; $p = 0,75$; HR: 0,89). Die Korrelation von hoher EREG-Expression und längerem OS unter Erhaltungstherapie mit Bevacizumab konnte innerhalb der RAS-Wildtyp Population jedoch weiterhin gesehen werden, das OS favorisiert mit 37,5 Monaten (95% KI 29,4-45,6) vs. 20,5 Monaten (95% KI 14,7-26,3) deutlich die Patienten mit hoher EREG-Expression ($p = 0,009$; HR: 0,31).

4.5.5.2 EREG-Einfluss auf das Überleben im Bevacizumab Erhaltungsbereich bei RAS-Mutation

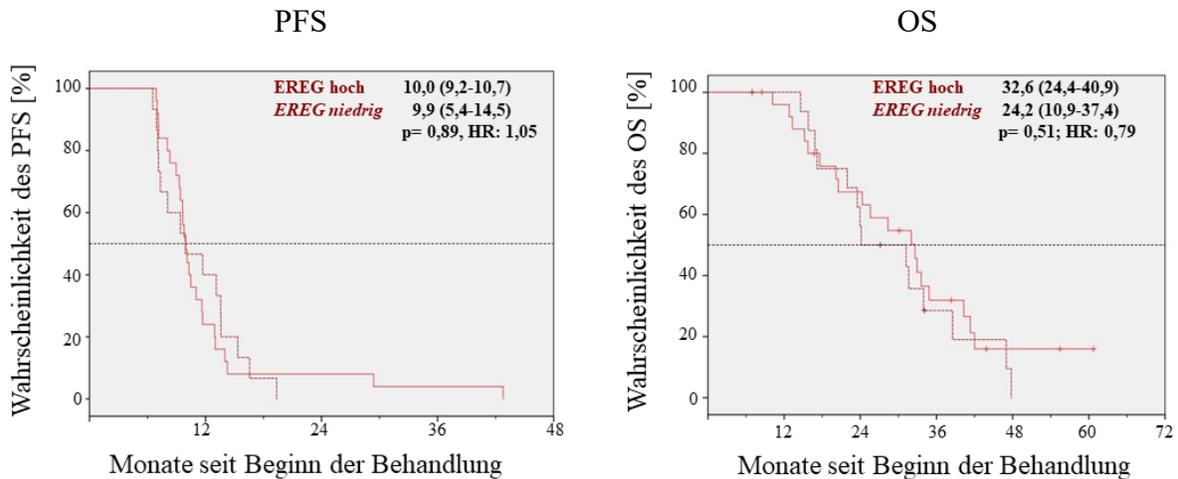


Abbildung 26: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab in der RAS-mutierten Subpopulation im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).

Die Korrelation mit EREG-Expression verliert sich innerhalb der Gruppe der Patienten mit RAS-mutierten Tumoren. Es zeigten sich keine Unterschiede im PFS mit 10,0 Monaten (95% KI 9,2-10,7) vs. 9,9 Monaten (95% KI 5,4-14,5) (hoch vs. niedrig; $p = 0,89$, HR: 1,05) sowie im OS mit 32,6 Monaten (95% KI 24,4-40,9) vs. 24,2 Monaten (95% KI 10,9-37,4) (hoch vs. niedrig; $p = 0,51$, HR: 0,79).

4.5.6 EREG-Einfluss auf das Überleben im Watch & Wait Arm

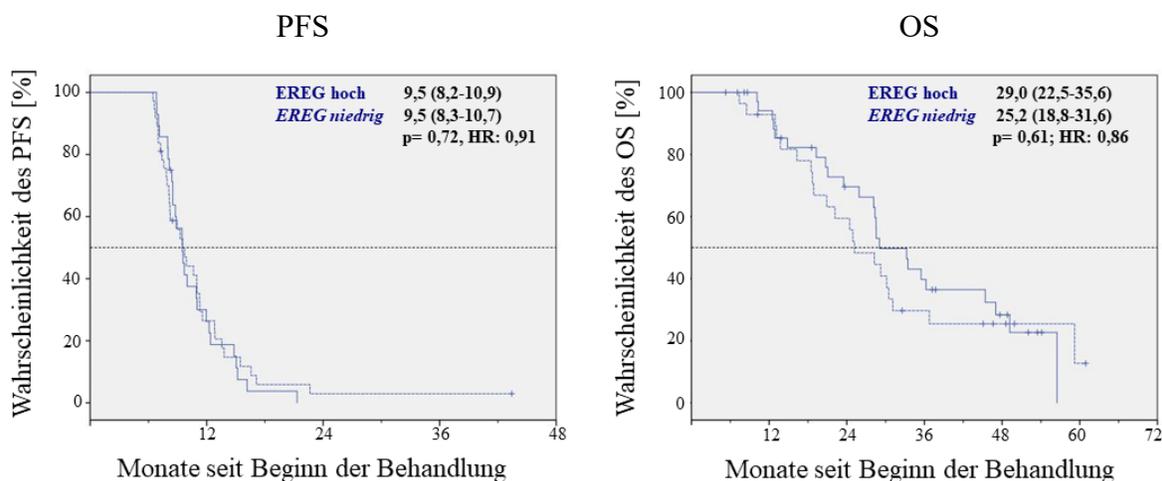


Abbildung 27: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).

Im Watch & Wait Arm zeigte sich wiederum kein Unterschied im PFS und OS. Die mittlere PFS beträgt 9,5 Monate (95% KI 8,2-10,9) vs. 9,5 Monate (95% KI 8,3-10,7) (hoch vs. niedrig; $p = 0,72$; HR: 0,91). Das mittlere OS unterschied sich ebenfalls nicht mit 29,0 Monaten (95% KI 22,5-35,6) vs. 25,2 Monaten (95% KI 18,8-31,6) (hoch vs. niedrig; $p = 0,61$; HR: 0,86).

Zusammengefasst zeigte sich für EREG, bezogen auf die einzelnen Therapiearme, ebenfalls kein Unterschied im PFS. Im Bevacizumab Arm zeigte sich ein signifikant längeres OS bei hoher EREG-Expression ($p = 0,024$), für die anderen Behandlungsarme zeigte sich kein Unterschied.

4.5.7 Einfluss der Amphiregulin und Epiregulin Expression auf das Überleben in Bezug auf die Erhaltungstherapie in der Doppelwildtyp Studiensubpopulation

Es wurde zudem untersucht, wie sich die AREG- und EREG-Expressionslevel auf die verschiedenen Behandlungsarme der Erhaltungstherapie auswirkten (keine Erhaltung vs. FP +

Bevacizumab vs. Bevacizumab). Hierbei wurden nur Patienten mit RAS- und BRAF Wildtyp untersucht.

4.5.7.1 Effekt von logAREG auf das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) in der Doppelwildtyp Population

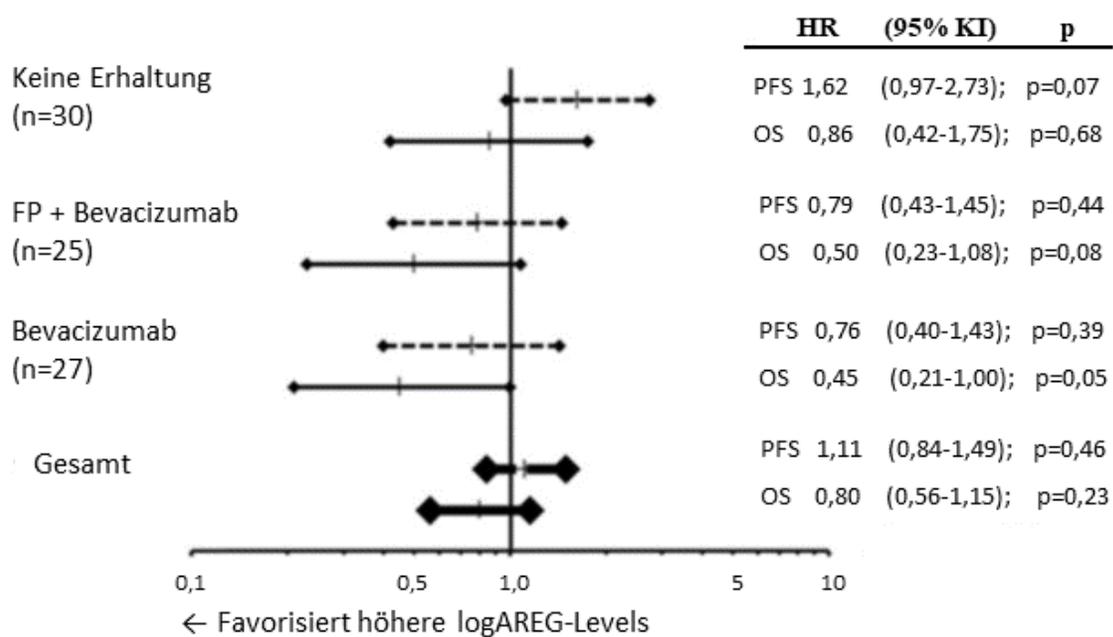


Abbildung 28: Effekt von logAREG auf das OS und PFS der DWT-Population.

Es konnte kein signifikanter Einfluss auf das PFS für logAREG festgestellt werden, in der Gruppe ohne Erhaltung ließ sich jedoch ein Trend zum kürzeren PFS ($p = 0,07$, HR 1,62) feststellen. Das OS wurde von logAREG nur in der Gruppe mit Bevacizumab beeinflusst ($p = 0,05$), ein Trend zeichnete sich für FP + Bevacizumab ab ($p = 0,08$).

4.5.7.2 Effekt von logEREG auf das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) der Doppelwildtyp Population

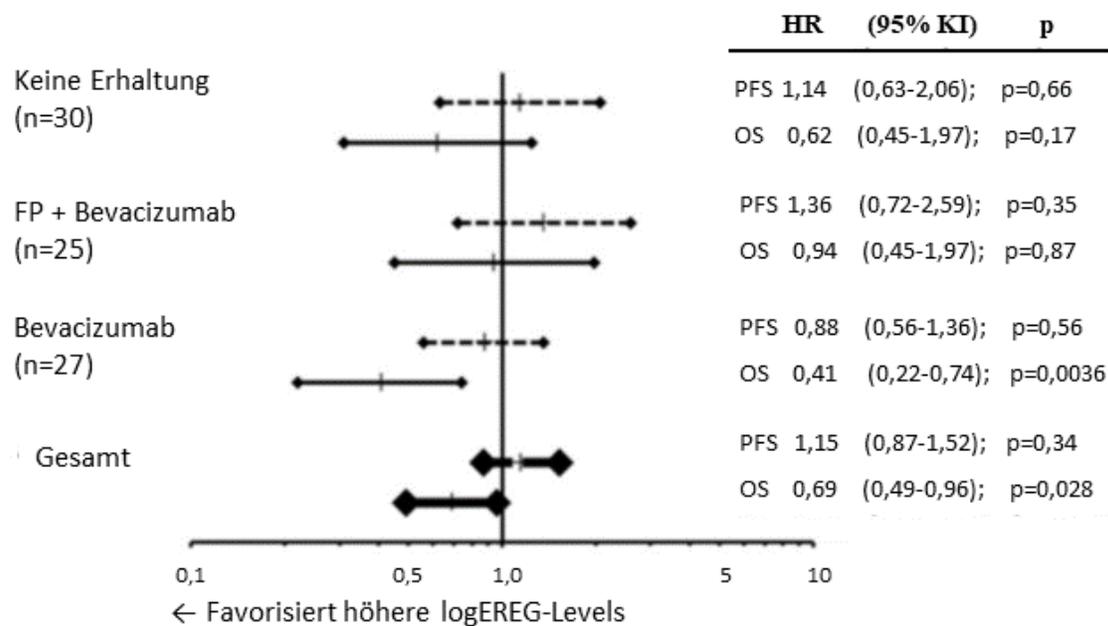


Abbildung 29: Effekt von logEREG auf das OS und PFS der DWT-Population.

Erneut konnte hier ein Effekt auf das OS nur in der Bevacizumab Gruppe gezeigt werden ($p = 0,004$), bei den übrigen Gruppen besteht kein Zusammenhang zwischen logEREG und OS bzw. PFS.

Zusammengefasst zeigte innerhalb der Doppelwildtyp-Gruppe (RAS und BRAF Wildtyp) nur der Behandlungszweig mit Bevacizumab einen signifikanten Zusammenhang zwischen AREG- und EREG-Levels und dem Gesamtüberleben. Ein Einfluss auf das PFS konnte in keiner Gruppe gezeigt werden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der verwendeten Methodik

Die beschriebenen Versuche wurden allesamt am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Die Protokolle zu RNA-Isolation, DNA-Transkription, PCR und Konzentrationsbestimmung waren bereits hinreichend etabliert. Es handelte sich also um Standardprotokolle welche zum Teil auch in der klinischen Routine eingesetzt werden. Die zeigte sich auch dadurch, dass von 371 Patientenproben der AIO KRK-0207 Studie 331 ausgewertet werden konnten.

Um die AREG- und EREG-Expression in Relation zu setzen, wurde zusätzlich ein *housekeeping gene* bestimmt. Dafür wählten wir die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH ist eines der am weitest verbreiteten *housekeeping* Gene [79]. Doch auch wenn dieses Gen häufig verwendet wird, so konnten Studien zeigen, dass sich die Expression dieses Gens zwischen verschiedenen Gewebearten signifikant unterscheiden kann [80]. Da wir nur eine Art von Gewebe untersuchten, stellte dies kein Problem dar. Es gibt jedoch Daten, die zeigen, dass die Expression von GAPDH im KRK signifikant hochreguliert sein kann und sogar die Tumorentstehung und Metastasierung fördern kann [81]. Es wird zudem vermutet, dass die GAPDH-Expression mit dem Fortschreiten des KRK korreliert [82]. Um die dargelegten möglichen Schwächen von GAPDH zu minimieren, wurde ein zweites *housekeeping* Gen, nämlich YWHAZ [83], verwendet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der AIO KRK 0207 („Maintenance“) Studie war es zu prüfen, ob bei Patienten mit mKRK, welche eine Induktionstherapie mit Oxaliplatin, 5-Fluoropyrimidin (5-FU) und Bevacizumab erhalten haben, eine Erhaltungstherapie mit Bevacizumab bzw. keine Erhaltung einer Erhaltungstherapie mit Fluoropyrimidin plus Bevacizumab unterlegen ist. Dabei wur-

den nur Patienten randomisiert, die nach 24 Wochen Induktionstherapie keinen Tumorprogress zeigten. Randomisierte Patienten, welche nach Randomisation im Rahmen der Erhaltungstherapie einen Tumorprogress zeigten, sollten eine Re-Induktionstherapie erhalten. Es konnte hierbei eine Nichtunterlegenheit der Monotherapie mit Bevacizumab gegenüber einer Kombination aus Fluoropyrimidin und Bevacizumab gezeigt werden, eine ausbleibende Erhaltungstherapie wirkte sich in der Tendenz negativ auf das OS aus [78]. Wir wollten in dieser Arbeit die Korrelation der AREG- und EREG-Expression mit den klinischen Ergebnissen dieser Studie prüfen.

Wir sahen in der Gesamtpopulation, dass bei hoher Expression von AREG und EREG das Verhältnis links- zu rechtsseitig deutlich zugunsten der linksseitigen Tumorlokalisation liegt. Dieses Patientenkollektiv hat auch insgesamt das bessere Outcome. Bei niedrigen AREG- und EREG Expressionsleveln war das Verhältnis links zu rechts ausgeglichener. In Anbetracht des Mutationsstatus zeigten wir, dass linksseitige Tumoren in der Doppelwildtyppopulation mit höheren AREG- und EREG-Expressionsleveln korrelieren. Dabei sind sie in der Population mit RAS mutierten Tumoren vor allem mit höheren EREG-Expressionsleveln assoziiert. Bei Patienten mit BRAF mutierten Tumoren, welche auch mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind, ist das Gegenteil der Fall.

Die AREG/EREG-Expression war in RAS-mutierten Tumoren insgesamt nicht vermindert.

In Tumoren mit BRAF V600E Mutation wurden generell niedrigere AREG- und EREG-Expressionslevel gemessen. Auch war das Ansprechen bei dieser Mutation mit einer hohen EREG-Expression tendenziell schlechter.

Wir konnten insgesamt zeigen, dass die AREG- und EREG-Expression bei Patienten mit mKRK, welche sich einer Induktionstherapie mit Oxaliplatin, Fluoropyrimidin und Bevacizumab unterzogen haben, direkt mit dem Outcome korreliert. Das Gesamtüberleben nimmt dabei mit steigender Expression von AREG und EREG zu, ein klar definierter Cut-off Wert ließ sich dabei jedoch nicht ermitteln. Für die Ansprechrate und das progressionsfreie Überleben konnten wir weder für die Gesamtpopulation noch für eine der Subpopulationen einen Zusammenhang zu der AREG- oder EREG-Expression herstellen.

Wenn man die Daten um bekannte Prognosefaktoren bereinigt, so beschränkt sich der prognostische Wert von AREG und EREG nur auf die Doppelwildtyp-Tumoren (RAS- und BRAF-Wildtyp). Innerhalb der Doppelwildtypgruppe wirkte sich – betrachtet man die verschiedenen Behandlungsarme der Erhaltungstherapie – eine hohe EREG-Expression vor allem in der Gruppe der Patienten welche eine Erhaltungstherapie mit Bevacizumab als Monotherapie erhielten positiv auf das Gesamtüberleben aus.

5.2.1 BRAF V600E Mutation ist mit niedriger AREG/EREG Expression und schlechterem Outcome assoziiert

Die BRAF V600E Mutation im KRK ist mit rechtsseitigen Tumoren und niedriger AREG/EREG Expression assoziiert. Weisen diese Tumoren jedoch hohe AREG- und EREG-Expressionsniveaus auf, so wirkte sich das negativ auf das Outcome aus. Sowohl RAS- als auch BRAF-Mutationen führen zu einem dauerhaft aktivierten EGFR-Signalweg. Dieser ist von exokrinen Signalen durch die EGFR-Liganden AREG und EREG unabhängig [84], daher müssen der zugrunde liegende Mechanismus und die unterschiedlichen Rollen von RAS und BRAF in mKRK hinsichtlich AREG und EREG noch genauer geklärt werden.

RAS und BRAF sind beide ein Teil des RAS/BRAF/MEK/ERK-Signalwegs und fördern durch *gain-of-function missense* Mutation die wachstumsfaktorunabhängige Proliferation, Apoptosesunterdrückung und Angiogenese. Die beiden Mutationen haben jedoch unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellfunktion und Entstehung bzw. Entwicklung des mKRK [85, 86]. So sind BRAF-Mutationen im mKRK beispielsweise assoziiert mit hoher Mikrosatelliteninstabilität, hoher Gesamtmutationsrate, Lymphozyteninfiltration, rechtsseitiger Lage und niedriger Differenzierung [86]. Interessanterweise wird das schlechte Überleben nur bei fehlender Mikrosatelliteninstabilität beobachtet [87].

BRAF-Mutationen sind zudem assoziiert mit einer Hypermethylierung von CpG-Inseln (*CIMP-high*). Dies kommt zustande, indem MAFK über die BRAF/MEK/Erk-Achse phosphoryliert wird und dieses zusammen mit BACH1 (Transkriptionsregulatorgen BACH1), CHD8 (Chromodomänen-Helikase-DNA-bindendes Protein 8) und DNMT3B (DNA (Cytosin-5 -) - Methyltransferase 3 beta) einen Komplex bildet. Dieser Komplex unterdrückt durch

DNA-Methylierung die Transkription nahegelegener Gene [88]. Im Rahmen dieses *silenci- ngs* durch CIMP wird die Expression von AREG und EREG ebenfalls gehemmt. Dies würde erklären, wieso wir in BRAF V600E mutierten Tumorproben signifikant niedrige AREG und EREG-Expressionslevel messen konnten [89]. Wir konnten zwar keinen Zusammenhang zwischen der AREG/EREG-Expression und dem Outcome in Patienten mit BRAF V600E Mutation herstellen, jedoch waren die Fallzahlen relativ niedrig, sodass hier eine begrenzte Teststärke vorliegt und eine größere Fallzahl möglicherweise einen Effekt zutage bringen könnte.

Während die RAS-Mutation häufig gemeinsam mit einer APC-Mutation auftritt, findet sich die BRAF-Mutation nicht in Zellen mit RAS-Mutation, was eine funktionelle Redundanz bzw. Inkompatibilität nahelegt [90]. RAS-Mutationen sind mit linksseitigen Karzinomen und männlichem Geschlecht assoziiert und weisen eher eine Mikrosatellitenstabilität auf, Tumoren mit dieser Mutation sprechen auf eine Behandlung mit EGFR-Antikörper nicht an [91-93]. Im Gegensatz zu BRAF werden die RAS-Mutationen nicht mit DNA-Methylierung der AREG- und EREG-Gene assoziiert, es konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass sowohl die Gen-Methylierung als auch die konsekutive AREG-Expression unabhängig vom RAS-Mutationsstatus ist [94]. Weitere Studien haben gezeigt, dass das Ansprechen und Outcome bei einer Therapie mit anti-EGFR Antikörper im RAS-Wildtyp verbessert ist [75, 95, 96], diese Beobachtung konnten wir für eine Behandlung mit Oxaliplatin, Fluoropyrimidin und Bevacizumab nicht zeigen.

5.2.2 AREG und EREG haben keinen prognostischen Wert für das Ansprechen auf Oxaliplatin / Fluoropyrimidin-Bevacizumab

Mehrere Studien kommen zu dem Schluss, dass sowohl eine hohe AREG-Expression als auch eine hohe EREG-Expression mit einem längeren OS und PFS assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten deren Tumoren eine hohe AREG/EREG-Expression aufwiesen und RAS-Wildtyp waren unter einer anti-EGFR Therapie ein längeres OS haben [97]. Doch auch bei Patienten, welche eine reine Chemotherapie und keine anti-EGFR Antikörper erhielten, hatten AREG und EREG prognostischen Wert. In der FIRE1-Studie, bei der

5FU/Leucovorin plus Irinotecan bzw. Irinotecan plus Oxaliplatin als Erstlinientherapie verabreicht wurde, zeigte sich für hohe AREG und EREG-Expressionslevel ein verlängertes PFS und für hohe EREG-Expressionslevel ein verlängertes OS [76]. In unserer Arbeit, bei der die Therapie auf Oxaliplatin / Fluoropyrimidin-Bevacizumab beruhte, konnten wir keinen prognostischen Wert für die beiden EGFR-Liganden hinsichtlich des Ansprechens ORR und des PFS ableiten, lediglich für das OS sahen wir einen positiven Effekt. Für die Doppelwildtyp-Gruppe sah man interessanterweise im Watch & Wait Behandlungsarm für hohe AREG Spiegel einen Trend zum kürzeren PFS ($p = 0,09$). Hier sprechen wir jedoch von einer kleinen Kohorte, daher müssen diese Beobachtungen durch eine größere Fallzahl geprüft werden.

Betrachtet man die Eigenschaften der Liganden und ihre Rolle im EGFR-Signalweg, so ist ein Effekt ohne anti-EGFR Antikörper (reine Chemotherapie) nicht anzunehmen. Trotzdem konnte selbst für alleinige Chemotherapie eine Korrelation sowohl für das PFS als auch das OS gezeigt werden [76]. Es ist anzumerken, dass in der FIRE1-Studie Irinotecan als chemotherapeutisches Basismedikament verabreicht wurde, möglicherweise beschränkt sich der Vorteil hoher AREG und EREG-Expression hinsichtlich des PFS auf dieses spezielle Medikament.

Ein weiterer Grund für die fehlende Korrelation könnte sein, dass das PFS erst ab dem Zeitpunkt der Randomisierung erfasst wurde und diese erst sechs Monate nach Beginn der Behandlung erfolgte. Erlitten Patienten vor dem Zeitpunkt der Randomisierung einen Tumorprogress, so werden diese in unserer Studie nicht erfasst. Von den Patienten, welche vor der Randomisierung aus der Studie ausschieden, sind keine Daten zu AREG- oder EREG-Expression bekannt. Wären die Expressionsspiegel der Patienten mit frühem Tumorprogress niedrig, so würde das die Hypothese des positiven Effekts von AREG und EREG stützen.

5.2.3 AREG und EREG Expressionen korrelieren mit dem Gesamtüberleben

Wir konnten in unserer Studie eine eindeutige Korrelation zwischen der AREG- und EREG-Expression und dem OS herstellen. Worauf die Korrelation mit dem OS zurückzuführen ist, ist nicht abschließend geklärt. Patienten mit Tumorprogress sollten protokollgemäß eine Re-

Induktion erhalten, dies wurde jedoch nur in den wenigsten Fällen durchgeführt (19-46% der Patienten in Erhaltungstherapie erhielten eine Re-Induktion) [78]. Andererseits könnten Patienten mit RAS Wildtyp eine anschließende Therapie mit anti-EGFR Antikörpern erhalten haben, beides könnte sich auf das OS auswirken und muss bei der Interpretation der Daten bedacht werden. Dies konnte bei der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt werden aufgrund fehlender Information.

Patienten mit RAS- und BRAF-Wildtyp, welche sich einer Therapie mit Fluoropyrimidin / Oxaliplatin / Bevacizumab unterziehen, profitieren von hohen AREG- und EREG-Expressionsniveaus in Form eines signifikant höheren OS. Dies deckt sich mit mehreren bereits veröffentlichten Studien, welche der AREG- und EREG-Expression einen prognostischen Wert zuschreiben [97].

Da der prognostische Effekt von AREG- und EREG-Spiegeln mit BRAF- und RAS-Mutationen korreliert, stellt sich die Frage, ob niedrige AREG- oder niedrige EREG-Expressionsniveaus als Ersatzbiomarker für einen automatisch aktivierten (z. B. durch Mutationen) EGFR-Weg angesehen werden können.

5.3 Fehlende Daten der AIO KRK 0207 Studie

Es wurde im Rahmen dieser Studie weder auf PIK3CA-Mutationen getestet, noch haben wir Daten zur PTEN- oder cMET-Expression. Die aktuellen Analysen sind außerdem aufgrund ihres retrospektiven Charakters und der Anzahl der verfügbaren Proben begrenzt. Von initial 837 Studienteilnehmern wurden nur 472 (56%) randomisiert. Tumorproben konnten jedoch nur von knapp 40% der initialen Studienteilnehmer ausgewertet werden. Von den restlichen 60% gibt es folglich keine Daten zur AREG und EREG-Expression. Da in dieser Studie nur Patienten erfasst wurden, welche eine Erhaltungstherapie erhielten, fehlen zudem die PFS-Daten für Patienten, welche einen Tumorprogress vor der Randomisierung zeigten. Dieser

massive Datenverlust kann eine Verzerrung der Ergebnisse und der prognostischen Wertigkeit von AREG und EREG bedeuten, besonders hinsichtlich des PFS, daher sind die hier gezeigten Daten mit Vorsicht zu interpretieren.

5.4 Ausblick

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und dem Wissen, dass AREG und EREG im Rahmen anderer Therapieregimes prognostischen Wert haben, stellt sich die Frage, inwiefern das therapeutisch genutzt werden kann. Dazu müssen die molekularbiologischen Mechanismen zunächst geklärt werden, um aus einer Korrelation eine Kausalität herzustellen zu können. Sobald die genauen Mechanismen der AREG- und EREG-Regulierung und ihr Zusammenhang mit dem Outcome beim mKRK entschlüsselt sind, können neue Therapieansätze basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelt werden. Ein Ansatz untersuchte beispielsweise die Gen-Methylierung des AREG-Gens, welche bei BRAF-Mutation, einer Mutation mit bekanntermaßen niedriger AREG-Expression, erhöht ist. Leider konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhter Gen-Methylierung und dem Outcome hergestellt werden, auch wenn eine starke inverse Korrelation zur AREG-Expression bestand [94]. Dies zeigt die Komplexität der Genregulierung auf und motiviert zur weiteren Forschung.

6 Zusammenfassung/Schluss

In dieser Arbeit untersuchten wir anhand der AIO KRK 0207 Studie den Einfluss der Expression der EGFR-Liganden AREG und EREG auf die relevanten Studienendpunkte Tumorsprechen (ORR), progressionsfreies (PFS) und Gesamtüberleben (OS). Dazu korrelierten wir die Expression der Liganden mit dem Outcome (PFS, OS) der Gesamtpopulation sowie der Subpopulationen in Abhängigkeit von Therapiearm (Fluoropyrimidin + Bevacizumab vs. Bevacizumab vs. Keine Erhaltung) und Mutationsstatus (BRAFV600E und RAS).

Um die Expression von AREG und EREG bestimmen zu können, gewannen wir RNA aus Tumorproben und wandelten sie mittels Reverse-Transkriptase in cDNA um, damit wir diese mittels PCR amplifizieren konnten. Es konnten insgesamt 331 Tumorproben ausgewertet werden.

Die Expressionen von AREG und EREG waren in BRAFV600E mutierten Tumoren signifikant niedriger als in BRAF Wildtyp Tumoren. Für RAS mutierte Tumoren konnte das nicht gezeigt werden. Wir konnten einen direkten Zusammenhang zwischen den AREG- und EREG-Expressionen und dem OS herstellen ($p = 0,003$ und $p = 0,001$). Diese Korrelationen waren jedoch auf die Doppelwildtyp (RASwt und BRAFV600Ewt) Population beschränkt. Sobald eine RAS- oder BRAF-Mutation vorhanden war, verschwand der prognostische Wert. Für das PFS konnte weder in der Gesamtpopulation noch in einer der Subpopulationen ein signifikanter Vorteil bezogen auf die AREG- und EREG-Expression gesehen werden.

Wir konnten in dieser Arbeit bestätigen, was bereits andere Studien zeigten, nämlich dass AREG- und EREG bei Doppelwildtypumoren einen prognostischen Wert besitzen. Zudem konnten wir zeigen, dass niedrige AREG- und EREG-Niveaus mit einer BRAFV600E-Mutation assoziiert sind. Es bleibt offen, was die dahinterliegenden Mechanismen sind und inwiefern die Expression der EGFR-Liganden in Zukunft zur Therapie oder Prognosebestimmung einsetzen kann.

7 Abkürzungsverzeichnis

5 – FU	5 – Fluoruracil
AKT	proteinkinase B
APC	adenomatous polyposis coli
AREG	Amphiregulin
BACH1	Transkriptionsregulatorgen BACH1
Bev	Bevacizumab
BRAFV600Ewt	BRAFV600E Wildtyp
c- Src	cellular sarcoma inducing
CAPRI	Capecitabin + Irinotecan
CAPOX	Capecitabin + Oxaliplatin
cDNA	complementary DNA
CHD8	Chromodomänen-Helikase-DNA-bindendes Protein 8
CIN	chromosomale Instabilität
CIMP	CpG – Island – Methylierungsphänotyp
Cp	crossing point
DCC	deleted in colon cancer
DNMT3B	DNA (Cytosin-5 -) - Methyltransferase 3 beta
DWT	Doppelwildtyp
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR	Epidermal Groth Factor Rezeptor
EREG	Epiregulin
ERK	extracellular signal – regulated kinase
FA	Folinsäure
FAK	focal adhesion kinase
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FAM	Fluoreszenzfarbstoff
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded tissue
FGF – 19	fibroblast growth factor 19
FP	Fluoropyrimidin
FOLFIRI	5 – Fluoruracil/ Folinsäure + Irinotecan
FOLFOX	5 – Fluoruracil/ Folinsäure + Oxaliplatin
FOLFOXIRI	5 – Fluoruracil/ Folinsäure + Oxaliplatin + Irinotecan
FRET	Förster – Resonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	genes of interest
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HR	hazard ratio
IgE	Immunglobulin E

IL- 3	Interleukin 3
IxOx	Irinotecan + Oxaliplatin
IQR	Interquartile range (Interquartilsabstand)
JNK	Janus kinase
KI	Konfidenzintervall
KRAS	kirsten rat sarcoma virus
LOH	loss of heterozygosity
mAKs	monoklonale Antikörper
MAFG	transcription factor MafG
MAPK	mitogen activated protein kinase
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSIh	hohe Mikrosatelliteninstabilität
MMR	mismatch repair
MLH1	mutL homolog 1
MSH2	mutS homolog 2
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OD	optische Dichte
ORR	overall response rate

OS	Gesamtüberleben (overall survival)
Ox	Oxaliplatin
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFS	progressfreies Überleben (progress-free survival)
PIK3CA	phosphatidyl – inositol – 3 – kinase
PLC	phospholipase C
RASwt	rat sarcoma Wildtyp
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RECIST	respond evaluation criteria in solid tumors
RT – qPCR	Real – Time quantitative PCR
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF α	<i>transforming growth factor alpha</i> TNM
UICC	Union internationale contre le cancer
UPL	universal probe library
VEGF	Vascular Epithelial Groth Factor
YWHAZ	tyrosine 3 – monoxygenase/tryptophan 5- monoxygenase activation protein zeta

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz (oben) und die Mortalität (unten) des KRK weltweit.....	2
Abbildung 2: Vogelstein-Modell.....	5
Abbildung 3: EGFR-Signalwege.....	14
Abbildung 4: AIO KRK-0207 Studiendesign	18
Abbildung 5: drei ungefärbte Tumorpräparate, das Tumorareal wurde eingezeichnet.....	19
Abbildung 6: optische RNA-Konzentrationsmessung im NanoDrop	22
Abbildung 7: Real-time quantitative PCR mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher.....	26
Abbildung 8: exponentielle PCR-Kurve.....	26
Abbildung 9: Consort-Flussdiagramm der AIO KRK 0207.....	30
Abbildung 10: Consort-Flussdiagramm.	31
Abbildung 11: Einfluss von AREG auf das PFS (links) und das OS (rechts) hinsichtlich der Gesamtpopulation.....	37
Abbildung 12: Einfluss von AREG auf das das PFS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in AREG hoch/high (links) und AREG niedrig/low (rechts).....	38
Abbildung 13: Einfluss von AREG auf das das OS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in AREG hoch (links) und AREG niedrig (rechts).	39
Abbildung 14: Effekt von logAREG auf PFS und OS.....	40
Abbildung 15: Einfluss von EREG auf das PFS (links) und das OS (rechts) hinsichtlich der Gesamtpopulation.....	41
Abbildung 16: Einfluss von EREG auf das das PFS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in EREG hoch/high (links) und EREG niedrig/low (rechts).....	42

Abbildung 17: Einfluss von EREG auf das OS hinsichtlich der Behandlungsarme, unterteilt in EREG hoch/high (links) und EREG niedrig/low (rechts).....	43
Abbildung 18: Effekt von logEREG auf PFS und OS.....	44
Abbildung 19: AREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab plus FP hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).....	45
Abbildung 20: AREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).....	46
Abbildung 21: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts)Abbildung 22: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm hinsichtlich des PFS (links) und dem OS (rechts).....	47
Abbildung 23: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab plus FP im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).....	48
Abbildung 24: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).	48
Abbildung 25: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab in der RAS-Wildtyp Subpopulation im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).	49
Abbildung 26: EREG-Einfluss auf die Erhaltungstherapie mit Bevacizumab in der RAS-mutierten Subpopulation im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).	50
Abbildung 27: AREG-Einfluss auf den Watch & Wait Arm im Hinblick auf das PFS (links) und das OS (rechts).	51
Abbildung 28: Effekt von logAREG auf das OS und PFS der DWT-Population.....	52
Abbildung 29: Effekt von logEREG auf das OS und PFS der DWT-Population.	53

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der UICC	7
Tabelle 2: Pipettierschema Mastermix reverse Transkription.....	23
Tabelle 3: Basismerkmale des Gesamtstudienkollektivs in Bezug auf AREG- und EREG-Expression	33
Tabelle 4: Basismerkmale der Patienten mit Doppelwildtyp Status in Bezug auf AREG- und EREG-Expression.....	33
Tabelle 5: Basismerkmale der Patienten mit Mutation im RAS-Gen in Bezug auf AREG- und EREG-Expression.....	34
Tabelle 6: Basismerkmale der Patienten mit Mutation im BRAF-Gen in Bezug auf AREG- und EREG-Expression.....	35
Tabelle 7: Einfluss von AREG- und EREG-Expression auf das Therapieansprechen (ORR)	36

10 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Stintzing für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Ich bedanke mich für seine Unterstützung und langanhaltende Bereitschaft mich durch die Arbeit zu begleiten.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Einarbeitung in die Untersuchungsmethoden und die tatkräftige Unterstützung bei Schwierigkeiten.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern Iveta und Andrey für die bedingungslose Liebe und Ermutigung durch alle Lebenslagen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, bei meinem Ehemann Christian und meiner Tochter Elisa für ihre Geduld und ihr Verständnis und dafür, dass sie mein Leben jeden Tag bereichern.

11 Lebenslauf

12 Eidesstattliche Erklärung



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

David, Boryana Andreeva

Name, Vorname

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

Die Rolle der Amphiregulin und Epiregulin Genexpression bei Oxaliplatin/Fluoropyrimidin plus Bevacizumab behandelten Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom – eine Analyse der Phase III AIO KRK-0207 Studie

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

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

Planegg, den 24.10.2024

Ort, Datum

Boryana David

Unterschrift Boryana Andreeva David

13 Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft*

der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021

ISBN 978-3-89606-309-0, DOI 10.25646/8353.

2. Herbst, A. and F.T. Kolligs, *Detection of DNA hypermethylation in remote media of patients with colorectal cancer: new biomarkers for colorectal carcinoma*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(2): p. 297-305.

3. Douaiher, J., et al., *Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations*. *J Surg Oncol*, 2017.

4. Organisation, W.H. *Estimated age-standardized mortality/incidence rates (World) in 2020, colorectum, both sexes, all ages*. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=41&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=41&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D

5. McQuade, R.M., et al., *Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches*. *Curr Med Chem*, 2017.

6. Tauriello, D.V., et al., *Determinants of metastatic competency in colorectal cancer*. *Mol Oncol*, 2017. **11**(1): p. 97-119.

7. Mundade, R., et al., *Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer*. *Oncoscience*, 2014. **1**(6): p. 400-6.

8. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. *Lancet*, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.

9. Pedersen, A., C. Johansen, and M. Gronbaek, *Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 861-7.

10. Reid, M.E., et al., *Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(10): p. 1006-11.
11. Cannon, J., *Colorectal Neoplasia and Inflammatory Bowel Disease*. *Surg Clin North Am*, 2015. **95**(6): p. 1261-9, vii.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
14. Muto, T., H.J. Bussey, and B.C. Morson, *The evolution of cancer of the colon and rectum*. *Cancer*, 1975. **36**(6): p. 2251-70.
15. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(9): p. 525-32.
16. Jass, J.R., et al., *Emerging concepts in colorectal neoplasia*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(3): p. 862-76.
17. Jass, J.R., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. *Histopathology*, 2007. **50**(1): p. 113-30.
18. Fishel, R. and R.D. Kolodner, *Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. **5**(3): p. 382-95.
19. Lynch, H.T. and A. de la Chapelle, *Hereditary colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(10): p. 919-32.
20. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2059-72.
21. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. *Nature*, 1992. **359**(6392): p. 235-7.
22. Migliore, L., et al., *Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 792362.
23. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K. and AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie ,S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 1.1*.
. 2014.
24. Nordlinger, B., et al., *Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1007-16.
25. Flieger, D., R. Keller, and W. Fischbach, *[Palliative treatment for colorectal cancer]*. *Internist (Berl)*, 2004. **45**(7): p. 786-94.
26. Sorich, M.J., et al., *Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(1): p. 13-21.

-
27. Weiss, A. and P. Nowak-Sliwinska, *Current Trends in Multidrug Optimization*. J Lab Autom, 2016: p. 2472630316682338.
28. Grothey, A., et al., *Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1209-14.
29. Heidelberger, C., et al., *Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds*. Nature, 1957. **179**(4561): p. 663-6.
30. 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.
31. 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.
32. Porschen, R., et al., *Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(27): p. 4217-23.
33. Douillard, J.Y., *Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer*. Oncology (Williston Park), 2000. **14**(12 Suppl 14): p. 51-5.
34. 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.
35. Bokemeyer, C., et al., *Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(5): p. 663-71.
36. Maughan, T.S., et al., *Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2103-14.
37. Bokemeyer, C., et al., *FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2015. **51**(10): p. 1243-52.
38. Roviello, G., et al., *The role of bevacizumab in solid tumours: A literature based meta-analysis of randomised trials*. Eur J Cancer, 2017. **75**: p. 245-258.
39. 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.
40. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
41. 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.

42. Chang, S.C., et al., *Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(7): p. 1721-7.
43. 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.
44. Douillard, J.Y., et al., *Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(31): p. 4697-705.
45. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1626-34.
46. Bublil, E.M. and Y. Yarden, *The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 124-34.
47. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2787-99.
48. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.
49. Schonemann, K.R., et al., *Phase II study of biweekly cetuximab in combination with irinotecan as second-line treatment in patients with platinum-resistant gastro-oesophageal cancer*. Eur J Cancer, 2012. **48**(4): p. 510-7.
50. Goldstein, N.S. and M. Armin, *Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system*. Cancer, 2001. **92**(5): p. 1331-46.
51. Mendelsohn, J., *Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy*. J Clin Oncol, 2002. **20**(18 Suppl): p. 1s-13s.
52. Yacoub, A., et al., *Epidermal growth factor and ionizing radiation up-regulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling*. Radiat Res, 2003. **159**(4): p. 439-52.
53. Zamah, A.M., et al., *Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin*. Hum Reprod, 2010. **25**(10): p. 2569-78.
54. Nam, K.T., et al., *Amphiregulin-deficient mice develop spasmodic polypeptide expressing metaplasia and intestinal metaplasia*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1288-96.
55. Berasain, C., et al., *Novel role for amphiregulin in protection from liver injury*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19012-20.
56. Berasain, C., et al., *Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 424-32.

-
57. Stoll, S.W., et al., *Metalloproteinase-mediated, context-dependent function of amphiregulin and HB-EGF in human keratinocytes and skin*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(1): p. 295-304.
58. Stoll, S.W., et al., *Amphiregulin carboxy-terminal domain is required for autocrine keratinocyte growth*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(8): p. 2031-40.
59. Berasain, C. and M.A. Avila, *Amphiregulin*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **28**: p. 31-41.
60. Yamane, S., et al., *Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients*. J Inflamm (Lond), 2008. **5**: p. 5.
61. Willmarth, N.E. and S.P. Ethier, *Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37728-37.
62. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1869-81.
63. Latasa, M.U., et al., *Regulation of amphiregulin gene expression by beta-catenin signaling in human hepatocellular carcinoma cells: a novel crosstalk between FGF19 and the EGFR system*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52711.
64. Castillo, J., et al., *Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6129-38.
65. Eckstein, N., et al., *Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 739-50.
66. Watanabe, T., et al., *Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes*. Eur J Cancer, 2010. **46**(11): p. 2119-26.
67. Nicholson, B.E., et al., *Profiling the evolution of human metastatic bladder cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7813-21.
68. Zhang, J., et al., *Intratumoral epiregulin is a marker of advanced disease in non-small cell lung cancer patients and confers invasive properties on EGFR-mutant cells*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(3): p. 201-7.
69. Shigeishi, H., et al., *Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas*. Oncol Rep, 2008. **19**(6): p. 1557-64.
70. Zhao, M., et al., *Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(2): p. 239-44.
71. Riese, D.J., 2nd and R.L. Cullum, *Epiregulin: roles in normal physiology and cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **28**: p. 49-56.

72. Takahashi, M., et al., *Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2003. **108**(20): p. 2524-9.
73. Khambata-Ford, S., et al., *Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(22): p. 3230-7.
74. Seligmann, J.F., et al., *Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer*. *JAMA Oncol*, 2016.
75. Jacobs, B., et al., *Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(30): p. 5068-74.
76. Stahler, A., et al., *Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial)*. *Int J Cancer*, 2016. **138**(3): p. 739-46.
77. Stintzing, S., et al., *Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survival (OS) in Oxaliplatin/Fluoropyrimidine Plus Bevacizumab Treated mCRC Patients-Analysis of the Phase III AIO KKK-0207 Trial*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 474.
78. 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.
79. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. *J Biotechnol*, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
80. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(3): p. 389-95.
81. Tang, Z., et al., *Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester*. *J Bioenerg Biomembr*, 2012. **44**(1): p. 117-25.
82. Bednarz-Misa, I., et al., *Whole blood ACTB, B2M and GAPDH expression reflects activity of inflammatory bowel disease, advancement of colorectal cancer, and correlates with circulating inflammatory and angiogenic factors: Relevance for real-time quantitative PCR*. *Adv Clin Exp Med*, 2020. **29**(5): p. 547-556.
83. Spalenza, V., et al., *Identification of internal control genes for quantitative expression analysis by real-time PCR in bovine peripheral lymphocytes*. *Vet J*, 2011. **189**(3): p. 278-83.
84. Wheeler, D.L., E.F. Dunn, and P.M. Harari, *Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010. **7**(9): p. 493-507.
85. Rajagopalan, H., et al., *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. *Nature*, 2002. **418**(6901): p. 934.
86. Morkel, M., et al., *Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance*. *Oncotarget*, 2015. **6**(25): p. 20785-800.

87. Phipps, A.I., et al., *Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival*. Gastroenterology, 2015. **148**(1): p. 77-87.e2.
88. Fang, M., et al., *The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype*. Mol Cell, 2014. **55**(6): p. 904-915.
89. Lee, M.S., et al., *Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2016. **114**(12): p. 1352-61.
90. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 330-7.
91. Yamauchi, M., et al., *Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum*. Gut, 2012. **61**(6): p. 847-54.
92. Bae, J.M., et al., *Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location*. Br J Cancer, 2013. **109**(4): p. 1004-12.
93. 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.
94. Bormann, F., et al., *Epigenetic regulation of Amphiregulin and Epiregulin in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2019. **144**(3): p. 569-581.
95. Seligmann, J.F., et al., *Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer*. JAMA Oncol, 2016. **2**(5): p. 633-642.
96. Jonker, D.J., et al., *Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer*. Br J Cancer, 2014. **110**(3): p. 648-55.
97. Jing, C., et al., *Prognostic value of amphiregulin and epiregulin mRNA expression in metastatic colorectal cancer patients*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 55890-55899.

14 Publikation

Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survivor (OS) in Oxaliplatin/Fluoropyrimidine plus Bevacizumab Treated mCRC Patients – Analysis of the Phase III AIO KRK-0207 Trial

Stintzing S, Ivanova B, Ricard I, Jung A, Kirchner T, Tannapfel A, Juette H, Hegewisch-Becker S, Arnold D, Reinacher-Schick A.

Frontiers of Oncology, 08. November 2018