

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Bestimmung molekularer Subtypen basierend auf mRNA-Genexpression in
Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom unter sequenzieller vs.
kombinierter Therapie mit Fluoropyrimidin, Irinotecan und Bevacizumab –
XELAVIRI Studie (AIO KRK 0110)***

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

vorgelegt von
Veronika Franziska Schuster

aus
Schongau

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Jung

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Eigler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	5
1.1 Das kolorektale Karzinom	5
1.2 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms	6
1.2.1 Erstlinientherapie der nicht-resektablen Erkrankung fitter Patienten	7
1.2.2 Weitere Therapielinien der nicht-resektablen Erkrankung fitter Patienten.....	9
1.2.3 Therapie nicht-fitter Patienten	10
1.2.4 Therapie älterer Patienten.....	10
1.3 Molekulare Biomarker	14
1.4 Primärtumorlokalisierung	15
1.5 Genexpressionsbasierte Sub-Klassifikation	16
1.6 Die XELAVIRI-Studie	18
2. Zielsetzung	20
3. Studiendesign und Methoden	21
3.1 XELAVIRI-Studie.....	21
3.2 Methoden	24
3.2.1 RNA-Isolation	24
3.2.2 mRNA-Genexpression	25
3.2.3 CMS-Klassifikation.....	27
3.2.4 Statistische Auswertung.....	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Patienten- und Tumorcharakteristika	30
4.2 CMS-Verteilung	33
4.3 Überlebensanalysen.....	38
4.3.1 Prognostischer Einfluss von CMS	38
4.3.2 Prädiktive Aussagekraft von CMS	42
4.4 Uni- und multivariate Regressionsanalysen.....	46
5. Diskussion	52
5.1 CMS-Klassifikation.....	52
5.1.1 Methodik.....	52
5.1.2 Prävalenz von CMS und Assoziation mit Patienten-/Tumorcharakteristika	54
5.2 Prognostische Aussagekraft von CMS.....	55
5.3 Bedeutung von CMS als prädiktiver Biomarker	56
5.4 Relevanz von CMS im klinischen Kontext	57

5.5	Stärken und Limitationen dieser Arbeit	58
6.	Zusammenfassung	60
7.	Abstract (English)	61
	Literaturverzeichnis	62
	Abbildungsverzeichnis	71
	Tabellenverzeichnis	72
	Abkürzungsverzeichnis	73
	Anhang:	75
	Ausführliche Protokolle	75
	Material	76
	Tabellen/Abbildungen	78
	Danksagung	87
	Affidavit	88
	Publikationsliste	89

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist die dritthäufigste maligne Tumorentität weltweit und ist die am zweithäufigsten letal verlaufende Tumorerkrankung.¹ In Deutschland ist laut dem Robert Koch-Institut ca. jede achte Krebsdiagnose auf das Kolon bzw. Rektum zurückzuführen. Die Inzidenz ist bei Männern geringfügig höher als bei Frauen. Unterdessen werden mehr als 50 % der Diagnosen im Alter von über 70 Jahren gestellt.² Die relative 5-Jahres-Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms liegt bei 64 %, wobei diese stark vom Tumorstadium bei Diagnosestellung abhängig ist. So weist ein lokal begrenztes Karzinom eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 90 % auf, wohingegen jene der Fernmetastasierung bei lediglich 14 % liegt. Mangelnde Symptome im Frühstadium untermauern die Wichtigkeit eines Screenings zur Tumordetektion und -prävention.³ Den leitliniengerechten Standard stellt hierbei die Koloskopie dar, die das Auffinden von existierenden Läsionen und einer eventuellen zeitgleichen Abtragung dieser ermöglicht. Als nicht-invasive Alternative kann auf den fäkal okkulten Bluttest (FOBT) zurückgegriffen werden, welcher nicht sichtbares Blut im Stuhl detektiert. Im Falle eines positiven Testergebnisses ist eine komplette endoskopische Untersuchung des Kolons erforderlich.⁴⁻⁶ Bei Erstdiagnose weisen bereits mehr als 20 % der Patienten ein metastasiertes Tumorstadium auf (synchrone Metastasierung). Im Verlauf kommt es bei bis zu 25 % der initial lokal begrenzten Karzinome zu einer metachronen Metastasierung, dies meint das Auftreten von Fernmetastasen mit zeitlicher Latenz.⁷

Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, hängt von Faktoren bezüglich des Lebensstils bzw. Verhaltens sowie von genetischen Prädispositionen ab. So zählen Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, regelmäßiger Alkoholkonsum und häufiger Verzehr von verarbeitetem bzw. rotem Fleisch zu den wichtigsten Risikofaktoren.^{2,6} Des Weiteren kann ätiologisch zwischen sporadischen und hereditären Formen unterschieden werden. Hereditäre kolorektale Karzinome sind selten (< 5 %) und können in das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC/ Lynch-Syndrom) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) unterteilt werden.⁵ Bei HNPCC handelt es sich um ein Tumorsyndrom, welches autosomal-dominant vererbt wird und auf Genmutationen im Mismatch-Reparatursystem (MMR) der DNA zurückzuführen ist. Auf Grundlage dieser genetischen Disposition steigt das Risiko einer Tumorerkrankung, im Besonderen von Kolorektal- bzw. Endometriumkarzinomen, stark an. Infolge des defekten DNA-Reparatursystems werden Fehler während der Replikation nicht erkannt, wodurch u.a. Längenveränderungen in den Mikrosatelliten (kurze repetitive DNA-Sequenzen) entstehen bzw. bestehen bleiben (Mikrosatelliteninstabilität, MSI). Ein fehlerhaftes Reparatursystem kann jedoch auch unabhängig von einer erblichen Komponente (Keimbahnmutation) entstehen. So kann eine somatische *BRAF*-Mutation bei kolorektalen Karzinomen ebenfalls zu einer solchen Pathologie führen (näheres siehe Biomarker).^{8,9} Das Charakteristikum der

klassischen FAP beschreibt das Auftreten von mehr als 100 kolorektalen Adenomen, wodurch die Wahrscheinlichkeit ein Karzinom zu entwickeln bei fast 100 % liegt.⁵

Die Pathogenese der meisten kolorektalen Karzinome ist auf klassische Adenome oder sessile serratierte Polypen zurückzuführen (70–90 %). In wiederholten genetischen und epigenetischen Ereignissen, welche einem sequenziellen Muster folgen, kommt es zur malignen Entartung (Adenom-Karzinom-Sequenz).¹⁰ Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch das Hervorbringen einer der beiden Hauptcharakteristika kolorektaler Karzinome (KRK), der Chromosomeninstabilität und/oder der Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Der MSI kommt hierbei, mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von ca. 15 % in Bezug auf die Gesamtheit aller KRK und mit lediglich 4–5 % im metastasierten Stadium, eine untergeordnete Rolle zu. Diese Instabilitäten erzeugen Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie APC und TP53 sowie in Onkogenen wie *KRAS*, *NRAS*, *PI3KCA* und *BRAF*, die wiederum die Krebsentstehung vorantreiben.^{11, 12} Prädisponierend für eine maligne Entartung sind maßgeblich

- eine Adenomgröße von > 1 cm,
- das Vorhandensein multipler Adenome (≥ 3 Polypen),
- eine villöse Histologie sowie
- eine hochgradige dysplastische Veränderungen.^{5, 11}

1.2 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Die Wahl des individuellen Therapiekonzepts bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) erfolgt unter Berücksichtigung klinischer und molekularpathologischer Parameter. Hierbei sind der Allgemeinzustand und Wille des Patienten, sowie die Charakteristika des Tumors (Stadium, Tumorlast, Molekularbiologie) und des Behandlungsverfahrens (Toxizitätsprofil, Therapieziel) zu berücksichtigen. Anhand dieser Faktoren ist im metastasierten Erkrankungsstadium zu entscheiden, ob ein Patient für eine intensive Therapie (Kombination von zwei oder drei Zytostatika + Biologikum) geeignet ist oder auf ein weniger intensives Verfahren zurückgegriffen werden muss und welche Substanzen verwendet werden. Anschließend sind Behandlungsziel und Behandlungsstrategie festzulegen.^{5, 9, 13} Folgend der aktuellen Leitlinie der European Society for Medical Oncology (ESMO) ist bei der Strategieplanung wie folgt vorzugehen (vereinfachte Darstellung)⁹:

- Bei resektablen Metastasen und Oligometastasierung: Operative Resektion +/- perioperative Chemotherapie
- Bei initial nicht resektablen Metastasen: nach Tumor- und Patientencharakteristika (Molekularpathologie, Primärtumorlokalisation, Alter, Allgemeinzustand) optimierte Chemotherapie, um resektablen Zustand zu erreichen (Konversionstherapie)

- Bei nicht resektablen Metastasen:
 - Intensive Chemotherapie bei fitten Patienten mit Tumor-assoziierten Symptomen und/oder starker Krankheitsprogression
 - Weniger intensive Therapie bei Patienten mit Komorbiditäten oder asymptomischem Tumor

1.2.1 Erstlinientherapie der nicht-resektablen Erkrankung fitter Patienten

Zytostatische Therapie

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der nicht-resektablen Erkrankung wurde durch kontinuierliche Fortschritte in der medikamentösen Therapie über die letzten 15 Jahre signifikant gesteigert.¹⁴ Die Erstlinientherapie weist die höchste Effektivität in Bezug auf Therapieansprechen und progressionsfreies Überleben (progression-free survival, PFS) auf.¹⁵ Das derzeitige Grundprinzip in dieser Situation stellt eine Kombination aus klassischen Zytostatika (5-Fluoruracil bzw. Capecitabin, Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan) mit zielgerichteten Agentien dar. Dabei sind im Hinblick auf die notwendige Therapieintensität der Allgemeinzustand des Patienten sowie die Tumorcharakteristika (Molekularpathologie, Primärtumorlokalisation) zu berücksichtigen.^{5, 9, 13}

Die historische Entwicklung der mKRK-Therapie begann mit der intravenösen Bolus-Gabe des Fluoropyrimidins 5-Fluoruracil (5-FU), dessen Aktivität durch das Hinzuziehen von Folinsäure (Leucovorin) gesteigert werden konnte.^{16, 17} Eine kontinuierliche Infusion von 5-FU verbesserte das Toxizitätsprofil sowie die Effektivität deutlich.¹⁸ Zu Beginn des neuen Jahrtausends wurde eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (overall survival, OS) von etwa 12 Monaten auf 15–19 Monate durch Kombinationschemotherapien (5-FU/Leucovorin-Therapie plus Irinotecan oder Oxaliplatin) erzielt.^{19, 20}

Das Pyrimidinanalogon 5-FU, bzw. dessen oral verabreichbare Vorstufe Capecitabin, inhibiert die Thymidilat-Synthase, ein wichtiges Enzym im Zyklus der DNA-Replikation. Durch die parallele Applikation von Folinsäure wird eine Verstärkung der Inhibition erzielt.^{16, 21} Das Alkylanz Oxaliplatin bewirkt eine Quervernetzung der DNA. Bei Irinotecan handelt es sich um einen Inhibitor der Topoisomerase I, ein Enzym, welches Topologieänderungen in der DNA herbeiführt.^{22, 23} All diese Substanzen inhibieren somit die DNA-Synthese bzw. deren Replikation, wodurch das Wachstum und die Teilung der Zelle verhindert werden. Neben allgemeinen Nebenwirkungen durch die systemische Therapie kann die Lebensqualität der Patienten vorrangig durch (late-onset) Diarrhoe (Irinotecan), periphere sensorische Neuropathie (Oxaliplatin) und Neutropenie (alle Substanzen) beeinflusst werden.²⁴

Folgende Kombinationstherapien werden derzeit von nationalen und internationalen Leitlinien empfohlen^{5, 9}:

- FOLFIRI bzw. CAPIRI (Fluoropyrimidin plus Irinotecan)
- FOLFOX bzw. CAPOX (Fluoropyrimidin plus Oxaliplatin)
- FOLFOXIRI (Fluoropyrimidin plus Irinotecan plus Oxaliplatin)

Die Wahl des Schemas (Doublette oder Triplet) richtet sich nach dem Allgemeinzustand, der Vorthherapie des Patienten und der Molekularbiologie des Tumors. Das Triplet FOLFOXIRI zeigt ein erhöhtes Toxizitätsprofil und ist nach derzeitiger Studienlage nur für fitte Patienten in gutem Allgemeinzustand, welche einen rechtsseitigen Primärtumor und/oder eine *RAS/BRAF*-Mutation aufweisen, in Erstlinientherapie geeignet. In allen anderen Fällen ist eine Doublette zu wählen.²⁵⁻²⁹ Vor dem Einsatz zielgerichteter Therapien (s.u.) wurden sequenzielle Therapieeskalationen (Verwendung weiterer Therapeutika bei Krankheitsprogress) gegenüber einer initialen Kombinationstherapie verglichen. Die Daten der CAIRO, MRC-FOCUS und FFCD-2000-05 Studien zeigten, dass die initialen Kombinationstherapien nicht mit höherer Effektivität, jedoch mit geringerer Tolerabilität, verglichen zu den sequenziellen Therapieeskalationen, assoziiert sind.³⁰⁻³²

Zielgerichtete Therapie

Die Erweiterung der chemotherapeutischen Basis mittels biologischer Tumortheraeutika ermöglicht eine zielgerichtete Therapie („targeted therapy“). Diese Agentien richten sich explizit gegen biologische Charakteristika maligner Zellen, durch welche sie sich von normalen Körperzellen unterscheiden. Hierbei sind die Angriffspunkte vor allem Komponenten aus der Signalkaskade der Proliferation, wie überexprimierte bzw. mutierte Wachstumsrezeptoren oder Tyrosinkinasen.²⁴

Insbesondere monoklonale Antikörper bzw. Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) sowie den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) finden Verwendung. Diese Antikörper verhindern die Angiogenese, Proliferation, Migration und Metastasierung des Tumors.^{33, 34}

In der Therapie des mKRK zeigt Bevacizumab als anti-angiogenetischer Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor eine Verbesserung des progressions-freien Überlebens in der Erstlinientherapie in Kombination mit Fluoropyrimidinen.^{5, 35, 36}

Zu den EGFR-Antikörpern der mKRK-Therapie zählen Cetuximab und Panitumumab, deren Kombination mit einer Chemotherapie die Prognose in *RAS*-Wildtyp Tumoren (OS und PFS) verbesserte. Hierbei scheint sich der Nutzen v.a. auf primär linksseitig Tumore zu beschränken.³⁷⁻³⁹ Die beiden Substanzen Cetuximab und Panitumumab sind als gleichwertig anzusehen.^{5, 38}

Einen weiteren zielgerichteten Behandlungsansatz bieten Checkpoint-Inhibitoren, die die Immunzellaktivität steigern. Hierzu zählen Antikörper gegen den Immun-Checkpoint-Rezeptor PD-1 (programmed cell death protein) auf T-Zellen (z.B. Nivolumab oder Pembrolizumab) sowie gegen das Oberflächenprotein CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) (z.B. Ipilimumab). Die Inhibition

verhindert den durch die Rezeptoraktivierung ausgelösten programmierten Zelltod und führt dadurch zu einer verbesserten Immunantwort.^{24, 40} Insbesondere Tumore mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) und/oder hoher Mutationslast (tumor mutational burden, TMB) sprechen auf eine Checkpoint-Inhibition an.^{41, 42 43} Seit August 2021 ist Pembrolizumab für diese Tumore in der Erstlinientherapie aufgrund der Ergebnisse der KEYNOTE-177-Studie⁴⁴ zugelassen.^{5, 45}

Ein ebensolches Vorgehen wird bei der Therapeutikakombination Trastuzumab/Lapatinib (Humaner HER2-Anikörper/Tyrosinkinaseinhibitor) empfohlen. Im Falle einer Therapierefraktärität (gemäß *RAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus) und einer vorliegenden Überexpression und/oder Amplifikation von HER-2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) mit *KRAS*-Wildtyp-Status zeigte sich diese Behandlung als effektiv^{46, 47}. Ein möglicher Einsatz sollte evaluiert werden, wobei eine offizielle Zulassung für das mKRK derzeit nicht vorliegt.⁵

1.2.2 Weitere Therapielinien der nicht-resektablen Erkrankung fitter Patienten

Im Falle eines Krankheitsprogresses nach erfolgter Erstlinientherapie ist, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ein Wechsel des zytostatischen Backbones (Irinotecan zu Oxaliplatin bzw. vice versa) anzuraten.⁹

Die Anti-VEGF-Therapie mittels Bevacizumab zeigt auch in späteren Therapiestadien eine hohe Effektivität. So stellt eine Fortführung bzw. Beibehaltung der Bevacizumab-Therapie (+ Chemotherapeutika) bei Krankheitsprogress eine geeignete Behandlungsoption dar.⁴⁸ Darüber hinaus kann im Rahmen der Zweitlinientherapie neben Bevacizumab auch auf das Anti-VEGF-R-Fusionsprotein Aflibercept und den VEGF-Rezeptor-Antikörper Ramucirumab (Anti-VEGF-R2-Tyrosinkinase-Inhibitor) zurückgegriffen werden, welche einen ähnlichen Effekt sowie vergleichbare Überlebensverbesserungen erzielen.^{5, 49}

Der Einsatz von Anti-EGFR-Antikörpern stellt, bei linksseitigen *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumoren, neben der effektiven Erstlinie auch in späteren Therapielinien eine wirksame Möglichkeit dar. Ist die Verabreichung dieses Antikörpers noch nicht in der Erstlinie erfolgt, so empfiehlt sich eine Zweitlinienanwendung. Im Falle eines Krankheitsprogresses nach Antikörpereinsatz ist zunächst eine EGFR-freie Therapielinie anzuraten und ggf. im Verlauf ein erneuter Einsatz zu erwägen.^{5, 50-52}

Des Weiteren zeigte sich ein Austausch des monoklonalen Antikörpers (Wechsel Anti-EGFR- auf Anti-VEGF-Therapie) gegebenenfalls als effektive Methode. Ein umgekehrtes Vorgehen (Wechsel Anti-VEGF- auf Anti-EGFR-Therapie) scheint jedoch in einer geringeren Wirksamkeit der Anti-EGFR-Therapie zu resultieren, wodurch eine solche Sequenzabfolge nicht anzuraten ist. Gegebenenfalls empfiehlt sich eine nochmalige Überprüfung nach sechsmonatiger Pause.^{5, 53, 54}

Bei Patienten mit refraktären mKRK, welche kein Therapieansprechen auf vorangegangene Behandlungen zeigen, empfiehlt sich ein Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren wie TAS-102 oder Regorafenib (aktuell keine Zulassung in Deutschland)⁵. Neue Studienergebnisse zeigen hierbei eine

Effektivitätssteigerung durch die Hinzunahme von Bevacizumab zu TAS-102⁵⁵, sowie eine vielversprechende Kombination von Regorafenib mit Nivolumab⁵⁶.

Darüber hinaus könnten Patienten bei Refraktärität von Fruquitinib (Anti-VEGF-Antikörper) profitieren⁵⁷ – eine europäische Zulassung wird derzeit geprüft.

Einen weiteren vielversprechenden Therapieansatz bieten RAS-zielgerichtete Medikamente wie Sotorasib (ehemals AMG510) oder Adagrasib. Es handelt sich hierbei um selektive Inhibitoren von KRAS (G12C), welche bei KRAS (G12C)-mutierten Tumoren eingesetzt werden können und ein inflammatorisches Tumormilieu erzeugen. In dessen Zusammenhang konnte ein besseres Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren demonstriert werden. Der Einsatz von Adagrasib konnte in Kombination mit Cetuximab die Effektivität maßgeblich steigern. Ein Einsatz dieser Substanzen ist nach derzeitiger Erkenntnis nur in letzter Instanz zu erwägen.⁵⁸⁻⁶⁰

1.2.3 Therapie nicht-fitter Patienten

Eine Therapie von Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand (ECOC \geq 2) stellt aufgrund der gesteigerten Vulnerabilität eine Herausforderung in der medikamentösen Therapie dar. Erschwerend ist hierbei die Tatsache, dass diese Patientenkohorte in Studien meist unterrepräsentiert ist. Nachzeitigem Erkenntnisstand empfiehlt sich eine Fluoropyrimidin-Monotherapie (5-FU oder Capecitabin) in Kombination mit Bevacizumab.⁵

1.2.4 Therapie älterer Patienten

Das kolorektale Karzinom ist mit einem mittleren Erkrankungsalter von 76 bzw. 72 Jahren (Frauen vs. Männer) eine Erkrankung, welche v.a. ältere Patienten betrifft.² Diese Kohorte ist jedoch in vielen klinischen Studien unterrepräsentiert, obwohl dies im Hinblick auf eine Therapieentscheidung von höchster Relevanz ist.⁶¹ Prinzipiell legen frühere Studienergebnisse nahe, dass in Bezug auf die Effektivität dieselben Therapieschemata für ältere und jüngere Patienten verwendet werden können⁶²⁻⁶⁷.

In Folge des erhöhten Lebensalters kommt es jedoch vermehrt zu verminderter Funktionsfähigkeit kritischer Organe. So kann dies aufgrund eingeschränkter Leber- bzw. Nierenfunktion zu einem reduzierten Metabolismus und eingeschränkter Elimination der Arzneien führen, wodurch es zu einer Steigerung der Toxizität kommt. Des Weiteren sind mit steigendem Alter vermehrt Komorbiditäten, wie Bluthochdruck und Diabetes, impliziert. All dies ist bei der Wahl der systemischen Therapie zu berücksichtigen und macht ein multidisziplinäres Herangehen erforderlich.^{14, 68}

Außerdem ist zu bedenken, dass bei Addition mehrerer Medikamente auch die Toxizität steigt. Dies kann gerade im älteren Kollektiv von einer geringeren Anzahl an Patienten toleriert werden.⁶⁸ Dahingehend ist es erforderlich, prädiktive Biomarker zu finden, welche Patienten- und Tumorspezifischere Therapien ermöglichen.

Eine detaillierte Auflistung aller Substanzen der Therapie mKRK, sowie deren Mechanismus, Indikation und Nebenwirkungsprofil ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Häufig verwendete medikamentöse Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Substanz	Mechanismus	Indikation	Spezifische Nebenwirkungen ^{24, 40, 58}
Fluoropyrimidin	Inhibition der Thymidylat-Synthase	Zytostatisches Rückgrat	Diarrhö, Hand-Fuß-Syndrom
Oxaliplatin	DNA-Quervernetzung	Zytostatisches Rückgrat	Mukositiden, periphere sensorische Neuropathien
Irinotecan	Topoisomerase I - Inhibitor	Zytostatisches Rückgrat	Myelosuppression, Spät-Diarrhö, cholinerges Syndrom
Bevacizumab	Anti-VEGF-Antikörper	Erst-, Zweit- und Folgelinientherapie in Kombination mit Fluoropyrimidin-haltiger Chemotherapie	Hypertonie, Darmperforation, Hämorrhagien
Aflibercept	Anti-VEGF-R-Fusionsprotein	Zweitlinientherapie in Kombination mit Zytostatika	Hypertonie, Hämorrhagien, thrombotische Ereignisse
Ramucirumab	Anti-VEGF-R2-Tyrosinkinase-Inhibitor	Zweitlinientherapie in Kombination mit Zytostatika	Neutropenie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Gastrointestinale Blutungen
Cetuximab bzw. Panitumumab	Anti-EGFR-Antikörper	Erst-, Zweit- und Folgelinientherapie bei RAS-Wildtyp-Tumor in Kombination mit Chemotherapie	Allergien, Kardiotoxizität bzw. Hautreaktionen
Fruquitinib	Anti-VEGF-Antikörper	Drittlinientherapie/Salvage-Therapie*	Hypertonie, Hand-Fuß-Syndrom
TAS-102 (Trifluridin/Tipiracil)	Zytostatikum + Thymidin-Phosphorylase-Inhibitor	Drittlinientherapie/Salvage-Therapie*	Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie
Pembrolizumab bzw. Nivolumab	PD1-Inhibitor	Mikrosatelliteninstabilität (MSI), Pembrolizumab Erstlinientherapie	Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Asthenie
Ipilimumab	CTLA4-Inhibitor	Zweitlinientherapie in Kombination mit Nivolumab (nach FU-basierter Therapie) bei MSI	Diarrhö, Pruritus, Müdigkeit, Erbrechen

Trastuzumab/Lapatinib	Humaner HER2-Antikörper + Tyrosinkinase-Inhibitor	Zweitlinientherapie bei HER2-Amplifikation und KRAS-Wildtyp-Tumor	Allergien, Kardiotoxizität und Übelkeit, Hand-Fuß-Syndrom
Sotorasib bzw. Adagrasib	KRAS (G12C)-Inhibitor	KRAS (G12C)-mutierter Tumor	Diarrhoe, Fatigue, Übelkeit

Tabelle 1: Medikamente der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. * Behandlung, welche bei Nichtansprechen/Therapieversagen vorangegangener Therapien zum Einsatz kommt.

1.3 Molekulare Biomarker

Als Biomarker wird in der Medizin ein charakteristisches Merkmal beschrieben, welches als Indikator für biologische Prozesse und Krankheitsverläufe dient. Hierbei wird zwischen prognostischen und prädiktiven Biomarkern unterschieden: ein prädiktiver Biomarker sagt die Effektivität einer spezifischen Therapie voraus, wohingegen ein prognostischer Biomarker die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten ungeachtet seiner Therapie prädiziert.⁶⁹ Bisherige identifizierte Biomarker des mKRK umfassen den *RAS*- und *BRAF*-Genstatus, HER2/neu sowie MSI(-H).^{5, 9}

Bei *KRAS* sowie *NRAS*, Unterformen von *RAS* (Rat-Sarcoma-Viral-Onkogen), handelt es sich um Gene, welche für die gleichnamigen Proteine kodieren. Diese GTP-bindenden Proteine sind ein Teil der intrazellulären Signalkaskade des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor). Eine Überaktivierung infolge einer Genmutation hat unter anderem eine kontinuierlich proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf die Zelle.⁷⁰ Während die Prävalenz von *KRAS*-Mutationen ca. 40–60 % der kolorektalen Karzinome beträgt, sind *NRAS*-Mutationen lediglich bei 3–5 % der Fälle zu finden.⁷¹ *RAS*-Mutationen sind negative prognostische Biomarker im Hinblick auf Gesamt- (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) der Patienten. Durch die kontinuierlich aktive Signalkaskade downstream des EGF-Rezeptors sind Anti-EGFR-Antikörper wirkungslos, weshalb *RAS*-Mutationen ebenso negative prädiktive Biomarker für eine Anti-EGFR-Therapie sind. Folglich sprechen *RAS*-Wildtyp-Tumore gut auf eine anti-EGFR-Therapie an, jedoch sind auch Fälle des Therapieversagens beschrieben.^{37, 38, 72}

Das Gen *BRAF* (v-Raf-Maus-Sarkom-Virus-Onkogen-Homolog B) kodiert für die Serin/Threonin-Proteinkinase *B-RAF*, die downstream von *RAS* in der *MAPK*-Signaltransduktionskaskade vorkommt. Die Mutationsprävalenz beträgt im mKRK ca. 10 %.⁷³ Etwa 90 % der *BRAF*-mutierten Tumore weisen eine V600E-Mutation (Klasse I Mutation) auf, welche in einer Substitution der Aminosäure Valin durch Glutamin resultiert und somit zu einer Überaktivität von *BRAF* führt.⁷⁴ Dies ist mit einer signifikant schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert. Der prädiktive Stellenwert dieses Biomarkers ist hingegen umstritten.^{5, 75, 76} Erste Ergebnisse der FIRE-4.5-Studie zeigen eine geringere Effektivität von Cetuximab gegenüber Bevacizumab in der Erstlinientherapie.⁷⁷ Aufgrund der hohen Aggressivität und des geringen Therapieansprechens eines solchen Tumors, kann derzeit weiterhin eine Triplet-Chemotherapie (FOLFOXIRI) oder Doublet-Therapie in Erstlinie erfolgen.^{5, 78} Bei vorbehandelten Patienten hingegen zeigte sich eine signifikant höhere Effektivität von Cetuximab in Kombination mit Encorafenib (*BRAF*-Inhibitor) gegenüber Cetuximab und Irinotecan.⁷⁹ Tumore mit *BRAF* Klasse II/III Mutation zählen mit ca. 2 % aller mKRK zu einer kleinen Gruppe und besitzen eine bessere Prognose, bedingt durch die geringere Kinaseaktivität als bei Klasse I Mutationen.⁷⁴

Das Onkogen HER2/neu (c-erbB-2/neu) kodiert für ein Transmembranprotein, das ebenso zur Familie der Tyrosin-Kinasen gehört und dem EGF-Rezeptor ähnelt. Eine Aktivierung resultiert in Signalkaskaden, welche zur Zellproliferation und -Differenzierung beitragen. Die Inzidenz einer HER2/neu-Amplifikation bzw. Überexpression bei kolorektalen Karzinomen liegt bei ca. 5 %.⁷⁴ Die

klinische Relevanz dieses Biomarkers sowie einer entsprechenden zielgerichteten Therapie konnte in den Studien HERACLES und MyPathway aufgezeigt werden.^{46, 47} Die Rolle als Prädiktor bezüglich einer Resistenz gegenüber einer EGFR-Therapie sowie jene als prognostischer Faktor konnte noch nicht verifiziert werden.⁷⁴

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist, wie bereits erwähnt (siehe 1.1), ein Charakteristikum des HNPCC, wird aber auch bei 15 % der sporadischen kolorektalen Karzinomen dedektiert.⁸⁰ Im metastasierten Tumorstadium ist eine MSI deutlich seltener zu finden (4–8 %) und oft mit einer *BRAF*-Mutation assoziiert. Zusammenhängend resultiert dies in einer allgemein schlechteren Prognose im Vergleich zu anderen mKRK. MSI ist ein Biomarker für den Nutzen von Checkpoint-Inhibitoren in der Erstlinientherapie (Pembrolizumab) als auch für weitere Therapielinien (Nivolumab, Ipilimumab).^{5, 9, 45,}

81

1.4 Primärtumorlokalisation

Eine Unterteilung von kolorektalen Karzinomen aufgrund der Primärtumorlokalisation erfolgt in rechtsseitige und linksseitige Tumore. Unterschiede existieren hierbei bezüglich molekularer, embryonaler, biologischer und anatomischer Eigenschaften. Den Trennpunkt stellte ursprünglich eine embryonale Grenze nach zwei Drittel des Colon Transversum dar, jedoch wird in klinischen Studien zur Vereinfachung häufig die splenische Flexur (linke Kolonflexur) verwendet. Distal gelegene Abschnitte (inklusive Rektum) werden der linken Seite zugeordnet, wohingegen alles proximal als rechtsseitig bezeichnet wird. Die Seitenzuordnung hat insbesondere einen hohen Stellenwert für prognostische und prädiktive Aussagen im metastasierten Setting.¹² So weist eine rechtsseitige Lokalisation beim mKRK unabhängig der Therapie eine signifikant schlechtere Prognose auf.⁸² Die rechtsseitigen Karzinome sind charakterisiert durch eine niedrigere Inzidenz (ca. ¼), ein häufigeres Vorkommen bei Frauen, ein vermehrt fortgeschrittenes Tumorstadium sowie eine muzinöse Pathologie. Darüber hinaus sind sie mit einer *RAS/BRAF*-Mutation, einer MSI und einer CPG island methylator phenotype (CIMP)-high assoziiert. Im Gegensatz zeigen linksseitige Tumore eine höhere Inzidenz (ca. ¾), ein gehäuftes Auftreten bei Männern und eine vermehrte Chromosomeninstabilität (siehe Abbildung 1).^{14,}

⁸³ Im Hinblick auf das Therapieansprechen konnten retrospektive Analysen randomisierter Studien eine höhere Effektivität einer Anti-EGFR-Therapie in links- gegenüber rechtsseitigen *RAS*-Wildtyp-Tumoren zeigen. Rechtsseitige Tumore könnten möglicherweise von einer Anti-VEGF-Therapie profitieren.⁸⁴⁻⁸⁶ 2022 konnte die PARADIGM-Studie die bestehenden retrospektiven Daten mittels eines prospektiven Ansatzes bestätigen⁸⁶. Die aktuellen Leitlinien empfehlen daher Anti-EGFR-Antikörper bei maßgeblich linksseitigen *RAS*-Wildtyp-Tumoren.⁵

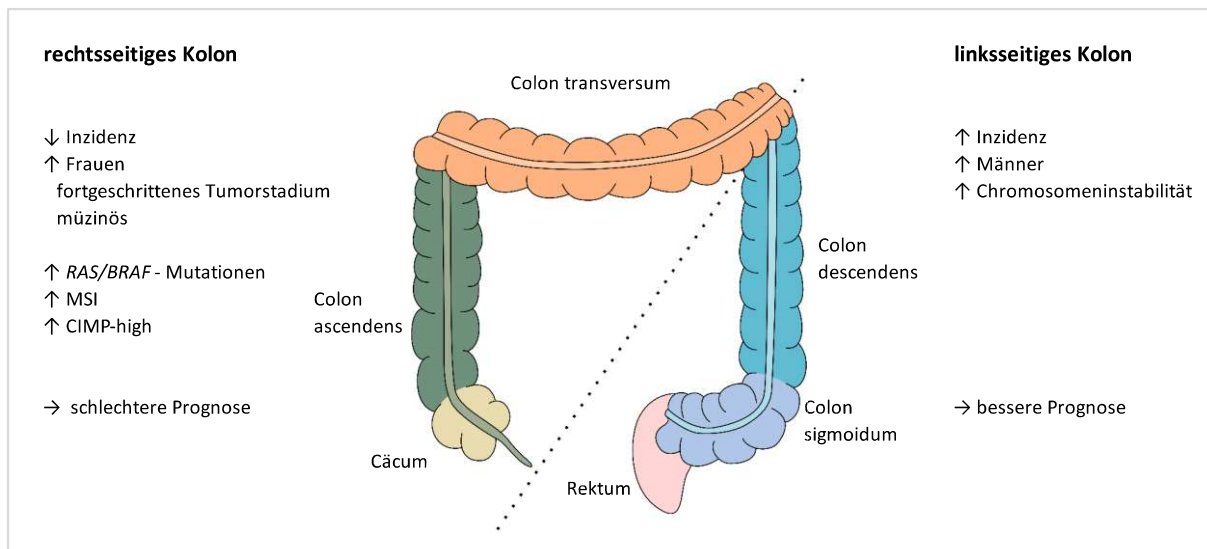


Abbildung 1: Charakteristika rechts- und linksseitiger Tumorlokalisation. *RAS* = rat sarcoma, *BRAF* = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, MSI = Mikrosatelliteninstabilität, CIMP = CPG island methylator phenotype

1.5 Genexpressionsbasierte Sub-Klassifikation

Unter Berücksichtigung aller o.g. molekularen (DNA-basierte Biomarker) und klinischen (Primärtumorlokalisation) Variablen beträgt das beste Therapieansprechen derzeit lediglich 80 % – jeder fünfte Patient erlebt daher keine signifikante Verkleinerung der Tumorlast trotz optimaler Therapie⁸⁶. Für eine optimale Therapieplanung sind daher weitere Biomarker erforderlich. Durch Guinney et al. konnte kürzlich eine auf mRNA-Genexpression basierende Einteilung in vier konsentrierte molekulare Subtypen (consensus molecular subtypes, CMS) erfolgen. Darüber hinaus wurden die wichtigsten biologischen Eigenschaften der einzelnen Subtypen herausgearbeitet. CMS1 bezeichnet den Immun-Phänotyp gekennzeichnet durch MSI und *BRAF*-Mutationen. Der kanonische Subtyp CMS2 weist eine Aktivierung des Wnt-/β-Catenin-Signalwegs auf. CMS3, auch als metabolischer Subtyp bezeichnet, ist charakterisiert durch eine Deregulation metabolischer Signalwege und einer Häufung von *KRAS*-Mutationen. Der mesenchymale Subtyp (CMS4) zeigt eine Aktivierung des TGFβ-Signalwegs.⁸⁷ Eine detaillierte Charakteristik der einzelnen Subtypen ist Tabelle 2 zu entnehmen. Ebenso wurde deklariert, dass die einzelnen Subtypen mit einer unterschiedlichen prozentualen Häufigkeit vorkommen: CMS1 14 %, CMS2 37 %, CMS3 13 %, CMS4 23 % (vgl. Tabelle 2). Bei der primären Klassifikation verblieben 13 % der Proben nicht zuordenbar, wodurch postuliert wurde, dass es sich hierbei möglicherweise um einen Übergangs-Phänotyp oder um intratumoral heterogene Tumore handelt.⁸⁷ Das Datenset, welches für die ursprüngliche Klassifikation genutzt wurde, wies mit 92% vornehmlich Tumore im frühen Stadium bei Diagnose auf. Das metastasierte Stadium ist dadurch deutlich unterrepräsentiert. Bei Metastasierung zeigt sich eine veränderte prozentuale Verteilung, welche sich in einer Reduktion in den Gruppen von CMS3 und CMS1 sowie einer Steigerung in CMS4 und CMS2 äußert.⁸⁸

Molekulare Subtypen des kolorektalen Karzinoms

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Systematik	MSI Immun	Kanonisch	Metabolisch	Mesenchymal
Prävalenz	14 %	37 %	13 %	23 %
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrosatelliteninstabilität (MSI) • Promoterhypermethylierung (CpG-Insel-Methylator Phenotype, CIMP) • <i>BRAF</i>-Mutationen • Immuninfiltration und -aktivierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Chromosomeninstabilität • Aktivierung des Wnt-/β-Catenin-Signalwegs 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>KRAS</i>-Mutationen • Deregulation metabolischer Signalwege 	<ul style="list-style-type: none"> • Vermehrtes Auftreten von somatischen Kopienzahlvariationen • Stark infiltratives Wachstum • Aktivierung des TGFβ-Signalwegs • Gefäßneubildungen (Angiogenese)

Tabelle 2: Molekulare Subtypen des kolorektalen Karzinoms. ^{87, 89} CMS = consensus molecular subtypes, *RAS* = rat sarcoma, *BRAF* = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, MSI = Mikrosatelliteninstabilität, CIMP = CpG island methylator phenotype

Des Weiteren wurden klinische Assoziationen mit den einzelnen Subtypen evaluiert. So zeigte sich in CMS1 eine Anreicherung bei Frauen mit einer rechtsseitigen Tumorlokalisation und entdifferenzierten Tumoren. CMS2 Tumore hingegen sind hauptsächlich der linken Seite zuzuordnen. Ein vermehrtes Auftreten in vorgeschrittenen Tumorstadien konnte für CMS4 eruiert werden.⁸⁷

Den prognostischen Wert der CMS-Klassifikation im Falle des metastasierten Settings konnte durch verschiedene retrospektive Analysen randomisierter klinischer Studien (FIRE-3, CALGB SWOG 80405 und AGITG MAX) validiert werden. Patienten mit einem CMS2 mKRK zeigten das beste OS, wohingegen bei CMS1 die schlechteste Prognose mit dem geringsten OS demonstriert wurde. CMS3 und CMS4 wiesen ein intermediäres OS auf.⁹⁰⁻⁹²

In Hinblick auf die Relevanz als prädiktiver Biomarker besteht derzeit eine eingeschränkte Studienlage. Jedoch konnten verschiedene Projekte bereits zeigen, dass die Subtypen für die Therapieentscheidung relevant sein können. Bei der Studie CALGB SWOG 80405 zeigte sich beispielsweise, dass CMS1 Patienten von einer Bevacizumab-basierten Therapie profitieren könnten⁹². Darüber hinaus konnte kürzlich ein möglicher prädiktiver Nutzen der CMS für eine Panitumumab-basierte Erhaltungstherapie bei RAS-Wildtyp mKRK evaluiert werden⁹³. Zusammenfassend würde eine Etablierung der molekularen Subtypen als prognostische und prädiktive Biomarker in die klinische Praxis einen erheblichen Beitrag zu einer individualisierteren und spezialisierteren Therapie des kolorektalen Karzinoms leisten.

1.6 Die XELAVIRI-Studie

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die randomisierte Phase III-Studie XELAVIRI im Rahmen der Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome (mKRK). Diese Studie setzte sich als Ziel die Nicht-Unterlegenheit einer sequenziellen Applikation eines Fluoropyrimidins (FP) mit Bevacizumab (Bev) und der Eskalation mittels Irinotecan (Iri) bei Krankheitsprogress gegenüber einer initialen Kombinationsapplikation (FP + Bev + Iri) zu demonstrieren.⁹⁴ Verschiedene Studien in der Prä-Antikörper-Ära, welche eine sequenzielle Eskalationstherapie von zytostatischen Chemotherapeutika mit einem von Beginn an kombinierten Einsatz verglichen, legten keine fundamentale Unterlegenheit des sequenziellen Ansatzes dar. Vielmehr zeigte sich in Studien wie FFCD-2000-05, MRC-FOCUS und CAIRO, dass eine initiale Zytostatika-Kombination mit einer höheren Toxizität assoziiert war, jedoch im Vergleich mit deren sequenziellen Einsatz keine Effektivitätssteigerung erzielte.³⁰⁻³² Nach Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper sollte daher nochmals die Nicht-Unterlegenheit eines sequenziellen gegenüber eines initialen Kombinationsregimes unter Verwendung von Bevacizumab im Rahmen der XELAVIRI-Studie evaluiert werden.

Als primärer Endpunkt von XELAVIRI wurde die Zeit bis zum Strategieversagen (time to failure of strategy, TFS) festgesetzt. Bei Betrachtung der gesamten Patientenkohorte konnte die Nicht-Unterlegenheit der sequenziellen Therapie gegenüber dem Kombinationsverfahren nicht demonstriert werden. Im Zuge einer Subgruppenanalyse konnte gezeigt werden, dass sich das Therapieansprechen in Abhängigkeit vom RAS/BRAF-Mutationsstatus unterscheidet. Patienten mit RAS/BRAF-Wildtyp-

Tumoren profitieren von dem initial kombinierten Verfahren, wohingegen bei *RAS*-mutierten Tumoren der sequenzielle Ansatz nicht-unterlegen ist.^{94, 95}

Anhand dieser Studienergebnisse stellte sich die Frage, inwiefern eine weitere molekulare Differenzierung in Subgruppen als potenzieller Biomarker für die Prognose sowie die prädiktive Therapieentscheidung des mKRK fungieren könnte.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Analyse war es, molekulare Subtypen basierend auf mRNA-Genexpression bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) innerhalb der randomisierten Phase III-XELAVIRI-Studie zu erheben und die Relevanz dieser Subtypen als prognostische und prädiktive Biomarker zu ermitteln.

Folgende Punkte wurden beleuchtet, um die Fragestellung zu klären:

- Bestimmung der mRNA-Genexpressionsdaten der XELAVIRI-Tumorproben mittels NanoString
- Erfassung der molekularen Subtypen durch Klassifikation der Patienten anhand der CMS-Klassifikation (Guinney et al., 2015, *CMSclassifier*)
- Erfassung deskriptiver Merkmale der Patientenkohorte in Abhängigkeit der molekularen Subtypen
- Korrelation der molekularen Subtypen mit den klinischen Endpunkten
 - Zeit bis zum Therapieversagen (time to failure of strategy, TFS)
 - Progressionsfreies Überleben (progression free survival, PFS)
 - Gesamtüberleben (overall survival, OS)

3. Studiendesign und Methoden

3.1 XELAVIRI-Studie

Die nachfolgenden Erläuterungen der Studie beziehen sich alle auf den Artikel von Modest et al.⁹⁴

Studiendesign

Bei der XELAVIRI-Studie (AIO-KRK-0110) handelt es sich um eine abgeschlossene, multizentrische,

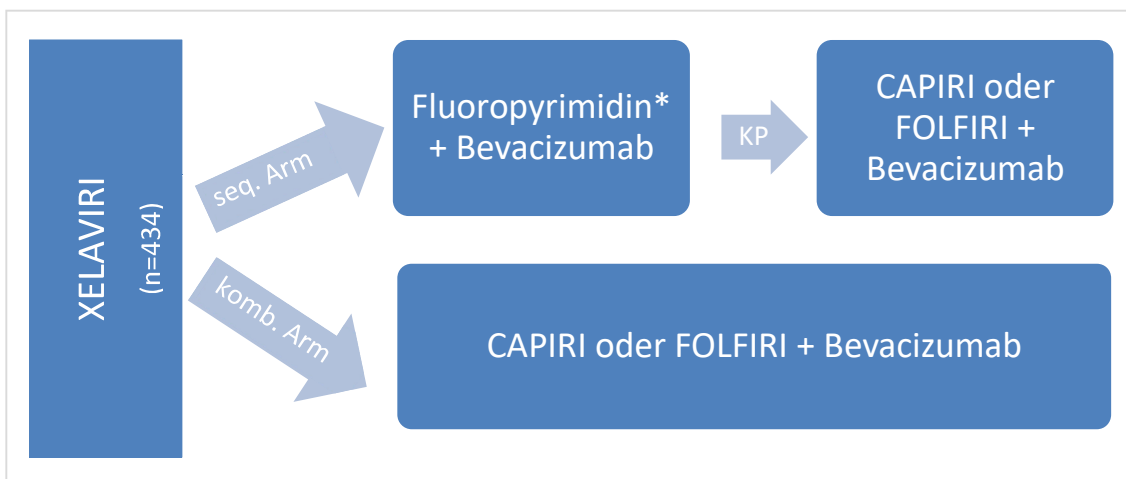


Abbildung 2: Therapiearme XELAVIRI-Studie. KP: Krankheitsprogression, *Fluoropyrimidin: Capecitabine oder 5-Fluorouracil, seq.: sequenziell, komb.: kombiniert.

zweiarmige, randomisierte klinische Phase III-Studie in der Erstlinientherapie von 434 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinoms (mKRK) im Zeitraum von 2010 bis 2016. Diese untersuchte die Nicht-Unterlegenheit einer sequenziellen Therapie (seq. Arm) eines Fluoropyrimidins plus Bevacizumab (Bev) und der Eskalation mit Irinotecan (Iri) im Falle des Krankheitsprogresses gegenüber einer bereits initialen Kombinationstherapie (komb. Arm) der Chemotherapeutika (vgl. Abbildung 2). Als Fluoropyrimidin kam Capecitabine oder 5-Fluorouracil (5-FU) zum Einsatz. Das detaillierte Therapieprotokoll der Schemata ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Therapieprotokoll der XELAVIRI-Studie

Therapieschema	Protokoll
Capecitabine + Bevacizumab	Capecitabine oral 1.250 mg/m ² zweimal täglich Tag 1 bis 14 plus Bev i.v. 7,5 mg/kg Körpergewicht an Tag 1, Therapiezykluswiederholung alle 3 Wochen
5-Fluorouracil + Bevacizumab	Tag 1 i.v.: racemisches Folinsäure 400 mg/m ² , FU-Bolus von 400 mg/m ² , FU über 46 h 2.400 mg/m ² und Bev 5 mg/kg Körpergewicht, Therapiezykluswiederholung alle 2 Wochen
CAPIRI + Bevacizumab	Capecitabine oral 800 mg/m ² zweimal täglich, Tag 1 bis 14, Iri i.v. 200 mg/m ² an Tag 1 plus Bev i.v. als Einmaldosis von 7,5 mg/kg Körpergewicht an Tag 1, Therapiezykluswiederholung alle 3 Wochen
FOLFIRI + Bevacizumab	Tag 1 i.v.: racemisches Folinsäure 400 mg/m ² , FU-Bolus von 400 mg/m ² , FU über 46 h 2.400 mg/m ² , Iri i.v. 180 mg/m ² und Bev 5 mg/kg Körpergewicht, Therapiezykluswiederholung alle 2 Wochen

Tabelle 3: Therapieprotokoll XELAVIRI-Studie. CAPIRI: Capecitabine + Irinotecan, FOLFIRI: Folinsäure + 5-Fluoruracil + Irinotecan

Patienten

Für die Patientenpopulation galten folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 4):

Ein- und Ausschlusskriterien der XELAVIRI-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Patientenalter ≥ 18 Jahre	Vorangegangen Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms
ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance Status von 0 bis 1	Adjuvante Therapie innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn
Histologisch nachgewiesenes metastasiertes kolorektales Karzinom (Stadium IV)	Herzinsuffizienz > Stadium II gemäß New York Heart Association
Adäquate Organfunktion	Kardial ischämisches Ereignis innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn

Unresektable Erkrankung (bzw. Patient lehnt operatives Verfahren ab)	Größeres Blutungsereignis innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn
Messbare Tumorläsionen gemäß Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) Version 1.1	Unbehandelte Hirnmetastasen

Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien der XELAVIRI-Studie.

Alle Patienten willigten der Studienteilnahme schriftlich ein. Eine Erfassung von klinischen, pathologischen und demographischen Daten fand bei allen Patienten statt. Eine kontinuierliche Beaufsichtigung erfolgte sowohl für den Zeitraum der Behandlung als auch des Follow-Ups. Die Durchführung der Studie basierte auf der Declaration of Helsinki (2008). Eine Bewilligung der retrospektiven Analyse wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität erteilt (Nr. 163-10).

Das Analyseset der Studie umfasste 421 Patienten. Davon war es bei 374 (88,8 %) Tumoren möglich eine *RAS*- und *BRAF*-Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung durchzuführen. Die Verteilung auf die beiden Therapiearme war mit einer Anzahl von 188 (50,3 %) Tumorproben in Arm A in etwa gleich jener in Arm B mit 186 (49,7 %).

Endpunkte

Der primäre Endpunkt der XELAVIRI-Studie wurde als die Zeit bis zum Therapieversagen (time to failure of strategy, TFS) der sequenziellen Therapie gegenüber der Kombinationstherapie definiert. Sekundären Endpunkte waren progressionsfreies Überleben (progression-free survival, PFS), Gesamtüberleben (overall survival, OS), Therapieansprechrate (overall response rate) sowie Sicherheit und Verträglichkeit. Ebenso stellte die Ermittlung der Therapieeffektivität bezogen auf die molekularen Subgruppen einen sekundären Endpunkt dar. Als TFS wurde die Zeit zwischen der Randomisierung der Patienten zu einer Therapiestrategie und dem Versagen der Irinotecan-beihaltenden Behandlung definiert. PFS beschreibt das Intervall zwischen Randomisierung und der Krankheitsprogression, dem Einsatz eines neuen Krebsmedikaments oder dem Tod des Patienten. Aus der Zeitspanne zwischen der Randomisierung und dem Tod des Patienten ungeachtet der Todesursache wurde das OS berechnet. Eine Untersuchung der Patienten erfolgte während der Behandlung im 9-wöchentlichen Rhythmus und nach Beendigung im Abstand von 3 Monaten. Dies wurde maximal 5 Jahre fortgeführt. Eine Aktualisierung der Überlebensanalysedaten erfolgte im September 2020.

3.2 Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Für die Verwendung des NanoString nCounter-Systems ist zunächst die Isolation der RNA aus dem Gewebe nötig. Die Tumorproben der Patienten lagen in Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebelöcken vor. Von diesen wurden mittels eines Mikrotoms Schnitte von ca. 10 µm Dicke angefertigt. Je einer dieser Schnitte wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um anschließend eine Einzeichnung des Tumorareals unter dem Mikroskop vorzunehmen. Die eigentliche RNA-Extraktion erfolgte mittels des RNeasy FFPE Kits von Qiagen. Hierbei wurden zunächst die Tumorareale auf die Leerschnitte (nicht gefärbt) projiziert, diese dann mit einem Skalpell abgetragen und anschließend in die Deparaffinierungslösung von Qiagen überführt. Die Menge an abgetragenen Schnitten variierte je nach Proben- bzw. Arealgröße, je Probe wurde eine Gesamtumorfläche von ca. 2 cm² verwendet. (Abbildung 3)

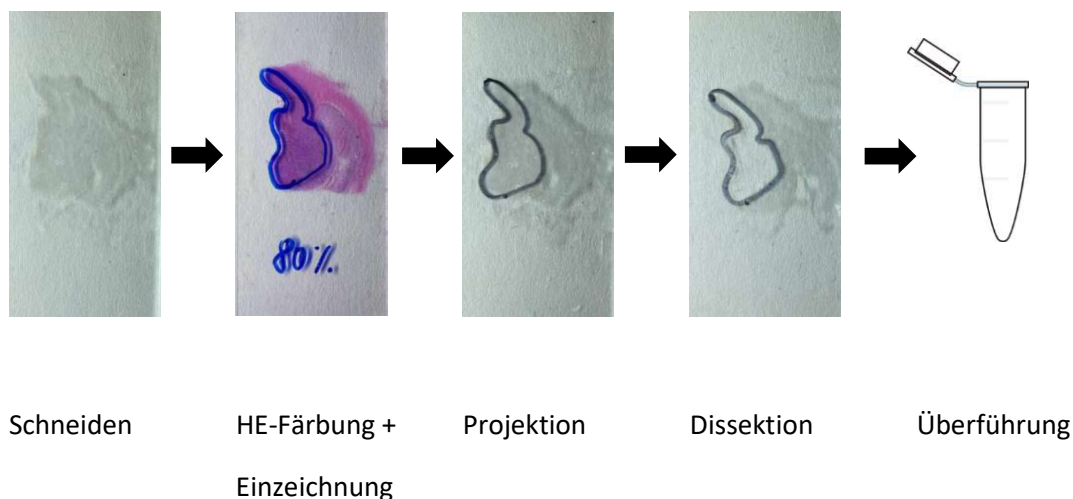


Abbildung 3: Arbeitsschritte der Nukleinsäureextraktion aus FFPE-Gewebe.

Nach Zugabe des Puffers PKD und eines Verdauers durch die Proteinase K wurde je 15 min bei 56 °C und 80 °C inkubiert. Nach Abtrennung der Deparaffinierungslösung kam es zum Einsatz des QIAcube-Isolationsroboters. Hierbei erfolgte ein DNase-Verdau, um eine Verunreinigung des RNA-Isolats mit DNA zu vermeiden. Anschließend wurde unter dem Einsatz von Ethanol sowie zweier Puffer die RNA-Extrahierung anhand der eingebrachten Silicagel-Membran-Säulen vollzogen. Diese Säulen banden die RNA, welche gewaschen und abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Eine genaue Beschreibung des durchgeführten Protokolls ist dem Anhang zu entnehmen. Das erhaltene Produkt wurde nach der erfolgreichen Konzentrationsmessung bis zur weiteren Analyse bei –80 °C tiefgefroren.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanodrop ND-1000 unter dem Einsatz von je 1,2 µl der entsprechenden RNA-Probe. Bei dem Gerät handelt es sich um ein Spektralphotometer, welches die Absorption im Bereich von 220 bis 750 nm misst. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Daraus ermittelt die Software, basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, die RNA-Konzentration der zu messenden Probe. Ebenso wurde die Reinheit anhand des A260/A280 Quotienten ermittelt. Dieser sollte im Bereich von 1,7–2,1 liegen, um eine höhergradige Verunreinigung, insbesondere durch Proteine, auszuschließen. Bei der Initialisierung des Gerätes sowie der Bestimmung des Leerwertes wurden je 1,2 µl RNase-freies Wasser verwendet.

3.2.2 mRNA-Genexpression

Das NanoString nCounter-Genexpressions-System ermöglicht das Erfassen und Zählen von spezifischen Nukleinsäuren in Lösungen. Dadurch wird es u.a. möglich ein mRNA-Expressionsprofil zu erstellen. Pro RNA-Molekül verwendet NanoString zwei frequenzspezifische Sonden, die Adapter- und Reportersonde (Capture bzw. Reporter Probe). Beide verfügen über eine ca. 50 Basenpaar-lange Sequenz, welche komplementär zu jener des Zielmoleküls (Target) ist. Darüber hinaus ist die Reportersonde mit einem farbkodierten Barcode versehen, der als Detektionssignal dient und einen individuellen Code repräsentiert. Die Adaptersonde hingegen ist durch eine Affinitätsmarkierung gekennzeichnet. Der Fluoreszenzbarcode ermöglicht es die Anzahl an mRNA-Molekülen der jeweiligen Probe auszulesen.⁹⁶ (Abbildung 4)

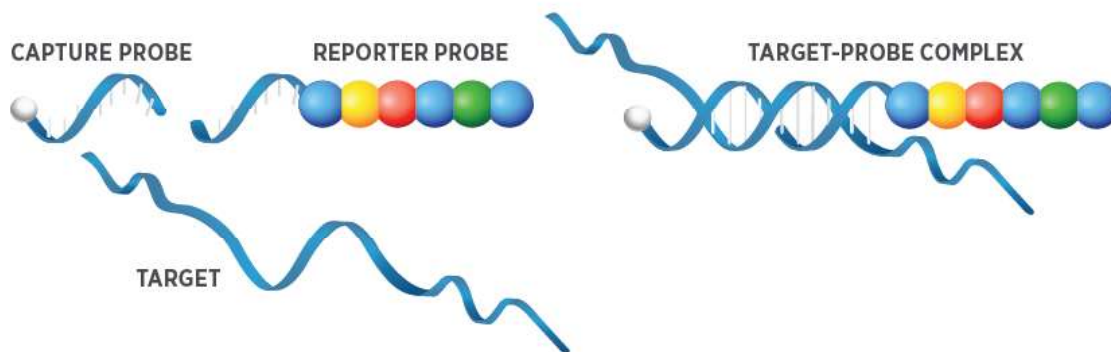


Abbildung 4: Darstellung der NanoString-Genexpression.⁹⁷

Für die vorliegende Arbeit wurde das Cancer Progression-Panel verwendet. Dieses Panel umfasst 770 Gene inklusive 30 Referenzgene, bei welchen es sich um sogenannte Housekeeper handelt. Housekeeping-Gene werden unabhängig vom Zelltyp und -stadium in jeder Zelle exprimiert und

können somit als Referenz verwendet werden. Zur Qualitätskontrolle dienen 8 Negativ- bzw. 6 Positivkontrollen.

Für die mRNA-Analyse mittels NanoString wurden die gefrorenen Proben auf Eis aufgetaut und anschließend für den Ansatz der Hybridisierung verwendet. Hierzu wurde zunächst ein Master-Mix durch Zugabe des Hybridisierungs-Puffers zur Reporter Code-Reagenz hergestellt. Nach Aufteilung dieses Gemisches in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße wurde die RNA-Probe hinzugefügt. Die gemäß Protokoll einzusetzende RNA-Masse betrug 150 ng. Das daraus resultierende Volumen jeder Probe wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$\frac{150 \text{ ng}}{\text{RNA-Konzentration} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)} = \text{Einsatz Hybridisierung} (\mu\text{l})$$

Betrag der Einsatz weniger als 5 μl , so wurde das Volumen durch die Verwendung von RNase-freiem Wasser auf 5 μl gebracht. Im Falle, dass ein Volumen, welches 5 μl überstieg, für die geforderte Masse zu verwenden war, wurden dennoch nur 5 μl der Probe verwendet. Dieses Vorgehen wurde bei allen Proben mit geringen RNA-Konzentrationen angewendet, die mindestens eine RNA-Konzentration $\geq 10,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ aufwiesen. Proben mit geringeren Konzentrationen wurden nicht für die NanoString-Analyse verwendet.

Nach Zugabe der RNA-Proben wurde abschließend das Capture Probe-Reagenz hinzugegeben und der Hybridisierungsansatz für 18–20 h bei 65 °C inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung des Hybridisierungsprotokolls ist dem Anhang zu entnehmen.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Hybridisierungsansätze in den Pipettieren-Roboter (Prep Station) überführt und der Vorgang gestartet. In diesem Schritt wurde durch den Einsatz von magnetischen „Beads“, welche komplementäre Nukleotidsequenzen zu Reporter- bzw. Capture-Probe aufweisen, das überschüssige Material entfernt. Durch das schrittweise Binden von zunächst der Capture-Probe und anschließend der Reporter-Probe kann jeweils das nicht gebundene Material ausgewaschen werden. Da die zu analysierende mRNA sowohl durch Reporter- als auch Capture-Probe gebunden ist, wird sie in beiden Waschschritten zurückgehalten. Diese wird erst abschließend eluiert und für die Datenanalyse in die Cartridge überführt und immobilisiert.⁹⁷ (vgl. Abbildung 5).

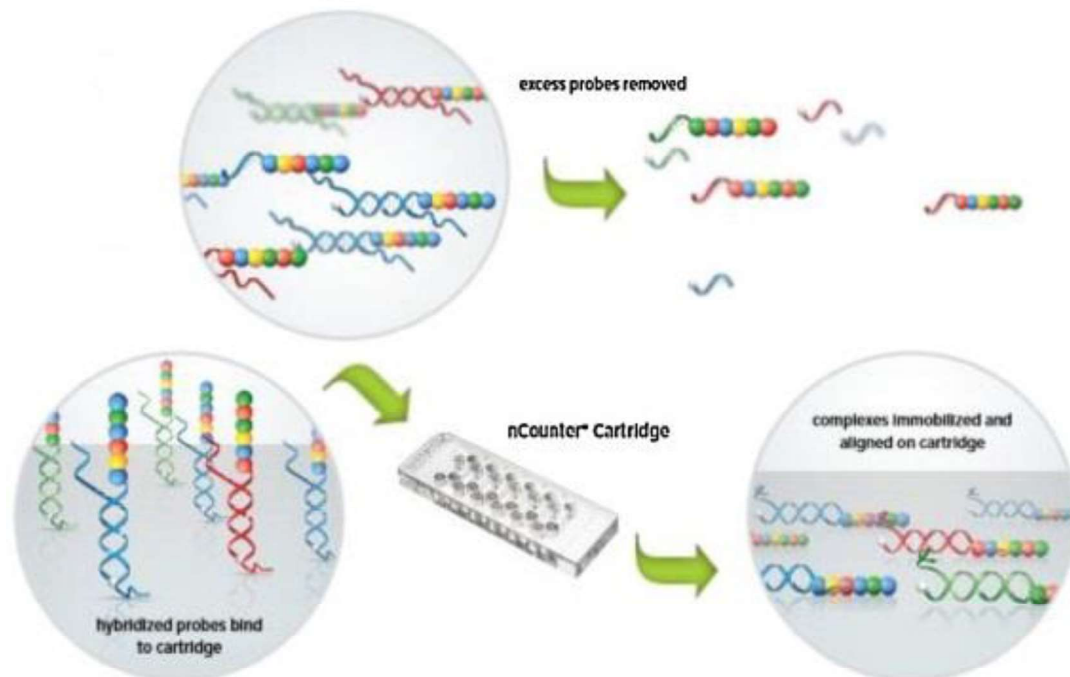


Abbildung 5: Reinigung und Immobilisierung der hybridisierten Proben. Entfernung von überflüssigem Sonden-Material und Immobilisierung und Ausrichtung der Target/Sonden-Komplexe auf der nCounter Cartridge.⁹⁷

Bei der Datengenerierung wurde der Digital Analyzer verwendet, welcher unter dem Einsatz eines CCD-Sensors die Fluoreszenzbarcodes ausliest und somit die Anzahl der als mRNA exprimierten Gene zählt.⁹⁷

Im Weiteren wurde unter Verwendung der Software nSolver 4.0 eine Normalisierung der gewonnenen Rohdaten durchgeführt. Dies geschah zunächst für den gesamten Datensatz. Die daraus ermittelten fehlgeschlagenen Probenläufe wurden entfernt und eine finale Normalisierung getätigt. Der Bereich des Normalisierungsfaktors wurde auf 0,1–10,0 festgesetzt. Aufgrund der geringen durchschnittlichen Zählergebnisse zweier Housekeeping-Gene, die sich somit nicht wesentlich von jenen der Negativ-Kontrollen unterschieden, wurden diese beiden Gene entfernt. Dabei handelte es sich um folgende Housekeeper:

- CC2D1B
- ZKSCAN5

3.2.3 CMS-Klassifikation

Die Erhebung konsentrierter molekularer Subtypen (consensus molecular subtypes, CMS) im kolorektalen Karzinom erfolgte ursprünglich anhand von mRNA-Genexpressionen, welche mittels Microarray-Verfahren erhoben wurden. Auf diesen Daten wurde basierend auf der

Programmiersprache R eine öffentlich verfügbare Klassifikations-Software *CMSclassifier* für Microarray-Daten entwickelt.⁸⁷ Aufgrund der jedoch unterschiedlichen zugrundeliegenden Methodik (NanoString statt Microarray) und der deutlich reduzierten Genzahl im Vergleich zur Originalpublikation konnte die verfügbare Software nicht auf diese Situation übertragen werden, sodass die Klassifikation mit bestehender Methodik und verfügbaren Genen neu abgerufen werden musste.

Insgesamt wurden für die finale CMS-Klassifikation der XELAVIRI-Studie zwei weitere Datensätze aus früheren Untersuchungen benutzt: die originalen, öffentlich verfügbaren Microarray-Daten von Guinney et al. (5973 Gene, nachfolgend Guinney-Set)⁸⁷ sowie die Microarray- und bereits publizierten CMS-Daten der ebenfalls abgeschlossenen FIRE-3-Studie (23.561 Gene, FOLFIRI in Kombination mit Cetuximab oder Bevacizumab in der Erstlinientherapie des *KRAS* Exon 2 Wildtyp metastasierten kolorektalen Karzinoms, nachfolgend FIRE-3-Set)⁹⁰.

Das Guinney-Set diente hierbei als Trainingskollektiv und das FIRE-3-Set als Validierungskollektiv für eine sog. multinomiale logistische Regressionsanalyse. Diese legte die jeweilige Genexpression des Tumorgewebes zugrunde und schätzte darauf basierend die Wahrscheinlichkeit der Gruppenzugehörigkeit zu den bekannten vier CMS-Gruppen ein. Zunächst wurden die CMS-Gruppen im Guinney-Set mit der öffentlich verfügbaren Klassifikations-Software *CMSclassifier* determiniert, jene fungierten nachfolgend als Goldstandard. Diese stellten im weiteren Verlauf die Erfolgskontrolle für die multinomiale logistische Regression dar.

Im nächsten Schritt wurde ein gemeinsames Datenset aus Guinney-Set, FIRE-3-Set und XELAVIRI-Set gebildet, welche insgesamt 465 Gene teilten. Um die Vorhersagekraft der multinomialen Regressionsanalyse zu optimieren, musste zunächst ermittelt werden, welche dieser Gene an der Zuordnung der Tumorproben zu den CMS-Gruppen beteiligt waren. Hierzu wurden zunächst im Rahmen einer sog. penalisierten logistischen Regression (auch LASSO genannt) im Guinney-Set die verfügbaren 465 Gene benutzt, um den vorab definierten Goldstandard an CMS-Gruppen ideal vorherzusagen. Dies geschah durch eine 100-fache Krossvalidierung, welche den optimalen Penalisierungskoeffizienten Lambda ermitteln sollte. Dieser selektierte wiederum die verfügbaren Gene als zugrundeliegende Variablen, um die Prädiktionswahrscheinlichkeit der Klassifizierung zu verbessern und den Fehler zu minimieren.

Abschließend wurde der im Trainingskollektiv (Guinney-Set) ermittelte Penalisierungskoeffizient Lambda benutzt, um die bereits bekannten CMS-Gruppen im Validierungskollektiv (FIRE-3-Set) zu reproduzieren. Nach Erfolgskontrolle wurde die CMS-Klassifikation der Tumorproben der XELAVIRI-Studie abgerufen.

Die Klassifizierung produzierte analog zum originalen Klassifizierungssystem zwei Variablen: predictedCMS und CCMS. Für jede Tumorprobe wurde die Wahrscheinlichkeit der Gruppenzugehörigkeit zu jeder CMS-Gruppe durch die Regressionsanalyse berechnet. Sofern die

Wahrscheinlichkeit der Gruppenzugehörigkeit mehr als 50 % betrug, wurde die Tumorprobe innerhalb der Variable predictedCMS der jeweiligen CMS-Gruppe zugeordnet. Die Variable nearestCMS war hierbei weniger restriktiv, hier erfolgte die Zuordnung zur jeweiligen CMS-Gruppe nur durch die höchste Wahrscheinlichkeit, der Schwellenwert von 50 % musste jedoch nicht erreicht werden. Während damit innerhalb der Variable nearestCMS jede Tumorprobe einer CMS-Gruppe zugeordnet werden konnte, wurden innerhalb der Variable predictedCMS Tumorproben, welche den Schwellenwert von 50 % nicht erreichten, als nicht klassifizierbar eingestuft.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung basierte auf der Kaplan-Meier-Methode, welche zur Abschätzung der Zeit bis zum Strategieveragen (time to failure of strategy, TFS), des progressionsfreien Überlebens (progression-free survival, PFS) und des Gesamtüberlebens (overall survival, OS) herangezogen wurde. Der Vergleich der Überlebensvorteile stützt sich auf den Log-Rank-Hypothesentest. Des Weiteren wurden univariante und multivariante Cox-Regressionsanalysen der Subgruppen für die Endpunkte (TFS, PFS, OS) angefertigt. Das Cox Proportional Hazard Model diente der Interaktionstestung der molekularen Subgruppen mit den Endpunkten. Das statistische Signifikanzniveau betrug $P < 0,05$ (zweiseitig).

Die statistische Analyse erfolgte mittels SAS 9.2 (SAS institute, Cary, North Carolina), SPSS PASW 25.0 (SPSS, Chicago, IL) und R v3.6.1.

4. Ergebnisse

Ein Teil der aufgeführten Ergebnisse wurden bereits 2021 im European Journal of Cancer publiziert⁹⁸. Diese werden im Folgenden erneut dargestellt und durch weitere Analysen ergänzt.

4.1 Patienten- und Tumorcharakteristika

Im Rahmen der XELAVIRI-Studie wurden im Zeitraum der Jahre 2010–2016 insgesamt 434 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) aus 82 deutschen Studienzentren rekrutiert. Das abschließende Analyseset umfasste 421 Patienten (XELAVIRI-Gesamtpopulation). Eine *RAS*- und *BRAF*-Mutationstestung war für 374 der 421 Tumore möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnten 337 Tumorproben gemäß den konsentierten molekularen Subtypen (CMS) klassifiziert werden, wobei für 7 Tumorproben weder Überlebens- noch molekularbiologische Daten vorlagen. Diese bilden die CMS-Subpopulation. (Abbildung 6)

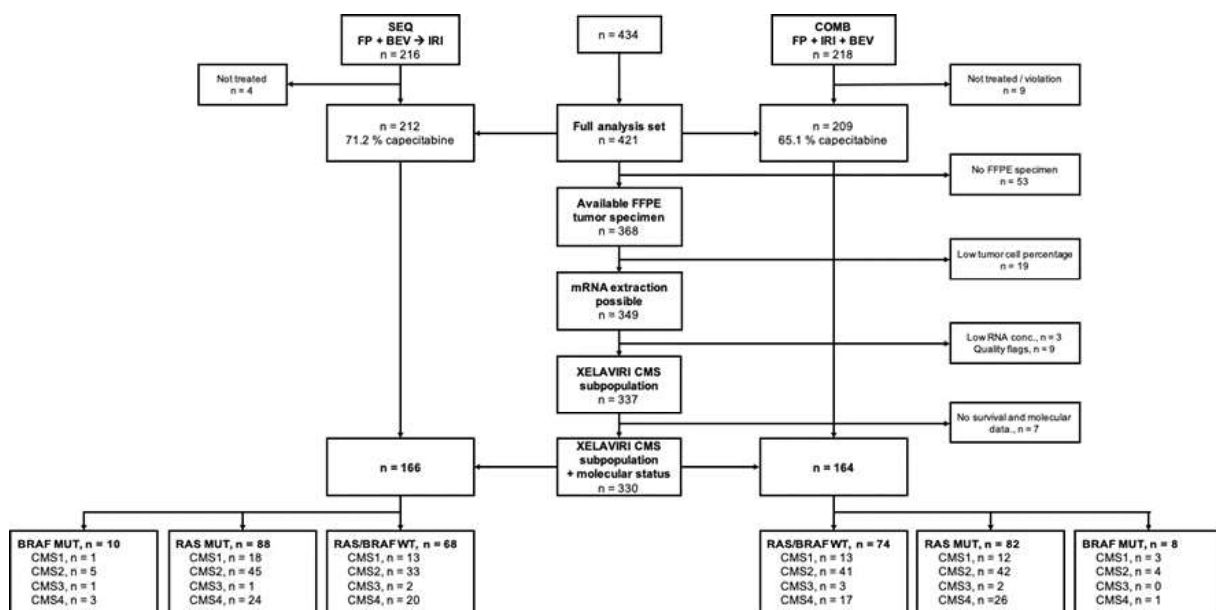


Abbildung 6: CONSORT-Diagramm XELAVIRI-Studie.

Die Baseline Charakteristika zwischen Gesamtpopulation und Subpopulation waren prinzipiell vergleichbar (siehe Tabelle 5).

Baseline Charakteristika

		XELAVIRI-Gesamtpopulation n = 421		CMS-Subpopulation n = 337*	
		seq. Arm n = 212 n (%)	komb. Arm n = 209 n (%)	seq. Arm n = 166 n (%)	komb. Arm n = 164 n (%)
Geschlecht	männlich	137 (64,6)	144 (68,9)	111 (66,9)	112 (68,3)
	weiblich	75 (35,4)	65 (31,1)	55 (33,1)	52 (31,7)
Alter in Jahren	Median (Spannweite)	71 (43 – 87)	69 (42 – 88)	73 (43 – 84)	69 (42 – 84)
	< 70	83 (39,2)	109 (52,2)	57 (34,3)	84 (51,2)
	>= 70	129 (60,8)	100 (47,8)	109 (65,7)	80 (48,8)
ECOG performance index	0	125 (59,0)	124 (59,3)	101 (60,8)	99 (60,4)
	1	85 (40,1)	81 (38,8)	63 (38,0)	61 (37,2)
	Unbekannt	2 (0,9)	4 (1,9)	2 (1,2)	4 (2,4)
Molekulare Subgruppe	<i>RAS/BRAF</i> -Wildtyp	79 (37,3)	79 (37,8)	68 (41,0)	74 (45,1)
	<i>RAS</i> -Mutation	97 (45,8)	97 (46,4)	88 (53,0)	82 (50,0)
	<i>BRAF</i> -Mutation	12 (5,7)	10 (4,8)	10 (6,0)	8 (4,9)
	Unbekannt	24 (11,3)	23 (11,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Lokalisation des Primärtumors	Links	138 (65,1)	135 (64,6)	106 (63,9)	106 (64,6)
	Rechts	68 (32,1)	63 (30,1)	56 (33,7)	49 (29,9)
	Unbekannt	6 (2,8)	11 (5,3)	4 (2,4)	9 (5,5)
Metastasierung	Synchron	151 (71,2)	145 (69,4)	119 (71,7)	112 (68,3)
	Metachron	57 (26,9)	59 (28,2)	45 (27,1)	48 (29,3)
	Unbekannt	4 (1,9)	5 (2,4)	2 (1,2)	4 (2,4)

Anzahl Organe mit Metastasen	1	79 (37,3)	81 (38,8)	63 (38,0)	71 (43,3)
	>= 2	131 (61,8)	126 (60,3)	101 (60,8)	91 (55,5)
	Unbekannt	2 (0,9)	2 (1,0)	2 (1,2)	2 (1,2)
Anzahl Metastasen je Organ	Lebermetastasen	153 (72,2)	159 (76,1)	122 (73,5)	121 (73,8)
	Leber limitiert	48 (22,6)	55 (26,3)	41 (24,7)	47 (28,7)
	Lungenmetastasen	108 (50,9)	86 (41,1)	85 (51,2)	66 (40,2)
	Lymphknotenmetastasen	76 (35,8)	82 (39,2)	56 (33,7)	58 (35,4)
	Metastasen im Peritoneum	16 (7,5)	9 (4,3)	13 (7,8)	7 (4,3)
Vorangegangene Therapie	Metastasen mit anderer Lokalisation	55 (25,9)	48 (23,0)	42 (25,3)	34 (20,7)
	Resektion	163 (76,9)	154 (73,7)	133 (80,1)	134 (81,7)
	Chemotherapie	49 (23,1)	48 (23,0)	40 (24,1)	43 (26,2)
	Radiotherapie	36 (17,0)	32 (15,3)	29 (17,5)	26 (15,9)

Tabelle 5: Baseline Charakteristika XELAVIRI-Gesamtpopulation und CMS-Subpopulation. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog. *Anmerkung: Für n = 7 Patienten lagen keine klinischen Daten vor (vgl. Abbildung 6: CONSORT-Diagramm XELAVIRI-Studie).

4.2 CMS-Verteilung

Die Stratifizierung der analysierten Tumorproben in die konsentierten molekularen Subtypen (CMS) erfolgte sowohl gemäß predictedCMS- als auch nearestCMS-Methodik. Bezüglich der nearestCMS-Klassifikation ergab sich eine prozentuale Verteilung von CMS1 18,4 % (n=62), CMS2 51,6 % (n=174), CMS3 2,7 % (n=9) und CMS4 27,3 % (n=92) (Abbildung 7). Bei der predictedCMS-Klassifikation verblieben 10,7 % der Proben nicht zuordenbar und wurden als unklassifiziert (NA) deklariert (Abbildung 7).

Zur Maximierung der statistischen Power wurde im Weiteren ausschließlich die nearestCMS-Einteilung verwendet. Die Ergebnisse der predictedCMS-Klassifikation sind im Anhang kurz tabellarisch aufgeführt, ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen der nearestCMS-Klassifikation.

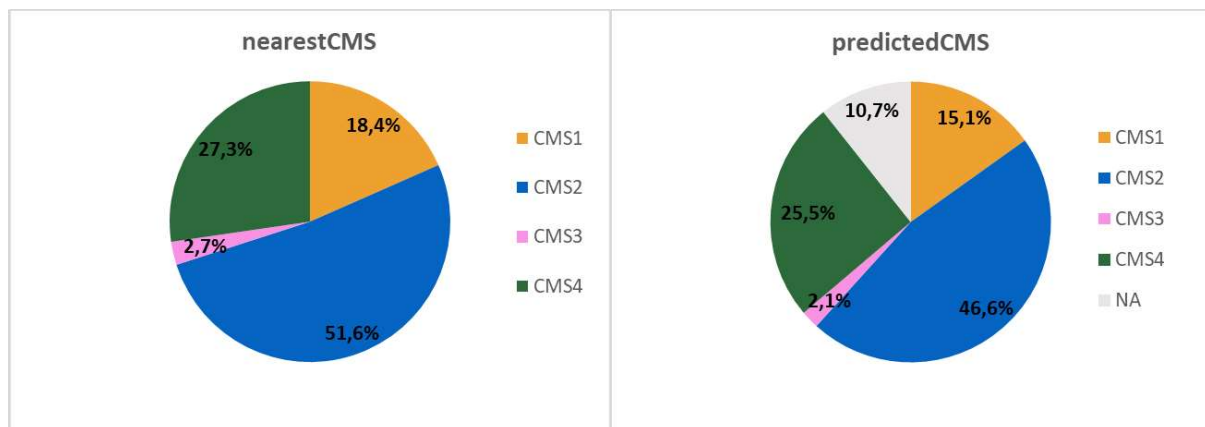


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der konsentierten molekularen Subtypen (CMS) gemäß nearestCMS und predictedCMS. CMS = consensus molecular subtypes, NA = unklassifiziert

Hinsichtlich der Primärtumorlokalisation (rechts vs. links) ergaben sich numerische Unterschiede bei der CMS-Verteilung. CMS1 (rechts: 24,1 %, links: 16,4 %) trat häufiger bei rechtsseitiger Tumorlokalisation auf. CMS2 war mit einem linksseitigen Primärtumor assoziiert (rechts: 49,1 %, links: 52,1 %) (Abbildung 8). Der Chi-Quadrat-Test ergab hierbei keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,348$) (Tabelle 6).

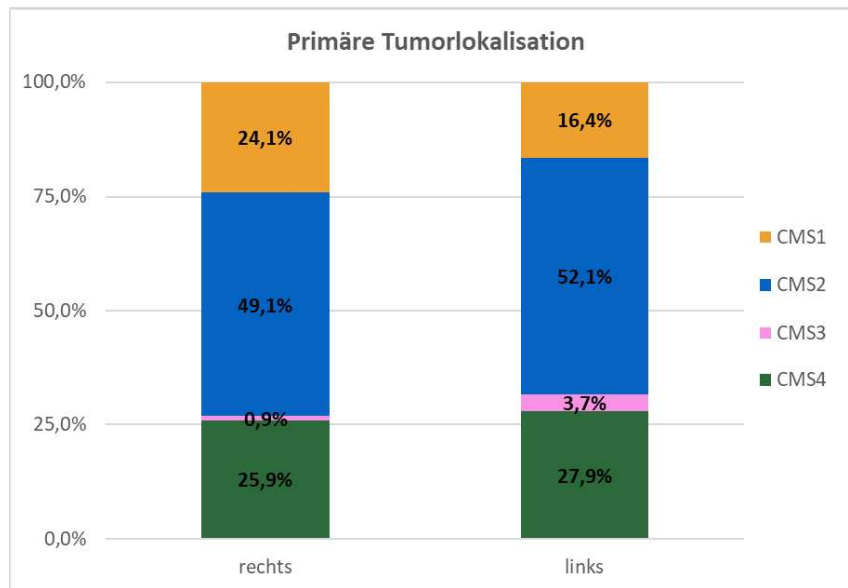


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung von CMS nach primärer Tumorlokalisation (rechts vs. links). CMS = consensus molecular subtypes

Ebenso konnte die Verteilung der Subtypen mit dem Patientenalter assoziiert werden. Die Population der unter 70-Jährigen ist durch einen gesteigerten Anteil von CMS4 im Vergleich zu jener der über 70-Jährigen gekennzeichnet (< 70 Jahre 34,5 % versus \geq 70 Jahre 21,4 %) (Abbildung 9). Der Altersmedian bei CMS4 lag bei 68 Jahren, wohingegen alle anderen Gruppen einen Median von größer als 70 Jahren aufwiesen (Abbildung 9). Die statistische Signifikanz wurde mit $P = 0,049$ (Chi-Quadrat) bestätigt (Tabelle 6).

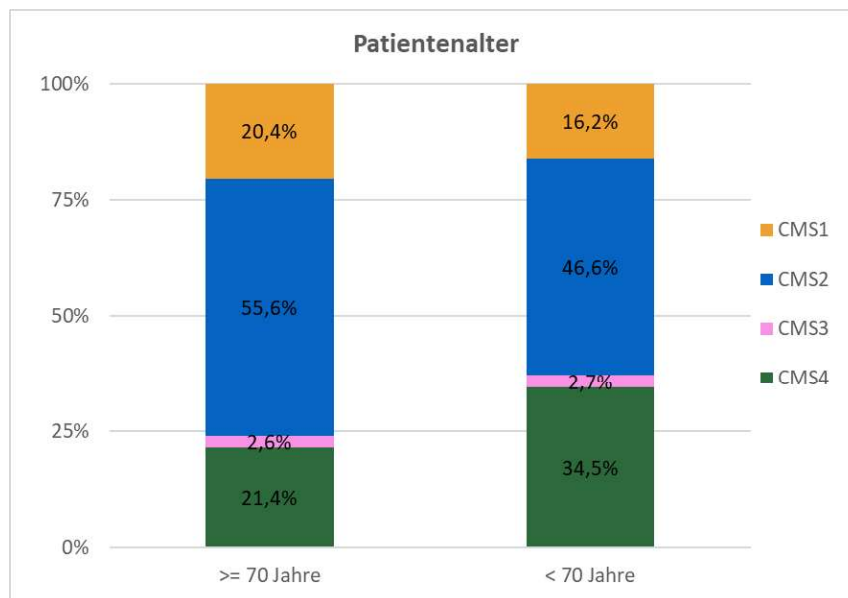


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung von CMS nach Patientenalter (\geq 70 Jahre vs. < 70 Jahre). CMS = consensus molecular subtypes

Der molekulare Mutationsstatus wurde numerisch mit der CMS-Einteilung assoziiert. Bei Vorliegen einer *RAS*-Mutation im Vergleich zu *RAS/BRAF*-Wildtyp und *BRAF*-Mutation trat CMS1 mit 17,6 % (*RAS/BRAF*-Wildtyp: 18,3 %, *BRAF*-Mutation: 22,2 %) seltener und CMS4 mit 29,4 % (*RAS/BRAF*-Wildtyp: 26,1 %, *BRAF*-Mutation: 22,2 %) häufiger auf. Die Werte für CMS3 sind aufgrund der geringen Anzahl von $n = 9$ nicht aussagekräftig. (Abbildung 10)

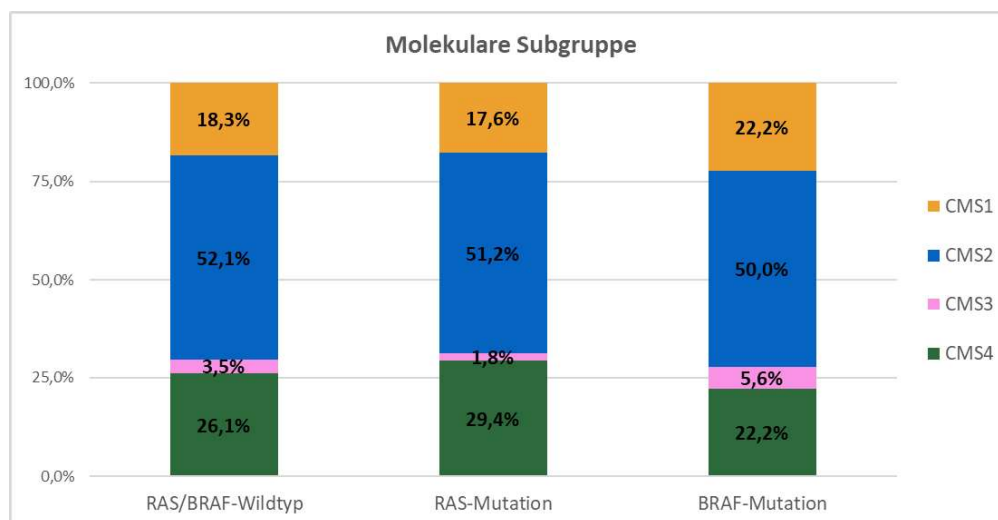


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung von CMS nach molekularer Subgruppe (*RAS/BRAF*-Wildtyp vs. *RAS*-Mutation vs. *BRAF*-Mutation). CMS = consensus molecular subtypes, *RAS* = rat sarcoma, *BRAF* = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog

Details hinsichtlich der CMS-Verteilung in Abhängigkeit der molekularen Signatur sowie der Tumorcharakteristika sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Patientencharakteristika*

		CMS1 n = 62	CMS2 n = 174	CMS3 n = 9	CMS4 n = 92	P (Chi-Quadrat)
		Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	
Geschlecht	Männlich	44 (73,3)	110 (64,7)	7 (77,8)	62 (68,1)	0,575
	Weiblich	16 (26,7)	60 (35,3)	2 (22,2)	29 (31,9)	
Alter in Jahren	Median (Spannweite)	73 (46 – 80)	71 (42 – 84)	71 (56 – 78)	68 (43 – 83)	-
	< 70	22 (36,7)	65 (38,2)	4 (44,4)	50 (54,9)	
	>= 70	38 (63,3)	105 (61,8)	5 (55,6)	41 (45,1)	
Behandlungsbarm	Arm A	32 (53,3)	83 (48,8)	4 (44,4)	47 (51,6)	0,906
	Arm B	28 (46,7)	87 (51,2)	5 (55,6)	44 (48,4)	
ECOG performance index	0	37 (61,7)	108 (65,5)	5 (55,6)	50 (55,6)	0,463
	1	23 (38,3)	57 (34,5)	4 (44,4)	40 (44,4)	
	Unbekannt	2 (3,2)	9 (5,2)	0 (0,0)	2 (2,2)	
Molekulare Subgruppe	RAS/BRAF-Wildtyp	26 (43,3)	74 (43,5)	5 (55,6)	37 (40,7)	0,905
	RAS-Mutation	30 (50,0)	87 (51,2)	3 (33,3)	50 (54,9)	
	BRAF-Mutation	4 (6,7)	9 (5,3)	1 (11,1)	4 (4,4)	
Lokalisation des Primärtumors	Links	34 (56,7)	110 (64,7)	8 (88,9)	60 (65,9)	0,348
	Rechts	25 (41,7)	51 (30,0)	1 (11,1)	28 (30,8)	
	Unbekannt	1 (1,7)	9 (5,3)	0 (0,0)	3 (3,3)	
Metastasierung	Synchron	45 (75,0)	121 (71,2)	6 (66,7)	59 (64,8)	0,755
	Metachron	15 (25,0)	45 (26,5)	3 (33,3)	30 (33,0)	
	Unbekannt	0 (0,0)	4 (2,4)	0 (0,0)	2 (2,2)	

Anzahl Organe mit Metastasen	1	27 (43,5)	71 (40,8)	4 (44,4)	32 (34,8)	0,918
	>= 2	33 (53,2)	98 (56,3)	5 (55,6)	56 (60,9)	
	Unbekannt	2 (3,2)	5 (2,9)	0 (0,0)	4 (4,3)	
	Lebermetastasen	45 (72,7)	130 (74,7)	7 (77,8)	61 (66,3)	
Anzahl Metastasen je Organ	Leber limitiert	19 (30,6)	47 (27,0)	3 (33,3)	19 (20,7)	-
	Lungenmetastasen	32 (51,6)	76 (43,7)	4 (44,4)	39 (42,4)	
	Lymphknotenmetastasen	17 (27,4)	59 (33,9)	2 (22,2)	36 (39,1)	
	Metastasen im Peritoneum	4 (6,5)	7 (4,0)	0 (0,0)	9 (9,8)	
	Metastasen mit anderer Lokalisation	9 (14,5)	41 (23,6)	2 (22,2)	24 (26,1)	
Vorangegangene Therapie	Resektion	50 (80,6)	132 (75,9)	9 (66,7)	76 (82,6)	-
	Chemotherapie	14 (22,6)	35 (20,1)	2 (22,2)	32 (34,8)	
	Radiotherapie	11 (17,7)	20 (11,5)	1 (11,1)	23 (25,0)	

Tabelle 6: Patientencharakteristika der CMS-Gruppen und Chi-Quadrat-Test. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog. *Anmerkung: Für n = 7 Patienten (CMS1 = 2, CMS2 = 4, CMS3 = 0, CMS4 = 1) lagen keine klinischen Daten vor (vgl. Abbildung 6: CONSORT-Diagramm XELAVIRI-Studie).

4.3 Überlebensanalysen

Eine Analyse der klinischen Endpunkte (Zeit bis zum Strategiever sagen, progressionsfreies Überleben, Gesamtüberleben) erfolgte sowohl in Bezug auf die generelle prognostische Aussagekraft der einzelnen molekularen Subtypen ungeachtet der Therapie, sowie auf den prädiktiven Wert der Subtypen als Biomarker für die Vorhersage des Nutzens eines bestimmten Therapieverfahrens.

4.3.1 Prognostischer Einfluss von CMS

Die prognostische Bedeutung der CMS-Gruppen wurde zunächst unter allen Patienten und anschließend bezogen auf den *RAS/BRAF*-Mutationsstatus analysiert.

Alle Patienten

Ein signifikanter Unterschied im Überleben bei Gegenüberstellung der einzelnen CMS-Gruppen trat weder bei der Zeit bis zum Strategiever sagen (time to failure of strategy, TFS), noch bei dem progressionsfreien Überleben (progression-free survival, PFS) oder dem Gesamtüberleben (overall survival, OS) auf. Die Ergebnisse sind anhand der Überlebenskurven der Abbildungen 11–13 graphisch dargestellt.

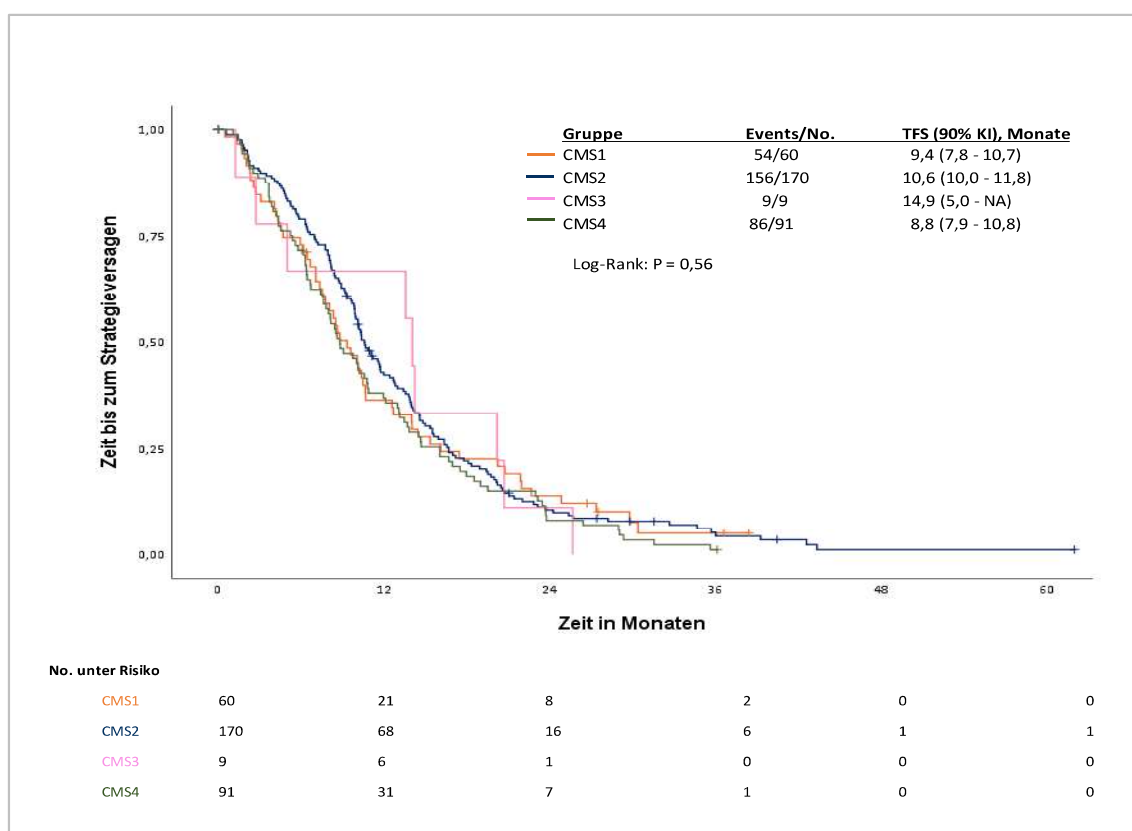


Abbildung 11: Vergleich der Zeit bis zum Strategiever sagen der CMS-Gruppen. CMS = consensus molecular subtypes

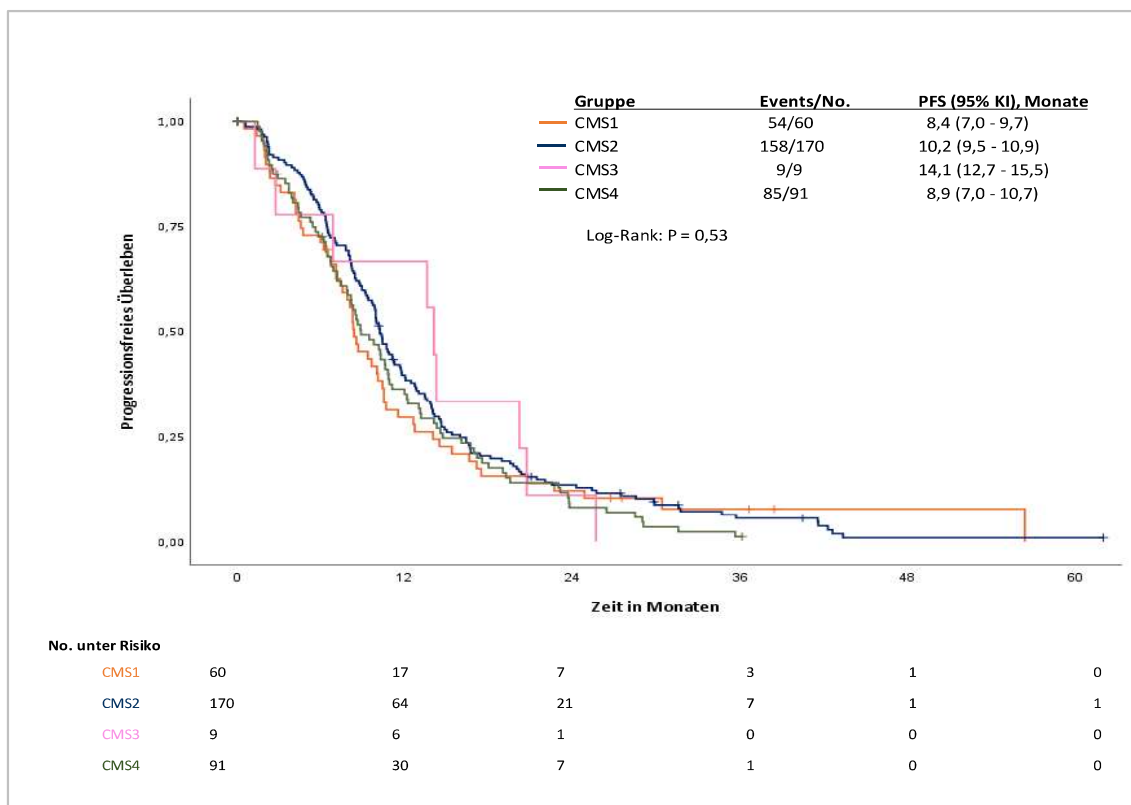


Abbildung 12: Vergleich des progressionsfreien Überlebens der CMS-Gruppen. CMS = consensus molecular subtypes

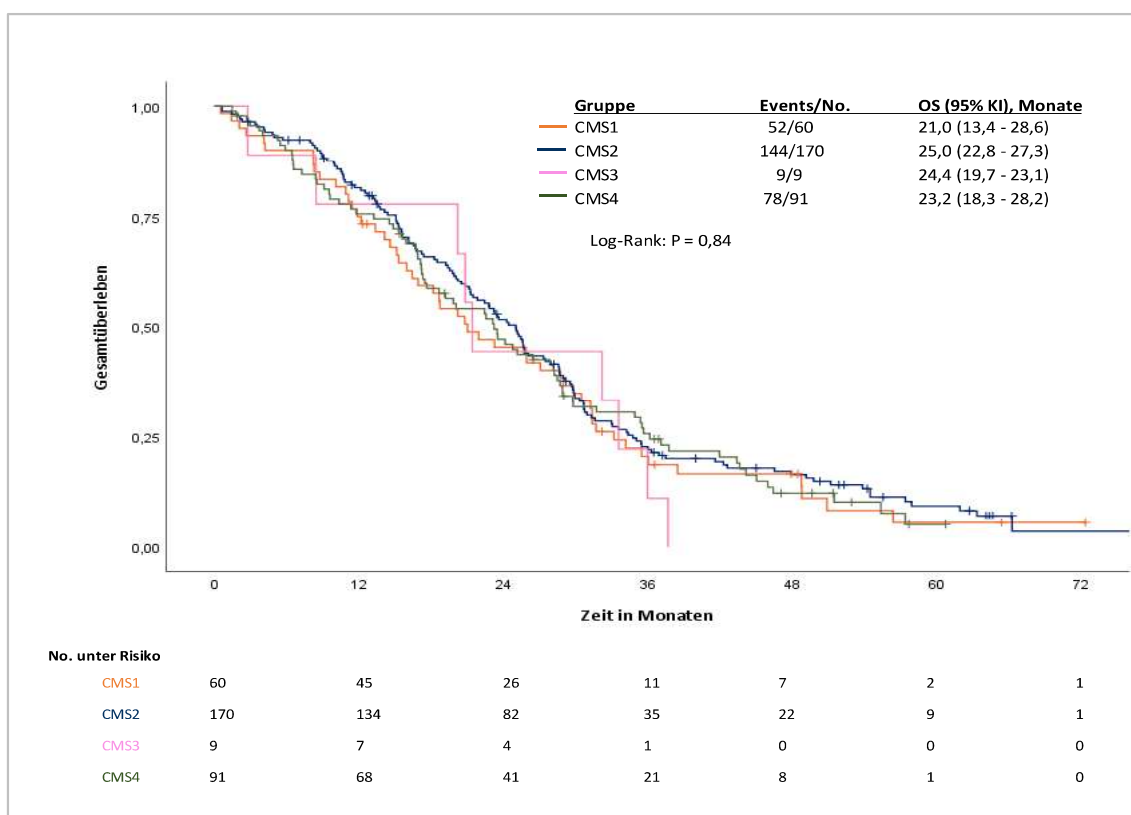


Abbildung 13: Vergleich des Gesamtüberlebens der CMS-Gruppen. CMS = consensus molecular subtypes

RAS/BRAF-Wildtyp

Ein signifikantes Ergebnis der CMS-Überlebensanalysen von TFS, PFS und OS innerhalb von Tumoren mit *RAS/BRAF*-Wildtyp-Status zeigte sich nicht. Die Log-Rank-Testung erzielte Werte von $P = 0,723$ für die TFS, von $P = 0,804$ für das PFS und von $P = 0,359$ für das OS. (Tabelle 7)

RAS-Mutation

Auch bei der Patientenkohorte mit *RAS*-mutierten Tumoren ergab sich kein signifikanter Überlebensvorteil bei Gegenüberstellung der einzelnen CMS-Gruppen (Log-Rank: TFS $P = 0,390$, PFS $P = 0,378$, OS $P = 0,749$). (Tabelle 7)

BRAF-Mutation

Tumore, welche eine *BRAF*-Mutation aufwiesen, fanden sich lediglich bei 18 Patienten. Aufgrund dieser geringen Anzahl ist die statistische Power stark vermindert, wodurch aus den erhaltenen Ergebnissen keine relevanten Rückschlüsse gezogen werden können. Auf eine Darstellung dieser wurde dahingehend verzichtet.

Primärtumorlokalisation

Unter Einbezug der primären Tumorlokalisation (linksseitig vs. rechtsseitig) zeigte sich mit Ausnahme des OS ($P = 0,010$) bei rechtsseitigen Primärtumoren kein signifikantes Ergebnis in Hinblick auf die Überlebensanalysen der einzelnen CMS-Gruppen. (Tabelle 7)

Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen

Status		Zeit bis zum Strategieversagen		Progressionsfreies Überleben		Gesamtüberleben	
		Median, Monate (90 % CI)	P (Log-Rank)	Median, Monate (95 % CI)	P (Log-Rank)	Median, Monate (95 % CI)	P (Log-Rank)
Alle Patienten n = 330	CMS1 , n = 60	9,4 (7,8 – 10,7)	0,558	8,4 (7,0 – 9,7)	0,534	21,0 (13,4 – 28,6)	0,836
	CMS2 , n = 170	10,6 (10,0 – 11,8)		10,2 (9,5 – 10,9)		25,0 (22,8 – 27,3)	
	CMS3 , n = 9	14,9 (5,0 – NA)		14,1 (12,7 – 15,5)		21,4 (19,7 – 23,1)	
	CMS4 , n = 91	8,8 (7,9 – 10,8)		8,9 (7,0 – 10,7)		23,2 (18,3 – 28,2)	
RAS/BRAF-Wildtyp n = 142	CMS1 , n = 26	12,6 (10,1 – 20,8)	0,723	10,5 (9,6 – 11,5)	0,804	31,4 (26,3 – 36,5)	0,359
	CMS2 , n = 74	11,8 (10,0 – 14,6)		10,4 (8,9 – 12,0)		28,7 (26,0 – 31,4)	
	CMS3 , n = 5	14,1 (5,0 – NA)		14,1 (0,0 – 29,6)		32,2 (7,8 – 56,6)	
	CMS4 , n = 37	10,6 (8,6 – 13,9)		10,2 (7,7 – 12,6)		24,1 (18,1 – 30,2)	
RAS-Mutation n = 170	CMS1 , n = 36	8,7 (6,5 – 10,5)	0,390	8,1 (6,0 – 10,2)	0,378	16,9 (10,4 – 23,5)	0,749
	CMS2 , n = 87	10,7 (10,0 – 12,8)		10,3 (9,2 – 11,5)		23,2 (19,4 – 27,0)	
	CMS3 , n = 3	13,6 (2,8 – NA)		13,6 (0,0 – 31,0)		21,4 (0,0 – 51,3)	
	CMS4 , n = 50	8,0 (6,4 – 10,2)		8,2 (6,5 – 10,0)		23,1 (16,8 – 29,5)	
Linksseitiger Primärtumor n = 212	CMS1 , n = 34	8,7 (7,4 – 10,7)	0,903	8,3 (7,5 – 9,1)	0,823	25,9 (11,2 – 40,6)	0,807
	CMS2 , n = 110	10,4 (9,9 – 11,8)		10,2 (9,5 – 10,8)		25,7 (22,5 – 28,9)	
	CMS3 , n = 8	14,2 (13,6 – NA)		14,1 (13,2 – 15,0)		21,4 (5,7 – 37,2)	
	CMS4 , n = 60	10,3 (8,9 – 13,2)		10,6 (9,3 – 11,8)		26,4 (21,5 – 31,4)	
Rechtsseitiger Primärtumor n = 105	CMS1 , n = 25	10,4 (6,7 – 15,4)	0,174	8,4 (4,4 – 12,4)	0,131	20,2 (16,9 – 23,5)	0,010
	CMS2 , n = 51	10,2 (8,1 – 14,0)		9,9 (7,4 – 12,4)		20,2 (16,5 – 23,9)	
	CMS3 , n = 1	2,76 (n/a)		2,76 (n/a)		2,76 (n/a)	
	CMS4 , n = 28	5,3 (3,7 – 8,2)		8,1 (5,9 – 10,3)		13,2 (6,2 – 20,3)	

Tabelle 7: Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen für die gesamte Patientenkohorte sowie in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe (RAS/BRAF-Mutationsstatus). CMS = consensus molecular subtypes, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, NA = nicht verfügbar

4.3.2 Prädiktive Aussagekraft von CMS

Therapieintensität

Bei der Gegenüberstellung der beiden Therapieintensitäten (kombiniert vs. sequenziell) innerhalb der einzelnen CMS-Gruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Überlebensendpunkte (TFS, PFS, OS).

Für CMS2 zeigte sich in Hinblick auf das OS mit einer Hazard Ratio [95 % KI] von 0,74 [0,53–1,03] eine Unterlegenheit der sequenziellen Therapie (seq. Arm). Bei CMS4-Patienten scheint in Bezug auf das PFS ebenfalls das sequenzielle Verfahren unterlegen (PFS: HR [95 % KI] = 0,67 [0,43–1,03]). In Bezug auf das TFS konnte innerhalb der molekularen Subtypen kein signifikanter Überlebensvorteil eines Therapiekonzeptes erzielt werden. (Tabelle 8)

Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe

Status		Zeit bis zum Strategieversagen (TFS)			Progressionsfreies Überleben (PFS)			Gesamtüberleben (OS)		
		Median (90 % KI)	HR (90 % KI)	P	Median (95 % KI)	HR (95 % KI)	P	Median (95 % KI)	HR (95 % KI)	P
CMS1 n = 60	seq. Arm n = 32	8,6 (6,5 – 10,7)	0,67 (0,42 – 1,06)	0,15	7,6 (5,4 – 9,7)	0,64 (0,37 – 1,11)	0,11	18,7 (11,1 – 26,3)	0,68 (0,39 – 1,19)	0,18
	komb. Arm n = 28	10,1 (8,1 – 12,7)			10,1 (7,6 – 12,6)			28,7 (14,4 – 43,0)		
CMS2 n = 170	seq. Arm n = 83	11,1 (10,0 – 13,0)	1,00 (0,77 – 1,30)	0,997	9,9 (8,0 – 11,9)	0,77 (0,56 – 1,06)	0,11	22,8 (19,1 – 26,6)	0,74 (0,53 – 1,03)	0,077
	komb. Arm n = 87	10,4 (9,7 – 12,0)			11,3 (8,9 – 13,6)			25,6 (24,6 – 26,6)		
CMS3 n = 9	seq. Arm n = 4	9,3 (1,28 – NA)	0,37 (0,10 – 1,33)	0,20	6,9 (0,0 – 18,9)	0,37 (0,08 – 1,70)	0,20	20,2 (8,1 – 32,3)	0,14 (0,02 – 1,31)	0,084
	komb. Arm n = 5	14,3 (14,1 – 20,7)			14,3 (13,9 – 14,6)			33,6 (30,6 – 36,5)		
CMS4 n = 91	seq. Arm n = 47	8,5 (6,4 – 13,1)	0,86 (0,60 – 1,23)	0,48	7,9 (6,4 – 9,4)	0,67 (0,43 – 1,03)	0,067	20,1 (12,3 – 27,9)	0,83 (0,53 – 1,30)	0,42
	komb. Arm n = 44	10,3 (8,0 – 13,1)			12,0 (8,4 – 15,5)			24,1 (17,9 – 30,4)		

Tabelle 8: Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe. CMS = consensus molecular subtypes, seq. Arm = sequenzielles Therapieverfahren mit Fluoropyrimidin und Bevacizumab gefolgt von Irinotecan im Falle einer Krankheitsprogression, komb. Arm = kombiniertes Therapieverfahren mit initial Fluoropyrimidin, Bevacizumab und Irinotecan

Molekulare Subgruppen

Eine DNA-Sequenzierung des Full-Analysis-Sets der XELAVIRI-Gesamtpopulation ergab, dass insgesamt 158 Patienten einen *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumor, 194 Patienten einen Tumor mit *RAS*-Mutation und 24 Patienten einen Tumor mit *BRAF*-Mutation aufwiesen. Innerhalb der CMS-Subpopulation fanden sich 142 *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumore, 170 *RAS*-mutierte Tumore und 18 *BRAF*-mutierte Tumore. (Tabelle 5)

Im Full-Analysis-Set der XELAVIRI-Studie konnte innerhalb der *RAS/BRAF*-Wildtyp-Subpopulation eine Unterlegenheit der sequenziellen Therapie gegenüber der initialen Kombinationstherapie festgestellt werden.⁹⁵

a) *RAS/BRAF*-Wildtyp

Die CMS-Subpopulation ermöglichte eine Analyse des *RAS/BRAF*-Mutationsstatus in Abhängigkeit des molekularen Subtyps (CMS). Daraus resultierend ergaben sich für Patienten mit CMS2 oder CMS4 und einem *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumor ein signifikant längeres OS sowie PFS im Falle einer Kombinationstherapie gegenüber einer sequenziellen Therapie. Im Detail zeigte sich für CMS2 ein medianes OS von 29,9 vs. 27,3 Monaten (HR [95 % KI] = 0,56 [0,3–0,96], $p = 0,036$) sowie ein PFS von 13,4 versus 7,8 Monaten (HR [95 % KI] = 0,48 [0,29–0,79], $p = 0,004$). Die Cox-Regressionsanalyse unter CMS4-Tumoren zeigte ein ähnliches Resultat, welches das Signifikanzniveau von 5 % jedoch nicht ganz erreichte (OS: HR [95 % KI] = 0,53 [0,26–1,08], $p = 0,079$; PFS: HR [95 % KI] = 0,54 [0,27–1,07], $p = 0,078$). Für die Zeit bis zum Strategieveragen (TFS) bei Patienten mit *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumoren präsentierte sich die Unterlegenheit des sequenziellen Therapieansatzes nur im Subtyp CMS2 (12,7 Monate komb. Arm vs. 10,0 Monate seq. Arm; HR [90 % KI] = 0,63 [0,41–0,95], $P = 0,066$). Die Gruppen CMS1 und CMS3 zeigten in der molekularen Subpopulation der *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumore keine eindeutige Präferenz bezüglich eines Therapiekonzeptes. (Abbildung 14 sowie Tabelle 15 - Anhang)

b) *RAS*-Mutation

Die Analyse von CMS1-Subgruppen-Patienten mit *RAS*-mutierten Tumoren ergab ein signifikant längeres Gesamtüberleben der initialen Kombinationstherapie im Vergleich mit dem sequenziellen Verfahren. Das mediane OS unterschied sich deutlich mit 21,0 Monaten (95 % KI: 3,1–38,9 Monate) im komb. Arm von jenem im seq. Arm mit 14,1 Monaten (95 % KI: 9,1–19,1 Monate). Diesbezüglich resultierte eine Hazard Ratio [95 % KI] von 0,43 [0,20–0,95], welche mit einem P-Wert von 0,038 die signifikante Unterlegenheit des seq. Arms widerspiegelt. Für die Zeit bis zum Strategieveragen und das progressionsfreie Überleben konnte die Signifikanz nicht erzielt werden (TFS: 9,4 Monate komb. Arm vs. 7,9 Monate seq. Arm; HR [90 % KI] = 0,64 [0,33–1,26]; PFS: 9,4 Monate komb. Arm vs. 6,5 Monate seq. Arm; HR [95 % KI] = 0,54 [0,24–1,22]). (Abbildung 14 sowie Tabelle 15 – Anhang)

Eine Überlegenheit des sequenziellen Ansatzes konnte für Patienten der CMS-Gruppe 2 und eines *RAS*-mutierten Tumors in Bezug auf die TFS detektiert werden. So zeigte sich eine mediane Zeit von 9,9 Monaten im komb. Arm versus 12,5 im seq. Arm. Die statistische Signifikanz wird durch die Hazard Ratio [90 % KI] von 1,59 [1,10–2,30] und einem P-Wert von 0,040 belegt. (Abbildung 14 sowie Tabelle 15 - Anhang)

In allen anderen Fällen konnte in der Subgruppenanalyse der *RAS*-mutierten Tumore keine Therapieüberlegenheit eruiert werden (Abbildung 14 sowie Tabelle 15 - Anhang).

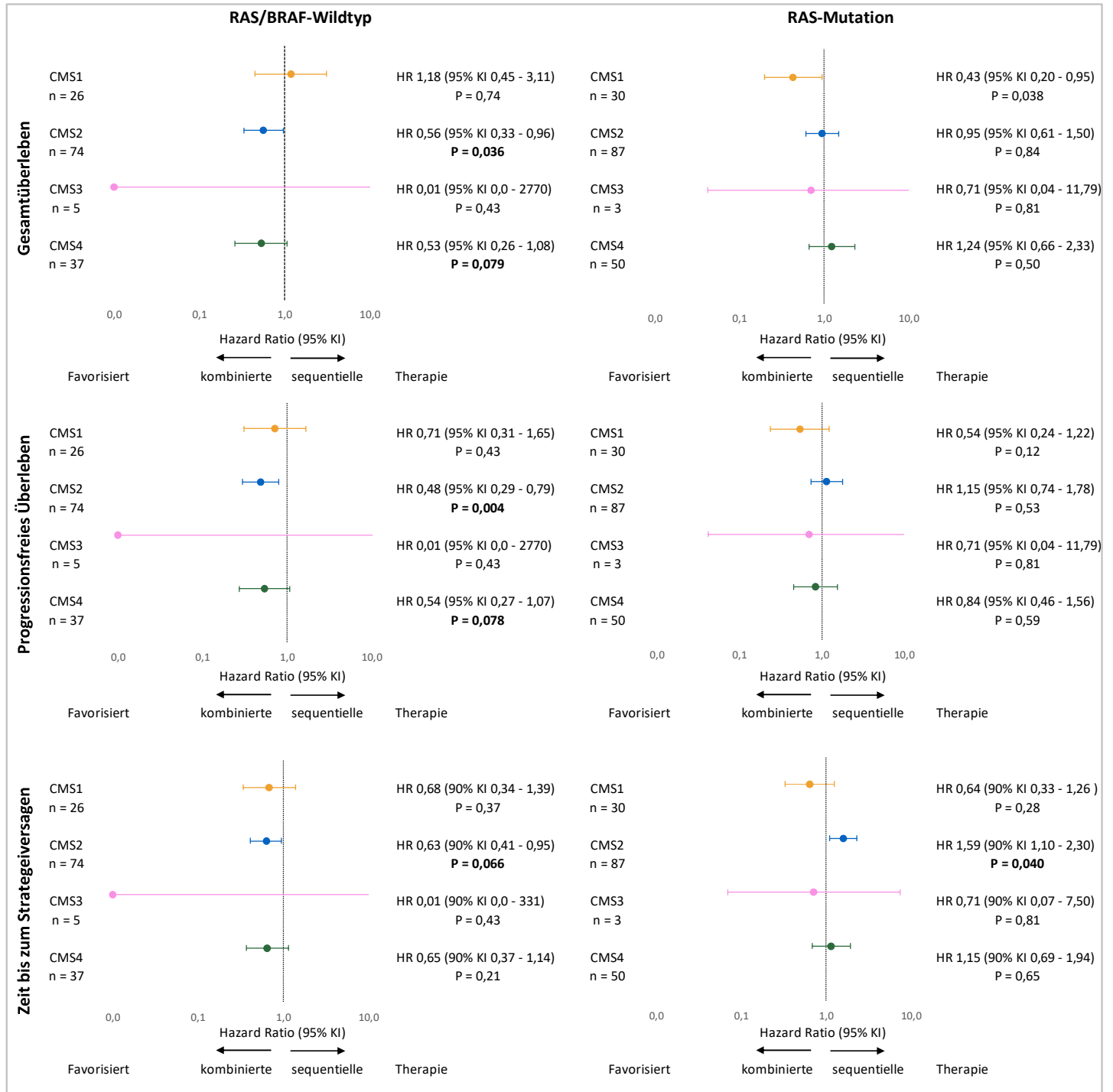


Abbildung 14: Forest Plot der CMS-Gruppen und deren *RAS/BRAF*-Mutationsstatus in Bezug auf das Therapieverfahren für das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben und die Zeit bis zum Strategieversagen. CMS = consensus molecular subtypes, *RAS* = rat sarcoma, *BRAF* = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, sequenzielle Therapie = Fluoropyrimidin und Bevacizumab gefolgt von Irinotecan im Falle einer Krankheitsprogression, kombinierte Therapie = initial Fluoropyrimidin, Bevacizumab und Irinotecan

c) *BRAF*-Mutation

Für die molekulare Subgruppe in Bezug auf *BRAF*-mutierte Tumore kann aufgrund der niedrigen Fallzahl von lediglich 18 Tumoren keine relevanten Rückschlüsse gezogen werden. Die ermittelten Überlebensdaten sind dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tabelle 15 - Anhang).

4.4 Uni- und multivariate Regressionsanalysen

Univariate Cox-Regressionsanalyse

Zur Abschätzung der Effektgröße prognose-assoziierten Variablen auf TFS, OS und PFS erfolgten univariaten Cox-Regressionsanalysen mit Inklusion der Baseline Charakteristika (siehe Tabelle 5), molekularbiologischer Faktoren (*RAS/BRAF*-Status) sowie der CMS-Subgruppen. Die Ergebnisse sind zur Veranschaulichung durch Forest Plots, die die Hazard Ratio sowie dessen Konfidenzintervall von 90 % bzw. 95 % widerspiegeln, illustriert. Werte kleiner 1 begünstigen den kombinierten Therapiearm, Werte größer 1 vice versa den sequenziellen Therapiearm.

Eine signifikante Unterlegenheit des sequenziellen Therapiekonzeptes (FP + Iri + Bev) für die Zeit bis zum Strategieversagen zeigte sich in der männlichen Patientenkohorte, bei Patienten mit *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumoren sowie beim Vorliegen von peritonealen Metastasen. Bei weiblichen Patienten war der sequenzielle Arm signifikant effektiver. (Abbildung 15)

Männliche Patienten, ältere Patienten (≥ 70 Jahre), ein ECOG-Status von 0 oder 1, *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumore linksseitige Primärtumore synchrone Metastasierung, Patienten mit mindestens zwei metastasen-befallenen Organen sowie Metastasen in der Leber, der Lunge, den Lymphknoten oder im Peritoneum hatten ein signifikant verlängertes PFS in der Kombinationstherapie. (Abbildung 16)

Ein signifikante Unterlegenheit der sequenziellen Therapie in Bezug auf das OS zeigte sich auch in den Subgruppen der männlichen Patienten, Patientenalter < 70 Jahre, *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumore, linksseitige Primärlokalisation des Tumors, ≥ 2 Organe mit Metastasen, Lymphknotenmetastasen, sowie vorangegangene Chemotherapie oder Radiotherapie. (Abbildung 17)

Sowohl beim PFS als auch beim OS konnte bei keiner Variable eine statistisch signifikante Überlegenheit des sequenziellen Therapiekonzeptes eruiert werden.

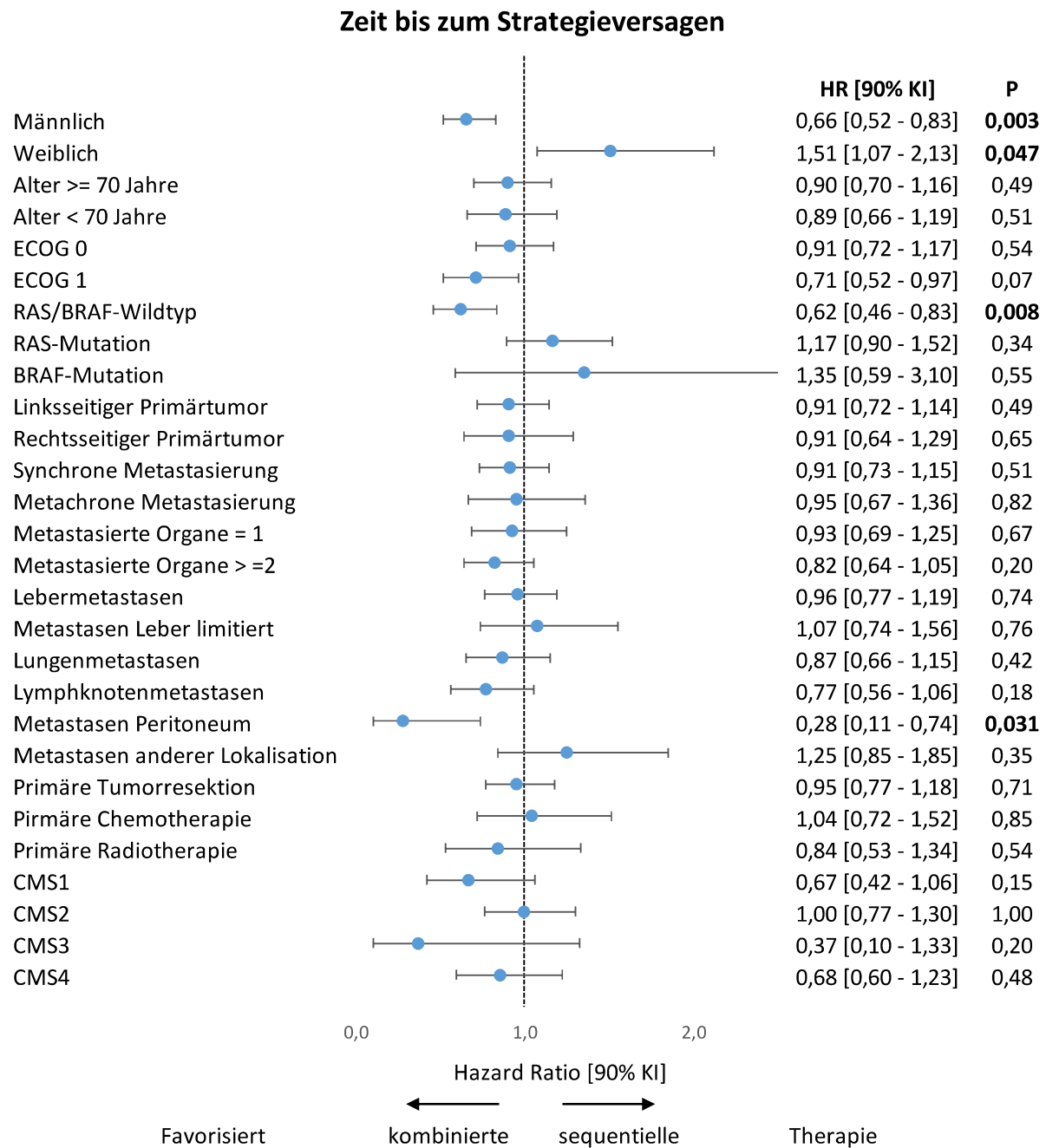


Abbildung 15: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für die Zeit bis zum Strategieversagen. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog

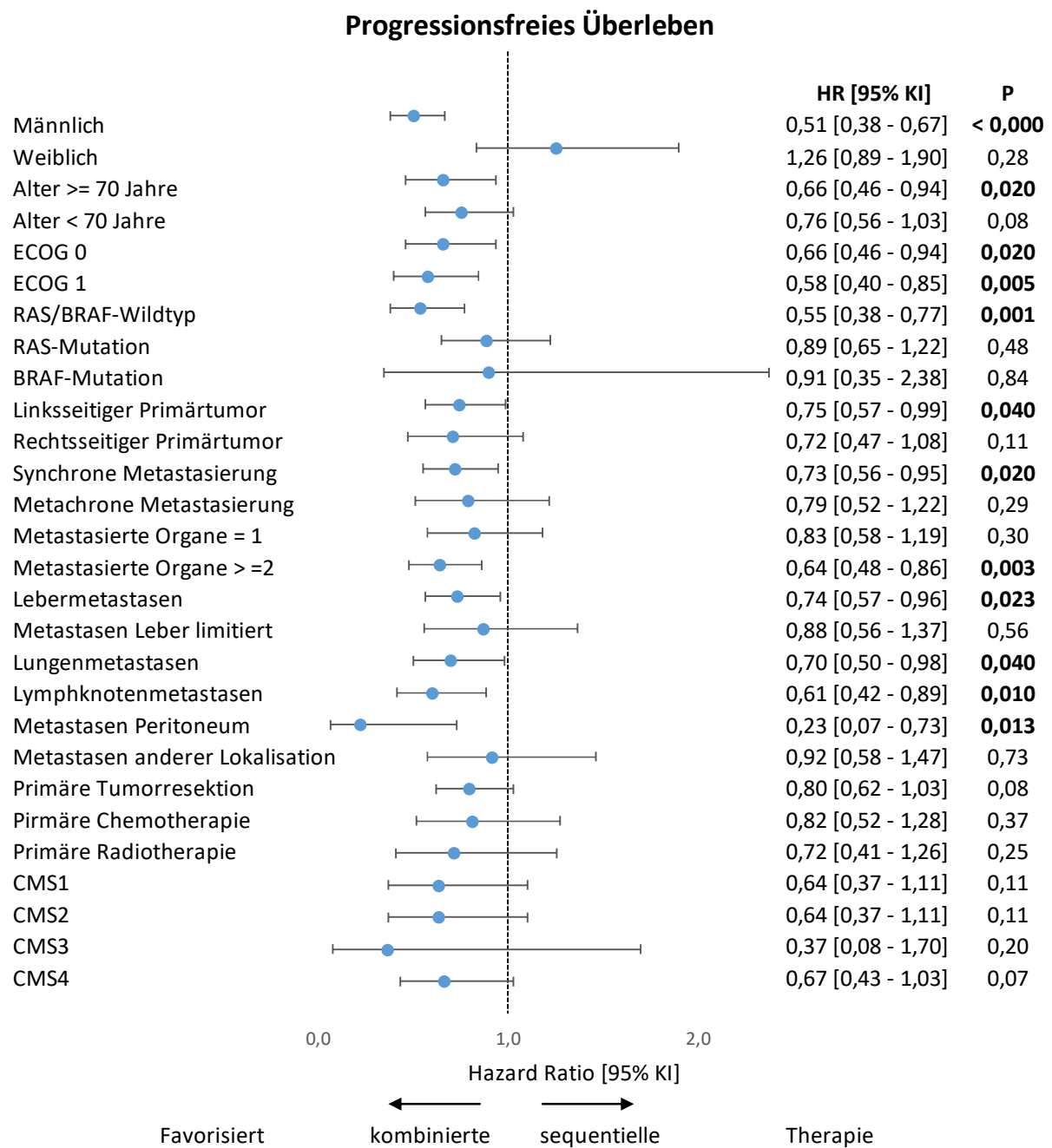


Abbildung 16: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für die Zeit bis zum Strategieversagen. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog

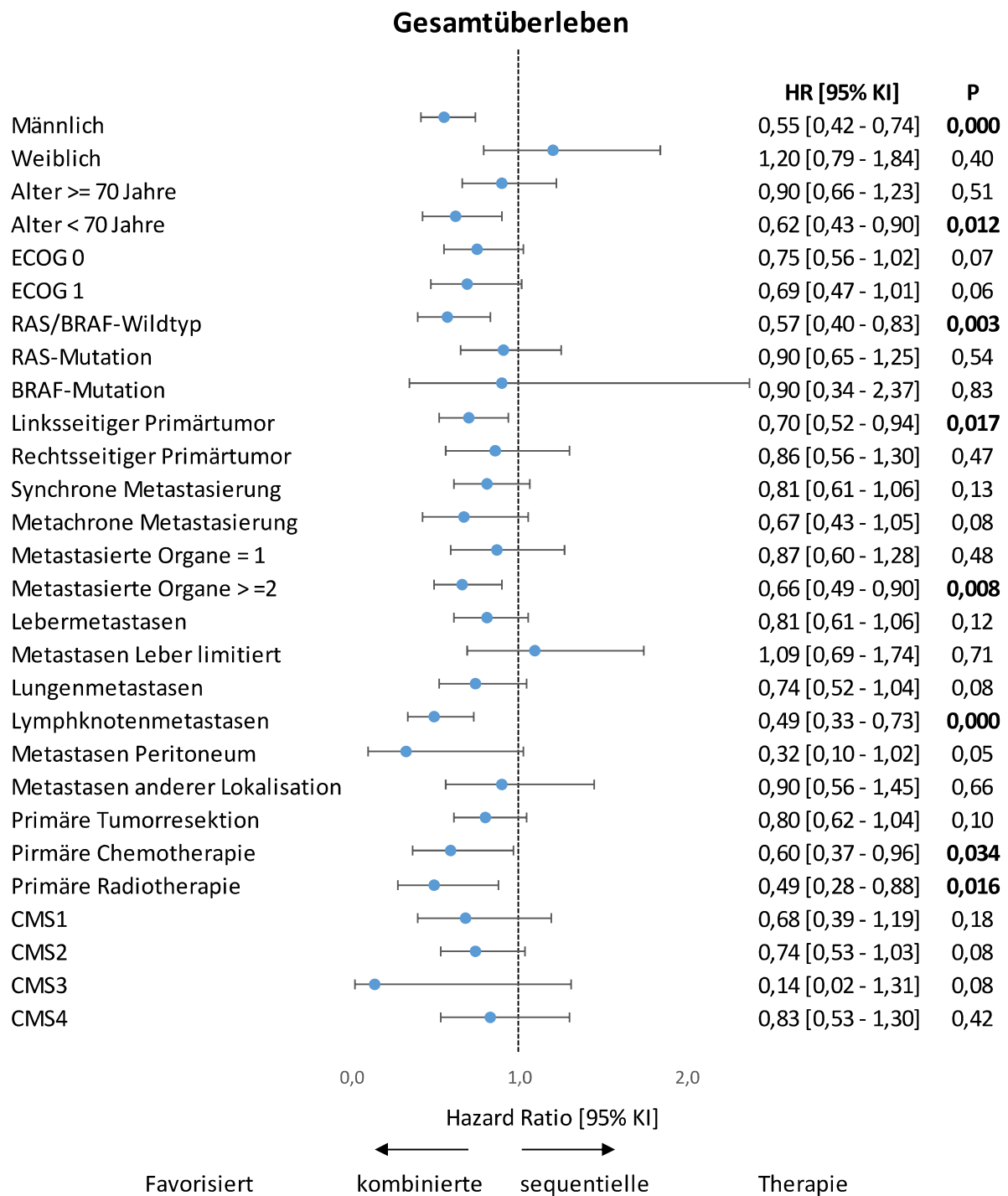


Abbildung 17: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für das Gesamtüberleben. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog

Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Unter Verwendung eines multivariaten Cox-Regressionsverfahrens war eine Testung auf interagierende Variablen möglich. Bei diesem Verfahren werden die einzelnen Variablen schrittweise selektiert, sodass am Ende nur noch jene mit einem signifikanten Effekt auf das Überleben persistieren. Dies erfolgte mittels eines Likelihood-Quotienten-Tests und einer schrittweisen Rückwärtsselektion. Die Ergebnisse sind den Tabellen 9–11 zu entnehmen.

Bezüglich der Zeit bis zum Strategiever sagen zeigten sich RAS/BRAF-Wildtyp-Tumore, RAS-mutierte-Tumore, die Anzahl der Organe mit Metastasen sowie das Vorhandensein von Lungenmetastasen und Metastasen mit anderer Lokalisation als signifikante Einflussfaktoren (Tabelle 9). Für das progressionsfreie Überleben konnten Leber- sowie Lungenmetastasen als signifikante Faktoren eruiert werden (Tabelle 10). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens persistierten die Faktoren Alter sowie Leber-, Lungen- und Lymphknotenmetastasen und sind somit als signifikant anzusehen (Tabelle 11). CMS verbleibt bei keinem der drei klinischen Endpunkte als signifikanter Faktor.

Zeit bis zum Strategiever sagen

		HR (90 % KI)	P
Molekulare Subgruppe	<i>RAS/BRAF</i> -Wildtyp vs. andere	0,23 (0,09 – 0,60)	0,012
	<i>RAS</i> -Mutation vs. andere	0,28 (0,11 – 0,70)	0,022
Anzahl Organe mit Metastasen	1 vs. ≥ 2	0,64 (0,42 – 0,98)	0,085
Organe mit Metastasen	Metastasen in Lunge	0,51 (0,34 – 0,77)	0,007
	Metastasen mit anderer Lokalisation	2,16 (1,33 – 3,51)	0,009

Tabelle 9: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für die Zeit bis zum Strategiever sagen. RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog.

Progressionsfreies Überleben

		HR (95 % KI)	P
Organe mit Metastasen	Lebermetastasen	0,65 (0,41 – 1,03)	0,064
	Lungenmetastasen	0,54 (0,34 – 0,86)	0,009

Tabelle 10: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für das progressionsfreie Überleben.

Gesamtüberleben

		HR (95 % KI)	P
Alter	<70 vs. ≥ 70	0,57 (0,35 – 0,93)	0,023
Organe mit Metastasen	Lebermetastasen	0,55 (0,33 – 0,92)	0,023
	Lungenmetastasen	0,51 (0,30 – 0,87)	0,013
	Lymphknotenmetastasen	0,62 (0,37 – 1,02)	0,062

Tabelle 11: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben.

Interaktionstest

Eine Interaktionstestung zweier unabhängiger Variablen zeigt auf, wenn der Effekt einer Variablen in Abhängigkeit des Effektes einer anderen Variablen auftritt.

Im Zuge des Interaktionstests (zweiseitig) der CMS-Subgruppe und des *RAS/BRAF*-Status konnte ein signifikantes Ergebnis der Unterlegenheit der sequenziellen Therapie für das Gesamtüberleben ($P = 0,012$) erzielt werden. Die Zeit bis zum Strategieveragen und das progressionsfreie Überleben ergaben mit P -Werten von 0,27 (TFS) bzw. 0,28 (PFS) keine statistische Signifikanz.

5. Diskussion

5.1 CMS-Klassifikation

Die Basis dieser Arbeit stellen die nach Guinney et al.⁸⁷ etablierten und auf Genexpressionsdaten beruhenden konsentierten molekularen Subtypen (consensus molecular subtypes, CMS) kolorektaler Karzinome dar. Es erfolgte eine Evaluation der CMS als prognostische Biomarker. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die CMS-Gruppen zusätzliche prädiktive Informationen im Hinblick auf die für Patienten notwendige Therapieintensität, d.h. die Nicht-Unterlegenheit einer sequenziellen Therapieeskalation gegenüber eines initialen Kombinationsregimes in gezielten Subgruppen, bereitstellen können.

Zunächst erfolgt eine Beleuchtung der verwendeten Methodik und eine Einordnung dieser in den wissenschaftlichen Kontext.

5.1.1 Methodik

Eine wichtige Einflussgröße auf das Ergebnis einer experimentellen Forschung stellt die Methodik bzw. das verwendete Verfahren dar. Hierzu zählt zunächst das Probenmaterial an sich bzw. dessen Konservierungsmethode. Bei den in der XELAVIRI-Studie verwendeten Tumorproben handelt es sich um Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe, welches zu ca. 70 % aus Tumorresektaten sowie ca. 30 % aus Tumorbiopsien stammt. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels Nanostring-Methode, welche einem multinomialen Regressionsmodell als Basis für den Abruf der CMS-Subtypen diente. Als Zuordnungsmethode wurde nearestCMS gewählt.

Zu den zwei gängigsten Methoden der Gewebsaufbereitung und -konservierung zählen das Fresh-Frozen Gewebe sowie das FFPE-Gewebe. Bei Fresh-Frozen Gewebe handelt es sich um Gewebe, welches mittels Flüssigstickstoff gefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wird. Es ist ideal für molekulargenetische Analysen, da es in der DNA/RNA-Konservierung dem FFPE-Gewebe überlegen ist. Da der technische Aufwand und die Kosten vergleichsweise hoch sind, wird im klinischen Alltag sowie zu Teilen in der Forschung überwiegend auf FFPE-Gewebe zurückgegriffen. Diese durch Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebestücke lassen sich leicht bei Raumtemperatur über Jahre lagern und erhalten dabei die zelluläre Morphologie und Architektur. Jedoch kann diese Konservierungsform zu Fragmentierung, Degeneration und Cross-Linking in den Nukleinsäuren (DNA/RNA) führen, wodurch deren Analyse verfälscht werden kann.^{99, 100} Die ursprüngliche CMS-Klassifikation arbeitete mit Datensätzen von Gewebeanalysen, welche vorwiegend anhand von Fresh-Frozen Geweben ermittelt wurden. Die aktuellen CMS-Studien beruhen vermehrt auf FFPE-Gewebe. Dahingehend zeigte eine vergleichende Analyse zwischen Fresh-Frozen Gewebe und FFPE-Gewebe eine bestehende Konkordanz der ermittelten Subtypen mit Ausnahme von CMS3 (erhöhte Rate an falsch negativen Ergebnissen).⁸⁷

Das verwendete Tumormaterial (ca. 70 % Resektat vs. ca. 30 % Biopsie) mag ebenfalls einen Einfluss auf das CMS-Verteilungsmuster haben. Hierbei ist zu bedenken, dass eine Biopsie lediglich einen Ausschnitt des gesamten Tumors repräsentiert, somit mit einem aus einer Resektion entstammenden Gewebe nicht immer äquivalent ist und zu erhöhten Ausfallraten (unklassifizierbare Proben) führen kann¹⁰¹. Eine mögliche Diskrepanz in der CMS-Klassifikation aufgrund unterschiedlicher Gewebebegewinnung wurde im Zuge der Klassifikationserstellung nicht bedacht⁸⁸. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass Gewebe aus unterschiedlichen Tumorarealen zu diskrepanten Ergebnissen in der CMS-Einteilung führte. Dies könnte potenziell durch eine Heterogenität innerhalb des Patienten sowie durch unterschiedlich exprimierte Gene des Stromas bedingt sein.^{88, 102} Inwiefern das Probenmaterial die Klassifikation der molekularen Subtypen im Detail beeinflusst ist noch zu eruieren. Für eine mögliche Anwendung des Klassifikationssystems in der klinischen Praxis, wäre dies jedoch unerlässlich.

Eine weitere Variabilität in der Methodik ergibt sich in dem verwendeten Verfahren zur Genexpressionsdatenanalyse der isolierten RNA. Das NanoString-Verfahren beruht auf der Hybridisierung komplementärer RNA-Stränge, welche mittels Fluoreszenzmarkierung detektiert werden können. Der Vorteil dieser Technik liegt im Vergleich mit anderen Verfahren (siehe unten) darin, dass kein Umschreiben in cDNA (complementary DNA) nötig ist und eine schlechtere RNA-Qualität sowie RNA-Menge ausreichend ist. Jedoch ist die Methode auf eine begrenzte Anzahl an Genen limitiert, welche bereits bekannt sein müssen, um gezielt detektiert zu werden. Ein größeres Gen-Spektrum liefern, mit einer theoretischen Identifikation von bis zu 50.000 Genen, Microarrays. Dieses Verfahren beruht ebenfalls auf Hybridisierung, wobei ein vorheriges Umschreiben der RNA mittels reverser Transkription in cDNA nötig ist. Auch müssen die zu detektierenden Gene zuvor bekannt sein. Dies ist bei dem Verfahren der RNA-Sequenzierung nicht nötig. Diese Methode ermöglicht eine gesamte Sequenzierung des Genoms sowie die Detektion von Veränderungen bzw. Unterschieden. Sie basiert ebenfalls auf einer reversen Transkription der RNA in cDNA, dessen Amplifikation und anschließende schrittweise Bestimmung der Reihenfolge der Basen mittels komplementärer Basenpaarung erfolgt. Jedoch handelt es sich hierbei um ein sehr aufwendiges Verfahren, welches insbesondere einer sehr hohen RNA-Qualität bedarf.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Für die Anforderungen der CMS-Analytik ist das NanoString-Verfahren ausreichend und ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Durchführung. Die Robustheit dieser Plattform sowie deren Anwendbarkeit für die CMS-Typisierung konnte bereits in diversen Studien belegt werden^{92, 106, 107}.

Auch die damit verbundene Verwendung einer multinomialen Regressionsanalyse für den Abruf der bekannten CMS-Klassifikation – trotz unterschiedlicher Genpanels – fand bereits in den Studien PETACC-8 und CALGB/SWOG 80405 Anwendung und war auch in dieser Analyse gut reproduzierbar^{92, 107}. Dennoch lässt sich durch die Verwendung eines anderen Genexpression-Panels eine Verzerrung des Klassifikationsresultats nicht gänzlich verhindern bzw. ausschließen. Im klinischen Kontext ist es jedoch wichtig sich einer Methodik zu bedienen, welche ein mit überschaubarem Aufwand schnelles

uns sicheres Ergebnis erbringt sowie geeignet für FFPE-Gewebe ist. Dies ist durch das NanoString-Verfahren gegeben.

Die Zuordnung zu einer CMS-Kategorie beruht auf der Ausprägung der tumorspezifischen mRNA-Genexpressionsdaten und inter-tumoraler Heterogenität. Prinzipiell existieren hier zwei unterschiedliche Ansätze. Das nearestCMS-Verfahren gewährt zur Optimierung der statistischen Power, ungeachtet der Sensitivität jeder Probe, eine definitive CMS-Zuordnung. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der predictedCMS-Methode nur eine Zuordnung zu einem Subtyp, insofern die Wahrscheinlichkeit einer Gruppenzugehörigkeit bei größer 50 % liegt. Anderenfalls wird die Tumorable als „unklassifiziert“ deklariert. Wenn dieses Niveau nicht erreicht wird, könnte es sich um intra-tumorale Heterogenität bzw. um eine Übergangsform handeln.^{87,88} Intra-tumorale Heterogenität beschreibt das Vorhandensein von verschiedenen Klonen innerhalb eines Tumors, welche jeweils eine individuelle Merkmalskonstellation in Bezug auf Morphologie, Inflammation, Genetik, Epigenetik oder das Transkriptom aufweisen¹⁰⁸. Dies wird durch die predictedCMS-Methode aufgrund des hohen Schwellenwerts möglicherweise nicht widerspiegelt. Häufiger als reine CMS-Typen ergeben sich Mischbilder, bedingt durch klonale Heterogenität und das Vorliegen mehrerer CMS-Merkmale innerhalb eines Tumors, oder auch bedingt durch das Tumor-Microenvironment^{109, 110}. Diese Confounder müssen daher bei der klinischen Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

5.1.2 Prävalenz von CMS und Assoziation mit Patienten-/Tumorcharakteristika

Die Prävalenz der CMS-Subtypen des metastasierten kolorektalen Karzinoms war in XELAVIRI prinzipiell mit den retrospektiven Analysen anderer Studien vergleichbar⁹⁰⁻⁹². Es zeigte sich jedoch eine andere prozentuale Verteilung innerhalb der einzelnen CMS-Gruppen, mit einem insbesondere niedrigen Anteil an CMS3 im Vergleich zu den Originaldaten von Guinney et al.⁸⁷. Des Weiteren fand sich eine Assoziation mit dem Patientenalter sowie dem Mutationsstatus.

Schwankungen der Prävalenz einzelner CMS-Subtypen können prinzipiell durch ein Confounder-bedingtes Selektionsbias (Stadium, Alter, Primärtumorlokalisation, Molekularbiologie) bedingt sein.^{87, 88}

Die ursprüngliche CMS-Klassifikation kolorektaler Karzinome basiert vorwiegend auf frühen Tumorstadien⁸⁷. Fontana et al. postulierte bereits aufgrund des aggressiveren Krankheitsverlaufs von CMS2- und CMS4-Tumoren und deren erhöhter Rezidivrate, insbesondere nach adjuvanter Vortherapie, einen überproportionalen Anteil dieser Subtypen im metastasierten Setting. Im Kontrast dazu stehen CMS1 und CMS3, welche maßgeblich in frühen Krankheitsstadien auftreten.⁸⁸ Die niedrige Prävalenz von CMS3-Tumoren in XELAVIRI könnte demnach durch einen höheren Anteil an Patienten mit adjuvanter Vortherapie (24,6 % vs. durchschnittlich 17,5 %) und metachroner Metastasierung (29 %) beeinflusst worden sein^{88, 90-92}.

Die Beobachtung einer altersbedingten Verschiebung der CMS-Prävalenzen – insbesondere vermehrtes Auftreten von CMS1 ab einem Alter > 70 Jahre – könnte durch weitere klinische und

molekularbiologische Einflussfaktoren erklärbar sein. Hierzu zählen das Patientengeschlecht sowie das Auftreten von *BRAF*-Mutationen und MSI (Mikrosatelliteninstabilität). Diese stehen sowohl in Zusammenhang mit einem höheren Patientenalter, einem weiblichen Geschlecht sowie mit CMS1^{14, 87}.

Die Lokalisation des Primärtumors nimmt ebenfalls Einfluss auf die Verteilung. Dahingehend konnte eine vermehrte Assoziation von CMS1 bei rechtsseitigen Primärtumoren sowie von CMS2 und CMS4 bei linksseitigen Primärtumoren festgestellt werden^{87,90-92}. Dies ist am ehesten durch weitere molekularbiologische Charakteristika zu erklären. So sind rechtsseitige Primärtumore vermehrt mit einer MSI und einer CIMP-high (CPG island methylator phenotype) assoziiert, was wiederum ein Charakteristikum von CMS1 ist. Andererseits ist eine Chromosomeninstabilität sowohl für linksseitige Primärtumore als auch für den Subtyp CMS2 kennzeichnend^{14, 87}.

Zuletzt nimmt auch der Mutationsstatus Einfluss auf die CMS-Prävalenz. Vorherige Analysen bestätigten eine vermehrte Repräsentation von *BRAF*-Mutationen bei CMS1 und zusätzlich eine Assoziation von *KRAS*-Mutationen bei CMS3^{92, 111}. Hierbei ist anzumerken, dass kein Subtyp durch eine individuelle Mutation bestimmt wird, noch eine bestimmte genetische Aberration auf einen Subtyp begrenzt ist⁸⁷. Vielmehr bestimmt das Zusammenspiel einzelner Mutationen den Subtyp. Dies steht letztendlich auch in Verknüpfung mit den Assoziationen von Patientenalter und Primärtumorlokalisation. Demnach ist eine deutlich differenziertere Betrachtung der Verteilung nötig.

5.2 Prognostische Aussagekraft von CMS

Im Zuge der Analyse der prognostischen Aussagekraft der CMS-Subtypen ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Subgruppen in Hinblick auf die klinischen Endpunkte (TFS, PFS, OS). Hierbei muss bedacht werden, dass in XELAVIRI ein vergleichsweise hoher Anteil an *RAS*-mutierten Tumoren vorlag und das Studiendesign keine Anti-EGFR-Antikörper-haltige Therapie enthielt.

Der *RAS*-Status spielt für die Rolle der CMS als prognostische Biomarker eine entscheidende Rolle. Zum einen da relevante prognostische Unterschiede in ähnlichen, früheren Untersuchungen maßgeblich in der *RAS*-Wildtyp-Population festgestellt wurden und zum anderen der Anteil an *RAS*-Mutationen mit durchschnittlich ca. 30 % deutlich geringer ausfiel als in XELAVIRI (50 %).^{90, 91, 93} Eine *RAS*-Mutation führt als onkogene Treibermutation zu einer deutlich aggressiveren Tumorbilogie und korreliert mit einem schlechteren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben der Patienten^{37, 38}. Die etablierten zytostatischen Regime sind darüber hinaus in *RAS*-mutierten Tumoren deutlich geringer wirksam als in *RAS*-Wildtyp-Tumoren⁹³. Entsprechend könnte der Mutationsstatus die Prognose signifikanter beeinflusst haben als eine molekulare Subtypisierung basierend auf mRNA-Genexpression.

Einen weiteren Einflussfaktor auf die prognostische Aussagekraft stellt die zugrundeliegende Therapie dar. Bisherige Analysen führten die Erstlinientherapie im Gegensatz zu XELAVIRI in der Regel unter Verwendung eines Anti-EGFR-Antikörpers (Cetuximab bzw. Panitumumab) durch. Ungeachtet molekularer Subtypen resultierten diese Antikörper bei *RAS*-Wildtyp-Tumoren in einer Steigerung des OS, PFS und der ORR (overall response rate).^{37, 38} Im Hinblick auf die CMS profitierten insbesondere

CMS2 und CMS4 *RAS*-Wildtyp-Tumore von einer Anti-EGFR-Therapie^{90, 92}, sodass die Absenz derartiger Antikörper in XELAVIRI zu den fehlenden prognostischen Unterschieden beigetragen haben könnte.

Des Weiteren ist an eine mögliche Interaktion von CMS mit Oxaliplatin oder Irinotecan zu denken. Die Therapieeffektivität ist maßgeblich durch das komplexe Zusammenspiel des Microenvironment des Tumors sowie der Chemotherapie und der verwendeten Biologika bedingt. Das Microenvironment eines Tumors setzt sich zusammen aus ortsansässigen und infiltrierenden Wirtszellen, abgesonderten Faktoren sowie der extrazellulären Matrix. Dieses Environment hat sowohl Einfluss auf die Tumorprogression als auch auf das therapeutische Ansprechen bzw. die Therapieresistenz.¹¹² Das differente Microenvironment spiegelt sich in der CMS-Klassifikation wider, denn die Einteilung anhand von Genexpressionsdaten basiert sowohl auf jenen der Tumorzellen selbst als auch auf jenen der Zellen des Microenvironments.⁸⁷ Im Vergleich der Studienergebnisse von FIRE3 und CALGB SWOG 80405 wurden die Einflüsse des Microenvironments auf das Therapieansprechen in Abhängigkeit der verwendeten Substanzen näher beleuchtet. Daraus resultierend lässt sich unter anderem annehmen, dass Irinotecan bei CMS2- und CMS4-Tumoren, insbesondere in Kombination mit Cetuximab, die überlegenere Option darstellt.^{90, 92, 113} Zwar fand Irinotecan bei XELAVIRI Verwendung, jedoch nicht in Kombination mit Cetuximab. Solche Interaktionskomponenten machen einen Vergleich ähnlicher Studien sehr komplex und lassen unterschiedliche Ergebnisse vermuten.

Abschließend betrachtet stellt das Gesamtüberleben einen Studienendpunkt dar, welcher auf multiplen Faktoren und subsequenten Therapielinien beruht und von diesen beeinflusst wird. Es ist anzunehmen, dass insbesondere die Reihenfolge der verabreichten Medikamente einen feststellbaren Effekt auf den prognostischen Krankheitsverlauf besitzt.^{54, 113-115}

5.3 Bedeutung von CMS als prädiktiver Biomarker

Dieses Projekt setzte sich unter anderem als Ziel, inwiefern CMS als Biomarker für die Therapieentscheidung des mKRC fungieren könnte. Hierbei sollte analysiert werden, in welchen Fällen ein sequenzieller Ansatz jenem des kombinierten Therapieverfahrens nicht-unterlegen ist und somit als Therapieoption anzuraten ist bzw. wann eine Unterlegenheit vorliegt und die Kombinationstherapie präferiert werden sollte. Eine multivariate Regressionsanalyse konnte die CMS nicht als unabhängigen Biomarker bestätigen, der Interaktionstest mit dem *RAS/BRAF*-Status war jedoch signifikant.

Diese Ergebnisse legten nahe, dass alleinig die CMS-Klassifikation in der XELAVIRI-Studie nicht als prädiktiver Biomarker für Therapieentscheidungen geeignet ist und weitere Biomarker in die Therapieentscheidung integriert werden mussten. Unterschiede im Hinblick auf die zu präferierende Therapieintensität zeigten sich letztlich in Abhängigkeit von CMS- und *RAS*-Status.

Ein sequenzielles Vorgehen könnte folglich eine gleichwertige Option für nicht-fitte bzw. ältere Patienten mit CMS1/3 *RAS*-Wildtyp oder *RAS*-mutierten Karzinomen darstellen. Patienten mit

erhöhter Komorbidität würden bei gleicher Effektivität von einer geringeren Toxizität und gesteigerten Lebensqualität, im Vergleich zu einer initialen Kombinationstherapie, profitieren.

Eine weitere Einflussgröße könnte die Primärtumorlokalisation (rechte vs. linke Kolonseite) darstellen. Im Zuge der Auswertung der erhaltenen Daten dieser Arbeit erfolgte ebenfalls eine Testung in Bezug auf die Relevanz der Primärtumorlokalisation in Zusammenhang mit dem CMS-Subtypen für die Therapieentscheidung. Jedoch ist diesem aufgrund der resultierenden geringen Fallzahl (vorwiegend $n = 10\text{--}20$) in den einzelnen Untergruppen und geringen statistischen Power nur eine sehr limitierte Aussagekraft zuzuordnen. Im Zuge dessen wurde auf eine Darstellung dieser Daten verzichtet.

Die Grundlage für den fehlenden Nutzen von CMS als Biomarker mag durch biologische Aspekte bedingt sein. Jeder Subtyp ist durch verschiedene biologische Charakteristika gekennzeichnet⁸⁷ (vgl. Tabelle 2). Diese treffen jedoch nicht auf alle Tumore eines Subtyps zu, sondern sind nur vermehrt mit diesem assoziiert⁸⁷. Dies spricht für eine Heterogenität innerhalb der einzelnen CMS-Gruppen. Diese biologische Diversität mag einen erheblichen Anteil dazu beitragen, dass bis dato noch keine reproduzierbare Assoziation zwischen den CMS-Subtypen und der Effektivität von zielgerichteten Agenzien (insbesondere monoklonale Antikörper) besteht¹¹⁶. Den am stärksten heterogenen Subtyp stellt vermutlich CMS2 dar, welcher ebenfalls keine starke Assoziation mit einem der bekannten genomischen Events (*RAS/BRAF*-Mutation bzw. MSI) aufweist⁸⁸. Dieser Subtyp zeigte beispielsweise in den Studien CALGB SWOG 8040 und FIRE3 ein besseres Ansprechen auf Cetuximab (EGFR-Antikörper) im Vergleich zu Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper), wohingegen die AGITG MAX-Studie hierbei eine höhere Effektivität von Bevacizumab feststellte⁹⁰⁻⁹². Diese widersprüchlichen prädiktiven Aussagen mögen durch die zu große Heterogenität innerhalb des Subtyps bedingt sein und verdeutlichen, dass Therapieentscheidungen alleinig anhand einer CMS-Typisierung derzeit nicht möglich sind. Zusammenfassend untermauert dies die These, dass CMS nur in der Zusammenschau mit anderen Biomarkern (*RAS/BRAF*-Mutationsstatus, Primärtumorlokalisation etc.) als solcher fungieren mag bzw. eine weitere Unterteilung innerhalb der Subtypen erforderlich ist.

5.4 Relevanz von CMS im klinischen Kontext

Die Implementierung der CMS-Klassifikation in die klinische Praxis ist derzeit aufgrund limitierender Faktoren noch nicht möglich. Insbesondere dem Kostenfaktor kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Aktuell ist die exakteste Variante der CMS-Bestimmung anhand des original *CMSclassifiers* möglich. Für diesen werden Daten aus einer Microarray-Analyse benötigt, wodurch für jeden Patienten ein Microarray-Chip nötig wäre. Dies ist unter finanziellen Gesichtspunkten jedoch nicht realisierbar. Wie bereits zuvor erwähnt, sind derzeit andere Methodiken in der Probe – u.a. das auch hier angewendete Verfahren mittels NanoString – jedoch sind diese aktuell noch mit zu großen Ungenauigkeiten assoziiert. Insbesondere muss hierbei auf die Verwendbarkeit von FFPE-Gewebe geachtet werden, welches im klinischen Alltag weit verbreitet ist, jedoch aufgrund seiner oft eingeschränkten Qualität für eine genaue Klassifikation herausfordernd ist (siehe 5.2.1 Methodik). Darüber hinaus beruhen die

vorliegenden Daten ausschließlich auf retrospektiven Analysen. Ein prospektiver Ansatz ist derzeit aufgrund der erprobten Mess- und Analysemethodik nicht umsetzbar. Dies ist dadurch bedingt, dass im Zuge der Klassifikation die erhaltenen Genexpressionsdaten im Datensatz zueinander verglichen werden, wodurch eine Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Datensatzes besteht. Auch bei gemeinsamer Auswertung mehrerer Patientendaten kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei anderer Zusammensetzung der Patientengruppe nicht eine andere CMS-Gruppe für den einzelnen Patienten bestimmt worden wäre.

Des Weiteren besteht aktuell kein Konsens bezüglich einer Priorisierung der Methoden nearestCMS oder predictedCMS. Daraus resultieren methodologische Unterschiede in der Analyse (Maximierung der statistischen Power vs. Exaktheit der Ergebnisse mit dem Risiko nicht-klassifizierbarer Proben).

Aufgrund dieser Problematik wäre zu überlegen, einen anderen Ansatz mittels eines Surrogat-Markers¹¹⁸ anzustreben. Hierbei würde ein Parameter verwendet werden, welcher Ersatzwerte liefert, auf Grundlage dieser die CMS-Subtypenbestimmung möglich ist. Anhand dieses Markers könnte ein einfaches sowie kostengünstiges Verfahren geschaffen werden, welches eine klinische Umsetzbarkeit der CMS-Klassifikation ermöglicht. Als Beispiel hierfür könnte unter der Zuhilfenahme von Artificial Intelligence HE-Schnitte (Hämatoxylin-Eosin) nach morphologischen Charakteristika gescannt werden, anhand welcher wiederum die eigentliche Klassifikation erfolgt. Somit würde das Verfahren der Genexpressionsdatenbestimmung umgangen werden. Erste vielversprechende Studien zeigen die mögliche Anwendbarkeit von Artificial Intelligence – Programmen in Bezug auf die Pathologie kolorektaler Karzinome und deren mögliche Anwendbarkeit für Klassifikationen.¹¹⁹ Beispielsweise konnte Kather et al. die Möglichkeit der Vorhersagen einer MSI anhand von HE-Gewebe mittels Deep Learning demonstrieren¹²⁰. Dies würde auch ermöglichen Patienten einzeln prospektiv zu testen und zu klassifizieren ohne der Abhängigkeit von einem Gesamtkollektiv.

Abschließend ist festzustellen, dass zum jetzigen Zeitpunkt CMS eine gewisse prognostische Aussagekraft bzw. Hinweise auf ein spezifisches Therapieansprechen liefert, jedoch keine festen und reliablen Daten bezüglich der prädiktiven Wertigkeit vorliegen. Diesbezüglich ist eine routinemäßige Anwendung der CMS-Klassifikation kolorektaler Karzinome in der klinischen Praxis derzeit unwahrscheinlich.

5.5 Stärken und Limitationen dieser Arbeit

Eine Stärke dieser Arbeit stellt der Anteil an älteren Patienten innerhalb der Studienkohorte dar. Dieses Charakteristikum ist in den meisten Studien unterrepräsentiert, verkörpert jedoch im klinischen Alltag einen nicht zu unterschätzenden Faktor in der Therapie des mKRR. Anhand dieser Arbeit ergeben sich somit weitere Ansätze bzw. Fragestellungen, welche in Hinblick auf personalisierte Therapiekonzepte näher beleuchtet werden sollten. Ebenso liefern die Ergebnisse robuste Daten zur möglichen Anwendbarkeit des NanoString-Verfahrens zur klinischen Anwend- und Umsetzbarkeit in Bezug auf die CMS-Subtypenklassifizierung.

Bei diesem Projekt handelte es sich um eine ungeplante Post-Hoc-Analyse, welche retrospektiv und explorativ angelegt ist. Aufgrund von vorangegangenen Analysen konnten ca. 20 % der Tumorproben nicht verwendet werden. Des Weiteren ist die Anzahl an Proben in einzelnen Subgruppen gering, wodurch dahingehend keine oder nur eine eingeschränkte Aussagekraft abgeleitet werden kann. Allumgreifend ist zu bedenken, dass das in der XELAVIRI-Studie verwendete sequenzielle Therapieverfahren nicht den aktuellen empfohlenen Standardtherapieregimen entspricht und die erhaltenen Ergebnisse deshalb nur mit Bedacht interpretiert werden sollten.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die randomisierte, kontrollierte XELAVIRI-Studie verglich zwei Therapiekonzepte der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Der primäre Endpunkt war als die Nicht-Unterlegenheit des sequenziellen Konzeptes aus Fluoropyrimidin plus Bevacizumab und der Eskalation mit Irinotecan im Falle des Erkrankungsprogresses gegenüber einem intensiveren Vorgehen mit initial Fluoropyrimidin plus Irinotecan plus Bevacizumab definiert. Dieser konnte nicht erzielt werden. Jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede der Therapieeffektivität unter Berücksichtigung des *RAS*-Mutationsstatus. Diese Arbeit setzt sich als Ziel, die konsentierten molekularen Subtypen (consensus molecular subtypes, CMS) als zusätzliche Biomarker für die Therapieentscheidung (sequenziell vs. kombiniert) zu etablieren.

Material und Methoden: Nach mRNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe erfolgte die Genexpressionsbestimmung anhand des NanoString-Verfahrens. CMS wurde mittels multinomialer Regression bestimmt und mit den aktualisierten Daten für das TFS, progressionsfreie Überleben (progression-free survival, PFS) und Gesamtüberleben (overall survival, OS) korreliert.

Ergebnisse: CMS konnte in 337 von 421 (80,0 %) Tumorproben bestimmt werden (CMS1: 18,4 %; CMS2: 51,6 %; CMS3: 2,7 %; CMS4: 27,3 %). Als potenzieller prädiktiver Biomarker konnte CMS2 in Kombination mit *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumoren in Hinblick auf die zu präferierende initiale Kombinationstherapie in Bezug auf das OS (HR 0,56 %, 95 % CI 0,33–0,96, $p = 0,036$) und PFS (HR 0,28, 95 % CI 0,29–0,79, $p = 0,004$) identifiziert werden. Ein eben solcher Trend zeigte sich für TFS (HR 0,63, 90 % CI 0,41–0,95, $p = 0,066$). Für CMS1 und *RAS*-mutierte Tumore resultierte ein längeres OS nach initialer Kombinationstherapie (HR 0,43, 95 % CI 0,20–0,95, $p = 0,038$). Der Interaktionstest (zweiseitig) von CMS und des *RAS/BRAF*-Status zeigte eine signifikante Überlegenheit des kombinierten Verfahrens in Bezug auf das OS ($p = 0,012$).

Schlussfolgerung: Bei Patienten mit einem *RAS/BRAF*-Wildtyp mKRK mag CMS2 als zusätzlicher Biomarker für die Therapieentscheidung (initiale Kombinationstherapie) fungieren.

7. Abstract (English)

Background: The XELAVIRI trial compared sequential (fluoropyrimidine and bevacizumab; irinotecan at progression) versus initial combination therapy (fluoropyrimidine, bevacizumab, irinotecan) of treatment-naïve metastatic colorectal cancer (mCRC). In the confirmatory analysis, the primary end-point (non-inferiority of sequential therapy regarding time to failure of strategy, TSF) was not met. Nevertheless, significant differences regarding treatment efficacy were observed according to *RAS* status. Here, I evaluate the consensus molecular subtypes (CMS) as additional biomarkers for sequential versus combination therapy.

Material and methods: Gene expression was measured using NanoString after mRNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tumour specimens. CMS were predicted using multinomial regression and correlated with updated data for TFS, overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).

Results: CMS were predicted in 337 of 421 (80.0%) patients (CMS1: 18.4%; CMS2: 51.6%; CMS3: 2.7%; CMS4: 27.3%). CMS2 together with *RAS/BRAF* wild-type status was identified as potential predictive marker of benefit from initial combination therapy for OS (HR 0.56%, 95% CI 0.33–0.96, $p = 0.036$) and progression-free survival (HR 0.28, 95% CI 0.29–0.79, $p = 0.004$) and also trending in TFS (HR 0.63, 90% CI 0.41–0.95, $p = 0.066$). In patients with *RAS*-mutated mCRC, CMS1 was associated with longer OS after initial combination therapy (HR 0.43, 95% CI 0.20–0.95, $p = 0.038$). Interaction testing (two-sided) of CMS and *RAS/BRAF* status in favour of the combination treatment strategy was significant for OS ($p = 0.012$).

Conclusion: In patients with *RAS/BRAF* wild-type mCRC, CMS2 may serve as an additional biomarker of benefit from the initial combination therapy, including irinotecan.

Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2015/2016. Berlin 2019. p. 38-41.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. Atlanta 2020. p. 13-21.
4. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England journal of medicine*. 2012;366(8):687-96.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1., AWMF; 2019.
6. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24 Suppl 6:vi64-72.
7. Arnold D, Stein A. Kolorektales Karzinom: Innovationen bei den multimodalen Therapien. *Dtsch Arztebl International*. 2014;111(6):12-.
8. Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert H, Schmiegel W, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/ Lynch syndrom. *Dtsch Arztebl International*. 2013;110(3):32-8.
9. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2023;34(1):10-32.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*. 1988;319(9):525-32.
11. Strum WB. Colorectal Adenomas. *The New England journal of medicine*. 2016;374(11):1065-75.
12. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10207):1467-80.
13. Modest DP, Hiddemann W, Heinemann V. Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. *Der Internist*. 2014;55(1):37-42.
14. Yu IS, Cheung WY. Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*. 2018;2018:9450754.
15. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2019;109:70-83.
16. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(10):1407-18.
17. Petrelli N, Douglass HO, Jr., Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. *Gastrointestinal Tumor Study Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(10):1419-26.

18. Benson AB, 3rd. Regional and systemic therapies for advanced colorectal carcinoma: randomized clinical trial results. *Oncology (Williston Park)*. 1998;12(10 Suppl 7):28-34.
19. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):905-14.
20. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(1):23-30.
21. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1998;34(8):1274-81.
22. Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Metal ions in life sciences*. 2018;18.
23. Mathijssen RH, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Current cancer drug targets*. 2002;2(2):103-23.
24. Graefe KH, Lutz WK, Bönisch H, Hrgs. *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 2., vollständig überarbeitete Auflage* ed. Stuttgart: Thieme; 2016. p. 659-80.
25. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(22):4866-75.
26. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(2):229-37.
27. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1670-6.
28. Cremolini C, Rossini D, Lonardi S, Antoniotti C, Pietrantonio F, Marmorino F, et al. Modified FOLFOXIRI plus panitumumab (mFOLFOXIRI/PAN) versus mFOLFOX6/PAN as initial treatment of patients with unresectable RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC): Results of the phase III randomized TRIPLETE study by GONO. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA3505-LBA.
29. Punt CJA, Bond MJG, Bolhuis K, Loosveld O, Helgason HH, Groot JWd, et al. FOLFOXIRI + bevacizumab versus FOLFOX/FOLFIRI + bevacizumab in patients with initially unresectable colorectal liver metastases (CRLM) and right-sided and/or RAS/BRAFV600E-mutated primary tumor: Phase III CAIRO5 study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA3506-LBA.
30. Koopman M, Antonini NF, Douma J, Wals J, Honkoop AH, Erdkamp FL, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9582):135-42.

31. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* (London, England). 2007;370(9582):143-52.
32. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, Etienne PL, Texereau P, Auby D, et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2011;12(11):1032-44.
33. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):549-80.
34. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 1999;82(2-3):241-50.
35. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.
36. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2335-42.
37. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(7):692-700.
38. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;369(11):1023-34.
39. Boeckx N, Koukakis R, Op de Beeck K, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, et al. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(8):1862-8.
40. O.V. Gelbe Liste Online gelbe-liste.de: Vidal MMI Germany GmbH; [10.07.2023]. Available from: <https://www.gelbe-liste.de/>.
41. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine*. 2015;372(26):2509-20.
42. Overman MJ, Lonardi S, Leone F, McDermott RS, Morse MA, Wong KYM, et al. Nivolumab in patients with DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability high metastatic colorectal cancer: Update from CheckMate 142. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(4_suppl):519-.
43. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, et al. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(7):1096-103.
44. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(5):665-77.
45. Onkologie DGfHuM. Pembrolizumab
(neues Anwendungsgebiet, metastasiertes kolorektales Karzinom). dgho.de.22.07.2021.

46. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, Hurwitz H, Spigel DR, Sweeney C, et al. Targeted Therapy for Advanced Solid Tumors on the Basis of Molecular Profiles: Results From MyPathway, an Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(6):536-42.
47. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):738-46.
48. Arnold D, Andre T, Bennouna J, Sastre J, Osterlund PJ, Greil R, et al. Bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) previously treated with BEV plus CT: Results of a randomized phase III intergroup study (TML study). *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(18_suppl):CRA3503-CRA.
49. Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2018;24(4):165-70.
50. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(14):2311-9.
51. Ciardiello F, Normanno N, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S, Cardone C, et al. Cetuximab continuation after first progression in metastatic colorectal cancer (CAPRI-GOIM): a randomized phase II trial of FOLFOX plus cetuximab versus FOLFOX. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016;27(6):1055-61.
52. Sartore-Bianchi A, Pietrantonio F, Lonardi S, Mussolin B, Rua F, Crisafulli G, et al. Circulating tumor DNA to guide rechallenge with panitumumab in metastatic colorectal cancer: the phase 2 CHRONOS trial. *Nature medicine*. 2022;28(8):1612-8.
53. Derangère V, Fumet JD, Boidot R, Bengrine L, Limagne E, Chevriaux A, et al. Does bevacizumab impact anti-EGFR therapy efficacy in metastatic colorectal cancer? *Oncotarget*. 2016;7(8):9309-21.
54. Modest DP, Stintzing S, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, et al. Impact of Subsequent Therapies on Outcome of the FIRE-3/AIO KRK0306 Trial: First-Line Therapy With FOLFIRI Plus Cetuximab or Bevacizumab in Patients With KRAS Wild-Type Tumors in Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(32):3718-26.
55. Prager GW, Taieb J, Fakih M, Ciardiello F, Van Cutsem E, Elez E, et al. Trifluridine–Tipiracil and Bevacizumab in Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2023;388(18):1657-67.
56. Fukuoka S, Hara H, Takahashi N, Kojima T, Kawazoe A, Asayama M, et al. Regorafenib Plus Nivolumab in Patients With Advanced Gastric or Colorectal Cancer: An Open-Label, Dose-Escalation, and Dose-Expansion Phase Ib Trial (REGONIVO, EPOC1603). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(18):2053-61.
57. Dasari A, Lonardi S, Garcia-Carbonero R, Elez E, Yoshino T, Sobrero A, et al. Fruquintinib versus placebo in patients with refractory metastatic colorectal cancer (FRESCO-2): an international, multicentre, randomised, double-blind, phase 3 study. *The Lancet*. 2023;402(10395):41-53.
58. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575(7781):217-23.

59. Fakih MG, Kopetz S, Kuboki Y, Kim TW, Munster PN, Krauss JC, et al. Sotorasib for previously treated colorectal cancers with KRAS^{G12C} mutation (CodeBreak100): a prespecified analysis of a single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2022;23(1):115-24.
60. Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou S-HI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *New England Journal of Medicine*. 2022;388(1):44-54.
61. Taieb J. How best to treat older patients with metastatic colorectal cancer? *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2019;4(5):331-3.
62. Aparicio T, Schischmanoff O, Poupardin C, Mary F, Soufir N, Barrat C, et al. High prevalence of deficient mismatch repair phenotype and the V600E BRAF mutation in elderly patients with colorectal cancer. *J Geriatr Oncol*. 2014;5(4):384-8.
63. Arkenau HT, Graeven U, Kubicka S, Grothey A, Englisch-Fritz C, Kretzschmar A, et al. Oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil/leucovorin or capecitabine in elderly patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2008;7(1):60-4.
64. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(11):1077-85.
65. Sastre J, Aranda E, Massutí B, Tabernero J, Chaves M, Abad A, et al. Elderly patients with advanced colorectal cancer derive similar benefit without excessive toxicity after first-line chemotherapy with oxaliplatin-based combinations: comparative outcomes from the 03-TTD-01 phase III study. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2009;70(2):134-44.
66. Sastre J, Grávalos C, Rivera F, Massuti B, Valladares-Ayerbes M, Marcuello E, et al. First-line cetuximab plus capecitabine in elderly patients with advanced colorectal cancer: clinical outcome and subgroup analysis according to KRAS status from a Spanish TTD Group Study. *The oncologist*. 2012;17(3):339-45.
67. Cassidy J, Saltz LB, Giantonio BJ, Kabbinavar FF, Hurwitz HI, Rohr UP. Effect of bevacizumab in older patients with metastatic colorectal cancer: pooled analysis of four randomized studies. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(5):737-43.
68. Papamichael D, Audisio RA, Glimelius B, de Gramont A, Glynne-Jones R, Haller D, et al. Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015;26(3):463-76.
69. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools): Food and Drug Administration (US), Silver Spring (MD); National Institutes of Health (US), Bethesda (MD); January 28, 2016.
70. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):459-65.
71. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2015;136(1):83-90.
72. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, Lenz HJ, Heinemann V, Klinkhardt U, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2015;51(10):1243-52.

73. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomarkers in cancer*. 2015;7(Suppl 1):9-12.
74. Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiology and oncology*. 2019;53(3):265-74.
75. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011;22(7):1535-46.
76. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(15):2011-9.
77. Stintzing S, Heinrich K, Tougeron D, Modest DP, Schwaner I, Euker J, et al. Randomized study to investigate FOLFOXIRI plus either bevacizumab or cetuximab as first-line treatment of BRAF V600E-mutant mCRC: The phase-II FIRE-4.5 study (AIO KRK-0116). *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):3502-.
78. Loupakakis F, Cremolini C, Salvatore L, Masi G, Sensi E, Schirripa M, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2014;50(1):57-63.
79. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;381(17):1632-43.
80. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2018;89(9-s):97-101.
81. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32.
82. Shida D, Tanabe T, Boku N, Takashima A, Yoshida T, Tsukamoto S, et al. Prognostic Value of Primary Tumor Sidedness for Unresectable Stage IV Colorectal Cancer: A Retrospective Study. *Annals of Surgical Oncology*. 2019;26(5):1358-65.
83. Siegmund-Schultze N. Kolorektale Karzinome: Die Lage des Primarius zählt. *Dtsch Arztebl International*. 2017;114(5):-20-.
84. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA oncology*. 2017;3(2):194-201.
85. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, Fruth B, Greene C, O'Neil BH, et al. Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):3504-.
86. Yoshino T, Watanabe J, Shitara K, Yasui H, Ohori H, Shiozawa M, et al. Panitumumab (PAN) plus mFOLFOX6 versus bevacizumab (BEV) plus mFOLFOX6 as first-line treatment in patients with RAS wild-type (WT) metastatic colorectal cancer (mCRC): Results from the phase 3 PARADIGM trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA1-LBA.

87. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*. 2015;21(11):1350-6.
88. Fontana E, Eason K, Cervantes A, Salazar R, Sadanandam A. Context matters-consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(4):520-7.
89. Włodarczyk M, Włodarczyk J, Siwiński P, Sobolewska-Włodarczyk A, Fichna J. Genetic Molecular Subtypes in Optimizing Personalized Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Current drug targets*. 2018;19(15):1731-7.
90. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(11):1796-803.
91. Mooi JK, Wirapati P, Asher R, Lee CK, Savas P, Price TJ, et al. The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2018;29(11):2240-6.
92. Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(22):1876-85.
93. Stahler A, Hoppe B, Na IK, Keilholz L, Müller L, Karthaus M, et al. Consensus Molecular Subtypes as Biomarkers of Fluorouracil and Folinic Acid Maintenance Therapy With or Without Panitumumab in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer (PanaMa, AIO KRK 0212). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2023;41(16):2975-87.
94. Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Vehling-Kaiser U, Uhlig J, Schenk M, et al. Sequential Versus Combination Therapy of Metastatic Colorectal Cancer Using Fluoropyrimidines, Irinotecan, and Bevacizumab: A Randomized, Controlled Study-XELAVIRI (AIO KRK0110). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(1):22-32.
95. Stahler A, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Kaiser F, Decker T, Held S, et al. First-line fluoropyrimidine plus bevacizumab followed by irinotecan-escalation versus initial fluoropyrimidine, irinotecan and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer - Final survival and per-protocol analysis of the randomised XELAVIRI trial (AIO KRK 0110). *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2022;173:194-203.
96. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):317-8.
97. NanoString Technologies, Inc.. nCounter® XT Assay User Manual. Seattle2016. p. 6-7.
98. Stahler A, Heinemann V, Schuster V, Alig AHS, Fischer LE, Weiss L, et al. Consensus molecular subtypes and RAS status as biomarker of treatment intensity with fluoropyrimidine, bevacizumab, and irinotecan in metastatic colorectal cancer (XELAVIRI, AIO KRK 0110). *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):3552-.
99. Gao XH, Li J, Gong HF, Yu GY, Liu P, Hao LQ, et al. Comparison of Fresh Frozen Tissue With Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Mutation Analysis Using a Multi-Gene Panel in Patients With Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:310.
100. BioChain-Institute-Inc. FFPE vs Frozen Tissue Samples. biochain.com [12.08.2022]. Available from: <https://www.biochain.com/blog/ffpe-vs-frozen-tissue-samples/>.

101. Alderdice M, Richman S, Gollins S, Stewart J, Hurt C, Adams R, et al. Prospective patient stratification into robust cancer-cell intrinsic subtypes from colorectal cancer biopsies. *The Journal of Pathology*. 2018;245.
102. Dunne PD, McArt DG, Bradley CA, O'Reilly PG, Barrett HL, Cummins R, et al. Challenging the Cancer Molecular Stratification Dogma: Intratumoral Heterogeneity Undermines Consensus Molecular Subtypes and Potential Diagnostic Value in Colorectal Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(16):4095-104.
103. Bourré L. Genome-Wide RNAseq and Array-Based NanoString Transcriptomic Technologies: Which To Use and When? - Crown Bioscience.2020. Available from: <https://blog.crownbio.com/genome-wide-rnaseq-and-array-based-nanostring-transcriptomic-technologies>.
104. Eilertsen IA, Moosavi SH, Strømme JM, Nesbakken A, Johannessen B, Lothe RA, et al. Technical differences between sequencing and microarray platforms impact transcriptomic subtyping of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2020;469:246-55.
105. Chatterjee A, Leichter AL, Fan V, Tsai P, Purcell RV, Sullivan MJ, et al. A cross comparison of technologies for the detection of microRNAs in clinical FFPE samples of hepatoblastoma patients. *Sci Rep*. 2015;5:10438.
106. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. *Cancer Res*. 2015;75(13):2587-93.
107. Marisa L, Ayadi M, Balogoun R, Pilati C, Malicot KL, Lepage C, et al. Clinical utility of colon cancer molecular subtypes: Validation of two main colorectal molecular classifications on the PETACC-8 phase III trial cohort. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3509-.
108. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*. 2018;85(1-2):72-84.
109. Laurent-Puig P, Marisa L, Ayadi M, Blum Y, Balogoun R, Pilati C, et al. Colon cancer molecular subtype intratumoral heterogeneity and its prognostic impact: An extensive molecular analysis of the PETACC-8. *Annals of Oncology*. 2018;29:viii18.
110. Chowdhury S, Hofree M, Lin K, Maru D, Kopetz S, Shen JP. Implications of Intratumor Heterogeneity on Consensus Molecular Subtype (CMS) in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19).
111. Smeby J, Sveen A, Merok MA, Danielsen SA, Eilertsen IA, Guren MG, et al. CMS-dependent prognostic impact of KRAS and BRAFV600E mutations in primary colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2018;29(5):1227-34.
112. O.V. The tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*: Springer Nature Limited; 2018 [01.01.2022]. Available from: <https://www.nature.com/collections/khylqkxqbr>.
113. Aderka D, Stintzing S, Heinemann V. Explaining the unexplainable: discrepancies in results from the CALGB/SWOG 80405 and FIRE-3 studies. *The Lancet Oncology*. 2019;20(5):e274-e83.
114. Hecht JR, Cohn A, Dakhil S, Saleh M, Piperdi B, Cline-Burkhardt M, et al. SPIRITT: A Randomized, Multicenter, Phase II Study of Panitumumab with FOLFIRI and Bevacizumab with FOLFIRI as Second-Line Treatment in Patients with Unresectable Wild Type KRAS Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2015;14(2):72-80.
115. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI {+/-} panitumumab for second-line treatment of metastatic

colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(1):107-16.

116. Borelli B, Fontana E, Giordano M, Antoniotti C, Lonardi S, Bergamo F, et al. Prognostic and predictive impact of consensus molecular subtypes and CRCAssigner classifications in metastatic colorectal cancer: a translational analysis of the TRIBE2 study. *ESMO Open*. 2021;6(2):100073.

117. Fontana E, Nyamundanda G, Cunningham D, Ragulan C, Sclafani F, Eason K, et al. Molecular subtype assay to reveal anti-EGFR response sub-clones in colorectal cancer (CRC). *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(4_suppl):658-.

118. IQWiG. Surrogate marker. *informedhealth.org.D*. [10.10.2022]. Available from: <https://www.informedhealth.org/glossary/surrogate-marker.html>.

119. Lancellotti C, Cancian P, Savevski V, Kotha SRR, Fraggetta F, Graziano P, et al. Artificial Intelligence & Tissue Biomarkers: Advantages, Risks and Perspectives for Pathology. *Cells*. 2021;10(4).

120. Kather JN, Pearson AT, Halama N, Jäger D, Krause J, Loosen SH, et al. Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. *Nature medicine*. 2019;25(7):1054-6.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristika rechts- und linksseitiger Tumorlokalisation.	16
Abbildung 2: Therapiearme XELAVIRI-Studie.	21
Abbildung 3: Arbeitsschritte der Nukleinsäureextraktion aus FFPE-Gewebe.	24
Abbildung 4: Darstellung der NanoString-Gensonden.	25
Abbildung 5: Reinigung und Immobilisierung der hybridisierten Proben.	27
Abbildung 6: CONSORT-Diagramm XELAVIRI-Studie.	30
Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der konsentierten molekularen Subtypen (CMS) gemäß nearestCMS und predictedCMS.	33
Abbildung 8: Prozentuale Verteilung von CMS nach primärer Tumorlokalisation (rechts vs. links).	34
Abbildung 9: Prozentuale Verteilung von CMS nach Patientenalter (≥ 70 Jahre vs. < 70 Jahre).	34
Abbildung 10: Prozentuale Verteilung von CMS nach molekularer Subgruppe (<i>RAS</i> / <i>BRAF</i> - Wildtyp vs. <i>RAS</i> -Mutation vs. <i>BRAF</i> -Mutation).	35
Abbildung 11: Vergleich der Zeit bis zum Strategiever sagen der CMS-Gruppen.	38
Abbildung 12: Vergleich des progressionsfreien Überlebens der CMS-Gruppen.	39
Abbildung 13: Vergleich des Gesamtüberlebens der CMS-Gruppen.	39
Abbildung 14: Forest Plot der CMS-Gruppen und deren <i>RAS</i> / <i>BRAF</i> -Mutationsstatus in Bezug auf das Therapieverfahren für das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben und die Zeit bis zum Strategiever sagen.	45
Abbildung 15: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für die Zeit bis zum Strategiever sagen.	47
Abbildung 16: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für die Zeit bis zum Strategiever sagen.	48
Abbildung 17: Forest Plot der Baseline Charakteristika in Bezug auf das Therapieverfahren für das Gesamtüberleben.	49
Abbildung 18: Missklassifikationsfehler der multinomialen Regression zur Vorhersage der CMS-Subtypen.	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamente der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms.	13
Tabelle 2: Molekulare Subtypen des kolorektalen Karzinoms.	17
Tabelle 3: Therapieprotokoll XELAVIRI-Studie.	22
Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien der XELAVIRI-Studie.....	23
Tabelle 5: Baseline Charakteristika XELAVIRI-Gesamtpopulation und CMS-Subpopulation.	32
Tabelle 6: Patientencharakteristika der CMS-Gruppen und Chi-Quadrat-Test.....	37
Tabelle 7: Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen für die gesamte Patientenkohorte sowie in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe (<i>RAS/BRAF</i> -Mutationsstatus).	41
Tabelle 8: Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe.	43
Tabelle 9: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für die Zeit bis zum Strategieversagen.	50
Tabelle 10: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für das progressionsfreie Überleben.	50
Tabelle 11: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben. .	51
Tabelle 12: Gene der multinomialen Regressionsanalyse zur CMS-Klassifizierung.	78
Tabelle 13: Patientencharakteristika der CMS-Gruppen für predictedCMS.	81
Tabelle 14: Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen für die gesamte Patientenkohorte sowie in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe (<i>RAS/BRAF</i> -Mutationsstatus) und der Lokalisation.	83
Tabelle 15: Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe und des <i>RAS/BRAF</i> -Mutationsstatus.	86

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Bev	Bevacizumab
BRAF	v-Raf-Maus-Sarkom-Virus-Onkogen-Homolog B
CAPIRI	Capecitabine + Irinotecan
CAPOX.....	Capecitabine + Oxaliplatin
cDNA.....	complementary DNA
CIMP	CPG island methylator phenotype
CMS.....	consensus molecular subtypes (konsentierete molekulare Subtypen)
CTLA-4.....	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
ECOG.....	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FOBT	fäkal okkultes Bluttest
FOLFIRI.....	Folinsäure + 5-Fluoruracil + Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure + 5-Fluoruracil + Oxaliplatin
FOLFOXIRI	Fluoropyrimidin + Irinotecan + Oxaliplatin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HNPCC.....	hereditäre kolorektale Karzinome ohne Polyposis
Iri	Irinotecan
komb.....	kombiniert
KRK.....	kolorektales Karzinom
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
MMR.....	Mismatch-Reparatursystem
MSI.....	Mikrosatelliteninstabilität
NA	unklassifiziert
ORR.....	overall response rate
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
PD	programmed cell death protein
PFS	progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
RAS.....	Rat-Sarcoma-Viral-Onkogen

RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
seq	<i>sequenziell</i>
TFS	<i>time to failure of strategy (Zeit bis zum Strategieversagen)</i>
TMB	<i>tumor mutational burden</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Anhang:

Ausführliche Protokolle

RNA-Isolation:

- Dissektion des Tumorareals und Überführung in 160 µl Deparaffinierungslösung
- Inkubation bei 56 °C für 3 min
- Zugabe von 150 µl PKD-Puffer
- Zentrifugation für 1 min bei 10 000 rpm
- Zugabe von 10 µl Proteinase K
- Inkubation für 15 min bei 56 °C
- Inkubation für 15 min bei 80 °C
- Transfer der unteren, farblosen Phase in ein neues Reaktionsgefäß
- Inkubation auf Eis für 3 min und Zentrifugation für 15 min bei 13 500 rpm
- Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Bestücken des Isolierroboters „QIAcube“ (nachfolgende Schritt erfolgten durch den QIAcube)
- Zugabe einer Lösung aus 16 µl DNase-Booster-Puffer und 10 µl DNase-Mix
- Hinzufügen von 320 µl RBC-Puffer und 720 µl Ethanol
- Überführung der Probe auf RNeasy MinElute spin column
- Zentrifugation für 15 s bei 10 000 rpm
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugation für 15 s bei 10 000 rpm
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugation für 15 s bei 10 000 rpm
- Trocknung der Säulen mittels Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit (10 640 rpm)
- Platzierung der RNeasy MinElute spin column in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß
- Elution (Ablösung) der RNA durch das Hinzufügen von 22 µl RNase-freiem Wasser
- Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit 10 640 rpm

NanoString Hybridisierungsprotokoll:

- Zugabe von 70 µl Hybridisierungspuffer zur Reporter Code-Reagenz
- Transfer von 8 µl des Mix in das Reaktionsgefäß

- Hinzufügen von bis zu 5 µl der RNA-Probe (n = 150 ng)
- Evtl. Zugabe von RNase-freiem Wasser (Auffüllen auf insgesamt 13 µl)
- Zugabe von 2 µl der Capture Probe-Reagenz
- Inkubation für 18–20 h bei 65 °C

Material

Geräte

QiaCube	Qiagen
Thermomixer	Eppendorf
Zentrifuge S417R	Eppendorf
Zentrifuge 3-1810	neoLab
Vortex-Genie 2	Scientific Indust.
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific
PrepStation	NanoString
Analyzer	NanoString

Kits/Panels

RNeasy FFPE Kit	Qiagen
MasterKit	NanoString
Cancer Progression	NanoString

Reagenzien

Ethanol absolut	AppliChem
Deparaffinierungslösung	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen

Verbrauchsmaterial

Tubes 2 ml	Sarstedt
Sterile Skalpellklingen	-
Pipettenspitzen	Biozym
Rotor Adapters	Qiagen

Filter-Tips

Qiagen

Software

nSolver software, v4.0

NanoString

CMSclassifier

Sage Bionetworks

SPSS PASW Version 18

IBM

SAS 9.2

SAS Institute

R v3.6.1

R Core Team

Tabellen/Abbildungen

Gene der CMS-Subtypen-Bestimmung

ACVR1	ACVR1C	ACVRL1*	ADAM9*	ADGRG1	AGK	AGR2*	AHNAK	AKAP12	AKT3
ALOX5	ANG*	ANPEP	APOD	ARHGAP32	ARHGDIB	ASPN	B3GNT3	BAG2	BCAS1
BMP5	CADM1	CALD1	CAMK2D*	CAVIN1	CCDC80	CCL5	CCL7*	CCL8	CDH1
CDH11	CDK14*	CEACAM5	CEP170*	CEP295*	CHP2*	CLDN1*	CLDN3	CNN1	COL5A2
COL6A2	CTSH*	CXCL11	CXCL13	CXCR4	CYP1B1*	DCN	DPT	DPYSL3	DSC2
ECM2*	ELK3	ENO2	EPHB3	EREG*	ETV4	FAP	FBLN5	FERMT2	FGFR2
FGFR3	FGFR4*	FN1	FXVD6	HEG1	HIF1A*	HUNK	ICAM1	ID1*	IL18
IL1RN	IL6	ITGA6	ITGB1	JCAD*	KCNJ8	LEFTY1*	LLGL2	LOX*	LRG1
LTBP4*	MAF	MAP2K1	MGC	MGP	MMP1	MMP14	MPDZ	MUC1*	MYC
MYLK	MYO5C*	NFATC2*	NOS2	NR4A3	NRP1	P3H1*	PCOLCE*	PDGFC	PLA2G2A
PLA2G3*	PLAUR	PLXND1	PMP22	PPFIBP2	PRELP	PTPRC	QKI	RAMP1*	RBL1
RBM47	ROCK1	ROCK2*	SACS	SERINC5	SERPINA1	SFRP2*	SH3YL1	SLC37A1	SLIT2*
SMAD2	SMAD4	SMAD9	SMOC1	SMURF2	SOD1	SOX17	SPARC	SPDEF	SPP1*
STAT1	SYNE1	TFDP1	TGFBR2	THBS2*	THBS4	THY1	TIE1	TIMP2	TMEM30B
TNFSF13	TNS1	TSPAN1	TWIST1	TYMP	VAV3*	VCAN	VEGFB	VSIG4	WARS1
WIPF1	ZCCHC24	ZEB1							

Tabelle 12: Gene der multinomialen Regressionsanalyse zur CMS-Klassifizierung. * Multipler Einsatz für die Bestimmung verschiedener CMS-Subtypen, CMS = consensus molecular subtypes

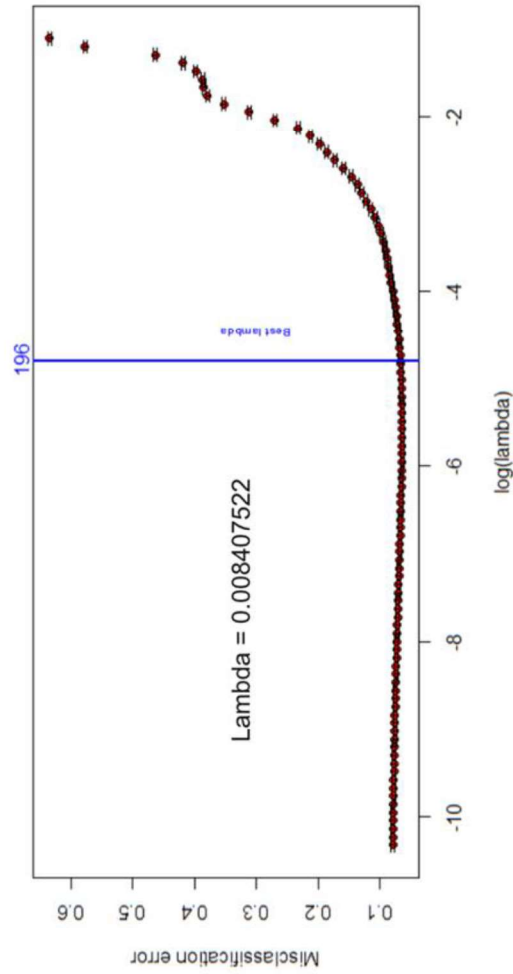


Abbildung 18: Missklassifikationsfehler der multinomialen Regression zur Vorhersage der CMS-Subtypen. Trainiert anhand von Genexpressionsdaten von Guinney et al. nach Anpassung in Bezug auf gemeinsame Gene mit dem NanoString PanCancer-Progression-Panel (angewendet in XELAVIRI). CMS = consensus molecular subtypes

Patientencharakteristika* (predictedCMS)

		CMS1 n = 51	CMS2 n = 157	CMS3 n = 7	CMS4 n = 86	Unklassifiziert n = 36
		Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Geschlecht	Männlich	36 (73,5)	100 (65,4)	5 (71,4)	58 (68,2)	24 (66,7)
	Weiblich	13 (26,5)	53 (34,6)	2 (28,6)	27 (31,8)	12 (33,3)
Alter in Jahren	Median (Spannweite)	73 (46 – 80)	71 (42 – 84)	71 (56–78)	68 (43–83)	71 (51–84)
	< 70	17 (34,7)	59 (38,6)	3 (42,9)	47 (55,3)	15 (41,7)
	>= 70	32 (65,3)	94 (61,4)	4 (57,1)	38 (44,7)	21 (58,3)
Behandlungsbarm	Arm A	29 (59,2)	78 (51,0)	3 (42,9)	47 (55,3)	9 (25,0)
	Arm B	20 (40,8)	75 (49,0)	4 (57,1)	38 (44,7)	27 (75,0)
ECOG performance index	0	31 (63,3)	95 (64,2)	4 (57,1)	45 (53,6)	25 (69,4)
	1	18 (36,7)	53 (35,8)	3 (42,9)	39 (46,4)	11 (30,6)
	Unbekannt	2 (0,0)	9 (0,0)	0 (0,0)	2 (0,0)	0 (0,0)
Molekulare Subgruppe	RAS/BRAF-Wildtyp	19 (38,8)	65 (42,5)	4 (57,1)	35 (41,2)	19 (52,8)
	RAS-Mutation	27 (55,1)	82 (53,6)	3 (42,9)	46 (54,1)	12 (33,3)
	BRAF-Mutation	3 (6,1)	6 (3,9)	0 (0,0)	4 (4,7)	5 (13,9)
Lokalisation des Primärtumors	Links	28 (57,1)	100 (65,4)	6 (85,7)	56 (65,9)	22 (61,1)
	Rechts	20 (40,8)	45 (29,4)	1 (14,3)	26 (30,6)	13 (36,1)

	Unbekannt	1 (2,0)	8 (5,2)	0 (0,0)	3 (3,5)	1 (2,8)
Metastasierung	Synchron	38 (77,6)	110 (71,9)	5 (71,4)	53 (62,4)	25 (69,4)
	Metachron	11 (22,4)	39 (25,5)	2 (28,6)	30 (35,3)	11 (30,6)
	Unbekannt	0 (0,0)	4 (2,6)	0 (0,0)	2 (2,4)	0 (0,0)
Anzahl Organe mit Metastasen	1	23 (45,1)	64 (40,8)	2 (28,6)	31 (36,0)	14 (38,9)
	>=2	26 (51,0)	88 (56,1)	5 (71,4)	51 (59,3)	22 (61,1)
	Unbekannt	2 (3,9)	5 (3,2)	0 (0,0)	4 (4,7)	0 (0,0)
	Lebermetastasen	37 (72,5)	116 (73,9)	6 (85,7)	55 (64,0)	29 (80,6)
Anzahl Metastasen je Organ	Leber limitiert	15 (29,4)	41 (26,1)	2 (28,6)	18 (20,9)	12 (33,3)
	Lungenmetastasen	26 (51,0)	72 (45,9)	3 (42,9)	36 (41,9)	14 (38,9)
	Lymphknotenmetastasen	13 (25,5)	51 (32,5)	2 (28,6)	32 (37,2)	16 (44,4)
	Metastasen im Peritoneum	4 (7,8)	6 (3,8)	0 (0,0)	9 (10,5)	1 (2,8)
	Metastasen mit anderer Lokalisation	7 (13,7)	37 (23,6)	2 (28,6)	22 (25,6)	8 (22,2)
Vorangegangene Therapie	Resektion	40 (78,4)	118 (75,2)	7 (100,0)	71 (82,6)	31 (86,1)
	Chemotherapie	11 (21,6)	31 (19,7)	2 (28,6)	32 (37,2)	7 (19,4)
	Radiotherapie	10 (19,6)	18 (11,5)	1 (14,3)	23 (26,7)	3 (8,3)

Tabelle 13: Patientencharakteristika der CMS-Gruppen für predictedCMS. CMS = consensus molecular subtypes, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group. RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog. *Anmerkung: Für n = 7 Patienten (CMS1 = 2, CMS2 = 4, CMS3 = 0, CMS4 = 1, Unklassifiziert = 0) lagen keine klinischen Daten vor (vgl. Abbildung 6: CONSORT-Diagramm XELAVIRI-Studie).

Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen (predictedCMS)

Status	Zeit bis zum Strategieversagen		Progressionsfreies Überleben		Gesamtüberleben	
	Median, Monate (90 % CI)	P (Log-Rank)	Median, Monate (95 % CI)	P (Log-Rank)	Median, Monate (95 % CI)	P (Log-Rank)
Alle Patienten n = 330	CMS1, n = 49	0,780	8,3 (7,6 – 9,0)	0,440	20,2 (15,1 – 25,4)	0,685
	CMS2, n = 153		10,2 (9,6 – 10,9)		25,0 (22,9 – 27,2)	
	CMS3, n = 7		13,6 (0,0 – 30,9)		21,4 (19,9 – 22,9)	
	CMS4, n = 85		9,5 (7,4 – 11,5)		23,5 (18,6 – 28,4)	
	Unklassifiziert, n = 36		10,4 (5,5 – 15,4)		26,1 (15,0 – 37,1)	
RAS/BRAF-Wildtyp n = 142	CMS1, n = 19	0,718	10,1 (6,4 – 13,8)	0,718	31,4 (16,8 – 46,0)	0,457
	CMS2, n = 65		10,2 (8,9 – 11,5)		28,7 (26,0 – 31,4)	
	CMS3, n = 4		6,9 (0,0 – 19,4)		20,8 (0,0 – 44,1)	
	CMS4, n = 35		10,3 (7,6 – 12,9)		24,1 (18,2 – 30,1)	
	Unklassifiziert, n = 19		12,6 (10,7 – 14,5)		31,4 (28,6 – 34,2)	
RAS-Mutation n = 170	CMS1, n = 27	0,575	8,1 (5,8 – 10,4)	0,366	16,0 (10,8 – 21,1)	0,382
	CMS2, n = 82		10,3 (9,4 – 11,3)		23,2 (19,5 – 26,9)	
	CMS3, n = 3		13,6 (0,0 – 31,0)		21,4 (0,0 – 51,3)	
	CMS4, n = 46		8,8 (6,9 – 10,7)		23,2 (13,4 – 33,0)	
	Unklassifiziert, n = 12		7,4 (1,3 – 13,5)		16,9 (5,0 – 28,8)	
Linkseitiger Primärtumor n = 212	CMS1, n = 28	0,983	8,3 (7,0 – 9,5)	0,298	18,2 (5,7 – 30,6)	0,724
	CMS2, n = 100		10,0 (9,4 – 10,6)		25,6 (22,3 – 29,0)	
	CMS3, n = 6		13,6 (4,9 – 22,3)		21,4 (7,8 – 35,1)	
	CMS4, n = 56		10,6 (9,3 – 11,9)		26,4 (21,4 – 31,5)	
	Unklassifiziert, n = 22		11,8 (8,0 – 15,6)		29,8 (23,0 – 36,7)	

Rechtsseitiger Primärtumor n = 105	CMS1, n = 20	10,1 (6,7 – 15,4)	0,422	8,4 (4,2 – 12,5)	0,355	18,7 (15,3 – 22,1)	0,026		
	CMS2, n = 45	10,2 (8,1 – 14,0)		9,9 (7,5 – 12,4)		21,2 (17,4 – 24,9)			
	CMS3, n = 1	2,8 (n/a)		2,8 (n/a)		2,8 (n/a)			
	CMS4, n = 26	5,4 (3,9 – 13,1)		4,4 (1,9 – 6,9)		14,5 (3,3 – 25,8)			
	Unklassifiziert, n = 13	8,0 (4,7 – 27,4)		8,3 (4,8 – 11,9)		16,9 (8,0 – 25,8)			

Tabelle 14: Überlebensanalysedaten der CMS-Gruppen für die gesamte Patientenkohorte sowie in Abhängigkeit der molekularen Subgruppe (*RAS*/*BRAF*-Mutationsstatus) und der Lokalisation. CMS = consensus molecular subtypes, *RAS* = rat sarcoma, *BRAF* = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, NA = nicht verfügbar

Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe und des RAS/BRAF-Mutationsstatus

Status		Zeit bis zum Strategiever sagen (TFS)			Progressionsfreies Überleben (PFS)			Gesamtüberleben (OS)		
		Median (90 % KI)	HR (90 % KI)	P	Median (95 % KI)	HR (95 % KI)	P	Median (95 % CI)	HR (95 % KI)	P
CMS1	RAS/BRAF-Wildtyp	seq. Arm n = 13	0,68 (0,34 – 1,39)	0,37	8,5 (5,1 – 12,0)	0,71 (0,31 – 1,65)	0,43	31,4 (14,1 – 48,6)	1,18 (0,45 – 3,11)	0,74
		komb. Arm n = 13			12,7 (10,1 – 24,9)			31,4 (26,8 – 35,9)		
	RAS-Mutation	seq. Arm n = 18	0,64 (0,33 – 1,26)	0,28	6,5 (4,6 – 8,3)	0,54 (0,24 – 1,22)	0,14	14,1 (9,1 – 19,1)	0,43 (0,20 – 0,95)	0,038
		komb. Arm n = 12			9,4 (7,4 – 10,5)			21,0 (3,1 – 38,9)		
	BRAF-Mutation	seq. Arm n = 1	1,14 (0,15 – 8,94)	0,92	4,2 (NA – NA)	1,14 (0,10– 13,27)	0,92	4,2 (-)	0,41 (0,03 – 6,62)	0,53
		komb. Arm n = 3			3,1 (0,5 – NA)			8,2 (0,0 – 20,5)		
CMS2	RAS/BRAF-Wildtyp	seq. Arm n = 33	0,63 (0,41 – 0,95)	0,066	7,8 (4,6 – 11,0)	0,48 (0,29 – 0,79)	0,004	27,3 (20,7 – 34,0)	0,56 (0,33 – 0,96)	0,036

CMS3	RAS- Mutation	komb. Arm n = 41	12,7 (10,2 – 16,4)			13,4 (10,6 – 16,2)		29,9 (24,2 – 35,7)			
		seq. Arm n = 45	12,5 (10,4 – 14,6)	1,59 (1,10 – 2,30)	0,040	10,3 (8,7 – 12,0)	1,15 (0,74 – 1,78)	0,53	21,3 (17,6 – 24,9)	0,95 (0,61 – 1,50)	
	BRAF- Mutation	komb. Arm n = 42	9,9 (8,5 – 10,9)			10,4 (8,9 – 11,8)			25,3 (21,5 – 29,0)	0,84	
		seq. Arm n = 5	8,0 (5,8 – 8,2)	0,71 (0,21 – 2,40)	0,64	8,0 (3,3 – 12,6)	0,30 (0,06 – 1,61)	0,16	10,7 (9,5 – 11,9)	1,20 (0,29 – 4,93)	
	RAS/BRAF- Wildtyp	komb. Arm n = 3	14,3 (14,1 – NA)	0,01 (0,0 – 331)	0,43	14,3 (14,0 – 14,5)	0,00 – 2770,77)	0,43	33,6 (31,4 – 35,8)	0,43	
		seq. Arm n = 2	3,2 (1,3 – NA)			1,3 (-)	0,01 (0,00 – 2770,77)		8,4 (-)	0,01 (0,00 – 2770,77)	
	RAS- Mutation	komb. Arm n = 2	14,2		0,71 (0,07 – 7,50)	0,81	-	0,71 (0,04 – 11,79)	-	0,71 (0,04 – 11,79)	0,81
		seq. Arm n = 1	13,6 (NA – NA)				-	0,71 (0,04 – 11,79)	-		

		(2,8 – NA)										
BRAF-Mutation	seq. Arm n = 1	20,2 (NA – NA)	-							-		
	komb. Arm n = 0	n/a	-							-		
CMS4	RAS/BRAF-Wildtyp	seq. Arm n = 20	0,65 (0,37 – 1,14)	0,21	8,5 (8,2 – 8,9) 13,0 (8,9 – 17,1)	0,54 (0,27 – 1,07)	0,08	18,7 (12,2 – 25,1) 28,5 (18,3 – 38,7)	0,53 (0,26 – 1,08)	0,08		
		komb. Arm n = 17										
	RAS-Mutation	seq. Arm n = 24	1,15 (0,69 – 1,94)	0,65	6,2 (4,2 – 8,3) 10,6 (8,4 – 12,8)	0,84 (0,46 – 1,56)	0,59	23,5 (9,9 – 37,0) 19,8 (12,3 – 27,4)	1,24 (0,66 – 2,33)	0,50		
		komb. Arm n = 26										
	BRAF-Mutation	seq. Arm n = 3	0,88 (0,11 – 6,91)	0,92	8,3 (1,0 – 15,7) 19,5 (-)	0,02 (0,00 – 462,07)	0,45	17,3 (0,0 – 38,6) 37,1 (-)	0,02 (0,00 – 462,07)	0,45		
		komb. Arm n = 1										

Tabelle 15: Überlebensanalysedaten der Therapiearme in Abhängigkeit der CMS-Gruppe und des RAS/BRAF-Mutationsstatus. CMS = consensus molecular subtypes, RAS = rat sarcoma, BRAF = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, seq. Arm = sequenzielles Therapieverfahren

Danksagung

Diese Arbeit hätte ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen nicht in dieser Form realisiert werden können. Für die vielfältige Hilfe möchte ich mich insbesondere bei folgenden Personen bedanken:

- Prof. Dr. med. Volker Heinemann für die Überlassung des Themas, die konstruktiven Anregungen sowie für die Reviews der Dissertation, der Publikation und des Posters
- PD Dr. med. Arndt Stahler für die herausragende Betreuung, Unterstützung und Motivation
- Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen sowie die wissenschaftlichen Anregungen
- PD Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink für die Unterstützung und Ratschläge in Hinblick auf die Planung und Durchführung der Laborarbeit
- Prof. Dr. med. Thomas Kirchner/Univ.-Prof. Dr. med. Frederick Klauschen für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit im Pathologischen Institut der LMU
- Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann für die Hilfe und Unterstützung bei der Identifikation der Tumorareale
- Sabine Sagebiel-Kohler für ihre tägliche Unterstützung und Hilfe bei der Organisation und Durchführung von Experimenten
- Den Mitarbeitern der Diagnostik des pathologischen Instituts Münchens für die Unterstützung in der Anfertigung der Gewebsschnitte sowie der immunhistologischen Färbung
- Meiner Schwester Martina Schuster für die Unterstützung in Bezug auf die formale Gestaltung und ihre Anregungen
- Meinen Freunden (insbesondere Fabian Schleich sowie Verena Merk) für ihre Geduld, ihren Beistand und ihre Ratschläge
- Meiner Familie für ihren Beistand und ihre Motivation

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schuster, Veronika Franziska

Name, Vorname

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

Bestimmung molekularer Subtypen basierend auf mRNA-Genexpression in Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom unter sequenzieller vs. kombinierter Therapie mit Fluoropyrimidin, Irinotecan und Bevacizumab-XELAVIRI Studie (AIO KRK 0110)

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

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

München, 30.12.2025

Ort, Datum

Veronika Franziska Schuster

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

Teil dieser Dissertation wurden im Rahmen einer Publikation im European Journal of Cancer (Stahler A. et al., EU J Cancer 2021, **157**, 71 - 80; doi: 10.1016/j.ejca.2021.08.017; [https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(21\)00535-9/fulltex](https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(21)00535-9/fulltex)) und in Form einer Posterpräsentation auf dem Annual Meeting der American Society of Clinical Oncology (ASCO) (J Clin Oncol 2021 39:15_suppl, abstr 3552) veröffentlicht.



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Schuster, Veronika Franziska

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Bestimmung molekularer Subtypen basierend auf mRNA-Genexpression in Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom unter sequenzieller vs. kombinierter Therapie mit Fluoropyrimidin, Irinotecan und Bevacizumab —XELAVIRI Studie (AIO KRK 0110)

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 30.12.2025

Ort, Datum

Veronika Franziska Schuster

Unterschrift Veronika Franziska Schuster