

**Aus dem Katharinenhospital Stuttgart
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Bosse**

**Die Bedeutung der prädiktiven
molekularpathologischen Diagnostik am Beispiel des
metastasierten kolorektalen Karzinoms**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Elena Hekeler
aus
Stuttgart**

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Bosse
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. H.-V. Gärtner

Meinen wundervollen Eltern
in großer Liebe und tiefer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
-----------------------------	---

1. Einleitung	1
----------------------	----------

1.1 Von der mikroskopischen Diagnostik zur „Lotsenstellung“ des Pathologen..	1
1.1.1 Der Wandel.....	1
1.1.2 Prädiktive Pathologie.....	4
1.1.3 Target-Therapie (engl. <i>targeted therapy</i>).....	5
1.1.4 Ära der personalisierten Medizin	7
1.2 Das metastasierte kolorektale Karzinom.....	9
1.2.1 Allgemeines, Epidemiologie, Risikofaktoren.....	9
1.2.2 Karzinogenese	10
1.2.2.1 Chromosomal instability (CIN) - pathway.....	11
1.2.2.2 Microsatellite instability (MSI) - pathway.....	14
1.2.2.3 Serrated pathway	15
1.2.3 Der prädiktive Biomarker im MAP-Kinase-pathway.....	16
1.2.3.1 EGF-Rezeptor (EGFR).....	17
1.2.3.2 KRAS	17
1.2.4 Therapie.....	19
1.2.4.1 Stellenwert der Chemotherapie.....	19
1.2.4.2 Antikörpertherapie (Target-Therapie).....	20
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	22

2. Patienten, Materialien & Methoden	25
---	-----------

2.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsgut.....	25
2.2 Materialien.....	26
2.3 Methoden	28
2.3.1 Follow-up-Datenerhebung.....	28
2.3.2 Datenbankerstellung.....	30
2.3.3 Probenvorbereitung	31
2.3.3.1 Histologie	31
2.3.3.2 Lasermikrodissektion (LMD).....	32
2.3.3.3 DNA-Isolation.....	33
2.3.4 Microarray	34
2.3.4.1 PCR-Amplifikation (LNA-Clamping)	34
2.3.4.2 LCD Array Chip.....	36
2.3.4.3 Hybridisierung, Labeling, Färbung, Detektion	37
2.3.5 Auswertungsverfahren.....	38

2.3.6	Pyrosequenzierung	39
2.3.6.1	Begründung der zusätzlichen Durchführung	39
2.3.6.2	Prinzip der Pyrosequenzierung	40
2.3.7	Statistische Methoden.....	41
2.3.7.1	Erläuterungen	41
2.3.7.2	Kaplan-Maier Methode	41
2.3.7.3	Log-Rank-Test	42
2.3.7.4	Exakter Test nach Fischer	42
2.3.7.5	T-Test (unverbunden).....	42
2.3.7.6	Cox-Regressionsanalyse	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Patientencharakteristik	44
3.2	Grunderkrankung.....	46
3.2.1	Tumorlokalisation.....	46
3.2.2	Histologische Klassifizierung.....	47
3.2.3	Grading	48
3.2.4	Tumorstadieneinteilung.....	49
3.2.5	Metastasen bei Erstdiagnose.....	51
3.2.6	R-Klassifikation.....	53
3.3	KRAS - Mutationsanalyse	54
3.3.1	KRAS - Mutationen.....	54
3.3.2	Diskordanzen im KRAS-Mutationsstatus	60
3.4	KRAS-Vergleiche	63
3.4.1	Kordanz- und KRAS-Status vs. pTNM-Klassifikation.....	63
3.4.1.1	Beurteilung der T-Klassifikation.....	63
3.4.1.2	Beurteilung der N-Klassifikation	64
3.4.1.3	Beurteilung der M-Klassifikation	65
3.4.2	Kordanz- und KRAS-Status vs. Grading.....	67
3.4.3	Kordanz- und KRAS-Status vs. Primärtumorlokalisation.....	68
3.4.4	KRAS-Status vs. Histologie	69
3.5	Follow-up	72
3.5.1	Ansprechen der First-Line-Chemotherapie	74
3.5.2	Ansprechen der Therapie mit „Panitumumab“ (Vectibix®).....	77
3.5.3	Ansprechen der Therapie mit „Cetuximab“ (Erbix®).....	78
3.5.4	Therapiewechsel.....	80
3.5.5	Therapieabbruch / Therapieunterbrechung.....	81
3.5.6	Rezidive und Fernmetastasen	83
3.5.6.1	Rezidive.....	83
3.5.6.2	Neue Fernmetastasen	85
3.6	KRAS (Cod61) & BRAF (Cod600) - Mutationsanalyse	87

3.7 Survivalanalyse.....	89
3.7.1 Overall Survival (OS).....	89
3.7.2 Progression-free survival (PFS).....	93
4. Diskussion	97
4.1 Allgemeines	97
4.2 Diskussion der Methode	99
4.2.1 Qualitätssicherung	99
4.2.2 Vorteile der hiesigen Techniken.....	99
4.2.3 Methodische Zukunftsideen	100
4.3 Diskussion der ermittelten Ergebnisse und Auswertung	101
4.3.1 Beurteilung des Patientenkollektivs	101
4.3.1.1 Aktuelle Situation.....	101
4.3.1.2 Bewertung der Alters- und Geschlechterverteilung.....	102
4.3.2 Beurteilung der KRAS-Mutationsanalyse	103
4.3.2.1 Mutationen im KRAS-Gen	103
4.3.2.2 Verhältnis von Codon 12 zu Codon 13	103
4.3.2.3 Widersprüchliche Ergebnisse im Kordanz-Status.....	104
4.3.2.4 Kritische Betrachtung der Diskordanzen	105
4.3.2.4.1 Doppelmutationen.....	105
4.3.2.4.2 Adenom-Karzinom-Sequenz bei den Diskordanzen.....	105
4.3.2.4.3 Erklärungen für das Auftreten von Diskordanzen	105
4.3.2.4.4 Rezidive mit unterschiedlichem Mutationsstatus	106
4.3.2.4.5 Klinische Relevanz des KRAS-Status in Adenomen.....	107
4.3.3 Beurteilung der KRAS-Vergleiche.....	108
4.3.3.1 Kordanz- und KRAS-Status vs. pTNM-Klassifikation.....	108
4.3.3.2 Kordanz- und KRAS-Status vs. Primärtumorlokalisation	108
4.3.3.3 KRAS-Status vs. Histomorphologie	109
4.3.4 Beurteilung des Follow-up	109
4.3.4.1 Differenzierte Betrachtung der First-Line-Chemotherapie.....	109
4.3.4.2 Differenzierte Betrachtung der Target-Therapie.....	110
4.3.4.2.1 Derzeitiger Kenntnisstand.....	110
4.3.4.2.2 Ansprechen der Therapie mit „Cetuximab“ (Erbitux®).....	111
4.3.4.2.3 Ansprechen der Therapie mit „Panitumumab“ (Vectibix®)	112
4.3.4.2.4 Anti-EGFR-Therapie bei KRAS-Mutation?.....	113
4.3.4.2.5 Kuration nach Anti-EGFR-Therapie?.....	113
4.3.4.2.6 Ursachenanalyse der Non-responder	114
4.3.4.3 Differenzierte Betrachtung der Therapiewechsel.....	116
4.3.4.4 Differenzierte Betrachtung der Therapieabbrüche.....	116
4.3.4.5 Differenzierte Betrachtung der Therapieunterbrechungen.....	117
4.3.4.6 Differenzierte Betrachtung der Fernmetastasen	117
4.3.4.7 Differenzierte Betrachtung der Rezidive.....	118
4.3.5 Beurteilung der Survivalanalyse.....	119

4.4 Kritische Bewertung der Durchführung.....	121
4.4.1 Patientenkollektiv	121
4.4.2 Verbesserungsvorschläge	121
4.4.2.1 RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)	121
4.4.2.2 Prospektive Studien.....	122
4.5 Schlussfolgerung.....	123
4.5.1 Ursachen für Diskordanzen	123
4.5.2 Einfluss des Kordanz-Status auf OS/PFS.....	123
4.5.3 Einfluss des Kordanz-Status auf weitere Parameter.....	123
4.5.4 Therapieansprechen & klinische Relevanz der Diskordanzen	124
4.5.5 Modulation des therapeutischen Imperativs	124
4.5.6 Fazit	125
4.6 Epikritische Betrachtung und Ausblick.....	126
4.6.1 Prädiktive Biomarker.....	126
4.6.2 Nutzen der Selektion	127
4.6.3 Personalisierte Medizin	128
4.6.4 Medizin-ethische Aspekte	130
5. Zusammenfassung	132
6. Anhang.....	134
7. Abbildungsverzeichnis	135
8. Tabellenverzeichnis	138
9. Literaturverzeichnis	140
10. Danksagung.....	154
11. Lebenslauf	155

Abkürzungsverzeichnis

A) Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abw.	Abweichung
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
APS	Adenosin 5' Phosphosulfat
Arg	Arginin
ASCO	American Society of Clinical Oncology
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bcr-abl	breakpoint cluster region - abelson murine leukemia viral oncogene
BDP	Berufsverband Deutscher Pathologen
BRAF	serine/threonine-protein kinase B-Raf
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CI	confidence interval
CIN	chromosomal instability
CML	chronische myeloische Leukämie
Cod	Codon
Cys	Cystein
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CR	complete remission
CT	Computertomographie
D	Diskordanz

DCC	deleted in colorectal carcinoma
DE	Deutschland
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure (-acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ED	Erstdiagnose
EGF(R)	epidermal-growth-factor - (receptor)
engl.	englisch
ErbB	v-ErbB erythroblastosis virus transforming oncogene homolog
ERK	extracellular signal regulated kinases
et al.	et alii
FA	Folinsäure (-acid)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FI	Finnland
FOLFIRI	Folinsäure(FOL), Fluoruracil(F), Irinotecan(IRI)
FOLFOX	Folinsäure(FOL), Fluoruracil(F), Oxaliplatin(OX)
5-FU	5-Fluoruracil
G	Grading
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Grb-2	growth factor receptor - bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hematoxylin-Eosin
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HGIN	hochgradige intraepitheliale Neoplasie
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
HT	high-throughput
H ₂ O	Wasser

HOPE	hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect
HR	Hazard Ratio
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
INT	Intergroup
Jhd.	Jahrhundert
K	Konkordanzen
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene (= k-ras; K-RAS)
lat.	lateinisch
LCD	low cost density
LGIN	leichtgradige intraepitheliale Neoplasie
LK	Lymphknoten
LMD	Lasermikrodissektion
LNA	locked-nucleid-acids
log	dekadischer Logarithmus
m	männlich
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mKRR	metastasiertes kolorektales Karzinom
MEK	mitogen activated ERK activating kinase
MOSAIK	Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/ Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer
MSI	microsatellite instability
mTOR	mammalian target of rapamycin
Mut	Mutation
MW	Mittelwert
n	Anzahl (Stichprobe)
N	Anzahl (Gesamtheit)
NE	non evaluable
NH ₃	Ammoniak
Nr.	Nummer
NRAS	neuroblastoma rat viral oncogene

NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
ON	over night
OP	Operation
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
OSP	Onkologischer Schwerpunkt Stuttgart
P	Phosphorsäurerest
PCR	Polymerasekettenreaktion (-chain reaction)
PD	progressive disease
PET	Polyethylenterephthalat
PFS	progression-free survival
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	phosphoinositide-3-kinase (Synonym: PIK3CA)
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (Synonym: PI3K)
PR	partial remission
p (-Wert)	Wahrscheinlichkeit (probability)
QuIP	Qualitätsinitiative Pathologie
R	Residual
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma oncogene
rcf	relative centrifugal force
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SA	Streptavidin
Ser	Serin
SD	stable disease
SNP	single nucleotide polymorphism
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt

SOS	son of sevenless
SQL	Structured Query Language
SSA	sessile serrative Adenome
STD	Standardabweichung
Std.	Standard
Taq	thermus aquaticus
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- α	transforming growth factor α
TMB	3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidin
(p)TNM	(pathologisch) Tumor, Nodes, Metastasen
TP53	Tumorsuppressorgen des p53-Proteins
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Val	Valin
v. Chr.	vor Christus
VEGF	vascular endothelial growth factor
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
Wnt	wingless Int 1
WSC	Wildtype Suppressor Compound
Wt	Wildtyp
XELOX	Xeloda® (Capecitabin) und Oxaliplatin
XELOXA	XELOX in Adjuvant Colon Cancer Treatment
z.B.	zum Beispiel

B) Physikalische Einheiten

h	Stunde
Min.	Minute
Sek.	Sekunden
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
°C	Grad Celsius
bp	Basenpaar(e)
Da	Dalton
Hz	Hertz (Einheit)
J	Joule
M	Molar (mol/l)
U	Units
Log	Logarithmus

C) Präfixe der physikalischen Einheiten

k	Kilo (10^3)
c	Zenti (10^{-2})
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})

1. Einleitung

1.1 Von der mikroskopischen Diagnostik zur „Lotsenstellung“ des Pathologen

Die Pathologie ändert ihr Gesicht.

Der Wandel im Bereich der Pathologie von der traditionellen mikroskopischen zur innovativen Diagnostik zeigt zunehmend positive Auswirkungen im Bereich der Tumormedizin. Grundlage sind die Bereiche der „prädiktiven Pathologie“, sowie der „Target-Therapie“, die den Klinikern ermöglichen, die richtige Therapie dem richtigen Patienten zuzusprechen, mit gleichzeitig maximalem therapeutischem Erfolg unter minimalen Nebenwirkungen.

1.1.1 Der Wandel

Die Pathologie stellt eine der innovationsstärksten Disziplinen der heutigen Medizin dar. Bis vor wenigen Jahren galt das Fachgebiet der Pathologie noch als rein diagnostisch orientiert. Kernpunkt war in vielerlei Hinsicht die makro-, zyto- und histologische Suche nach der korrekten Krankheitsdiagnose auf Basis von Gewebeproben, Abstrichen oder Operationspräparaten des Patienten, während die Obduktion, wie auch heute noch, nur einen kleinen Anteil des Aufgabengebietes ausmachte. Das Repertoire dieser diagnostischen Pathologie wurde im letzten Viertel des 20ten Jahrhunderts durch die Entwicklung der Molekularpathologie zunehmend erweitert (s. Abb. 1). Somit entwickelte sich über den Blick in das Genom eine umfassende Diagnostik im molekularen Bereich unter Einbeziehung einer subtilen Funktionsanalyse von Tumoren. Rasche Sequenzierungsmethoden, metabolische Analysen sowie Chip- und Arraytechnologien wurden entwickelt. Diese sog. HT-Technologien (high-throughput) ermöglichen sogar mit altem Archivmaterial und geringsten Zell- und Gewebeanteilen zuverlässige quantitative Aussagen.

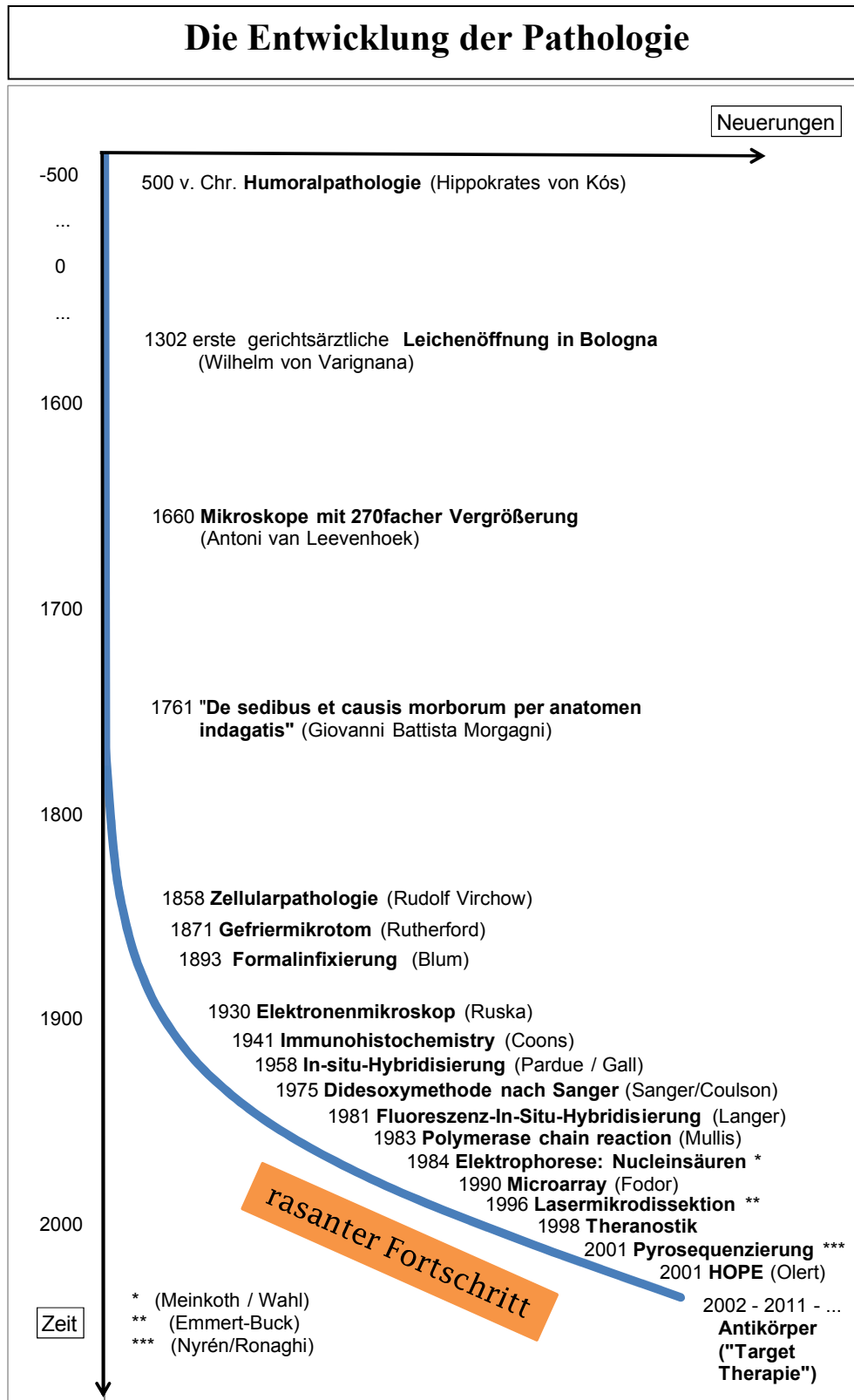


Abb. 1: Chronologische Darstellung der Entwicklung der Pathologie von den Wurzeln im 5. Jhd. v. Chr. bis ins beginnende 21. Jahrhundert.

Der Fortschritt wird im Verlauf weder quantitativ noch numerisch verifiziert. Die Kurve soll ausschließlich einen tendenziellen Verlauf über die Jahre hinweg veranschaulichen.

Im Zuge der rasanten Entwicklung der molekularpathologischen Methoden etablierte sich die heutige moderne Pathologie, die die traditionell diagnostische Pathologie revolutioniert und einen entscheidenden Paradigmenwechsel vollzogen hat.

Abb. 2 veranschaulicht die paradigmatische Wende von der Deskription (lat. *describere*, beschreiben) zur Prädiktion (lat. *praedicere*, vorhersagen).

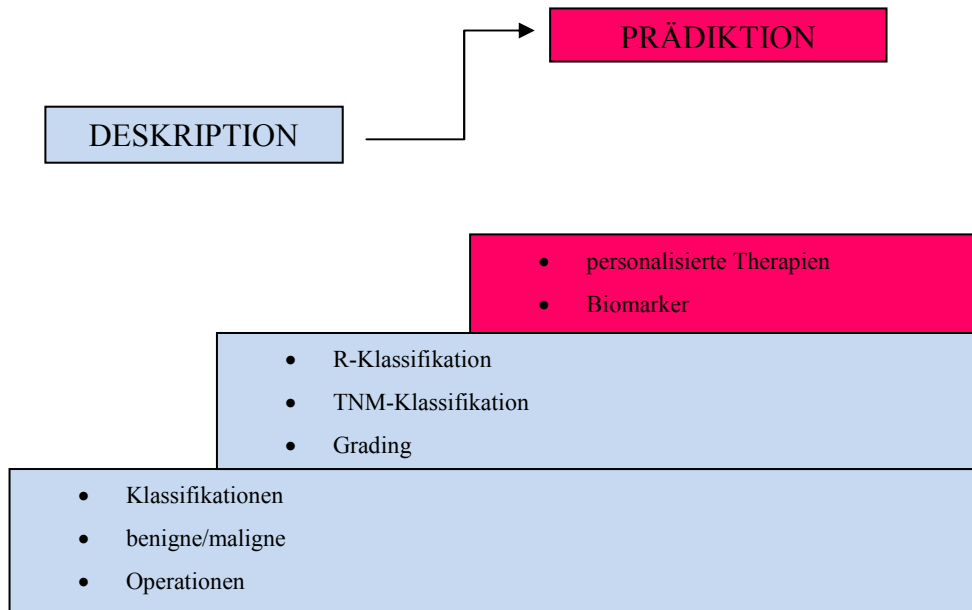


Abb. 2: Entwicklung der Beurteilungskriterien
(nach Professor A. Bosse, Pathologisches Institut des Klinikums Stuttgart)

Die neu hinzugekommene prädiktive Pathologie verlagert den Schwerpunkt der pathologischen Beurteilung, jedoch ohne dabei die Anwendung traditionell bewährter Methoden zu vernachlässigen. Die Bestimmung des Malignitätsgrades, die Ausbreitung sowie die Typisierung des Tumors stehen weiterhin im Vordergrund. Für die morphologische Beurteilung gibt es bis dato außer der Mikroskopie kein anderes Verfahren, das diese Aufgabe bewerkstelligen könnte.

Die deskriptive Pathologie nimmt damit weiterhin im Rahmen der sog. „Primärdiagnostik“ mit ca. 80% einen sehr großen Stellenwert ein, jedoch wird zusätzlich von einer „Sekundär- und Tertiärdiagnostik“ gesprochen, die wachsende Anteile der pathologischen Diagnostik einnehmen (s. Abb. 3).

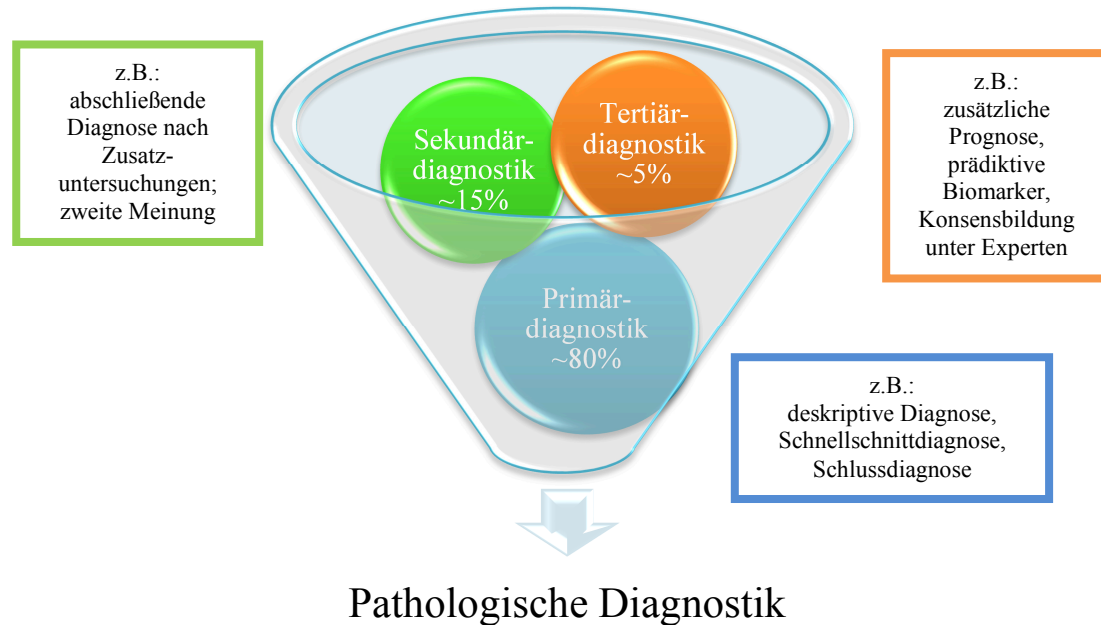


Abb. 3: Schematische Darstellung der Komponenten der modernen pathologischen Diagnostik (Angaben und Werte nach Professor A. Bosse, Pathologisches Institut des Klinikums Stuttgart)

1.1.2 Prädiktive Pathologie

Durch die zunehmende Sachkenntnis der Tumorbiologie und ihrer molekularen Abläufe lässt sich eindeutig feststellen, dass das Tumorstadium nicht allein von einzelnen Tumormarkern, sog. Biomarkern, abhängt. Vielmehr liegen diesem komplex verknüpfte Interaktionen verschiedenster intrazellulärer Moleküle zu Grunde, deren korrekte Kommunikation untereinander in vielen Fällen bis dato noch nicht geklärt ist.

Die erwähnten Biomarker stellen jedoch trotzdem eine wichtige Rolle in Bezug auf die Tumorbiologie dar, denn sie sind objektiv messbar, evaluierbar und dienen als Indikator für normale oder pathologische Prozesse. Ebenso zeigen sie die pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention an.

Biomarker können prognostisches oder prädiktives Potential besitzen.

Die „Prädiktiven Biomarker“ nehmen in der Onkologie deutlich an Bedeutung zu. Das Wort „prädiktiv“ impliziert, dass es sich hierbei um berechenbare und absehbare Marker

handelt, die Vorhersagekraft für das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie besitzen, ohne sich spontan zu verändern.

Sie sind die Voraussetzung für eine maßgeschneiderte Therapie eines jeden Patienten, um den individuellen Tumor mit optimaler Wirkung und maximalem therapeutischen Erfolg zu bekämpfen.

Grundlage hierbei ist, dass spezifische genetische Eigenschaften des Tumors mit bestimmten Wirkeigenschaften einer zielgerichteten Therapie korrelieren.

Dies erfordert eine Selektion der Patienten, wodurch die Therapieeignung bzw. die Effizienz für Therapiemöglichkeiten vorhergesagt werden kann.

Die Pathologie hat bereits in den letzten Jahren bei den häufigsten Tumorarten geeignete Verfahren zur Selektion von Patienten bzgl. der Therapieeignung etabliert. Dazu zählen der HER-2-Test für das Mammakarzinom, der KRAS-Test für das metastasierte kolorektale Karzinom, sowie der EGFR-Test für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom. Ebenfalls wurde der immunhistochemische Nachweis von CD20 auf malignen B-Zell-Lymphomen sowie CD117 bei GIST (gastrointestinalen Stromatumoren) in die Diagnostik der Pathologie aufgenommen.

Durch die Möglichkeiten, den Therapieerfolg prospektiv einzuschätzen, bekommt die Prädiktion in der Onkologie wie auch in der Pathologie einen immer größeren Stellenwert.

1.1.3 Target-Therapie (engl. *targeted therapy*)

Grundlage für die inzwischen feste Stellung der molekularpathologischen Diagnostik innerhalb der pathologischen Diagnosefindung war die detaillierte molekulare Aufschlüsselung der Signaltransduktionskaskaden. Mit der „Entdeckung der Zellkommunikation und im speziellen der Entdeckung der G-Proteine“ erhielten Alfred G. Gilman und Martin Rodbell 1994 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin, womit sie die Grundlagen für unseren heutigen Wissensstand bezüglich der intrazellulären Kommunikationswege legten (Raju, 2000). Diese Entdeckung prägte seither maßgeblich die Vorstellung der molekularpathologischen Entwicklungskaskade von Tumoren.

Die Tumorthherapie basiert traditionell auf 3 äußerst beständigen Hauptmethoden: Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie. Doch mittlerweile gibt es auch im therapeutischen Bereich ein breites Spektrum an neuen Substanzen und Methoden. Hierzu zählen die Immuntherapien, Antikörpertherapien sowie Therapien mit „small molecules“. Diese neuen Methoden greifen stärker auf das moderne molekulare Wissen zurück und können damit zielgerichtet in die einzelnen Signalkaskaden eingreifen.

Insgesamt wurden bisher 12 Signalwege identifiziert, innerhalb derer Mutationen (meist in Protoonko- oder Tumorsuppressorgenen) in der Regel stattfinden (Jones et al., 2008). Durch Kenntnis dieser Mutationen können beispielsweise an Schlüsselstellen der Signaltransduktion Strukturen ausgemacht werden, die für den Tumor essentiell und für seine Funktion lebensnotwendig sind. Für diese Zielstrukturen (engl. *targets*) werden Therapeutika entwickelt, die den Tumor an seiner Schwachstelle treffen sollen. Diese inzwischen etablierte Methode der Target-Therapie ermöglicht damit eine zielgenaue Behandlung des Gewebes und vermeidet eine globale, unspezifische, nebenwirkungsreiche Applikation.

Derzeit gibt es nur wenige zugelassene Antikörper, die als Tumorthérapeutika Anwendung finden. Dieser geringe Bruchteil einer eigentlich sehr vielversprechenden großen Anzahl von neuen Substanzen, die sich in der Entwicklungsphase I. bis III. befinden und mit Wahrscheinlichkeit in den nächsten Jahren auf den Markt kommen werden, ist in Tabelle 1 dargestellt. Somit stellen die bisher zugelassenen Antikörper nur die Spitze eines Eisberges der sich rasant entwickelnden molekularen prädiktiven Diagnostik dar. Aus dieser Entwicklung heraus hat sich das Kunstwort „Theranostik“ etabliert, welches die optimale Kommunikation aus „prädiktiver Pathologie“ und „Target-Therapie“ beschreibt. Ein optimierter Therapieerfolg wird jedoch nur in seltenen Fällen erreicht. Nach heutigem Wissensstand sprechen z.B. bei Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom in etwa 10% - 20% der Patienten auf derartige Therapiemaßnahmen an (Chung et al., 2005; Cunningham et al., 2004).

Tabelle 1: Zugelassene Antikörper

Handelsname (Freiname)	Tumor	Wirkort
Herceptin® (Trastuzumab)	Mammakarzinom Magenkarzinom	Her2/neu
Glivec® (Imatinib)	CML GIST	c-kit, bcr-abl c-kit, bcr-abl
Erbitux® (Cetuximab) Vectibix® (Panitumumab)	kolorektales Karzinom	EGFR
Tarceva® (Erlotinib) Iressa® (Gefitinib)	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	EGFR
Tarceva® (Erlotinib)	Pankreaskarzinom	EGFR
Avastin® (Bevacizumab)	Kolorektales Karzinom nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom Nierenzellkarzinom Mammakarzinom	VEGF

1.1.4 Ära der personalisierten Medizin

Durch diese Entwicklung umfasst der moderne Aufgabenbereich des Pathologen neben der histo- sowie zytopathologischen intravitalen Diagnostik und der klinischen Obduktion nunmehr auch prädiktive molekulare Untersuchungen. Ebenso wird die Qualitätssicherung in der Medizin, die die Versorgung der Patienten verbessern soll, als ein Kernpunkt des pathologischen Tätigkeitsbereiches angesehen. Für diese Umsetzung finden inzwischen die molekularpathologischen Befunde Einzug in den klinischen Gesamtbefund der Patienten, wodurch Therapieentscheidungen in Zusammenarbeit von Pathologen und Klinikern präzisiert und individualisiert angepasst werden können. Die Diagnose des Pathologen bedeutet oftmals eine wichtige und entscheidende Weichenstellung für die Wahl der Therapieschemata.

„Weg vom Sektionssaal hin zur prädiktiven Diagnostik“ - so hat sich die heutige Pathologie vom „Omega“ zum „Alpha“ entwickelt und nimmt eine Schlüsselrolle in Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen ein. Im diesem Zusammenhang wird auch von der „Lotsenstellung des Pathologen“ gesprochen.

Schon im Jahre 1966 hat der amerikanische Wissenschaftler A. Donabedian die „Dimension der Qualität“ in Struktur-, Prozess- und Ergebnisqualität unterteilt (Donabedian, 1966). Unter Berücksichtigung des aktuellen medizinischen Kenntnisstands findet das Qualitätsmanagement sowie die Qualitätssicherung in der Pathologie auf allen drei Ebenen in höchstem Maße statt, wodurch eine patientenorientiert integrierte Versorgung ermöglicht wird.

Die Medizin der Zukunft wird oftmals als personalisierte Medizin bezeichnet. Die Voraussetzung dafür wird durch die moderne Pathologie geschaffen. Grundsätzlich ist die Identifikation von Biomarkern dabei ein wichtiger Schritt für die personalisierte Therapie. Die Zusammenarbeit von Pathologen und Onkologen, wie z.B. in interdisziplinären Tumorboards, führt zu einer optimalen Verknüpfung der wissenschaftlichen Untersuchungen und ihrer klinischen Anwendung.

Die Bedeutung der modernen Pathologie in der Ära der personalisierten und zielgerichteten Medizin wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der im Jahre 2008 in Europa am häufigsten auftretenden Krebserkrankung (Ferlay et al., 2010), dem kolorektalen Karzinom, dargestellt.

1.2 Das metastasierte kolorektale Karzinom

1.2.1 Allgemeines, Epidemiologie, Risikofaktoren

Mit über 70.000 Neuerkrankungen und ca. 30.000 Todesfällen in Deutschland ist inzwischen das kolorektale Karzinom für Männer, wie auch für Frauen, einer der häufigsten malignen Tumoren. Mit 16% ist es die zweithäufigste Krebserkrankung und mit 12% - 14% die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Geschlechterspezifisch übersteigt nur das Mammakarzinom in der weiblichen Bevölkerung und das Prostatakarzinom bzw. Bronchialkarzinom in der männlichen Bevölkerung das kolorektale Karzinom bezüglich Krebsneuerkrankung bzw. Krebstodesursache (Robert Koch-Institut, 2010).

Im internationalen Vergleich liegt Deutschland mit seinen Erkrankungszahlen mit an der Spitze (Robert Koch-Institut, 2010). Im Jahre 2008 machte das kolorektale Karzinom mit 13,6% die häufigste aller Krebserkrankungen in Europa aus, was einer Summe von 436.000 Fällen entspricht (Ferlay et al., 2010).

Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom stellen eine positive Familienanamnese, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, sowie hereditäre Erkrankungen dar. Eine hereditäre Ursache findet sich z.B. beim HNPCC (Rustgi, 2007), der FAP (Morin et al., 1997), beim Peutz-Jeghers-Syndrom (Launonen, 2005), sowie beim Gardner- (Gardner, 1951) und Turcot-Syndrom (Turcot, 1959).

Ebenfalls führen Alkoholabusus, Nikotinabusus, gemüse-, obst- und faserarme Ernährung, fett- und kalorienreiche Ernährung sowie mangelnde Bewegung zu einem erhöhten Risiko. Protektiv und damit risikosenkende Wirkung wird dagegen Folsäure, Vitamin D, antioxidante Vitamine (Vitamin A, C, E) und Mineralien (Selen, Kalzium) zugesprochen (Ahmed et al., 2004).

Der Hauptanteil der Dickdarntumoren von ca. 70% - 80% entsteht jedoch sporadisch im Rahmen von somatischen Genmutationen, während ca. 5-10% erblich bedingt sind (Keimbahnmutationen) und ungefähr bis zu 25% eine familiäre Häufung zeigen

(Calvert and Frucht, 2002; Nagy et al., 2004). Lediglich die sporadische Form des kolorektalen Karzinoms soll nachfolgend beleuchtet werden.

1.2.2 Karzinogenese

Seit der Erstbeschreibung der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ 1975 (Muto et al., 1975) galt diese als Paradigma für die Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Darunter verstand die Wissenschaft damals den unter dem heutigen Begriff laufenden „chromosomal instability (CIN)-pathway“.

Derzeit wird die Annahme, dass alle kolorektalen Karzinome diesen postulierten „CIN-pathway“ nehmen, revidiert. Offensichtlich gibt es nach momentanem Wissensstand drei grundsätzlich verschiedene Wege. So sind zu dem seit mehr als 20 Jahren bekannten „CIN-pathway“ der „MSI-pathway“ und der „serrated pathway“ neu hinzugekommen.

Zwar geht man weiterhin davon aus, dass das kolorektale Karzinom durch eine sequenzielle Abfolge von Veränderungen in Schlüsselgenen entsteht, jedoch unterschiedliche Signalwege und zugrunde liegende Mechanismen existieren. Dies ist unter anderem ein Erklärungsansatz für die Unterschiede im Krankheitsverlauf, im Therapieansprechen und in der Prognose betroffener Patienten.

Diesen zuvor genannten Schlüsselgenen werden drei klassische Gengruppen zugeordnet (Gryfe et al., 1997; Vogelstein et al., 2000). Dies sind einerseits die Proto-Onkogene, die zu Onkogenen mutieren und damit das Zellwachstum und gleichzeitig die maligne Entartung fördern. Auf der anderen Seite die Tumorsuppressorgene, die nach Mutation keinen Einfluss mehr auf die Zellproliferation haben. Zusätzlich sind die Mismatch-Reparaturgene zu nennen, die mutiert keine fehlerfreie DNA-Replikation mehr durchführen können, mit dem Ergebnis, dass weitere Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen möglich sind.

1.2.2.1 Chromosomal instability (CIN) - pathway

Kolorektale Karzinome entwickeln sich über einen stufenweise ablaufenden Prozess. Sie entstehen ausgehend von einer normalen Epithelzelle des Kolorektums durch monoklonale Expansion einer einzigen Zelle über einen adenomatösen benignen Polyp, der sich bis zu einem invasiven Karzinom ausbilden kann. Grundsätzlich handelt es sich bei dem Polyp um eine polypöse Schleimhautalteration mit konkreter Konfiguration. Diese Adenome können sich tubulär, tubulovillös oder villös zeigen, sowie schmal, breitbasig oder gestielt sein. Desweiteren weisen sie zyto- und histologische Kriterien einer intraepithelialen Neoplasie auf. Von der WHO wird diese als neoplastische Epithelproliferation ohne Zeichen einer Invasion definiert.

Nicht alle Adenome entwickeln sich immer zu einem Karzinom. Adenome stellen fakultative Präkanzerosen dar, bei denen man davon ausgeht, dass sie in ca. 10% kanzerös werden (Hermanek et al., 1983). Bei Adenomen über 2cm werden sogar Malignitätsraten von ca. 17% angegeben (Muto et al., 1975). Somit steigt das Progressionsrisiko mit dem Grad der Ausdehnung der Veränderung.

Der histologisch und makroskopisch nachweisbare Progress wurde, wie zuvor erwähnt, 1975 mit dem Begriff der sog. „Adenom-Karzinom-Sequenz“ geprägt. Diese Sequenz beschreibt im Regelfall einen über Jahre bzw. Jahrzehnte sich erstreckenden Prozess (Fearon and Vogelstein, 1990; Gryfe et al., 1997), bei dem der Polyp sukzessiv dysplastischer, villöser und auch größer wird. Bestätigt wird diese Ansicht dadurch, dass das Durchschnittsalter der Erstdiagnose in der 5.-7. Lebensdekade liegt. Ebenso lieferte die „National Polyp Study“ einen gewichtigen Beweis für diese kausale sequenzielle Abfolge (Winawer et al., 1993).

1988 erarbeiteten Fearon und Vogelstein analog zu diesem pathogenetischen Modell die molekularpathologischen Veränderungen, wodurch sie jedem Schritt des Prozesses eine bestimmte Genmutation zuordnen konnten (Fearon and Vogelstein, 1990; Vogelstein et al., 1988) (s. Abb. 4).

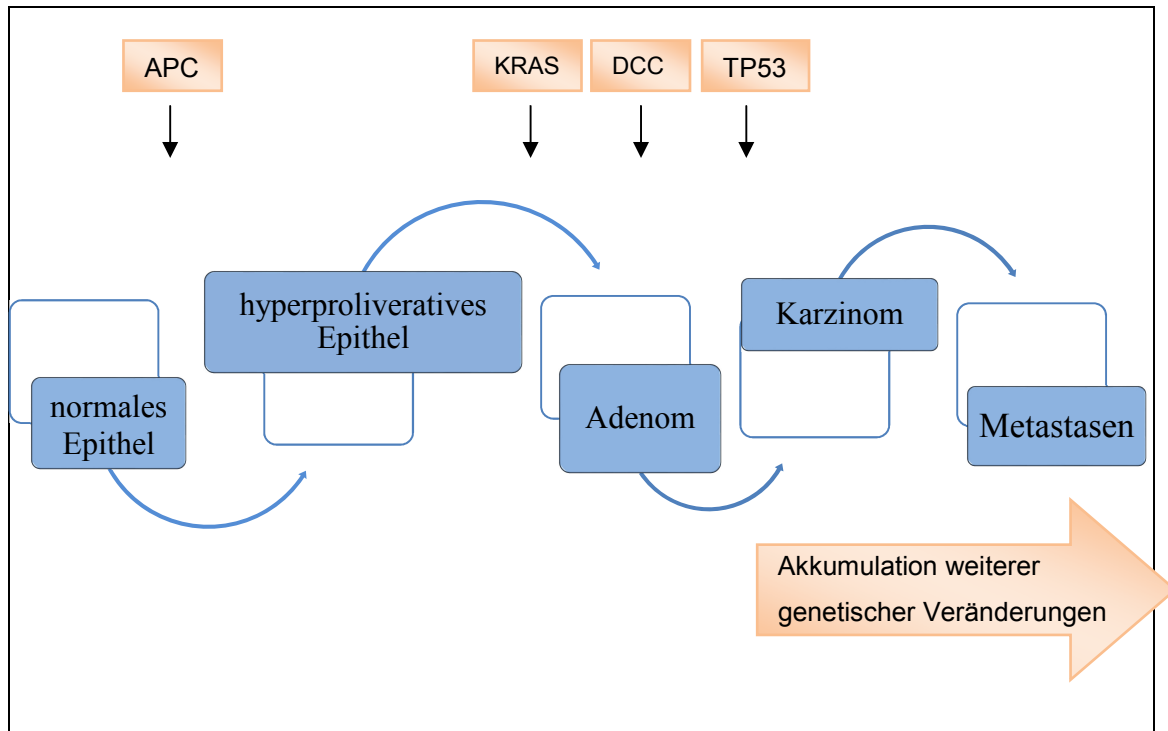


Abb. 4: Multistep-Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms (Modell nach Fearon und Vogelstein, 1990)
 Legende: APC: adenomatous polyposis coli; KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene;
 DCC: deleted in colorectal carcinoma; TP53: tumor protein p53

Initialisiert wird diese Multistep-Karzinogenese konkret durch eine Mutation beider Allele des Tumorsuppressorgens APC oder durch Mutation eines Allels bei gleichzeitigem Verlust des anderen (Powell et al., 1992). APC steht für das multifunktionale „Adenomatous-polyposis-coli-Protein“, das mit einer Vielzahl von anderen Proteinen interagiert. Eines davon ist das sog. β -Catenin, das an der Zelladhäsion und der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt ist. APC ist eine Untereinheit des β -Catenin-Degradationskomplexes und damit Bestandteil des wnt-Signalweges (Cruz-Bustillo, 2004; Gumbiner, 1995). Veränderungen in diesem Pfad, durch Mutation im APC-Gen, werden bei 75% - 85% der kolorektalen Karzinome beobachtet (Frattini et al., 2004; Michor et al., 2004). Bei einem mutierten APC-Gen wird im Zellkern β -Catenin akkumuliert, entsprechend einem dauerhaften wnt-Signal. Es wandert in den Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren von wnt-Zielgenen, die an der Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind (Behrens et al.,

1996). Mutationen im APC-Gen finden sich z.B. bei der FAP, dem Gardner-Syndrom oder auch dem Turcot-Syndrom.

Als nächster Schritt folgt die Mutation im KRAS-Gen, einem Proto-Onkogen, das in 30% - 40% der kolorektalen Karzinome mutiert ist (Aaltonen et al., 1993; Andreyev et al., 1998; Andreyev et al., 2001). Infolge der dauerhaften Aktivierung des KRAS-Gens, ausgelöst durch die Mutation, werden somit kontinuierlich Wachstumsimpulse von der Zellmembran zum Zellkern weitergegeben, woraus ein unkontrolliertes Tumorzellwachstum resultiert. In diesem Prozess ist auch die Inaktivierung des DCC-Gens („deleted in colorectal carcinoma“), einem Tumorsuppressorgen, involviert, welches 1989 identifiziert wurde (Fearon et al., 1990). Die Mutation im DCC-Gen führt zu einem Verlust des Zusammenhalts der Zellen, da das DCC-Protein für Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen verantwortlich ist (Fearon and Vogelstein, 1990). Diese Mutation tritt bei 70% der kolorektalen Karzinome und 50% der fortgeschrittenen Adenome auf (Calvert und Frucht, 2002; Vogelstein et al., 1988). Selbst große Adenome sind zu diesem Zeitpunkt noch benigne Neoplasien.

Die weitere Tumorprogression ist Folge der Mutation des TP53-Gens. Als Wächter im Zellzyklus verhindert p53 die Replikation geschädigter DNA und regt auch die Apoptose von geschädigten Zellen an. Folge einer Mutation in diesem Gen ist der Verlust des programmierten Zelltods, wodurch sich ebenfalls ein ungehemmtes Tumorzellwachstum ergibt. Mutationen in diesem Gen zeigen sich in mehr als 50% der sporadischen kolorektalen Karzinome (Aaltonen et al., 1993; Iacopetta, 2003; Kressner et al., 1999; Vogelstein et al., 2000).

Inzwischen wird der Vorgang differenzierter betrachtet.

Tumorbiologen gehen davon aus, dass „die genetischen Veränderungen nicht geordnet oder sequenziell-algorithmisch, sondern relativ chaotisch, im Sinne eines stochastischen Prozesses“ (Tannapfel, 2010) ablaufen. Derzeit können 700 - 1000 Genalterationen identifiziert werden. Diese bilden die Grundlage für neue Genkombinationen. Über epigenetische Veränderungen kommt es zu weiteren Modifikationen der „Kombinatorik“. Desweiteren wird „die genetische Diversivität ... durch die genetische Instabilität und durch epigenetische Alterationen vergrößert“ (Tannapfel, 2010).

Um in diesem stochastischen Prozess etwas Orientierung zu erhalten, wird konkret zwischen frühen und späten Ereignissen während der Karzinogenese unterschieden. Die Mutationen im KRAS-Proto-Onkogen werden zu den frühen Ereignissen gezählt (Pretlow et al., 1993; Smith et al., 1994; Yamashita et al., 1995) ebenso die Inaktivierung beider Allele des APC-Gens (Nagase et al., 1993). Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 stellen eher ein spätes Ereignis in der Karzinogenese dar (Fearon and Vogelstein, 1990).

Die Folgen der Akkumulation genetischer und chromosomaler Veränderungen in Onkogenen wie KRAS und Tumorsuppressorgenen wie APC, DCC und p53 führen zu einer Aneuploidie und chromosomalen Instabilität. Dies begründet, weshalb die Adenom-Karzinom-Sequenz auch als CIN (chromosomal instability) Bezeichnung findet. Eine CIN findet sich bei 65% - 70% der sporadischen kolorektalen Karzinome (Lengauer et al., 1998).

1.2.2.2 Microsatellite instability (MSI) - pathway

Der MSI-pathway unterscheidet sich grundlegend vom CIN-pathway.

Hierbei kommt es aufgrund einer somatischen Mutation in Mismatch-Reparaturgenen zu einer fehlerhaften DNA-Replikation im Bereich der Microsatellitenloci. Mutationen in einem der 3 Haupt-Mismatch-Reparaturgene (MLH1, MSH2 und MSH6) führen zu einem Defekt der entsprechenden Proteine und zur Begünstigung weiterer Mutationen, wie z.B. im KRAS-Gen oder APC-Gen. Zusätzlich sind ebenso die oben genannten genetischen Veränderungen des CIN-pathways aktiv.

Dieser Weg steht bei sporadischen Kolonkarzinomen mit bis zu 16% nicht im Vordergrund. Dagegen kommt er zum größten Teil bei HNPCC-Tumoren mit ca. 86% vor (Aaltonen et al., 1994; Gryfe et al., 1997).

1.2.2.3 Serrated pathway

Bereits 1990 wurde von Longacre und Fenoglio-Preiser der Begriff des „serratierten Adenoms“ eingeführt (Longacre and Fenoglio-Preiser, 1990) und zwar für erhabene Läsionen, welche eine serrative (sägeblattartige, gezahnte) Kryptenmorphologie zeigen, dabei aber auch durch eindeutige neoplastische zytologische Veränderungen gekennzeichnet sind. Sessile serrative Adenome (SSA) stellen eine neue Polypenentität im Kolorektum dar, welche von hyperplastischen Polypen wie auch von traditionellen serratierten Adenomen unterschieden werden müssen (Noffsinger, 2009).

Serrative Adenome entstehen meist im rechten Hemikolon und betreffen häufiger ältere Patienten mit einem Geschlechterverhältnis von ca. 2:1 (w:m) (Tuppurainen et al., 2005).

Frauen sind für diese Form der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms prädisponiert. Als Grund dafür wird die Reduktion des Östrogen- und Folatspiegels nach der Menopause angenommen (Mäkinen, 2007).

Diese SSA sind für 10% - 20% aller kolorektalen Karzinome verantwortlich. Vermutet wird auch, dass dieser Karzinogeneseweg schneller abläuft als die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz (CIN).

Beim serrated pathway spricht man auch von epigenetischer Instabilität.

Die primäre Schlüsselmutation liegt im BRAF-Gen. Es kommt dabei zu Störungen der Apoptose der Kryptenepithelien, daraufhin zur epigenetischen Promotor(CpG)-Methylierung und aufeinander folgenden Genausfällen und schließlich zur Entwicklung einer meist hohen Mikrosatelliteninstabilität (Tannapfel et al., 2010).

1.2.3 Der prädiktive Biomarker im MAP-Kinase-pathway

Trotz des enormen Wissenstandes und der Bedeutung der Onkogene steht daher für das kolorektale Karzinom nur ein einziger prädiktiver Biomarker zur Verfügung: KRAS.

KRAS ist eines der ersten Onkogene, die entdeckt wurden. Angeborene KRAS-Mutationen werden beim Noonan-Syndrom und bei Kardio-fazio-kutanen Syndromen gefunden, wohingegen erworbene KRAS-Mutationen in Leukämien, kolorektalen Karzinomen und auch bei Pankreaskarzinomen häufig sind (Tannapfel et al., 2010). Darüberhinaus werden diese auch in einer Vielzahl von weiteren humanen Krebsarten, insbesondere der Lunge, des Endometriums, des Gallengangs sowie der Ovarien gefunden (Riely and Ladanyi, 2008; Schubbert et al., 2007).

Das KRAS-Protein spielt eine entscheidende Rolle in der MAP-Kinase-Kaskade ausgehend vom EGF-Rezeptor. (s. Abb. 5)

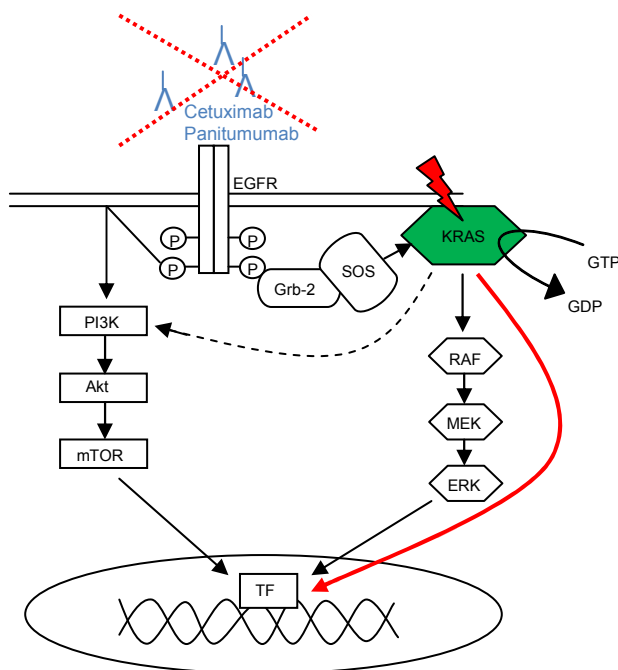


Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-abhängigen Signaltransduktion.

Mittels liganden-induzierter Dimerisierung wird der EGFR über Autophosphorylierung aktiviert. Über die Adaptorproteine Grb-2, SOS und KRAS folgt die Initiierung des MAP-Kinase-pathways. Das G-Protein-gekoppelte KRAS besitzt zusätzlich die Fähigkeit über Aktivierung von PI3K den PI3K/Akt/mTOR-Pathway zu aktivieren. Dieser stellt einen zweiten Haupt-signalweg ausgehend von EGFR dar. Ein mutiertes KRAS-Gen (⚡) zieht eine konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-pathways unterhalb des EGFR nach sich, die sich durch Anti-EGFR-Wirkstoffe (Cetuximab, Panitumumab) nicht modifizieren lässt.

Legende:

EGFR: epidermal-growth-factor receptor),
 P: Phosphorsäurerest; Grb-2: growth factor receptor-bound protein 2; SOS: son-of-sevenless;
 KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene;
 GTP/GDP: Guanosin-di/-triphosphat;
 RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma;
 MEK: mitogen activated ERK activating kinase;
 ERK: extracellular-signal regulated kinase;
 PI3K Phosphatidylinositol-3-kinase; Akt: Protein-kinase B; mTOR: mammalian target of rapamycin;
 TF: transcription factor.

1.2.3.1 EGF-Rezeptor (EGFR)

Der EGF-Rezeptor (EGFR, ErbB-1, HER-1) ist ein Transmembranprotein, das zur Familie der Tyrosinkinase-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren gehört. Die EGFR-abhängige Signaltransduktion in Richtung Zellkern reguliert Prozesse wie Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese und Apoptose.

Der EGFR stellt das Bindeglied zwischen dem extrazellulären Raum und der intrazellulären Signaltransduktion dar. Aufgebaut ist er aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer lipophilen Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne mit Thyrosinkinaseaktivität (Schlessinger, 1986). Durch einen extrazellulären Liganden, wie z.B. EGF, TGF- α oder auch Amphiregulin und Epiregulin, kommt es zur Aktivierung durch entweder eine Homodimerisierung zwischen identischen Rezeptoren oder eine Heterodimerisierung zwischen zwei unterschiedlichen Mitgliedern der Rezeptorfamilie (Lemmon and Schlessinger, 1994). Daraus resultiert eine Autophosphorylierung der Rezeptorthyrosinkinase, wodurch verschiedene Signalkaskaden initialisiert werden. In einer dieser Kaskaden (s. Abb. 5) spielt das KRAS-Protein eine entscheidende Rolle.

1.2.3.2 KRAS

KRAS gehört der ras (rat sarkoma)-Proto-Onkogenfamilie an. Diese besteht aus kleinen GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) mit einem molekularen Gewicht von 21kDa. Derzeit sind 3 verschiedene RAS-Proteine, mit ihrerseits gewebespezifischer Expression, bekannt:

- ➔ HRAS (Harvey-RAS)
- ➔ KRAS (Kirsten-RAS)
- ➔ NRAS (Neuroblastoma-RAS)

Das KRAS-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p11.22) und ist ein orthologes (ähnliches) Onkogen zum transformierenden Gen, das 1967 aus dem Kirsten

Rat Sarcoma Virus das erste Mal isoliert wurde (Kirsten et Mayer, 1967). Das KRAS-Protein befindet sich auf der Innenseite der Plasmamembran, besitzt GTPase-Aktivität (Khosravi-Far et al., 1994) und agiert als An/Aus-Schalter der Signaltransduktion in den Zellkern (Adjei and Hidalgo, 2005). Seine Aktivierung ist der Phosphorylierung der EGF-Thyrosinkinase nachgeschaltet und wird durch SOS bewerkstelligt, welches das GTP-bindende Protein KRAS in seine aktive Form überführt. Das Signal wird im Weiteren über Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), MEK (mitogen activated ERK activating Kinase) und ERK (extracellular-signal-regulated Kinase) weitergeleitet und führt schließlich zur Transkription von Genen im Zellkern mittels Transkriptionsfaktoren wie c-jun, c-myc und c-fos (Adjei and Hidalgo, 2005; Schubbert et al., 2007). Über KRAS ist der MAP-Kinase-pathway eng mit dem PI3K/Akt/mTOR-pathway vernetzt, da KRAS im Stande ist p110, eine katalytischen Untereinheit von PI3K, zu aktivieren (Gupta et al., 2007). (s. Abb. 5)

Ein mutiertes KRAS-Gen zieht eine konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-pathways unterhalb des EGFR-Rezeptors nach sich (unabhängig von der Fixierung des Liganden an seinen Rezeptor), die sich durch Anti-EGFR-Wirkstoffe nicht modifizieren lässt. Die Folge ist eine Daueraktivierung des Signalwegs in den Zellkern, wodurch die physiologischen Vorgänge in übermäßigem Grad gesteigert werden und eine maligne Entartung bzw. dessen Progression herbeiführt wird. Die eigenständige Inaktivierung des KRAS-Proteins kommt hierbei nicht mehr zustande.

Der KRAS-Mutationsstatus entscheidet somit darüber, ob ein Patient für eine Anti-EGFR-Therapie (Target-Therapie) in Frage kommt. Liegt das KRAS-Gen also im Wildtyp vor, kann mittels Anti-EGFR-Wirkstoffen von extrazellulär eingegriffen und reguliert werden.

Bei etwa 70% der Tumoren kann auch eine EGFR-Überexpression nachgewiesen werden (Nicholson et al., 2001). Der Grad der Expression korreliert aber nicht mit der Effektivität der Anti-EGFR-Therapie (Cunningham et al., 2004; Saltz et al., 2004). Damit ist ein immunhistochemischer Nachweis von EGFR auf den Tumorzellen vor Beginn der Anti-EGFR-Therapie nicht notwendig.

Onkogene-KRAS-Mutationen werden bei ca. 40% der sporadischen kolorektalen Karzinome gefunden (Bos et al., 1987, Boughdady et al., 1992), welche 80% aller

kolorektalen Karzinome ausmachen (Nagy et al., 2004). Eine Punktmutation des KRAS-Gens findet man zu >95% in Codon 12 und 13 des Exon 2 (Bazan et al., 2005), weit weniger häufig in den Codon 61 und 146, deren prädiktiver Effekt in der Routinetestung noch keine Verwendung findet (Loupakis et al., 2009b).

1.2.4 Therapie

1.2.4.1 Stellenwert der Chemotherapie

Die Lebenserwartung von Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom lag früher bei alleiniger Supportivtherapie im Median bei nur 6 Monaten. Durch die Einführung von palliativen Chemotherapiestrategien in Mono- und später auch Kombinationstherapien, sowie der Entwicklung neuer zielgerichteter (targeted) Substanzen, stieg diese auf 20–30 Monate an (Oechsle et al., 2006).

Die Relevanz der systemischen Chemotherapie bei Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom gilt heute als gesichert und wird damit durchweg empfohlen. Eine Chemotherapie bedeutet im Vergleich zu „Best Supportiv Care“ Überlebenszeitverlängerung, Verringerung tumorbedingter Symptome sowie Lebensqualitätsverbesserung (Scheithauer et al., 1993). Dieser Nutzen gilt auch für ältere Patienten (Köhne et al., 2001; Sargent et al., 2001).

Eine adjuvante Chemotherapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom hat das konkrete Ziel, disseminierte Tumorzellen zu eliminieren und damit das Langzeitüberleben, im speziellen das progressionsfreie Überleben, des Patienten zu verbessern. Der Nutzen dieser Therapie wurde 1990 auf 5-FU-Basis erstmalig durch die Intergroup-Studie INT-0035 belegt (Moertel et al., 1990). Gezeigt wurde, dass im Stadium III des kolorektalen Karzinoms die Einnahme von 5-FU/Levamisol über 12 Monate die Rezidivrate um 40% und die Mortalität um 33% signifikant gegenüber der nicht behandelten Kontrollgruppe gesenkt hat. 5-FU/Levamisol wurde damals damit zum Standard in der adjuvanten Therapie im Stadium III.

Inzwischen wurde dieser Standard mehrmals erneuert. 1998 wurde die Äquieffektivität von 6 monatigen gegenüber 12 monatigen Schemata belegt (O’Connell et al., 1998),

sodass die 6-monatige 5FU/FA Chemotherapie nach dem Mayo-Clinic-Schema, alternativ das NSABP-Schema, neu als Standard für das Stadium III galt.

2004 wurde basierend auf der MOSAIC-Studie der Standard erneut abgeändert - das FOLFOX-Schema etablierte sich. Durch die Kombination 5-FU/FA als 48h Dauerinfusionsschema nach De Gramont mit Oxaliplatin bei Patienten im Stadium II und III ergab eine Risikoreduktion um 23% gegenüber der alleinigen 5-FU-Therapie (Gill et al., 2004). Gleichermaßen etablierte sich das FOLFIRI-Schema, das anstelle von Oxaliplatin Irinotecan beinhaltet (Douillard et al., 2000).

Die XELOXA-Studie hat 2010 einen neuen Standard gesetzt. XELOX, die Kombination aus Capecitabin und Oxaliplatin, wurde zur adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms im Stadium III zugelassen. Capecitabin (Xeloda®) ist ein oraler Fluoropyrimidin-basierter Prodrug, wodurch eine Portimplantation eingespart werden kann.

Das chemotherapeutische Vorgehen bei Fernmetastasierung (Stadium IV) basiert auf den gleichen Chemotherapeutika sowie Schemata, die im Stadium III genutzt werden. Die zur Verfügung stehenden Medikamente sind damit folgende: 5-Fluoruracil/Folinsäure, Capecitabin, Oxaliplatin und Irinotecan. Inzwischen werden diese in Mono- und Kombinationstherapien in Verbindung mit molekularen Therapeutika (Antikörpern) (s. Kapitel 4.3.4.2) erfolgreich angewandt.

1.2.4.2 Antikörpertherapie (Target-Therapie)

Aufgrund der oben beschriebenen Funktionen des EGF-Rezeptors wurden verschiedene therapeutische Angriffspunkte festgelegt und spezifische Medikamente für eine zielgenaue Therapie (Target Therapie) konzipiert. Somit sind derzeit zwei monoklonale Anti-EGFR-Antikörper in Deutschland zugelassen - Cetuximab sowie Panitumumab. Cetuximab ist ein rekombinanter, monoklonaler chimärer Maus/Mensch-Antikörper (IgG1), der eine antikörperabhängige zellulär vermittelte Zelltoxizität zu induzieren

vermag. Panitumumab ist dagegen ein rekombinanter humaner IgG2-Antikörper ohne antikörperabhängige Zelltoxizität.

Beide sind gegen die extrazelluläre ligandenbindende Domäne des EGFR gerichtet (s. Abb. 5), wodurch die liganden-induzierte Autophosphorylierung und Aktivierung von EGFR verhindert wird (Gill et al., 1984). Diese kompetitive Bindung führt zur Endozytose des Antikörper-Rezeptor-Komplexes, wodurch der Signalweg, ausgehend von EGFR, unterbrochen wird (Fan et al., 1994).

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass die Antikörper nur dann ihre Wirksamkeit entfalten können, wenn der EGFR intakt ist und die nachfolgenden Signalwege regulierbar sind.

Einen weiteren zugelassenen Antikörper in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms stellt Bevacizumab dar. Im Gegensatz zu Cetuximab und Panitumumab bindet dieser rekombinante, humanisierte IgG1-Antikörper an den zirkulierenden Faktor VEGF, wodurch er auch bei Patienten Wirkung zeigen kann (Antiangiogenese), bei denen KRAS mutiert ist (Hurwitz et al., 2009).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Der einzige derzeit (seit Januar 2008) etablierte hoch signifikante, negative prädiktive Biomarker für das metastasierte kolorektale Karzinom stellt KRAS dar. Ein mutiertes KRAS-Gen spricht für ein fehlendes Ansprechen einer Therapie mit monoklonalen Anti-EGFR-Antikörpern. Dies wurde inzwischen in zahlreichen Studien für Panitumumab (Vectibix®) (Amado et al., 2008) sowie für Cetuximab (Erbix®) (Van Cutsem et al., 2009) und auch für Mono- und Kombinationstherapien gezeigt.

Folge dieser eindeutigen Ergebnisse ist, dass nun alle Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom auf die KRAS-Mutation getestet werden.

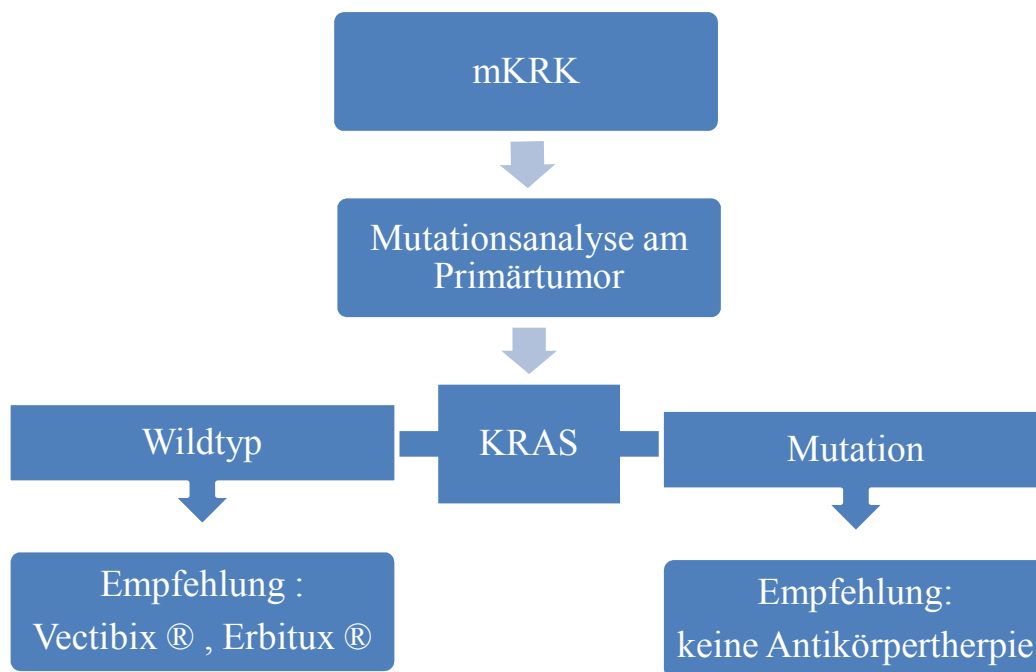


Abb. 6: Flussdiagramm laut Leitlinie zur KRAS-Mutationsanalyse beim metastasierten kolorektalen Karzinom (ASCO)

Legende: mKRK: metastasiertes kolorektales Karzinom;
KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene;
Vectibix®: Panitumumab; Erbitux®: Cetuximab

Nach bisherigem Kenntnisstand wird der Mutationsstatus des Primärtumors als Goldstandard für die Therapie angesehen. Beim Nachweis eines Wildtyps wird die Empfehlung für eine Therapie mit Vectibix® oder Erbitux® ausgesprochen, andernfalls wird bei vorhandener Mutation diese nicht empfohlen (s. Abb. 6). Dies bedeutet eine wichtige Weichenstellung für die weitere Therapie, wobei interindividuelle Unterschiede im Ansprechen nicht ausgeschlossen werden können. Auch wird durch diese Analyse kein uneingeschränktes Ansprechen in der selektierten Gruppe erzielt, sondern lediglich eine erhöhte Responserate.

Die Verwendung von Cetuximab und Panitumumab bei Vorliegen einer KRAS-Mutation erhöht das Risiko für Nebenwirkungen. Ebenso entstehen hierdurch unnötige Kosten, die keinen objektivierbaren Nutzen bieten. Das permanent „angeschaltete“ KRAS-Protein kann durch die inhibitorische Antikörpertherapie nicht beeinflusst werden, so dass der Tumor weiterwachsen, sich ausbreiten und metastasieren kann.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die KRAS-Mutation beim Dickdarmkarzinom ein frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt, wobei die Mutation auch in metastatischen Absiedelungen beibehalten wird (Riely et Ladany, 2008). Die Übereinstimmung des Mutationsstatus (Konkordanzgrad) zwischen Primärtumor und Metastasen liegt laut vieler Studien über 90%.

Bei den restlichen Patienten kommt es jedoch vor, dass im Primärtumormaterial und im Metastasenmaterial ein unterschiedlicher KRAS-Mutationsstatus vorliegt. Diese sogenannten Diskordanzen werden in vielen Studien mit einem geringen Prozentsatz erwähnt, aber in der weiteren Betrachtung vernachlässigt. Es gibt jedoch auch Arbeiten, die einen Diskordanzanteil von bis zu 44% zeigen (Velho et al., 2009).

Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung ist es, diesen Anteil an Diskordanzen an einem Kollektiv von 60 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zu analysieren. Ebenso soll die Bedeutung der modernen Pathologie in der Ära der personalisierten Medizin in Bezug auf das kolorektale Karzinom untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund stellen sich für das kolorektale Karzinom folgende Fragen:

1. Beeinflussen die Diskordanzen im Mutationstatus den Krankheitsverlauf der Patienten (Follow-up) sowie das Therapieansprechen ?
2. Hat das Wissen über einen diskordanten Mutationstatus Konsequenzen für die Therapie ? Ist eine Modulation des therapeutischen Imperativs notwendig?
3. Bietet die momentane prädiktive Diagnostik eine 100%ige Aussagekraft für das Ansprechen der Therapie ?

2. Patienten, Materialien & Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsgut

Das 60 Personen umfassende Kollektiv (21 Frauen, 39 Männer, Durchschnittsalter bei ED 63,33 Jahre) setzt sich zusammen aus Patienten, deren Tumormaterial am Institut für Pathologie des Klinikums Stuttgart bereits aus diagnostischen Gründen molekularpathologisch bezüglich des KRAS-Mutationsstatus untersucht worden war. Das Untersuchungsgut war interindividuell unterschiedlich. Pro Patient wurden mindestens zwei unterschiedliche Präparate auf die Mutationen hin getestet. Mögliche Präparate waren: Primärtumor, Rezidiv, Adenom (LGIN, HGIN), Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen.

Einsender waren sowohl die chirurgische Abteilung des hiesigen Klinikums selbst, als auch ambulante Ärzte. Die Originalpräparate entstammen den Jahren 1996 bis 2009. Die Primäroperation fand bei 46 Patienten (=76,7%) am Klinikum Stuttgart statt, die restlichen 14 Patienten (=23,3%) wurden an externen Krankenhäusern operiert. Die Durchführung der adjuvanten Therapie erfolgte bei 43 Patienten (=71,7%) am Klinikum Stuttgart und bei 11 Patienten (=18,3%) an externen Kliniken. Die restlichen 6 Patienten (=10%) wurden ambulant in onkologischen Schwerpunktpraxen entsprechend behandelt.

Für die retrospektive Analyse wurden diejenigen Patienten eingeschlossen, die ein metastasiertes kolorektales Karzinom aufwiesen, am Primärtumor bereits operiert wurden und adjuvant Chemotherapie erhielten. Zusätzlich mussten Follow-up-Daten bis zum Stichtag 01.07.2010 oder dem zuvor eingetretenen Tod des Patienten vorhanden sein.

2.2 Materialien

Alle Geräte inkl. Software, Chemikalien, Puffer oder Enzyme, die zur Durchführung Verwendung fanden, sind in Tabelle 2 inkrementell zum späteren Vorgehen aufgelistet.

Tabelle 2: Geräte & Software, Chemikalien, Puffer, Enzyme
(DE: Deutschland; FI: Finnland; PET: Polyethylenterephthalat)

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller, Ort, Land
Mikrotom	Histologie	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Membranobjektträger (PET), MembraneSlide	Histologie	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Xylol <i>Bestellnummer: 28975.291</i>	Histologie	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol absolut <i>Bestellnummer: 100983</i>	Histologie, DNA-Isolation	Merck GmbH, Darmstadt, DE
Hämatoxylin nach Mayer (11) <i>Bestellnummer : MHS32</i>	Histologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
NH ₃ (Ammoniak)	Histologie	hauseigene Herstellung, Klinikum Stuttgart, DE
Eosin Y <i>Bestellnummer: HT110332</i>	Histologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Aqua destillata	Histologie, PCR	hauseigene Herstellung, Klinikum Stuttgart, DE
Lichtmikroskop	Histologie	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Digitalkamera	Histologie	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Leica LMD6500	LMD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Software Version 6.3	LMD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
OptiCap (200µl)	LMD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
BioSprint15 DNA Blood Kit (360) <i>Bestellnummer: 940017</i>	DNA-Isolation	Qiagen GmbH, Hilden, DE

Buffer ATL (200ml) <i>Bestellnummer: 19076</i>	DNA-Isolation	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Qiagen ® Proteinkinase K (2ml) <i>Bestellnummer: 19131</i>	DNA-Isolation	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Vortexer	DNA-Isolation	LTF Labortechnik, Wangen, DE
KingFisher mL	DNA-Isolation	Thermo Fisher Scientific, Helsinki, FI
Mikrozentrifuge	DNA-Isolation	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikrozentrifugen Tubes 1,5ml	DNA-Isolation	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf ® Thermomixer Compact	DNA-Isolation	Eppendorf, Hamburg, DE
PCR-Tubes	PCR	Eppendorf, Hamburg, DE
Buffer (10x, incl. 20mM MgCl ₂) <i>Bestellnummer: 12161494103</i>	PCR	Roche, Mannheim, DE
dNTP Mix (10mM) <i>Bestellnummer: 18427088</i>	PCR	Invitrogen GmbH, Darmstadt, DE
Taq-Polymerase (5U/µl) <i>Bestellnummer.:201203</i>	PCR	Qiagen, Hilden, DE
CAS 1200	PCR	Corbett Research, Australia jetzt Qiagen, Hilden, DE
Thermocycler	PCR	Analytik Jena AG, Jena, DE
K-RAS ^{SNP} 1.4 LCD Array Kit, 12Chips/ 96 Tests <i>Bestellnummer: SN-300-06</i>	Microarray	Chipron GmbH, Berlin, DE
Inkubationswasserbad	Mikroarray	GFL Gesellschaft für Labor-technik mbH, Burgwedel, DE
CHIP ^{SPIN} FVL2400N	Microarray	Chipron GmbH, Berlin, DE
Detektion Kit (Modulator, STAIN, Dilution Buffer, Hybridization Buffer B, LABEL) <i>Bestellnummer: Z-100-01</i>	Microarray	Chipron GmbH, Berlin, DE
CHIP-Scanner PF2700	Auswertung	Chipron GmbH, Berlin, DE
SlideReader Software Vers. 9.01	Auswertung	Chipron GmbH, Berlin, DE
PyroMark Q24, incl. Software	Pyrosequenzierung	Qiagen GmbH, Hilden, DE

2.3 Methoden

2.3.1 Follow-up-Datenerhebung

Die Erhebung der Follow-up-Daten, d.h. die Erfassung des postoperativen Verlaufs der Erkrankung mit adjuvanter Chemotherapie, erfolgte über verschiedene Wege. Das Zusammentragen dieser Daten war durch den jüngsten Entlassungsbrief am geeignetsten möglich. Dieser beinhaltete den chronologischen Verlauf der postoperativen Therapiemethoden inklusive durchgeführter adjuvanter Chemotherapie. Nur bei denjenigen Patienten, die zum aktuellen Zeitpunkt der Abfrage am Klinikum Stuttgart behandelt wurden, konnte mithilfe Ihrer Originalakte bzw. des digitalen Programmes „HYD media“ im Archiv dieser Entlassungsbrief eingesehen werden.

Alle übrigen Patienten, über deren postoperativen Verlauf im Klinikum Stuttgart keine aktuellen Daten vorlagen, waren über ihren Hausarzt auffindbar. Daten über die behandelnden Hausärzte waren am OSP Stuttgart e.V. (Onkologische Schwerpunkt Zentrum Stuttgart) durch das zentrale EDV-gestützte Tumordokumentations- und Informationssystem einsehbar, so dass diese postalisch angeschrieben werden konnten. Mittels eines selbst erstellten Formulars und der zusätzlichen Bitte, den jüngsten zur Verfügung stehenden Entlassungsbrief ihres Patienten der Rücksendung beizulegen, konnten zu allen 60 Patienten die notwendigen Follow-up-Daten erhoben werden. Der Abfragestichtag war der 01.07.2010.

Das Formular befindet sich im Anhang (s. S. 134). Bei fehlendem Entlassungsbrief sollten wenigstens Eckpunktfragen (Ort der Primäroperation, Therapieabbruch, Therapieunterbrechung, Remissionsgrad, sekundäre Operationen, Tod) abklärt werden.

Die Überlebenszeit stellt einen der solidesten und langfristigen Parameter dar. Um allerdings möglichst zügig eine Erfolgskontrolle der Therapie zu erhalten, sind schneller zu evaluierende Parameter notwendig.

Um das Tumoransprechen und damit einen Therapieerfolg oder -misserfolg objektiv und quantitativ beurteilen zu können, fanden die RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) - Kriterien bzw. - Kategorien Anwendung.

Die ursprünglich publizierten Kriterien (Therasse et al, 2000) sind inzwischen verfeinert, vereinfacht und um neue Untersuchungsmethoden erweitert worden (Eisenhauer et al, 2009). Diese Kriterien umfassen aber weiterhin 5 mögliche Kategorien für die Klassifikation des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren. Diese sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Fünf Kategorien des Therapieansprechens nach RECIST

CR	complete remission	alle Läsionen sind verschwunden
PR	partial remission	min. 30% Reduktion der Läsionen
SD	stable disease	weder PR noch PD
PD	progressive disease,	min. 20% Größenzunahme der Läsionen
NE	Non evaluable, Non-CR/Non-PD	nicht evaluierbar

Es wird unterschieden zwischen einer partiellen (PR) und einer kompletten Remission (CR), sowie einer stabilen Erkrankung (SD) und einem Progress (PD). Sind nicht auswertbare Daten vorhanden, werden diese unter nicht-evaluierbar (NE) aufgeführt. Diese 5 Outcome-Möglichkeiten waren für den Onkologen als Ergebnis der jeweiligen Staginguntersuchung ein entscheidendes Kriterium im Hinblick auf die Applikation der adjuvanten Chemotherapie. Ebenso dienten diese RECIST-Kategorien der aktuellen Untersuchung, da mittels dieser die Evaluierung des progressionsfreien Überlebens vorgenommen wurde. Ebenso wurde das beste Gesamtansprechen (best overall response) hiermit ermittelt.

2.3.2 Datenbankerstellung

Über Microsoft Office Access 2007 wurde eine relationale Datenbank angelegt. Diese umfasste alle Daten der Patienten in systematischem Aufbau. Folgende Struktur wurde hierbei erstellt (s. Abb. 7):

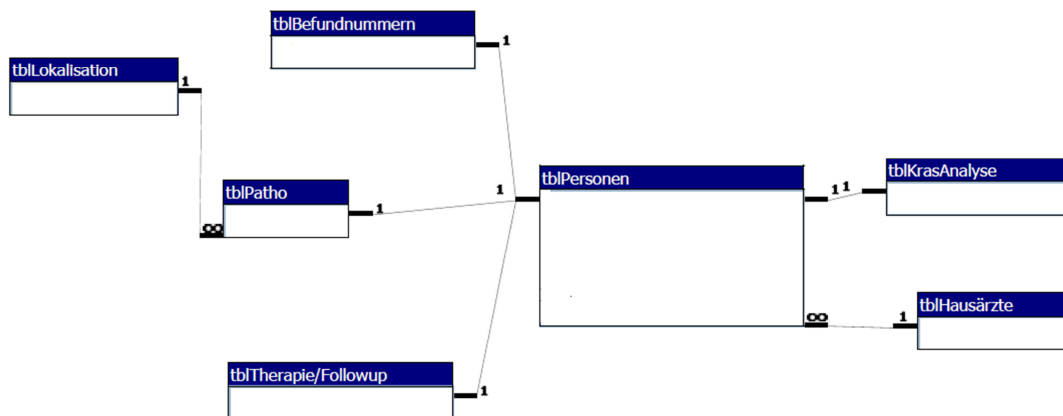


Abb. 7: Beziehungen in Access
Legende: tbl.: Tabelle

Diese Datenbank ermöglichte anschließend konkrete Abfragen einzelner Kriterien von speziellen oder auch allen Patienten, insbesondere jedoch die Abfrage vernetzter Kriterien innerhalb des Patientenkollektivs zum differenzierten Vergleich mittels SQL-Abfragen (Structured Query Language).

2.3.3 Probenvorbereitung

2.3.3.1 Histologie

Fixierung und Entparaffinierung:

Ausnahmslos wurden FFPE(formalin-fixed paraffin-embedded)-Präparate verwendet. Diese waren in 4% gepuffertem Formalin für 24h fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet worden. Anschließend wurden je nach Größe des Tumorareals 5-10µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, die über die Entparaffinierung der DNA-Isolation zugeführt wurden.

Bei extrem geringem Tumoranteil wurde die Lasermikrodissektion genutzt. Hierfür mussten Schnitte von bis zu 20µm erzeugt und auf PET(Polyethylenterephthalat)-beschichtete Objektträger aufgezogen werden. Zwar konnte bei derart dicken Schnitten kaum eine Aussage über die Morphologie gemacht werden, jedoch lag der Vorteil darin, dass umso mehr Tumorzellen pro Fläche vorhanden waren.

Zur histologischen Beurteilung wurden zudem zusätzlich 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt und anschließend gemeinsam mit Prof. Dr. med. A. Bosse (Institut für Pathologie, Klinikum Stuttgart) hinsichtlich der TN-Klassifikation, des Gradings sowie nach histomorphologischen Aspekten gesichtet und beurteilt.

Entparaffinierung, sofern notwendig:

- 1.) Xylol für 3x20 Sek.
- 2.) Ethanol 100% für 2x30 Sek.
- 3.) Ethanol 95% für 2x30 Sek.
- 4.) Spülen mit Aqua destillata für 30 Sek.

Färbung nach folgendem HE-Protokoll:

- 1.) Hämatoxylin nach Mayer für 1 Min
- 2.) Spülen mit Aqua destillata für 30 Sek.
- 3.) in Ammoniumhydroxid bläuen für 30 Sek.
(NH₃ 1:500 mit Aqua destillata verdünnt)

- 4.) in Eosin färben für 10 Sek.
- 5.) Ethanol 70% für 2x30 Sek.
- 6.) Ethanol 96% für 1x30 Sek.
- 7.) Ethanol 100% für 1x30 Sek.
- 8.) 10-15 Min. an der Luft trocknen lassen

2.3.3.2 Lasermikrodissektion (LMD)

Für die kontaminationsfreie und schnelle Isolierung von einzelnen Tumorzellarealen wurde die Lasermikrodissektion unter Verwendung des „Leica LMD 6500“ angewendet. Das Gerät umfasst ein Mikroskop, einen Probentisch sowie einen Laser. Zusätzlich verfügt es über eine Steuerungssoftware, mit welcher der Molekularpathologe das entsprechende Tumoreal markieren und durch den Laser exakt ausschneiden kann.

Ein kohärenter gepulster Diodenlaserstrahl (355nm, 80Hz, >4ns, 50µJ) wurde über ein Objektiv auf das Gewebe (HE gefärbter Schnitt) fokussiert. Mehrere hintereinander gereihete Pulse erzeugten Schnittlinien. Multicut war möglich. Benachbartes Gewebe wurde weder erhitzt noch geschädigt, da das Gewebematerial der Schnittlinie per plasmainduzierter Ablation verdampfte. Die Präzision des Schnittes war objektivabhängig. Auf diese Weise konnten die Tumorzellen von einem hohen Anteil Stroma, Entzündungszellen, sowie Nekrosen mit einem hohen Maß an Reinheit abgetrennt werden, wodurch eine Steigerung der Sensitivität der Downstream-Analyse ermöglicht wurde. Die ausgeschnittenen Bereiche fielen nach der Exzision zusammen mit der Trägermembran (PET = Polyethylenterephthalat) aufgrund der Schwerkraft in den Cup eines Eppendorf-Tubes (OptiCap) und standen für die anschließende DNA-Extraktion, Amplifikation und Analyse zur Verfügung.

D.h. mittels Separation der Tumorzellen war es möglich, eine hohe Tumor-DNA-Ausbeute zu erzielen, die Probe nur minimal zu schädigen, sowie das Dissektat kontaminationsfrei zu sammeln.

2.3.3.3 DNA-Isolation

Im folgenden Schritt wurde die genomische DNA mittels „Magnetic Beads“ Technologie mit dem „KingFisher mL“ isoliert.

Herstellung des Lysats :

Es wurden in den Cup-Deckel des noch offenen OptiCaps nach der LMD 20 µl ATL Puffer hinzugefügt, anschließend verschlossen und bei 10000 rcf für 10 Sekunden zentrifugiert. Bei ungenügendem Herauslösen von Geweberesten aus dem Deckel sowie ungenügender Auflösung konnte dieser Vorgang mit 20 µl ATL Puffer mehrmals wiederholt werden. Befanden sich alle Zellen in Lösung, so wurde der Tube mit ATL Puffer auf 180µl aufgefüllt. Als nächstes wurde zur Entfernung aller Proteine aus dem Präparat 20µl Proteinkinase K hinzugegeben. Bei 56°C und 500 rpm Agitation wurde ON inkubiert und anschließend nochmals für 10 Sekunden bei 10000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen neuen Eppendorf-Tube überführt, in welchem sich bereits 430 µl Master Mix befanden.

Master Mix:
 200 µl AL Puffer
 200µl Isopropanol
 30µl MagAttract Suspension G

Insgesamt wurden 5 Eppendorf-Tubes für den „KingFisher mL“ pro Gewebe bereitgestellt und im Anschluss das Programm BS15 DNA Tissue (Qiagen) gestartet.

Tube 1	630µl Lysat
Tube 2	700µl AW1 Puffer
Tube 3	500µl AW2 Puffer
Tube 4	500µl AW2 Puffer
Tube 5	100-200µl AE Puffer

Der Vorgang der biomagnetischen Separation, der durch den „KingFisher mL“ automatisiert wurde, ist folgender: Die DNA bindet an die „Magnetic Beads“ (MagAttrakt Suspension G). Der Magnetstab wird in das Lysat gesenkt, woraufhin die Beads am Magneten pelletieren. Beim Anheben des Magnetstabs bleiben die Beads inklusive DNA haften und werden bei Überführung des Magnetstabs in den AW1 Puffer mitgenommen. Dieser Transfer erfolgt weitere 2 Mal in AW2 Puffer, in denen die DNA zunehmend weiter gereinigt wird. Um die DNA zu guter Letzt von den „Magnetic Beads“ zu lösen, befindet sich in Tube 5 ein Elutionspuffer. Hierfür wird bei RT für 3 Min. inkubiert und anschließend werden die „Magnetic Beads“ aus dem Elutionspuffer entfernt.

2.3.4 Microarray

Für die Detektion von SNP's in Codon 12 und 13 wurde von der Firma Chipron der Array „K-RAS^{SNP} 1.4“ verwendet. Hiermit können 6 Punktmutationen in Codon 12 sowie 3 Punktmutationen in Codon 13 im KRAS-Gen nachgewiesen werden. Der Array ist damit spezifisch aber auch sensitiv, denn es können bei einem Wildtyp-Hintergrund weniger als 0,5% Mutationen nachgewiesen werden (Clamping PCR). Diese Methode der Detektion führt innerhalb von ca. 4 Stunden ohne jegliche Fluoreszenz zu Ergebnissen. Sie umfasst die Durchführung der PCR, das Array-Protokoll sowie die Analyse.

2.3.4.1 PCR-Amplifikation (LNA-Clamping)

Für die Amplifikation wurde ein Volumen von 3µl (min. 25ng/µl genomische DNA) des DNA-Isolates eingesetzt. Die Amplifikation wurde analog zum PCR-Protokoll des K-RAS SNP 1.4 Arrays durchgeführt:

1.) 22µl Master Mix in 4 PCR-Tubes

Master Mix (für 4 PCR-Tubes): (=110µl)

12,5µl	Buffer (10x, incl. 20mM MgCl ₂)
5,0µl	dNTP Mix (je 10mM)
5,0µl	Primer Mix k-ras (biotinyliert, mitgeliefert im Kit)
5,0µl	K-RAS WSC 0,1 oder WSC 0,5 oder H ₂ O (mitgeliefert im Kit)
1,5µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
81,0µl	H ₂ O

2.) 3µl DNA-Isolat hinzufügen

3.) PCR starten

Thermocycler-Programm:

5 Min.	- 94°C
45 Sek.	- 94°C
45 Sek.	- 60°C
45 Sek.	- 72°C
Schritt 2 - 4 wird 42x wiederholt	
3 Min.	- 72°C

Um geringste Spuren an mutierten KRAS-Sequenzen innerhalb eines homologen, umfassenden Wildtyphintergrundes zu detektieren, wurde die Amplifikation in Anwesenheit von Oligonukleotiden, versetzt mit Locked-Nucleid-Acids (LNA) (Koshkin et al, 1998), durchgeführt. LNAs sind modifizierte Nukleinsäuren, in welchen die Ribose vom 2' O-Atom zum 4'C-Atom mittels einer Methylengruppe überbrückt und damit in einer RNA-Konfiguration (3'endo-Konfiguration) fixiert wird (Obika et al, 1998). Diese Konfiguration hat zur Folge, dass jene Oligonukleotide eine signifikant höhere Affinität und damit höhere thermische Stabilität zur komplementären RNA besitzen als natürliche DNA (Koshkin et al, 1998).

Die erhöhte Affinität wird in diesem Fall genutzt, um bevorzugt die Amplifikation von selektiven Wildtypsequenzen zu unterdrücken und damit sequenzspezifisch KRAS-Mutationen in Codon 12 und 13 detektieren zu können (Huang et al, 2010).

Dies geschah mittels WSC (Wildtype Supressor Compound). Wildtypsequenzen, an denen WSC komplementär binden konnte, wurden durch die Polymerase schlechter amplifiziert als mutierte Sequenzen. Je höher die WSC-Konzentration gewählt wurde, desto stärker zeigte sich diese Unterdrückungsfähigkeit hinsichtlich der Wildtyp-Amplifikation (Huang et al., 2010). Verschiedene WSC-Konzentrationen, WSC 0,0; 0,1; 0,25; 0,5 und 0,75, fanden in diesem Fall Verwendung.

D.h. eine höchst selektive Amplifizierung war damit möglich, wodurch während der PCR hauptsächlich jene DNA-Sequenzen vervielfältigt wurden, die eine Punktmutation (mismatch) aufwiesen. In erster Linie wurde jede extrahierte genomische DNA sowohl ohne WSC wie auch mit WSC 0,1 angesetzt, d.h. 2 Arrays pro Person. WSC 0,5 fand nur Anwendung, wenn eine verstärkte Unterdrückung der Wildtypsequenzen von Nöten war. Zur Verifikation konnten ebenso WSC 0,25 und WSC 0,75 verwendet werden.

Die PCR-Reaktion erzeugte 171bp große Amplicons, die mit Biotin markiert waren. Diese amplifizierten Fragmente überspannten Codon 12 und 13 im Exon 1 des KRAS-Gens.

2.3.4.2 LCD Array Chip

Ein LCD Array Chip enthält 8 identische Arrays, die jeweils individuell für parallele Analysen genutzt werden können. Jeder Array besteht aus 7 x 7 Feldern mit einem Durchmesser von jeweils 300µm. Diese sind mit einem chemischen Trägermaterial beschichtet, auf das in einem spezifischen Muster DNA-Einzelstränge (Sonden) immobilisiert sind. Diese Sonden dienen als komplementäre Bindungspartner für die zu untersuchende, extrahierte, mit Biotin markierte DNA. Die Wildtyp- wie auch die mutationsspezifischen Sonden sind alle zur Absicherung vertikal in Duplikaten aufgespottet. In 3 Ecken des Arrays befinden sich sog. „Guidedots“. Diese stellen eine Hybridisierungskontrolle sowie eine Färbekontrolle dar. Ebenso besteht ihre Notwendigkeit darin, dass der Chip-Scanner diese als Orientierungspunkte für das Auswertungsgitter nutzt.

Insgesamt sind 27 Felder analog zum Auswertungsgitter in einem charakteristischen Muster gespottet (3 Kontrollen, 3x2 Wildtypsequenzen, 6x2 Mutationssequenzen in Codon 12, 3x2 Mutationssequenzen in Codon 13).

Jeweils 4 verschiedene Gewebe konnten pro Chip untersucht werden, da jedes Gewebe mit 2 unterschiedlichen WSC-Konzentrationen auf die Mutationen hin getestet und damit 2 Arrays benötigt wurden.

2.3.4.3 Hybridisierung, Labeling, Färbung, Detektion

Folgendes Verfahren wurde analog zum Protokoll des K-RAS SNP 1.4 Arrays durchgeführt.

Hybridisierung:

- 1.) Wasserbad auf 35°C einstellen
- 2.) 200µl Wasser in jede Ecke der Hybridisierungskammer pipettieren, um eine feuchte Kammer zu erhalten
- 3.) Chip in die Hybridisierungskammer setzen
- 4.) 25µl Hybridisierungs-Mix und 10µl PCR-Produkt gut mischen und in die Wells pipettieren

<p><u>Hybridisierungs-Mix (für 8 Arrays) :</u> 10µl Modulator 240µl Hybridization Buffer B</p>

- 5.) Feuchte Kammer schließen und Chip bei 35°C für 30 Min. inkubieren
- 6.) 3 Waschpufferküvetten mit 300ml WASH solution vorbereiten
- 7.) Chip für 10 Sek. In Küvette 1 und 2 hin und her bewegen
- 8.) Chip in die Küvette 3 transferieren, 1 Min. inkubieren.
- 9.) Chip in der Zentrifuge (CHIP SPIN FVL2400) für 15 Sek. bei 2400 rpm trocknen

Labeling:

- 10.) 30µl Labeling Mix in die Wells pipettieren

<p><u>Labeling Mix (für 8 Arrays):</u> 270µl Dilution Buffer 30µl Modulator 2µl LABEL</p>

- 11.) bei RT 5 Min. inkubieren
- 12.) Waschen und Trocknen, analog Schritt 6-9

Färbung:

- 13.) 30µl STAIN-Lösung (CAVE!: dunkel lagern) in jedes Well pipettieren und bei RT für 5 Min. inkubieren
- 14.) den Färbeprozess nach 3-5 Min. durch Spülen des Chips für 15 Sek. in der 3. Waschpufferküvette abstoppen
- 15.) trocknen, analog Schritt 9

Es wird in diesem Fall von einer "Reversen Hybridisierung" gesprochen. Dieses Prinzip basiert auf einer klassischen Hybridisierung der biotinylierten Amplicons an die immobilisierten Sonden, mit anschließender stringenter Waschung, so dass nur diejenigen Amplicons gebunden bleiben, die zu 100% komplementär sind. Nachfolgend wurde ein Enzymkomplex (LABEL), bestehend aus kovalent gebundenem Streptavidin (SA) und horseradish peroxidase (HRP), hinzugegeben. SA bindet an Biotin, während HRP Enzymaktivität besitzt und das im Anschluß zugefügte TMB (3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidin) (STAIN) als Substrat umsetzt. TMB wird in Anwesenheit von HRP tiefblau, präzipitiert und wird dadurch detektierbar.

Bei der Hybridisierung und beim Labeling wird ein Modulator genutzt. Dieser dient der pH-Stabilisierung und beinhaltet Kontroll-Oligonukleotide, die auf den Guidedots hybridisieren.

2.3.5 Auswertungsverfahren

Je nach Vorhandensein keiner, einer oder mehrerer Mutationen waren die entsprechenden Felder des Arrays gefärbt. Durch die blauen Präzipitate konnte aufgrund des bekannten Musters der aufgespotteten Sonden auf die Mutation zurückgeschlossen werden.

Optimale Aussagen über eine Mutation konnten dann erfolgen, wenn die Intensität der Mutationsfelder der der Wildtypfelder entsprach.

Die Auswertung bzw. die kritische Auseinandersetzung bezüglich des letztendlichen Mutationsstatus konnte mit der momentan im Einsatz befindlichen Software nicht automatisiert per Gerät ablaufen, sondern musste manuell, durch die langjährigen

Erfahrungen des Molekularpathologen (Dr. Wiedorn, Institut für Pathologie am Klinikum Stuttgart) erfolgen.

Erst mit einer neuen Softwareversion (V10.00.02), die Dr. Wiedorn in Zusammenarbeit mit der Firma Chipron etabliert, wird zukünftig eine weitgehend automatisierte Analyse möglich sein.

Die Chips wurden über den CHIP-Scanner PF2700 (Chipron) eingelesen und mittels Analysesoftware (SlideReader Vers. 9.01 / Chipron) digitalisiert. Die Software erstellte ein „Image“ mit unterschiedlichsten Graustufen, entsprechend der Farbintensität der Präzipitate auf dem Array. Grundbedingung für die Auswertbarkeit war, dass die Kontrollen bei jeder der drei möglichen WSC-Konzentrationen (0; 0,1, 0,5) farbintensiv waren.

Ein optimales Ergebnis war in Abhängigkeit vom prozentualen Mutationsanteil und der vorhandenen DNA-Menge bei unterschiedlichen WSC-Konzentrationen zu erhalten.

Zu hohe Hintergrundsignale mussten weiter unterdrückt werden, um keine Mutationen zu übersehen und damit Verfälschungen auszuschließen. Bei einem niedrigen Prozentsatz an Mutationen, bestand die Möglichkeit, dass erst bei WSC 0,5 ein optimales Darstellen der Mutation möglich war. Umgekehrt war bei hohem Prozentsatz bei WSC 0,1 das Optimum erreicht, da bei WSC 0,5 alle Wildtypsequenzen bereits unterdrückt worden wären.

Diese Beschreibung der richtigen WSC-Konzentration für ein genaues Ergebnis soll darlegen, dass die korrekte Interpretation bei leider häufig vorkommenden schwachen bzw. unklaren Intensitäten sehr schwierig ist und das Wissen über den Mutationsanteil bei Analyse unbekannt ist.

2.3.6 Pyrosequenzierung

2.3.6.1 Begründung der zusätzlichen Durchführung

Im Rahmen der Auswertung der Follow-up-Daten derjenigen Patienten, die zeitweilig mit einer Anti-EGFR-Therapie behandelt wurden, zeigte sich bei 11 von 19 Patienten trotz des Vorliegens eines KRAS-Wildtyps ein fehlendes Therapieansprechen auf die

Antikörpertherapie. Da der Wildtyp im KRAS-Gen (Codon 12&13) keine Ursache für den hohen Anteil an Nonrespondern darstellt (s. Diskussion, Kapitel 5.3.4), war es notwendig, nach Mutationen in anderer Lokalisation bzw. anderem Gen des MAP-Kinase-pathways zu suchen. Bei Detektion würde dies den Progress begründen.

Deshalb wurden weitere Mutationsanalysen bei jenen 11 Patienten durchgeführt. Dafür wurde die eingefrorene Rest-DNA der Microarrayanalyse für eine Pyrosequenzierung verwendet, mit dem Ziel der Klärung von Mutationen in Cod61 des KRAS-Gens und Cod600 des BRAF-Gens (V600E).

2.3.6.2 Prinzip der Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung gehört zu den High-Throughput-Technologien, wodurch sich DNA-Stränge innerhalb von ca. 5h sequenzieren lassen. Vier Enzyme (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase) sowie 2 Substrate (Adenosin 5' Phosphosulfat (APS) und Luziferin) sind Grundlage für diese Methode, wodurch eine Detektion von freiwerdendem Pyrophosphat ermöglicht wird (Nyrén, 1987; Ronaghi et al., 1996). dNTPs werden hintereinander zum einzelsträngigen Template mit gebundenem Primer hinzugefügt. Die DNA-Polymerase baut dNTPs in den DNA-Strang ein, wenn diese komplementär zur Base des Templates vorliegen und bewirkt so eine Elongation entlang des Template-DNA-Strangs. Das bei diesem Einbau frei werdende Pyrophosphat entsteht in äquimolaren Mengen zum eingefügten dNTP. Durch die ATP-Sulfurylase wird es mit APS zu ATP, welches anschließend mit Luziferin, katalysiert durch die Luziferase, zu Oxyluciferin umgewandelt wird. Die dabei erzeugte Lichtmenge ist proportional zur ATP-Menge. Über die Apyrase werden zusätzlich die nicht eingebauten dNTPs und auch ATP abgebaut. Anschließend wird das nächste Nukleotid hinzugefügt.

Die entstandene Lichtmenge wird gemessen, mit einer Software verarbeitet und danach durch ein Pyrogramm graphisch dargestellt.

2.3.7 Statistische Methoden

2.3.7.1 Erläuterungen

Grundsätzlich wurden die nachfolgend benannten statistischen Methoden als Trendunterstützung genutzt. Die Aussagekraft der Ergebnisse hatte aufgrund der geringen Fallzahlen der einzelnen Subgruppen keine statistisch korrekte numerische Aussagekraft. Problematisch zeigte sich in Bezug auf die Survivalanalyse, dass die Prognose des metastasierten kolorektalen Karzinoms über die Zeit nicht konstant blieb. Nicht zuletzt war dies auf die über die Jahre immer besser werdenden Therapiemaßnahmen und damit einer besseren Prognose zurückzuführen. Trotzdem konnte ein Trend mit Hilfe dieser Methoden anschaulich dargestellt werden.

Die Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Tabellen erfolgte mit Microsoft[®] Excel und dem dazugehörigen Statistik-Add-In WinSTAT[®] Version 2009.1.

2.3.7.2 Kaplan-Maier Methode

Diese auch als „Kaplan-Meier-Schätzer“ bezeichnete Methode wurde 1958 entwickelt (Kaplan und Meier, 1958). Es ist eine nicht-parametrische Schätzung, bei der zensierte individuelle Überlebenszeiten berücksichtigt werden. Die graphische Darstellung der Überlebenszeitkurve wird in Form einer absteigenden Treppenfunktion mit Stufen zu jedem Sterbezeitpunkt erstellt. Als zeitlicher Nullpunkt und damit Beginn der Überlebenszeitbetrachtung wurde der OP-Tag der Primäroperation festgelegt. Ende der individuellen Betrachtung war der Todestag bzw. bei noch lebenden Patienten der 01.07.2010. Somit umfasst die Überlebenszeitkurve die Zeitspanne des Follow-up der beobachteten Patienten.

Mithilfe dieser Analyse ließ sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der ein Ereignis (der Progress der Erkrankung (PD) nach Operation unter adjuvanter Therapie) zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt (progression-free survival - PFS) bzw. nach welcher Zeit ein bestimmter Anteil der betrachteten Patienten noch am Leben war (overall survival - OS).

2.3.7.3 Log-Rank-Test

Dieser auch unter dem Namen „Mantel-Haenszel-Schätzer“ bekannte Test wurde 1959 zum Vergleich von Häufigkeiten entwickelt (Mantel und Haenszel, 1959). Für Gruppenvergleiche ist es das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse. Er gibt Auskunft darüber, ob die beobachteten Unterschiede in den Überlebenszeitkurven statistisch signifikant sind. Als statistisch signifikant gelten p-Werte $< 0,05$. Es ist ein nicht-parametrisches Verfahren, dessen Name (Log-Rank-Test) daher rührt, dass er auf dem Logarithmus der Ränge der Daten basiert (Ziegler et al, 2007). In der folgenden Untersuchung wurde mit diesem Test beispielsweise überprüft, ob das Mortalitätsrisiko zwischen den Subgruppen Konkordanz/Diskordanz verschieden ist.

2.3.7.4 Exakter Test nach Fisher

Dieser Test geht auf Ronald Aylmer Fisher zurück. Es ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit, der auch bei einer geringen Fallzahl zuverlässige Resultate bietet. Grundlage für diesen Test sind Kontingenztafeln mit verschiedenen großen Matrices. Im vorliegenden Kollektiv wurden Zusammenhänge zwischen dem Konkordanz- und KRAS-Status mit weiteren Parametern durch diesen Test mittels manueller Berechnung untersucht.

2.3.7.5 T-Test (unverbunden)

Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, die Differenz von Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben der gleichen Variablen auf eine Signifikanz hin zu prüfen. Voraussetzung ist, dass die Variable intervallskaliert und normalverteilt sein muss. Dieser Test wird in der vorliegenden Untersuchung angewandt, um die durchschnittliche Therapieunterbrechung innerhalb der Subgruppen auf Signifikanz zu prüfen.

2.3.7.6 Cox-Regressionsanalyse

Mit dieser, auch als „proportionales Hazard Modell“ bezeichneten Methode, wird untersucht, ob bestimmte Variablen die Überlebenswahrscheinlichkeit oder das progressionsfreie Überleben des Patientenkollektivs (univariat bzw. multivariat) beeinflussen (Cox, 1972). Grund für die Anwendung dieser Analyse ist, dass Erkrankungen meist nicht nur von einem Parameter, sondern meist von einer Vielzahl von Faktoren parallel beeinflusst werden. Voraussetzung im Cox-Regressionsmodell ist die Proportionalität der Hazard Ratio, wodurch die Stärke des Zusammenhangs berechnet wird.

Verwendung findet diese Methode in der Survivalanalyse.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristik

Die retrospektive Untersuchung wurde an einer Stichprobe von n=60 Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom vorgenommen. Das Kollektiv unterteilt sich in 21 weibliche (=35%) und 39 männliche (=65%) Betroffene (s. Abb. 8), mit einem Alter bei Erstdiagnose zwischen 21 und 84 Jahren (MW 63,34 Jahre, STD 11,39 Jahre; s. Tabelle 4 und Abb. 9).

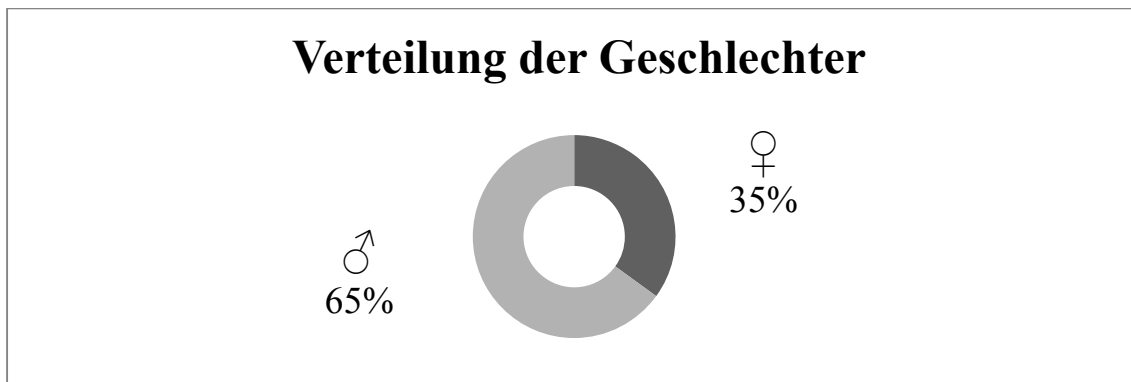


Abb. 8: Graphische Darstellung der Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs; Ringdiagramm (n=60)

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung des mittleren Patientenalters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n=60)
Legende: m: männlich; w: weiblich

	N	Mittelwert	Vertrauen (95%)	Standard-Fehler	Standard-Abweichung
m	39	64,89 Jahre	2,41 Jahre	1,19 Jahre	7,44 Jahre
w	21	60,45 Jahre	7,39 Jahre	3,54 Jahre	16,25 Jahre
gesamt	60	63,34 Jahre	2,94 Jahre	1,47 Jahre	11,39 Jahre

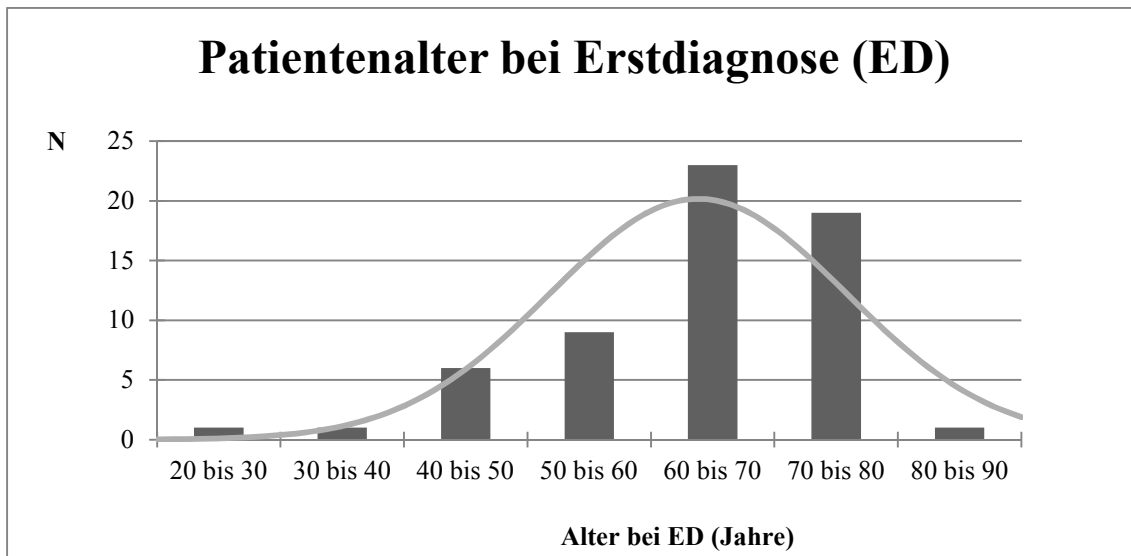


Abb. 9: Graphische Darstellung der allgemeinen Verteilung des Patientenalters bei Erstdiagnose (ED) im Histogramm mit einer Klassengröße von 10 Jahren inklusive Normalverteilungskurve (n=60)

Bei der geschlechterspezifischen Betrachtung des Alters bei Erstdiagnose zeigt sich, dass die weibliche Bevölkerung über die Jahre hinweg eine homogene Verteilung aufweist, mit geringfügigem Maximum in der Altersspanne von 70 bis 80 Jahren. Währenddessen ist bei der männlichen Bevölkerung eine eindeutige Zunahme der Erkrankung über 70 Jahre zu verzeichnen (s. Abb. 10). Bei der getrennten Betrachtung des Alters bei ED ergibt sich somit bei den Frauen ein mittleres Alter von 60,45 Jahren (STD 16,25) und bei den Männern von 64,89 Jahren (STD 7,44 Jahre).

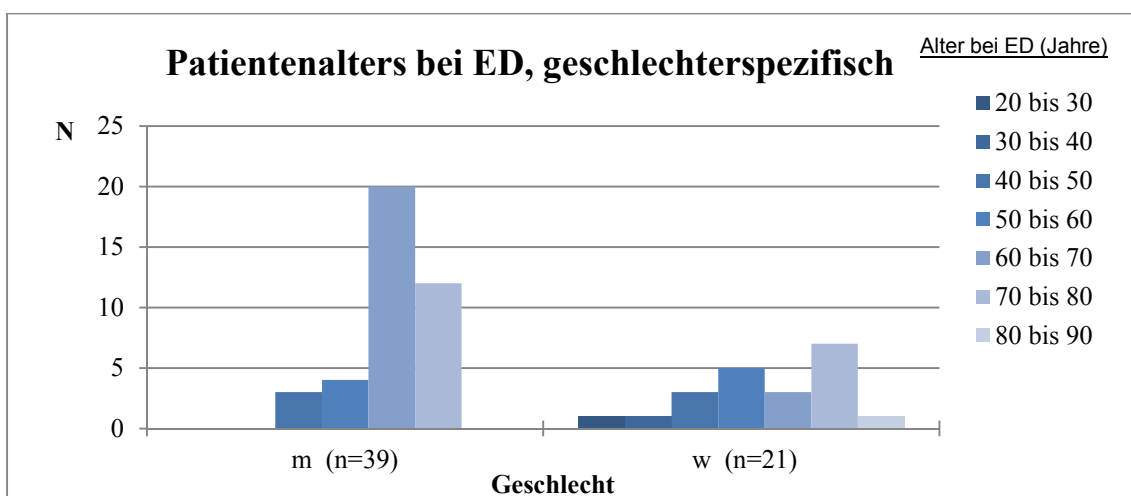


Abb. 10: Vergleichende graphische Darstellung der geschlechterspezifischen Verteilung des Alters bei Erstdiagnose (ED) im Histogramm mit einer Klassengröße von 10 Jahren

3.2 Grunderkrankung

3.2.1 Tumorlokalisation

Die in der Literatur beschriebene klassische anatomische Verteilung der Tumorlokalisationen im Kolorektum spiegelt sich in der 60 Patienten umfassenden Stichprobe wieder. Auch die prozentuale Verteilung der Lokalisation innerhalb des Kolons entspricht der typischen Distribution (s. Abb. 11). Bei geschlechtergetrennter Betrachtung zeigt sich kein nennenswerter Unterschied (s. Abb. 12a,b).

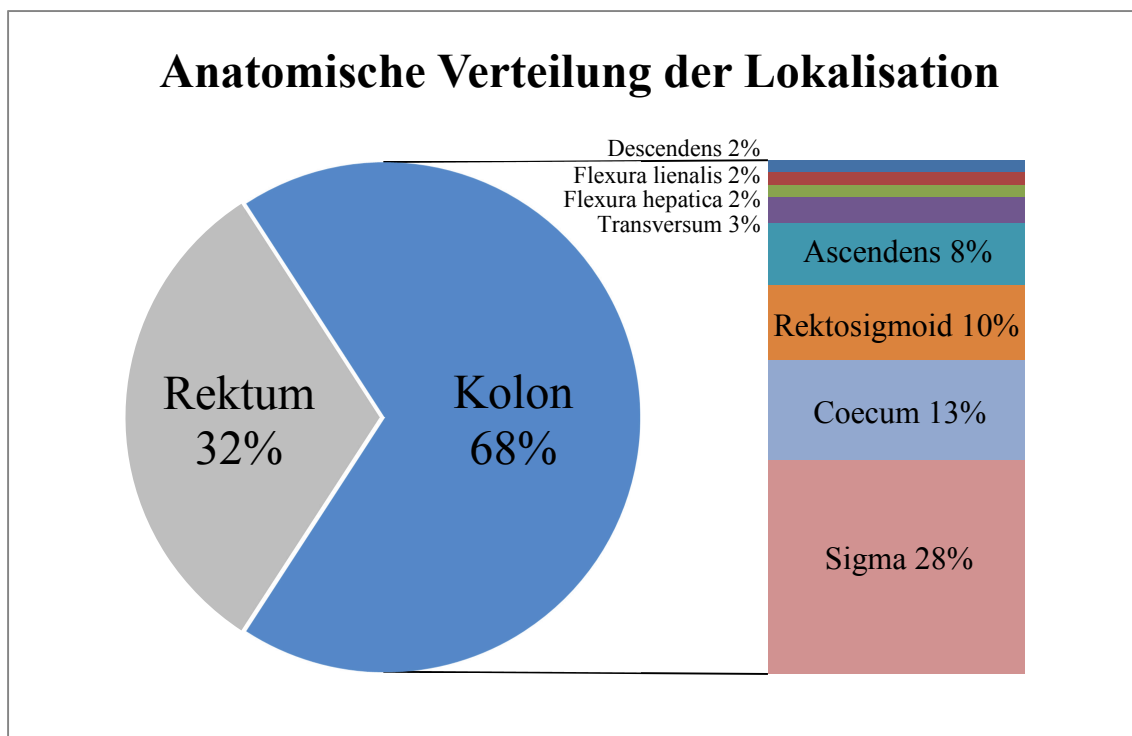


Abb. 11: Graphische Darstellung der anatomischen Verteilung der Tumorlokalisation; Tortendiagramm (n=6)

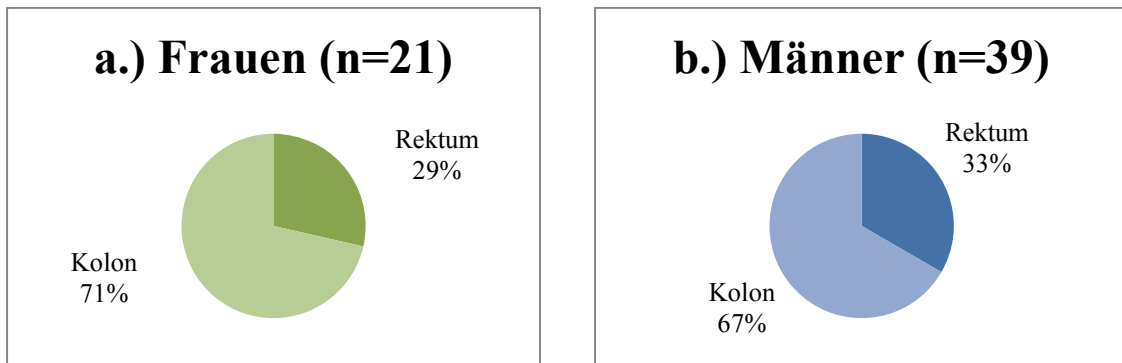


Abb. 12a,b: Graphische Darstellungen der anatomischen Verteilung der Tumorlokalisation, getrennt nach Geschlecht; Tortendiagramme (a.) n=21 b.) n=39)

3.2.2 Histologische Klassifizierung

Desweiteren stimmt die histologische Differenzierung der Karzinome, klassifiziert nach WHO, ebenso mit der in der Literatur verzeichneten charakteristischen Allokation überein. Es zeigt sich folgende Verteilung (s. Abb. 13): 54 Adenokarzinome (=90%), 5 muzinöse Adenokarzinome (=8%) und 1 Siegelringkarzinom (=2%).

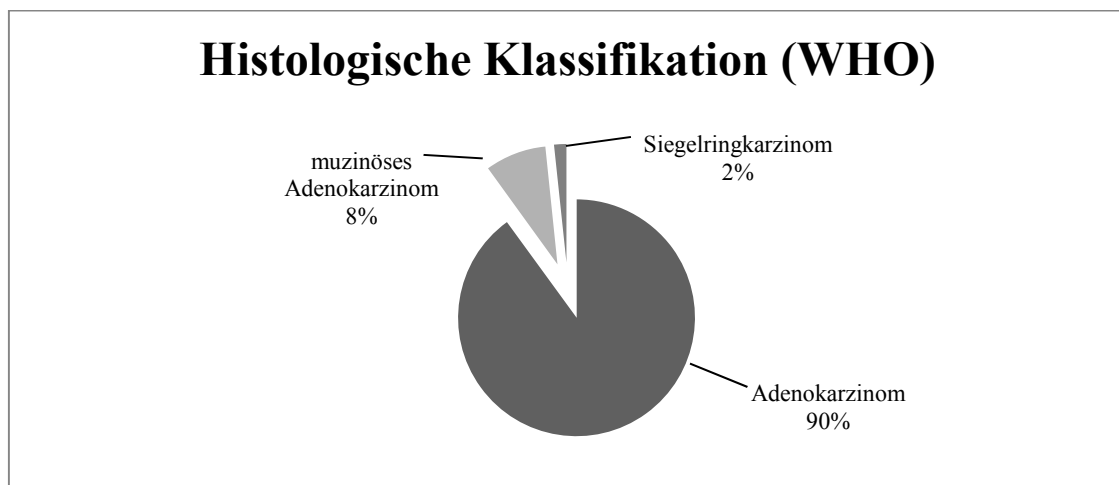


Abb. 13: Graphische Darstellung der histologischen Differenzierung; Tortendiagramm (n=60)

3.2.3 Grading

Zur detaillierteren Betrachtung der kolorektalen Karzinome werden diese nach ihrem Ausreifungsgrad untersucht. Dieses sog. Grading orientiert sich an den Richtlinien der UICC (Union internationale contre le cancer) und unterscheidet 4 verschiedene Differenzierungsgrade. Per definitionem nimmt der Differenzierungsgrad mit zunehmendem Grading ab, wodurch G1 den höchsten Differenzierungsgrad aufweist und G4 undifferenziert ist. Abb. 14 zeigt die Gradingverteilung der Stichprobe; Stadium G4 ist nicht vertreten. Den am häufigsten vorkommenden Differenzierungsgrad stellt G3 mit 61,67% dar.

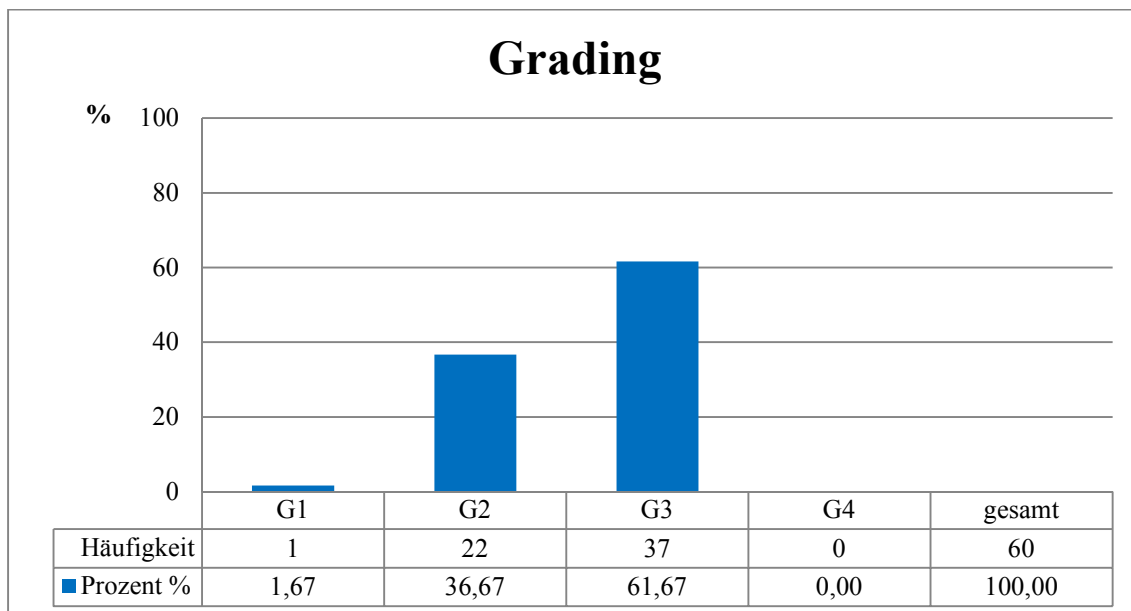


Abb. 14: Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der Stichprobe (n=60) bzgl. des Gradings G1 – G4

3.2.4 Tumorstadieneinteilung

Tabelle 5: TNM-Klassifikation UICC 2010
(nach Wittekind und Meyer 2010) Tabellarische Darstellung ohne die Unterteilung in a-, b-, c-
Unterkategorien, da diese spezifische Zuordnung an den kolorektalen Karzinomen des
Patientenkollektivs (n=60) nicht vorgenommen wurde.

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Das UICC-pTNM-System ist international als Tumorklassifikation akzeptiert und stellt den Goldstandard dar. Die Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenbefall (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M) wird mittels TNM-Klassifikation maligner Tumore (s. Tabelle 5) ebenso nach den Richtlinien der UICC klassifiziert. Das entsprechende Tumorstadium (UICC I-IV) ergibt sich aus der Kombination dieser T, N, und M-Kategorien (s. Tabelle 6). Mit 2 Ausnahmen (4 und 9 Lymphknoten) wurden pro Patient, wie gefordert, mindestens 12 Lymphknotenmetastasen untersucht (MW: 15,38; STD: 5,45).

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Primärtumorverteilung hinsichtlich der TNM-Klassifikation sowie entsprechender UICC-Stadieneinteilung (n=60)

UICC-Stadium	Definition			Häufigkeit	Prozent
	T	N	M		
0	Tis	N0	M0	0	0,00%
I	T1	N0	M0	1	1,67%
	T2	N0	M0	2	3,33%
II	T3	N0	M0	3	5,00%
	T4	N0	M0	2	3,33%
III	jedes T	N1	M0	7	11,67%
	jedes T	N2	M0	6	10,00%
IV	jedes T	jedes N	M1	39	65,00%

Im vorliegenden Patientenkollektiv stellt das Tumorstadium UICC IV mit 65 % das häufigste Stadium zum Zeitpunkt der Primäroperation dar (s. Tabelle 6).

Abb. 15 veranschaulicht graphisch die Verteilung der UICC-Stadien.

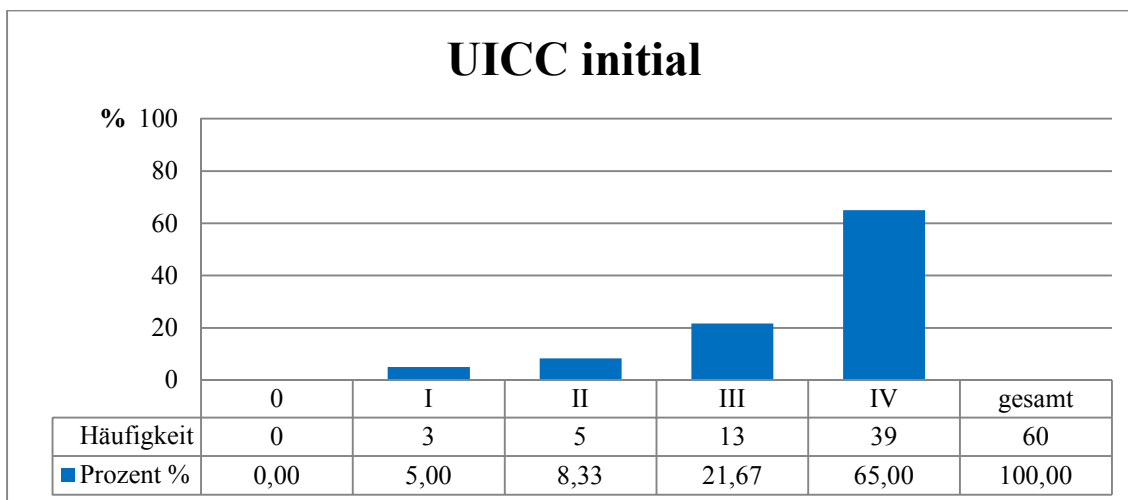


Abb. 15: Graphische und tabellarische Darstellung der UICC-Stadieneinteilung nach Primäroperation (n=60)

3.2.5 Metastasen bei Erstdiagnose

Über die postoperative Feststellung der pTNM-Klassifikation zeigt sich in Bezug auf die Metastasierung, dass 47 Patienten (=78,33%) Lymphknotenmetastasen aufweisen.

Ebenso lassen sich bei 39 Patienten (=35%) Fernmetastasen feststellen (s. Abb. 16).

Insgesamt zeigen sich 49 verschiedene Fernmetastasenlokalisationen bei 39 Personen.

Dies bedeutet, dass bei jenen Patienten im Mittel 1,26 Fernmetastasenorte vorliegen.

Die häufigste Lokalisation für Fernmetastasen stellt die Leber dar, mit einem Befallsanteil von 67,31% (=32 Patienten).

Häufigkeit und Lokalisation werden folgend in Abb. 17 visualisiert.

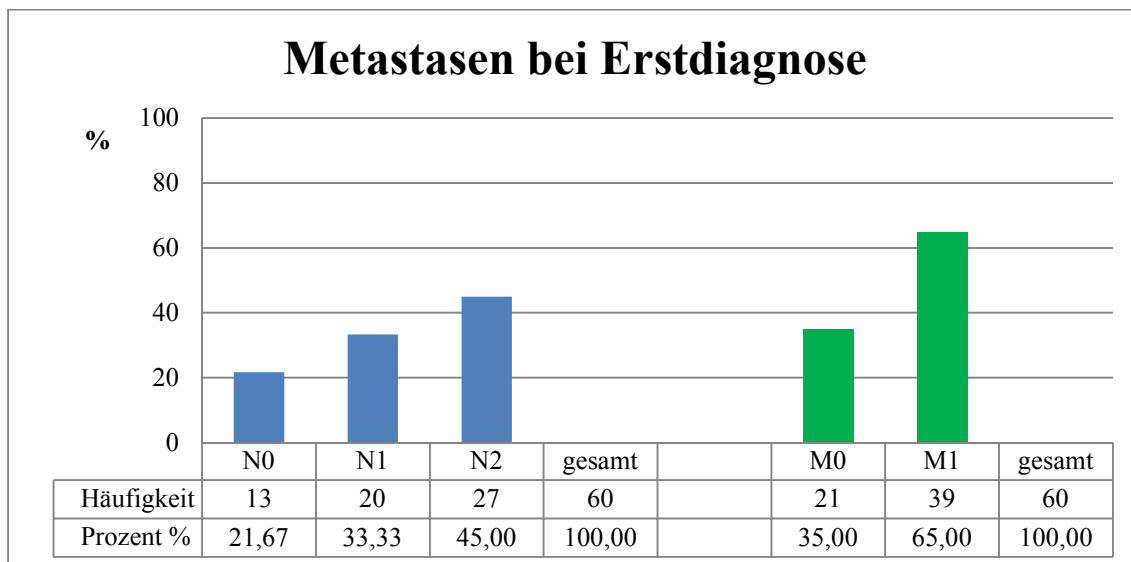


Abb. 16: Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der N-Klassifikation (n=60) und M-Klassifikation (n=60)

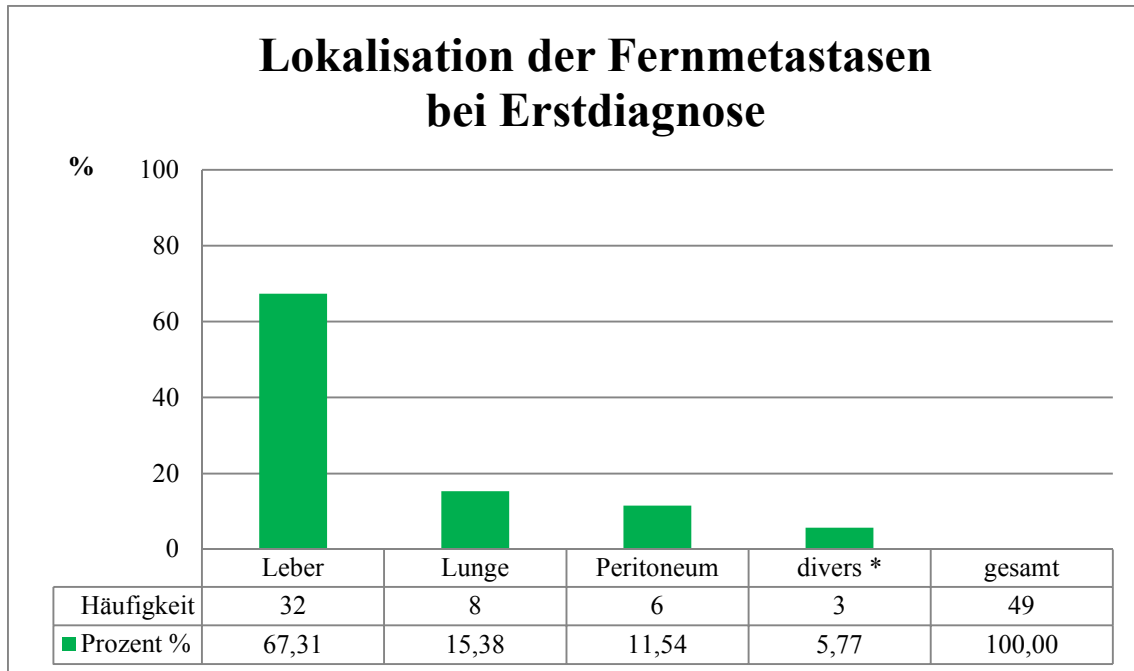


Abb. 17: Graphische und tabellarische Darstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der Fernmetastasen bei Erstdiagnose (n=49)
*divers: Bauchwand, Netz, Gehirn

3.2.6 R-Klassifikation

Zur Beurteilung der Entfernung des gesamten Tumorgewebes ohne Belassung etwaiger Residuen wird die sogenannte R-Klassifikation verwendet. R0 steht für eine kurative Resektion, d.h. dass kein Resttumor nachweisbar ist, wobei jedoch nicht-nachweisbare Residuen nicht nachgewiesen werden können.

R1 steht für einen mikroskopisch und R2 für einen makroskopisch nachweisbaren Residualtumor. Ist von RX die Rede, kann das Vorhandensein von Residuen nicht beurteilt werden. Abb. 18 zeigt die Verteilung der R-Klassifikation des Patientenkollektivs mit einem Hauptanteil von 85% bei R0.

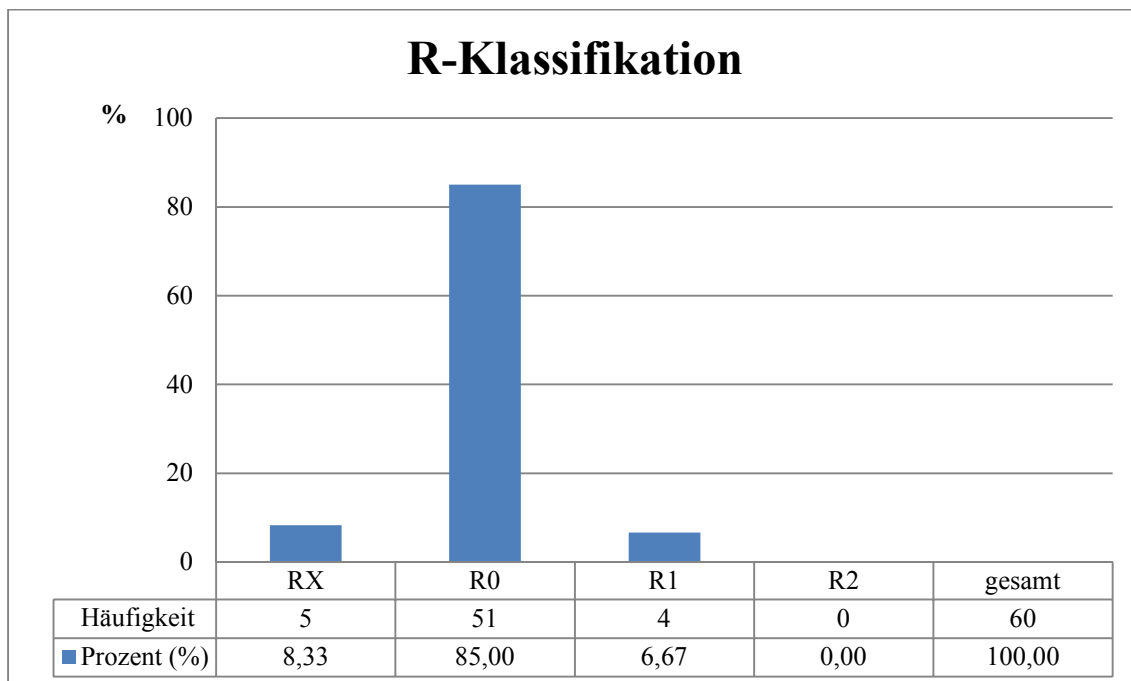


Abb. 18: Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der R-Klassifikation (n=60)

3.3 KRAS - Mutationsanalyse

3.3.1 KRAS - Mutationen

Untersucht wurde Tumorgewebe von 60 Patienten. Bei jedem Patienten wurden im Verlauf der Krebserkrankung mindestens zwei KRAS-Mutationsanalysen an verschiedenen Geweben vorgenommen. Der KRAS-Mutationsstatus des Primärtumors wurde bei 59 Patienten bestimmt. Die weiteren Analysen fanden entweder an LK-Metastasen, Fernmetastasen, Rezidiven sowie an Adenomen (LGIN/HGIN) statt. Welches Gewebe für eine weitere Analyse in Frage kam richtete sich nach dem individuellen Fortschreiten der Erkrankung. Schließlich wurden 162 Gewebeproben auf die KRAS-Mutation analysiert (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung und Verteilung der mutationsanalytisch untersuchten Gewebetypen inklusive vorhandener KRAS-Mutationen

Mutationsanalyse an:	alle Proben		KRAS-Mutationen	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Primarius	59	36,42%	26	44,07%
Lymphknotenmetastase	32	19,75%	14	43,75%
Fernmetastase	30	18,52%	9	30,00%
Rezidiv	14	8,64%	6	42,86%
Adenom	27	16,67%	10	37,04%
Summe:	162	100,00%	65	40,12%

Mutationen im KRAS-Gen werden insgesamt bei 65 Gewebeproben (=40,12%), unabhängig vom Gewebetyp, detektiert. Eine Übereinstimmung im Mutationsstatus (Konkordanz) der einzelnen Gewebe bzgl. eines Patienten findet sich bei 48 Erkrankten (=80%). Diskordanzen ergeben sich bei 12 Patienten (=20%) (s. Abb. 19).

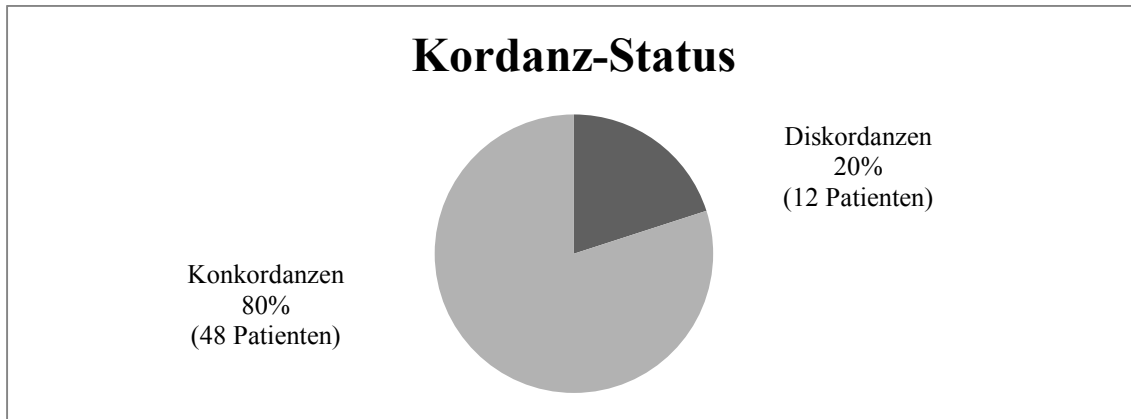


Abb. 19: Graphische Darstellung der Verteilung des Übereinstimmens bzw. Nicht-Übereinstimmens im KRAS-Mutationsstatus verschiedener Gewebe, der gleichen Person; Tortendiagramm (n=60)

Dieser Kordanz-Status soll in der weiteren Untersuchung als trennendes Kriterium für die beiden Hauptuntergruppen der Analyse stehen. Zu den Konkordanzen zählen diejenigen Patienten, bei denen entweder eine Übereinstimmung eines KRAS-Wildtyps in ihren Gewebetypen zu finden ist oder aber eine identische KRAS-Mutation. Sobald ein Gewebetyp eine andere KRAS-Mutation aufweist oder ein KRAS-Wildtyp bei bereits ermittelter KRAS-Mutation vorliegt, wie auch im umgekehrten Fall, so entspricht dieses Vorkommen einer Diskordanz. Diese Diskordanzen stellen den Hauptbetrachtungsaspekt der vorliegenden Arbeit dar und werden in einem separaten Kapitel (3.3.2) gezielt betrachtet und einzeln analysiert.

In der Gruppe der Konkordanzen kann darüberhinaus unterschieden werden, ob die Übereinstimmung im KRAS-Gen auf dem Vorhandensein einer Mutation oder eines Wildtyps basiert (s. Abb. 20).

Diese getrennte Betrachtung innerhalb der Konkordanzen wird in die Untersuchung mit einbezogen und ist in jeder folgenden Tabelle bzw. Abbildung separat gelistet bzw. graphisch dargestellt.

Die Tabellen 8 - 12 stellen das Vorkommen und die Verteilung der KRAS-Mutationen in den verschiedenen Gewebetypen dar.

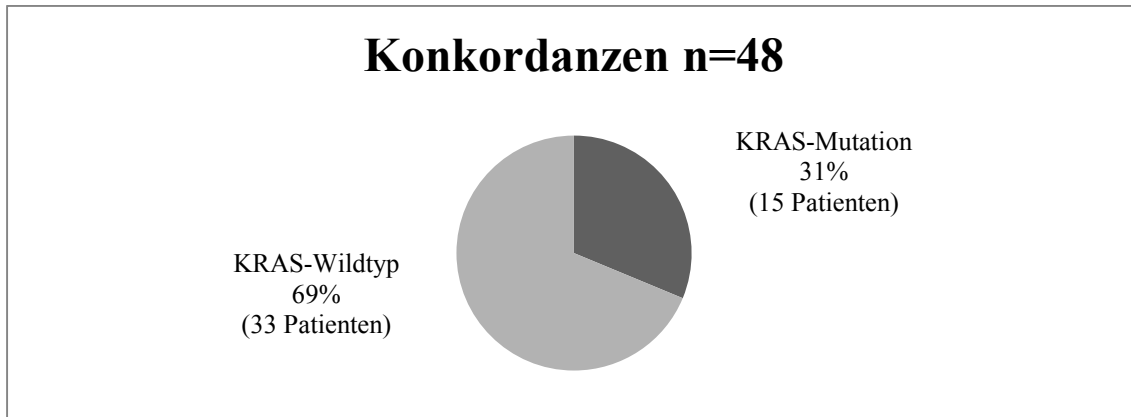


Abb. 20: Graphische Darstellung der Verteilung des KRAS-Mutationsstatus in der Subgruppe der Konkordanzen; Tortendiagramm (n=48)

Tabelle 8: KRAS-Mutationen in Primärtumoren (n=59)

	Primärtumor					
	alle		Konkordanzen		Diskordanzen	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Einfachmutationen:						
Cod12Asp	15	25,42%	9	18,75%	6	54,55%
Cod12Cys	3	5,08%	2	4,16%	1	9,09%
Cod12Ser	2	3,39%	1	2,08%	1	9,09%
Cod12Val	2	3,39%	1	2,08%	1	9,09%
Cod12Ala	1	1,69%	1	2,08%	0	0,00%
Cod12Arg	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod13Asp	2	3,39%	1	2,08%	1	9,09%
Doppelmutationen:						
Cod12Cys/Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser/Cod13Asp	1	1,69%	0	0,00%	1	9,09%
Wildtyp:	33	55,93%	33	68,75%	0	0,00%
Summe:	59	100,00%	48	100,00%	11	100,00%
KRAS-mutiert:	26	44,07%	15	31,25%	11	100,00%

Tabelle 9: KRAS-Mutationen in Lymphknotenmetastasen (n=32)

	LK-Metastasen		Konkordanzen		Diskordanzen	
	alle		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Einfachmutationen:						
Cod12Asp	7	21,87%	7	29,16%	0	0,00%
Cod12Cys	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser	3	9,37%	1	4,17%	2	25,00%
Cod12Val	1	3,13%	1	4,17%	0	0,00%
Cod12Ala	1	3,13%	1	4,17%	0	0,00%
Cod12Arg	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Doppelmutationen:						
Cod12Cys/Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser/Cod13Asp	2	6,25%	0	0,00%	2	25,00%
Wildtyp:	18	56,25%	14	58,33%	4	50,00%
Summe:	32	100,00%	24	100,00%	8	100,00%
KRAS-mutiert bei:	14	43,75%	10	41,67%	4	50,00%

Tabelle 10: KRAS-Mutationen in Fernmetastasen (n=30)

	Fernmetastasen		Konkordanzen		Diskordanzen	
	alle		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Einfachmutationen:						
Cod12Asp	3	10,00%	3	11,54%	0	0,00%
Cod12Cys	1	3,33%	1	3,85%	0	0,00%
Cod12Ser	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Val	1	3,33%	0	0,00%	1	25,00%
Cod12Ala	1	3,33%	1	3,85%	0	0,00%
Cod12Arg	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod13Asp	2	6,67%	1	3,85%	1	25,00%
Doppelmutationen:						
Cod12Cys/Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser/Cod13Asp	1	3,33%	0	0,00%	1	25,00%
Wildtyp:	21	70,00%	20	76,92%	1	25,00%
Summe:	30	100,00%	26	100,00%	4	100,00%
KRAS-mutiert:	9	30,00%	6	23,08%	3	75,00%

Tabelle 11: KRAS-Mutationen in Rezidiven (n=14)

	Rezidive		Konkordanzen		Diskordanzen	
	alle		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Einfachmutationen:						
Cod12Asp	1	7,14%	1	8,33%	0	0,00%
Cod12Cys	3	21,43%	2	16,67%	1	20,00%
Cod12Ser	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Val	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ala	1	7,14%	1	8,33%	0	0,00%
Cod12Arg	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Doppelmutationen:						
Cod12Cys/Cod13Asp	1	7,14%	0	0,00%	1	20,00%
Cod12Ser/Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Wildtyp:	8	57,14%	8	66,67%	3	60,00%
Summe:	14	100,00%	12	100,00%	5	100,00%
KRAS-mutiert:	6	42,86%	4	33,33%	2	40,00%

Tabelle 12: KRAS-Mutationen in Adenomen (n=27)

	Adenome		Konkordanzen		Diskordanzen	
	alle		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Einfachmutationen:						
Cod12Asp	1	3,70%	0	0,00%	1	5,89%
Cod12Cys	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser	3	11,11%	0	0,00%	3	17,65%
Cod12Val	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ala	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Arg	1	3,70%	0	0,00%	1	5,89%
Cod13Asp	3	11,11%	0	0,00%	3	17,65%
Doppelmutationen:						
Cod12Cys/Cod13Asp	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Cod12Ser/Cod13Asp	2	7,41%	0	0,00%	2	11,76%
Wildtyp:	17	62,96%	10	100,00%	7	41,18%
Summe:	27	100,00%	10	100,00%	17	100,00%
KRAS-mutiert:	10	37,04%	0	0,00%	10	58,82%

Die Tabellen 8 - 12 zeigen, dass nicht nur 12 verschiedene Einfachmutationen auftreten können, sondern auch in Einzelfällen Doppelmutationen nachweisbar sind. Bei den insgesamt 6 detektierten Doppelmutationen besteht immer die Beteiligung von Cod13Asp (=100%).

Insgesamt wurden 58 Einfachmutationen analysiert, mit einem Verhältnis von Cod12- zu Cod13-Mutationen von 88% zu 12%. In den Adenomen hat Cod13 den größten prozentualen Anteil von 37,50% im Vergleich zu 62,50% in Cod12. Die restlichen Gewebe weisen anteilmäßig geringere prozentuale Vorkommen auf. Cod12Asp ist die häufigste Einfachmutation mit 46,55% und kommt in 15 (=55,56%) von 27 Fällen am häufigsten in den Primärtumoren vor. 6 (=40 %) dieser 15 Cod12Asp-Primärtumoren entfallen auf Diskordanzen.

Die Tabellen zeigen weiterhin, dass in jedem der 5 analysierten Gewebetypen der KRAS-Wildtyp mehr als 50% ausmacht. Der größte prozentuale Anteil an KRAS-Wildtyp findet sich mit 70% (21 von 30 Fällen) bei den Fernmetastasen. Hingegen zeigt sich der größte prozentuale Anteil an KRAS-Mutationen mit 44,07% (26 von 59 Fällen) bei den Primärtumoren. Ein ähnliches Verhältnis im KRAS-Wildtyp zwischen Konkordanzen und Diskordanzen findet sich bei den Lymphknotenmetastasen (58,33% und 50%) und Rezidiven (66,67% und 60%). Bei Betrachtung der Diskordanzen hat keiner (=0%) der analysierten Primärtumore einen KRAS-Wildtypstatus.

Auffällig ist beim Gewebetyp der Adenome, dass bei allen 10 untersuchten Adenomen, die den Konkordanzen angehören, KRAS ausschließlich im Wildtyp vorzufinden ist. Besteht hingegen eine KRAS-Mutation, so gehört diese Probe zur Subgruppe der Diskordanzen. Adenome in Diskordanzfällen kommen jedoch in beiden Mutationsstadien des KRAS-Gens vor.

3.3.2 Diskordanzen im KRAS-Mutationsstatus

Ein divergentes Bild im KRAS-Mutationsstatus kann bei 12 Patienten nachgewiesen werden. Diese sind in Tabelle 13 detailliert aufgelistet.

Tabelle 13: Zusammenstellung der mutationsanalytischen Ergebnisse im KRAS-Gen bei n=12 Patienten mit diskordantem KRAS-Mutationsstatus.

Je nach Verlauf der Erkrankung und Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterial wurde pro Patient unterschiedliches Gewebe analysiert.

Legende: LK: Lymphknoten, R: Rezidiv; A: Adenom

Nr.	KRAS-Status				
	Primärtumor	Lymphknotenmetastase	Fernmetastase	Rezidiv	Adenom
1	Cod12Val	Wildtyp			Cod12Arg
2	Cod12Asp		Cod12Val (Hepar)		
3	Cod12Ser	Cod12Ser			A1: Cod12Asp A2: Cod13Asp A3: Cod13Asp A4: Cod12Ser A5: Cod12Ser/ Cod13Asp A6: Wildtyp
4	Cod13Asp	Wildtyp	Cod13Asp(Pankreas)		
5	Cod12Ser/ Cod13Asp	LK1: Cod12Ser/ Cod13Asp LK2: Cod12Ser/ Cod13Asp LK3: Cod12Ser	Cod12Ser/ Cod13Asp (Omentum majus)		A1: Cod12Ser A2: Cod12Ser A3: Cod13Asp A4: Wildtyp A5: Wildtyp A6: Cod12Ser/ Cod13Asp
6		Wildtyp	Wildtyp (Hepar)	R1: Cod12Cys R2: Wildtyp R3: Wildtyp R4: Cod12Cys/ Cod13Asp	
7	Cod12Asp	Wildtyp			
8	Cod12Cys		Wildtyp (Cerebrum)		
9	Cod12Asp				Wildtyp
10	Cod12Asp				Wildtyp
11	Cod12Asp				Wildtyp
12	Cod12Asp				Wildtyp

Bei 11 dieser diskordanten Fälle weist der Primärtumor eine KRAS-Mutation auf, während die restlichen Gewebe des entsprechenden Patienten mindestens eine andere Mutation oder einen Wildtyp zeigen. Die häufigste Mutation ist Cod12Asp bei 6 der 11 Primärtumoren (=54,55%). Aufgrund des zu großen zeitlichen Abstandes zur Primäroperation und damit des Fehlens von Primärtumormaterial konnte bei einem der diskordanten Fälle keine Analyse an diesem stattfinden (Nr.6).

Drei analysierte Lymphknotenmetastasen sowie eine Fernmetastase und zwei Adenome sind konkordant zu ihrem Primärtumor, allerdings stellt die Analyse weiterer Adenome und einer Lymphknotenmetastase ein inhomogenes, diskordantes Bild dar (Nr. 3, 5). Ebenso stimmen zwei Rezidive, ein Lymphknoten, sowie eine Fernmetastase in ihrem Mutationsstatus überein, jedoch wird in zwei weiteren Rezidiven auch dieses konkordante Verhalten unterbrochen (Nr. 6).

Bei 4 Patienten (Nr. 9-12) zeigt sich lediglich im Adenom keine Mutation.

Die fünf Fernmetastasen wurden an vier verschiedenen Geweben untersucht, mit dem Ergebnis von vier unterschiedlichen Mutationen (Leber, Pankreas, Omentum majus, Cerebrum) (Nr. 2, 4, 5, 8).

Bei fünf der diskordanten Fälle ließ sich trotz Mutation im Primarius ein Wildtyp in den Metastasen erfassen (Nr. 1, 4, 6, 7, 8).

Doppelmutationen ließen sich bei drei Patienten detektieren. Diese finden sich bei Patient Nr.5 in 4 seiner Gewebeproben vom Typ „Cod12Ser/Cod13Asp“, während bei Patient Nr. 3 der Typ „Cod12Ser/Cod13Asp“ nur in einem Adenom und bei Patient Nr. 6 der Typ „Cod12Cys/Cod13Asp“ in einem seiner Rezidive auftritt.

7 der 12 Patienten (=58,33%) hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen. Bei 10 der 12 Patienten (=83,33%) wurde nach der Primäroperation ein positiver Lymphknotenstatus festgestellt.

Entsprechend der Zuordnung bzgl. der einzelnen Gewebe kann ein prozentuales Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutation an allen 45 Proben der 12 Patienten mit diskordantem Verhalten ermittelt werden (s. Abb. 21).

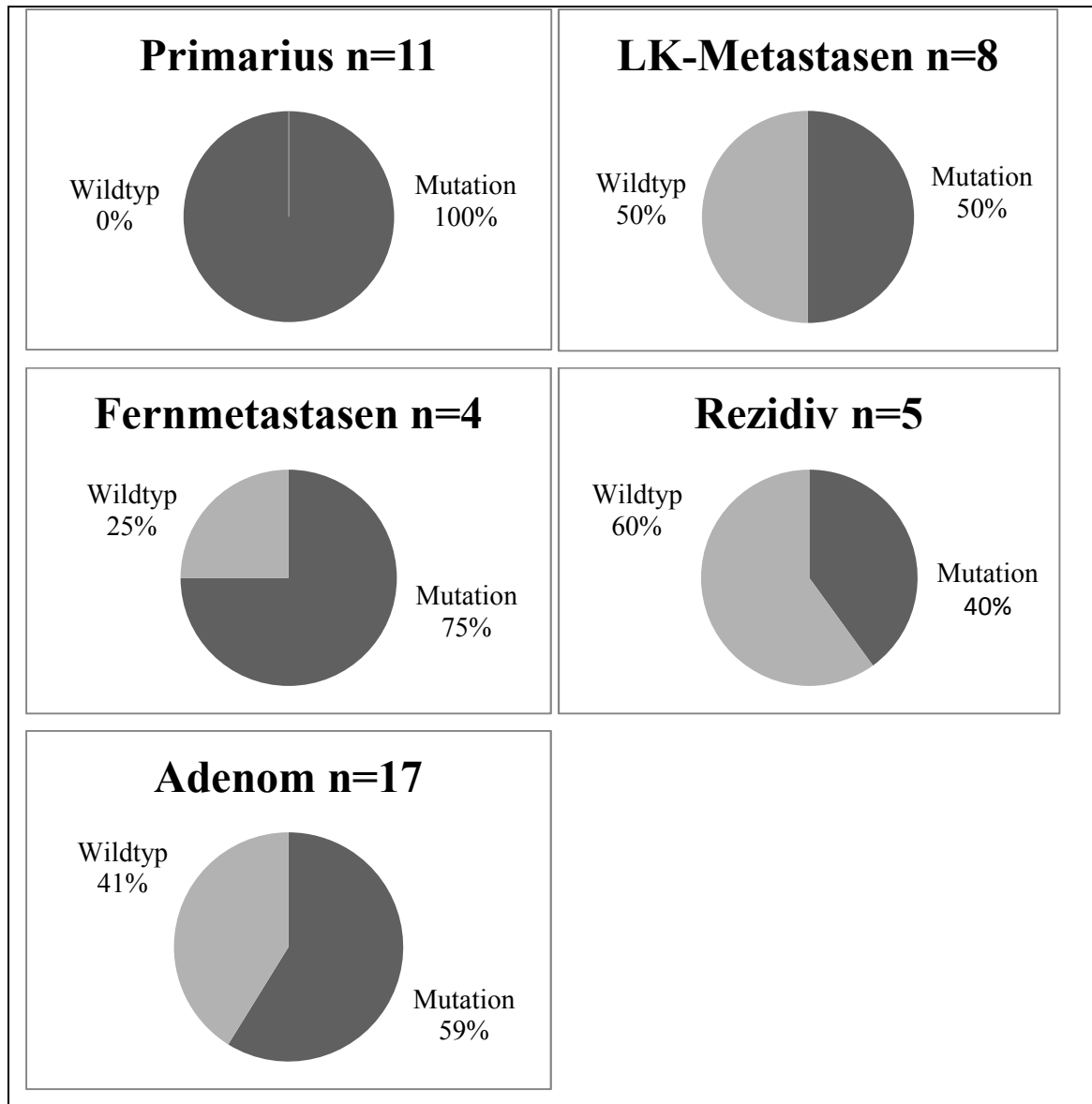


Abb. 21: Zusammenfassende graphische Darstellungen der Verteilungen des KRAS-Mutationsstatus an 5 verschiedenen Gewebetypen des Subkollektivs (n=12) mit diskordantem KRAS-Mutationsstatus; Tortendiagramme

3.4 KRAS-Vergleiche

In diesem Kapitel soll eine Darstellung und Gegenüberstellung von Tumorvariablen und dem Kordanz- bzw. dem KRAS-Mutationsstatus erfolgen. Ziel ist es, mögliche Zusammenhänge, Beziehungen oder Verflechtungen aufzudecken. Eventuelle Abhängigkeiten könnten Einfluss auf das weitere Ansprechen der Chemo- oder Antikörpertherapien zeigen. Untersucht werden die pTNM-Klassifikationen, das Grading, die Primärtumorlokalisation sowie histologische Auffälligkeiten.

3.4.1 Kordanz- und KRAS-Status vs. pTNM-Klassifikation

Im Folgenden findet eine separate Darstellung der pT-, pN-, und M-Klassifikationen statt. Es muss hierbei erwähnt werden, dass das M-Stadium nicht ausschließlich pathologisch bestimmt wurde. Bei einem Teil der Patienten, bei denen keine Resektion oder Biopsie von Fernmetastasen stattfand, wurde das M-Stadium alternativ während der Staginguntersuchung durch entsprechende Bildgebung (Sonographie, Röntgen-Thorax, CT) ermittelt. Somit wird hier das M-Stadium nicht als „pM-Stadium“ aufgeführt.

3.4.1.1 Beurteilung der T-Klassifikation

Tabelle 14: T vs. Kordanz/KRAS (n=60);
häufigstes Stadium grau hinterlegt

	T-Klassifikation								gesamt	
	pT1		pT2		pT3		pT4			
KRAS-Status	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen										
Wildtyp	1	3,03	3	9,09	23	69,70	6	18,18	33	100,00
Mutation	0	0,00	0	0,00	12	80,00	3	20,00	15	100,00
Diskordanzen	1	8,33	3	25,00	8	66,67	0	0,00	12	100,00
gesamt	2	3,33	6	10,00	43	71,67	9	15,00	60	100,00

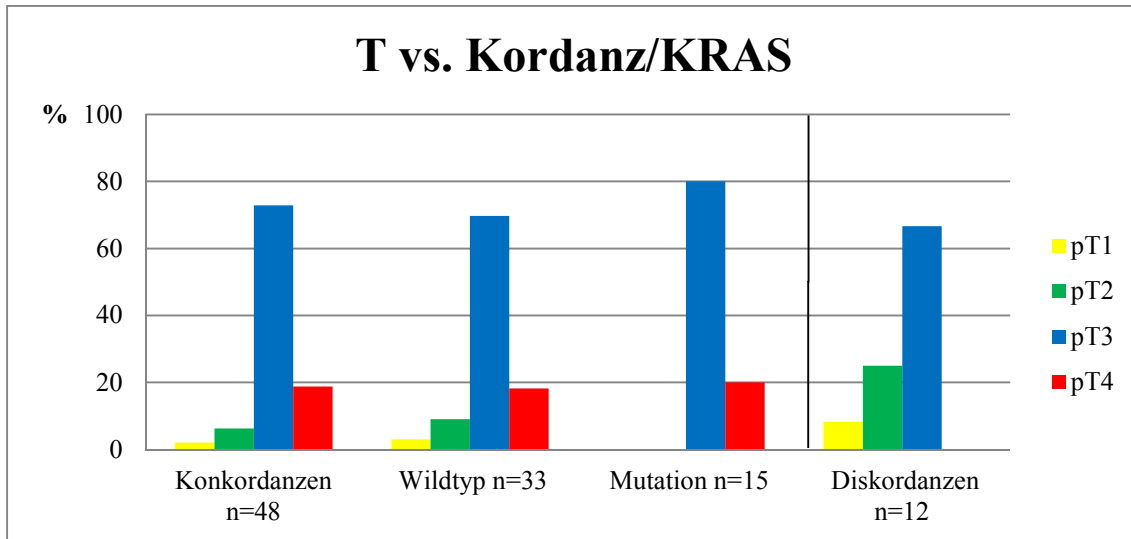


Abb. 22: Graphische Darstellung der Verteilung der T-Klassifikation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Tabelle 14 und Abb. 22 zeigen, dass bei den Diskordanzen das Stadium pT4 nicht vertreten ist. Bei der genaueren Betrachtung der Konkordanzen fällt auf, dass bei der Subgruppe der KRAS-Mutationen nur Erkrankte mit dem Stadium pT3 und pT4 vorzufinden sind. Das häufigste Stadium stellt insgesamt mit 71,67% das Stadium pT3 dar (Konkordanzen: 72,92%; Diskordanzen: 66,67%).

3.4.1.2 Beurteilung der N-Klassifikation

Tabelle 15: N vs. Kordanz/KRAS (n=60); häufigstes Stadium grau hinterlegt

KRAS-Status	N-Klassifikation						gesamt	
	pN0		pN1		pN2			
	N	%	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen								
Wildtyp	9	27,27	11	33,33	13	39,40	33	100,00
Mutation	2	13,33	6	40,00	7	46,67	15	100,00
Diskordanzen	2	16,67	4	33,33	6	50,00	12	100,00
gesamt	13	21,67	21	35,00	26	43,33	60	100,00

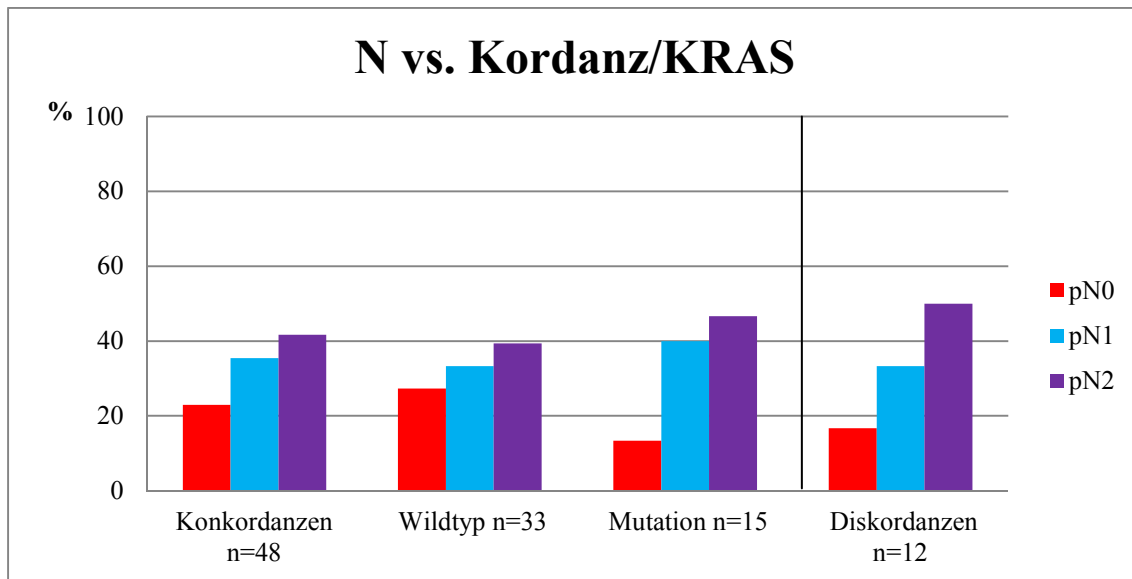


Abb. 23: Graphische Darstellung der Verteilung der N-Klassifikation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Tabelle 15 und Abb. 23 zeigen, dass die Verteilung der einzelnen N-Stadien innerhalb der Konkordanzen und Diskordanzen in Richtung pN2 zunimmt. pN2 stellt das häufigste Stadium mit insgesamt 43,33% dar (Konkordanzen: 41,67%; Diskordanzen: 50,00%).

3.4.1.3 Beurteilung der M-Klassifikation

Tabelle 16: M vs. Kordanz/KRAS (n=60); häufigstes Stadium grau hinterlegt

	M-Klassifikation				gesamt	
	M0		M1			
KRAS-Status	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen						
Wildtyp	12	36,36	21	63,64	33	100,00
Mutation	4	26,67	11	73,33	15	100,00
Diskordanzen	5	41,67	7	58,33	12	100,00
gesamt	21	35,00	39	65,00	60	100,00

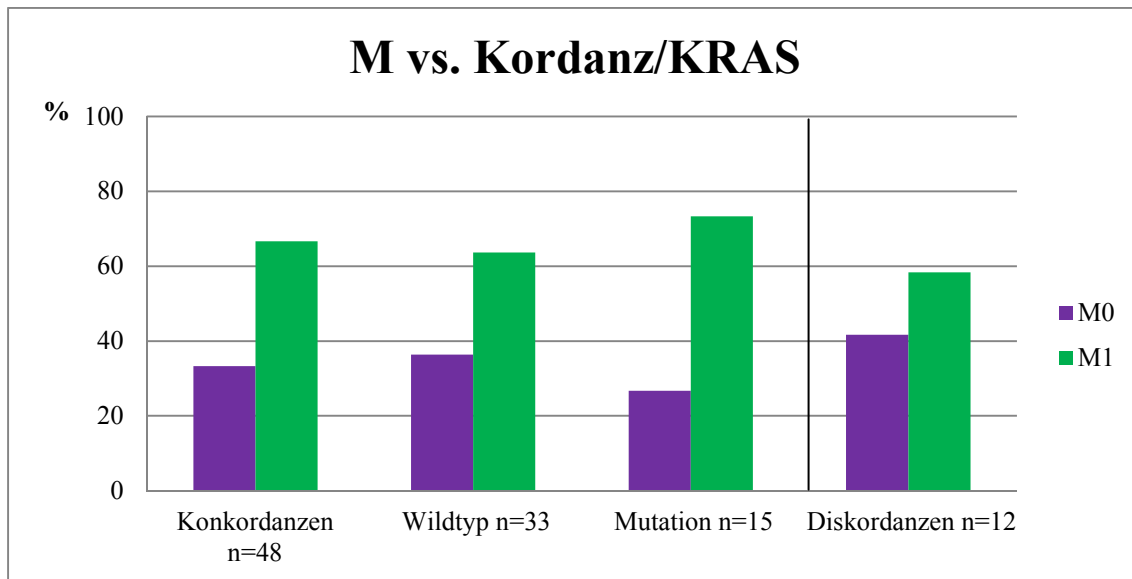


Abb. 24: Graphische Darstellung der Verteilung der M-Klassifikation in Bezug auf den Konkordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Tabelle 16 und Abb. 24 zeigen, dass das M1-Stadium im Vergleich zum M0-Stadium sowohl innerhalb der Konkordanz, wie auch der Diskordanz häufiger auftritt. In Konkordanzfällen mit vorliegender KRAS-Mutation liegen zu 73,33 % Fernmetastasen bei Erstdiagnose vor (M1). Besteht ein KRAS-Wildtyp, so lassen sich in 63,64% der Fälle Fernmetastasen an einem vom Tumor entfernten Ort feststellen. Die Diskordanz besitzen hingegen den mit 58,33% geringsten Prozentsatz für das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Stadium mit „pT3 pN2 M1“ das häufigste Stadium des Patientenkollektivs (n=60) ist. Dies bestätigt sich bei den Konkordanz, bei den Diskordanz und auch in den Untergruppen der Konkordanz (Wildtyp, Mutation). Ebenfalls werden keine Unterschiede in den drei Gegenüberstellungen der Klassifikationen beobachtet.

3.4.2 Kordanz- und KRAS-Status vs. Grading

Tabelle 17: Grading vs. Kordanz/KRAS;
häufigstes Stadium grau hinterlegt

	Grading						gesamt	
	G1		G2		G3			
KRAS-Status	N	%	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen								
Wildtyp	0	0,00	12	36,36	21	63,64	33	100,00
Mutation	0	0,00	7	46,67	8	53,33	15	100,00
Diskordanzen	1	8,33	3	25,00	8	66,67	12	100,00
gesamt	1	1,67	22	36,67	37	61,67	60	100,00

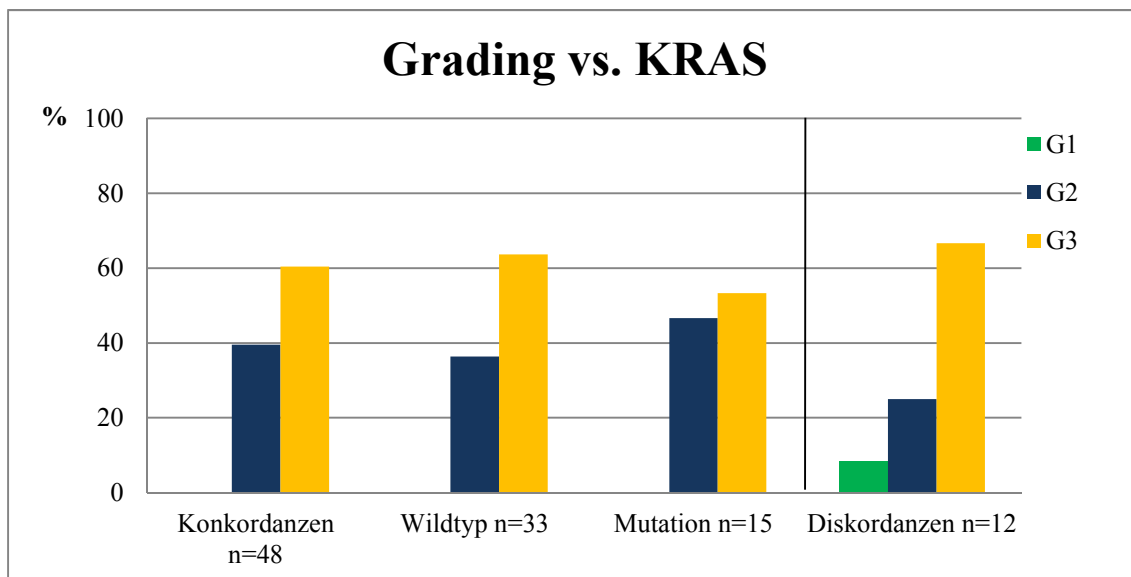


Abb. 25: Graphische Darstellung der Verteilung des Gradings in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Tabelle 17 und Abb. 25 zeigen, dass G3 in jeder Subgruppe überwiegt. G1 tritt lediglich bei einem diskordanten Fall auf. Beim Vergleich der Subgruppen KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation zeigen sich verhältnismäßig mehr G3- als G2-Tumoren bei den Wildtypen. Jedoch lässt sich hier keine Signifikanz nachweisen. Auch das prozentuale Überwiegen von G3 bei den Diskordanzen ist gegenüber den Konkordanzen ebenfalls nicht signifikant.

3.4.3 Kordanz- und KRAS-Status vs. Primärtumorlokalisation

Tabelle 18: Lokalisation vs. Kordanz/KRAS

KRAS-Status	Lokalisation				gesamt	
	Kolon		Rektum		N	%
	N	%	N	%		
Konkordanzen						
Wildtyp	23	69,70	10	30,30	33	100,00
Mutation	9	60,00	6	40,00	15	100,00
Diskordanzen	10	83,33	2	16,67	12	100,00
gesamt	42	70,00	18	30,00	60	100,00

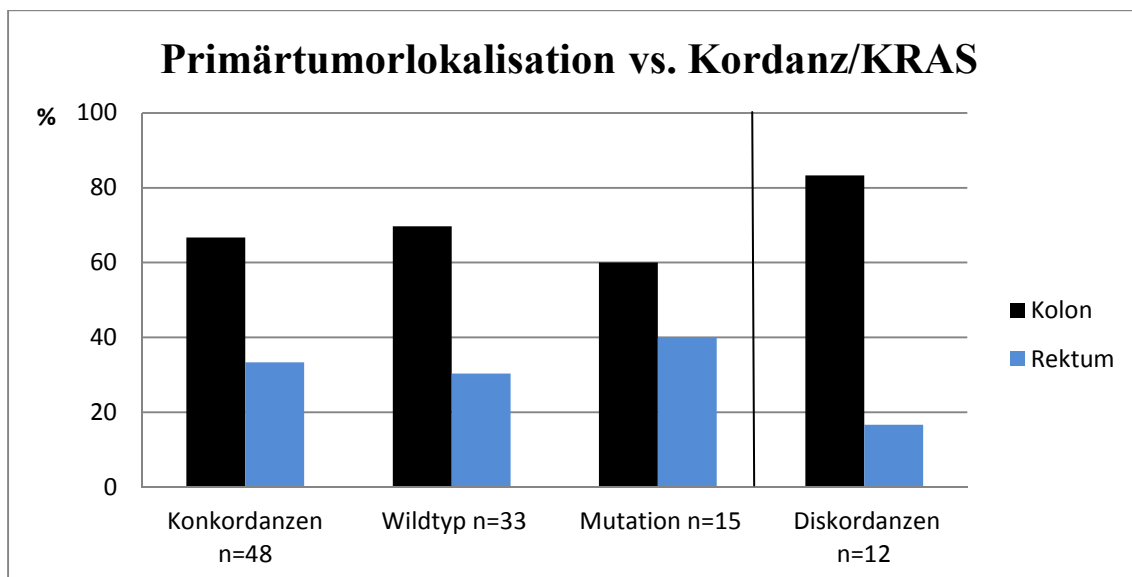


Abb. 26: Graphische Darstellung der Verteilung der Primärtumorlokalisation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Tabelle 18 und Abb. 26 zeigen, dass der prozentuale Anteil der im Kolon befindlichen Tumore im Falle von Diskordanzen mit 83,33% höher liegt als bei Konkordanzen mit 66,67%.

Um festzustellen, ob die Konkordanzen oder Diskordanzen einen signifikanten Einfluss auf die T-, N- oder M-Klassifikation, das Grading sowie die Primärtumorlokalisation haben, wurde der „Exakte Test nach Fisher“ angewendet. Als Nullhypothese galt, dass

weder die Diskordanzen noch die Konkordanzen einen Einfluss auf die 3 Klassifikationen, das Grading oder die Lokalisation des Karzinoms haben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgelistet. Da in allen Fällen $p > 0,05$ ist, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, so dass die Nullhypothese beibehalten wird.

Die gleiche Feststellung fand sich bei der Betrachtung des KRAS-Status innerhalb der Konkordanzen (s. Tabelle 20).

Tabelle 19: Exakter Test nach Fisher: TNM-Klassifikation vs. Konkordanz-Status

	Exakter Test nach Fisher
T-Klassifikation	$p = 0,061$
N-Klassifikation	$p = 0,921$
M-Klassifikation	$p = 0,224$
Grading	$p = 0,135$
Lokalisation	$p = 0,161$

Tabelle 20: Exakter Test nach Fisher: TNM-Klassifikation vs. KRAS-Status (Konkordanzen)

	Exakter Test nach Fisher
T-Klassifikation	$p = 0,821$
N-Klassifikation	$p = 0,669$
M-Klassifikation	$p = 0,376$
Grading	$p = 0,538$
Lokalisation	$p = 0,205$

3.4.4 KRAS-Status vs. Histologie

Ziel der folgenden Betrachtung ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen den histomorphologischen Charakteristika und dem KRAS-Status festzustellen. Betrachtet wurden die Gewebe getrennt nach KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation, mit dem Ergebnis, dass die Molekulargenetik sich histomorphologisch nicht widerspiegelt. Sowohl bei vorliegendem KRAS-Wildtyp, als auch bei KRAS-Mutation zeigt sich eine vergleichbare Verteilung (s. S. 47, Abb. 13) in der histologischen Klassifizierung.

Es folgt nun anhand ausgewählter HE-Präparate (Abb. 28 - 33) die exemplarische Darstellung von mikroskopisch repräsentativen Geweben. Da sich kein Unterschied im KRAS-Status verzeichnen lässt, wird keine Differenzierung der Abbildungen in KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation vorgenommen. Zuvor zeigt Abb. 27a,b das makroskopisch repräsentative Pendant zu den histologischen Präparaten.

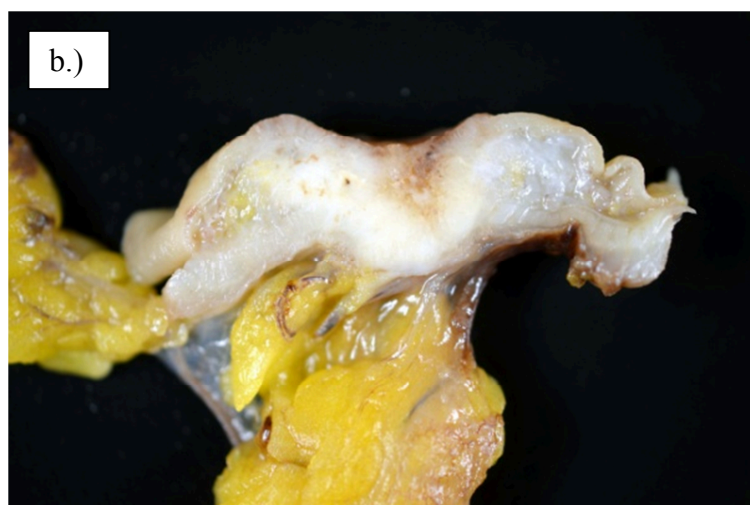
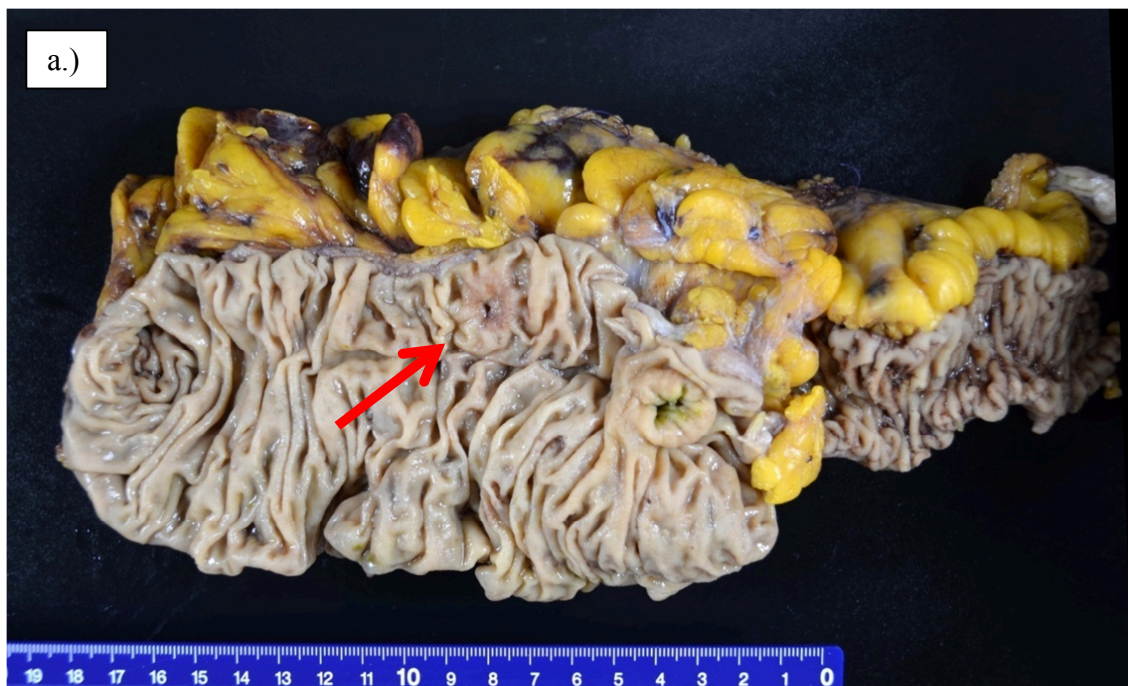


Abb. 27: Makroskopische Bilder eines Rektumkarzinoms

- a.) 2cm im Durchmesser messendes exulceriertes Rektumkarzinom (roter Pfeil)
- b.) Schnittfläche des Karzinoms mit infiltrativem Wachstumsmuster bis in die äußeren Schichten der Tunica muscularis

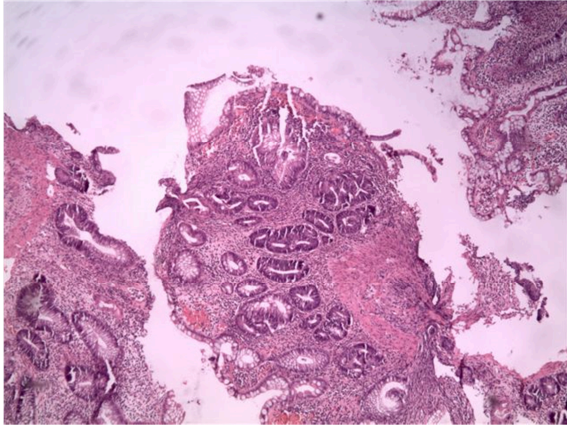


Abb. 28: **mäßig differenziertes Adenokarzinom (G2) des Kolons**
ausgedehnte Nekrosen, fokale
Entzündungsinfiltrate, HE,
Vergrößerung: 40fach

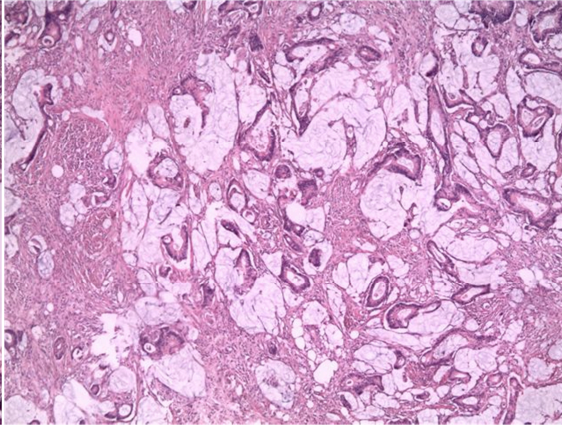


Abb. 29: **mäßig differenziertes muzinöses Adenokarzinom (G2) des Kolons**
ausgedehnte Schleimseen, vereinzelt
Entzündungsinfiltrate, HE,
Vergrößerung: 100fach

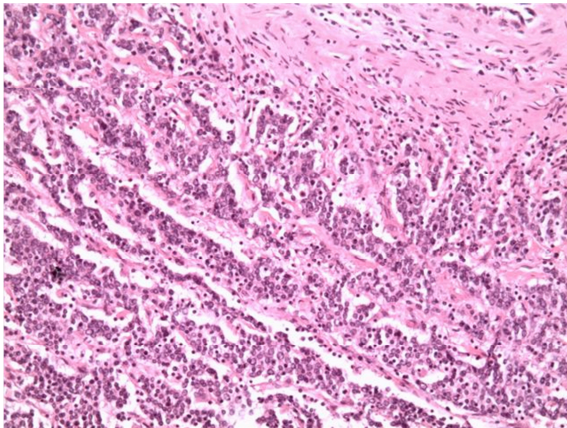


Abb. 30: **wenig differenziertes kleinzelliges Adenokarzinom (G3) des Kolons**
targetartiges Wachstum, kräftige
Entzündungsinfiltrate, HE,
Vergrößerung: 100fach

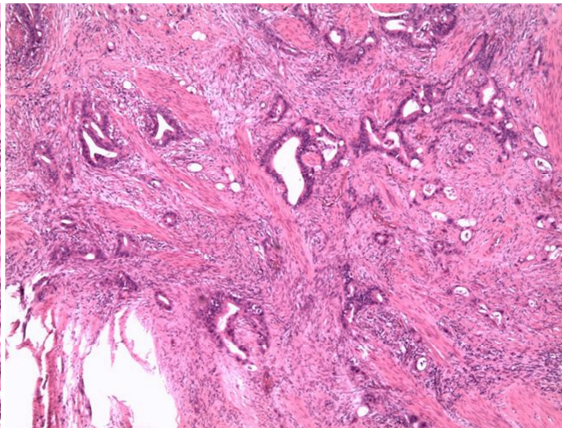


Abb. 31: **mäßig differenziertes Adenokarzinom (G2) des Rektums**
verteilte Tumorzellverbände mit
ausgedehnten Entzündungsinfiltraten, HE,
Vergrößerung: 100fach

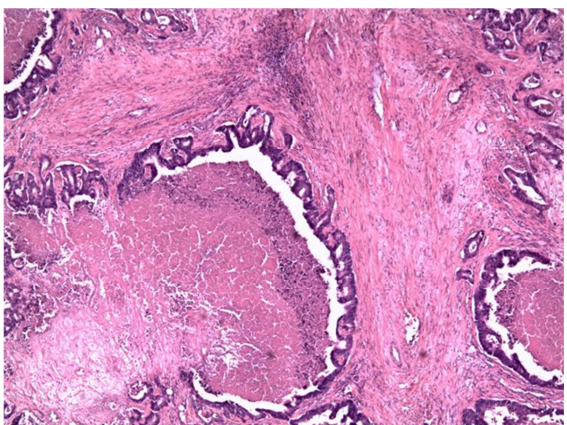


Abb. 32: **Lebermetastase eines wenig differenzierten Adenokarzinoms (G3) des Rektums**
ausgedehnte Nekrosen, HE,
Vergrößerung: 200fach

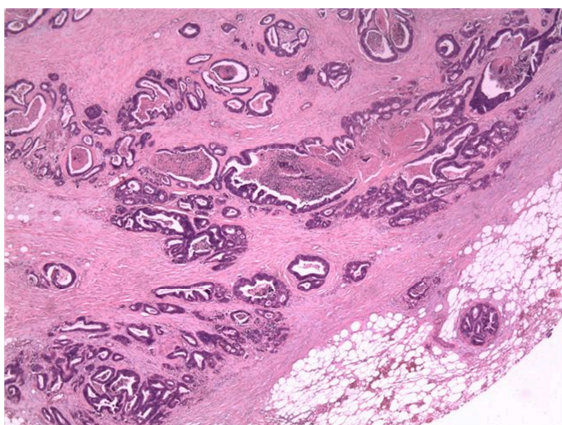


Abb. 33: **Lymphknotenmetastase eines mäßiggradig differenzierten Adenokarzinoms (G2) des Kolons**
vereinzelt Nekrosen, HE,
Vergrößerung: 100fach

3.5 Follow-up

Die Erhebung der Follow-up-Daten konnte bei allen 60 Patienten erfolgen. Diese Daten variieren jedoch aufgrund des interindividuellen Erkrankungsalters und der Erkrankungsdauer in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den 38 (=63,33%) bereits vor dem 1.7.2010, dem Stichtag der Abfrage, verstorbenen Patienten (s. Abb. 34) sind die krankengeschichtlichen Fakten und therapierelevanten Daten vollständig vorhanden. Das Zeitfenster vom Erstdiagnosedatum bis zum Todeszeitpunkt umspannt bei diesen 6,3 Monate bis 13,9 Jahre, mit einer mittleren Follow-up-Zeit von 3,7 Jahren (STD: 2,68).

Von den restlichen 22 Erkrankten (=36,67%) liegen jene Daten nur bis zum Stichtag des 1.7.2010 vor. Je nach Erstdiagnosezeitpunkt variiert bei diesen somit die Zeitspanne der Betrachtungsdauer von 17 Monaten bis 12,5 Jahren. Ihre mittlere Follow-up-Zeit liegt derzeit bei 3,6 Jahren (STD: 2,50).

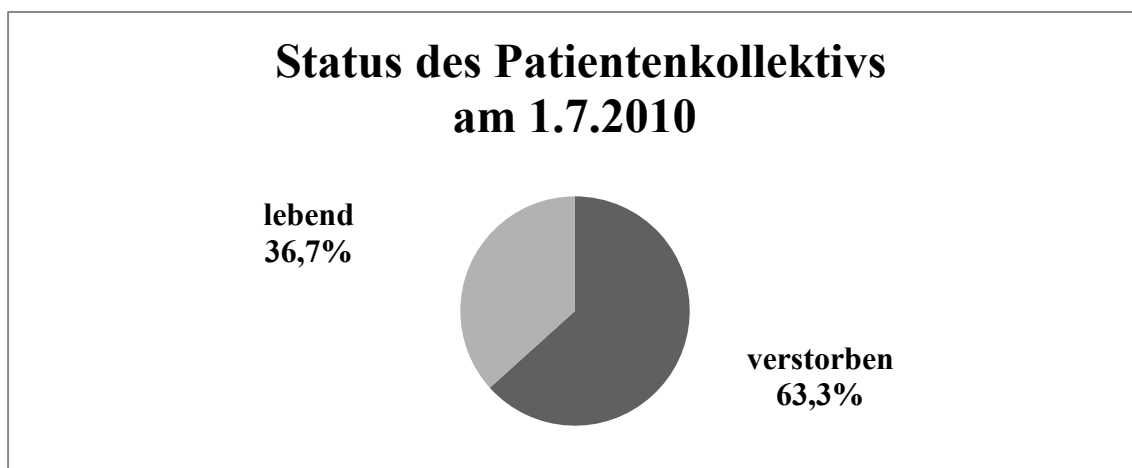


Abb. 34: Graphische Darstellung des Lebensstatus der Patienten am Stichtag der Befragung, 1.7.2010; Tortendiagramm (n=60)

Die Patienten wurden im Durchschnitt ca. 3 Monate nach Bekanntwerden der Erstdiagnose an ihrem Kolon- bzw. Rektumkarzinom operiert. Mit 8 Ausnahmen wurden alle Patienten im Anschluss an die Operation mit einer Chemotherapie versorgt. Die Wahl der Chemotherapie bzw. des Therapieregimes war abhängig von dem

damaligen medizinischen Wissensstand bzgl. der Wirksamkeit beim metastasierten kolorektalen Karzinom. Da der Zeitraum der Erstdiagnose des Gesamtkollektivs 13,3 Jahre umfasst (zwischen 01/1996 und 04/2009), sind die einzelnen Patienten je nach damals vorherrschender Leitlinie mit unterschiedlichen First-Line-, Second-Line-, Third-Line- usw. Therapien behandelt worden.

Die bereits erwähnten 8 Ausnahmen entsprechen den Patienten mit UICC-Stadium I und II. Bei diesen bestand im Anschluss an die Primäroperation keine Indikation zu einer Chemotherapie. Aufgrund der späteren Entwicklung von Metastasen bzw. des Auftretens von Rezidiven war diese mit einer Latenz von durchschnittlich 4,3 Jahren doch erforderlich.

3.5.1 Ansprechen der First-Line-Chemotherapie

Insgesamt erfolgten im Mittel 8,4 Zyklen (K: 8,3 Zyklen; D: 8,8 Zyklen) einer First-Line-Chemotherapie vor dem ersten Staging. Dieses ergab, dass bei 66,67% der Patienten nach der First-Line-Therapie die Erkrankung nicht weiter voranschritt und sogar teilweise remittierte („kontrollierte Erkrankung“). Die restlichen 33,33 % unterlagen ohne Anschläge der Chemotherapie einem Fortschreiten der Erkrankung (s. Tabelle 21, Abb. 35).

Tabelle 21: Zusammenfassung der Verteilung des Ansprechens der First-Line Chemotherapie am Gesamtkollektiv; eingeteilt nach den 4 Kategorien nach RECIST

	kontrollierte Erkrankung			Progress	Summe
	CR (Complete response)	PR (Partial response)	SD (Stable disease)	PD (Progressive disease)	
Gesamtkollektiv	11	15	14	20	60
Prozent (%)	18,33%	25,00%	23,33%	33,33%	100,00%

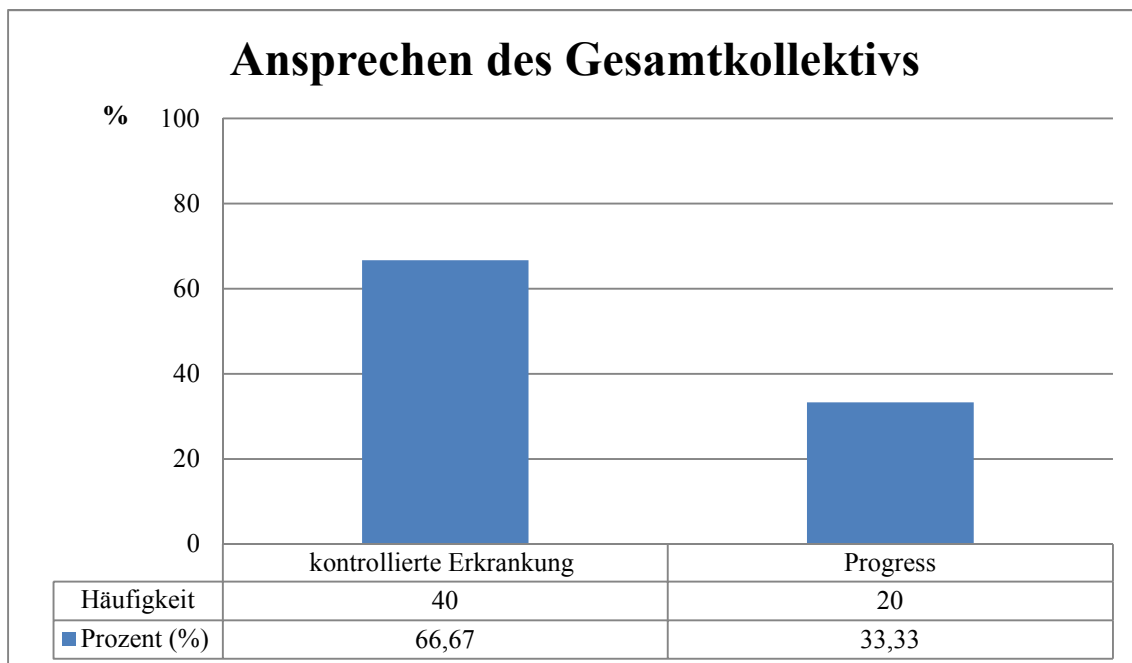


Abb. 35: Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse des Ansprechens der First-Line-Chemotherapie zwischen der kontrollierten Erkrankung (CR, PR, SD) und dem Progress (PD); (n=60)

Abb. 36 und Abb. 37 zeigen das Ergebnis der First-Line-Chemotherapie getrennt nach ihrem Kordanz-Status.

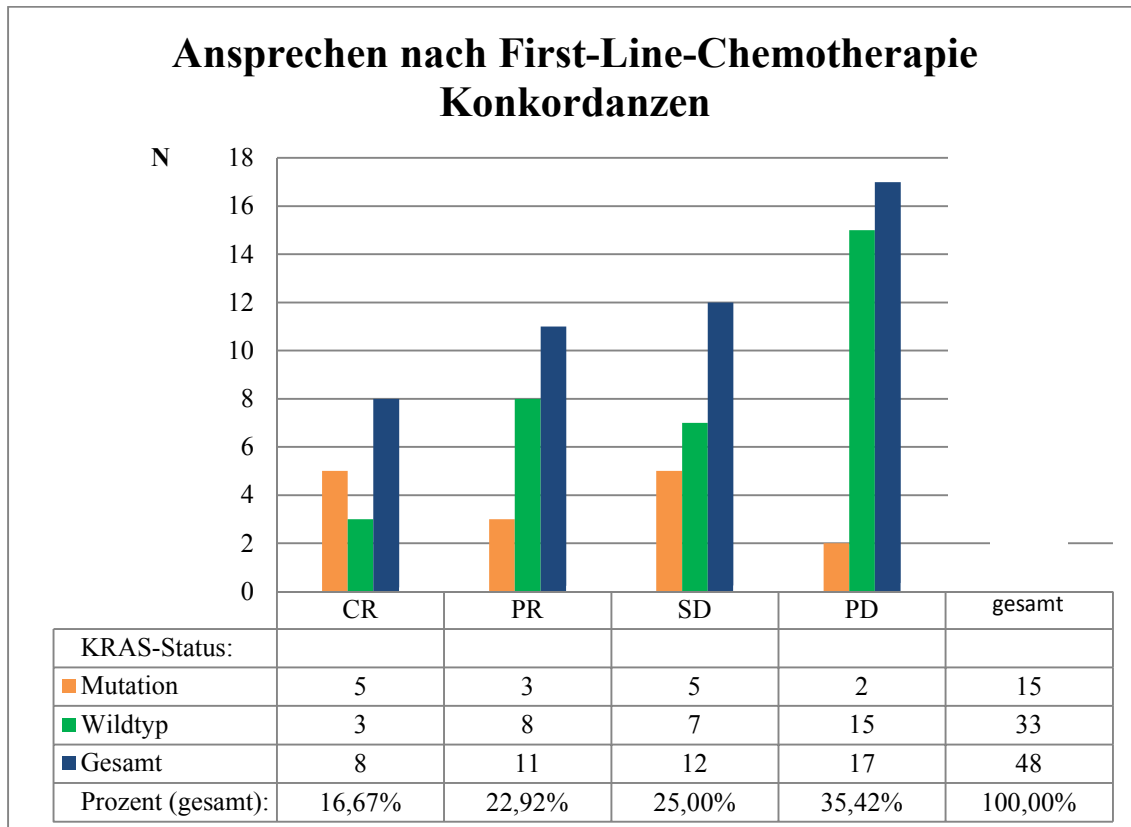


Abb. 36: Vergleichende graphische und tabellarische Darstellung des Ansprechens der Konkordanzen auf die First-Line-Chemotherapie, inklusive der getrennten Betrachtung von KRAS-Wildtyp und -Mutation, eingeteilt nach RECIST (n=48)
 Legende:
 CR: complete response; PR: partielle response; SD: stable disease; PD: progressive disease

In Abb. 36 ist zu erkennen, dass in der Gruppe der Konkordanzen der Progress der Erkrankung (PD) mit 35,42% Spitzenreiter der 4 Kategorien ist. Unter Zusammenfassung der restlichen Kategorien, die eine „kontrollierte Erkrankung“ beschreiben, kommt es in 64,59% der Fälle zu einem erfolgreichen Ansprechen. In Anbetracht des vorherrschenden KRAS-Mutationsstatus kann eine unterschiedliche Aussage über das Ansprechen gemacht werden. Bei einem KRAS-Wildtyp besteht bei 15 von 33 Fällen (=45,45%) ein Progress, während bei vorliegendem mutiertem KRAS-Gen lediglich 2 von 15 (=13,33%) Fälle ein Fortschreiten der Erkrankung zeigen. Die vorherrschenden Kategorien bei zugrundeliegender KRAS-Mutation sind die komplette Remission (CR)

sowie die stabile Erkrankung (SD). Mittels „Exaktem Test nach Fisher“ zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied im Ansprechen zwischen KRAS-Wildtyp und -Mutation (s. Tabelle 22).

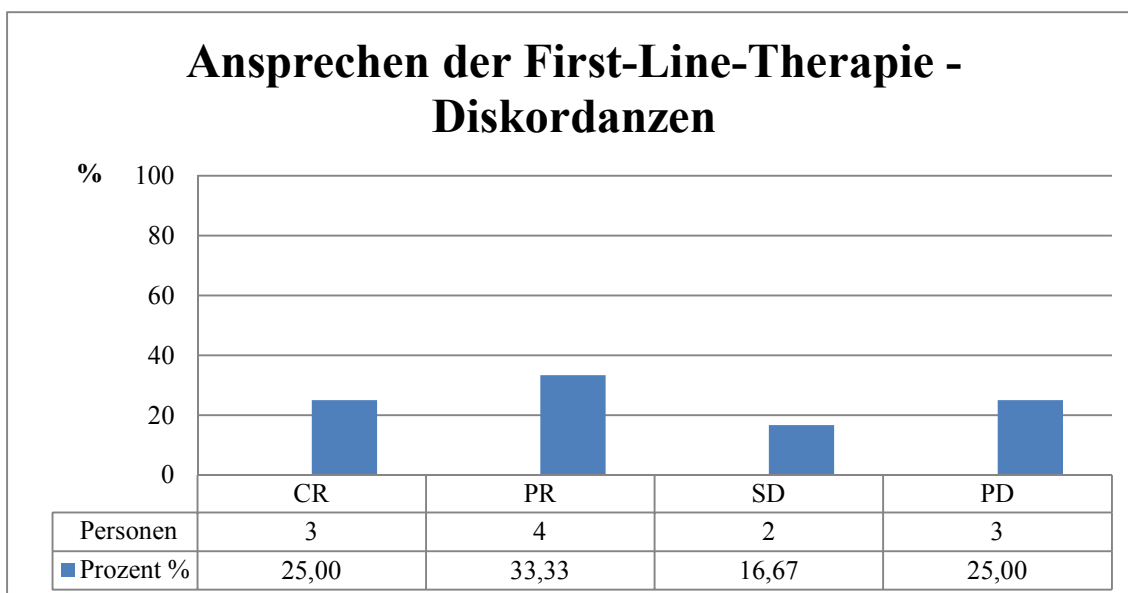


Abb. 37: Vergleichende graphische und tabellarische Darstellung des Ansprechens der Diskordanzen auf die First-Line-Chemotherapie, eingeteilt nach RECIST (n=12)
 Legende: CR: complete response; PR: partielle response; SD: stable disease; PD: progressive disease

Wie aus Abb. 37 ersichtlich ist, liegt der Schwerpunkt des Ansprechens bei den Diskordanzen geringfügig im Bereich der partiellen Remission mit 33,33%, jedoch dicht gefolgt von sowohl der kompletten Remission (CR) wie auch dem Progress (PD), die jeweils 25% ausmachen.

Tabelle 22: Exakter Test nach Fisher (First-Line-Chemotherapie)
 Legende: WT: Wildtyp; Mut: Mutation; p: probability

	Exakter Test nach Fisher
Diskordanzen vs. Konkordanzen	p = 0,692
Konkordanzen: KRAS-WT vs. KRAS-Mut	p = 0,061

3.5.2 Ansprechen der Therapie mit „Panitumumab“ (Vectibix®)

Mit dem Anti-EGFR-Antikörper „Panitumumab“ wurden nur 5 Patienten des Kollektivs behandelt, so dass sich die Fallzahl hier auf lediglich n=5 beläuft. Bei vier dieser Erkrankten liegt ein KRAS-Wildtyp zugrunde, während bei einem ein diskordantes Verhalten im Mutationsstatus existiert.

Die Verabreichung des Antikörpers erfolgte bei allen als Third-Line-Therapie bzw. Fourth-Line-Therapie.

Diese 5 Fälle sind im Einzelnen in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Zusammenstellung der zeitweilig mit Panitumumab therapierten Patienten (n=5)

Legende:

n.e.: (noch) nicht erfolgt;

PR: partial response; PD: progressive disease; Panitumumab: Vectibix®;

FOLFIRI: Folinsäure, Fluoruracil, Irinotecan

Patienten	KRAS-Status	Therapie	Therapiedauer	Staging
1	konkordant - Wildtyp	Panitumumab	3 Monate	PD
2	konkordant - Wildtyp	Panitumumab	4 Monate	PD
3	konkordant - Wildtyp	Panitumumab	3 Monate	n.e.
4	diskordant	Panitumumab	2 Monate	PR
5	konkordant - Wildtyp	Panitumumab + FOLFIRI	1 Monate	PD

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich ist, war in einem Fall noch kein Staging nach der Antikörpergabe erfolgt. Hierbei wurde „Panitumumab“ das erste Mal kurz vor dem Stichtag der Follow-Up-Abfrage verabreicht, so dass damit keine Aussage über das Ansprechen möglich ist. In weiteren zwei Fällen verstarben die Patienten unter Therapie am Progress der Erkrankung (PD).

Eine Staginguntersuchung ärztlicherseits erfolgte somit in nur 2 Fällen.

Beim ersten Patienten wurde der Antikörper in Kombination mit FOLFIRI verabreicht, jedoch nach einem Monat wieder abgesetzt, da ein massiver Progress des metastasierten kolorektalen Karzinoms festgestellt wurde. Anschließend wurde auf Cetuximab mit FOLFIRI umgeschwenkt, mit dem Ergebnis einer partiellen Remission.

Die Einnahme von „Panitumumab“, bei unklarem KRAS-Mutationsstatus im Primarius, jedoch Vorliegen eines diskordanten KRAS-Mutationsstatus in Metastasen und

Rezidiven, zeigte bei dem zweiten Patienten nach 2 Monaten eine partielle Remission (PR). Bei Fortführung für 2 weitere Monate verschlechterte sich der Zustand und der Progress der Erkrankung setzte sich fort.

Das diskordante Verhalten basiert hier auf ermittelten Wildtypen im KRAS-Gen von einer Lymphknotenmetastase, einer Lebermetastase sowie 2 Rezidiven und 2 Mutationen (Cod12Cys; Cod12Cys/Cod13Asp) in weiteren 2 Rezidiven.

3.5.3 Ansprechen der Therapie mit „Cetuximab“ (Erbitux®)

Von den insgesamt 33 konkordanten Fällen mit KRAS-Wildtyp wurden 14 Patienten (=42,42%) zeitweilig mit „Cetuximab“ behandelt. Ebenfalls erhielt ein Patient mit einer KRAS-Mutation (Cod12Cys in Primarius, Bauchdeckenmetastase und Rezidiv) aus unklaren Gründen „Cetuximab“ verabreicht. Damit beläuft sich die Fallzahl der mit „Cetuximab“ therapierten Patienten auf n=15.

In allen Fällen wurde dieser Antikörper erst als Third-Line-, Fourth-Line- oder Fifth-Line-Therapie eingesetzt. In 11 der Fälle fand er in einer Kombinationstherapie Anwendung, bei 4 Fällen dagegen als Monotherapie.

Das Ansprechen der Therapie wurde nach durchschnittlich 5,5 Zyklen bei 14 Patienten überprüft. Ein Patient (KRAS-Wildtyp) verstarb unter der Monotherapie, da seine Erkrankung massiv voranschritt. Ein Zyklus umfasst 2 Wochen.

Abb. 38 stellt die verschiedenen Therapien unter der obligaten Verwendung von „Cetuximab“ im Vergleich zum Therapieansprechen dar.

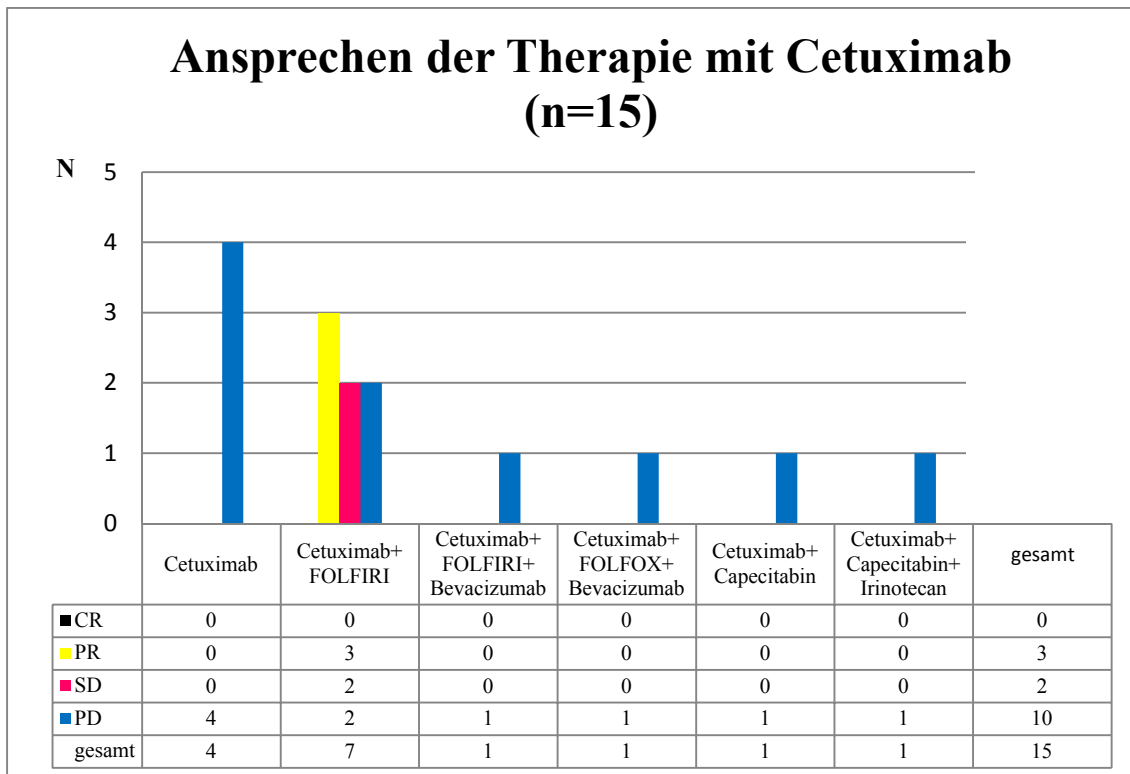


Abb. 38: Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der einzelnen Kombinationstherapien und der Monotherapie mit „Cetuximab“ in Bezug auf das Therapieansprechen (n=15)

Legende:

CR: complete response; PR: partielle response; SD: stable disease; PD: progressive disease;

FOLFIRI: Folinsäure, Fluoruracil, Irinotecan;

FOLFOX: Folinsäure, Fluoruracil, Oxaliplatin

Abb. 38 macht deutlich, dass die Verabreichung von Cetuximab in Monotherapie die Erkrankung bei 4 von 4 Patienten (=100%) nicht unter Kontrolle bringen konnte. Auch unter der Anwendung von Kombinationstherapien überwiegt der Progress der Erkrankung mit 6 von 11 (=54,54%) Fällen.

Bei 5 Patienten, die jeweils mit der Kombination aus Cetuximab und FOLFIRI behandelt wurden, gelang in 3 Fällen eine partielle Remission, sowie in 2 Fällen eine Stabilisierung der Erkrankung. Damit wurde unter dieser Therapie bei 5 von 7 Therapierten (=71,43%) die Erkrankung zeitweilig unter Kontrolle gebracht. Der einzige mit Cetuximab therapierte Patient mit KRAS-Mutation profitierte nicht von ihrer Gabe. Die Erkrankung schritt unter Kombinationstherapie von Cetuximab mit FOLFIRI weiter voran.

3.5.4 Therapiewechsel

Durch das Fortschreiten der Erkrankung (PD) unter Therapie ist ein Therapiewechsel auf ein anderes Regime indiziert. Durchschnittlich sind bei den Konkordanzen 3,25 Therapiewechsel (STD: 1,47) notwendig, während es bei den Diskordanzen im Mittel nur 2,50 Änderungen (STD: 1,24) bedarf. Die Häufigkeit der Therapiewechsel wird in Tabelle 24 und Abb. 39 dargestellt. Mittels „Exaktem Test nach Fisher“ wurde zusätzlich der Einfluss des Konkordanz-Status auf die Therapiewechselanzahl ermittelt, mit dem Ergebnis von $p=0,268$.

Tabelle 24: Vergleichende tabellarische Darstellung der Verteilung der Anzahl an Therapiewechseln bzgl. des Konkordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

	Therapiewechsel (N)							gesamt
	1	2	3	4	5	6	7	
KRAS-Status								
Konkordanzen								
Wildtyp	4	3	9	10	4	2	1	33
Mutation	3	4	5	1	2	-	-	15
Diskordanzen	3	4	1	4	-	-	-	12
gesamt	10	11	15	15	6	2	1	60
Prozent (%)	16,67%	18,33%	25,00%	25,00%	10,00%	3,33%	1,67%	100,00%

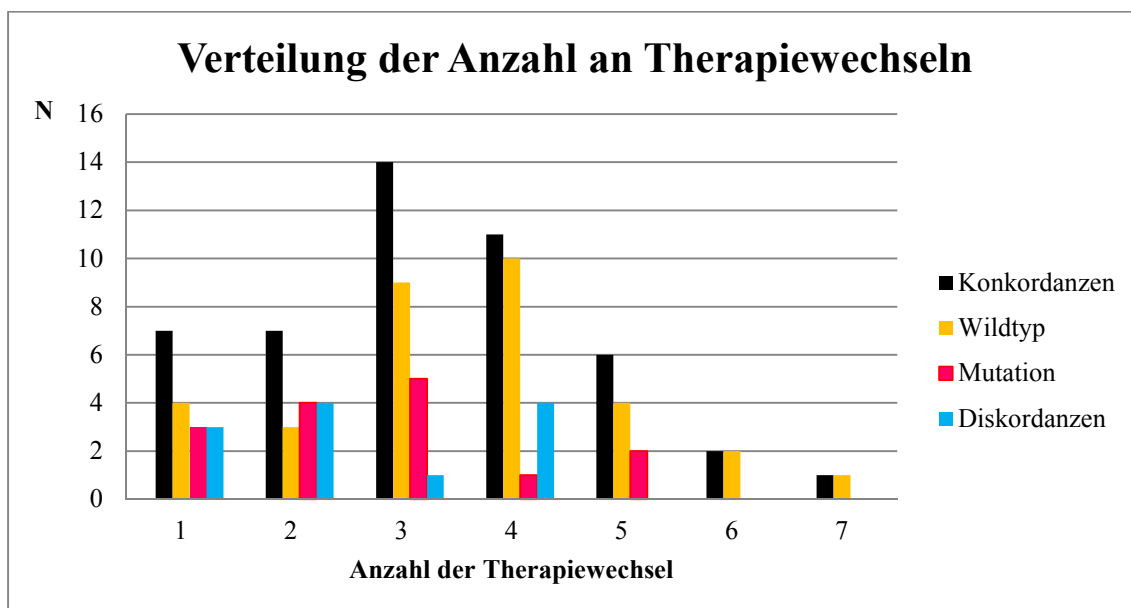


Abb. 39: Vergleichende graphische Darstellung der Verteilung der Anzahl an Therapiewechseln bzgl. des Konkordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

3.5.5 Therapieabbruch / Therapieunterbrechung

Dass eine Therapie abgebrochen werden muss, kann die Folge verschiedenster Umstände sein. Gründe stellen auf der einen Seite das Fortschreiten der Erkrankung dar, woraufhin ein Therapiewechsel erfolgen sollte. Auf der anderen Seite können es massive Nebenwirkungen sein, die nicht beherrschbar sind. Ebenfalls wird zu den Gründen eines Therapieabbruches der Tod eines Patienten gezählt.

Abb. 40 und 41 legen die Gründe für einen Therapieabbruch getrennt nach Konkordanzen / Diskordanzen graphisch dar.

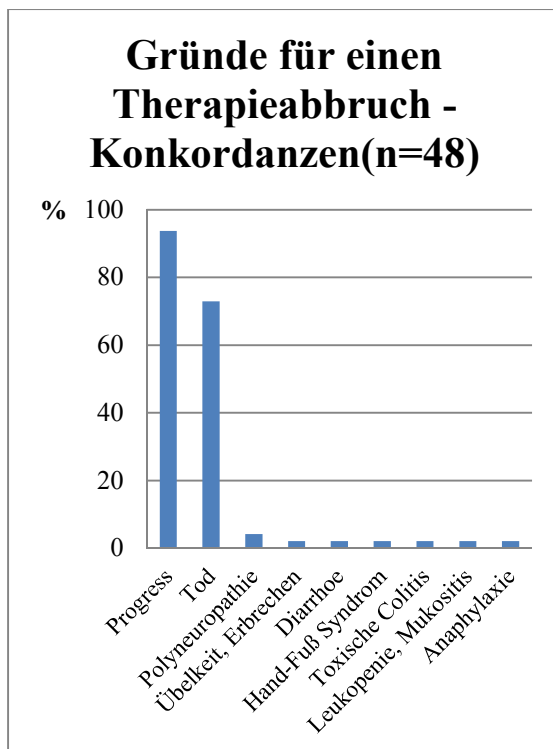


Abb. 40: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gründe für einen Therapieabbruch bei den Konkordanzen; Säulendiagramm (n=48)

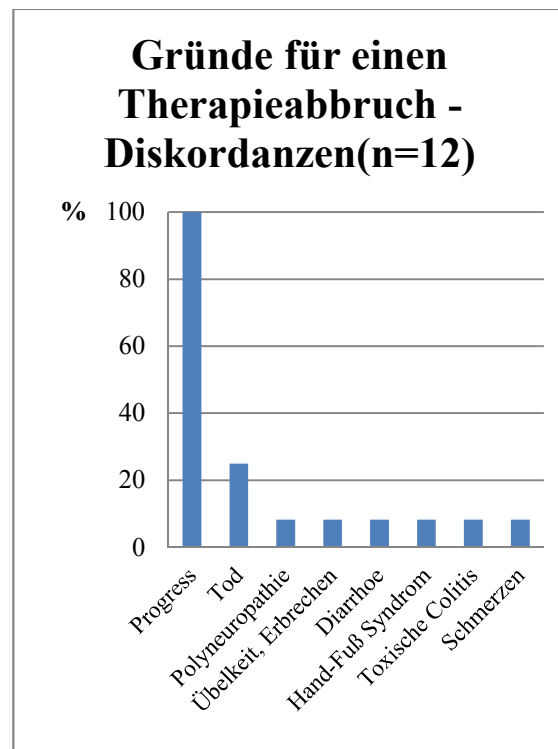


Abb. 41: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gründe für einen Therapieabbruch bei den Diskordanzen; Säulendiagramm (n=12)

Der Vergleich zwischen der graphischen Abb. 40 und 41 zeigt anschaulich, dass keine auffälligen Ursachenunterschiede für einen Therapieabbruch in Bezug auf den Konkordanz-Status zu finden sind. Bei den Diskordanzen unterlagen alle Patienten (12=100%) einem Progress ihrer Erkrankung, hingegen bei den Konkordanzen nur 45 (=93,75%) von 48 Patienten. Bei 35 (=72,92%) der 48 Erkrankten mit konkordantem Mutationsstatus war

der Tod für den Abbruch der Therapie verantwortlich. Unter den Diskordanzen fand sich der Tod nur in 3 (=25%) von 12 Fällen als Abbruchgrund. Alle weiteren in Abb. 40 und 41 aufgelisteten Gründe traten in einer Häufigkeit von jeweils unter 10% auf und waren teilweise nur in Einzelfällen nachzuweisen.

Therapieunterbrechungen erfolgten nach einer Remission (komplett und partiell) sowie teilweise auch bei stabilem Verhalten der Erkrankung. Bezogen auf das Follow-up der Patienten ergibt sich das in Tabelle 25 gelistete Ergebnis. Bei den Konkordanzen zeigt sich mit 13,8 Monaten (STD: 20,39) eine längere Therapiepause als bei den Diskordanzen mit 10,2 Monaten (STD: 6,83), jedoch verdeutlicht die Anwendung des T-Tests (unverbunden), dass kein signifikanter Unterschied bzgl. sowohl des Konkordanz-Status als auch des KRAS-Status besteht (s. Tabelle 26).

Tabelle 25: Tabellarische Darstellung der Dauer der Therapieunterbrechung im Mittel nach den Stagingergebnissen CR, PR, SD

	N	durchschnittliche Therapieunterbrechung in Monaten	STD
KRAS-Status			
Konkordanzen	28	13,80	20,39
Wildtyp	18	16,00	24,90
Mutation	10	9,85	7,05
Diskordanzen	10	10,20	6,83

Tabelle 26: T-Test unverbunden (durchschnittliche Therapieunterbrechungen)
Legende: WT: Wildtyp; Mut: Mutation; p: probability

	T-Test unverbunden
Diskordanzen vs. Konkordanzen	p = 0,420
Konkordanzen: KRAS-WT vs. KRAS-Mut	p = 0,338

3.5.6 Rezidive und Fernmetastasen

In der detaillierten Betrachtung des Krankheitsverlaufs der Patienten wird auch das Auftreten von Rezidiven sowie die Neuentwicklung von Metastasen betrachtet. Hauptaugenmerk dabei ist die evtl. Abhängigkeit des KRAS-Mutationsstatus von der Häufigkeit des Auftretens. Ebenso wird verglichen, ob ein möglicher Zusammenhang mit Diskordanzen nachzuweisen ist. Die Tabellen 27 - 30 zeigen die Verteilung der Entstehung von Rezidiven und Fernmetastasen der 60 Erkrankten, die zum Zeitpunkt der Operation noch nicht nachweisbar waren, sondern erst im Verlauf der Erkrankung auftraten (graphische Darstellung in Abb. 42 - 45).

Im Zuge der Betrachtung der neu entstandenen Fernmetastasen (metachron) wird auch die Lokalisation dieser in die Analyse mit eingezogen. Abb. 46 veranschaulicht die Lokalisationen und deren Häufigkeiten in Abhängigkeit von der Kordanz. Initial vorhandene Fernmetastasen (synchron) werden in Abb. 17 (s. S. 52) und Abb. 24 (s. S. 66) in analoger Weise dargestellt. Der Einfluss der bei Erstdiagnose vorhandenen Fernmetastasen auf die Überlebenszeit bzw. die Mortalität sowie das progressionsfreie Überleben wird in Kapitel 3.7 veranschaulicht.

3.5.6.1 Rezidive

Tabelle 27: Rezidive vs. Kordanz/KRAS

	Rezidive				gesamt	
	JA		Nein			
KRAS-Status	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen						
Wildtyp	4	12,12	29	87,88	33	100,00%
Mutation	4	26,67	11	73,33	15	100,00%
Diskordanzen	1	8,33	11	91,67	12	100,00%
gesamt	9	15,00	51	85,00	60	100,00%

Tabelle 28: Exakter Test nach Fisher (Rezidive)
 Legende: WT: Wildtyp; Mut: Mutation; p: probability

	Exakter Test nach Fisher
Diskordanzen vs. Konkordanzen	p = 0,420
Konkordanzen: KRAS-WT vs. KRAS-Mut	p = 0,148

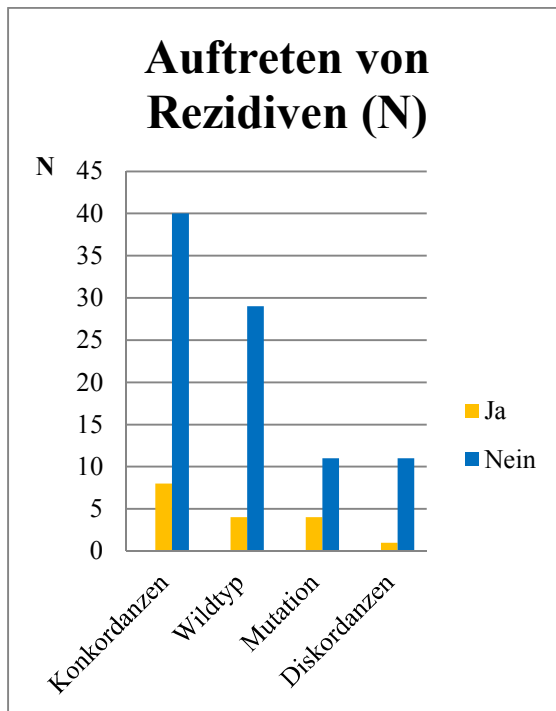


Abb. 42: Graphische Darstellung der numerischen Verteilung des Rezidiv-auftritts bzgl. des Konkordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

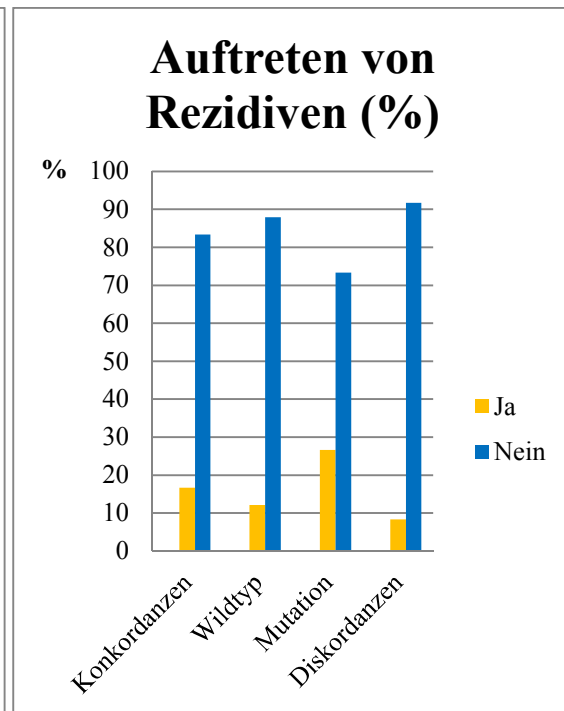


Abb. 43: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Rezidiv-auftritts bzgl. des Konkordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Die dargestellten Ergebnisse bzgl. des Auftretens von Rezidiven (Tabelle 27, Abb. 42 und 43) zeigen, dass nur 9 (=15%) von 60 Patienten ein Rezidiv im Verlauf ihrer Erkrankung bekamen. 8 dieser Rezidive (=88,89%) traten bei Konkordanzfällen auf, während ein einzelner Fall (=11,11%) aus der Gruppe der Diskordanzen stammt.

Dieser einzelne Fall stellt eine Besonderheit dar.

Hier kam es zur Entwicklung von 4 parallel aufgetretenen Rezidiven, von denen 2 einen KRAS-Wildtyp besaßen, die beiden anderen ein mutiertes KRAS-Gen.

Bei Vorliegen einer KRAS-Mutation kam es bei 4 (=26,67%) der 15 Patienten zur Entstehung von Rezidiven. Im Vergleich dazu entstanden bei einem KRAS-Wildtyp ebenfalls bei 4 (=12,12%), allerdings von 33 Fällen, Rezidive.

3.5.6.2 Neue Fernmetastasen

Tabelle 29: Vergleichende tabellarische Darstellung der bereits bei Erstdiagnose vorhandenen Fernmetastasen (synchron) und der unter Therapie neu hinzugekommenen Fernmetastasen (metachron) (n=60)

	synchrone Fernmetastasen				gesamt	
	JA		Nein			
metachrone Fernmetastasen	N	%	N	%	N	%
Ja	10	55,56	8	44,44	18	100,00
Nein	29	69,05	13	30,95	42	100,00
gesamt	39	65,00	21	35,00	60	100,00

Tabelle 30: Vergleichende tabellarische Darstellung der neu entstandenen Fernmetastasen und des Konkordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60)

	metachrone Fernmetastasen				gesamt	
	JA		Nein			
KRAS-Status	N	%	N	%	N	%
Konkordanzen						
Wildtyp	11	33,33	22	66,67	33	100,00
Mutation	5	33,33	10	66,67	15	100,00
Diskordanzen	2	16,67	10	83,33	12	100,00
gesamt	18	30,00	42	70,00	60	100,00

Tabelle 31: Exakter Test nach Fisher (Fernmetastasen)
Legende: WT: Wildtyp; Mut: Mutation; p: probability

	Exakter Test nach Fisher
synchron vs. metachron	p = 0,238
Diskordanzen vs. Konkordanzen	p = 0,224
Konkordanzen: KRAS-WT vs. KRAS-Mut	p = 0,624

Bezüglich der Frage, ob ein signifikanter Einfluss der synchronen auf die Entwicklung von metachronen Fernmetastasen besteht, fand der „Exakte Test nach Fisher“ Anwendung, der eine Signifikanz mit $p=0,238$ ausschließt.

Mit $p=0,224$ und $p=0,624$ wird auch der mögliche Einfluss des Kordanz-Status sowie des KRAS-Status wiederlegt. (s. Tabelle 31)

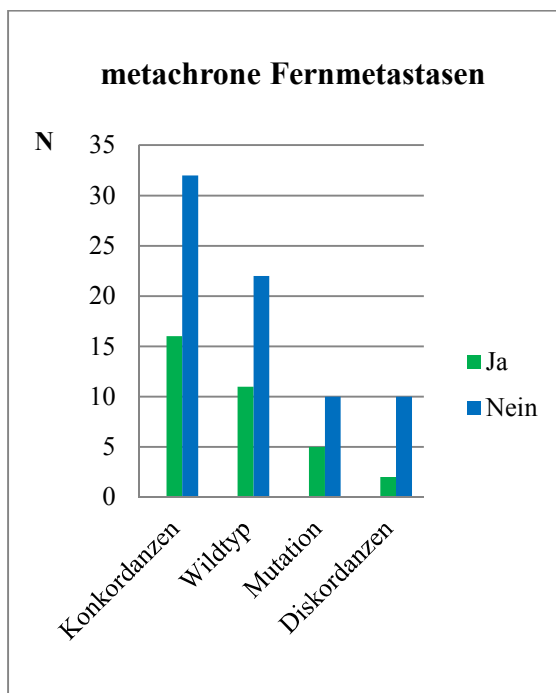


Abb. 44: Vergleichende graphische Darstellung der numerischen Verteilung der metachronen Fernmetastasen und des Kordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60)

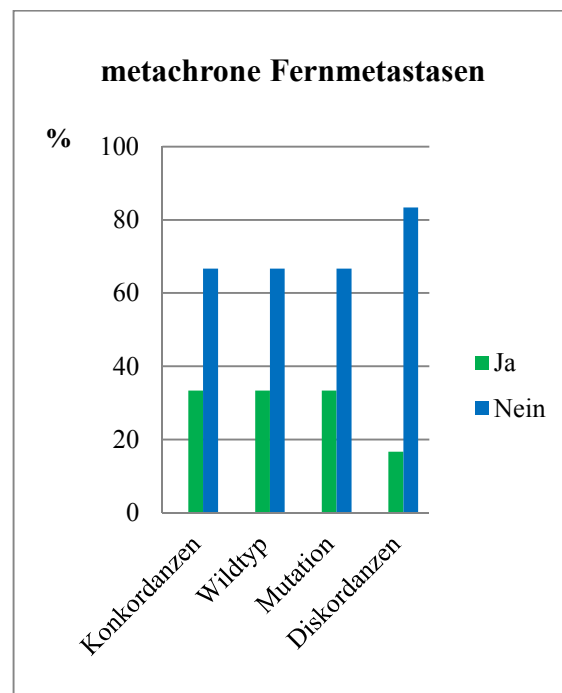


Abb. 45: Vergleichende graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der metachronen Fernmetastasen und des Kordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60)

Wie den Tabellen 30, 31 und Abb. 44, 45 zu entnehmen ist, kommt es bei 18 (=30%) von 60 Patienten zur Entwicklung von neuen Fernmetastasen. 8 (=44,45%) dieser 18 Erkrankten besaßen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Fernmetastasen (M0). Die anderen 10 Erkrankten (=55,56%) besaßen ein Erstdiagnosestadium M1 und zeigten im Verlauf der Erkrankung eine neue Lokalisation von Fernmetastasen. Die restlichen 29 Patienten der ursprünglich 39 Patienten mit Fernmetastasen bei Erstdiagnose wiesen keine weiteren Lokalisationen an Metastasen auf.

Festzustellen ist, dass bei den Konkordanzen kein prozentualer Unterschied im Hinblick auf den KRAS-Mutationsstatus besteht. Sowohl bei einem KRAS-Wildtyp wie auch bei einer KRAS-Mutation besteht ein ca. 30%iges Auftreten von neu hinzukommenden Fernmetastasen. Dagegen weisen die Diskordanzen mit 2 von 12 Fällen einen wesentlich geringeren Anteil von nur 16,67% auf.

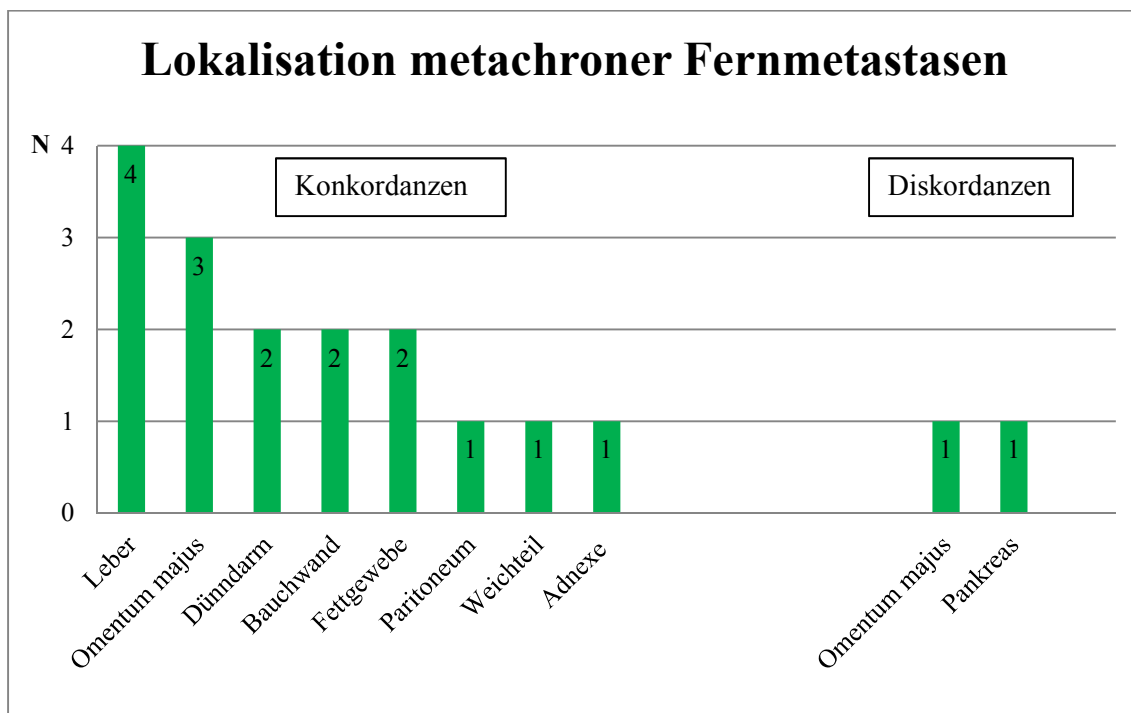


Abb. 46: Vergleichende graphische Darstellung der Lokalisation der neu entstandenen Fernmetastasen getrennt nach dem Konkordanz-Status; Säulendiagramm (n=18)

3.6 KRAS (Cod61) & BRAF (Cod600) - Mutationsanalyse

Zur genaueren Ursachenklärung für ein Nichtansprechen einer Anti-EGFR-Therapie (Panitumumab und/oder Cetuximab) bei zugrunde liegendem KRAS-Wildtyp in Cod12&13 werden die Ergebnisse der Pyrosequenzierung von KRAS (Cod61) und BRAF (Cod600) betrachtet (Tabelle 32). 10 der 11 (=90,90%) Patienten, die auf die Antikörpertherapie nicht erfolgreich reagierten, weisen einen Wildtypstatus in beiden untersuchten Genen auf. 1 von 11 (=9,09%) dagegen zeigt einen Wildtypstatus in

Cod61 des KRAS-Gens, jedoch einen diskordanten BRAF-Status bezüglich Cod600 (V600E). Hier findet sich im Primärtumor eine Mutation, während die Lebermetastase einen Wildtyp präsentiert. Der Patient erhielt Cetuximab.

Tabelle 32: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der zusätzlichen Pyrosequenzierung von KRAS (Cod61) und BRAF (Cod600) bei fehlendem Ansprechen auf Panitumumab und/oder Cetuximab mit zugrunde liegendem KRAS-Wildtyp in Cod12&13; Fallzahl n=11

Konkordanzen	KRAS (Cod61)				BRAF (Cod600)			
	Wildtyp		Mutation		Wildtyp		Mutation	
	N	%	N	%	N	%	N	%
	11	100,00%	0	0,00%	10	90,90%	0	0,00%
Diskordanzen	0 (0,00%)				1 (9,10%)			

3.7 Survivalanalyse

3.7.1 Overall Survival (OS)

Im Folgenden werden Kaplan-Maier-Kurven im Hinblick auf das Gesamtüberleben (overall survival, OS) dargestellt. Das OS wird definiert als die Zeit zwischen der Primäroperation und dem Stichtag der Abfrage am 01.07.2010 (bei vorher eingetretenem Tod bis zum Todesdatum). Wie schon in Kapitel 2.3.7 erwähnt und begründet, besitzen die Kurven keine korrekte statistische Aussagekraft. Ebenfalls umfassen die Subgruppen zu geringe Fallzahlen, so dass eine mögliche Signifikanz weiter hinterfragt werden sollte. Die Kaplan-Maier-Kurven sollen jedoch trotzdem zur Verdeutlichung der Trends herangezogen werden.

Darüber hinaus findet die Log-Rank-Teststatistik Anwendung; bei statistischer Signifikanz ($p < 0,05$) die Cox-Regressionsanalyse.

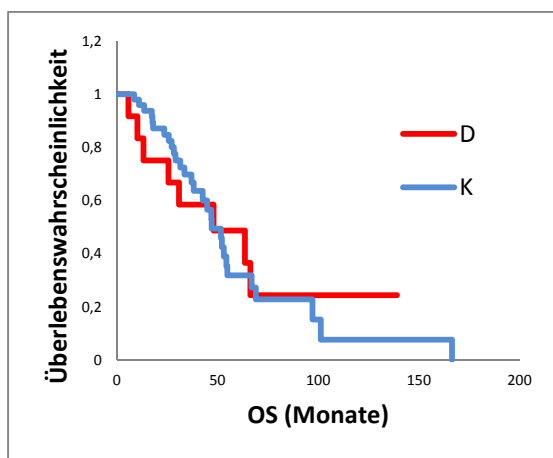


Abb. 47: OS vs. Diskordanzen (D) / Konkordanzen (K) - $p=0,772$

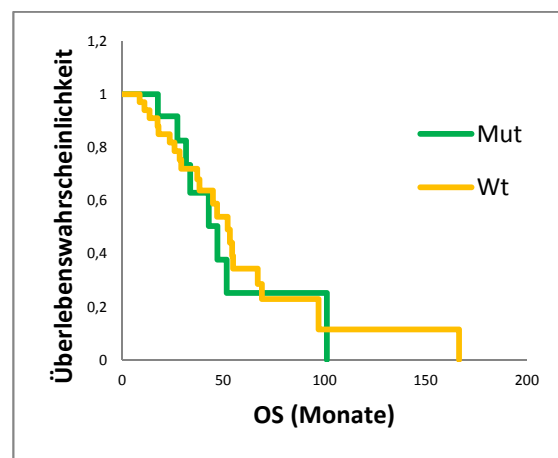


Abb. 48: OS vs. Mutiert (Mut) / Wildtyp (Wt) der Konkordanzen - $p=0,771$

In Abb. 47 wird das gesamte Patientenkollektiv von 60 Personen in die Überlebenszeitanalyse eingebunden. In dem Beobachtungszeitraum von 13,3 Jahren verstarben 38 Patienten; bei 22 Patienten war die Beobachtungszeit zensiert. Die mittlere Überlebenszeit liegt bei den Konkordanzen bei 42,3 Monaten (STD:28,97), den Diskordanzen bei 49,7 Monaten (STD: 39,61). Über die Log-Rank-Teststatistik ergibt

sich ein p-Wert von 0,772, womit ein Unterschied in der Überlebenszeit nicht nachgewiesen werden kann. Da eine Kurvenkreuzung stattfindet und damit kein Proportional Hazard vorliegt, sind die Ergebnisse eines Vergleiches beider Subgruppen nicht aussagekräftig. Folglich ist auch keine Cox-Regression möglich.

Abb. 48 bezieht sich nur auf die Subgruppe der Konkordanzen (n=48). Hier wird betrachtet, inwiefern der KRAS-Mutationsstatus Einfluss auf die Überlebenszeit hat. Mit einem p-Wert von 0,771 besteht auch hier keine Signifikanz und die Aussagekraft der Ergebnisse eines Vergleichs ist ebenfalls nichtig, da kein Proportional Hazard vorliegt.

Im Folgenden werden weitere Parameter als gruppierte Variablen in Bezug auf die Überlebenszeit untersucht. Die Abb. 49 – 56 stellen diese in Form von Kaplan-Maier-Kurven getrennt nach Konkordanzen und Diskordanzen dar.

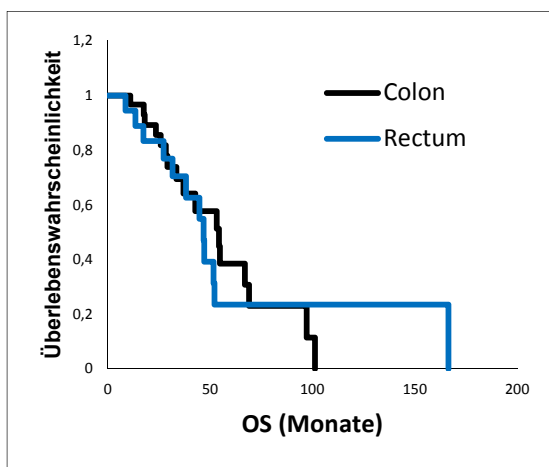


Abb. 49: OS vs. Lokalisation (Konkordanzen)
- p=0,817

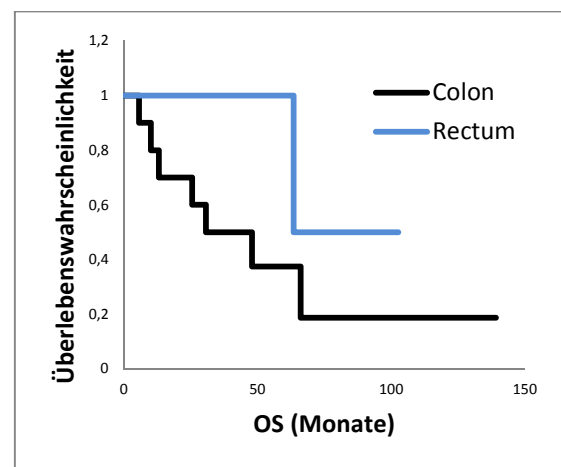


Abb. 50: OS vs. Lokalisation (Diskordanzen)
- p=0,333

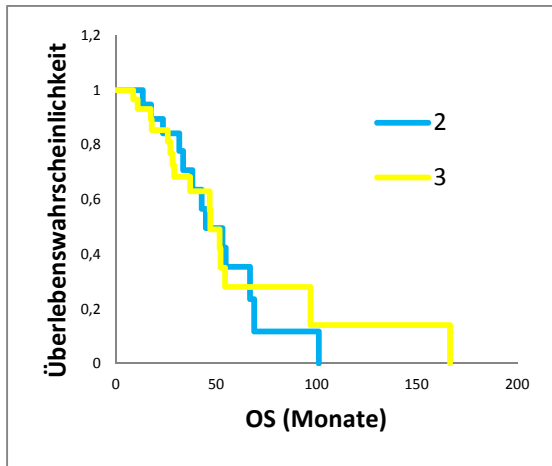


Abb. 51: OS vs. Grading (G2; G3) (Konkordanzen) - $p=0,927$

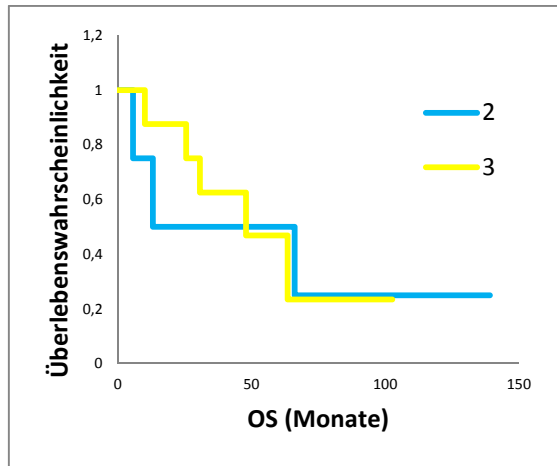


Abb. 52: OS vs. Grading (G2; G3) (Diskordanzen) - $p=0,925$

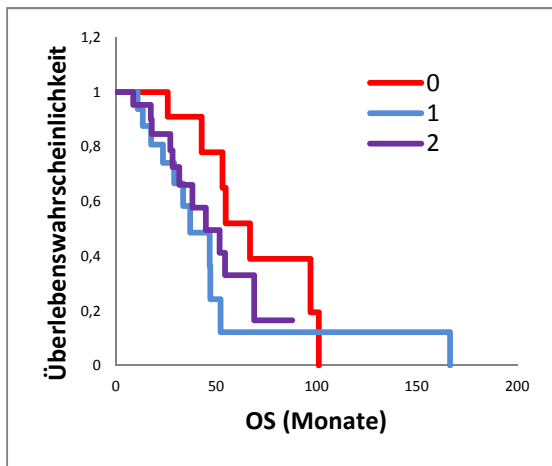


Abb. 53: OS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Konkordanzen) - $p=0,298$

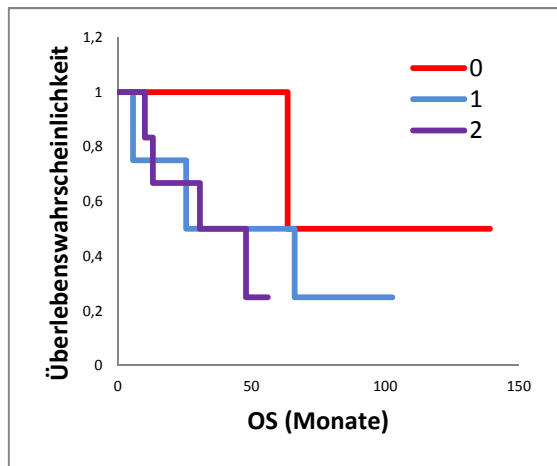


Abb. 54: OS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Diskordanzen) - $p=0,514$

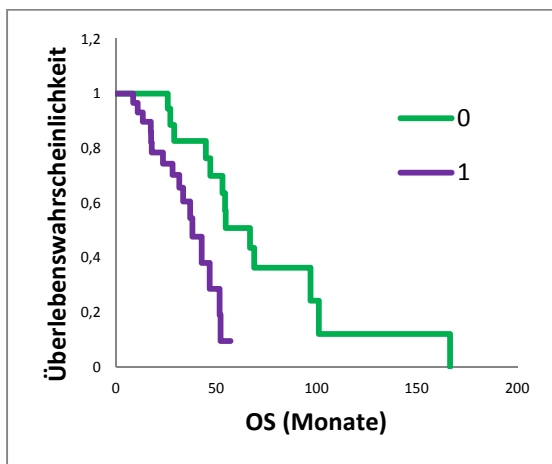


Abb. 55: OS vs. M-Stadium (M0, M1) (Konkordanzen) - $p=0,00$

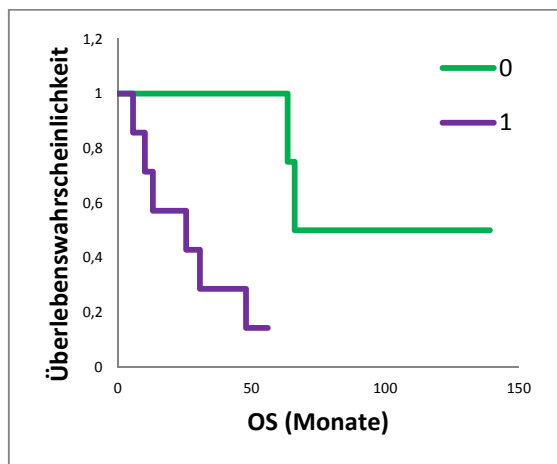


Abb. 56: OS vs. M-Stadium (M0, M1) (Diskordanzen) - $p=0,007$

Tabelle 33: Cox-Regressionsanalyse (Overall Survival)

Legende: HR: Hazard Ratio; CI: confidence interval; P: Probability; M0: fernmetastasenfrei;
M1: Fernmetastasen

	HR	95% CI	P
Gesamtkollektiv: M0 vs. M1	4,74	1,49 - 9,64	0,0004
Konkordanzen: M0 vs. M1	3,79	1,49 - 9,64	0,003
Diskordanzen: M0 vs. M1	1,47	0,27 - 8,14	0,007

Interpretation:

Das einzige signifikante Ergebnis findet sich bei der Fernmetastasierung (Abb. 55, 56). Wenn keine Fernmetastasen bei Erstdiagnose vorliegen, erhöht dies die Dauer des Gesamtüberlebens bei Konkordanzen und Diskordanzen.

In Abb. 49 - 54 konnten keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben verzeichnet werden. Das Überleben ist unabhängig vom Konkordanz-Status sowie vom Mutationsstatus des KRAS-Gens. Auch konnte keine Abhängigkeit der Überlebenszeit bzgl. der Primärtumorlokalisation entdeckt werden. Weder das Grading, noch der Befall der Lymphknoten postoperativ lässt sich mit dem Gesamtüberleben in Verbindung bringen.

3.7.2 Progression-free survival (PFS)

Das Progression-free survival (PFS) ist per definitionem die Zeit zwischen der Primäroperation und dem Progress der Erkrankung trotz Chemotherapie. Der Progress wird bestimmt durch das Auftreten eines Rezidivs, neuer Metastasen oder der Vergrößerung von Metastasen.

Folgend werden erneut Kaplan-Maier-Kurven dargestellt. Diese besitzen ebenfalls, aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs in den Subgruppen, keine korrekte statistische Aussagekraft. Sie dienen der Trendunterstützung. Die Ergebnisse werden auch hier durch den Log-Rank-Test gestützt, sowie die Cox-Regressionanalyse, die lediglich bei signifikantem Verhalten aufgeführt wird.

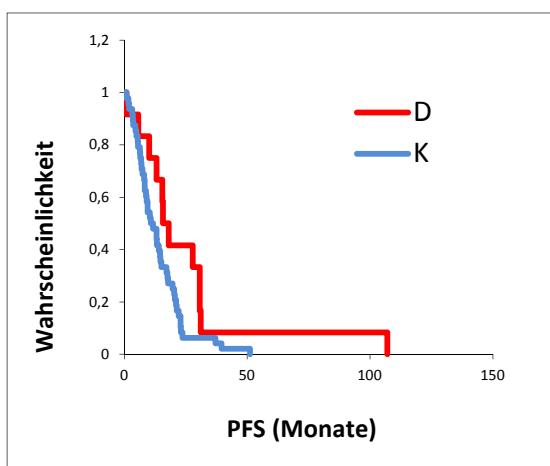


Abb. 57: PFS vs. Diskordanzen (D) / Konkordanzen (K) – $p=0,055$

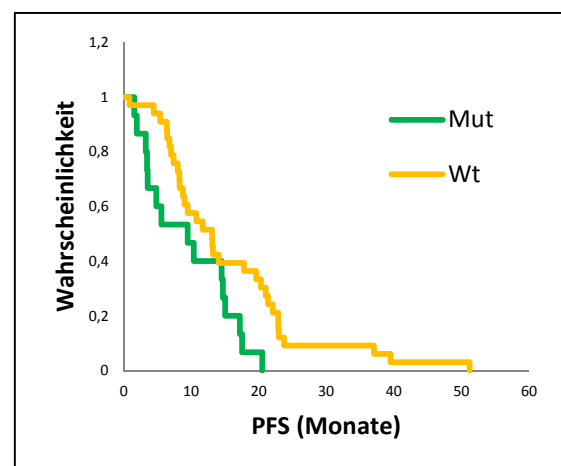


Abb. 58: PFS vs. Mutiert (Mut) / Wildtyp (Wt) der Konkordanzen – $p=0,021$

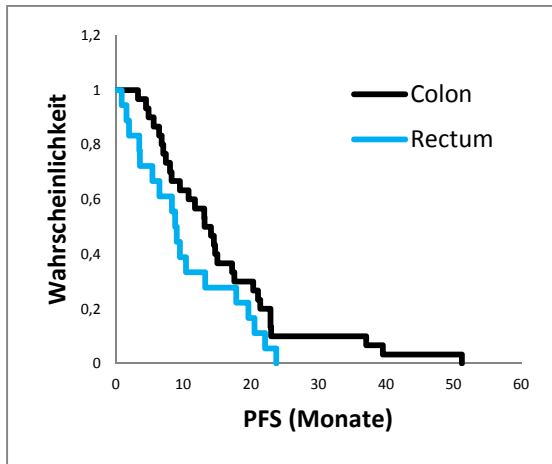


Abb. 59: PFS vs. Lokalisation (Konkordanzen) - $p=0,103$

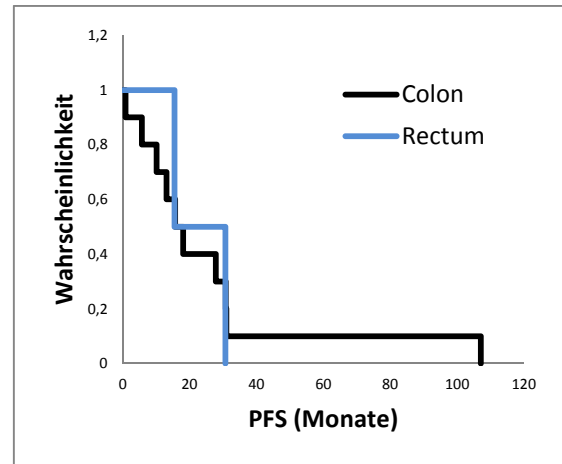


Abb. 60: PFS vs. Lokalisation (Diskordanzen) - $p=0,854$

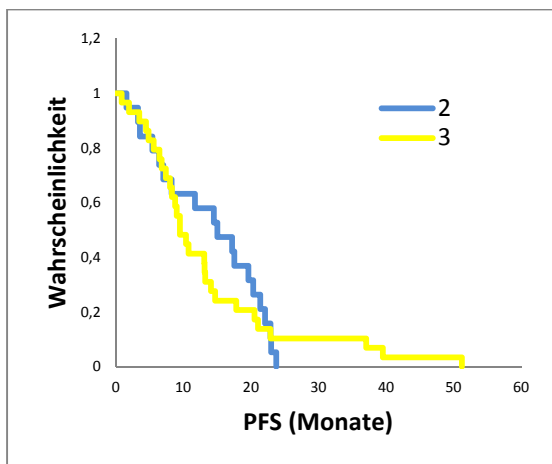


Abb. 61: PFS vs. Grading (G2; G3) (Konkordanzen) - $p=0,738$

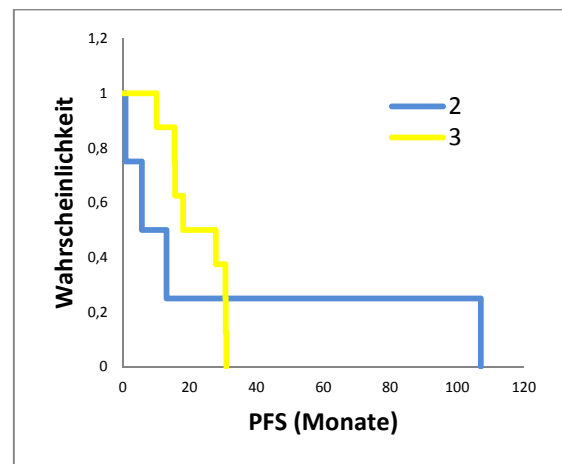


Abb. 62: PFS vs. Grading (G2; G3) (Diskordanzen) - $p=0,855$

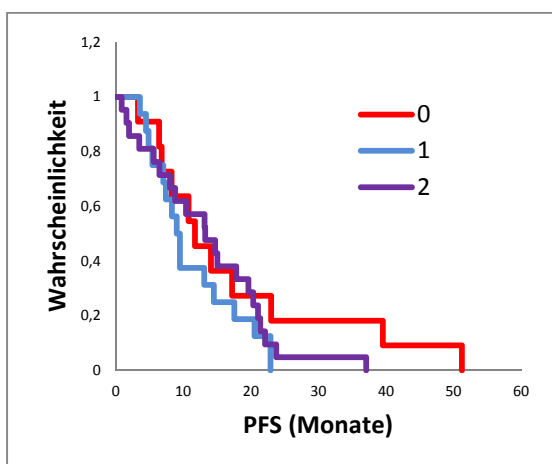


Abb. 63: PFS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Konkordanzen) - $p=0,331$

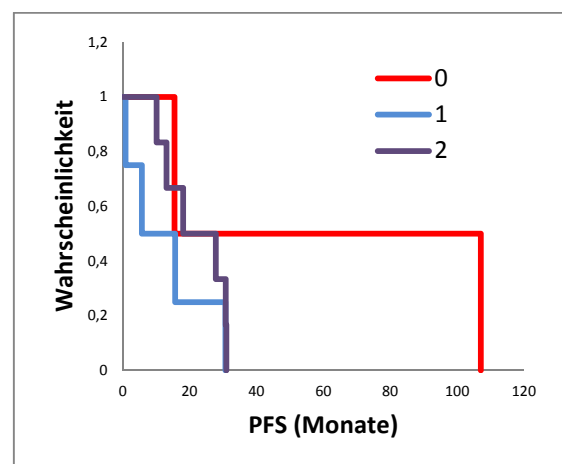


Abb. 64: PFS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Diskordanzen) - $p=0,252$

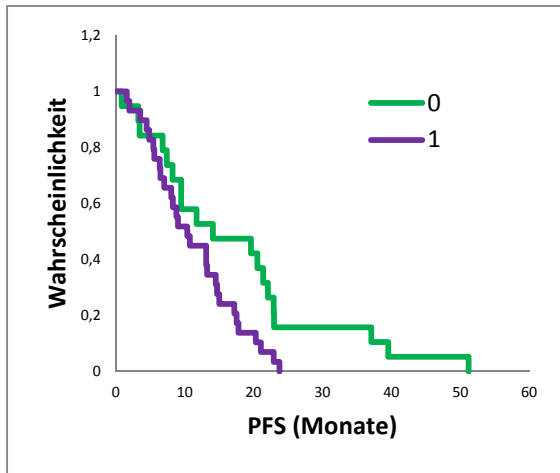


Abb. 66: PFS vs. M-Stadium (M0, M1) (Konkordanzen) - $p=0,031$

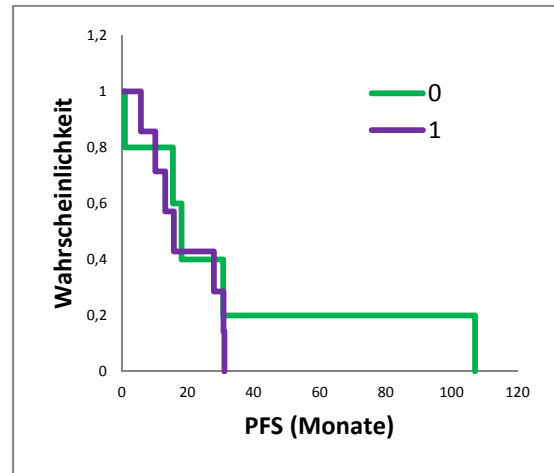


Abb. 65: PFS vs. M-Stadium (M0, M1) (Diskordanzen) - $p=0,630$

Tabelle 34: Cox-Regressionsanalyse (progression-free survival)

Legende: HR: Hazard Ratio; CI: confidence interval; P: Probability; WT: Wildtyp; Mut: Mutation; M1: Fernmetastasen; M0: fernmetastasenfrei

	HR	95% CI	P
Konkordanzen: KRAS-WT vs. KRAS-Mut	2,14	1,10 - 4,16	0,021
Konkordanzen: M1 vs. M0	1,98	1,05 - 3,73	0,031

Interpretation:

Im Fall des PFS zeigt sich bei Betrachtung des KRAS-Mutationsstatus in der Gruppe der Konkordanzen ein signifikantes Ergebnis (s. Abb. 58). Bei vorliegendem KRAS-Wildtyp besteht ein signifikant längeres PFS als bei einem mutierten KRAS-Gen ($p=0,021$). Das mittlere PFS liegt bei den KRAS-Mutationen bei 9,6 Monaten (STD: 1,68), während es sich bei den KRAS-Wildtypen über 15,6 Monate (STD:1,91) erstreckt.

Sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Fernmetastasen vorhanden, so zeigt sich lediglich in der Subgruppe der Konkordanzen ein signifikanter Vorteil im PFS ($p=0,031$) gegenüber dem Vorliegen von Fernmetastasen (s. Abb. 66). Unter den Diskordanzen lässt sich diese Signifikanz nicht nachweisen (s. Abb. 66).

Beim Vergleich zwischen Diskordanzen und Konkordanzen ist der p-Wert mit $p=0,055$ größer als $p=0,05$ (s. Abb. 57), sodass man auch hier von keiner Signifikanz sprechen kann. Festzustellen ist hier jedoch, dass das mittlere PFS bei den Konkordanzen 13,7 Monate (STD: 27,60) umfasst, während es bei den Diskordanzen 25,5 Monate (STD: 10,13) sind.

In den Abb. 59 - 64 und 66, in denen die Lokalisation, das Grading sowie das N- und M-Stadium untersucht werden, sind keine Unterschiede im PFS zu finden.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Für Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom besteht inzwischen die Möglichkeit, eine individuelle Vorhersage über den Benefit einer Antikörpertherapie zu machen. Diese Innovation der heutigen modernen Pathologie, revolutioniert durch die „prädiktive Pathologie“, beschreibt den entscheidenden Schritt in Richtung personalisierter Medizin. Im Zentrum dieses Geschehens befindet sich derzeit der prädiktive, hoch signifikante Biomarker KRAS. Durch dessen Analyse im Tumorgewebe und entsprechende Interpretation können Ärzte eine individuell passende Therapie ausarbeiten. Die routinemäßige Untersuchung dieses Biomarkers ist bislang nur im metastasierten Stadium zugelassen.

Das KRAS-Gen, welches das KRAS-Protein codiert, mutiert sehr früh in der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms. Dank der grundlegenden Publikation von Vogelstein und Fearon im Jahre 1988 ist diese Sequenz die Basis für das Verständnis der Multistepkarzinogenese von der Hyperplasie über das Adenom zum Karzinom. Auch wenn man nach bisherigem Kenntnisstand allgemein davon ausgeht, dass die KRAS-Mutation in den metastatischen Absiedelungen beibehalten wird, zeigen neuere Studien inzwischen widersprüchliche Ergebnisse bzgl. der Übereinstimmung des Mutationsstatus der Gewebe, die aus einem Tumor hervorgehen.

Jene Studien verzeichnen einen sog. Diskordanzanteil von 4% - 44%, womit beschrieben wird, dass dieser Anteil an Patienten verschiedene KRAS- Mutationsstati in den verschiedenen Gewebetypen ihres metastasierten Tumors präsentieren.

Da diese Diskordanzen deswegen zwischen den zwei Extremen (nur KRAS-Wildtyp oder nur KRAS-Mutation) stehen, stellen sie momentan eine Unbekannte im Hinblick auf die Notwendigkeit einer detaillierteren Analyse dar:

- Was sind die Ursachen für diese Diskordanzen?
- Zeigen Diskordanzen einen anderen Krankheitsverlauf bzw. ein anderes Outcome als diejenigen, die einen übereinstimmenden KRAS-Status präsentieren?

- Haben Diskordanzen einen anderen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Tumoren als Konkordanzen?
- Zeigen Diskordanzen ein anderes Ansprechen auf Chemotherapie oder Target-Therapie?
- Kann das Wissen über Diskordanzen für das therapeutische Vorgehen hilfreich sein?
- Sollte der momentane therapeutische Imperativ (Primarius mit KRAS-Wildtyp → Anti-EGFR-Therapie) in diesen Fällen neu definiert werden?

All diese Fragen werden in der folgenden Diskussion mit dem Ziel abgehandelt, zu klären, ob ein diskordanter Mutationsstatus einen therapeutischen Imperativ beinhaltet. Zusätzlich wird deren Stellenwert in Bezug auf die prädiktive Diagnostik in der Ära der personalisierten Medizin beleuchtet und spezifisch die Methode zur Detektion der KRAS-Mutationen am Beispiel des Untersuchungsguts des Pathologischen Instituts des Klinikums Stuttgart betrachtet.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Qualitätssicherung

Die unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Verfahren zur KRAS-Mutationsanalyse (Sanger-Sequenzierung, Array-Analyse, Schmelzkurvenanalyse und Pyrosequenzierung) zeigen vergleichbare Spezifität, allerdings unterschiedliche Sensitivität für den Mutationsstatus (Weichert et al., 2010). Die Wahl der Analytik bleibt trotzdem jedem Institut, meist abhängig vom Equipment, dem Personal sowie der Erfahrung des Molekularpathologen, selbst überlassen. Daher müssen interne und externe Qualitätssicherungsmaßnahmen durchgeführt werden (Dietel, 2008). Für eine Fehlerminimalisierung und den Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen müssen die untersuchenden Laboratorien an der Qualitätssicherungsinitiative Pathologie (QuIP) der deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) und des Berufsverbandes Deutscher Pathologen (BDP) teilnehmen und sich den jährlichen Ringversuchen unterziehen.

4.2.2 Vorteile der hiesigen Techniken

Im Institut für Pathologie des Klinikums Stuttgart wird die Array-Analyse mit entsprechender Zertifizierung als Standard für die KRAS-Mutationsanalyse von Codon 12 und 13 routinemäßig angewendet.

Die Array-Analyse zeigt eine vorteilhafte kostengünstige Detektion der Mutationen. Jedoch sind nicht nur monetäre Gründe eine Entscheidungshilfe bei der Wahl der Methode, sondern auch ökonomische Faktoren. Die Verwendung von WSC (Wildtype Suppressor Compound) steigert die Sensitivität der Analyse und ermöglicht damit die Feststellung geringster Mengen an mutierten Zellen. Die dadurch geringeren Ergebnisse im Methodenvergleich (Weichert et al., 2010) stützen die Verwendung dieser Methode.

Im Zuge der nachträglichen Mutationsanalyse von Cod61 des KRAS-Gens sowie Cod600 des BRAF-Gens wurde hingegen die Pyrosequenzierung genutzt. Mit höchster Sensitivität und Spezifität können hier hotspot-Mutationen auch in degradierten DNA-

Proben festgestellt werden, mit einem Detektionslimit von nur 5% mutierten Allelen (Ogino et al., 2005; Poehlmann et al., 2007).

4.2.3 Methodische Zukunftsideen

Im vorliegenden Kollektiv fanden nur FFPE(formalin-fixed paraffin-embedded)-Präparate Anwendung. An FFPE-Präparaten wurden auch sämtliche Mutationsanalysen großer Studien durchgeführt, die Grundlage für die Entscheidung zur routinemäßigen KRAS-Mutationsanalyse im metastasierten Stadium des kolorektalen Karzinoms sind. Für eine bessere Gewebekonservierung könnte man diskutieren, ob es angebracht wäre, jene Methoden der KRAS-Mutationsanalyse an HOPE(Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect)-fixiertem Gewebe, eingebettet in Paraffin, durchzuführen (Olert et al., 2001). Wiedorn et al., 2002 zeigte mit seiner Studie, dass diese formalin-freie Fixierungsmethode eine exzellente Alternative zur konventionellen Formalinfixierung (FFPE) darstellt, um u.a. hoch-molekular-gewichtige DNA von > 20 kbp für nachfolgende Analysen zu extrahieren und besser erhalten zu können. Ob diese Methode durch Verringerung der Degradation von Nukleinsäuren die KRAS-Mutationsanalyse in Ihrer Sensitivität steigern oder aber durch den außerordentlich guten Erhalt der Morphologie eine mögliche Assoziation zwischen histomorphologischen Kriterien und dem Mutationsstatus ermöglichen könnte, wäre für zukünftige Studien ein interessanter Untersuchungsaspekt.

4.3 Diskussion der ermittelten Ergebnisse und Auswertung

4.3.1 Beurteilung des Patientenkollektivs

4.3.1.1 Aktuelle Situation

Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich eigentlich um eine Erkrankung des älteren Menschen, jedoch zeigt sich auch, dass ca. 2% - 3% der Patienten jünger als 40 sind (Steele, 1994), was in der vorliegenden Untersuchung mit ca. 3% (= 2 von 60 Patienten) bestätigt wird. Im Wesentlichen zeigen Frauen über 75 Jahren und Männer zwischen 60 und 84 Jahren erhöhte Erkrankungsraten (Robert Koch-Institut, 2010). Auch im Hinblick auf diese Erkenntnis stellt sich das vorliegende Patientenkollektiv als repräsentativ dar (s. S. 45, Abb. 10). Die aktuellen epidemiologischen Krebsregister der Bundesländer weisen derzeit relative 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 53% und 63% auf, während in den 1980er Jahren diese noch bei lediglich 50% lagen. Die altersstandardisierte Inzidenz hat bei beiden Geschlechtern seit 1980 zugenommen, während die altersstandardisierten Sterberaten abgenommen haben (Robert Koch-Institut, 2010).

Die Zunahme der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist vermutlich auf die immer besser werdende Diagnostik zur Früherkennung zurückzuführen. Ziel der Früherkennung ist, asymptomatische Patienten mit einer kolorektalen Neoplasie (vom adenomatösen Polyp bis zum Karzinom) zu erkennen. Dies führt zu einer Diagnosevorverlegung und ermöglicht den Therapiebeginn in einem sehr frühen Krankheitsstadium mit kurativem Ziel. Damit ist auch die abnehmende Mortalitätsrate zu erklären, denn durch optimales frühzeitiges Therapiemanagement kann das eventuell sonst lebensgefährdende Krankheitsstadium umgangen werden.

Für Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom hat sich in den letzten zehn Jahren eine enorme Verbesserung der Anzahl der Überlebenden abgezeichnet. Die Zahl der Überlebenden mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom hat sich praktisch verdoppelt (Garcia et al., 2008). Dies ist hauptsächlich zurückzuführen auf die medizinischen Innovationen, wie neue Kombinationen aus Chemotherapien, mit Verwendung von 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, sowie auch die Nutzung von therapeutischen Wirkstoffen, wie die monoklonalen EGFR-Antikörper und VEGF-

Antikörper. Trotz Verdopplung der Zahl der Überlebenden muss man indes weiterhin sagen, dass Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom immer noch eine infauste Prognose mit Heilungsraten von $< 10\%$ aufweisen (Schmiegel et al., 2008), da der Überlebendenanteil dennoch sehr gering ist.

4.3.1.2 Bewertung der Alters- und Geschlechterverteilung

Das bei Erstdiagnose ermittelte Durchschnittsalter (s. S. 44/45, Tabelle 4/Abb. 9) des Patienten-kollektivs entspricht mit 63,33 Jahren den Beobachtungen zahlreicher Autoren (Buglioni et al., 1999; Cejas et al., 2009; Etienne-Grimaldi et al., 2008; Italiano et al., 2010; Karapetis et al., 2008; Knijn et al., 2011). Jedoch ist eine geschlechtergetrennte Betrachtung zu berücksichtigen. Bei Frauen zeigt sich im vorliegenden Kollektiv ein Erkrankungsdurchschnittsalter von 60,45 Jahren, bei Männern dagegen von 64,89 Jahren (s. S. 44, Tabelle 4). Dies zeigt einen geschlechterspezifischen Altersunterschied von 4,44 Jahren, welcher in der Literatur mit nahezu identischem Wert von 4,2 Jahren bei Boland et al. ebenfalls angegeben wird (Boland et al., 2000). Verglichen mit anderen malignen Tumorerkrankungen entspricht das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose dem bei einem malignen Melanom der Haut, einem Kehlkopfkarcinom oder auch einem Brustdrüsenkrebs (Robert Koch-Institut, 2010).

In der Gesamtschau zeigt sich ein Geschlechterverhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten von 1:1,86 (35% Frauen : 65% Männern) (s. S. 44, Abb. 8). Der größere Männeranteil stellt sich auch in der Projektion der Erkrankungsfälle für das Jahr 2010 vom Robert Koch-Institut dar, jedoch etwas weniger stark mit einem Verhältnis von 1:1,17 (33.620 Frauen : 39.410 Männer) (Robert Koch-Institut, 2010). Dies verdeutlicht jedoch, dass im vorliegenden Kollektiv eine signifikante Verschiebung zum männlichen Geschlecht vorliegt. Allerdings scheint dies nach derzeitigen Erkenntnissen keine Auswirkungen auf Mutations- und Metastasierungseigenschaften zu haben, so dass das vorliegende Patientenkollektiv trotz der leicht divergenten Geschlechterverteilung als repräsentativ angesehen werden kann.

4.3.2 Beurteilung der KRAS-Mutationsanalyse

4.3.2.1 Mutationen im KRAS-Gen

Je nach Isoform umfasst die kleine GTPase (KRAS) 188-189 Aminosäuren (Wicki et al., 2010). Ereignen sich Punktmutationen im KRAS-Gen eines kolorektalen Karzinoms, so betrifft dies hauptsächlich Codon 12, 13, 61 oder 146 (Wicki et al., 2010). Aktuelle Studien zufolge treten in 30% - 45% der Fälle KRAS-Mutationen im Primärtumor auf, die zu 98% (Oliveira et al., 2004) in Codon 12 und 13 lokalisiert sind und damit eine konstitutive Aktivierung des Proteins hervorrufen (Andreyev et al., 1998; Andreyev et al., 2001; Baldus et al., 2010; Italiano et al., 2010; Knijn et al., 2011; Oliveira et al., 2004; Wong et Cunningham, 2008). Im vorliegenden Kollektiv von 60 Patienten zeigt sich ein Anteil von 44,07% an KRAS-Mutationsträgern im Primärtumor, die über Codon 12 und 13 ermittelt wurden (s. S. 54, Tabelle 7). Dieser Anteil entspricht damit dem in der Literatur beschriebenen Auftreten. Die molekulare KRAS-Analyse in der Routinetestung fokussiert speziell auf Codon 12 und 13 (Allegra et al., 2009). Jedoch wird dadurch das beschriebene Auftreten von Punktmutationen in Codon 61 und 146 vernachlässigt. Laut Loupakis et al. 2009b können allerdings in diesen Codonen in bis zu 10% weitere KRAS-Mutationsträger auffindig gemacht werden. Dieser Detektionsverlust an eigentlich bestehenden KRAS-Mutationen kann zu entscheidenden Fehleinschätzungen im Hinblick auf das Therapiemanagement führen. Dies heißt, dass bei einem Nichtansprechen der Antikörpertherapie bei KRAS-Wildtyp, ermittelt durch Codon 12 und 13, optimalerweise in Codon 61 und 146 nachanalysiert werden sollte.

4.3.2.2 Verhältnis von Codon 12 zu Codon 13

Das ermittelte Verhältnis von Mutationen in Codon 12 zu 13 entspricht mit 88% zu 12% (s. Kapitel 3.3.1) dem in anderen Studien ebenfalls bestätigten Überwiegen von Codon 12 (Baldus et al., 2010; Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988). Die am häufigsten auftretende Einzelmutation ist laut Literatur Cod12Asp (Knijn et al., 2011; Oliveira et al., 2004), die auch in den vorliegenden Ergebnissen mit

46,55% bestätigt wird. Das Auftreten von mehr als der Hälfte (55,56%) dieser Mutationen in Primärtumoren, ist auf den hohen Anteil dieser bzgl. der Gesamtanzahl der einzelnen Gewebetypen zurückzuführen. Dass es sich bei wiederum 40% dieser Cod12Asp-Mutationen um diskordante Fälle handelt, ist aus heutigen Erkenntnissen über diese Mutationen nicht einleuchtend. Interessant wäre, ob dieses Ergebnis auch in anderen Patientenkollektiven vorzufinden ist oder ob es eine Ausnahme darstellt.

4.3.2.3 Widersprüchliche Ergebnisse im Konkordanz-Status

Der hohe Konkordanzgrad, der in vielen Studien derzeit durchschnittlich mit >92% beschrieben wird (Artale et al., 2008; Cejas et al., 2009; Italiano et al., 2010; Knijn et al., 2011; Santini et al., 2008), spiegelt sich im vorliegenden Fall nicht wieder. Lediglich bei 80% der Patienten lassen sich zwischen den verschiedenen Gewebetypen Übereinstimmungen feststellen (s. S. 55, Abb. 19). Folglich wird mit diesem Ergebnis ein Diskordanzgrad von 20% erreicht. Ähnliche Ergebnisse mit einem verhältnismäßig hohen Diskordanzgrad von 4% - 44% zwischen Primarius und Metastasen wurden inzwischen mehrmals belegt (Albanese et al., 2004; Al-Mulla et al., 1998; Baldus et al., 2010; Garm Spindler et al., 2009; Loupakis et al., 2009a; Molinari et al., 2009; Oliveira et al., 2007; Oudejans et al., 1991; Perrone et al., 2009; Tórtola et al., 2001). Derzeitige Studien bzgl. des Konkordanz-Status sind damit sehr widersprüchlich. Sogar eine 100%ige Übereinstimmung zwischen Primärtumor und korrespondierenden Metastasen wurde in einigen Studien verzeichnet (Etienne-Grimaldi et al., 2008; Suchy et al., 1992; Weber et al., 2007; Zauber et al., 2003). Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang allerdings immer, ob auch alle Mutationen überprüft wurden und welche Methode/Methoden eingesetzt wurden, da sich hierdurch bereits Unterschiede in der Häufigkeit der Diskordanzen erklären lassen.

4.3.2.4 Kritische Betrachtung der Diskordanzen

4.3.2.4.1 Doppelmutationen

Die diskordanten Fälle in der vorliegenden Arbeit weisen ein inhomogenes Muster auf. Nicht nur Einzelmutationen, sondern auch Doppelmutationen wurden in 5 verschiedenen Gewebetypen detektiert (s. S. 56 - 58, Tabelle 8 - 12). Diese lassen sich vermutlich durch einen polyklonalen Primärtumor erklären (De Roock et al., 2010a). Weshalb allerdings jeweils Cod13Asp beteiligt ist, lässt sich nicht beantworten. Es muss jedoch nicht immer von einer Cod13Asp-Beteiligung ausgegangen werden, da auch andere Doppelmutationen in der Literatur schon beschrieben wurden (De Roock et al., 2010a). Eventuell kann aber mit Cod13Asp eine erhöhte Prävalenz vorliegen.

4.3.2.4.2 Adenom-Karzinom-Sequenz bei den Diskordanzen

Alle 11 getesteten Primärtumoren der diskordanten Fälle zeigen eine KRAS-Mutation (s. S. 60, Tabelle 13). Nach der weit verbreiteten Annahme, dass die KRAS-Mutation ein frühes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt (Fearon and Vogelstein, 1990; Vogelstein et al., 1988), lässt sich schlussfolgern, dass eine KRAS-Mutation vor der Metastasierung auftritt und dann ebenfalls in metastatischen Absiedelungen vorzufinden ist. Jedoch widerspricht diese Vorstellung den Tatsachen in jenen diskordanten Fällen. Hier sind Fernmetastasen, teilweise auch zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt, mit KRAS-Wildtyp entstanden, obwohl der Primärtumor bereits früh eine KRAS-Mutation aufwies.

4.3.2.4.3 Erklärungen für das Auftreten von Diskordanzen

Bei den Diskordanzen treten sowohl Wildtyp-Gewebe wie auch Gewebe mit andersartigen Mutationen bei vorliegendem mutiertem Primarius im KRAS-Gen auf (s. S. 60, Tabelle 13). Diese (paradoxen) Resultate lassen sich vermutlich durch verschiedene, pathogenetisch unterschiedliche Ansätze begründen. In Bezug auf den Primärtumor, muss an eine intratumorale Heterogenität gedacht werden (Knijn et al.,

2011) oder an das sog. „Disseminierungsmodell“, bei welchem Tumorzellen den Primarius vor dem Erreichen eines vollständig malignen Phänotyps (mit somatischer KRAS-Mutation) verlassen haben (Klein, 2009) und somit der Zeitfaktor eine große Rolle spielt. Im Weiteren muss ebenfalls der Gedanke herangezogen werden, dass eine noch nicht detektierte, unabhängige Zweitneoplasie, mit anderem KRAS-Status und Metastasierung, parallel vorliegt, zumal KRAS-Mutationen auch in anderen Tumoren wie Pankreas-, Bronchial-, Gallenblasen-, Ovarial- oder Endometriumkarzinomen vorkommen können.

Andere Studien zeigen, dass nur ein niedriger Anteil an Tumorzellen überhaupt befähigt ist, eine Migration zu überleben und anschließend noch Sekundärläsionen zu bilden. Hierfür zeigen KRAS-mutierte Tumorzellen eine bessere Anpassungsfähigkeit als KRAS-Wildtyp-Tumorzellen (Kosakowska et al., 2010). Dies stützt das Ergebnis von Velho et al., 2009, der einen KRAS-Mutationsanteil von 82,1% in den LK-Metastasen zeigte. Im vorliegenden Kollektiv finden sich aber nur 43,75% KRAS-Mutationen in LK-Metastasen und nur 30% in Fernmetastasen (s. S. 54, Tabelle 7). Diese geringeren Prozentzahlen zeigen sich auch in anderen Studien (Cejas et al., 2009; Italiano et al., 2010; Knijn et al., 2011), womit hinterfragt werden muss, ob auch die Möglichkeit besteht, dass KRAS-Wildtyp-Tumorzellen diese Anpassungsfähigkeit und erhöhte Metastasierungsintensität erwerben können.

Diese Erklärungsmodelle stellen eine mögliche Begründung der Pathogenese für die detektierten diskordanten Fälle dar, jedoch liefern sie keine Entscheidungshilfe bzgl. des therapeutischen Verfahrens.

4.3.2.4.4 Rezidive mit unterschiedlichem Mutationsstatus

Selbst Rezidive, wie im vorliegenden Kollektiv ein Beispiel (s. S. 60, Tabelle 13/Nr. 6) bestätigt, können verschiedene Mutationsstadien aufweisen. In der Literatur liegen für diesen Fall bis dato keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Vermuten lässt sich dabei jedoch, dass die Bezeichnung „Rezidiv“ hier etwas unglücklich in der Befundung gewählt sein könnte. Es muss grundsätzlich an die seltene Möglichkeit gedacht werden,

dass weitere unabhängige Zweitneoplasien mit eigens durchlaufener Adenom-Karzinom-Sequenz vorliegen könnten.

4.3.2.4.5 Klinische Relevanz des KRAS-Status in Adenomen

Die Adenome stellen den Beginn einer neuen Adenom-Karzinom-Sequenz dar, in der selbstverständlich nicht der gleiche KRAS-Status, wie im untersuchten Primarius, vorliegen muss. In ca. 25% der traditionellen adenomatösen und in 4% - 37% der serrativen Polypen werden KRAS-Mutationen entdeckt (Chan et al., 2003; Jass et al., 2006; O'Brien et al., 2004; O'Brien et al., 2006; Yang et al., 2004). Selbst unter den frühen genetischen Alterationen in hyperplastischen Polypen lassen sich diese bereits vorfinden (Otori et al., 1997; Yang et al., 2004). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich in den Adenomen (LGIN und HGIN) ein KRAS-Mutationsanteil von 37,04% (s. S. 54, Tabelle 7). Dieser Anteil repräsentiert und bestätigt das Entstehen von KRAS-Mutationen früh in der Karzinogenese, so dass dieser Anteil dem in der Literatur erwähnten Anteil für Primärtumore (30% - 45%) entspricht (s. Kapitelbeginn). Weiterhin ergibt sich, dass alle KRAS-mutierten Adenome den diskordanten Fällen angehören. Ob der diskordante Mutationsstatus Einfluss auf die KRAS-Genmutation in sich neu bildenden Adenom-Karzinom-Sequenzen hat, ist in der Literatur bis jetzt noch nicht näher beleuchtet worden.

Bei den Diskordanzen wurde in 4 Fällen nur der Primarius und ein Adenom mutationsanalytisch untersucht (s. S. 60, Tabelle 13/Nr. 9-12). Jeder einzelne Fall zeigte im Adenom einen KRAS-Wildtyp, während der Primärtumor eine KRAS-Mutation trug. Hierbei handelt es sich um zwei unterschiedliche im Organismus befindliche Adenom-Karzinom-Sequenzen, deren Mutationsstatus im KRAS-Gen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt wurde.

Adenome werden bislang noch nicht mit Anti-EGFR-Therapien behandelt. Es gibt dazu noch keine Untersuchungen hinsichtlich einer Wirksamkeit. Doch könnte hypothetisiert werden, dass in solchen Fällen, wie oben beschrieben, die Möglichkeit einer Antikörpertherapie nicht gänzlich ausgeschlossen werden sollte. Das Wildtyp-Adenom

könnte nämlich in diesen Fällen empfindlich sein für eine Anti-EGFR-Therapie, wodurch zusätzlich die Entwicklung eines Zweittumors unterdrückt würde.

4.3.3 Beurteilung der KRAS-Vergleiche

4.3.3.1 Kordanz- und KRAS-Status vs. pTNM-Klassifikation

Das Wissen über Diskordanzen und Konkordanzen nimmt im vorliegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf die Größenentwicklung oder die metastatischen Absiedlungen (s. Kapitel 3.4.1). Ob KRAS-Wildtyp oder KRAS-Mutation, es zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied bzgl. der TNM-Klassifikation (s. S. 69, Tabellen 19 und 20). Dieser fehlende Einfluss wurde bereits im Jahr 1991 schon festgehalten (Oudejans et al., 1991).

Die fehlende Assoziation zur Tumorausdehnung, Nodalstatus sowie Fernmetastasierung entspricht nicht der Vorstellung, da der Signalweg, in welchen KRAS eingeschaltet ist, u.a. für Proliferation, Migration und Invasion verantwortlich ist. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass ein mutiertes KRAS über die Daueraktivierung des Signals in den Zellkern, eine dauerhafte Stimulation von Proliferation, Migration und Invasion bewirkt und damit den Tumor wachsen und Metastasen bilden lässt.

Diese Diskrepanz lässt sich eventuell damit begründen, dass die zuvor beschriebenen Effekte durch eine Daueraktivierung eines anderen Gens (BRAF, N-RAS, PIK3CA) bei zugrundeliegendem KRAS-Wildtyp initialisiert werden (s. S. 16, Abb. 5).

4.3.3.2 Kordanz- und KRAS-Status vs. Primärtumorlokalisation

Die in der Literatur beschriebene klassisch anatomische Verteilung der Tumorlokalisation im Kolorektum, spiegelt sich in der 60 Patienten umfassenden Stichprobe wieder (s. S. 46, Abb. 11). Auch die prozentuale Verteilung der Lokalisation innerhalb des Kolons entspricht der typischen Distribution. Bei geschlechtergetrennter Betrachtung zeigt sich kein nennenswerter Unterschied (s. S. 47, Abb. 12a,b). Weder der Kordanz- noch der KRAS-Status zeigen im vorliegenden Kollektiv eine Assoziation zur Primärtumorlokalisation (s. S. 69, Tabelle 19 und 20). Im Gegensatz dazu wurde

bereits 1992 beschrieben, dass Karzinome im Rektosigmoid mit größerer Wahrscheinlichkeit KRAS-Genmutationen aufweisen als an anderen Stellen ($p > 0,04$) (Boughdady et al., 1992). Jedoch wurde dies in neueren Studien nicht bestätigt ($p = 0,251$) (Weichert et al., 2010), womit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ihre Repräsentativität behalten.

4.3.3.3 KRAS-Status vs. Histomorphologie

Eine mögliche Abhängigkeit oder Synopsis zwischen histomorphologischen Charakteristika und dem KRAS-Status konnte innerhalb des 60 Personen umfassenden Kollektivs nicht aufgedeckt werden (s. Kapitel 3.4.4). Eben diese fehlende Assoziation wird auch durch Weichert et al. beschrieben, der die Tumore auf die An- und Abwesenheit von Nekrosen, dem Fettgewebe oder dem Vorhandensein von Entzündungen untersucht hat (Weichert et al., 2010).

Der Ausreifungsgrad (Grading), der an den histologischen Präparaten bestimmt wurde (s. Kapitel 3.4.2), zeigt auch numerisch betrachtet (Exakter Test nach Fisher) keine signifikante Assoziation zum KRAS- oder Kordanz-Status (s. S. 69, Tabelle 19 und 20). Diese fehlende Abhängigkeit beschreibt ebenfalls bereits Oudejans et al., 1991.

4.3.4 Beurteilung des Follow-up

4.3.4.1 Differenzierte Betrachtung der First-Line-Chemotherapie

Die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms hat sich im letzten Jahrzehnt aufgrund der rapiden Entwicklung neuer Chemotherapien sowie Biologicals, zu einer eigenständigen sehr komplexen Wissenschaft entwickelt.

Da die vorliegende retrospektive Untersuchung bereits im Jahre 1996 mit der Rekrutierung einzelner Patientendaten beginnt, die KRAS-Mutationsstatus-Testung mit anschließender Entscheidung für oder gegen eine Anti-EGFR-Therapie jedoch erst seit den letzten 4 Jahren routinemäßig durchgeführt wird, basiert die First-Line-Therapie aller Patienten des Kollektivs ausschließlich auf Chemotherapien. Trotzdem war es von Interesse, inwiefern die Chemotherapien, die ja keinen direkten Einfluss auf die EGFR-

Signalkaskade, in denen KRAS eingeschaltet ist, besitzen, unterschiedliches Ansprechen im Gewebe zwischen den später definierten Diskordanzen und Konkordanzen bzw. KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation zeigen.

Das Ansprechen im vorliegenden Kollektiv (s. Kapitel 3.5.1) zeigt, dass in 2/3 der Fälle die Erkrankung nicht weiter voranschritt und sogar teilweise remittierte (CR, PR, SD). Das objektive Ansprechen (CR + PR) lag bei 43,33% und entspricht damit den Ergebnissen in der Literatur von 30% - 55% (Biasco et al., 2006). Unter separater Betrachtung der 5 Kategorien nach RECIST, überwiegt in der Subgruppe der Konkordanzen jedoch der Krankheitsprogress (PD), während in der Subgruppe der Diskordanzen das Ansprechen relativ ausgewogen ist, mit geringfügigem Dominieren der partiellen Remission (PR). Ein signifikanter Unterschied im Ansprechen zwischen Diskordanzen/Konkordanzen und KRAS-Wildtyp/KRAS-Mutation konnte damit nicht verzeichnet werden, wodurch die Hypothese aufgestellt werden kann, dass die KRAS-Mutationen, soweit dies bei der kleinen Stichprobengröße beurteilbar ist, keine Vulnerabilität der Gewebe mit möglichem Ansprechen auf Chemotherapien verursachen.

4.3.4.2 Differenzierte Betrachtung der Target-Therapie

4.3.4.2.1 Derzeitiger Kenntnisstand

Der KRAS-Mutationsstatus ist Dreh- und Angelpunkt für das Ansprechen einer Therapie mit monoklonalem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (Amado et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Lievre et al., 2008). Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom, die Träger eines mutierten KRAS-Gens sind, zeigen eine Resistenz auf Anti-EGFR-Therapien, wie Cetuximab und Panitumumab (Al-Mulla et al., 1998; Amado et al., 2008; de Reynie's et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Oudejans et al., 1991; Suchy et al., 1992). Diese Verknüpfung zwischen mutiertem KRAS und fehlendem Therapieansprechen resultiert bei beiden in einem erniedrigten PFS und speziell bei Cetuximab auch in einem geringeren OS (Karapetis et al., 2008; Tol et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009). Entsprechend dazu wurde bei vorliegendem KRAS-Wildtyp ein

Benefit in der Verwendung von monoklonalen Antikörpern verzeichnet (Scartozzi et al., 2007). Diese Untersuchungen begründen, weshalb jene monoklonalen Antikörper nur im Falle eines KRAS-Wildtyp verabreicht werden sollten. Wobei hinzugefügt werden muss, dass bei festgestelltem Wildtyp im KRAS-Gen ein Benefit der Anti-EGFR-Therapie nicht garantiert werden kann (Wong et Cunningham, 2008).

Zusätzlich muss natürlich berücksichtigt werden, dass KRAS als anerkannter negativ prädiktiver Biomarker zwar eine hohe Spezifität mit 93% besitzt, jedoch die Sensitivität mit 47% gering ist (Linardou et al., 2008).

4.3.4.2.2 Ansprechen der Therapie mit „Cetuximab“ (Erbitux®)

Die Wirksamkeit von Cetuximab sowohl in Monotherapie (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008), wie auch in Kombination mit Chemotherapien (Bokemeyer et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009) wurde in Studien mehrmals belegt. Selbst der Nutzen einer zusätzlichen Gabe von Bevacizumab (s. Kapitel 1.2.4.2) zu Cetuximab zeigt Erfolge (Saltz et al., 2007).

Abb. 38 (s. S. 79) zeigt, dass in der vorliegenden Untersuchung ein Ansprechen der Therapie mit Cetuximab nur in Einzelfällen stattfand. Diese zeigten unter der Kombinationstherapie Cetuximab + FOLFIRI eine zeitweilige Remission (PD) oder Stabilisierung der Erkrankung (SD). Verglichen mit Di Fiore et al., 2007 zeigt sich bei Betrachtung des objektiven Ansprechens (PR und CR), ein gleicher prozentualer Anteil von 20%. Auch Lin et al., 2011 beschreibt mit 26,2% einen ähnlichen Anteil. Bei Betrachtung der Stabilisierung (=13%) und des Progresses (=67%) sind die Ergebnisse ebenfalls verhältnismäßig vergleichbar (Di Fiore et al., 2007; Lin et al., 2011). Damit können die Ergebnisse im Ansprechen der Therapie mit Cetuximab, ausgewertet nach RECIST, als repräsentativ angesehen werden.

4.3.4.2.3 Ansprechen der Therapie mit „Panitumumab“ (Vectibix®)

Im Gegensatz zu Cetuximab hat Panitumumab eine geringere Immunogenität als Cetuximab (Weiner, 2006), da er ein rein humaner Antikörper ist. Bei Patienten mit chemotherapie-refraktärem metastasiertem kolorektalem Karzinom war lange Zeit nach europäischen Leitlinien die Gabe von Panitumumab in Monotherapie empfohlen (Van Cutsem and Oliveira, 2008). Neue Ergebnisse über die Wirksamkeit von Panitumumab in Kombination mit Chemotherapie wurden erst kürzlich beschrieben. Peeters et al. zeigt in einer großen prospektiven Phase III Studie, dass Panitumumab mit FOLFIRI bei Wildtyp-KRAS statistische Signifikanz in der Verbesserung des progressionsfreien Überlebens aufweist (Peeters et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden 4 Patienten mit Panitumumab in Monotherapie behandelt (s. S. 77, Tabelle 23). Bei lediglich einem Patienten zeigte sich eine zeitweilige Remission. In den anderen Fällen folgte ein Progress oder keine Nachweisbarkeit. Dieses Ergebnis ist repräsentativ, wenn man von einem Anteil an Nonrespondern von bis zu 65% ausgeht (s. Kapitel 4.3.4.2.5). Gerade jener Patient, der positiv auf die Therapie mit Panitumumab reagierte, zeigt ein diskordantes Verhalten im KRAS-Mutationsstatus. Vermuten lässt sich, dass hierbei eine partielle Remission (PR) stattfand, die auf einen Rückgang der Tumorzellformationen mit KRAS-Wildtyp zurückzuführen ist, während jene mit mutiertem KRAS nicht auf die Therapie ansprechen.

Im Gegensatz zu Peeters et al., 2010 konnte bei einem weiteren Patienten, der mit der Kombination aus Panitumumab + FOLFIRI therapiert wurde, ein rasanter Progress festgestellt werden.

Infolge des Nichtansprechens auf die Mono- bzw. Kombinationstherapie mit Panitumumab, lässt sich vermuten, dass evtl. eine Mutation in einem anderen Gen vorzufinden wäre oder aber aufgrund einer intratumoralen Heterogenität ein falsch-negatives Ergebnis vorliegt. Zur Ursachenklärung des Nichtansprechens s. Kapitel 4.3.4.2.6.

4.3.4.2.4 Anti-EGFR-Therapie bei KRAS-Mutation?

Bis auf einen Patienten (KRAS mutiert) handelt es sich in der Subgruppe der mit Cetuximab therapierten Patienten um Konkordanzfälle mit zugrundeliegendem KRAS-Wildtyp. Aufgrund der eingängigen Erkenntnisse der zwei großen, randomisierten Phase III-Studien, OPUS und CRYSTAL, zeigte sich, dass die Verwendung von Cetuximab keinen Benefit bei vorliegender KRAS-Mutation verzeichnet und sogar schädlich für diese Patienten ist (Bokemeyer et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009). Damit repräsentiert der einzelne mit Cetuximab therapierte, jedoch KRAS mutierte Patient exakt jene Feststellung.

Paradoxerweise wurde in einigen wenigen Studien ein Ansprechen in Einzelfällen trotz mutiertem KRAS-Gen sowohl auf Cetuximab wie auch Panitumumab beschrieben (Benvenuti et al., 2007; De Roock et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Frattini et al., 2004; Hecht et al., 2007; Karapetis et al., 2008; Khambata-Ford et al., 2007; Lièvre et al., 2006; Lièvre et al., 2008; Loupakis et al., 2009a; Wong et Cunningham 2008).

Gründe für die Annahme, dass diese Ergebnisse nicht nur auf irrtümlich fehlerhaften Analysen beruhen, könnten Unterschiede in den verschiedenen KRAS-Mutationen darstellen. Bereits dieses Jahr hat De Roock et al. einen Überlebensvorteil durch Cetuximab bei chemotherapie-refraktären metastasierten kolorektalen Karzinomen mit G13D-Mutation im Vergleich zu anderen KRAS-Mutationen entdeckt (De Roock et al., 2010b).

4.3.4.2.5 Kuration nach Anti-EGFR-Therapie?

Die lediglich vorübergehende Verbesserung im Krankheitsverlauf nach Anti-EGFR-Therapie kann damit erklärt werden, dass selbst bei bestem therapeutischem Ansprechen, mit zugrundeliegendem KRAS-Wildtyp, klinische Studiendaten darauf hinweisen, dass eine Stabilisierung höchstens 12 bis 18 Monate weilt (Cunningham et al., 2004). Begründet wird diese sekundäre Resistenz mit der Entwicklung von widerstandsfähigen Klonen durch einen darwinistischen Selektionsprozess (Bardelli and Siena, 2010).

Die in Kapitel 4.3.4.2.1 erwähnte fehlende Garantie auf ein Ansprechen der Anti-EGFR-Therapie bei KRAS-Wildtyp zeigt sich durch den hohen Anteil an Nonrespondern. Ein unerwartetes Nichtansprechen tritt laut der aktuellen Studienlage in bis zu 65% der kolorektalen Karzinome auf (Allegra et al., 2009; Van Cutsem, 2007; Van Cutsem et al., 2007). Andere Studien reduzieren sogar den Anteil an Respondern auf nur 10% - 20% herunter (Chung et al., 2005; Cunningham et al., 2004). D.h. grobe 2/3 der Patienten profitieren nicht von ihrer Verabreichung.

4.3.4.2.6 Ursachenanalyse der Non-responder

Verschiedene Gründe bzw. Hypothesen können als Erklärung für ein Nichtansprechen der Anti-EGFR-Therapie herangezogen werden. In erster Linie geht man davon aus, dass eine irrtümlich fehlerhafte Analyse durch die Qualitätsinitiative Pathologie (QuIP) weitgehend ausgeschlossen werden kann. Wobei eine Korrektheit immer überprüft werden sollte und somit oberste Priorität besitzt. Einen weiteren Grund können die bereits erwähnten Diskordanzen darstellen (Knijn et al., 2011). Wird ein Primarius mit KRAS-Wildtyp reseziert, sein KRAS-Status analysiert und abhängig von diesem therapiert, so können noch im Organismus belassene Lymphknoten- oder Fernmetastasen ein mutiertes KRAS-Gen aufweisen und daher auf eine Anti-EGFR-Therapie hin nicht reagibel sein.

Eine intratumorale genetische Heterogenität, die bereits von Giaretti et al., 1996, Al-Mulla et al., 1998; Albanese et al., 2004 sowie Losi et al., 2005, mit ca. 35% - 47% beschrieben wurde, kann ebenfalls durch ein falsch negatives Ergebnis das therapeutische Versagen erklären. Hingegen ergaben die Analysen von Baldus et al. 2010, an einem Kollektiv von 100 Patienten nur 8% Heterogenität. Jedoch zeigte er, dass sich im Tumorzentrum ein höherer Anteil an Mutationen findet, als im Randbereich. Eben diese Feststellung kann die Gefahr bergen, dass bei Entnahme im Randbereich die eigentlich vorhandene KRAS-Mutation im Zentrum nicht festgestellt wird.

Neben diesen Begründungen für ein Scheitern der Antikörpertherapie können auch weniger häufig auftretende Mutationen des KRAS-Gens, Codon 61 und 146 die routinemäßig nicht erfasst werden, vorliegen und damit ein Ansprechen verhindern (Loupakis et al., 2009b). Des Weiteren muss an Mutationen in anderen Effektoren der 2 Hauptsignalwege RAS-RAF-MEK und PIK3CA-PTEN-AKT, ausgehend von EGFR, gedacht werden. Diese beiden Hauptachsen sind über PIK3CA miteinander vernetzt, so dass Mutationen besonders in BRAF, NRAS und PIK3CA auch einen negativen Einfluss auf das Ansprechen haben könnten (De Roock et al., 2009; Di Nicolantonio et al., 2008; Laurent-Puig et al., 2009; Lin et al., 2011; Sartore-Bianchi et al., 2009).

Im vorliegenden Patientenkollektiv kann bei sämtlichen 11 Nonrespondern die Mutation in Codon 61 des KRAS-Gens als Ursache für ein Nichtansprechen ausgeschlossen werden. Mittels Pyrosequenzierung zeigt sich jeweils ein Wildtyp. Des Weiteren kann von einer Mutation in Codon 600 (V600E) des BRAF-Gens ebenfalls abgesehen werden, da hier, mit einer kleinen Ausnahme, in gleicher Weise nur Wildtypen detektiert wurden. Diese V600E-Mutation liegt bei 90% aller aktivierenden BRAF-Mutationen vor (Wan et al., 2004) und wird daher üblicherweise als zentrale Mutation analysiert. Lediglich ein Patient zeigt einen diskordanten BRAF-Mutationsstatus (Primarius mit BRAF-Mutation, Lebermetastase mit BRAF-Wildtyp). Jedoch begründet diese Feststellung nicht das Nichtansprechen der Anti-EGFR-Therapie, da die im Körper weiterhin vorhandene Lebermetastase mit einem BRAF- und KRAS-Wildtyp-Status theoretisch ansprechen könnte. Damit tragen beide zusätzlich untersuchten Gene nicht zur Ursachenklärung im vorliegenden Kollektiv bei. In Anbetracht des zusätzlichen Ausschlusses von KRAS (Codon61) und BRAF (V600E) lässt sich damit schlussfolgern, dass die Klärung des Nichtansprechens auf die oben beschriebenen weiteren Ursachen zurückfällt.

4.3.4.3 Differenzierte Betrachtung der Therapiewechsel

Die durchschnittliche Anzahl an Therapiewechseln, die Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom erfahren, ist bis dato in noch keiner Studie analysiert worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung besitzen somit keine Vergleichswerte. Ein signifikantes Ergebnis bzgl. des unterschiedlichen Verhaltens von Diskordanzen und Konkordanzen gegenüber der Therapiewechselanzahl konnte nicht gezeigt werden (s. Kapitel 3.5.4). Die Wechselfrequenz darf allerdings nur im Hinblick auf das Overall Survival (OS) dieser beiden Subgruppen beurteilt werden, da die Häufigkeit der Therapiewechsel natürlich von der Überlebenszeit abhängt. (s. Kapitel 3.7)

4.3.4.4 Differenzierte Betrachtung der Therapieabbrüche

Im Hinblick auf die Gründe für einen Therapieabbruch konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Konkordanzen und Diskordanzen verzeichnet werden. Panitumumab zeigt bei Nebenwirkungen zu >20% Hautreaktionen, wie Erythem, akneiforme Dermatitis, Juckreiz oder Ausschlag, darüberhinaus lässt sich auch Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen sowie Müdigkeit abzeichnen (Gemmete and Mukherji, 2011). Unter Cetuximab kommt es bei bis zu 80% der Patienten zu Hautreaktionen, aber auch Diarrhoe, Asthenie, Akne, Anämie und auch Übelkeit/Erbrechen (Cunningham et al., 2004). Diese Nebenwirkungen können ebenso bei Chemotherapien beobachtet werden, sodass nicht direkt differenziert werden kann und somit auch verständlicherweise kein Unterschied in den Subgruppen vorzufinden ist. Die anteilige Verteilung (s. S. 81, Abb. 40 und 41) zeigt ebenfalls beinahe gleiches Verhalten, mit dem einzigen Unterschied, dass in der Subgruppe der Konkordanzen prozentual mehr Patienten bereits verstorben sind als bei den Diskordanzen. Dies sagt soweit gar nichts über das OS aus, da die Patienten zu unterschiedlichsten Zeitpunkten ihre Erstdiagnose erhielten.

4.3.4.5 Differenzierte Betrachtung der Therapieunterbrechungen

Die durchschnittliche Therapiepause, die sich bei Patienten mit vorübergehend kontrollierter Erkrankung (CR, PR, SD) summiert aufzeigt, unterscheidet sich weder im Kordanz-Status noch im KRAS-Status signifikant (s. S. 82, Tabelle 26). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass bei diesen Patienten die addierte progressionsfreie Zeit nicht vom Kordanz- oder KRAS-Status abhängt.

4.3.4.6 Differenzierte Betrachtung der Fernmetastasen

Laut Abb. 17 (s. S. 52) repräsentiert das vorliegende Patientenkollektiv die in der Literatur beschriebene Lokalisationsverteilung der synchronen Fernmetastasen. Hauptfernmetastasenorte sind Leber, Peritoneum und Lunge. Aufgrund der anatomischen Gefäßversorgung, finden sich Lungenmetastasen häufiger bei Rektumkarzinomen, während Lebermetastasen eher bei Kolonkarzinomen vorzufinden sind (Cejas et al., 2009). Cerebrale Metastasen sind dagegen ungewöhnlich. Jedoch ist das kolorektale Karzinom für 5% der Hirnmetastasen verantwortlich, die in der Mehrheit der Fälle erst in einem späteren Stadium der Krebserkrankung (metachron) auftreten (Üskent et al., 2003).

Die Entwicklung einer Peritonealkarzinose ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Jayne et al., 2002). Entstehen kann diese entweder durch eine transmurale Streuung des Primarius oder aber auch durch eine Perforation. Sie wird in 5% - 8% der Patienten mit kolorektalem Karzinom bei Primärtumorresektion gefunden und ist zusätzlich zur Lymphknoten-Ratio ein wichtiger prognostischer Faktor für dieses Krebsgeschehen (Matsuda et al., 2011).

Weitere ermittelte Daten zeigen, dass der Anteil an synchronen zu metachronen Fernmetastasen sowie deren prozentuale Verteilung bzgl. des KRAS-Status mit anderen Studienergebnissen vergleichbar ist (Cejas et al., 2009; Italiano et al., 2010; Molinari et al., 2009). Die häufigste Lokalisation stellt die Leber dar (Artale et al., 2008; Borner et al., 1999; Molinari et al., 2009). Dies bestätigen die vorliegenden Daten sowohl im synchronen, wie auch metachronen Fall (s. Kapitel 3.2.5 und 3.5.6.2).

Tabellen 31 (s. S. 85) zeigt des Weiteren, dass kein signifikanter Einfluss von synchronen auf die Entwicklung von metachronen Fernmetastasen besteht. Darüberhinaus besteht auch keine Assoziation zwischen den Diskordanzen und Konkordanzen oder KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation auf die Entwicklung von metachronen Fernmetastasen.

Diese Ergebnisse sind in der Literatur nicht untersucht, so dass hierzu keine Vergleichsdaten zur Verfügung stehen. Ursache für diese fehlende Assoziation könnte jedoch auch in diesem Fall eine Mutation in anderen Effektoren (KRAS Codon 61, 146 oder BRAF, NRAS, PIK3CA) der Signalkaskaden, ausgehend von EGFR sein.

4.3.4.7 Differenzierte Betrachtung der Rezidive

Bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist die Methode der Wahl die operative Resektion. Trotzdem entwickeln ca. 40% der primär kurativ operierten Patienten im Verlauf ein lokales, regionales oder fernes Tumorrezidiv (Buglioni et al., 1999). Im vorliegenden Patientenkollektiv sind jedoch nur 15% von einem Rezidiv (davon 42,9% KRAS-Mutationen) betroffen (s. Kapitel 3.5.6.1).

Eventuell ist dieser verringerte Prozentsatz auf die im Vergleich zum Jahre 1999 inzwischen ausgefeiltere Chemotherapie und Target-Therapie zurückzuführen. Ein Vergleich zwischen Diskordanzen und Konkordanzen kann nicht gezogen werden, da ein einzelner Diskordanzfall kein repräsentatives Bild für diese Gruppe abgibt.

Dieser Fall ist jedoch erwähnenswert, da jener Patient eine Entwicklung von 4 parallel aufgetretenen Rezidiven zeigt, deren KRAS-Status 2x Wildtypen und 2x Mutationen zeigt. Dieses Bild verdeutlicht, dass der ursprüngliche Primärtumor, der hier zur KRAS-Mutationsanalyse leider nicht zur Verfügung stand, möglicherweise eine Tumorerogenität aufwies, wodurch unterschiedlich Zellen mit verschiedenem KRAS-Status sich absiedeln konnten.

4.3.5 Beurteilung der Survivalanalyse

Das mittlere OS ist beim metastasierten kolorektalen Karzinom im letzten Jahrzehnt von ca. 12 auf ca. 20 Monate angestiegen (Meyerhardt and Mayer, 2005; Saunders and Iveson, 2006). Jene Zeitphase wird im untersuchten Kollektiv mit ca. 42 Monaten (Konkordanzen) und ca. 50 Monaten (Diskordanzen) weit überschritten (s. Kapitel 3.7). Dies ist vermutlich nicht auf noch bessere Therapien zurückzuführen, sondern begründet sich eher darin, dass in das Patientenkollektiv auch Patienten aufgenommen wurden, die postoperativ keine Fernmetastasen besaßen, vorerst nicht adjuvant behandelt wurden und damit ihr langes PFS postoperativ gewichtig auf die Statistik des OS einwirkt. Bei Herausrechnung dieser 8 Patienten ergibt sich trotzdem ein mittleres OS von 37 Monaten (Konkordanzen) und 40 Monaten (Diskordanzen), woraus der Schluss gezogen werden könnte, dass hier eine hohe Resilienz (Widerstandsfähigkeit) der Patienten vorlag.

Im Gesamtkollektiv zeigt sich erwartungsgemäß der M0-Status in der Survivalanalyse mit einem Überlebensvorteil gegenüber dem M1-Status (HR=4,74; 95% CI 1,49 - 9,64 ; p= 0,0004). Eine prognostische Relevanz ist mit diesem breiten Konfidenzintervall nur annähernd gegeben. Hilfreich wäre ein größerer Stichprobenumfang, der hier aber nicht zur Verfügung steht. Jedoch stimmt diese Beobachtung mit der Prognose im Stadium UICC IV überein, in welcher die 5-JÜR von 8% wesentlich niedriger ist als im Stadium I-III mit 44% - 93% (O'Connell et al., 2004). Damit würde sich im vorliegenden Patientenkollektiv für Patienten mit Fernmetastasen ein 4,74-fach höheres Risiko ergeben, früher zu versterben, als Patienten im M0-Stadium. Dieser signifikante Unterschied im OS spiegelt sich sowohl in der Subgruppe der Konkordanzen (p=0,003), wie auch der Diskordanzen (p=0,007) wieder, wodurch geschlussfolgert werden kann, dass das Wissen über Diskordanzen in diesem Fall keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat.

Eine Signifikanz unter den Konkordanzen zeigt sich in Bezug auf das PFS. Das M1-Stadium bei ED zeigt hier ein 1,98-fach höheres Risiko zur frühzeitigeren Progression als das M0-Stadium (HR=1,98; 95% CI 1,05 - 3,73; p=0,031). Diese Signifikanz lässt

sich jedoch bei den diskordanten Fällen nicht nachweisen. Desweiteren zeigt sich auch der KRAS-Status als prognostisch relevant. Nachgewiesene KRAS-Mutationen haben ein 2,14-fach höheres Risiko zur früheren Progression als Wildtypen (HR=2,14; 95%CI 1,1 - 4,16; p=0,021). Dieses Verhalten zeigt sich in der Literatur besonders beeindruckend bei Therapien mit Cetuximab nach zuvor fehlgeschlagener Chemotherapie. Das PFS kann hierbei zeitlich verdoppelt werden (Karapetis et al., 2008). Vorliegende Daten sind das Ergebnis verschiedener Chemotherapien und bestätigen damit, dass der KRAS-Status unabhängig von der Innovation Target-Therapie grundsätzlich bzgl. des Progress eine Rolle spielt. Beide zuvor erwähnten signifikanten Ergebnisse besitzen in diesen Fällen ein wesentlich kleineres Konfidenzintervall, so dass diese Ergebnisse tendenziell relevant erscheinen.

Außerdem konnten durch verschiedene weitere Variablen (Grading, Lokalisation, T- und N-Klassifikation) keine Auswirkungen auf das Gesamtüberleben oder das progressionsfreie Überleben verzeichnet werden. Eine Einflussnahme der Diskordanzen/Konkordanzen oder des KRAS-Wildtyp/KRAS-Mutation auf das Gesamtüberleben kann nicht nachgewiesen werden. Eben diese fehlende Assoziation zwischen KRAS-Status und OS wird auch in der Literatur beschrieben (Cejas et al., 2009; Etienne-Grimaldi et al., 2008).

4.4 Kritische Bewertung der Durchführung

4.4.1 Patientenkollektiv

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist mit einem Stichprobenumfang von n=60 Patienten durchaus repräsentativ, dennoch unterliegt die Subgruppe der Diskordanzen mit n=12 einer großen Inhomogenität. Diese ist sowohl auf die Vielfältigkeit der untersuchten Gewebe und Therapieregime, die unterschiedliche Länge der Follow-up-Zeiten sowie die individuelle Ausbreitung der Erkrankung zurückzuführen. Diese Punkte sind zwar auch bei den Konkordanzen vorhanden, zeigen jedoch aufgrund des größeren Stichprobenumfangs mit n=48 eher Übereinstimmungen.

Durch die Gewebevielfalt mit gleichzeitig niedrigem Stichprobenumfang ist es schwierig, die Richtung des Kausalzusammenhangs in Bezug auf den Konkordanz- und KRAS-Status sowie das Outcome zu klären und damit Rückschlüsse auf die individuelle Situation des Patienten zu ziehen. Folglich musste der KRAS-Status in den Vordergrund gestellt werden, ohne die individuelle Situation des Patienten mit all seinen Tumorlokalisationen berücksichtigen zu können.

4.4.2 Verbesserungsvorschläge

4.4.2.1 RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)

Die RECIST-Kriterien stellen eine hervorragende Einteilung für das Therapieansprechen dar. Allerdings hat sich während der Auswertung dieser Untersuchung gezeigt, dass jene Kriterien für eine konkrete Betrachtung des Ansprechens im Falle von Diskordanzen nicht ausreichen. Um das Ansprechen genau zu verfolgen wäre eine detaillierte Auflistung mit konkreter Beschreibung der Progression oder Remission derjenigen Gewebe, die mutationsanalytisch auf KRAS untersucht wurden, hilfreich. Aus den zugesandten Arztbriefen war es teilweise nicht möglich herauszulesen, ob z.B. der Progress nur im Primarius oder auch in den Metastasen stattfand. Im diskordanten Fall ist eben genau diese Analyse essentiell, um ein Ansprechen differenziert nach Geweben mit KRAS-Wildtyp unter Anti-EGFR-Therapie verfolgen zu können.

4.4.2.2 Prospektive Studien

Da Diskordanzen auch weiterhin Gegenstand von Untersuchungen und Studien sein sollten, wäre es sinnvoll, speziell im Hinblick auf diese Subgruppe, prospektive Studien durchzuführen. Damit wäre von vornherein die Follow-up-Zeit für alle Probanden festgelegt, es gäbe keine Abhängigkeit von alten und unvollständigen Daten, es könnten gleiche Therapieregime angewendet werden und statt lediglich Hypothesen könnten Beweise erbracht werden. Durch diese Vereinheitlichung wären auch die statistischen Ergebnisse aussagekräftiger. Allerdings darf man natürlich nicht vergessen, dass es schwierig ist, genau jene Patienten mit Diskordanzen ausfindig zu machen, zumal dieser Kordanz-Status erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung definierbar ist.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend leistet die vorliegende Untersuchung einen wertvollen Beitrag zur Relevanz der Diskordanzenbestimmung.

4.5.1 Ursachen für Diskordanzen

Die Arbeit bestätigt das Vorhandensein von einem hohen Diskordanzgrad mit 20% und widerspricht damit der uneingeschränkten Übereinstimmung der KRAS-Mutationsstati in den verschiedenen Geweben eines Patienten. 4 mögliche Ursachen erklären dieses diskordante Verhalten: intratumorale Heterogenität, sehr frühe Disseminierung (Zeitfaktor), unabhängige Zweitneoplasie, unterschiedliche Metastasierungspotenz.

4.5.2 Einfluss des Kordanz-Status auf OS/PFS

In dieser Arbeit konnte keine Signifikanz im direkten Vergleich zwischen Konkordanzen/Diskordanzen und dem OS oder PFS nachgewiesen werden.

4.5.3 Einfluss des Kordanz-Status auf weitere Parameter

Bis auf einen, konnte bei keinem der untersuchten Parameter (TNM-Klassifikation, Lokalisation, Grading) eine Beeinflussung im Krankheitsverlauf durch den Kordanz-Status beobachtet werden. Lediglich bei vorliegendem diskordantem Mutationsstatus ist es irrelevant, ob Fernmetastasen vorliegen, da das PFS sowohl im M0 wie auch im M1-Stadium ähnlich kurze progressionsfreie Zeiten aufzeigt. Dies verdeutlicht, dass die Vorhersage der eigentlich prognostisch positiven, metastasenfrien Situation im Falle von Diskordanzen ggf. relativiert werden muss. Diese Feststellung muss weiter hinterfragt werden, da der Stichprobenumfang möglicherweise hierfür zu gering ist. Inwiefern eine tatsächliche, reproduzierbare Signifikanz vorliegt, muss in anderen Studien mit größeren Kollektiven überprüft werden.

4.5.4 Therapieansprechen & klinische Relevanz der Diskordanzen

Das Ansprechen der Diskordanzen zeigt in Bezug auf die First-Line-Chemotherapie keinen Unterschied zu den Konkordanzen. Leider kann keine relevante Aussage über ein Ansprechen unter Target-Therapie gegenüber den Konkordanzen gemacht werden. Grund hierfür ist, dass keiner der diskordanten Fälle im Primärtumor einen KRAS-Wildtyp präsentiert, so dass mit zwei Ausnahmen keine Antikörpertherapie erfolgte. Die eine Ausnahme zeigt bei vorliegender KRAS-Mutation und Cetuximabgabe eben jenen in der Literatur beschriebenen fehlenden Benefit (s. Kapitel 4.3.4.2.1).

Die andere Ausnahme verdeutlicht bei unbekanntem KRAS-Status im Primärtumor jedoch teilweise Wildtyp-Status in Metastasen und Rezidiven, eine zeitweilige partielle Remission unter Panitumumab. Dieses Beispiel untermauert, dass das Wissen über einen diskordanten KRAS-Mutationsstatus möglicherweise Konsequenzen für die Therapie haben könnte. Präsentieren einzelne Gewebe einen KRAS-Wildtyp, so besteht bei diesen zumindest die Fähigkeit auf eine Antikörpertherapie mit Erfolg anzusprechen.

Das Ansprechen auf Cetuximab und Panitumumab hingegen bei zu Grunde liegendem KRAS-Wildtyp ist repräsentativ. Gründe für den hierbei hohen Non-Responderanteil sind in einer fehlerhaften Analyse, dem Vorhandensein von Diskordanzen oder aber anderen, nicht routinemäßig untersuchten Mutationen (KRAS 147, N-RAS, PIK3CA) zu suchen. Eben diese Mutationen können Ursache für das nicht nachweisbare unterschiedliche Verhalten im KRAS-Status oder Konkordanz-Status auf das Tumorwachstum, den Nodalstatus und die Fernmetastasen sein.

Eine Mutation in KRAS (Codon61) und BRAF(V600E) als Grund für ein Nichtansprechen konnte bei den vorliegenden Nonrespondern ausgeschlossen werden.

4.5.5 Modulation des therapeutischen Imperativs

Es ist zu überlegen, ob zukünftig der therapeutische Imperativ im Falle des metastasierten kolorektalen Karzinoms eine andere Entscheidungsbasis für das Therapieregime erhalten sollte. So könnte man nicht mehr den KRAS-Status des

Primarius sondern der Metastasen als Entscheidungshilfe wählen. Hintergrund hierbei ist, dass das klinische Ansprechen auf die metastatische Erkrankung hin evaluiert, jedoch der Status von KRAS im Primarius bestimmt wird. Der Primarius dagegen befindet sich nach der Resektion nicht mehr im Organismus und ist damit eigentlich nicht mehr „target“ der adjuvanten Therapie, wohingegen die verbliebenen Metastasen einer Behandlung bedürfen.

Diese Situation stellt in Frage, ob der KRAS-Status im Primarius damit den KRAS-Status in den Metastasen sicher und korrekt widerspiegelt.

Das Vorhandensein eines diskordanten Mutationsstatus wird momentan in der aktuellen Leitlinie noch nicht berücksichtigt, da viele Jahre eine Konkordanz zwischen den Geweben, die aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz hervorgehen, angenommen wurde.

Weil inzwischen einige Studien, inklusive der vorliegenden, einen Diskordanzgrad von bis zu 44% beschreiben, der in diesem Ausmaß nicht mehr zu vernachlässigen ist, wäre es angebracht diese Fälle zukünftig auch in die Evaluation mit einfließen zu lassen. Damit könnte ein weiteres Subkollektiv erfasst werden, das eventuell für eine Anti-EGFR-Therapie in Frage kommen könnte, falls einzelne Gewebe ein KRAS-Gen im Wildtyp präsentieren.

4.5.6 Fazit

Allerdings beinhaltet der KRAS-Status Unwägbarkeiten, denn die momentane prädiktive Diagnostik besitzt noch keine 100%ige Aussagekraft für das Ansprechen der Antikörpertherapie. Der Responderanteil von lediglich 10% - 20% verdeutlicht, dass zwar die ersten Schritte in Richtung personalisierter Medizin erfolgreich gegangen wurden, jedoch eine Weiterentwicklung des Konzepts unbedingt noch erfolgen muss, um eine optimale Prädiktion zu ermöglichen.

4.6 Epikritische Betrachtung und Ausblick

4.6.1 Prädiktive Biomarker

Viele Gründe für ein Nichtansprechen der Therapie verleiten dazu, die momentane prädiktive Diagnostik für das kolorektale Karzinom in Frage zu stellen. Sich mit der Entscheidung für eine spezifische Therapie, allein auf einen Biomarker mit nur 47%iger Sensitivität zu berufen, ist risikobehaftet, wenn man sich bewusst ist, welche Vielfalt an Möglichkeiten für eine Therapieresistenz hinter einem KRAS-Wildtyp stecken können. Die niedrige Sensitivität ist unbefriedigend. Jedoch veranschaulicht sie die momentane Situation, dass der Bedarf, einen Marker zu nutzen, der die ärztliche therapeutische Entscheidung unterstützt sowie das Ansprechen vorhersagt, auch ohne dabei maximale Spezifität und Sensitivität aufzuweisen, überwiegt. Dies wiederum impliziert die Notwendigkeit der Erforschung weiterer, sensitiverer prädiktiver Biomarker, die nicht nur eigenständig sondern evtl. auch in Kombination mit KRAS eine Steigerung der zukünftigen prädiktiven Diagnostik ermöglichen.

Eine Idee ist, dass bei detektiertem KRAS-Wildtyp sich eine BRAF-Analyse routinemäßig anschließt. Bei Wildtyp in diesem Gen würde man anschließend NRAS untersuchen und falls immer noch keine Mutation nachweisbar ist, zuletzt noch PIK3CA (De Roock et al., 2010a). Bereits mit einem Wildtyp in KRAS und BRAF wären bereits 55% Nonresponder ausgeschlossen (Bardielli et Siena, 2010). Dieses Vorgehen basiert auf der Erkenntnis, dass KRAS, BRAF und NRAS- Mutationen sich gegenseitig ausschließen (De Roock et al., 2008; De Roock et al., 2010a).

Darüberhinaus konnten Assoziationen zwischen ansteigender EGFR-Genexpression (Moroni et al., 2005b) und dem Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie sowie auch bei erhöhtem Expressionslevel der EGFR-Liganden „Amphiregulin“ und „Epiregulin“ (Khambata-Ford et al., 2007) nachgewiesen werden. Da beide eigenständig derzeit nicht als prädiktive Biomarker in Frage kommen (Balko et al., 2009; Moroni et al., 2005a), könnten sie jedoch als Ergänzung zusätzliche prädiktive Information bieten.

Dadurch würde die sich neu entwickelnde Systempathologie (Dietel and Schäfer, 2008) in den Vordergrund rücken und die Vernetzung der Einzelergebnisse zu einem vollständigeren Bild bzgl. der Prädiktion möglich sein.

Dies alles zeigt, dass zukünftig große prospektive, multizentrische Biomarkerstudien notwendig sind, um weitere prädiktive Marker zu validieren. Es betrifft nicht nur das kolorektale Karzinom, sondern alle Karzinomentitäten.

Der geringe Bruchteil an zugelassenen Biomarkern zeigt nur die Spitze eines Eisbergs der Theranostik. Der „Berg“ an sich umfasst viele potenzielle neue Marker, die jedoch in hohem Maße wegschmelzen, da die Prädiktion mit ihrer möglichst hohen Spezifität und Sensitivität enorme Anforderungen stellt.

4.6.2 Nutzen der Selektion

Die momentane Situation erfordert eine Selektion von Patienten als höchste Priorität, da die Kosten einer prädiktiven Pathologie und Target-Therapie enorm sind. Auch in Zukunft spielt diese Subgruppeneinteilung eine zentrale Rolle, da sonst Biologicals, wie Antikörper, ökonomisch nicht mehr tragfähig sind. Genau diese Selektion stellt ja auch die Grundlage für eine personalisierte Medizin dar und begründet damit die Eingliederung der individualisierten Therapie in das klinische Setting mit einer hohen translationalen Relevanz. Eine Kostenminimierung ist derzeit nicht absehbar, aber durch die Selektion werden weniger erfolglose Therapien durchgeführt. Eine Verbesserung des Kosten-Nutzen-Effektes wird dadurch erzielt.

Man darf selbstverständlich die Selektion nicht nur als Mittel zum Zweck für kosteneffizienteres Management ansehen, sondern vielmehr als Überlebensverlängerung, Lebensqualitätssicherung oder Nebenwirkungsreduktion für Patienten. Ziel ist der individuelle Patient, der im Krankheitsfall Anspruch auf Hilfe hat. Eine gute Lebensqualität trotz schwerer Krebserkrankung erzeugt nachgewiesenermaßen einen Therapieerfolg und teilweise auch Lebenszeitverlängerung. Die Bereitstellung von finanziellen Mitteln für diese Diagnostik kann zu Beginn größere Beträge umfassen, als es mittelfristig der Fall sein wird. Diese Kosten jedoch, müssen den vielfältigen Kriterien standhalten, die gesellschaftlich, medizinisch und ökonomisch als Nutzen definiert werden. Prädiktive Pathologie und Target-Therapie verhindern die Verschwendung von Ressourcen. Sie sind das Ergebnis der neuesten Forschung, leiteten die personalisierte Medizin ein, vernetzen Wissenschaft und Klinik und können auf der Basis des interdisziplinären Managements die Forschung bereichern. So gelangen

monetäre Investitionen in Form von Daten und Analysen schrittweise in die Forschung zurück.

4.6.3 Personalisierte Medizin

Mit der Entwicklung von prädiktiven molekularen Untersuchungen und der folgenden Selektion von Patienten wurde eine neue Dimension in der Medizin geöffnet. Die drei Standbeine dieser modernen Medizin mit der prädiktiven Pathologie, der Target-Therapie sowie der personalisierten Medizin sind nicht mehr wegzudenken. Niemand kann sich diesem Fortschritt entziehen. Sie sind die Voraussetzung für eine maßgeschneiderte Therapie eines jeden Patienten, um den individuellen Tumor mit optimaler Wirkung und maximalem Erfolg zu bekämpfen.

Die individualisierte Medizin stellt eine neue Chance dar, um komplexe Zusammenhänge detaillierter verstehen zu können. Es ist eine Chance für den Patienten sowie eine Herausforderung für den Pathologen und Onkologen. Detailkenntnis führt langfristig zu effizienteren, nebenwirkungsärmeren und kostengünstigeren Behandlungsstrategien. Früher wurden Medikamente hergestellt, die möglichst bei vielen Patienten Wirkung zeigten, jedoch interindividuell sehr verschieden ansprachen. Der heutige Einsatz von teuren, hochtechnisierten sowie spezifischen Tumortherapeutika, individualisiert an den Patienten angepasst, ermöglichen einen Rückgang der Applikationsrate von wirkungslosen und nebenwirkungsreichen Medikamenten.

Die personalisierte Medizin ist auf ein Maximum an Präzision bzgl. Aussagen über maligne Tumoren angewiesen, da die Konklusion für die richtige Therapie grundlegend von der prädiktiven Pathologie abhängt. Die Ergebnisse der momentan in der Routine durchgeführten Methoden sowie des Follow-up der Patienten verdeutlichen, dass der Responderanteil der Patienten, nach KRAS-Mutationsanalyse, bereits bei 10% - 20% liegt. Dies beweist, dass diese individualisiert abgestimmte Therapie Erfolg zeigt und damit den richtigen Weg beschreitet. Dass dieser Prozentsatz an Respondern weiter erhöht werden kann, bestätigen die noch nicht routinemäßig durchgeführten Mutationsanalysen an BRAF, N-RAS und Codon 61 des KRAS-Gens.

Dass diese personalisierte Medizin jedoch erst Anwendung findet, wenn sich der Patient in einem metastasierten Stadium befindet, in dem meist nur noch eine palliative Therapie möglich ist, ist ein Kernproblem der heutigen, aufstrebenden Entwicklung der tumorspezifischen Vorsorgeuntersuchungen (z.B. Endoskopie). Der Gedanke des Eingreifens in einem möglichst frühen Stadium mit kurativem Ziel wird beim kolorektalen Karzinom bisher nur durch die klassischen Therapieverfahren wie Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie umgesetzt.

Warum aber nicht frühzeitig schon tumorspezifisch individuell agieren?

Besteht vielleicht die Möglichkeit durch frühzeitige individuelle Therapie die Wahrscheinlichkeit zur Rezidivierung zu verringern oder sogar die Mikrometastasierungspotenz weiter zu minimieren?

Dies führt zu der Frage, ob man zukünftig personalisierte Medizin, basierend auf der prädiktiven Pathologie und der Target-Therapie, bereits in früheren, fernmetastasenfreien Stadien umsetzen sollte?

Zu diskutieren wäre ebenfalls, inwiefern bereits Adenome auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen könnten.

Weiter stellt sich die Frage, ob eine personalisierte Medizin in einem sehr frühen Stadium eine systemische Erkrankung effektiv verhindern könnte?

Beispielsweise liegt bei bestehender Lymphangiosis carcinomatosa per definitionem noch keine Fernmetastasierung vor, so dass keine KRAS-Mutationsanalyse stattfinden und damit keine personalisierte Medizin umgesetzt werden kann. Die Infiltration der Lymphgefäßbahnen ist aber nicht mehr kurativ behandelbar und zeigt eine hohe Fernmetastasierungspotenz.

Könnte also eine Antikörpertherapie in dieser Situation die Fernmetastasierung frühzeitig verhindern?

Diese hypothetischen Möglichkeiten und Fragen zum Einsatz der personalisierten Medizin beim kolorektalen Karzinom zeigen, dass es noch viele offene Fragen gibt, worauf die zukünftige Forschung hoffentlich bald Antworten finden wird.

Das „Rad der Erkenntnis“ lässt sich nicht zurückdrehen. Die personalisierte Medizin hat den Weg beschritten. Wie viele Steine hierbei im Weg liegen, bestimmen etliche Faktoren. Die Berechnung des Kosten-Nutzen-Effekts ist einer davon. Welchen

Stellenwert er in der gesellschaftlichen, ethischen und ökonomischen Betrachtung von Gesundheit erhält, muss auch zukünftig diskutiert werden und v.a. transparent bleiben, um ein Auseinanderdriften der Pole Gesundheitspolitik, Wirtschaftlichkeit, persönlicher Hilfsanspruch, Früherkennung, Heilung und Forschung zu vermeiden.

4.6.4 Medizin-ethische Aspekte

Die Kriterien, nach denen ein Patient momentan im metastasierten Stadium des kolorektalen Karzinoms behandelt wird, sind rational und enorm effizienz-orientiert. „Evidence-based medicine“ ist das Stichwort. Die Entscheidung für eine medizinische Behandlungen soll patientenorientiert und möglichst auf empirisch nachgewiesener Wirksamkeit basieren. In keiner Weise wird eine Klassen-Medizin angewandt. Jedoch wirft dies folgende Frage auf:

Kann man aufgrund von molekularpathologischen Tests Patienten Therapien verweigern, mit der Begründung, dass Sie laut Statistik ein schlechtes Ansprechen zeigen werden? Nach heutigem medizinisch - wissenschaftlichem Kenntnisstand, weiß man bereits, dass es interindividuelle Reaktionen auf Medikamente gibt und dass diese nicht ausschließlich auf genetischer Ebene determiniert sind. Inwiefern epigenetische Veränderungen ein mutiertes KRAS-Gen außer Kraft setzen oder der individuelle Hormonhaushalt Einfluss auf die Signalkaskaden, die EGFR nachgeschaltet sind, haben kann, ist derzeit noch ungeklärt. Auch die Resilienz (Widerstandsfähigkeit) der Patienten (s. Kapitel 4.6.) oder mögliche zeitliche Latenz im Ansprechen sind nicht vorhersehbar.

Selbstverständlich kann durch ein rationales Vorgehen keine Erfolgsgarantie gesichert werden, jedoch ermöglicht es eine umfassende, integrierte Versorgung unserer Gesellschaft mit erhöhter Bereitschaft für vulnerable Patientensubgruppen. Transparenz, Qualität und Verfügbarkeit sind die Grundlage für eine akzeptierte Kategorisierung und Kriterienbildung.

Das sporadische kolorektale Karzinom ist die häufigste Krebserkrankung in Europa und betrifft demographisch gesehen v.a. ältere Patienten. Da gerade in Deutschland die Alterspyramide auf dem Kopf steht, besteht hier enormes Forschungspotential. Genau

jene Altersgruppe darf nicht als „zu alt“ abgetan werden, sondern muss zentraler Untersuchungsgegenstand sein, und zwar auch im Hinblick auf interindividuelle Unterschiede im Ansprechen der Patienten. Ob wir damit Erkenntnisse gewinnen, die vielleicht einmal prophylaktische Bedeutung erhalten, ggf. das Krebsgeschehen besiegen oder ein längeres Leben unter Medikation möglich machen, hängt von unserer Investition ab. Die Allokationsethik ist ein Schlüssel dazu. Sie hilft das Für und Wider sowie die Dimensionen individueller Anspruch und gesellschaftliche Realisierbarkeit zu verknüpfen.

5. Zusammenfassung

Im Zuge der Innovationen prädiktive Pathologie und Target-Therapie hat sich der Pathologe vom „Omega“ zum „Alpha“ entwickelt und bestimmt inzwischen maßgeblich durch primäre therapeutische, molekularpathologische Untersuchungen spätere Therapiemaßnahmen. Durch seine Bestimmung des KRAS-Mutationsstatus beim metastasierten kolorektalen Karzinom (mKRC), kann er eine Aussage über den Benefit einer Anti-EGFR-Therapie machen (Cetuximab/Panitumumab), was inzwischen Grundlage in der Diagnostik und Therapie dieser Krebserkrankung ist.

Im Vorliegenden wird abgehandelt, in wie weit beim mKRC ein diskordanter KRAS-Status einen therapeutischen Imperativ beinhaltet. Lange Zeit ging man von einem hohen Konkordanzgrad zwischen Primarius und Metastasen im KRAS-Status aus. Inzwischen häufen sich Studien, die einen evtl. unterschätzt hohen Diskordanzgrad belegen, was in der vorliegenden Untersuchung mit 20% bestätigt wird. 4 Ursachen lassen sich für das Auftreten von Diskordanzen benennen: intratumorale Heterogenität, frühzeitige Disseminierung, unabhängige Zweitneoplasie und unterschiedliche Metastasierungspotenz. Durch die Identifizierung von Diskordanzen könnte zukünftig ein Subkollektiv erfasst werden, das teilweise KRAS-Wildtypgewebe besitzt und so mit einer partiellen Remission ansprechen könnte. Möglicherweise würde hierdurch die Überlebenszeit dieser Patienten sowie ihre Lebensqualität erfolgreich verbessert werden.

Analysiert wurde der KRAS-Status bei 60 Patienten (an min. je 2 verschiedenen Gewebetypen) mittels Array-Analyse in Codon 12 und 13, welche eine kostengünstige Detektion bei gleichzeitiger Sensitivitätssteigerung der Methode durch WSC darstellt. Die Erhebung von Follow-up-Daten ermöglichte die Betrachtung des Krankheitsverlaufs. Ein signifikanter Unterschied im Konkordanz-Status bzgl. OS/PFS konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine mögliche Beeinflussung der TN-Klassifikation, des Gradings und der Lokalisation nicht bestätigt werden. Im Gesamtkollektiv, unabhängig von der getrennten Betrachtung Konkordanzen/Diskordanzen, zeigt sich der M0-Status mit einem signifikanten Überlebensvorteil gegenüber dem M1-Status. Im Hinblick auf das PFS jedoch zeigt sich die Signifikanz nur bei den Konkordanzen. Eine Vorhersage der eigentlich prognostisch positiven,

metastasenfreien Situation müsste im Falle der Diskordanzen ggf. relativiert werden. Ob tatsächliche, reproduzierbare Signifikanzen vorliegen, muss in weiteren Studien mit größeren Kollektiven überprüft werden.

Die Bestimmung des KRAS-Status dient derzeit momentan nur als therapeutische Entscheidungshilfe, da die prädiktive Diagnostik noch keine 100%ige Aussagekraft für das Ansprechen der Anti-EGFR-Therapie besitzt. Das vorliegende Patientenkollektiv zeigte einen repräsentativ hohen Nonresponder-Anteil unter den Konkordanzen mit KRAS-Wildtyp, der zusätzlich untersucht wurde. Hier ließ sich mittels Pyrosequenzierung von BRAF(V600E) und KRAS(Cod61) keine Ursachenklärung für das fehlende Ansprechen verzeichnen.

Aufgrund der niedrigen Sensitivität von KRAS, ist weiterhin eine intensive Forschung im Hinblick auf neue Biomarker notwendig. Der hohe Nonresponder-Anteil einer Anti-EGFR-Therapie zeigt, dass die Bestimmung von KRAS in Zukunft nicht alleine ausreicht, um das Ansprechen effektiv und mit einem hohen Prozentsatz im Voraus zu bestimmen. Wesentliche wissenschaftliche Erkenntnisse bzgl. einer personalisierten Medizin liegen bereits vor, eine Weiterentwicklung des Konzepts ist jedoch unbedingt notwendig, um eine optimale Prädiktion zu ermöglichen.

6. Anhang

Formular zur Datenvervollständigung - mCRC

Name:
 Vorname:
 Geburtsdatum:

primäre Dickdarm-OP, wo? _____
(Adresse der Klinik)

Entlassbrief beigelegt ? NEIN JA

Gab es einen Therapieabbruch ? NEIN JA, warum ? _____

Wurde die Therapie unterbrochen ? NEIN JA, für wie lange ? _____

nach Therapieende:

- stabile Erkrankung - keine Veränderung
- Komplette Remission - Vollständiges Verschwinden aller Läsionen > 4 Wochen
- Teilremission - Tumolvolumen um > 50% reduziert
- Minimale Remission - Tumolvolumen um 25-50 % reduziert
- Vergrößerung des Tumors um min. 20%
- _____

erneute Operation ?

- Resektion des Rezidivtumors
- Metastasenresektion, wo?: _____
- _____

wann ? (Datum) _____

Patient verstorben ? NEIN JA, wann ? (Datum) _____
 woran ? _____

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Chronologische Darstellung der Entwicklung der Pathologie von den Wurzeln im 5. Jhd. v. Chr. bis ins beginnende 21. Jahrhundert.	2
Abb. 2:	Entwicklung der Beurteilungskriterien.....	3
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Komponenten der modernen pathologischen Diagnostik.....	4
Abb. 4:	Multistep-Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms.....	12
Abb. 5:	Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-abhängigen Signaltransduktion.	16
Abb. 6:	Flussdiagramm laut Leitlinie zur KRAS-Mutationsanalyse beim metastasierten kolorektalen Karzinom (ASCO).....	22
Abb. 7:	Beziehungen in Access	30
Abb. 8:	Graphische Darstellung der Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs; Ringdiagramm (n=60).....	44
Abb. 9:	Graphische Darstellung der allgemeinen Verteilung des Patientenalters bei Erstdiagnose (ED) im Histogramm mit einer Klassengröße von 10 Jahren inklusive Normalverteilungskurve (n=60).....	45
Abb. 10:	Vergleichende graphische Darstellung der geschlechterspezifischen Verteilung des Alters bei Erstdiagnose (ED) im Histogramm mit einer Klassengröße von 10 Jahren	45
Abb. 11:	Graphische Darstellung der anatomischen Verteilung der Tumorlokalisation; Tortendiagramm (n=6).....	46
Abb. 12a,b:	Graphische Darstellungen der anatomischen Verteilung der Tumorlokalisation, getrennt nach Geschlecht; Tortendiagramme (a.) n=21 b.) n=39)	47
Abb. 13:	Graphische Darstellung der histologischen Differenzierung;.....	47
Abb. 14:	Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der Stichprobe (n=60) bzgl. des Gradings G1 – G4	48
Abb. 15:	Graphische und tabellarische Darstellung der UICC-Stadieneinteilung nach Primäroperation (n=60).....	50
Abb. 16:	Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der N-Klassifikation (n=60) und M-Klassifikation (n=60)	51
Abb. 17:	Graphische und tabellarische Darstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der Fernmetastasen bei Erstdiagnose (n=49).....	52
Abb. 18:	Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der R-Klassifikation (n=60)	53
Abb. 19:	Graphische Darstellung der Verteilung des Übereinstimmens bzw. Nicht-Übereinstimmens im KRAS-Mutationsstatus verschiedener Gewebe, der gleichen Person; Tortendiagramm (n=60)	55
Abb. 20:	Graphische Darstellung der Verteilung des KRAS-Mutationsstatus in der Subgruppe der Konkordanzen; Tortendiagramm (n=48).....	56
Abb. 21:	Zusammenfassende graphische Darstellungen der Verteilungen des KRAS-Mutationsstatus an 5 verschiedenen Gewebetypen des Subkollektivs (n=12) mit diskordantem KRAS-Mutationsstatus; Tortendiagramme	62
Abb. 22:	Graphische Darstellung der Verteilung der T-Klassifikation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstaus (n=60).....	64
Abb. 23:	Graphische Darstellung der Verteilung der N-Klassifikation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	65
Abb. 24:	Graphische Darstellung der Verteilung der M-Klassifikation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	66
Abb. 25:	Graphische Darstellung der Verteilung des Gradings in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	67

Abb. 26:	Graphische Darstellung der Verteilung der Primärtumorlokalisation in Bezug auf den Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	68
Abb. 27:	Makroskopische Bilder eines Rektumkarzinoms	70
Abb. 28:	mäßig differenziertes Adenokarzinom (G2) des Kolons	71
Abb. 29:	mäßig differenziertes muzinöses Adenokarzinom (G2) des Kolons.....	71
Abb. 30:	wenig differenziertes kleinzelliges Adenokarzinom (G3) des Kolons	71
Abb. 31:	mäßig differenziertes Adenokarzinom (G2) des Rektums.....	71
Abb. 32:	Lebermetastase eines wenig differenzierten Adenokarzinoms (G3) des Rektums	71
Abb. 33:	Lymphknotenmetastase eines mäßiggradig differenzierten Adenokarzinoms (G2) des Kolons	71
Abb. 34:	Graphische Darstellung des Lebensstatus der Patienten am Stichtag der Befragung, 1.7.2010; Tortendiagramm (n=60).....	72
Abb. 35:	Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse des Ansprechens der First-Line-Chemotherapie zwischen der kontrollierten Erkrankung (CR, PR, SD) und dem Progress (PD); (n=60).....	74
Abb. 36:	Vergleichende graphische und tabellarische Darstellung des Ansprechens der Konkordanzen auf die First-Line-Chemotherapie, inklusive der getrennten Betrachtung von KRAS-Wildtyp und -Mutation, eingeteilt nach RECIST (n=48)	75
Abb. 37:	Vergleichende graphische und tabellarische Darstellung des Ansprechens der Diskordanzen auf die First-Line-Chemotherapie, eingeteilt nach RECIST (n=12).....	76
Abb. 38:	Graphische und tabellarische Darstellung der Verteilung der einzelnen Kombinationstherapien und der Monotherapie mit „Cetuximab“ in Bezug auf das Therapieansprechen (n=15)	79
Abb. 39:	Vergleichende graphische Darstellung der Verteilung der Anzahl an Therapiewechseln bzgl. des Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	80
Abb. 40:	Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gründe für einen Therapieabbruch bei den Konkordanzen; Säulendiagramm (n=48).....	81
Abb. 41:	Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gründe für einen Therapieabbruch bei den Diskordanzen; Säulendiagramm (n=12)	81
Abb. 42:	Graphische Darstellung der numerischen Verteilung des Rezidiv-auftretens bzgl. des Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	84
Abb. 43:	Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Rezidiv-auftretens bzgl. des Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	84
Abb. 44:	Vergleichende graphische Darstellung der numerischen Verteilung der metachronen Fernmetastasen und des Kordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	86
Abb. 45:	Vergleichende graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der metachronen Fernmetastasen und des Kordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	86
Abb. 46:	Vergleichende graphische Darstellung der Lokalisation der neu entstandenen Fernmetastasen getrennt nach dem Kordanz-Status; Säulendiagramm (n=18).....	87
Abb. 47:	OS vs. Diskordanzen (D) / Konkordanzen (K).....	89
Abb. 48:	OS vs. Mutiert (Mut) / Wildtyp (Wt) der Konkordanzen	89
Abb. 49:	OS vs. Lokalisation (Konkordanzen)	90
Abb. 50:	OS vs. Lokalisation (Diskordanzen).....	90
Abb. 51:	OS vs. Grading (G2; G3) (Konkordanzen).....	91
Abb. 52:	OS vs. Grading (G2; G3) (Diskordanzen).....	91
Abb. 53:	OS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Konkordanzen).....	91
Abb. 54:	OS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Diskordanzen).....	91
Abb. 55:	OS vs. M-Stadium (M0, M1) - (Konkordanzen).....	91
Abb. 56:	OS vs. M-Stadium (M0, M1) (Diskordanzen).....	91

Abb. 57:	PFS vs. Diskordanzen (D) / Konkordanzen (K).....	93
Abb. 58:	PFS vs. Mutiert (Mut) / Wildtyp (Wt) der Konkordanzen.....	93
Abb. 59:	PFS vs. Lokalisation (Konkordanzen).....	94
Abb. 60:	PFS vs. Lokalisation (Diskordanzen).....	94
Abb. 61:	PFS vs. Grading (G2; G3) (Konkordanzen).....	94
Abb. 62:	PFS vs. Grading (G2; G3) (Diskordanzen).....	94
Abb. 63:	PFS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Konkordanzen).....	94
Abb. 64:	PFS vs. N-Stadium (N0, N1, N2) (Diskordanzen).....	94
Abb. 65:	PFS vs. M-Stadium (M0, M1).....	95
Abb. 66:	PFS vs. M-Stadium (M0, M1).....	95

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zugelassene Antikörper	7
Tabelle 2: Geräte & Software, Chemikalien, Puffer, Enzyme.....	26
Tabelle 3: Fünf Kategorien des Therapieansprechens nach RECIST.....	29
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung des mittleren Patientenalters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n=60).....	44
Tabelle 5: TNM-Klassifikation UICC 2010.....	49
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Primärtumorverteilung hinsichtlich der TNM-Klassifikation sowie entsprechender UICC-Stadieneinteilung (n=60).....	50
Tabelle 7: Zusammenfassung und Verteilung der mutationsanalytisch untersuchten Gewebetypen inklusive vorhandener KRAS-Mutationen.....	54
Tabelle 8: KRAS-Mutationen in Primärtumoren (n=59).....	56
Tabelle 9: KRAS-Mutationen in Lymphknotenmetastasen (n=32).....	57
Tabelle 10: KRAS-Mutationen in Fernmetastasen (n=30).....	57
Tabelle 11: KRAS-Mutationen in Rezidiven (n=14).....	58
Tabelle 12: KRAS-Mutationen in Adenomen (n=27).....	58
Tabelle 13: Zusammenstellung der mutationsanalytischen Ergebnisse im KRAS-Gen bei n=12 Patienten mit diskordantem KRAS-Mutationsstatus.....	60
Tabelle 14: T vs. Kordanz/KRAS (n=60);.....	63
Tabelle 15: N vs. Kordanz/KRAS (n=60);.....	64
Tabelle 16: M vs. Kordanz/KRAS (n=60);.....	65
Tabelle 17: Grading vs. Kordanz/KRAS;.....	67
Tabelle 18: Lokalisation vs. Kordanz/KRAS.....	68
Tabelle 19: Exakter Test nach Fisher: TNM-Klassifikation vs. Kordanz-Status.....	69
Tabelle 20: Exakter Test nach Fisher: TNM-Klassifikation vs. KRAS-Status (Konkordanzen).....	69
Tabelle 21: Zusammenfassung der Verteilung des Ansprechens der First-Line Chemotherapie am Gesamtkollektiv; eingeteilt nach den 4 Kategorien nach RECIST.....	74
Tabelle 22: Exakter Test nach Fisher (First-Line-Chemotherapie).....	76
Tabelle 23: Zusammenstellung der zeitweilig mit Panitumumab therapierten Patienten (n=5).....	77
Tabelle 24: Vergleichende tabellarische Darstellung der Verteilung der Anzahl an Therapiewechseln bzgl. des Kordanz- und KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	80
Tabelle 25: Tabellarische Darstellung der Dauer der Therapieunterbrechung im Mittel nach den Stagingergebnissen CR, PR, SD.....	82
Tabelle 26: T-Test unverbunden (durchschnittliche Therapieunterbrechungen).....	82
Tabelle 27: Rezidive vs. Kordanz/KRAS.....	83
Tabelle 28: Exakter Test nach Fischer (Rezidive).....	84
Tabelle 29: Vergleichende tabellarische Darstellung der bereits bei Erstdiagnose vorhandenen Fernmetastasen (synchron) und der unter Therapie neu hinzugekommenen Fernmetastasen (metachron) (n=60).....	85
Tabelle 30: Vergleichende tabellarische Darstellung der neu entstandenen Fernmetastasen und des Kordanz- bzw. KRAS-Mutationsstatus (n=60).....	85
Tabelle 31: Exakter Test nach Fisher (Fernmetastasen).....	85

Tabelle 32: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der zusätzlichen Pyrosequenzierung von KRAS (Cod61) und BRAF (Cod600) bei fehlendem Ansprechen auf Panitumumab und/oder Cetuximab mit zugrunde liegendem KRAS-Wildtyp in Cod12&13; Fallzahl n=11.....	88
Tabelle 33: Cox-Regressionsanalyse (Overall Survival).....	92
Tabelle 34: Cox-Regressionsanalyse (progression-free survival)	95

9. Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A
1993 Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer.
Science 260(5109):812-816.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A
1994 Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients.
Cancer Res 54(7):1645-1648.
- Adjei AA, Hidalgo M
2005 Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy.
J Clin Oncol 23(23):5386-5403.
- Ahmed FE
2004 Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks.
J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 22(2):91-147.
- Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD
1998 Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality.
J Pathol 185(2):130-138.
- Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, Colomba P, Tagliavia M, La Farina M
2004 Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations.
Biochem Biophys Res Commun 325(3):784-791.
- Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL
2009 American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy.
J Clin Oncol 27(12):2091-2096.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD
2008 Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 26(10):1626-1634.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA
1998 Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study.
J Natl Cancer Inst 90(9):675-684.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urošević N
2001 Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study.
Br J Cancer 85(5):692-696.

- Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S
2008 Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer.
J Clin Oncol 26(25):4217-4219.
- Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE
2010 Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases.
Clin Cancer Res 16(3):790-799.
- Balko JM, Black EP
2009 A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer.
BMC Cancer 9:145.
- Bardelli A, Siena S
2010 Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer.
J Clin Oncol 28(7):1254-1261.
- Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calo V, Valerio MR, Latteri MA, Vieni S, Grassi N, Cicero G, Dardanoni G, Tomasino RM, Colucci G, Gebbia N, Russo A
2005 Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study.
Ann Oncol 16 Suppl 4:iv50-55.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W
1996 Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.
Nature 382(6592):638-642.
- Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A
2007 Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies.
Cancer Res 67(6):2643-2648.
- Biasco G, Derenzini E, Grazi G, Ercolani G, Ravaioli M, Pantaleo MA, Brandi G
2006 Treatment of hepatic metastases from colorectal cancer: many doubts, some certainties.
Cancer Treat Rev 32(3):214-228.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P
2009 Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 27(5):663-671.
- Boland C, Sinicrope F, Brenner D, Carethers J
2000 Colorectal cancer prevention and treatment.
Gastroenterology 118:115-128.
- Borner MM
1999 Neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases of colorectal cancer--too good to be true?
Ann Oncol 10(6):623-626.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B
1987 Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers.
Nature 327(6120):293-297.
- Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF
1992 K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon.
Surg Oncol 1(4):275-282.

- Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M
1999 Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2.
Int J Cancer 84(6):545-552.
- Calvert PM, Frucht H
2002 The genetics of colorectal cancer.
Ann Intern Med 137(7):603-612.
- Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C, Barriuso J, Moreno Garcia V, Larrauri J, Lopez R, Casado E, Gonzalez-Baron M, Feliu J
2009 KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis.
PLoS One 4(12):e8199.
- Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST
2003 BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas.
Cancer Res 63(16):4878-4881.
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB
2005 Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry.
J Clin Oncol 23(9):1803-1810.
- Cox DR
1972 Regression Models and Life-Tables.
J R Stat Soc Series B Stat Methodol 34(2):187-220.
- Cruz-Bustillo Clarens D
2004 Molecular genetics of colorectal cancer.
Rev Esp Enferm Dig 96(1):48-59.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E
2004 Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 351(4):337-345.
- de Reynies A, Boige V, Milano G, Faivre J, Laurent-Puig P
2008 KRAS mutation signature in colorectal tumors significantly overlaps with the cetuximab response signature.
J Clin Oncol 26(13):2228-2230; author reply 2230-2231.
- De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S
2008 KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab.
Ann Oncol 19(3):508-515.
- De Roock W, Lambrechts D, Tejpar S
2009 K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer.
N Engl J Med 360(8):834; author reply 835-836.
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M, Tejpar S
2010a Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.
Lancet Oncol 11(8):753-762.

- De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S
2010b Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab.
JAMA 304(16):1812-1820.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T
2007 Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy.
Br J Cancer 96(8):1166-1169.
- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A
2008 Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 26(35):5705-5712.
- Dietel M
2008 Molekularpathologische Analyse des KRAS-Mutationsstatus beim metastasierten kolorektalen Karzinom - ein Beispiel prädiktiver Pathologie.
Onkologie 31:138-140.
- Dietel M, Schafer R
2008 Systems pathology--or how to solve the complex problem of predictive pathology.
Virchows Arch 453(4):309-312.
- Donabedian A
1966 Evaluating the quality of medical care.
Milbank Mem Fund Q 44(3):Suppl:166-206.
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P
2000 Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.
Lancet 355(9209):1041-1047.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J
2009 New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1).
Eur J Cancer 45(2):228-247.
- Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, Francois E, Formento P, Renee N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G
2008 K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy.
Clin Cancer Res 14(15):4830-4835.
- Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J
1994 Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells.
J Biol Chem 269(44):27595-27602.
- Fearon ER, Vogelstein B
1990 A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell 61(5):759-767.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B
1990 Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers.
Science 247(4938):49-56.

- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E
2010 Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.
Eur J Cancer 46(4):765-781.
- Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M
1987 Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis.
Nature 327(6120):298-303.
- Frattoni M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA
2004 Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis.
Clin Cancer Res 10(12 Pt 1):4015-4021.
- Frattoni M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L
2007 PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients.
Br J Cancer 97(8):1139-1145.
- Garcia J, Riely GJ, Nafa K, Ladanyi M
2008 KRAS mutational testing in the selection of patients for EGFR-targeted therapies.
Semin Diagn Pathol 25(4):288-294.
- Gardner EJ
1951 A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum.
Am J Hum Genet 3(2):167-176.
- Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, Lindebjerg J, Andersen RF, Cruger D, Jakobsen A
2009 The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer.
Ann Oncol 20(5):879-884.
- Gemmete JJ, Mukherji SK
2011 Panitumumab (vectibix).
AJNR Am J Neuroradiol 32(6):1002-1003.
- Giaretti W, Monaco R, Pujic N, Rapallo A, Nigro S, Geido E
1996 Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy.
Am J Pathol 149(1):237-245.
- Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J
1984 Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity.
J Biol Chem 259(12):7755-7760.
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thome SD, Alberts SR, Haller DG, Benedetti J, Francini G, Shepherd LE, Francois Seitz J, Labianca R, Chen W, Cha SS, Heldebrant MP, Goldberg RM
2004 Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?
J Clin Oncol 22(10):1797-1806.
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J
1997 Molecular biology of colorectal cancer.
Curr Probl Cancer 21(5):233-300.
- Gumbiner BM
1995 Signal transduction of beta-catenin.
Curr Opin Cell Biol 7(5):634-640.

- Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J
2007 Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice.
Cell 129(5):957-968.
- Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, Venook A, Malik I, Tchekmedyian S, Navale L, Amado RG, Meropol NJ
2007 Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer.
Cancer 110(5):980-988.
- Hermanek P, Fruhmorgen P, Guggenmoos-Holzmann I, Altendorf A, Matek W
1983 The malignant potential of colorectal polyps--a new statistical approach.
Endoscopy 15(1):16-20.
- Huang Q, Wang GY, Huang JF, Zhang B, Fu WL
2010 High sensitive mutation analysis on KRAS gene using LNA/DNA chimeras as PCR amplification blockers of wild-type alleles.
Mol Cell Probes 24(6):376-380.
- Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O
2009 The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. Oncologist 14(1):22-28.
- Iacopetta B
2003 TP53 mutation in colorectal cancer.
Hum Mutat 21(3):271-276.
- Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, Fabas T, Benchimol D, Evrard S, Gugenheim J, Becouarn Y, Brunet R, Fonck M, Francois E, Saint-Paul MC, Pedeutour F
2010 KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications.
Ann Surg Oncol 17(5):1429-1434.
- Jass JR, Baker K, Zlobec I, Higuchi T, Barker M, Buchanan D, Young J
2006 Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer.
Histopathology 49(2):121-131.
- Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F
2002 Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer.
Br J Surg 89(12):1545-1550.
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW
2008 Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.
Science 321(5897):1801-1806.
- Kaplan EL, Meier P
1958 Nonparametric estimation from incomplete observations.
J Am Stat Assoc 53(282):457-481.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR
2008 K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.
N Engl J Med 359(17):1757-1765.

- Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA, 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ
2007 Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab.
J Clin Oncol 25(22):3230-3237.
- Khosravi-Far R, Der CJ
1994 The Ras signal transduction pathway.
Cancer Metastasis Rev 13(1):67-89.
- Kirsten WH, Mayer LA
1967 Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus.
J Natl Cancer Inst 39(2):311-335.
- Klein CA
2009 Parallel progression of primary tumours and metastases.
Nat Rev Cancer 9(4):302-312.
- Knijjn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Borger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID
2011 KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients.
Br J Cancer 104(6):1020-1026.
- Kohne CH, Grothey A, Bokemeyer C, Bontke N, Aapro M
2001 Chemotherapy in elderly patients with colorectal cancer.
Ann Oncol 12(4):435-442.
- Kosakowska EA, Stec R, Charkiewicz R, Skoczek M, Chyczewski L
2010 Molecular differences in the KRAS gene mutation between a primary tumor and related metastatic sites - case report and a literature review.
Folia Histochem Cytobiol 48(4):597-602.
- Koshkin AA, Nielsen P, Meldgaard M, Rajwanshi VK, Singh SK, Wengel J
1998 LNA (Locked Nucleic Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly Stable LNA: LNA Duplexes.
J Am Chem Soc 120:13252-13253.
- Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G
1999 Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer.
J Clin Oncol 17(2):593-599.
- Launonen V
2005 Mutations in the human LKB1/STK11 gene.
Hum Mutat 26(4):291-297.
- Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouche O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F
2009 Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer.
J Clin Oncol 27(35):5924-5930.
- Lemmon MA, Schlessinger J
1994 Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization.
Trends Biochem Sci 19(11):459-463.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B
1998 Genetic instabilities in human cancers.
Nature 396(6712):643-649.

- Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P
2006 KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer.
Cancer Res 66(8):3992-3995.
- Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P
2008 KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab.
J Clin Oncol 26(3):374-379.
- Lin JK, Lin AJ, Lin CC, Lan YT, Yang SH, Li AF, Chang SC
2011 The status of EGFR-associated genes could predict the outcome and tumor response of chemorefractory metastatic colorectal patients using cetuximab and chemotherapy.
J Surg Oncol 104:661-666.
- Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaklopiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, Papadimitriou CA, Murray S
2008 Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer.
Lancet Oncol 9(10):962-972.
- Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM
1990 Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia.
Am J Surg Pathol 14(6):524-537.
- Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J
2005 Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression.
Carcinogenesis 26:916-922.
- Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I, Cascinu S, Falcone A
2009a PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 27(16):2622-2629.
- Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F
2009b KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer.
Br J Cancer 101(4):715-721.
- Mantel N, Haenszel W
1959 Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease.
J Natl Cancer Inst 22(4):719-748.
- Matsuda K, Hotta T, Takifuji K, Kobayashi Y, Tsuji T, Nagai Y, Horiuchi T, Yamaue H
2011 Lymph nodes ratio is associated with the survival of colorectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis.
Am Surg 77(5):602-607.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ
2005 Systemic therapy for colorectal cancer.
N Engl J Med 352(5):476-487.
- Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA
2004 Linear model of colon cancer initiation.
Cell Cycle 3(3):358-362.

- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA
1990 Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma.
N Engl J Med 322(6):352-358.
- Molinari F, Martin V, Saletti P, De Dosso S, Spitale A, Camponovo A, Bordoni A, Crippa S, Mazzucchelli L, Frattini M
2009 Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant.
Br J Cancer 100(7):1087-1094.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW
1997 Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.
Science 275(5307):1787-1790.
- Moroni M, Sartore-Bianchi A, Benvenuti S, Artale S, Bardelli A, Siena S
2005a Somatic mutation of EGFR catalytic domain and treatment with gefitinib in colorectal cancer.
Ann Oncol 16(11):1848-1849.
- Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A
2005b Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study.
Lancet Oncol 6(5):279-286.
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC
1975 The evolution of cancer of the colon and rectum.
Cancer 36(6):2251-2270.
- Nagase H, Nakamura Y
1993 Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene.
Hum Mutat 2(6):425-434.
- Nagy R, Sweet K, Eng C
2004 Highly penetrant hereditary cancer syndromes.
Oncogene 23(38):6445-6470.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME
2001 EGFR and cancer prognosis.
Eur J Cancer 37 Suppl 4:S9-15.
- Noffsinger AE
2009 Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy.
Annu Rev Pathol 4:343-364.
- Nyren P
1987 Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity.
Anal Biochem 167(2):235-238.
- Obika S, Nanbu D, Hari Y, Andoh J-i, Morio K-i, Doi T, Imanishi T
1998 Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type confirmation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides.
Tetrahedron Lett 39:5401-5404.
- O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, Mulcahy E, Farraye FA, Amorosino M, Swan N
2004 Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype.
Am J Surg Pathol 28(4):423-434.
- O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amorosino M, Farraye FA
2006 Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points.
Am J Surg Pathol 30(12):1491-1501.

- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY
2004 Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging.
J Natl Cancer Inst 96(19):1420-1425.
- O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ Jr, Erlichman C, Shepherd L, Moertel CG, Kocha WI, Pazdur R, Wieand HS, Rubin J, Vukov AM, Donohue JH, Krook JE, Figueredo A
1998 Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer.
J Clin Oncol 16(1):295-300.
- Oechsle K, Schuch G, Bokemeyer C
2006 Studien zum Kolorektalkarzinom
Onkologie 12:345-349.
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS
2005 Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing.
J Mol Diagn 7(3):413-421.
- Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Muller AM, Muller-Navia J
2001 HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues.
Pathol Res Pract 197(12):823-826.
- Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S, Jr., Lindblom A, Peltomaki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM
2004 Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status.
Hum Mol Genet 13(19):2303-2311.
- Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, Capelinha AF, Duval A, Hamelin R, Machado JC, Schwartz S, Jr., Carneiro F, Seruca R
2007 KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression.
Oncogene 26(1):158-163.
- Otori K, Oda Y, Sugiyama K, Hasebe T, Mukai K, Fujii T, Tajiri H, Yoshida S, Fukushima S, Esumi H
1997 High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps.
Gut 40(5):660-663.
- Oudejans JJ, Slebos RJ, Zoetmulder FA, Mooi WJ, Rodenhuis S
1991 Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver.
Int J Cancer 49(6):875-879.
- Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, Andre T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J
2010 Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 28(31):4706-4713.
- Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S
2009 PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients.
Ann Oncol 20(1):84-90.
- Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R
2007 K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique.
Pathol Res Pract 203(7):489-497.

- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW
1992 APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.
Nature 359(6392):235-237.
- Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL
1993 K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon.
J Natl Cancer Inst 85(24):2004-2007.
- Raju TN
2000 The Nobel chronicles. 1994: Alfred G Gilman (b 1941) and Martin Rodbell (1925-98).
Lancet 355(9222):2259.
- Riely GJ, Ladanyi M
2008 KRAS mutations: an old oncogene becomes a new predictive biomarker.
J Mol Diagn 10(6):493-495.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.)
2010 Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.
Beitrag zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 7. Ausgabe. RKI, Berlin.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P
1996 Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release.
Anal Biochem 242(1):84-89.
- Rustgi AK
2007 The genetics of hereditary colon cancer.
Genes Dev 21(20):2525-2538.
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ
2004 Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the
epidermal growth factor receptor.
J Clin Oncol 22(7):1201-1208.
- Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M,
Quinones M, Morse M, Chen HX
2007 Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab
and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study.
J Clin Oncol 25(29):4557-4561.
- Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G,
Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A,
Tonini G, Ruzzo A
2008 High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites:
implications for clinical practice.
Oncologist 13(12):1270-1275.
- Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, Macdonald JS, Labianca R, Haller DG, Shepherd LE, Seitz JF,
Francini G
2001 A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients.
N Engl J Med 345(15):1091-1097.
- Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, Martini M, Cipani T,
Marrapese G, Mazzucchelli L, Lamba S, Veronese S, Frattini M, Bardelli A, Siena S
2009 Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-
targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer.
PLoS One 4(10):e7287.
- Saunders M, Iveson T
2006 Management of advanced colorectal cancer: state of the art.
Br J Cancer 95(2):131-138.

- Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Pierantoni C, Cascinu S
2007 Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options.
Br J Cancer 97(1):92-97.
- Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D
1993 Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer.
BMJ 306(6880):752-755.
- Schlessinger J
1986 Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase.
J Cell Biol 103(6 Pt 1):2067-2072.
- Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C
2008 [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008].
Z Gastroenterol 46(8):799-840.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G
2007 Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.
Nat Rev Cancer 7(4):295-308.
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S
1994 Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons.
Cancer Res 54(21):5527-5530.
- Steele GD, Jr.
1994 The National Cancer Data Base report on colorectal cancer.
Cancer 74(7):1979-1989.
- Suchy B, Zietz C, Rabes HM
1992 K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: relation to aneuploidy and metastasis.
Int J Cancer 52(1):30-33.
- Tannapfel A
2010 Maligne Transformation, S.16
In: Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V (Hrsg.): Praxis der Viszeralchirurgie. Onkologische Chirurgie 3.Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G
2010 The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions.
Dtsch Arztebl Int 107(43):760-766.
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG
2000 New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada.
J Natl Cancer Inst 92(3):205-216.
- Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groeningen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Borger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O, Punt CJ
2009 Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 360(6):563-572.
- Tortola S, Steinert R, Hantschick M, Peinado MA, Gastinger I, Stosiek P, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA
2001 Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer.
J Clin Oncol 19(11):2837-2843.

- Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllonen AP, Tuominen H, Karttunen TJ, Makinen MJ
2005 Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer.
J Pathol 207(3):285-294.
- Turcot J, Despres JP, St Pierre F
1959 Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon:
report of two cases.
Dis Colon Rectum 2:465-468.
- Üskent N, Demirbas S, Türken O, Yildirim Ş, Tecimer C, Kandemir G, Yaylaci M
2003 Survival from the precocious brain metastasis of the colon cancer.
Turk J Cancer 33(3):154-157.
- Van Cutsem E
2007 Optimizing administration of epidermal growth factor receptor-targeted agents in the treatment of
colorectal cancer.
Clin Colorectal Cancer 6 Suppl 2:S60-65.
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel
J, Richardson G, Wolf M, Amado RG
2007 Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best
supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol 25(13):1658-1664.
- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R,
Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P
2009 Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 360(14):1408-1417.
- Van Cutsem EJ, Oliveira J
2008 Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and
follow-up.
Ann Oncol 19 Suppl 2:ii33-34.
- Velho S, Oliveira C, Seruca R
2009 KRAS mutations and anti-epidermal growth factor receptor therapy in colorectal cancer with
lymph node metastases.
J Clin Oncol 27(1):158-159; author reply 159.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM,
Bos JL
1988 Genetic alterations during colorectal-tumor development.
N Engl J Med 319(9):525-532.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ
2000 Surfing the p53 network.
Nature 408(6810):307-310.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ,
Barford D, Marais R
2004 Cancer Genome Project: mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by
oncogenic mutations of B-RAF.
Cell 116(6):855-867.
- Weber JC, Meyer N, Pencreach E, Schneider A, Guerin E, Neuville A, Stemmer C, Brigand C, Bachellier
P, Rohr S, Kedinger M, Meyer C, Guenot D, Oudet P, Jaeck D, Gaub MP
2007 Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified
different subtypes.
Int J Cancer 120(3):524-532.

- Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, Stenzinger A, Joos H, Landt O, Heiser V, Rocken C, Dietel M
2010 KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology.
J Mol Diagn 12(1):35-42.
- Weiner LM
2006 Fully human therapeutic monoclonal antibodies.
J Immunother 29(1):1-9.
- Wicki A, Herrmann R, Christofori G
2010 Kras in metastatic colorectal cancer.
Swiss Med Wkly 140:w13112.
- Wiedorn KH, Olert J, Stacy RA, Goldmann T, Kuhl H, Matthus J, Vollmer E, Bosse A
2002 HOPE--a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues. Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect.
Pathol Res Pract 198(11):735-740.
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, Ackroyd F, Shike M, Kurtz RC, Hornsby-Lewis L, Gerdes H, Steward ET and the national polyp study workgroup
1993 Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup.
N Engl J Med 329(27):1977-1981.
- Wittekind C, Meyer HJ
2010 TNM-Klassifikation maligner Tumoren
7.Auflage. Wiley-VCH, Weinheim, S.94-99
- Wong R, Cunningham D
2008 Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies.
J Clin Oncol 26(35):5668-5670.
- Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H
1995 Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon.
Gastroenterology 108(2):434-440.
- Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ
2004 BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status.
Am J Surg Pathol 28(11):1452-1459.
- Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT
2003 Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas.
Mol Pathol 56(3):137-140.
- Ziegler A, Lange S, Bender R
2007a [Survival analysis: log rank test].
Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1:e39-41.

10. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Dr. A. Bosse, meinem Doktorvater,
für dieses außerordentlich interessante Promotionsthema, die Begleitung mit
konstruktiver Kritik und besonders die persönlichen Gespräche, die mir für meine
eigene berufliche Zukunft Motivation und Orientierung waren,

Herrn Oberarzt Dr. med. K. Wiedorn
für die engagierte praktische Unterstützung und die wertvollen fachlichen Anregungen,

den Mitarbeitern
des gesamten pathologischen und molekularpathologischen Teams
für die freundliche und unkomplizierte Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und
Problemen,

allen beteiligten **Hausärzten**
für die Unterstützung bei der Datensammlung durch zahlreiche Rücksendungen,
wodurch die Follow-up-Analyse erst ermöglicht wurde,

meinen **Eltern**,
denen diese Promotionsarbeit gewidmet ist, möchte ich insbesondere
meinen tiefen Dank aussprechen für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre fortwährende
Unterstützung und Geduld.

11. Lebenslauf