Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie

(Prof. Dr. med. H. Becker)

im Zentrum Chirurgie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

KRAS- und BRAF-Mutationen im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christoph Obermeyer

aus

Osnabrück

Göttingen 2012

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. B.M. Ghadimi
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. P. Burfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 5

1.1. Thema 5

1.2. Das Rektumkarzinom 5

1.2.1. Einführung 5

1.2.2. Karzinogenese 6

1.2.2.1. Das sporadisch auftretende Kolorektale Karzinom 6

1.2.2.2. Molekulargenetische Veränderungen 7

1.2.2.3. Hereditäre Formen des Kolorektalen Karzinoms 8

1.2.3. Diagnostik 9

1.2.4. Staging, Grading und Krankheitsstadien 10

1.2.4.1. Staging 10

1.2.4.2. Grading 12

1.2.4.3. Stadienenteilung des Kolorektalen Karzinoms 13

1.2.5. Therapie 14

1.2.6. Prognose 16

1.3. Der MAP-Kinase-Pathway 17

1.3.1. Einführung 17

1.3.2. *BRAF* 19

1.3.3. *KRAS* 20

2. Material und Methoden 23

2.1. Tumorproben 23

2.1.1. Patientenkollektiv 23

2.1.2. Ansprechen auf Therapie – Tumorregression und Downstaging 26

2.2. Methoden 29

2.2.1. Nomenklatur 29

2.2.2. Multiplex-PCR 30

2.2.2.1. Funktionsprinzip 30

2.2.2.2. Primer 31

2.2.2.3. Pipettierschemata und Protokolle 32

2.2.3. Gelelektrophorese 33

2.2.4. Probenaufreinigung 36

2.2.5. Sequenzierung 37

2.2.5.1. Funktionsprinzip der Sequenzierung 38

2.2.5.2. Protokolle und Reagenzien 41
3. Ergebnisse 42
3.1. Mutationen 42
3.1.1. BRAF-Mutationen 42
3.1.2. KRAS-Mutationen 42
3.2. Auswirkungen von KRAS-Mutationen 43
3.2.1. KRAS-Mutationen und Ansprechen auf Therapie 43
3.2.2. KRAS-Mutationen und Follow-Up Daten 48
4. Diskussion 50
5. Zusammenfassung 54
6. Anhang: IUPAC code table 56
7. Literaturverzeichnis 58
8. Abbildungsnachweis 66

1. Einleitung

1.1. Thema

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von Mutationen im *BRAF*- und *KRAS*-Gen im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom und deren Einfluss auf das Ansprechen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

1.2. Das Rektumkarzinom

1.2.1. Einführung

In Deutschland erkranken jährlich über 70.000 Menschen an einem Kolorektalen Karzinom, von denen etwa 30.000 versterben (Schmiegel et al. 2008). Es ist damit in beiden Geschlechtern die dritthäufigste bösartige Tumorerkrankung nach Prostata- und Bronchialkarzinom bei Männern bzw. Mamma- und Bronchialkarzinom bei Frauen (Jemal et al. 2003). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Männern 69, bei Frauen 72 Jahre (Lamberti et al. 2005). Das Lebenszeitrisiko an einem Kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt derzeit etwa 5%, wobei Männer gegenüber Frauen ein geringfügig höheres Risiko haben (Schmiegel et al. 2008).

Obwohl Karzinome des Kolons und des Rektums häufig unter dem Begriff des „Kolorektalen Karzinoms“ subsumiert werden, gibt es doch einige, wesentliche Unterschiede. So haben Rektumkarzinome gegenüber Karzinomen des Kolons eine schlechtere Prognose, werden anders therapiert und unterscheiden sich zudem auf molekulargenetischer Ebene (Li und Lai 2009, Frattini et al. 2004).
Zwischen 25 und 35 Prozent der Kolorektalen Karzinome sind Rektumkarzinome. Etwa ein Viertel davon befinden sich im oberen Rektumdrittel (12-16 cm ab Anocutan-Linie), die übrigen Karzinome verteilen sich gleichmäßig auf das mittlere (6-12 cm ab Anocutan-Linie) und untere Drittel (< 6 cm ab Anocutan-Linie) (Thomschke et al. 2002).

1.2.2. Karzinogenese

1.2.2.1. Das sporadisch auftretende Kolorektale Karzinom

Es wird allgemein zwischen dem sporadisch auftretenden Kolorektalen Karzinom und dem hereditären Kolorektalen Karzinom unterschieden. Dem hereditären Typ liegt dabei eine vererbliche genetische Komponente zu Grunde, während das sporadisch auftretende Karzinom in erster Linie durch den Einfluss von Umweltfaktoren entsteht.

Die Entstehung des sporadisch auftretenden Kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell bedingt und wird durch die Ernährungs- und Lebensweise der westlichen Industrienationen begünstigt. Dabei haben die Vereinigten Staaten von Amerika, Australien, Neuseeland, Kanada sowie die Europäischen Staaten die höchsten Inzidenzraten, während China, Indien und Teile von Afrika und Südamerika niedrigere Inzidenzraten aufweisen (Boyle und Langman, 2000). Als Risikofaktoren wurden übermäßige Aufnahme von tierischem Fett aus Rind-, Schweine- und Lammfleisch sowie reduzierte Aufnahme von Ballaststoffen mit der Nahrung identifiziert. Weitere Faktoren sind Alkoholkonsum, Adipositas, Bewegungsmangel, Rauchen und hoher sozio-ökonomischer Status (Haggar und Boushey 2009, Boyle und Langman 2000).

Das Vorhandensein eines Adenoms im Dickdarm ist als Risikofaktor für die Entstehung von Dickdarmkrebs zu sehen (Janout und Kollarova 2001). Das Lebenszeitrisiko, ein Adenom zu entwickeln, beträgt 19 %, wie es von Labianca et al. an der amerikanischen Bevölkerung festgestellt wurde (Labianca et al. 2005). Etwa 95 % der sporadisch auftretenden Kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus im Darm vorhandenen Adenomen. Die Adenom-Karzinom-Sequenz, also die Zeitspanne, in der sich Adenome zu Karzinomen entwickeln, beträgt etwa 5 – 10 Jahre (Haggar und Boushey 2009).

Adenome sind dabei als Präkanzerosen anzusehen, die bestimmte grundlegende genetische Veränderungen aufweisen. Aktuell werden drei molekulargenetisch unterschiedliche Pathomechanismen (auch als „Pathways“ bezeichnet) diskutiert, die im folgenden Punkt beschrieben werden. Ein Pathway schließt das gleichzeitige

Vorliegen eines weiteren Adenoms dabei nicht aus, was bedeutet, dass auch Mischformen auftreten können.

1.2.2.2. Molekulargenetische Veränderungen

Chromosomal instabile Karzinome (CIN – „chromosomal instable neoplasms“):
Zwischen 70 % und 85 % der kolorektalen Karzinome entstehen über den CIN-Pathway. Molekulargenetische Veränderungen entstehen durch Zugewinne oder Verluste chromosomaler Abschnitte. Der CIN-Pathway ist darüber hinaus mit der Mutation oder dem genetisch-strukturellen Verlust von Tumorsuppressorgenen vergesellschaftet, wie beispielsweise bei Mutationen des A*PC-Gens, p53* oder des (Proto-) Onkogens *KRAS.* Dabei müssen nicht zwingend alle, den CIN-Pathway charakterisierenden, Veränderungen in einem Tumor auftreten; es scheint möglich zu sein, dass andere genetische Veränderungen Bypassfunktionen übernehmen und zur Karzinomentwicklung führen können (Worthley und Leggett 2010).

Mikrosatelliteninstabile Karzinome (MSI – „microsatellite instability“):
Normalerweise werden Replikationsfehler der DNA, die bei der Zellteilung auftreten, von bestimmten Proteinen korrigiert. Diese werden zum „mismatch repair system“ (MMR) zusammengefasst. Treten Fehler im MMR-System auf, führt dies zu einer Häufung von Replikationsfehlern, welche besonders häufig in Mikrosatelliten auftreten, die hochrepetitive Sequenzen innerhalb des Genoms darstellen. Diese Veränderungen erfolgen entsprechend auch in codierenden Genabschnitten, sodass es zu einer fehlerhaften Genregulation kommt. Einige dieser Gene spielen auch in der Karzinogenese von Kolorektalen Karzinomen eine Rolle (beispielsweise *TGFBR2, BAX, CASP5, CTNNB1, APC, IGF2* und *E2F4*). Das im Punkt 1.2.2.3. noch detaillierter beschriebene HNPCC-Syndrom ist die erbliche Form Kolorektaler Karzinome („pure MSI-Pathway“), bei der eines der MMR-Gene durch eine Mutation verändert ist. In sporadischen Tumoren hingegen ist die Funktion häufig durch z.B. Methylierung der Genpromotorregion reduziert. Das Auftreten eines MSI-Karzinoms ist überdies ebenfalls mit Genmutationen assoziiert. Überhäufig findet sich hier eine Mutation im BRAF-Gen (Worthley und Leggett 2010).

„CpG island methylator phenotype“ (CIMP):

Die Methylierung der DNA im Bereich eines Promotors führt zu einer Minderexpression des dazu gehörigen Gens, was als „gene silencing“ bezeichnet wird. Ist ein Tumorsuppressorgen entsprechend methyliert, kann dies in der Folge zur Entstehung eines Kolorektalen Karzinoms führen. Der CIMP beschreibt dabei eine Kombination aus mehreren methylierten Genen. Im Kolonkarzinom ist dies häufig mit einer *BRAF*-Mutation und/oder einer Mikrosatelliteninstabilität assoziiert. Diese weisen typischerweise eine günstige Prognose auf (Worthley und Leggett 2010).

Es finden sich jedoch auch CIMP-positive Karzinome, die nicht mit *BRAF*-Mutationen einhergehen und mikrosatellitenstabil sind, wobei eine einheitliche Definition des zu verwendenden Genpanels fehlt (Weisenberger et al. 2006). Entsprechend wurde durch Shen et al. 2007) versucht, eine Klassifikation anhand der Methylierung vorzunehmen. In Abhängigkeit von den getesteten Promotoren bzw. deren Methylierungsfrequenz wurden die Tumore in drei verschiedene Kategorien eingeteilt: CIMP1 (CIMP-high) – Fälle mit einer signifikant erhöhten Frequenz an MSI und *BRAF*-Mutationen (80 % und 53 %) sowie seltenen *KRAS*- und *p53*-Mutationen (16 % und 11 %); CIMP2 (CIMP-low) – Fälle mit erniedrigter MSI- und *BRAF*-Mutationsrate (0 % und 4 %), aber hoher Zahl an *KRAS*- (92 %), jedoch niedriger Frequenz an *p53*-Mutationen (31 %); die CIMP-negative Gruppe wies hohe Frequenzen von *p53*-Mutationen (71 %) sowie niedrige Mutationsraten von *BRAF* und *KRAS* (2 % und 33 %) und wenig MSI (12 %) auf (Shen et al. 2007).

1.2.2.3. Hereditäre Formen des Kolorektalen Karzinoms

Etwa 5 – 10 % aller Kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden einer vererbten genetischen Variation. Die häufigsten hereditären Syndrome sind „familial adenomatous polyposis“ (FAP) und „hereditary nonpolyposis colorectal cancer“ (HNPCC), auch bekannt als Lynch-Syndrom. Die Genmutationen, die für die Erkrankungen ursächlich sind, wurden identifiziert. Im Falle des HNPCC sind Gene des DNA-Reparaturmechanismus (*MLH1*, *MSH2, MSH6* und *PMS2*) betroffen, bei der FAP

sind vererbte Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* verantwortlich (Haggar und Boushey 2009, Worthley und Leggett 2010).

HNPCC liegt etwa 2 – 6 % der Kolorektalen Karzinome zu Grunde. Das Lebenszeitrisiko, an einem Kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt für Personen mit den bekannten HNPCC-Mutationen bei 70 – 80 %. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt etwa 45 Jahre. Der Pathway, über den sich bei HNPCC Karzinome entwickeln, ist der reine MSI-Pathway (Worthley und Leggett 2010).

FAP ist für etwa 1 % der Kolorektalen Karzinome verantwortlich. Bei der FAP entwickeln die Patienten bereits in frühen Jahren Hunderte von Polypen. Schon im Alter von 20 Jahren können Kolorektale Karzinome auftreten. Im Alter von 40 Jahren ist nahezu jeder Patient erkrankt, sofern Kolon und Rektum nicht vorher präventiv entfernt wurden. FAP-assoziierte Karzinome entstehen auf dem CIN-Pathway mit einer vererbten Mutation im *APC*-Gen als bedingende Ursache (Haggar und Boushey 2009, Worthley und Leggett 2010).

1.2.3. Diagnostik

Darmkrebs bleibt oft sehr lange asymptomatisch. Charakteristische und vor allem pathognomonische Symptome der Erkrankung existieren nicht. Häufig wird von den Patienten zunächst eine Blutbeimengung im Stuhl festgestellt, welche bis zum Beweis des Gegenteils verdächtig auf das Vorliegen eines Karzinoms ist. Die Blutbeimengung kann aber, neben einem Kolorektalen Karzinom, mehrere andere Ursachen haben. Bei Karzinomverdacht steht zur Diagnosesicherung eine Reihe von Untersuchungsmethoden mit unterschiedlicher Zuverlässigkeit zur Verfügung. Sie umfasst den eher unspezifischen Test auf okkultes Blut (Hämoccult©), klinische Untersuchungen durch digitale rektale Austastung, Rektoskopie und Koloskopie. Außerdem bedienen sich viele Ärzte bildgebender Verfahren wie Röntgen mit Kontrastmittelfüllung des Darms sowie der Computer- oder Magnetresonanztomographie. Die beiden zuletzt genannten Verfahren werden beim

Vorliegen eines Karzinoms auch zum Staging des Tumors herangezogen (Labianca et al. 2005).

Tumormarker wie CEA und CA 19-9 sind für Screening und Diagnostik ungeeignet, da sie sowohl in Bezug auf Sensitivität als auch auf Spezifität nicht zuverlässig sind. Zur Verlaufskontrolle sind sie hingegen geeignet und werden im klinischen Alltag angewandt (Schmiegel et al. 2008).

1.2.4. Staging, Grading und Krankheitsstadien

1.2.4.1. Staging

Nach Diagnosesicherung erfolgt zur Planung der Therapie eine Ausbreitungsdiagnostik, das so genannte Staging. Hierbei werden mit klinisch-diagnostischen Methoden die lokale Ausdehnung des Befunds, der Lymphknotenbefall sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen festgestellt.

Bei den angewandten Untersuchungen bestehen von Klinik zu Klinik Unterschiede. Die Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ empfiehlt zur Ausbreitungsdiagnostik die komplette Koloskopie zum Ausschluss eines Zweittumors, Abdomensonographie, Röntgen-Thorax-Aufnahmen in zwei Ebenen, starre Rektoskopie zur exakten Höhenlokalisation und die histologische Sicherung mittels Biopsie. Ergänzt wird das Staging häufig durch die Endosonographie sowie Computer- oder Magnetresonanztomographie. Dabei werden zur lokalen Tumorausbreitung primär die Magnetresonanztomographie oder Endosonographie herangezogen, wobei letztere nur in den Händen erfahrener Untersucher eine zuverlässige Aussagekraft hat. Die Computertomographie dient im Rahmen des Stagings in der Regel nur der Diagnostik von Fernmetastasen. Nach der Operation wird das Operationspräparat histopathologisch untersucht, wobei wiederum die lokale Ausbreitung des Tumors und der Befall von Lymphknoten im Resektat bestimmt werden. Weicht der vom Pathologen ermittelte Befund von dem mit oben beschriebenen Mitteln erhobenen Stagingbefund ab, kann das als Erfolg der neoadjuvanten Therapie bewertet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre aber auch, dass die Untersuchung vor Therapiebeginn falsche Ergebnisse geliefert hat (Schmiegel et al. 2008).

Der auf diese Weise erhobene klinische Befund wird nach der TNM-Klassifikation klassifiziert und nach den Richtlinien der „Union Internationale contre le Cancer“ (UICC) einem Krankheitsstadium zugeordnet (UICC 2002).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Primärtumors (nach UICC 2002)

T-Level	Bedeutung
TX	Primärtumorbeurteilung nicht möglich
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorinfiltration in die Submukosa
T2	Tumorinfiltration in die Muscularis propria
T3	Tumorinfiltration durch die Muscularis propria in Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumorinfiltration direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder Perforation in das viszerale Peritoneum

Tabelle 2: TNM-Klassifikation regionaler Lymphknotenmetastasen (nach UICC 2002)

LN-Status	Bedeutung
NX	Regionaler Lymphknotenstatus kann nicht beurteilt werden
N0	Kein Lymphknotenbefall nach regionaler Lymphadenektomie
N1	Befall von 1-3 Lymphknoten
N2	Befall von 4 oder mehr Lymphknoten

Tabelle 3: TNM-Klassifikation von Fernmetastasen (nach UICC 2002)

M-Status	Bedeutung
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.2.4.2. Grading

An dem zur Diagnosestellung bioptisch entnommenen Tumorgewebe wird zur weiteren Charakterisierung des Karzinoms eine Untersuchung durchgeführt, um den Grad der Entartung zu bestimmen. Dies wird als Grading bezeichnet und ergänzt das Staging. Das Kolorektale Karzinom als Adenokarzinom wird nach seiner glandulären Differenzierung in die Grade G1 – G4 eingeteilt. Dabei richtet sich das Grading nach dem am geringsten differenzierten Tumorareal. Aus dem Befund des Gradings ergeben sich im Normalfall keine Konsequenzen in Bezug auf die Therapie, lediglich beim Frühkarzinom (T1, N0, L0) ist der Differenzierungsgrad von Bedeutung. Tumore mit guter oder mäßiger Differenzierung können durch lokale Abtragung therapiert werden, während Tumore mit schlechter Differenzierung durch onkologisch-chirurgische Resektion entfernt werden sollten. Das Grading hat prinzipiell keinen Einfluss auf die Einteilung des Tumors in ein Krankheitsstadium und es kommt ihm eine geringe Bedeutung bei der Prognose zu (Schmiegel et al. 2008, UICC 2002).

Tabelle 4: Einteilung des Histopathologischen Gradings (nach UICC 2002)

Grading	Differenzierungsgrad (in Klammern Anteil glandulärer Differenzierung)
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert (>95%)
G2	Mäßig differenziert (>50% ≤95%)
G3	Schlecht differenziert (>5% ≤50%)
G4	Un- bzw. entdifferenziert (≤5%)

1.2.4.3. Stadienenteilung des Kolorektalen Karzinoms

Aus den Ergebnissen der Staginguntersuchung wird dem Karzinom ein Stadium zugewiesen. Tabelle 5 verdeutlicht die Stadieneinteilung nach UICC (UICC 2002).

Tabelle 5: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (nach UICC 2002)

UICC	T-Level	LN-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
II A	T3	N0	M0
II B	T4	N0	M0
III A	T1 / T2	N1	M0
III B	T3 / T4	N1	M0
III C	jedes T	N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Kolorektale Karzinome der UICC-Stadien II und III werden als lokal fortgeschritten bezeichnet und sind Gegenstand dieser Arbeit. Die im Folgenden beschriebene Therapie und Prognose bezieht sich lediglich auf Erkrankungen dieser beiden Stadien.

Es existiert weiterhin die Einteilung nach Dukes, die vor allem im Anglo-Amerikanischen Bereich verwendet wird. Dukes B entspricht dabei UICC II, Dukes C dem Stadium III nach UICC.

1.2.5. Therapie

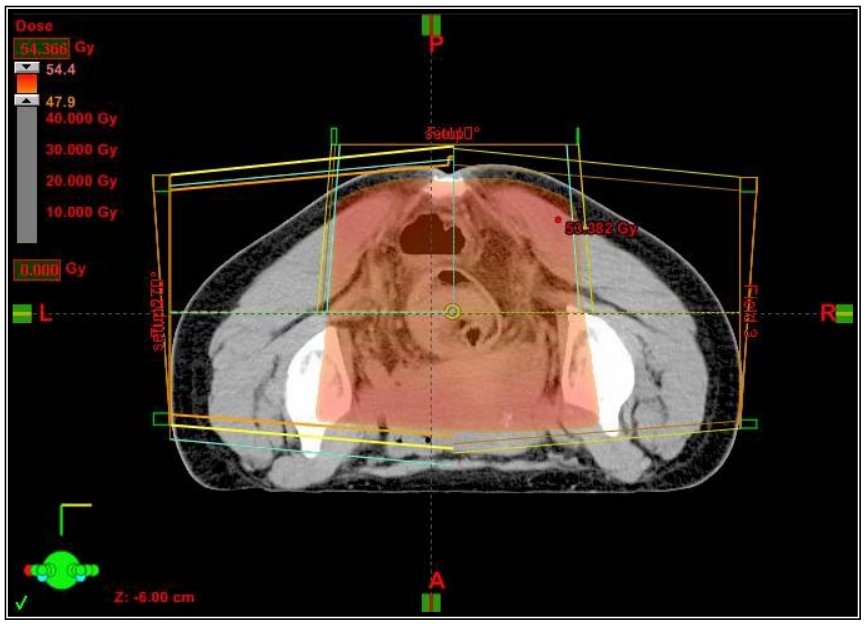
Das lokal fortgeschrittene Rektumkarzinom wird heute in Europa und Nordamerika in einem multimodalen Konzept, bestehend aus Operation, zytostatischer Chemotherapie und Bestrahlung behandelt. In der von Sauer et al. im Jahr 2004 publizierten CAO/ARO/AIO–94 Studie konnte gezeigt werden, dass ein Konzept neoadjuvanter Radiochemotherapie gegenüber dem Konzept einer primären Operation mit adjuvanter Chemotherapie zwar keine Vorteile in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten bietet, jedoch im Hinblick auf lokale Kontrolle, Sphinktererhalt, Toxizität und Compliance überlegen ist (Sauer et al. 2004). Die Ergebnisse dieser und anderer Studien, die klare Vorteile einer präoperativen Bestrahlung zeigen, sind derzeit die leitliniengerechte Behandlung des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms, eine Strahlentherapie enthaltende Vortherapie, gefolgt von der onkologisch adäquaten Operation mit adjuvanter Chemotherapie (Kapiteijn et al. 2001, Sauer et al. 2004). Die Operation mit kurativem Ansatz - der totalen mesorektalen Resektion - umfasst die Resektion des Primärtumors im Gesunden mit dem anhängenden Mesorektum und des regionären Lymphabflusses unter Schonung der anatomisch vorgegebenen Hüllfaszien. Je nach Tumorlokalisation kann die Operation unter Beachtung der Sicherheitsabstände kontinenzerhaltend durchgeführt werden (Schmiegel et al. 2008).

Bei der Radiotherapie sollen der Tumor und die zugehörigen Lymphknoten die maximale Strahlendosis erhalten, umliegendes Gewebe jedoch bestmöglich geschont werden. Die weitgehende Aussparung des umliegenden Gewebes und der Nachbarorgane wird durch das Bestrahlen aus unterschiedlichen Richtungen erreicht. Der im Zentrum der Bestrahlung liegende Tumor erhält dabei die volle Strahlendosis, das restliche Gewebe, durch welches technisch bedingt hindurch bestrahlt werden muss, hingegen nur (bei 3-Felder-Planung) ein Drittel der Gesamtdosis. Die

nachfolgende Abbildung 1 zeigt die Bestrahlung aus drei Richtungen (3-Felder-Planung). Das Areal, welches die volle Strahlendosis erhält, ist rot dargestellt.

Die Bestrahlung der Patienten dieser Studie erfolgte, wie oben beschrieben, an der Universitätsmedizin Göttingen nach einem für jeden Patienten individuell erstellten Plan. An anderen Kliniken werden Patienten erfolgreich mit Konzepten therapiert, die teilweise von der 3-Felder-Bestrahlung abweichen.

Abbildung 1: Strahlentherapieplan



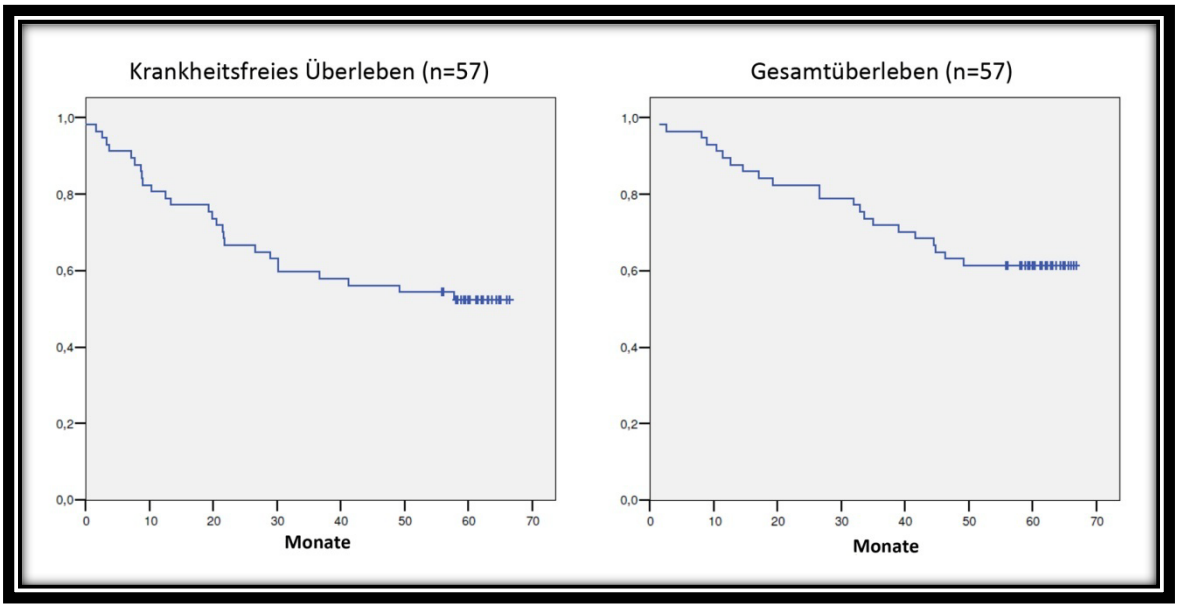
Da in diese Arbeit nur Daten von im Rahmen der „CAO/ARO/AIO–94“- und „CAO/ARO/AIO–04“ – Studien behandelten Patienten einfließen, werden hier auch nur die Chemotherapiekonzepte dieser beiden Studien detailliert erläutert. In der klinischen Praxis werden Patienten nach unterschiedlichen Therapieschemata mit abweichenden Radiotherapie- und/oder zytostatischen Chemotherapie-Konzepten wie Irinotecan oder Capecitabin behandelt (Schmiegel et al. 2008). Die detaillierte Therapiebeschreibung der im Rahmen der erwähnten Studien behandelten Patienten ist im Punkt 2.1.1. auf Seite 19 aufgeführt.

1.2.6. Prognose

Die Prognose des Rektumkarzinoms ist vom Tumorstadium und Tumorgrading abhängig (Cerottini et al. 1999, Liang et al. 2004). Ebenso spielt die Lokalisation des Primärtumors eine Rolle. Tief sitzende Karzinome (unteres Rektumdrittel) haben eine ungünstigere Prognose, da ihre Lokalrezidivrate gegenüber den höher lokalisierten Karzinomen erhöht ist (7,6 % in Gegensatz zu 2,4 %) (Thomschke et al., 2002).

Eine von Velenik et al. durchgeführte Studie mit 57 Patienten, die entsprechend der hier vorliegenden Studie an einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom erkrankt waren und mit einem sehr ähnlichen Therapieschema behandelt wurden, kam zu den folgenden Ergebnissen im Bezug auf die Prognose: Die Rate an lokaler Kontrolle nach fünf Jahren war 87,4 %. Nach fünf Jahren lag das Gesamtüberleben bei 62 %, das krankheitsfreie Überleben bei 52 %. Die mediane Follow-Up-Zeit betrug 62 Monate (Velenik et al. 2010). Die folgende Abbildung 2 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve zu der angeführten Studie.

Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben der zitierten Studie (modifiziert nach Velenik et al. 2010, S. 88)



Im Rahmen der dieser Dissertation zu Grunde liegenden, multizentrischen Phase-III-Studie wurde gezeigt, dass die Rate an Lokalrezidiven durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie deutlich gesenkt werden konnte. Bislang zeigte sich anhand der 5-Jahresüberlebensrate jedoch keine signifikante Verbesserung der Prognose (Sauer et al. 2004). Eine Re-Evaluierung mit längerem Follow-up sollte jedoch auch einen Vorteil im Hinblick auf das Gesamtüberleben und damit auch auf die Prognose zeigen, da dies auf Grund der reduzierten Lokalrezidive zu erwarten ist.

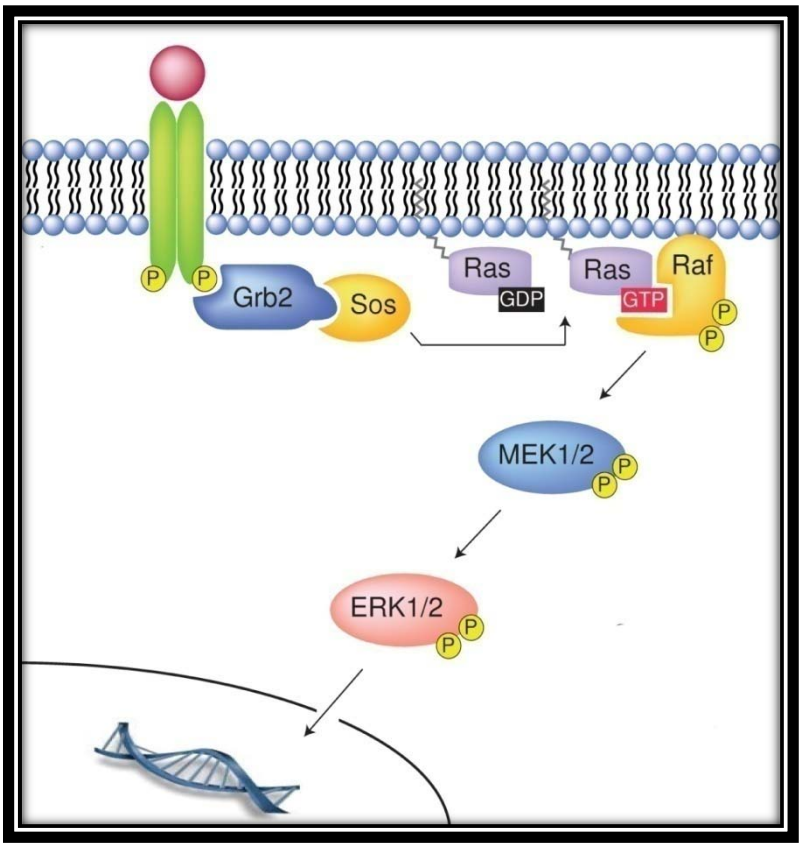
Ein Kriterium zum Abschätzen der individuellen Prognose eines Patienten ist der Tumorregressionsgrad. Dabei wird von dem Pathologen im resezierten Tumor das Verhältnis von vitalem Tumorgewebe zu dem durch Radiochemotherapie induzierten, fibrotischen Umbau bestimmt und in fünf Grade von TRG 0 (keine Tumorregression) bis TRG 4 (komplette Tumorregression) eingeteilt. In dieser Arbeit wird der Tumorregressionsgrad als Marker für das Ansprechen auf Radiochemotherapie verwendet (Rodel et al. 2005). Weitere Details zum Tumorregressionsgrad werden im Methodenteil unter Punkt 2.1.2. auf Seite 22 beschrieben.

1.3. Der MAP-Kinase-Pathway

1.3.1. Einführung

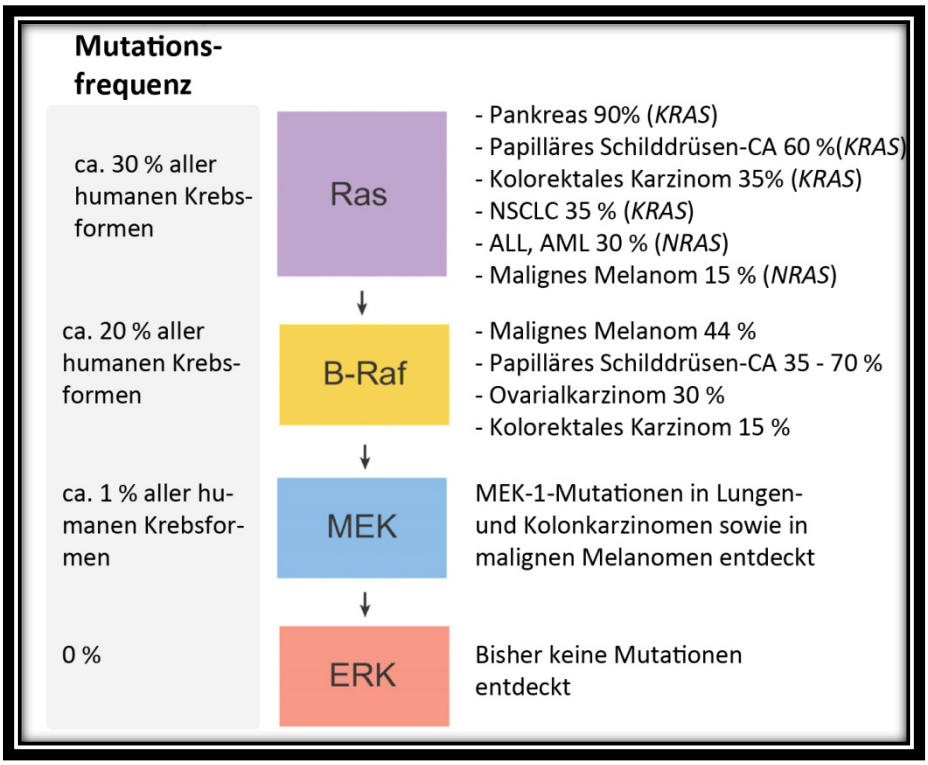
Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Übermittlungsweg für extrazelluläre Signalstoffe und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Signaltransduktion läuft über den Rezeptor und dessen Effektorprotein, dem GRB2, über das SOS Protein, welches die membranständige Proteinkinase Ras aktiviert, das wiederum die Übermittlung über die Proteine RAF – MEK – ERK zum Zellkern weiterleitet (Fremin und Meloche 2010).

Abbildung 3: Schema des MAP-Kinase-Pathways (modifiziert nach Fremin und Meloche 2010, S. 8):



Der MAP-Kinase-Weg ist in etwa 30 % aller humanen Krebsformen überaktiv (Fremin und Meloche 2010, Hoshino et al. 1999). Zwei wichtige Proteine mit onkogenem Potential auf der Signalkaskade sind *KRAS* und *BRAF*. Im Kolorektalen Karzinom finden sich bei 30 – 40 % der Fälle Mutationen im *KRAS*-Gen und bei etwa 5 – 15 % Mutationen im *BRAF*-Gen. Aber auch in anderen humanen Krebserkrankungen kommen *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen mit unterschiedlicher Häufigkeit vor, wie in Abbildung 4 dargestellt (Fremin und Meloche 2010, Wang et al. 2003).

Abbildung 4: Mutationen im MAPK-Pathway in humanen Krebserkrankungen (modifiziert nach Fremin und Meloche 2010, S. 8):



Wie im Punkt 1.2.2. auf Seite 2 bereits beschrieben, spielen die Proteinkinasen des MAP-Kinase-Pathways des im Zuge der Karzinomentstehung eingeschlagenen Pathways eine wichtige Rolle (Worthley und Leggett 2010, Shen et al. 2007).

1.3.2. *BRAF*

BRAF ist eine Proteinkinase, die im MAP-Kinase-Signalweg von den RAS-Proteinen aktiviert wird und selbst wiederum Proteinkinasen in der Signalkaskade aktiviert. *BRAF* ist genau wie *KRAS* ein Proto-Onkogen.

Im Kolorektalen Karzinom kommt der Mutation des *BRAF*-Gens eine besondere Bedeutung zu. Die Mutationsfrequenz von *BRAF* im Kolorektalen Karzinom wird mit 5 – 15 % angegeben und ist mit geringer Differenzierung sowie Mikrosatelliteninstabilität assoziiert. *BRAF*-Mutationen treten im proximalen Kolon häufiger auf als in den anderen Kolonabschnitten (Fransen et al. 2004, Naguib et al. 2010). Etwa 90 % aller

BRAF-Mutationen bestehen in einer Thymidin-zu-Adenin-Transversion auf dem Nukleotid 1799, im Codon 600 auf Exon 15 des *BRAF*-Gens (Wang et al. 2003). Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch (V600E) im aktiven Zentrum des Proteins und damit zu einer erhöhten Aktivität der Kinase im Vergleich zu dem Wild-Typ (Davies et al. 2002, Wan et al. 2004).

Seit einigen Jahren werden in der Therapie des Kolorektalen Karzinoms Antikörper eingesetzt, die gegen den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR), gerichtet sind. *BRAF*-Mutationen haben Einfluss auf die Therapie mit EGFR-Antikörpern wie Cetuximab oder Panitumumab. Di Nicolantonio et al. zeigten, dass anti-EGFR-Therapie im metastasierten Kolorektalen Karzinom nur beim Vorliegen des Wild-Typ *BRAF* wirksam ist (Di Nicolantonio et al. 2008).

1.3.3. *KRAS*

*KRA*S ist ein membranständiges G-Protein im Singnalkaskadeweg des MAP-Kinase-Pathways und wird von einer Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert. *KRAS* ist ein Proto-Onkogen und genau wie *BRAF* wichtiger Bestandteil der zur Karzinomentstehung führenden Pathways (Worthley und Leggett 2010, Shen et al. 2007). Studien zeigen, dass Genmutationen die Aktivität von *KRAS* erhöhen. Es besteht somit ein Zusammenhang mit einem aggressiveren biologischen Verhalten der Karzinome, die entsprechende *KRAS*-Mutationen tragen (Karnoub und Weinberg 2008).

Die häufigsten Mutationen im *KRAS*-Gen finden sich in Codon 12 und 13 in Exon 2. Seltener mutiert sind Codon 61 in Exon 3 und Codon 146 in Exon 4 (Edkins et al. 2006). Das Auftreten der Mutationen steht in keinem Zusammenhang mit Alter, Geschlecht oder Familienanamnese. *KRAS*-Mutationen sind erworbene Mutationen ohne hereditäre Komponente (Brink et al. 2003).

Das biologische Verhalten von in *KRAS* mutierten Zellen hängt möglicherweise auch von dem betroffenen Codon ab. Weiterhin scheint für das Verhalten von in *KRAS* mutierten Zellen wichtig zu sein, welche Aminosäure nach einer Mutation

fehlerhafterweise in das Protein eingebaut wird. So zeigten Guerrero et al. im In-Vitro-Modell, dass Zelllinien mit Mutationen in Codon 12 und 13 sowie Zelllinien, die Wild-Typ-*KRAS* überexprimieren, zwar erhöhte Proliferationsraten aufweisen, aber nur Codon-12-Mutanten geringere Apoptoseraten zeigen (Guerrero et al. 2000). Durch In-Vitro-Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei Mutationen, die einen Aminosäureaustausch im Protein zur Folge haben, das biologische Verhalten des Tumors von der substituierten Aminosäure anhängig ist. Es wurde entdeckt, dass G12C-Mutationen kein gesteigertes Wachstum der Zellkolonien auslösen, G12V-Mutationen zu aggressiv wachsenden Zellkolonien führen und G12D-Mutanten einen abweichenden Signalkaskadeweg nutzen, welcher ein weniger aggressives Verhalten der Zellen zur Folge hat (Cespedes et al. 2006).

Neben In-Vitro-Untersuchungen wurden in vielen klinischen Studien Beobachtungen angestellt, ob die verschiedenen *KRAS*-Mutationen im Hinblick auf das betroffene Codon oder die substituierte Aminosäure das Outcome der Patienten unterschiedlich beeinflussen. Obwohl sich die Ergebnisse der einzelnen Studien teilweise widersprachen, zeigte die RASCAL-II-Studie, eine 3439 Patienten umfassende Metaanalyse, ein signifikant vermindertes Gesamtüberleben und ein signifikant vermindertes krankheitsfreies Überleben für nur eine bestimmte Mutation des *KRAS*-Gens. Die entsprechende Mutation liegt auf dem Codon 12 des Gens und besteht in einer Glycin-zu-Valin-Substitution (Andreyev et al. 2001).

Eine besondere klinische Bedeutung kommt der Mutation im *KRAS*-Gen bei der Therapie des metastasierten Kolorektalen Karzinoms zu. Karapetis et al. und van Cutsem et al. zeigten, dass eine Therapie mit Antikörpern, die gegen den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) gerichtet sind, bei Vorliegen von *KRAS*-Mutationen im UICC-Stadium IV des Kolorektalen Karzinoms mit einem schlechteren Ansprechen auf Therapie assoziiert ist als bei Vorliegen des *KRAS*-Wild-Typs (Karapetis et al. 2008, Van Cutsem et al. 2009). Das gilt auch für den Antikörper Panitumumab, der ebenfalls gegen den EGFR gerichtet ist, jedoch im Gegensatz zu Cetuximab ein voll humaner Antikörper ist (Amado et al. 2008).

Zu einem gewissen Grad können *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen in Bezug auf ihr onkogenes Potential als gleichwertig angesehen werden. Die Häufigkeit von *BRAF*-Mutationen ist negativ mit der Häufigkeit von *KRAS*-Mutationen korreliert (Davies et al. 2002, Yuen et al. 2002, Rajagopalan et al. 2002). Die Frequenz von *BRAF*-Mutationen ist in Tumoren des rechten Kolons am höchsten und nimmt im Verlauf zum Rektum hin ab. *KRAS*-Mutationen hingegen sind im gesamten Kolon vertreten. Sie haben nach Slatterey et al. im rechten Kolon ihre höchste Frequenz (36%), eine erniedrigte im linken Kolon (26,9%) und eine mittlere im Rektum (30,5%) (Slattery et al. 2009). Die in der Literatur angegebene Frequenz variiert allerdings von Autor zu Autor. Die Gründe hierfür werden im Diskussionsteil dieser Arbeit näher beleuchtet.

2. Material und Methoden

2.1. Tumorproben

2.1.1. Patientenkollektiv

Für die Studie, die dieser Dissertation zu Grunde liegt, wurden Tumorproben von insgesamt 94 Patienten analysiert. Alle Patienten wurden in der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen im Rahmen der „CAO/ARO/AIO-94“- oder „CAO/ARO/AIO-04“-Studien behandelt. Die 64 männlichen und 30 weiblichen Patienten waren im Durchschnitt 62,3 Jahre (35 – 81 Jahre) alt und waren an einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom der cUICC-Stadien II und III erkrankt. Genaueren Aufschluss über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs im Hinblick auf T-Level und Lymphknotenstatus liefert Tabelle 6.

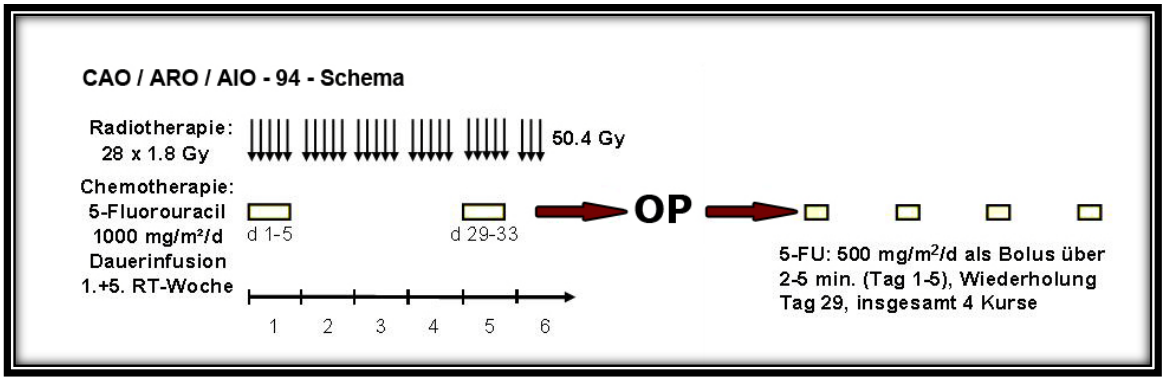
Tabelle 6: Präoperativer Status des Patientenkollektivs nach UICC-Stadien

Präoperativer Status		
UICC	T-Level	LN-Status
II 31	uT2 2	N+ 2
III 63	uT3 90	N- 31
		N+ 59
	uT4 2	N+ 2

Zur Kontrolle der Methodik wurde neben der DNA aus den Tumorbiopsien der Patienten auch das Exon 15 der Zelllinie HT-29 sequenziert, welches die typische *BRAF*-V600E-Mutation aufweist (Davies et al. 2002).

In die Untersuchung fanden Patienten aus dem Prüfarm der „CAO/ARO/AIO–94“-Studie Eingang. Die darin neoadjuvant behandelten Patienten (n=57) erhielten das folgende Therapieschema: Präoperative neoadjuvante Radiochemotherapie mit einer Bestrahlungsdosis von 50,4 Gray (Gy) in 28 Einzeldosen zu je 1,8 Gy und einer 120-stündigen Dauerinfusion von 5-Fluorouracil (5-FU) in einer Dosierung von 1000mg/m²/Tag an den Tagen 1 - 5 sowie 29 - 33. Die vier bis sechs Wochen nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie durchgeführte Operation umfasste die Rektumresektion oder Rektumexstirpation mit totaler mesorektaler Exzision. Anschließend wurde eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt, die aus der Gabe von 5-FU in der Dosierung 500 mg/m²/Tag als Bolus an fünf aufeinander folgenden Tagen bestand. An Tag 29 wurde die Therapie wiederholt und beinhaltete insgesamt 4 Kurse (Sauer et al. 2004). Die folgende Abbildung 5 zeigt das zuvor beschriebene Therapieschema.

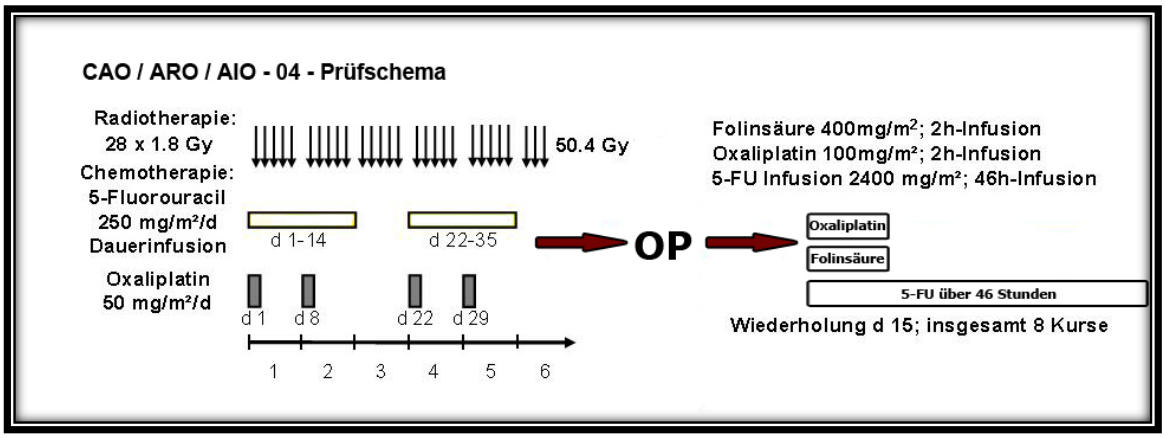
Abbildung 5: CAO / ARO / AIO – 94 – Schema



Im Rahmen der „CAO/ARO/AIO–04“-Studie wird derzeit untersucht, ob die kombinierte präoperative Radiochemotherapie mit 5-FU und Oxaliplatin der Therapie wie oben beschrieben überlegen ist (Horisberger et al. 2009, Rodel and Sauer 2007). Patienten (n=37), die im experimentellen Arm der „CAO/ARO/AIO–04“-Studie behandelt wurden, erhielten neben der unverändert durchgeführten Strahlentherapie folgendes Chemotherapieschema: Dauerinfusion von 5-FU 250 mg/m²/Tag an den Tagen 1 - 14 und 22 - 35. Zusätzlich Oxaliplatin 50 mg/m² als zweistündige Infusion an den Tagen 1, 8, 22 und 29. Wie bei der Standardtherapie folgten die Operation im

Abstand von 4-6 Wochen nach Abschluss der Radiochemotherapie und die adjuvante Chemotherapie nach weiteren 4 Wochen nach Abschluss der jeweiligen Operation. Die adjuvante Chemotherapie bestand in der Gabe von Oxaliplatin 100 mg/m² und Folinsäure 400 mg/m² je als zweistündige Infusion sowie der Gabe von 5-FU 2400 mg/m² als 46-Stunden-Dauerinfusion. Das Schema wurde insgesamt acht Mal wiederholt mit einem Abstand von 14 Tagen. Die folgende Abbildung 6 zeigt grafisch die zuvor erläuterte Therapie.

Abbildung 6: CAO / ARO / AIO – 04 – Schema



Die Patienten wurden im Rahmen der klinischen Studien im Follow-Up beobachtet.

Von jedem Patienten wurden mit dessen Einverständnis erstmalig bereits vor Therapiebeginn aus dem Tumor 2 Biopsien entnommen. Die Proben dienten einerseits zur Diagnosesicherung, andererseits zur Gewinnung von Tumor-DNA und -RNA. Die Entnahme und Durchführung der Untersuchungen war zuvor durch die lokale Ethikkommission genehmigt worden. Für die Isolierung der DNA wurde Trizol (Firma Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die so gewonnene DNA wurde bei einer Temperatur von –80° C bis zur weiteren Analyse konserviert.

2.1.2. Ansprechen auf Therapie - Tumorregression und Downstaging

Bei der Beurteilung des Erfolgs der präoperativen Radiochemotherapie wurden die Parameter T-Level-Rückbildung, genannt Downsizing, und Stadienrückstufung nach UICC-Kriterien, genannt Downstaging, herangezogen. Dabei wurden die durch rektale Endosonographie erhobenen Befunde mit denen der histopathologischen Aufarbeitung verglichen, also jeweils uT im Vergleich zu ypT und uUICC im Vergleich zu ypUICC. Die folgende Tabelle 7 listet das Ergebnis des postoperativen Stagings des Patientenkollektivs auf.

Tabelle 7: Postoperatives Staging des Patientenkollektivs ypUICC

Postoperativer Status					
ypUICC		**ypT-Level**		**LN-Status**	
0	11	ypT0	13	ypN-	11
				ypN+	2
I	32	ypT1	13	ypN-	2
				ypN+	11
II	20	ypT2	24	ypN-	3
				ypN+	21
III	28	ypT3	37	ypN-	17
				ypN+	20
IV	3	ypT4	7	ypN-	3
				ypN+	4

Bei 51 Patienten (54,3 %) kam es zu einem T-Level-Downsizing, bei 57 Patienten (60,6 %) zu einem Downstaging. Die folgende Tabelle 8 zeigt das Ergebnis des Vergleichs von prä- mit posttherapeutischem Staging der Patienten.

Tabelle 8: T-Level-Downsizing und Downstaging des Patientenkollektivs

	T-Level-Downsizing	Downstaging
Ja	51	57
Nein	43	37

Weiterhin wurde in dieser Studie durch eine erfahrene Pathologin der Tumorregressionsgrad (TRG) bestimmt. Dazu wurde im Operationspräparat das Verhältnis von durch Radiochemotherapie verursachtem fibrotischen Umbau zu vitalen Tumorzellen anhand eines Fünf-Punkte-Grading-Systems semi-quantitativ bestimmt. Dabei wurde bei völligem Fehlen fibrotischen Umbaus das TRG-Stadium 0 vergeben. Bei weniger als 50 % Tumorregression wurde TRG 1 klassifiziert. Eine Regression zwischen 50 und 70 % entsprach TRG 2, mehr als 70 % Regression TRG 3. Das völlige Fehlen von vitalen Tumorzellen wurde als komplette Regression oder TRG-Stadium 4 beurteilt. (Dworak et al. 1997) Die folgende Tabelle 9 listet die oben beschriebenen Tumorregressionsgrade zur besseren Übersicht tabellarisch auf.

Tabelle 9: Einteilung des Tumorregressionsgrads

TRG Level	Verhältnis von Tumor zu Fibrose
0	Keine Tumorregression, kein fibrotischer Umbau
1	< 50 % Tumorregression
2	50 % bis 70 % Tumorregression
3	> 70 % Tumorregression
4	Komplette Regression, keine vitalen Tumorzellen

Bei 93 von den 94 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde, wie oben beschrieben, der Tumorregressionsgrad bestimmt. 12 Patienten (12,8 %) hatten eine komplette Regression (TRG 4) und zeigten damit ein optimales Ansprechen auf die Therapie. Bei 68 Patienten (72,3 %) wurde ein Tumorregressionsgrad von 2 und 3 und

somit ein mittleres Ansprechen bestimmt. Ein geringer Erfolg der Therapie, ausgedrückt durch TRG 0 und 1, wurde bei 13 Patienten (13,8 %) festgestellt. In einem Fall war die Bestimmung des TRG auf Grund zu geringer Entnahmemenge nicht verlässlich möglich. Tabelle 10 beinhaltet die Anzahl der Patienten für die einzelnen Tumorregressionsgrad.

Tabelle 10: Tumorregressionsgrad im Patientenkollektiv

Tumorregressionsgrad	
TRG 0	1
TRG 1	12
TRG 2	30
TRG 3	38
TRG4	12

2.2. Methoden

Im folgenden Teil 2.2. wird die Methodik der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie beschrieben. Die angewandten Verfahren umfassen PCR, Gelelektrophorese, Aufreinigungsreaktion und Sequenzierung. Die einzelnen Verfahren wurden in der genannten Reihenfolge durchgeführt und im folgenden Abschnitt detailliert erläutert.

2.2.1. Nomenklatur

Die Beschreibung von DNA-Sequenzen und Aminosäuren in Proteinen erfolgt codiert nach den Regeln der INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (siehe Anhang S. 52).

Gensequenzen werden demnach als eine Reihenfolge von Buchstaben dargestellt, wobei jeder Buchstabe für eine Nukleinsäure codiert. So beschreibt „GGT“ die Abfolge Guanin – Guanin – Thymidin auf dem DNA-Strang.

In Proteine eingebaute Aminosäuren werden nach dem IUPAC-Code entweder im 1-Buchstaben- oder im 3-Buchstaben-System dargestellt. So kann die Aminosäure Alanin entweder mit „A“ oder mit „Ala“ beschrieben werden. Zu beachten ist, dass „A“ ebenfalls für Adenosin im Zusammenhang mit der Darstellung von Gensequenzen stehen kann. Daher muss beachtet werden, ob ein Buchstabe im Kontext der Beschreibung von Aminosäuren oder Nukleinsäuren steht.

Das System wird ergänzt durch Zahlen, die definieren, an welcher Stelle sich eine Aminosäure in einem Protein beziehungsweise eine Nukleinsäure in einem Gen befindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der IUPAC-Code, wie oben ausgeführt, verwendet, um die entdeckten Mutationen zu beschreiben. Gly13Asp oder die analoge Schreibweise G13D charakterisieren somit eine Mutation, die an der Position 13 im Protein zu einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Aspartat geführt hat. 38G>A oder G38A charakterisiert eine Mutation an der Position 38 eines Gens, bei der Guanin durch Adenin ersetzt wurde.

Die vollständige IUPAC-Code-Tabelle, wie sie in dieser Dissertation Anwendung fand, befindet sich im Anhang.

2.2.2. Multiplex-PCR

2.2.2.1. Funktionsprinzip

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) ermöglicht die gezielte und weitgehend automatisierte Vervielfältigung von kurzen Einzelstrang-DNA-Molekülen. Sie stellt die Grundlage für die Durchführung von DNA-Sequenzierungen und Mutationsanalysen in der medizinischen Forschung dar.

Das Prinzip der PCR besteht in der Wiederholung von drei Reaktionsschritten. Hierbei wird die Original-DNA exponentiell vervielfältigt. Jede Wiederholung (Zyklus) besteht aus den folgenden drei Schritten:

Denaturation: Zunächst liegt die zu vervielfältigende DNA als Doppelstrang vor. Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufzubrechen und auf diese Weise die Stränge voneinander zu trennen.
Annealing: Die Temperatur des Reaktionsgemisches wird gesenkt, damit die Primer an die DNA binden können.
Elongation: Im dritten Schritt wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase angehoben. Die Polymerase beginnt nun, an den Primer einen neuen, zu der Original-DNA komplementären, DNA-Strang zu synthetisieren. Hierbei bedient sie sich an den im Reaktionsgemisch vorhandenen DNA-Nukleotiden.

Diese drei Reaktionsschritte werden vielfach wiederholt, was theoretisch unter optimalen Bedingungen eine Vervielfältigung um den Faktor 2^x ermöglicht.

Die Reaktion wie beschrieben findet in einem automatisierten Thermocycler statt, welcher die für die Reaktion notwendigen Temperaturänderungen selbstständig durchführt.

Die verwendete Multiplex-PCR erlaubt die Amplifikation mehrerer Genabschnitte in einer Reaktion. In einer einzigen PCR wurden verschiedene Primer zur Amplifikation mehrerer DNA-Abschnitte eingesetzt. Damit wurden in einer PCR die notwendigen Amplifikate für die Sequenzierung des *BRAF*-Gens und der drei kodierenden Exone des *KRAS*-Gens gewonnen.

Den oben beschriebenen Zyklen der PCR wird eine Erhitzungsphase von 15 Minuten auf 95°C vorgeschaltet, um ein möglichst vollständiges Lösen der DNA-Stränge voneinander zu erreichen. Weiterhin wird in diesem Schritt die DNA-Polymerase durch Denaturierung eines an die Polymerase gebundenen Antikörpers aktiviert („hot start PCR“).

Für die Multiplex-PCR wurde das Qiagen Multiplex Kit (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

2.2.2.2. Primer

Folgende Primersequenzen wurden in der PCR verwendet:

KRAS:

Exon 2 Forward: 5´-TCCCAAGGAAAGTAAAGTTCCCATATTAATG-3´,

Exon 2 Reverse: 5´-CGCAGAACAGCAGTCTGGCTATTTAG-3´,

Exon 3 Forward: 5´-CACTGCTCTAATCCCCCAAGAACTTC-3´,

Exon 3 Reverse: 5´-GGAGCAGGAACAATGTCTTTTCAAGTC-3´,

Exon 4 Forward: 5´-CAAA GCCAAAAGCAGTACCATGGA-3´,

Exon 4 Reverse: 5´-AGCCAAATTTTATGACAAAAGTTGTGGACAG-3´.

BRAF:

Forward: 5´-GTGGATCACACCTGCCTTAAATTGC-3´

Reverse: 5´- GAGAATATCTGGGCCTACATTGCTAAAATC-3´.

Die Primer wurden mittels Primer3 entwickelt (Rozen und Skaletsky 2000) und von der Firma Qiagen hergestellt.

2.2.2.3. Pipettierschemata und Protokolle

Der Ansatz der PCR umfasst die im Folgenden beschriebenen Reagenzien und Tabelle 11 zeigt das angewandte Pipettierschema:

Mastermix: Taq-DNA-Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate, Mg^{2+}-Ionen in einer Pufferlösung
Primermix: DNA-Primer für das *BRAF*-Gen und Exon 2,3 und 4 des *KRAS*-Gens
DNA: Tumorzell-DNA

Tabelle 11: Pipettierschema der Multiplex-PCR

Komponente	Menge
Mastermix	6 µl
Primermix	1,2 µl
Proben-DNA	4,8 µl [20ng/µl]
Gesamt	12 µl

Die folgende Tabelle 12 listet die einzelnen Reaktionsschritte des Thermocyclers auf. Die Schritte 2 - 4 werden insgesamt 30 Mal wiederholt und das Produkt anschließend auf 4° C abgekühlt.

Tabelle 12: Cyclerprotokoll der Multiplex-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	95° C	15 min	Aktivierung der Polymerase
2	94° C	30 sec	Denaturierung
3	66,5° C	90 sec	Annealing
4	72° C	90 sec	Elongation
Ende	4°	Bis Entnahme	Kühlung der Probe

2.2.3. Gelelektrophorese

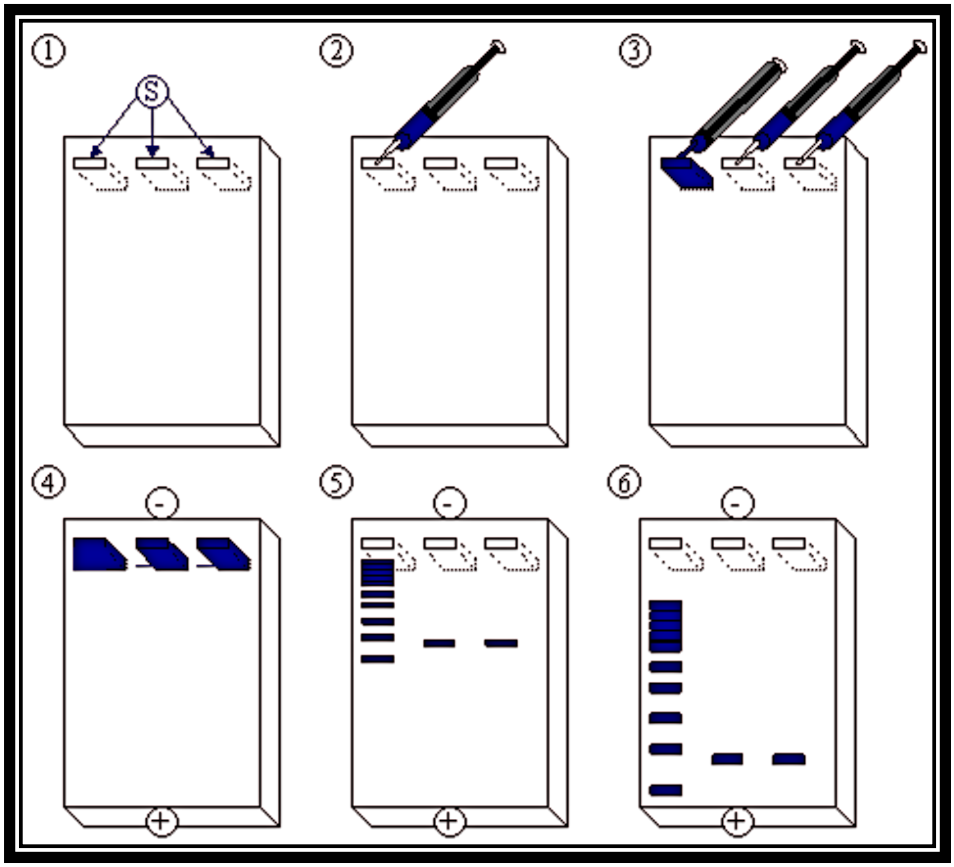
Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuresträngen aus einem Nukleinsäuregemisch nach ihrer Größe, wie in diesem Fall das Multiplex-PCR-Produkt. Weiterhin dient die Gelelektrophorese der näherungsweisen Größenbestimmung der aufgetrennten Nukleinsäuren. Dazu wird parallel zu den zu analysierenden Strängen ein Gemisch von Nukleinsäuren mit bekannten und definierten Größen aufgetragen.

Die diesem Abschnitt folgende Abbildung 7 zeigt grafisch das Prinzip der Gelelektrophorese. Die im Text angegebenen Nummern beziehen sich auf die Abbildung 7.

Als Matrix für die Elektrophorese dient ein Gel, welches aus einem Netz von Agarosepolymeren besteht. In diesem Netz enthalten sind feine Poren, durch die DNA-Moleküle wandern können. Weiterhin ist im Gel ein Nukleinsäurefarbstoff, in diesem Fall „GelRed“, enthalten, welcher sich an die DNA anlagert und unter UV-Licht fluoresziert. Im Gel ausgespart sind Taschen (1), in die DNA-Proben sowie ein Farbstoff, hier „loading Dye“, zur Beurteilung des Fortschritts der Elektrophorese gegeben werden (2) + (3). Anschließend wird an das Gel, welches in einem Laufpuffer (1x TAE-Lösung) liegt, eine Gleichstromspannung angelegt (4). Da Nukleinsäuremoleküle negativ geladen sind, wandern sie durch die Poren im Gel zur Anode (5). Dabei bewegen sich kleine Nukleinsäurestränge schneller durch das Gel als

große. Am Ende des Vorgangs befinden sich diese kleineren Fragmente daher näher an der Anode als größere. Ein Gemisch aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, genannt DNA-Ladder, dient als Bezugspunkt innerhalb des Gels und ermöglicht eine ungefähre Größenbestimmung der durch das Gel gelaufenen DNA-Fragmente (6).

Abbildung 7: Prinzip der Gelelektrophorese



Die Herstellung des 2%-Agarose-Gels erfolgt folgendermaßen: 1g NuSieve-Agarose (NuSieve® 3:1 Agarose, Lonza, Rockland, USA) wird in 50ml 1fach-TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig auflöst. Nach Hinzugabe von 5 µl „GelRed“ und Abkühlung auf ca. 50° C wird das Gel blasenfrei gegossen und mit einem Kamm zur Aussparung der Taschen versehen. Nach einer Dreiviertelstunde ist das Gel bei Raumtemperatur vollständig erstarrt und bereit zur Verwendung.

Tabelle 13 listet die Inhaltsstoffe und Konzentrationen des verwendeten TAE-Puffers in einfacher und fünfzigfacher Konzentration auf.

Tabelle 13: Zusammensetzung des TAE-Puffers

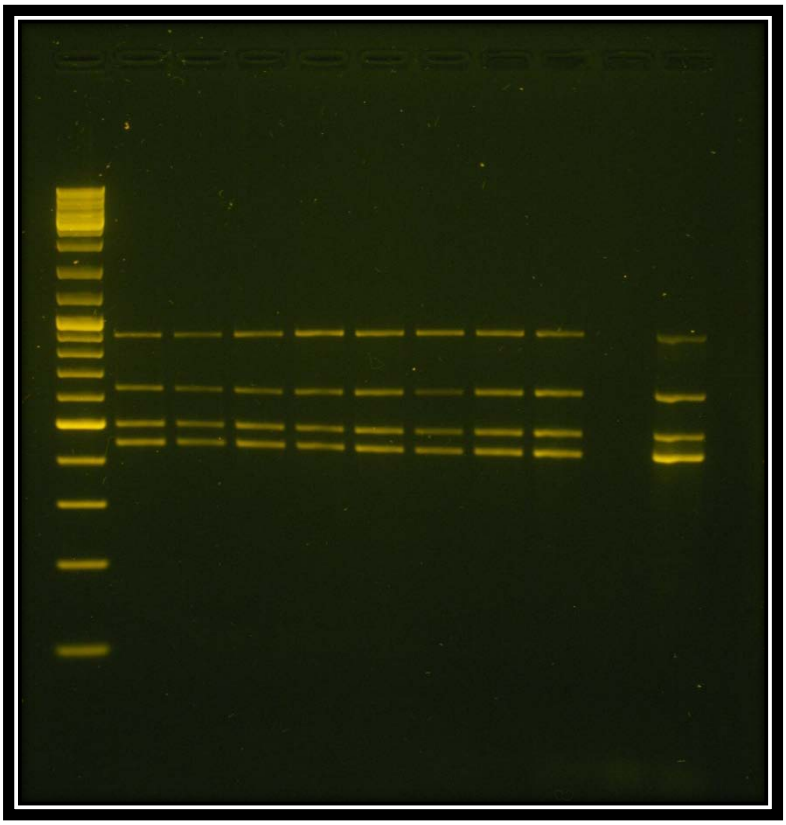
50x TAE-Puffer (1 Liter)	**1x TAE-Puffer (1Liter)**
242 g Tris-Base (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol) (= 2 mol)	4,84 g Tris-Base
57.1 ml 100%ige Essigsäure (= 1 mol)	1,142 ml Essigsäure
100 ml 0.5 M Na2 EDTA (pH 8.0)	2 ml EDTA
H_2O bis auf 1000 ml	H_2O bis auf 1000 ml

Im Gel befinden sich 11 Kammern, welche jeweils mit einer DNA-Ladder, Tumorzell-DNA, und Positiv- sowie Negativkontrollen befüllt werden. Die Positivkontrolle bestand aus einer PCR mit Leukozyten-DNA und die Negativkontrolle aus einer PCR ohne DNA zum Ausschluss von Verunreinigungen.

Direkt nach dem Befüllen der Kammern nach oben genanntem Schema wird eine Gleichstromspannung von 120 Volt angelegt. Nach 75 min Laufzeit wird das Gel unter UV-Licht begutachtet und das Ergebnis per Digitalfotografie dokumentiert.

Das fotografierte Gel sieht nach korrekter Durchführung der Elektrophorese und fehlerfreier PCR wie in der nachstehenden Abbildung 8 aus. Man erkennt die Banden für die Amplifikate des *BRAF*-Exons und der *KRAS*-Exone 2 bis 4; die Negativkontrolle zeigt keinerlei Banden.

Abbildung 8: Fotografische Ergebnisdokumentation der Gelelektrophorese



2.2.4. Probenaufreinigung

Für die Sequenzierung der amplifizierten DNA ist es notwendig, die noch im Reaktionsgemisch vorhandenen Primer und Nukleosidtriphosphate zu degenerieren. Dazu wird die Exonuklease I (EXO I, E.coli) und die „shrimp alkaline phosphatase“ (SAP) der Firma USB, Staufen, Deutschland verwendet. Das Enzym EXO I degeneriert Einzelstrang-DNA in 3‘ -> 5‘ Richtung und zerstört verbliebene Einzelstrang-DNA und Primer im Gemisch. Das Enzym SAP katalysiert die Abspaltung der Phosphatgruppen von den restlichen Nukleotiden. Das Reaktionsgemisch wird wie in Tabelle 14 beschrieben angesetzt und nach dem in Tabelle 15 dargestellten Thermocyclerprotokoll zur Reaktion gebracht. Das für die Reaktion verwendete Kit stammte von der Firma Quiagen.

Tabelle 14: Pipettierschema der Aufreinigungsreaktion

Substanz	Menge
10x SAP-Puffer	0,87 µl
Exo-I	0,255 µl
SAP	1,875 µl
PCR Produkt	6 µl
Gesamt	**9 µl**

Tabelle 15: Cyclerprotokoll der Aufreinigungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit
1	37° C	60 min
2	80° C	15 min
3	4° C	Bis Entnahme

2.2.5. Sequenzierung

Die Analyse der Basenabfolge auf dem Erbgut einer Zelle, genannt Sequenzierung, stellt die Grundlage für die moderne molekulargenetische Forschung dar. Das 1980 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigte Verfahren ermöglicht heutzutage, nach einigen Modifikationen der Ursprungsmethode, die direkte Analyse von DNA-Basenabfolgen in einer auf- und vorbereiteten Lösung.

Die in diesem Kapitel bereits beschriebenen Verfahren lieferten ein für die Sequenzierung notwendiges DNA-Produkt, welches lediglich aus den zu analysierenden Exons der betreffenden Gene *BRAF* und *KRAS* besteht. Die weiteren Schritte bis zur erfolgreichen Sequenzierung der Exons sind in hier im weiteren Verlauf beschrieben.

2.2.5.1. Funktionsprinzip der Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Abschnitte wurde mit der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt. Das Funktionsprinzip ähnelt dabei den oben bereits ausführlich beschriebenen und zuvor im Rahmen dieser Studie angewandten Methoden.
Zu Beginn der Analyse steht wieder eine Reaktion, die auf dem gleichen Prinzip wie die Polymerasekettenreaktion beruht. Die Reaktion wurde dabei jeweils für beide Komplementärstränge, unter Verwendung eines Forward- und eines Reverseprimers, durchgeführt. Im Reaktionsgemisch dieser Sequenzierungs-PCR sind prinzipiell die gleichen Reagenzien enthalten, die auch bei der oben bereits beschriebenen PCR Verwendung fanden. Der entscheidende Unterschied besteht bei der Sequenzierungs-PCR aber darin, dass ein Teil der dem Reaktionsgemisch zugegebenen Nukleotide am 3‘-Ende keine Hydroxygruppe besitzt. Das verursacht einen Abbruch der Polymerasekettenreaktion nach dem Einbau eines solchen Nukleotids in den Strang. Da nur ein Teil der Nukleotide einen Strangabbruch verursacht und ihr Einbau in den Strang an einer zufälligen Stelle erfolgt, ergibt sich am Ende der Reaktion ein Gemisch von Nukleinsäuren aller möglichen Längen. Da die Nukleotide, welche einen Strangabbruch verursachen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind, können sie später an einem Detektor registriert werden. Bis dahin ist allerdings ein Zwischenschritt nötig. Den Ansatz der genauen Sequenzierungs PCR, wie in dieser Studie angewandt, zeigt auf Seite 37 unter Punkt 2.2.5.2. Tabelle 16, während Tabelle 17 das verwendete Cyclerprotokoll darstellt.
In dem nach der Reaktion entstandenen Nukleinsäuregemisch befinden sich nun also DNA-Stränge unterschiedlichster Größe, die jeweils mit einem markierten Nukleotid enden. Der nächste Schritt besteht nun in der Auftrennung der DNA-Stränge nach ihrer Größe. Dazu wurde ein Verfahren angewandt, welches in seinen Grundzügen der Gelelektrophorese wie oben beschrieben entspricht, allerdings modifiziert und automatisiert wurde. Gemeint ist die so genannte Kapillarelektrophorese, die im Rahmen dieser Studie mit dem ABI-3100-Sequenzer der Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika, durchgeführt wurde. Bei dem Verfahren wird in einer hauchdünnen Kapillare das Nukleinsäuregemisch in einer Elektrolytlösung elektrophoretisch aufgetrennt. Wiederum bedient man sich der

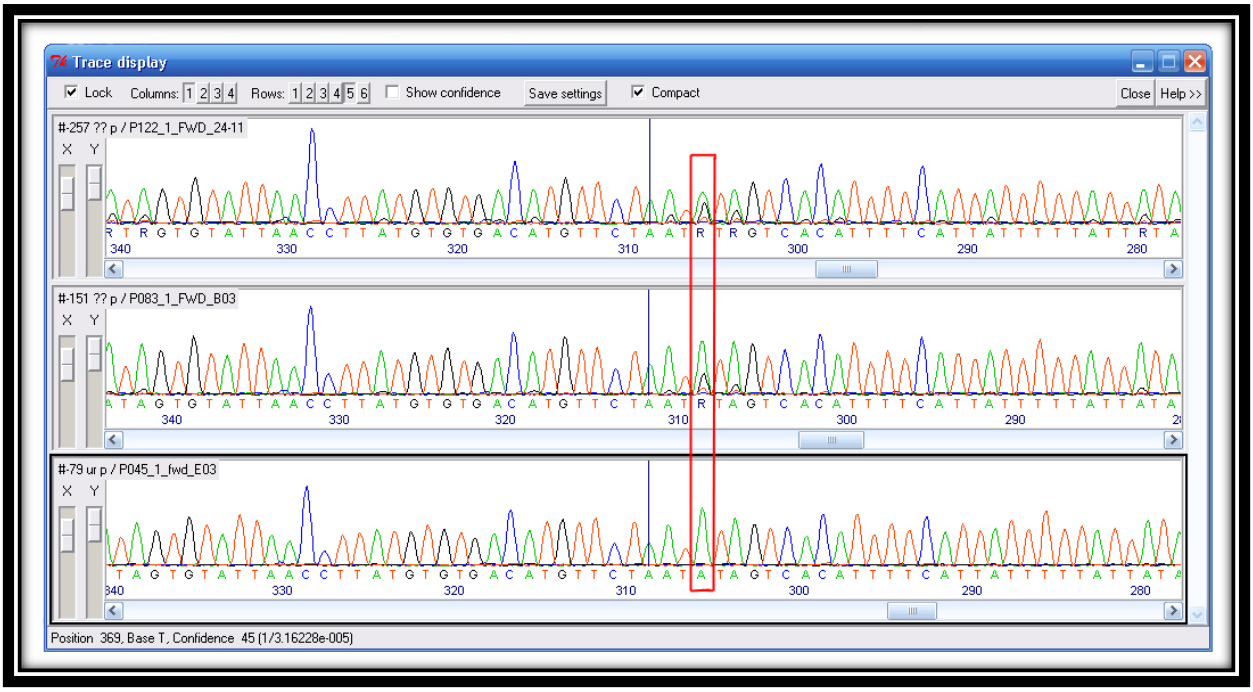
unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer Moleküle im elektrischen Feld und erhält am Ende ein in der Kapillare nach Größe sortiertes Molekülgemisch. Da die am Ende eines jeden Strangs eingebauten Nukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, können diese nun durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden.

Dies geschieht wiederum in dem oben genannten Sequenzer. Ein Laser regt der Reihe nach die nach Größe sortierten Nukleotidstränge zur Fluoreszenz an. Das Fluoreszieren der am Ende der Stränge eingebauten Strangabbruchnukleotide wird der Reihe nach, ebenfalls entsprechend der Größe der Stränge, an einem Detektor registriert. Da jede Base mit einem eigenen Farbstoff markiert wurde, kann die Registrierung aller vier Basen an einem einzigen Durchgang erfolgen.

Das Gerät errechnet nun aus der Länge der Produkte und der Abfolge der Fluoreszenzsignale die genaue Basenabfolge auf der zu analysierenden DNA. Das Ergebnis wird in einer Datei ausgegeben und kann vom Untersucher mit entsprechender Software, in diesem Fall Staden Package, ausgewertet und interpretiert werden. Dieses Programm steht allen Wissenschaftlern kostenlos zur Verfügung und kann über die Internetadresse http://staden.sourceforge.net bezogen werden.

Die Auswertung und Interpretation erfolgt am Computer. Die Software stellt dabei die Fluoreszenzsignale der einzelnen Basen farbcodiert als Peaks dar. Abbildung 9, angefertigt während der Auswertung der Sequenzierung, verdeutlicht dies.

Abbildung 9: Auswertungssoftware Staden



Da das Ziel dieser Studie war, Mutationen zu entdecken, wurde nun die in den Tumorzellen festgestellte Basenabfolge mit der bekannten Basenabfolge normaler, nicht mutierter DNA verglichen. Bei Vorhandensein einer Mutation zeigte sich in der grafischen Darstellung in diesen Fällen ein zusätzlicher Peak, der eine andere Farbcodierung aufwies als bei normaler DNA zu erwarten gewesen wäre. Das Nebeneinander zweier Peaks ist also als Vorhandensein zweier unterschiedlicher Basen an dieser Stelle des Genoms zu bewerten. Die Interpretation dieses Befundes ist das Vorhandensein mutierter Tumorzell-DNA und DNA aus nicht mutierten Stromazellen, die bei der Biopsie ebenfalls entnommen und im Prozess der Analyse ebenfalls amplifiziert und analysiert wurden.

Die Auswertung der Basenabfolge geschah für jede Probe einzeln und komplett, da nur so auch seltene Mutationen abseits der bekannten Hot-Spots entdeckt werden konnten.

2.2.5.2. Protokolle und Reagenzien

Im folgenden Abschnitt und in den Tabellen 16 und 17 werden die in dieser Studie für die Sequenzierung verwendeten Reagenzien und Protokolle aufgelistet.

Die für die Sequenzierung verwendeten Primer entsprechen mit Ausnahme des *BRAF*-Forward-Primers denen aus der PCR (siehe 2.2.2.2. auf Seite 27). Zur Sequenzierung von *BRAF* wurde ein anderer Primer verwendet, um ein kürzeres Amplifikat zu erhalten.

Der für die Sequenzierung verwendete *BRAF*-Forward-Primer ist der folgende:
5´-CAGCATCTCAGGGCCAAAAATTTAATC-3´

Tabelle 16: Ansatz Sequenzierungsreaktion

Substanz	**Menge**
Wasser ohne DNAse / RNAse	2,25 µl
DMSO	0,25 µl
Primer (forward oder reverse)	0,5 µl
Big Dye	1 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1 µl

Tabelle 17: PCR-Programm Sequenzierungsreaktion

Schritt	**Temperatur**	**Zeit**	
1	94° C	2 min	
2	96° C	15 sec	
3	56,5° C	15 sec	Schritt 2 – 4 wird 25x wiederholt
4	60° C	4 min	
77	72° C	7 min	
78	8° C	Bis Entnahme	

3. Ergebnisse

3.1. Mutationen

3.1.1. *BRAF*-Mutationen

Mutationen, die zu einer verstärkten Aktivierung von *BRAF* führen, betreffen überwiegend das Codon 600, welches in Exon 15 des *BRAF*-Gens liegt (Wang et al. 2003). Um auch andere Mutationen zu erfassen, wurde das komplette Exon 15 sequenziert und individuell für jede Probe analysiert.

Die Sequenzierung ergab in keiner der 94 Tumorproben die typische V600E-Mutation, welche im Zusammenhang mit dem Kolorektalen Karzinom beschrieben wird. Allerdings konnte bei einem Patienten eine G1780A-Mutation nachgewiesen werden, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatte (G594N). Die entdeckte Mutation ist in Tabelle 18 aufgelistet und charakterisiert.

Tabelle 18: Entdeckte *BRAF*-Mutationen

Codon	Anzahl	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
594 (n=1)	1	G1780A	G594N

3.1.2. *KRAS*-Mutationen

Zum Nachweis von Mutationen im *KRAS*-Gen und zur Sicherstellung, dass keine Mutationen abseits der bekannten Hot-Spots der Suche entgehen, wurden die Exons 2, 3 und 4 vollständig sequenziert und für jede Probe eine separate Auswertung durchgeführt. Somit wurden die bekannten Mutationen in Codon 12 und 13 sowie auch die seltener beschriebene Mutationen in Codon 61 und 146 sicher erfasst.

Insgesamt konnten bei 45 von 94 Proben Mutationen im *KRAS*-Gen nachgewiesen werden, was einer Gesamtfrequenz von 48 % entspricht. 29 dieser 45 Mutationen (64%) befanden sich in Codon 12, zehn (22%) in Codon 13 und je drei (7%) in den Codons 61 und 146. In einer Probe waren zwei simultane Mutationen nachweisbar (34G>T und 36T>G). Tabelle 19 listet die entdeckten *KRAS*-Mutationen systematisch auf.

Tabelle 19: Entdeckte *KRAS*-Mutationen

Codon	Anzahl	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
12 (n=29)	1	34G>A	Gly12Ser
	1	34G>T	Gly12Cys
	1	34G>T + 36T>G	Gly12Trp
	15	35G>A	Gly12Asp
	3	35G>C	Gly12Ala
	8	35G>T	Gly12Val
13 (n=10)	10	38G>A	Gly13Asp
61 (n=3)	2	182A>T	Gln61Leu
	1	182A>G	Gln61Arg
146 (n=3)	2	436G>A	Ala146Thr
	1	436G>C	Ala146Pro

3.2. Auswirkungen von KRAS-Mutationen

3.2.1. *KRAS*-Mutationen und Ansprechen auf Therapie

Ein weiteres Ziel der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie war es, die festgestellten Mutationen mit dem Krankheitsverlauf der Patienten in Verbindung zu setzen. Dazu wurden die Proben der Patientenkollektive ohne *KRAS*-Mutationen mit

dem Kollektiv mutierter Codons 12, 13, 61 und 146 verglichen. Die Bezugsgrößen waren die klinischen Parameter und das Ansprechen auf Therapie, welches an Hand von T-Level-Downsizing und UICC-Downstaging unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests untersucht wurde. Bei der TRG-Level-Analyse wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet, im Englischen „subsequent pairwise Wilcoxon rank-sum test" genannt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5\%$ festgelegt.

Bei der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wild-Typ-*KRAS* und den gruppierten Mutationen im Bezug auf T-Level-Downsizing, UICC-Downstaging, die im Operationspräparat histopathologisch festgestellte Tumorinfiltrationstiefe (ypT) oder den Lymphknotenbefall (ypN) festgestellt werden.

Da in den Analysen aber Mutationen von unterschiedlichen Exons Eingang gefunden hatten, wurde im nächsten Schritt die unterschiedliche Verteilung der Parameter in Abhängigkeit des mutierten Codons untersucht. Das komplette Ergebnis ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Korrelation zwischen Wild-Typ-*KRAS* und gruppierten Mutationen der Codons 12, 13, 61, 146 in Bezug auf die Parameter TRG, Downsizing und Downstaging

Parameter	Level	*KRAS*-Mutation										p
		Wild-Typ (n = 49)		Codon 12 (n = 29)		Codon 13 (n = 10)		Codon 61 (n = 3)		Codon 146 (n = 3)		
		n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	
TRG	0	0	0	0	0	0	0	1	33	0	0	0.22
	1	4	8	6	21	0	0	1	33	1	33	
	2	18	38	10	34	2	20	0	0	0	0	
	3	20	42	11	38	6	60	0	0	1	33	
	4	6	12	2	7	2	20	1	33	1	33	
T-Level-Downsizing (uT - ypT)	0	20	41	18	62	2	20	1	33	2	67	0.14
	1	29	59	11	38	8	80	2	67	1	33	
UICC-Downstaging (uUICC - ypUICC)	0	24	49	10	34	1	10	0	0	2	67	0.07
	1	25	51	19	66	9	90	3	100	1	33	
ypT	0	7	14	2	7	2	20	1	33	1	33	0.19
	1	8	16	2	7	2	20	1	33	0	0	
	2	13	27	7	24	4	40	0	0	0	0	
	3	18	37	16	55	2	20	0	0	1	33	
	4	3	6	2	7	0	0	1	33	1	33	
ypN	0	28	57	22	76	9	90	3	100	1	33	0.81
	1	14	29	6	21	1	10	0	0	2	67	
	2	7	14	1	3	0	0	0	0	0	0	

Auch in dieser Analyse fand sich keine Ungleichverteilung. Da aus der Literatur jedoch eine unterschiedliche Aktivität des Proteins in Abhängigkeit von der zu Grunde

liegenden Mutation bekannt war, erfolgte eine weitere Analyse basierend auf dem Aminosäureaustausch. Auf Grund der Vielzahl unterschiedlicher Mutationen wurden für die Auswertung nur die drei häufigsten Mutationen herangezogen. Hierzu gehörten 23 Codon-12-Mutationen, wovon acht einen Austausch von Glycin gegen Valin (G12V) und 15 einen Austausch von Glycin gegen Aspartat (G12D) aufwiesen. Zehn Patienten boten Mutationen in Codon 13, der mit einem Aminosäureaustausch Glycin zu Valin (G13D) einherging. In der statistischen Analyse wurden die Mutationen gruppiert und gegen Wild-Typ-*KRAS* in Bezug auf Tumorregressionsgrad, T-Level-Downsizing und UICC-Downstaging verglichen. In Bezug auf die Parameter T-Level-Downsizing und UICC-Downstaging zeigte sich erneut keine statistisch signifikante Korrelation. Allerdings bot sich ein auffallender Unterschied in der Verteilung des Tumorregressionsgrades zwischen den einzelnen Mutationen und dem Wild-Typ (p = 0,052), dargestellt in Tabelle 21.

Tabelle 21: Korrelation zwischen Wild-Typ-*KRAS* und den gruppierten G12D-, G12V- und G13D-Mutationen in Bezug auf die Parameter TRG, Downsizing und Downstaging

Parameter	Level	*KRAS*-Mutation								p
		Wild-Typ (n = 49)		G12D (n = 15)		G12V (n = 8)		G13D (n=10)		
		n	%	n	%	N	%	N	%	
TRG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.052
	1	4	8	1	7	3	38	0	0	
	2	18	38	5	33	3	38	2	20	
	3	20	42	7	47	2	24	6	60	
	4	6	12	2	13	0	0	2	20	
T-Level-Downsizing (uT - ypT)	0	20	41	8	54	6	75	2	20	0.11
	1	29	59	7	47	2	25	8	80	
UICC-Downstaging (uUICC - ypUICC)	0	24	49	4	27	4	50	1	10	0.08
	1	25	51	11	63	4	50	9	90	

Um die Bedeutung dieser Assoziation einschätzen zu können, wurde ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Mutationen und dem Wild-Typ durchgeführt. Dabei zeigten sich starke Unterschiede zwischen G12V und G13D (p = 0,0124) sowie Wild-Typ und G12V (p = 0,0399) hinsichtlich der Tumorregression. In Bezug auf das T-Level-Downsizing wurde gleichermaßen verfahren. Hier zeigte sich ebenfalls ein starker Unterschied zwischen G12V und G13D (p = 0,0267). Problematisch für diese Analyse war jedoch der multiple Vergleich auf dem gleichen Parameter, sodass eine Korrektur auf multiples Testen durchgeführt werden musste (nach Bonferroni). Die Tabellen 22 und 23 liefern das komplette Ergebnis.

Tabelle 22: Korrelation der einzelnen Mutationen und Wild-Typ (WT) in Bezug auf den Tumorregressionsgrad:

Vergleich	P
WT vs. G12D	0,7229
WT vs. G12V	0,0399
WT vs. G13D	0,1355
G12D vs. G12V	0,0517
G12D vs. G13D	0,3164
G12V vs. G13D	0,0124

Tabelle 23: Korrelation der einzelnen Mutationen und Wild-Typ (WT) in Bezug auf den T-Level-Downsizing:

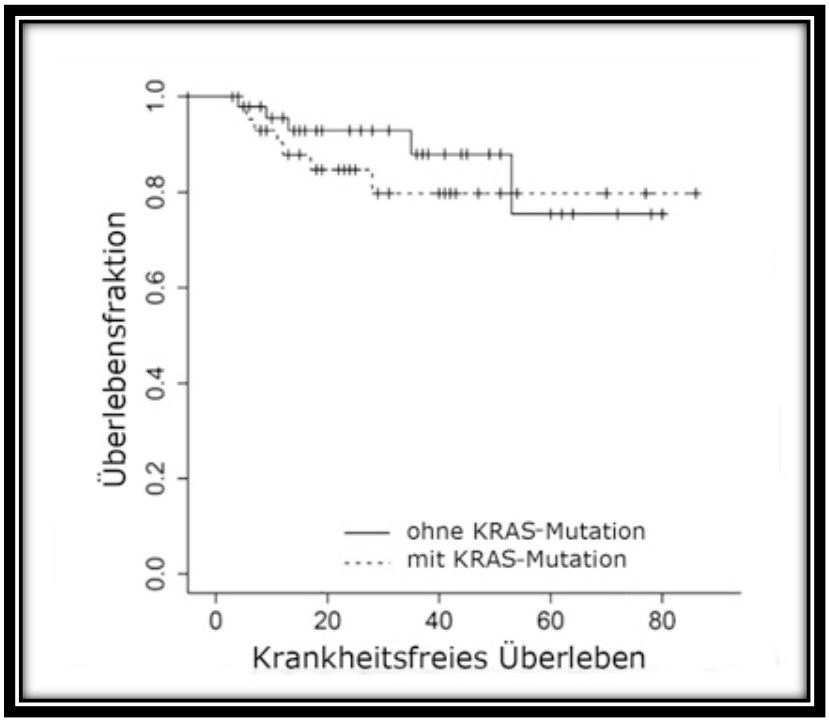
Vergleich	p
WT vs. G12D	0,4014
WT vs. G12V	0,0766
WT vs. G13D	0,2232
G12D vs. G12V	0,3403
G12D vs. G13D	0,1095
G12V vs. G13D	0,0267

3.2.2. KRAS-Mutationen und Follow-Up-Daten

Die mediane Follow-Up-Zeit der Patienten in der vorliegenden Studie betrug zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit 30,7 Monate. Die kürzeste Follow-Up-Zeit betrug dabei drei, die längste 86 Monate. Während dieser Zeit verstarben drei Patienten an einem Rezidiv, jeweils 15, 21 bzw. 57 Monate nach der Operation. Zwei weitere Patienten verstarben drei bzw. vier Monate nach der Operation am plötzlichen Herztod. Daraus ergibt sich ein medianes Gesamtüberleben von 20 Monaten (kürzester Wert drei Monate, längster 57 Monate). Von den drei an dem Rezidiv verstorbenen Patienten wiesen zwei den *KRAS*-Wild-Typ und einer eine Mutation (G12W) auf.

Zwölf Patienten erlitten einen Krankheitsrückfall, davon drei in Form eines Lokalrezidivs und neun in Form von Fernmetastasen in Lunge, Leber, Gehirn und / oder systemischen Lymphknotenbefalls. Damit betrug das mediane krankheitsfreie Überleben 22,8 Monate (2 - 50 Monate). Einer der drei Patienten mit Lokalrezidiv zeigte eine einzelne *KRAS*-Mutation (G12D). Bei den neun Patienten mit Fernmetastasen waren sechs *KRAS*-Mutationsträger (66,7%). Allerdings war keine der Mutationen (2xG12D, G12C, G12W, G13D und G12V) statistisch signifikant überrepräsentiert. Anhand von Kaplan-Meier-Kurven wurde untersucht, ob *KRAS*-Mutationen einen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben haben. Dies ergab jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,58$) (Gaedcke et al. 2010).

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve (Gadcke et al. 2010, S. 81):



4. Diskussion

Der MAP-Kinase-Pathway spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und trägt in bis zu 30 % der Fälle zur Entstehung des Kolorektalen Karzinoms bei (Hoshino et al. 1999, Fremin und Meloche 2010). *KRAS* und *BRAF* sind Teile des MAP-Kinase-Signalkaskadewegs und werden durch onkogene Mutationen aktiviert. Die in der Literatur bisher publizierte Mutationsrate für *BRAF* von etwa 5 – 15 % im Kolorektalen Karzinom konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Es wurde in 94 Tumorproben lediglich eine *BRAF*-Mutation gefunden (1 %). Diese einzelne Mutation lag in Codon 594 und zählt zu den in der Literatur selten beschriebenen Mutationen (Davies et al. 2002). Die Abwesenheit von V600E-Mutationen in den in dieser Studie berücksichtigten Tumorproben lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome steht aber im Einklang mit einer von Kim JC et al. (2008) veröffentlichten Studie. In der betreffenden Arbeit wurden *BRAF*-Mutationen in Karzinomen des rechten Kolons (n=73), des linken Kolons (n=72) und des Rektums (n=79) verglichen. Dabei wurde für Karzinome der UICC-Stadien I – IV eine abnehmende Mutationsrate für *BRAF* vom rechten über das linke Kolon bis hin zum Rektum ermittelt (Kim JC et al. 2008). Wie auch in der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studie wurden keine V600E-*BRAF*-Mutationen in den untersuchten Rektumkarzinomen gefunden. Allerdings fanden Di Nicolantonio et al. eine einzelne V600E-Mutation in 43 untersuchten Rektumkarzinomen (Di Nicolantonio et al. 2008) und Fransen et al. sogar zwei Mutationen in 55 Proben (Fransen et al. 2004). Da die Frequenz von *BRAF*-Mutationen vom rechten Kolon zum Rektum hin abnimmt und die in der hier vorliegenden Studie analysierten Tumore ausschließlich aus den mittleren und unteren Rektumdritteln stammten, wäre eine mögliche Erklärung für die von Di Nicolantonio et al. und Fransen et al. gefundenen Mutationen die Lokalisation dieser Tumoren im oberen Rektumdrittel. Bei der Interpretation dieser Funde muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass die Daten, die in dieser Dissertation analysiert wurden, aus einem gesicherten Kollektiv einer Phase-III-Studie stammen und insgesamt eine höhere Fallzahl aufweisen als die zitierten Studien. Zusammengenommen zeigen die vorgelegten Daten somit, dass *BRAF*-Mutationen in lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen des unteren und mittleren Drittels nur eine untergeordnete Rolle spielen. Entsprechend ist auch die Bedeutung im Rahmen

aktueller Chemotherapiekonzepte gegen den „anti-epidermal-growth-factor-receptor“, genannt EGFR-Antagonisten, in neoadjuvanten Therapiekonzepten für Patienten mit Rektumkarzinom (Debucquoy et al. 2009, Horisberger et al. 2009, Rodel et al. 2003) allenfalls marginal. Die zu Grunde liegende Ration war, dass *BRAF*-Mutationen eine aktivierende Wirkung auf die Downstream-Proteine des EGF-Rezeptors haben. Dabei hängt die Wirksamkeit der anti-EGFR-Therapie jedoch vom Vorhandensein des *BRAF*-Wild-Typ-Allels ab (Di Nicolantonio et al. 2008). Theoretisch wäre also bei der Planung einer individualisierten Therapie die Mutationsanalyse von *BRAF* sinnvoll, da eine Therapie mit EGFR-Antagonisten bei Vorliegen von *BRAF*-Mutationen nach den zitierten Studien nicht wirksam zu sein scheint. In Anbetracht des Nichtvorhandenseins von *BRAF*-V600E-Mutationen in Adenokarzinomen des mittleren und unteren Rektumdrittels, wie in dieser und anderen Studien festgestellt, ist ein solcher Test für dort lokalisierte Tumore somit überflüssig.

Mutationen im *KRAS*-Gen sind bei etwa 30 bis 40 % aller Kolorektalen Karzinome zu finden (Fremin und Meloche, 2010, Karapetis et al. 2008). Die Angaben in der Literatur über die Frequenz variieren, was unter anderem auf den Umfang des Screenings zurückzuführen ist. So wurde in vielen publizierten Studien nicht, wie in dieser Arbeit, das komplette *KRAS*-Gen sequenziert und ausgewertet sondern lediglich Exon 2 mit den Hot-Spot-Mutationen in Codon 12 und 13. In der vorliegenden Studie wurde hingegen nach vollständiger und bidirektionaler Sequenzierung aller drei translatierenden Exone bei 45 von 94 Patienten (48 %) eine Mutation festgestellt. Bei ausschließlicher Betrachtung der in den meisten Studien untersuchten Hot-Spots auf den Codons 12 und 13, finden sich bei 39 Patienten dieser Studie (41,5 %) Mutationen im *KRAS*-Gen. Die Frequenz von Codon 12 und 13 *KRAS*-Mutationen in Rektumkarzinomen ist damit vergleichbar mit der in Kolonkarzinomen festgestellten Frequenz (Bosman et al. 2009).

In den Publikationen über *KRAS*-Mutationen ist längst nicht immer ein Screening nach den selteneren Mutationen in Codon 61 und 146 durchgeführt worden, obwohl für Codon-146-Mutationen bereits eine transformierende Aktivität beschrieben wurde (Feig und Cooper 1988). Um diese und möglicherweise auch zusätzliche Mutationen zu

erfassen, wurden in dieser Studie die kompletten Exone 2, 3 und 4 sequenziert. Dabei wurden in drei Tumorbiopsien (3,2 %) Mutationen im Codon 61 und in weiteren drei Biopsien (3,2 %) Mutationen in Codon 146 gefunden. Zusammengenommen machen die Codon 61 und 146 Mutationen 13,3 % aller in dieser Studie gefundenen Mutationen aus. Die hier festgestellte, relativ hohe Anzahl an Codon-146-Mutationen wurde für Rektumkarzinome in der Literatur bisher nicht beschrieben. Für das Kolorektale Karzinom allerdings untersuchten bereits Edkins et al. zwei unterschiedliche Patientengruppen aus den Vereinigten Staaten sowie aus Hong Kong. Hierbei entdeckten die Autoren Codon-146-Mutationen bei zwei von 94 (2,1 %) bzw. bei sieben von 126 Patienten (5,5 %) (Edkins et al. 2006). Diese bereits für das Kolorektale Karzinom erhobenen Befunde und die Ergebnisse der jetzt hier vorliegenden Studie für das Rektumkarzinom zeigen, dass bei zukünftigen Projekten zu dieser Thematik ebenfalls nach Codon 61 und 146 Mutationen gesucht werden sollte.

KRAS-Mutationen beeinflussen das Therapieergebnis von Patienten, die mit einer anti-EGFR-Therapie behandelt wurden (Karapetis et al. 2008, Van Cutsem et al. 2009, Tol et al. 2009, Lurje et al. 2008) und führen möglicherweise zu einer erhöhten Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (Grana et al. 2002, Gupta et al. 2001). Für Patienten mit Rektumkarzinom, die eine Therapie aus präoperativer Radiochemotherapie und EGFR-Antikörpern wie Cetuximab bekamen, wurde keine Assoziation zwischen *KRAS*-Mutationen und Ansprechen auf Therapie festgestellt (Kim SY et al. 2010). Luna-Perez et al. beschrieben im Jahr 2000 einen Zusammenhang zwischen *KRAS*-Mutationen und längerem Gesamtüberleben sowie längerem krankheitsfreien Überleben für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom, die eine Radiochemotherapie ohne EGFR-Antikörper erhielten. Diese Daten wurden aus Tumorproben erhoben, die nach abgeschlossener neoadjuvanter Radiochemotherapie genommen wurden (Luna-Perez et al. 2000).

In der vorliegenden Studie wurden von den 94 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom erstmalig bereits vor Therapiebeginn Tumorproben zur Bestimmung des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus entnommen. Somit konnte der Einfluss der neoadjuvanten Radiochemotherapie als mögliche Störgröße eliminiert werden. Anhand der Biopsien und den Ergebnissen der histopathologischen Aufarbeitung der

Operationspräparate wurden die Parameter Tumorregressionsgrad, T-Level-Downsizing und -Downstaging bestimmt. Außerdem wurde der Versuch unternommen, diese Daten mit dem *KRAS*-Mutationsstatus in Korrelation zu setzen. Die klinischen Marker TRG, T-Level-Downsizing und -Downstaging wurden herangezogen, da sie eine Schlussfolgerung über das krankheitsfreie Überleben zulassen und eine Bewertung des Erfolgs der Radiochemotherapie ermöglichen (Rodel et al. 2005). Die Korrelation von mutiertem *KRAS* in Bezug auf den Wild-Typ war in Hinsicht auf die verwendeten Marker nicht signifikant. Nach Anwendung der Marker auf die einzelnen mutierten Codons wurde der Zusammenhang ebenfalls nicht signifikant. Somit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen KRAS-Mutationsstatus und Erfolg der Radiochemotherapie gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden erst kürzlich von Zauber et al. publiziert, die 53 Patienten untersuchten. Zwar wurden in dieser Arbeit nur Codon 12 und 13 untersucht und die präoperative Therapie dieser Patienten wich zudem geringfügig von der hier beschriebenen ab, doch entsprechen Zauber‘s Ergebnisse prinzipiell den hier erhobenen Daten (Zauber et al. 2009).

Eine erhöhte Kinaseaktivität und die damit verbundene Überaktivierung des Ras-Pathways wurde von Guerrero und anderen bereits wiederholt veröffentlicht (Bazan et al. 2002, Guerrero et al. 2000, Guerrero et al. 2002, Monticone et al., 2008). Dabei zeigte sich auch, dass es zu einer unterschiedlichen Aktivität in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Mutationen kommen kann, so dass die vorliegenden Daten in Hinblick auf den klinischen Verlauf untersucht wurden. Bei der Betrachtung der drei größten Gruppen, zwei Codon 12 Mutationen (G12D, G12V) und eine Codon 13 Mutation (G13D) wurde in dieser Studie eine Assoziation ($p = 0,052$) zwischen einem bestimmen Aminosäureaustausch und dem Tumorregressionsgrad festgestellt. Dieser Zusammenhang ist hauptsächlich den Unterschieden zwischen G12V und G13D ($p = 0,0124$) sowie zwischen dem Wild-Typ und G12V ($p=0,0399$) zuzuordnen. Dies lässt vermuten, dass Tumore, die G12V-Mutationen tragen, weniger Regression zeigen als solche mit G13D-Mutationen.

Aufgrund der Größe des untersuchten Patientenkollektivs müssen die erhobenen Daten vorsichtig interpretiert werden, legen aber aktuell die Vermutung nahe, dass G12V-Mutationen einen gegenüber Radiochemotherapie resistenteren Tumor darstellen. Dies ist gut mit den Ergebnissen der RASCAL-II-Studie zu vereinbaren, in der 3439 Patienten auf den *KRAS*-Status hin untersucht wurden. In der Multicenterstudie wurde eine Assoziation zwischen dem G12V-Subtyp und einem kürzeren krankheitsfreien sowie vermindertem Gesamtüberleben bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom der Dukes-Stadien B und C festgestellt (Andreyev et al. 2001).

Zusammenfassend sollte für *KRAS* festgehalten werden, dass bei zukünftigen Projekten zu *KRAS*-Mutationen in Rektumkarzinomen ebenfalls nach selteneren Mutationen gefahndet werden sollte. Die hier erstmalig festgestellte hohe Mutationsfrequenz der Codons 61 und 146 von zusammen 13,3 % aller gefundenen Mutationen offenbart diese Notwendigkeit. Weiterhin geht aus dieser Arbeit hervor, dass ein Zusammenhang zwischen dem Erfolg von Radiochemotherapie und dem Vorliegen bestimmter Mutationen bestehen könnte. Da auf Grund der Größe des Patientenkollektivs dazu aber kein statistisch signifikantes Ergebnis ermittelt werden konnte, sollte dieser Möglichkeit in einer größer angelegten Studie nachgegangen werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde erstmalig der Mutationsstatus von *BRAF* und *KRAS* in bereits vor Therapiebeginn entnommenen Biopsien bestimmt. Es wurde in der Analyse des *BRAF*-Gens keine der typischen V600E-Mutationen gefunden, lediglich eine G594N-Mutation. Dies lässt auf eine untergeordnete Relevanz von *BRAF*-Mutationen beim Rektumkarzinom und das Ansprechen auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie schließen. In dieser Studie wurden *KRAS*-Mutationen in Codon 12 und 13 in einer mit Kolonkarzinomen vergleichbaren Häufigkeit gefunden. Zusätzlich wurde aber erstmalig eine hohe Zahl von Mutationen in Codon 61 und 146 entdeckt, so dass diese Codons in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollten. Obwohl sich in diesen Daten bei keiner der Mutationen eine signifikante Assoziation mit dem Ansprechen auf Radiochemotherapie zeigte oder eine Aussage in Bezug auf Überleben beziehungsweise Rezidivbildung zuließ, war dennoch die Tendenz zu einer Korrelation der Subtypen G12V und G13D mit dem Ansprechen auf Radiochemotherapie feststellbar. Eine statistisch signifikante Assoziation könnte durch Analyse eines größeren Patientenkollektivs bewiesen werden.

6. Anhang: IUPAC code table

Nomenklaturregeln der International union of pure and applied chemistry

IUPAC code table: Aminosäuren

1-letter	3-letter	Beschreibung
A	Ala	Alanine
R	Arg	Arginine
N	Asn	Asparagine
D	Asp	Aspartic acid
C	Cys	Cysteine
Q	Gln	Glutamine
E	Glu	Glutamic acid
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
L	Leu	Leucine
K	Lys	Lysine
M	Met	Methionine
F	Phe	Phenylalanine
P	Pro	Proline
S	Ser	Serine
T	Thr	Threonine
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosine
V	Val	Valine
B	Asx	Aspartic acid or Asparagine
Z	Glx	Glutamine or Glutamic acid
X	Xaa	Any amino acid

IUPAC code table: Nukleinsäuren

Code	Beschreibung
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
U	Uracil
R	Purine (A or G)
Y	Pyrimidine (C, T, or U)
M	C or A
K	T, U, or G
W	T, U, or A
S	C or G
B	C, T, U, or G (not A)
D	A, T, U, or G (not C)
H	A, T, U, or C (not G)
V	A, C, or G (not T, not U)
N	Any base (A, C, G, T, or U)

7. Literaturverzeichnis

1. Amado R, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman D, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson S, Chang D (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26, 1626-34

2. Andreyev H, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N (2001): Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. Br J Cancer 85, 692-6

3. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, La Farina M, Albanese I, Dardanoni G, Salerno S (2002): Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. Ann Oncol 13, 1438-46

4. Bosman FT, Yan P, Tejpar S, Fiocca R, Van Cutsem E, Kennedy RD, Dietrich D, Roth A (2009): Tissue biomarker development in a multicentre trial context: a feasibility study on the PETACC3 stage II and III colon cancer adjuvant treatment trial. Clin Cancer Res 15, 5528-33

5. Boyle P, Langman JS (2000): ABC of colorectal cancer: Epidemiology. BMJ 321, 805-8

6. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2003): K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. Carcinogenesis 24, 703-10

7. Cerottini JP, Caplin S, Pampallona S, Givel JC (1999): Prognostic factors in colorectal cancer. Oncol Rep 6, 409-14

8. Cespedes MV, Sancho FJ, Guerrero S, Parreno M, Casanova I, Pavon MA, Marcuello E, Trias M, Cascante M, Capella G, (2006): K-ras Asp12 mutant

neither interacts with Raf, nor signals through Erk and is less tumorigenic than K-ras Val12. Carcinogenesis 27, 2190-200

9. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417, 949-54.

10. Debucquoy A, Haustermans K, Daemen A, Aydin S, Libbrecht L, Gevaert O, De Moor B, Tejpar S, McBride WH, Penninckx F (2009): Molecular response to cetuximab and efficacy of preoperative cetuximab-based chemoradiation in rectal cancer. J Clin Oncol 27, 2751-7

11. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, (2008): Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26, 5705-12

12. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997): Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. Int J Colorectal Dis 12, 19-23.

13. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, Greenman C, Davies H, Dalgliesh G, Forbes S, (2006): Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther 5, 928-32

14. Feig LA, Cooper GM (1988): Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. Mol Cell Biol 8, 2472-8

15. Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P (2004): Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. Carcinogenesis 25, 527-33

16. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S (2004): Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. Clin Cancer Res 10, 4015-21

17. Fremin C, Meloche S (2010): From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. J Hematol Oncol 3, 8

18. Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C, Wolff HA, Herrmann MK, Beissbarth T, Becker H, Ried T, Ghadimi M (2010): KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. Radiother Oncol 94, 76-81

19. Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, Sartor CI, Cox AD (2002): Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways. Cancer Res 62, 4142-50

20. Guerrero S, Casanova I, Farre L, Mazo A, Capella G, Mangues R (2000): K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. Cancer Res 60, 6750-6

21. Guerrero S, Figueras A, Casanova I, Farre L, Lloveras B, Capella G, Trias M, Mangues R (2002): Codon 12 and codon 13 mutations at the K-ras gene induce different soft tissue sarcoma types in nude mice. FASEB J 16, 1642-4

22. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Cheng Y, Bernhard EJ, Muschel RJ, McKenna WG (2001): The Ras radiation resistance pathway. Cancer Res 61, 4278-82

23. Haggar FA, Boushey RP (2009): Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 22, 191-7

24. Horisberger K, Treschl A, Mai S, Barreto-Miranda M, Kienle P, Strobel P, Erben P, Woernle C, Dinter D, Kahler G, Hochhaus A (2009): Cetuximab in Combination with Capecitabine, Irinotecan, and Radiotherapy for Patients with Locally Advanced Rectal Cancer: Results of a Phase II MARGIT Trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 74, 1487-93

25. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J (1999): Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene 18, 813-22

26. Janout V, Kollarova H (2001): Epidemiology of colorectal cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 145, 5-10

27. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ (2003): Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin 53, 5-26.

28. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH (2001): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. N Engl J Med 345, 638-46

29. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S (2008): K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 359, 1757-65

30. Karnoub AE, Weinberg RA (2008): Ras oncogenes: split personalities. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 517-31

31. Kim JC, Cho YK, Roh SA, Yu CS, Gong G, Jang SJ, Kim SY, Kim YS (2008): Individual tumorigenesis pathways of sporadic colorectal adenocarcinomas are associated with the biological behavior of tumors. Cancer Sci 99, 1348-54

32. Kim SY, Hong YS, Kim DY, Kim TW, Kim JH, Im SA, Lee KS, Yun T, Jeong SY, Choi HS, Lim SB (2010) Preoperative Chemoradiation with Cetuximab, Irinotecan, and Capecitabine in Patients with Locally Advanced Resectable Rectal Cancer: A Multicenter Phase II Study. Int J Radiat Oncol Biol Phys 81, 677-83

33. Labianca R, Beretta GD, Mosconi S, Milesi L, Pessi MA (2005): Colorectal cancer: screening. Ann Oncol 16 Suppl 2, 127-32

34. Lamberti C, Di Blasi K, Archut D, Fimmers R, Mathiak M, Bollmann M, Vogel J, Kindermann D, Mezger J, Schmidt-Wolf IG, (2005): Population-based registration of unselected colorectal cancer patients: five-year survival in the region of Bonn/Rhine-Sieg, Germany. Z Gastroenterol 43, 149-54

35. Li FY, Lai MD (2009): Colorectal cancer, one entity or three. J Zhejiang Univ Sci B 10:219-29

36. Liang H, Hao XS, Wang XN, Li JW, Wang JC, Wang DC (2004): Analysis of prognostic factors of rectal cancer in the elderly. Ai Zheng 23, 299-302

37. Luna-Perez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payan H, Quintero A (2000): Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. Ann Surg Oncol 7, 727-31

38. Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA, El-Khoueiry A, Husain H, Wilson PM, Ladner RD (2008): Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. Clin Cancer Res 14, 7884-95

39. Monticone M, Biollo E, Maffei M, Donadini A, Romeo F, Storlazzi CT, Giaretti W, Castagnola P (2008): Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. Mol Cancer 7, 92

40. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, Cooke JC, Luben RN, Ball RY, McTaggart A, Arends MJ, Rodwell SA (2010): Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with BRAF and K-ras mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study. BMC Cancer 10, 99

41. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature 418, 934

42. Rodel C, Sauer R (2007): Integration of novel agents into combined-modality treatment for rectal cancer patients. Strahlenther Onkol 183, 227-35

43. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Hohenberger W, Schmoll HJ, Sauer R (2003): Phase I/II trial of capecitabine, oxaliplatin, and radiation for rectal cancer. J Clin Oncol 21, 3098-104

44. Rodel C, Martus P, Papadoupolos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R (2005): Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. J Clin Oncol 23, 8688-96

45. Rozen S, Skaletsky H (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132, 365-86

46. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. N Engl J Med 351, 1731-40

47. Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A (2008) S3-Leitlinienkonferenz Kolorektales Karzinom. Z Gastroenterol 46, 1-73

48. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K (2007): Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 18654-9

49. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, Edwards S, Caan BJ, Samowitz W (2009): A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. Dis Colon Rectum 52, 1304-11

50. Thomschke D, Kyau-Ummen B, Halbfass HJ (2002) Local recurrence and survival rate after rectal cancer operations and multimodal therapy. Chirurg 73, 245-54

51. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groeningen CJ, Sinnige HA (2009): Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 360, 563-72

52. UICC = Wittekind CH, Meyer HJ, Bootz F: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage; Springer, Berlin 2002

53. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G (2009): Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 360, 1408-17

54. Velenik V, Oblak I, Anderluh F (2010): Long-term results from a randomized phase II trial of neoadjuvant combined-modality therapy for locally advanced rectal cancer. Radiat Oncol 5, 88

55. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell 116, 855-67

56. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN (2003): BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. Cancer Res 63, 5209-12

57. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D (2006): CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet 38, 787-93

58. Worthley DL, Leggett BA (2010): Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. Clin Biochem Rev 31, 31-8

59. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS (2002): Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. Cancer Res 62, 6451-5.

60. Zauber NP, Marotta SP, Berman E, Grann A, Rao M, Komati N, Ribiero K, Bishop DT (2009): Molecular genetic changes associated with colorectal carcinogenesis are not prognostic for tumor regression following preoperative chemoradiation of rectal carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 74, 472-6

8. Abbildungsnachweis

Abbildung	Darstellung
Abbildung 1 S. 11	Strahlentherapieplan
Abbildung 2 S. 12	Kaplan-Meier Kurve zum Krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben
Abbildung 3 S. 14	Schema des MAP-Kinase Pathways
Abbildung 4 S. 15	Mutationen im MAPK-Pathway in humanen Krebserkrankungen
Abbildung 5 S. 20	CAO / ARO / AIO – 94 Schema
Abbildung 6 S.21	CAO / ARO / AIO – 04 Schema
Abbildung 7 S. 30	Prinzip der Gelelektrophorese
Abbildung 8 S. 32	Fotografische Ergebnisdokumentation der Gelelektrophorese
Abbildung 9 S. 36	Auswertungssoftware STADEN
Abbildung 10 S. 45	Kaplan-Meier-Kurve

Lebenslauf

Ich wurde am 23.06.1985 als Sohn von Dr. Ulrich Obermeyer und Dr. Sigrid Obermeyer in Osnabrück geboren. In den Jahren 1990 – 1995 besuchte ich die Grundschule St. Martin in meinem Heimatort Hagen a.T.W. und die Orientierungsstufe Hagen a.T.W. in den Jahren 1995 – 1997. Im Anschluss wechselte ich auf das Gymnasium Oesede in Georgsmarienhütte, wo ich im Jahr 2004 meine Abiturprüfung mit der Durchschnittsnote 1,8 ablegte. Dort erwarb ich auch das kleine Latinum und beteiligte mich an vielen aussercurriculären Projekten.

Meinen Zivildienst leistete ich im direkten Anschluss an mein Abitur in der OP-Abteilung des Franziskushospitals Harderberg ab, wo ich, in meinem Bestreben, Arzt zu werden, bestätigt wurde.

Im Sommersemester 2005 begann ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Parallel zum Studium absolvierte ich in den Semesterferien eine Ausbildung zum Rettungssanitäter und arbeitete insgesamt 3 ½ Jahre als studentische Intensivpflegekraft im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen. Nach Regelstudienzeit schloss ich im Mai 2011 mein Studium mit der Gesamtnote „gut“ ab.

In den Jahren 2008 und 2009 engagierte ich mich ehrenamtlich, von der Stabsstelle für Transplantationskoordination der UMG unterstützt, für das Thema Organspende. Mit einem Studienfreund zusammen organisierte ich zwei Podiumsdiskussionen sowie kleinere Veranstaltungen. Weiterhin arbeitete ich zusammen mit Ralf Werner von der Stabsstelle und in Kooperation mit der Deutschen Stiftung Organtransplantation ein Konzept zur Optimierung des Organspendeprozesses an der UMG aus.

Im Juni 2008 begann ich in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen meine Doktorarbeit mit dem Thema „*BRAF*- und *KRAS*-Mutationen im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom“ unter der Betreuung von Prof. Dr. B. Michael Ghadimi und Dr. med. Jochen Gaedcke. Seit dem 15. September 2011 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen.