

Diplomarbeit

***K-RAS* Mutationsstatus und Prognose
beim kolorektalen Karzinom**

eingereicht von
Anne-Katrin Harb
Geb.Dat.: 30.04.1989

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der
Universitätsklinik für Innere Medizin
Abteilung für klinische Onkologie

unter der Anleitung der Betreuer

Mag. Dr. Martin Pichler

Ass. Prof. PD Dr. Armin Gerger

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 23.03.2013

Anne-Katrin Harb

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen beiden Betreuern, Herrn Ass. Prof. PD Dr. Armin Gerger und Herrn Mag. Dr. Martin Pichler, großen Dank für die Möglichkeit meine Diplomarbeit auf der Onkologischen Abteilung des Universitätsklinikum Graz zu verfassen, aussprechen. Bei Herrn Mag. Dr. Martin Pichler möchte ich mich ganz besonders für die unermüdliche und vor allem rasche Unterstützung und Hilfestellung bei all meinen Fragen und Problemen bedanken. Sein Engagement hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern. Ihr habt mich Zeit meines Lebens immer unterstützt, gefördert und seid mir auch in schwierigen Zeiten zur Seite gestanden.

Euer emotionaler, ideeller und finanzieller Rückhalt war mir auf meinem Weg immer sicher und hat mir mein Leben so wie es ist, ermöglicht.

Zusammenfassung

Einleitung Das kolorektale Karzinom ist der dritthäufigste bösartige Tumor weltweit. Die Grundlagen der Entstehung finden sich dabei in genetischen Veränderungen von bestimmten Genen, welche dem klassischen Weg nach vom gutartigen Adenom zum bösartigen Karzinom führt. Dabei spielt in dieser Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms das *K-RAS* Onkogen eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren hat der *K-RAS* Mutationsstatus immer mehr an Bedeutung als prädiktiver Marker für die Therapie bei kolorektalem Karzinom gewonnen. Hinsichtlich des Stellenwertes auf die Prognoseeinschätzung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte allerdings, vor allem bei kleineren Studien, noch kein einheitliches Ergebnis erzielt werden.

Methoden In die vorliegende retrospektive Studie haben wir 643 Patienten, welche am LKH Graz, LKH Fürstenfeld und LKH Leoben behandelt wurden, eingeschlossen. Voraussetzung waren die Möglichkeit der Datenerhebung über das Krankenhausinformationssystem MEDOCS betreffend den *K-RAS* Status, sowie Angaben zu folgenden klinischen Parametern: Geschlecht, Behandlungszentrum, Tumorlokalisation, Grading und TNM Stadium. Ziel der Studie war es, mittels statistischer Analysen, Unterschiede hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens bei Patienten mit und ohne *K-RAS* Mutation und Assoziationen von klinischen Parametern zu untersuchen.

Ergebnisse Bezüglich der Assoziationen zwischen *K-RAS* Status und klinischen Parametern wurden für die Gruppe der Tumorlokalisation signifikante Unterschiede nachgewiesen ($p < 0.05$). *K-RAS* Wildtyp zeigte sich gehäuft bei Sigmakarzinomen, wohin gehend im Caecum ein niedriger Anteil an *K-RAS* Wildtyp anzutreffen war. Im Caecum zeigte sich eine Häufung an Codon 13 Mutationen ($p < 0.05$). Mittels Kaplan-Meier-Kurven und Log Rank Test wurde die Hypothese, dass der *K-RAS* Status Einfluss auf das krebsspezifische Überleben hat, abgelehnt. Signifikante Unterschiede im Überleben zeigten sich jedoch für verschiedene Tumorlokalisationen und erwartungsgemäß auch bei den bekannten Prognosefaktoren Grading, sowie T- und M-Stadium. Die abschließende Prüfung der Variablen auf deren unabhängigen prognostischen Stellenwertes mittels multivariater Cox Analyse bestätigte dies für Grading, T- und M-Stadium ($p < 0.05$).

Schlussfolgerung Häufigeres Auftreten von *K-RAS* Mutationen im proximalen Kolon bestätigt die Ergebnisse von anderen kleineren Studien wieder. Unsere Daten weisen darauf hin, dass der *K-RAS* Mutationsstatus keinen prognostischen Stellenwert in unserer Kohorte besitzt.

Abstract

Introduction Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide. CRC pathogenesis is driven by underlying genetic alterations in tumor promoting and suppressing genes. In this context, the *K-RAS* oncogene plays an important role in the adenoma-carcinoma-sequence of CRC pathogenesis. Currently, determining the *K-RAS* mutational status is important with regard to assessment of therapy response in CRC patients. However, the influence of different *K-RAS* gene mutations on prognosis of CRC patients has been controversially reported so far.

Methods We included 643 CRC patients, who were treated at the LKH Graz, LKH Fürstenfeld and LKH Leoben between 2005 and 2012. Inclusion criteria in our retrospective evaluations were data about *K-RAS* status and the following clinico-pathological parameters: gender, treatment centre, tumor location, grading and TNM classification. Kaplan-Meier curves, univariate and multivariate Cox proportional analysis were applied to investigate differences in cancer-specific survival between patients with and without *K-RAS* mutations and associations of clinical parameters by means of statistical analysis.

Results A statistically significant association ($p < 0.05$) between tumor location and *K-RAS* mutational subtype could be detected. In more detail, *K-RAS* wild-type occurs more frequently in tumors of the sigma. By contrast, a lower percentage of KRAS wild-type was seen in the caecum. In addition, we found codon 13 mutations more frequently located in the caecum. For all other clinico-pathological parameters no statistically significant association to the *K-RAS* status could be identified. By applying Kaplan-Meier curves and the log-rank test, we found no survival difference between *K-RAS* wild-type and *K-RAS* mutations ($p = 0.316$). In our study cohort, we detected significant differences in survival for different tumor locations, for grading, T-stage and M-stage. Finally, we proved grading, T- and M-stage as independent poor prognostic parameters by using multivariate Cox proportional analysis.

Conclusion *K-RAS* mutations are more frequently found in proximal located CRC, which is in line with some previously reported studies. According to our data, no survival difference between patients with *K-RAS* wild-type and *K-RAS* mutations exists.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. Epidemiologie	1
2. Klassifikation	2
2.1 Anatomische Definitionen	2
2.2 Makroskopische Tumorformen	2
2.3 Histologische Tumorformen	3
2.4 WHO Grading	3
2.5 TNM Klassifikation	3
2.6 UICC Stadieneinteilung	5
3. Klinik und Diagnostik	5
3.1 Klinische Symptome	5
3.2 Klinische Diagnose	5
4. Therapie	6
4.1 Chirurgische Resektion	6
4.2 Konservative Therapie	8
5. Ätiologie	8
5.1 Umweltfaktoren	9
5.2 Genetische Risikofaktoren - hereditäre kolorektale Karzinome	11
5.2.2 Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)	12
5.2.3 Turcot-Syndrom	13
5.2.4 Muir-Torre-Syndrom	13
6. Pathogenese-Molekularbiologie	13
6.1 Die Chromosomale Instabilität (CIN)	14
6.1.1 Das APC-Tumorsuppressorgen und der APC/WNT/ β -catenin Signalweg	16
6.1.2 Das Tumorsuppressorgen <i>P53</i>	17
6.1.3 Verlust der Heterozygotie (LOH) im Chromosom 18q	18
6.2 Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	19
6.3 Die verstärkte Methylierung von CpG-Inseln der DNA	20
7. <i>K-RAS</i> Onkogen	21
7.1 Die Aufgabe der RAS - Proteine	21
7.2 Das <i>K-RAS</i> Gen und der RAS/RAF/MAPK Signalweg	25

7.2.1 Der PI3K/AKT Signalweg	28
7.3 <i>K-RAS</i> und Therapie	30
7.3.1 EGFR Antagonisten	30
7.3.2 RAS und die Farnesyltransferaseinhibitoren	33
7.4 <i>K-RAS</i> und Diagnose	35
7.5 <i>K-RAS</i> und Prognose	37
II. MATERIAL UND METHODEN	45
1. Studienkollektiv	45
2. Statistische Auswertung	46
III. ERGEBNISSE	48
1. Patientendaten	48
2. Assoziation zwischen <i>K-RAS</i> Status und anderen Variablen	50
3. Unterschiede im krebspezifischen Überleben zwischen verschiedenen Parametern	51
3.1 Geschlecht	52
3.2 <i>K-RAS</i> Status	53
3.3 Tumorlokalisation	56
3.4 Grading	57
3.5 T-Stadium	58
3.6 M-Stadium	59
4. Variablen als unabhängige ungünstige prognostische Faktoren	60
IV. DISKUSSION	61
Schlussfolgerung	65
V. LITERATURVERZEICHNIS	66

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. GEGENÜBERSTELLUNG DER TNM- UND DUKES KLASSIFIKATION, SOWIE DER UICC STADIENEINTEILUNG	4
ABBILDUNG 2. HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER ÄTIOLOGIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS	9
ABBILDUNG 3. ZEITLICHE ABFOLGE DER HISTOLOGISCHEN UND GENETISCHEN VERÄNDERUNGEN IM RAHMEN DER ADENOM-KARZINOM SEQUENZ	15
ABBILDUNG 4. MODIFIZIERUNG UND AKTIVIERUNG VON <i>K-RAS</i>	23
ABBILDUNG 5. DER RAS/RAF/MAPK SIGNALWEG	26
ABBILDUNG 6. DIE BINDUNG VON EGF AN EGFR UND DIE DAMIT AUSGELÖSTEN SIGNALKASKADEN	28
ABBILDUNG 7. ANGRIFFSSTELLEN UND WIRKUNGEN DER <i>EGFR</i> ANTAGONISTEN	31
ABBILDUNG 8. HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES <i>K-RAS</i> STATUS	48
ABBILDUNG 9. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR KREBSSPEZIFISCHES ÜBERLEBEN BEZOGEN AUF DAS GESCHLECHT	52
ABBILDUNG 10. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM <i>K-RAS</i> -MUTATIONSSTATUS ENTSPRECHEND (ALL PARTICULAR <i>K-RAS</i> MUTATIONS)	53
ABBILDUNG 11. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM <i>K-RAS</i> -MUTATIONSSTATUS ENTSPRECHEND (WT VERSUS CODON 12 VERSUS CODON 13)	54
ABBILDUNG 12. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM <i>K-RAS</i> -MUTATIONSSTATUS ENTSPRECHEND (WT VERSUS MUTATIONS)	55
ABBILDUNG 13. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DER TUMORLOKALISATION ENTSPRECHEND	56
ABBILDUNG 14. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM TUMORGRADING ENTSPRECHEND	57
ABBILDUNG 15. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM T-STADIUM ENTSPRECHEND	58
ABBILDUNG 16. KAPLAN-MEIER KURVE FÜR PATIENTEN GRUPPIERT DEM M-STADIUM ENTSPRECHEND	59

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES <i>K-RAS</i> STATUS BEZOGEN AUF VERSCHIEDENE VARIABLEN	51
TABELLE 2. MULTIVARIATE COX ANALYSE BEZOGEN AUF DAS KREBSSPEZIFISCHE ÜBERLEBEN	60

Anmerkung: Im Hinblick auf eine bessere Lesbarkeit des Textes wurde auf die durchgehende Anführung der weiblichen Formen und Endungen verzichtet. Es findet die gebräuchliche maskuline Bezeichnung Anwendung. Sinngemäß werden in einem solchen Fall jedoch stets beide Geschlechter erfasst.

I. EINLEITUNG

Um ein besseres Verständnis für die gesellschaftliche Bedeutung und die Komplexität der genetischen Grundlagen des kolorektalen Karzinoms zu erlangen, wird in den folgenden Kapiteln auf die Epidemiologie, die Ätiologie, die Pathogenese, den Verlauf und die Therapie kurz eingegangen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt jedoch in der Evaluierung der prognostischen Bedeutung bezogen auf das krebsspezifische Überleben bei Vorhandensein einer *K-RAS*-Mutation bzw. der Bedeutung der unterschiedlichen *K-RAS*-Mutationssubtypen im Kodon 12 und 13 des Exons 2.

1. Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz von Krebs befindet sich stetig im Steigen. 2008 wurde die Anzahl der Erkrankten auf 12,7 Millionen geschätzt, wobei sich die Mortalität in diesem Jahr bereits auf 7,6 Millionen belief (1).

Das kolorektale Karzinom, der häufigste gastrointestinale Tumor, belegt in der Rangliste der häufigsten Tumore weltweit den 3. Platz (2).

2008 lag die Zahl der Neuerkrankungen weltweit bei 1,2 Millionen und die Anzahl der Todesfälle wurde auf 608.700 geschätzt.

Bezogen auf das Geschlecht stellt es bei Männern nach dem Lungen- und dem Prostatakarzinom, das dritthäufigste Karzinom, bei Frauen nach dem Brustkrebs gar schon die zweithäufigste Tumorentität dar.

Global gegliedert, findet sich die höchste Inzidenz in Australien, Neuseeland, Europa und Nordamerika, die niedrigste hingegen in Afrika und in Süd-Zentralasien (1).

Die Ursache der unterschiedlichen Inzidenzen weltweit ist nicht bekannt (3).

Erwähnenswert ist, dass, obwohl sich weltweit ein hoher Anstieg der Inzidenz zeigt, in Ländern wie z.B. Deutschland die Neuerkrankungsrate allerdings in den letzten Jahren bereits konstant bleibt und die Mortalität seit Jahren sogar rückläufig ist (4).

In Österreich lag die Anzahl der Todesfälle im Jahre 2010 bei 2.146. Die Inzidenz belief sich in diesem Jahr auf insgesamt 4.496 Neuerkrankungen, davon 2.481 Männer und 2.015 Frauen (5).

Nicht nur in Österreich, auch weltweit zeigt sich bei Männern durchgehend eine höhere Prävalenz (1).

Da das sporadische kolorektale Karzinom meist bei Patienten über dem 50. Lebensjahr diagnostiziert wird, wird es zu den Karzinomen des älteren Menschen gezählt (6).

In Deutschland liegt der Häufigkeitsgipfel bei Männern bei 69 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren (4).

Man geht von einem Lebenszeitrisiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, von 5-6 % aus (7). Das Risiko daran zu versterben beträgt in der westlichen Welt 2,7-2,8 Prozent (4).

2. Klassifikation

2.1 Anatomische Definitionen

Anatomisch gesehen erstreckt sich das Kolorektum vom Caecum bis zum Analkanal und wird in Colon, Appendix vermiformis und Rektum eingeteilt. Das Colon umfasst das Colon ascendens, das Colon transversum, das Colon descendens und das Colon sigmoideum, welches fließend in das Rektum übergeht, ungefähr 12-15 cm oral der Linea dentata (8).

2.2 Makroskopische Tumorformen

Auf Grund ihres makroskopischen Wachstums können kolorektale Karzinome in folgende Tumorformen unterteilt werden:

- schüsselförmig ulzeriertes Karzinom (55-60%)
- polypös-blumenkohlartiges Karzinom (25%)
- plattenartiges Karzinom (15-20%)
- diffus-infiltrierendes (szirrhöses) Karzinom (1%) (4)

2.3 Histologische Tumorformen

Im Rahmen der WHO-Klassifizierung lassen sich histologisch folgende kolorektale Tumortypen unterscheiden:

- Adenokarzinom (~ 90%)
- muzinöses Adenokarzinom (~ 10%)
- Siegelringzellkarzinom
- Plattenepithelkarzinom
- adenosquamöses Karzinom (Mischtyp aus Adeno- und Plattenepithelkarzinom)
- kleinzelliges Karzinom
- undifferenziertes Karzinom (6)

2.4 WHO Grading

Die am weitest verbreitete Einteilung der Differenzierungsgrade des kolorektalen Karzinoms basiert auf dem Differenzierungsgrad der Drüsen und folgt dem Grading-System der WHO:

- G1: gut differenziert
- G2: mäßiggradig differenziert
- G3: schlecht differenziert
- G4: undifferenzierte und kleinzellige Karzinome (6)

Gebräuchlich ist auch die Unterteilung, bei der G1 und G2 zur ‚Low-Grade‘-Kategorie sowie G3 und G4 zur ‚High-Grade-Kategorie‘ zusammengefasst werden (9).

2.5 TNM Klassifikation

Für die Stadieneinteilung (Staging), mit deren Hilfe auch prognostische Aussagen getroffen werden können, wird im klinischen sowie im pathologischen Gebrauch die TNM Klassifikation verwendet.

Die Tumor (T), Node (N) und Metastasis (M) Klassifikation basiert auf der Tiefe der Invasion der Tumorzellen in die Darmschleimhaut, auf der Anzahl der positiven Lymphknoten und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (10).

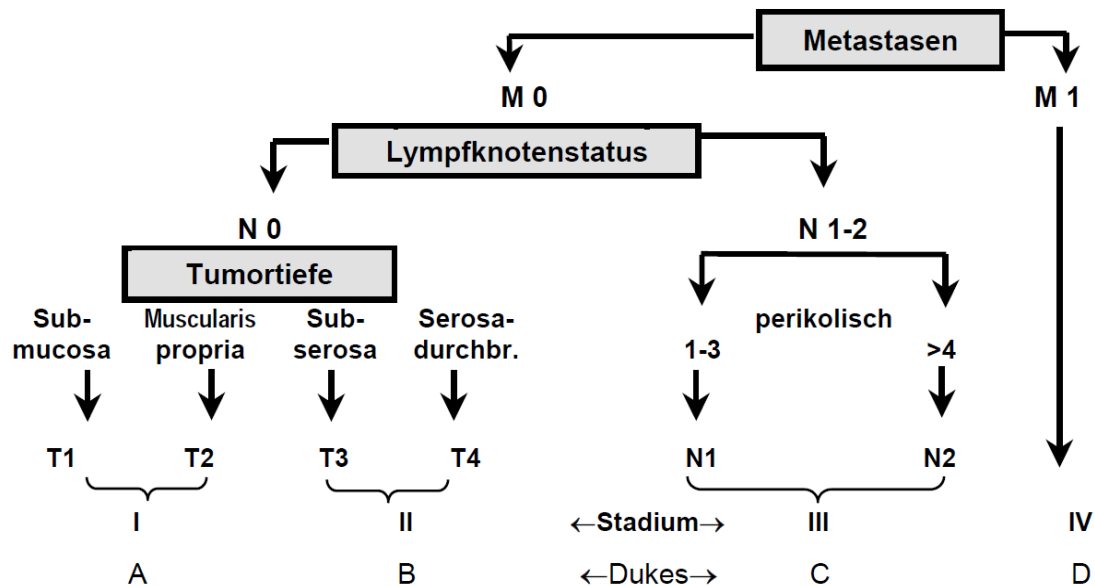


Abbildung 1. Gegenüberstellung der TNM- und Dukes Klassifikation, sowie der UICC Stadieneinteilung (11).

Die erste Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms wurde bereits 1931 von Dukes eingeführt und hat nach einigen weiteren Modifizierungen in ihren Grundzügen noch immer Gültigkeit (4).

Die am häufigsten verwendete Fassung der Dukes Klassifikation ist die Astler-Coller Modifizierung. Auf Grund der mittlerweile differenzierten Therapie kolorektaler Karzinome konnten auch die Erweiterungen der Dukes Klassifikation den Anspruch auf weitere Differenzierung nicht Rechnung tragen. Die TNM Klassifikation löste die Klassifikation von Duke somit vollständig ab (12).

2.6 UICC Stadieneinteilung

Für die pathologische Stadieneinteilung (Staging) wird die UICC-Stadieneinteilung (Union International Contre le Cancer) verwendet, welche auf der TNM Klassifikation basiert. Die Einteilung beinhaltet vier Erkrankungsstadien, welche auf den Komponenten Tumorgröße, Lymphknoten- und Fernmetastasen beruht (9).

3. Klinik und Diagnostik

3.1 Klinische Symptome

Die klinischen Beschwerden, welche kolorektale Karzinome hervorrufen können, sind meist unspezifisch und zeigen sich mit schleichendem Beginn oft erst in fortgeschrittenen Tumorstadien. Auf Grund unterschiedlicher Lokalisation des Tumors können die klinischen Symptome ebenfalls sehr unterschiedlich sein (7, 9).

Die meisten Patienten zeigen eine perianale Blutung, entweder makroskopisch oder mikroskopisch, die leicht als Hämorrhoidalblutung miss gedeutet werden kann (6). Häufig wird auch die einer Blutung folgende Anämie, die zu Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Kurzatmigkeit führt, beobachtet. Unspezifische Veränderungen der Stuhlgewohnheiten mit Phasen der Obstipation und Diarrhöe zählen ebenfalls zu den häufigen klinischen Erscheinungsbildern. Des Weiteren können kolorektale Karzinome Auslöser für Tenesmen mit Stuhl- und Blutabgang und unwillkürlichen Stuhl- und Windabgang sein. Allgemeine Tumorsymptome wie Gewichtsverlust und Anorexie oder Beschwerden durch Metastasen zeigen sich meist später im Krankheitsverlauf (7, 9).

3.2 Klinische Diagnose

Der überwiegende Teil kolorektaler Karzinome wird, trotz vorhandener effektiver und ökonomischer Screening Verfahren, noch immer erst nach Auftreten erster Symptome diagnostiziert (13). Eine frühe Diagnose vor Auftreten der Beschwerden gelingt nur mittels Nachweis von okkultem Blut im Stuhl und der Koloskopie.

Bei Verdacht auf ein kolorektales Karzinom folgt nach Erhebung einer gründlichen Anamnese die körperliche Untersuchung bei der im Falle einer großen Tumormasse eine Palpation des Abdomens bei der Diagnosestellung hilfreich sein kann.

Die Koloskopie nimmt bei der Diagnostik einen wichtigen Platz ein und wird immer komplett bis ins proximale Colon durchgeführt, um neben bioptischer Diagnosesicherung die Tumorlokalisierung und eventuell vorhandene Zweitkarzinome zu diagnostizieren.

Beim Rektumkarzinom kommt, neben der digitalen Austastung, auch die starre Rektoskopie zum Einsatz um den Tumorunterrand zur Anokutanlinie bestimmen zu können. Darüber hinaus sollte bei rektalen Karzinomen eine Endosonographie zur Einschätzung der Infiltrationstiefe und des regionalen Lymphknotenstatus eingesetzt werden (4, 9).

Tumormarker wie das Carcinoembryonale Antigen (CEA) haben nur in der Verlaufskontrolle einen Stellenwert, nicht jedoch fürs Screening oder die primäre Diagnostik (14).

Die Abklärung möglicher Metastasen und organüberschreitendem Wachstum für das Staging wird mittels Röntgen-Thorax und Sonographie des Abdomens durchgeführt und bei unklarem Befund durch CT-Abdomen oder CT-Thorax ergänzt (9).

4. Therapie

4.1 Chirurgische Resektion

Die einzige kurative Therapie des kolorektalen Karzinoms stellt die radikale Tumoresektion dar, bei der die En-bloc-Entnahme des Tumors, eine partielle oder totale Entfernung des Mesorektums, sowie die Entfernung seiner Lymphabflusswege erfolgt.

Eine solche R0-Resektion kann bei etwa 70-80% der Patienten durchgeführt werden.

Bei der Bestimmung des Resektionsausmaßes gilt bezüglich der intramuralen Tumorausbreitung ein Sicherheitsabstand von 2 cm als ausreichend. Da sich Lymphknotenmetastasen jedoch auch noch in bis zu 10 cm Abstand finden können, geben

vor allem die Lymphadenektomie bzw. deren Durchblutung das Ausmaß der Resektion vor.

Im Hinblick auf das Rektumkarzinom ist die extramurale Ausbreitung in das Mesorektum ausschlaggebend für den Resektionsrand, da diese in jenem Fall mikroskopisch weitreichender ist (4, 6).

Die typischen Resektionsverfahren des kolorektalen Karzinoms sind abhängig von der Lokalisation des Tumors:

- Hemikolektomie rechts: Caecum und Colon ascendens
- Transversumresektion: Colon transversum
- Hemikolektomie links: linke Flexur und Colon descendens
- Sigmaresektion: proximales und mittleres Drittel Colon sigmoideum

Ist der Tumor nur auf die Mukosa beschränkt, ist auch eine rein endoskopische Mukosaresektion möglich (6).

Eine Kontinenz-erhaltende Operation ist anzustreben, dies setzt allerdings voraus, dass bei rektalen Karzinomen ein Sicherheitsabstand zum Anus von mindestens 2 cm eingehalten werden kann. Ist dies nicht möglich muss auch der Analkanal inklusive Sphinktermuskulatur mitentfernt werden. Bei dieser abdominoperinealen Rektumexstirpation muss der Anus danach blind verschlossen werden und eine permanente Kolostomie angelegt werden (4, 6, 7, 15).

Sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vorhanden, so ist auch die chirurgische Entfernung von einzelnen Leber- oder Lungenmetastasen indiziert, wenn der Primärtumor radikal reseziert werden konnte und auch die Metastasen vollständig resektabel sind. Nach heutigem Stand des praktischen Vorgehens wird bei synchroner hepataler Metastasierung zuerst, falls möglich, die Resektion der Metastasen („liver-first concept“) durchgeführt, und erst danach die Resektion des Primärtumor. Sowohl vor einer Metastasektomie, als auch danach wird eine perioperative Chemo-Immuntherapie durchgeführt (4, 6, 7, 15).

Fortgeschrittene Rektumkarzinome, welche nicht mehr resektabel sind, erfordern entweder einen Anus praeter oder man erhält die Darmpassage mittels ablativen Verfahren bzw. einem Stent aufrecht (7).

4.2 Konservative Therapie

Um die Lokalrezidivrate zu senken hat sich beim Rektumkarzinom die neoadjuvante Radiochemotherapie (RCT) in den UICC Stadien II und III bewährt. Diese kann eventuell auch eine sphinktererhaltende Operation ermöglichen.

Eine postoperative adjuvante Chemotherapie wird in Stadium III ebenfalls routinemäßig durchgeführt.

Beim Kolonkarzinom wird an die radikale chirurgische Entfernung in „No-Touch-Technik“ eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II mit Risikofaktoren und Stadium III angeschlossen (16).

Im Stadium IV des kolorektalen Karzinoms muss individuell und interdisziplinär ein palliatives Therapieschema erstellt werden, welches die Symptome der Folgen und Komplikationen des fortgeschrittenen lokalen Tumors und die der Fernmetastasierung bekämpft. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass in manchen Fällen auch im metastasierten Stadium über operative Verfahren in Kombination mit Chemo-Immuntherapie eine kurative Situation ermöglicht werden kann (16).

5. Ätiologie

Hinsichtlich der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms gibt es mehrere Theorien, jedoch noch einige Unklarheiten die noch weiter aufgeklärt werden müssen..

Bekannt ist auf jeden Fall, dass an der Entstehung sowohl genetische als auch Umweltfaktoren beteiligt sind. Man geht davon aus, dass die Genetik den größten Einfluss auf das Risiko hat, ein kleiner Anteil von mindestens 5 % aller kolorektalen Tumore ist sogar monogenetisch determiniert (7).

Die Erforschung dieser sogenannten hereditären Tumore hat stark dazu beigetragen, Wege der Entstehung sporadischer kolorektaler Karzinome zu verstehen (3).

Prinzipiell kann man die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms, wie in Abbildung 2 ersichtlich, in drei Gruppen einteilen. Die kleinste Gruppe stellen kolorektale Karzinome dar, die auf dem Boden von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen entstehen. Sie machen 1-2 % aus. Bei 5-10 % liegt der Erkrankung hingegen ein definiertes hereditäres Krebsyndrom zugrunde. Den größten Teil von 88-94 % machen Patienten ohne prädisponierende Vorerkrankung aus (4).

Allerdings besteht bei bis zu 25 % zumindest eine familiäre Vorbelastung, beim Rest handelt es sich um sporadische kolorektale Karzinome ohne positive familiäre Anamnese (7).

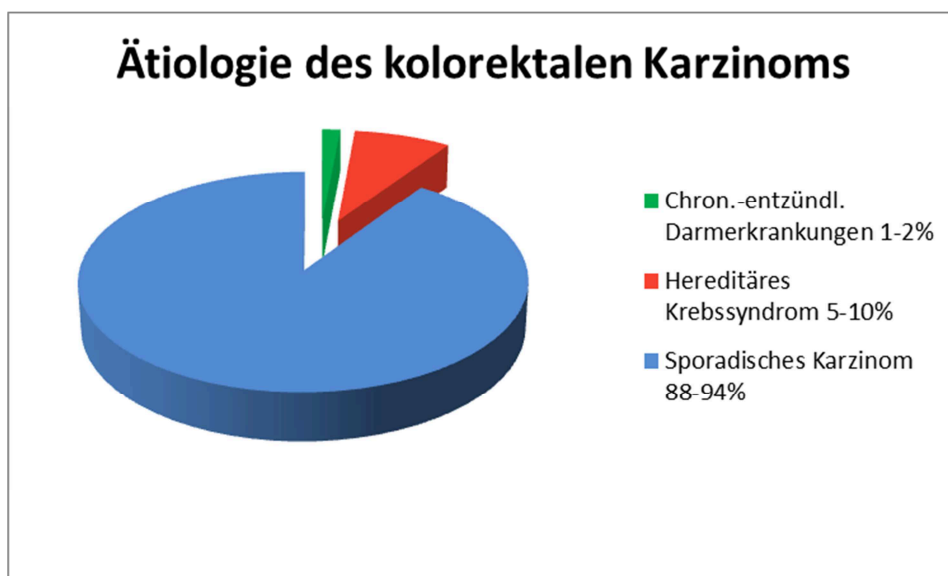


Abbildung 2. Häufigkeitsverteilung der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms (4).

5.1 Umweltfaktoren

Zu den bedeutendsten nicht-genetischen Risikofaktoren gehört die Ernährung.

Für rotes Fleisch konnte eine positive Korrelation zwischen Fleischverzehr und der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (4).

Eine Metaanalyse ist 2007 jedoch zum Schluss gekommen, dass der Effekt der Ernährung auf die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms eher als moderat zu betrachten ist. Eine einfache ausgewogene Ernährung mit genügend Obst und Gemüse sei demnach der Schlüssel zur Gesundheit (17).

Dass die Ernährung vor allem in die Gegenrichtung, also protektiv wirken kann, zeigt sich ebenfalls in vielen Studien. Es hat sich erwiesen, dass karzinogen wirkendem oxidativem Schaden durch in der Nahrung enthaltenen Antioxidantien entgegengewirkt werden kann. Unter den Früchten und dem Gemüse, die Antioxidantien enthalten, hat sich vor allem der Apfel als evidentestes protektives Nahrungsmittel erwiesen (18).

Ein protektiver Effekt wird auch der Ingestion pflanzlicher Faserstoffe nachgesagt. Inwieweit dies auf den Faseranteil und nicht auf andere, sogenannte sekundäre Pflanzenstoffe (z.B. Vitamine) zurückzuführen ist, bleibt umstritten.

Eine Abnahme des Risikos an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken im Zusammenhang mit der Konsumation von Milchprodukten und Molkereiprodukten wird durch den hohen Kalziumgehalt erklärt (4).

Die bekannten gesundheitsschädlichen Auswirkungen des Alkohols scheinen auch die Entstehung des Karzinoms zu fördern. Vor allem das Risiko an einem Rektumkarzinom zu erkranken steht im Verhältnis zur Menge des zugeführten Alkohols (4).

Wie der Alkohol ist auch der Tabakrauch ein allgemeiner Risikofaktor in der Entstehung von Krebserkrankungen, dessen Einfluss auf die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms belegt worden ist (4).

Der Zusammenhang zwischen kolorektalem Karzinom und Übergewicht lässt sich nicht eindeutig auf das Übergewicht beziehen, da sich in dieser Risikogruppe verschiedene potenzielle Trigger wie mangelnde körperliche Aktivität und Ernährung widerspiegeln. Die Korrelation wird allerdings vermutet.

Regelmäßige Bewegung ist wiederum in der Lage der Karzinogenese entgegenzuwirken (4).

Weitere Risikofaktoren wie berufliche Exposition mit Asbest und anderen organischen Verbindungen, hormonelle Faktoren bei der Frau, Ureterosigmoidostomien und Gallensäuren sind ebenfalls zu erwähnen (4).

5.2 Genetische Risikofaktoren - hereditäre kolorektale Karzinome

Die entscheidende Rolle der Genetik in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms zeigt sich schon anhand der Tatsache, dass im Rahmen hereditärer Syndrome die Entstehung eines Karzinoms unbehandelt vorprogrammiert ist.

5.2.1 Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP)

Die FAP ist eine obligate Präkanzerose, die autosomal dominant vererbt wird. Die Prävalenz dieses Krankheitsbildes liegt bei 1:5.000 bis 1:10.000 und liegt etwa 1 % aller kolorektalen Karzinome zugrunde. FAP Patienten mit dem klassischen Krankheitsphänotyp entwickeln bereits im Kindheits- und Pubertätsalter standardmäßig hunderte bis tausende kolorektale Adenome (4).

Diese befinden sich im Kolon, Rektum, Duodenum und in Form von ‚gland polyps‘ im Magen und sind benigne. Einige dieser adenomatösen Polypen entarten mit der Zeit allerdings zu bösartigen Karzinomen. Unbehandelt beträgt das Lebenszeit-Risiko dieser Patienten ein Karzinom zu entwickeln bei 100 %. Dies geschieht typischerweise in einem Alter von etwa 40 Jahren. Die Prävention der Wahl ist daher die prophylaktische Kolektomie im Teenageralter (3).

Keimbahnmutationen des *APC*-Gens sind die molekulare Grundlage der FAP (4). Das Gen, welches bei FAP Patienten mutiert ist, wurde 1991 entdeckt und *APC* ‚adenomatöse Polyposis Coli‘ benannt (3).

Es gehört der Gruppe der Tumorsuppressorgene an und blockt normalerweise den Übergang von der G1- zur S Phase im Zellzyklus (19).

Die FAP lässt sich hinsichtlich verschiedener Genotyp-Phänotyp-Beziehungen in verschiedene Subgruppen unterteilen. Dies führt auch zu unterschiedlichen diagnostischen und therapeutischen Überlegungen unter den FAP Patienten und macht wiederum die

Bedeutung der Kenntnisse über die molekulare Grundlage der individuellen Karzinogenese ersichtlich (4).

Das Gardner Syndrom wird als eine klinische Subgruppe der FAP betrachtet. Es stellt ein sehr seltenes autosomal dominant vererbtes Krankheitsbild dar. Charakteristisch ist das Auftreten von Adenomen des Dickdarms, sowie von Knochen- und Weichteiltumoren. Die Adenome besitzen, wie bei der FAP, unbehandelt ein Risiko von 100 % maligne zu entarten (20).

Die attenuierte FAP (AFAP) beschreibt eine abgeschwächte Variante der klassischen FAP und unterscheidet sich von dieser durch eine signifikant niedrigere Anzahl von bis zu max. 100 Adenomen, welche meist auch proximaler im Kolon lokalisiert sind. Eine karzinogene Entartung entwickelt sich erst später als bei der klassischen FAP (19).

Mutationen im *APC* Gen sind bei der AFAP ebenfalls vorhanden, laut neuen Erkenntnissen spielt eine Veränderung im neu entdeckten MutY homologue (*MUTYH*) Gen jedoch eine noch bedeutendere Rolle. Das *MUTYH* Gen ist bei der Basen-Exzision-Reparatur beteiligt (21).

5.2.2 Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Bei Patienten mit einer FAP oder einem anderen, der FAP verwandten, hereditären Syndrom entwickeln sich multiple Polypen, aus denen mit der Zeit Karzinome entstehen.

Das HNPCC, welches auch Lynch-Syndrom genannt wird, zeichnet sich jedoch nicht durch das Vorhandensein von Polypen aus, sondern durch eine Prädisposition, die zur Entwicklung von synchronen und metachronen kolorektalen sowie auch extrakolonischen HNPCC-assoziierten Karzinomen führt. Diese treten häufig vor dem 50. Lebensjahr auf und das Risiko, ein kolorektales Karzinom bis zum 75. Lebensjahr zu entwickeln, liegt in etwa bei 92 %. Die assoziierten Tumore, für die ebenfalls ein erhöhtes Risiko besteht, betreffen das Endometrium und die Ovarien bei der Frau, den Magen, das Zentralnervensystem sowie das Übergangsepithel des Nierenbeckens und der harnableitenden Organe bei beiden Geschlechtern (3, 4)

Das HNPCC liegt in etwa 1-5 % aller kolorektalen Karzinome zugrunde und wird ebenfalls autosomal dominant vererbt (3, 4).

Im Gegensatz zur FAP liegt dem HNPCC keine Punktmutation eines Tumorsuppressorgens zugrunde, sondern eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI), welche durch eine Keimbahnmutation in einer der Mismatch Repair (MMR) Gene entsteht.

Eine solche Mikrosatelliteninstabilität lässt sich in über 95 % der Fälle bei diesem Krankheitsbild nachweisen (19).

5.2.3 Turcot-Syndrom

Beim Turcot-Syndrom, einer allelischen Variante des HNPCC, kommt es, neben kolorektalen Adenomen, zur frühen Entwicklung von entweder Medulloblastomen oder Glioblastomen. Dies ist abhängig davon, ob die Mutation im *APC*- oder in einem der Mismatch-Repair-Gene auftritt. Die Hirntumore können oft schon in jungen Jahren zum Tode führen, noch bevor gastrointestinale Manifestationen auftreten (4, 22).

5.2.4 Muir-Torre-Syndrom

Dieses Syndrom stellt eine extrem seltene Sonderform des HNPCC dar und ist durch zusätzliche Hauttumore gekennzeichnet. Wiederum sind Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen die molekulare Grundlage des Krankheitsbildes (4).

6. Pathogenese-Molekularbiologie

Die Haupteigenschaften von Tumorzellen werden hauptsächlich durch ihre genetischen Veränderungen bestimmt (3).

Um die genomische Integrität zu bewahren sind unsere Zellen im Dauereinsatz.

Allein 30 % der Gene des menschlichen Genoms codieren für Proteine, die die Intaktheit unserer DNA bewahren sollen (19).

Das menschliche Genom besitzt verschiedene Strategien um vor allem die Stammzellen der Epithelzellen im Kolon vor solchen akkumulierenden Mutationen zu schützen. So befinden sich diese Zellen dort, wo sie vor Umweltgiften und anderen Mutagenen am besten geschützt sind, nämlich tief am Grund der Krypten der Dickdarmschleimhaut (19).

Nachbarzellen produzieren Muzine, welche sich schützend über das Gewebe legen, und so vor chemischen, physikalischen und mechanischen Reizen schützen.

Die Tochterzellen der Stammzellen wandern im Rahmen ihrer Differenzierung zur Oberfläche der Schleimhäute, wo sie nun weitaus ungeschützter verschiedenen Mutagenen ausgesetzt sind. Die Möglichkeit maligne zu entarten wird ihnen durch ihre kurze Lebensdauer von 5-7 Tagen allerdings genommen (19).

Den Stammzellen ermöglicht ein Plasmamembranprotein sogar, potentielle mutagene Moleküle aus der Zelle hinaus zu pumpen. Dieses Plasma-Membran Protein nennt sich MDR1 (multidrug resistance 1) und ist wahrscheinlich auch für die Resistenz der Tumorstammzellen gegen Chemotherapeutika verantwortlich.

Kommt es trotz Schutzstrategien zu Schäden, leiten Stammzellen normalerweise ihre eigene Apoptose ein (19).

Trotz aller Schutzmechanismen kann es zu genomischer Instabilität mit der Folge der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms kommen.

Hierbei können 3 verschiedenen Mechanismen zum Tragen kommen:

- „Die chromosomale Instabilität (CIN)
- Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI)
- Die verstärkte Methylierung von CpG-Inseln der DNA (7)“

6.1 Die Chromosomale Instabilität (CIN)

Der Mechanismus, welcher zu chromosomaler Instabilität führt, wird auch als ‚gatekeeper pathway‘ bezeichnet und entspricht morphologisch der Adenom-Karzinom-Sequenz. Der Begriff der Adenom-Karzinom-Sequenz wurde 1951 von Jackman et al eingeführt. Darunter wird eine voraussehbare Abfolge von histologischen Veränderungen verstanden. Schrittweise entsteht aus normaler Schleimhaut über eine niedriggradige und später hochgradige Dysplasie ein invasives Karzinom (4, 19).

Bereits 1990 wurden von Fearon und Vogelstein (23), entsprechend dem histologischen Modell, die zugehörigen genetischen Veränderungen beschrieben. Dabei handelt es sich um die Akkumulation von Mutationen, die zur Aktivierung von Protoonkogenen und zur

Inaktivierung von zumindest 3 Tumorsuppressorgenen führt. Bei den Tumorsuppressorgenen handelt es sich um die Inaktivierung des *APC*-, des *P53*- und des *DCC*-Gens, wobei das *APC*-Gen eine Schlüsselrolle einnimmt. Seine Mutation bildet auch die Grundlage der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) (4, 19).

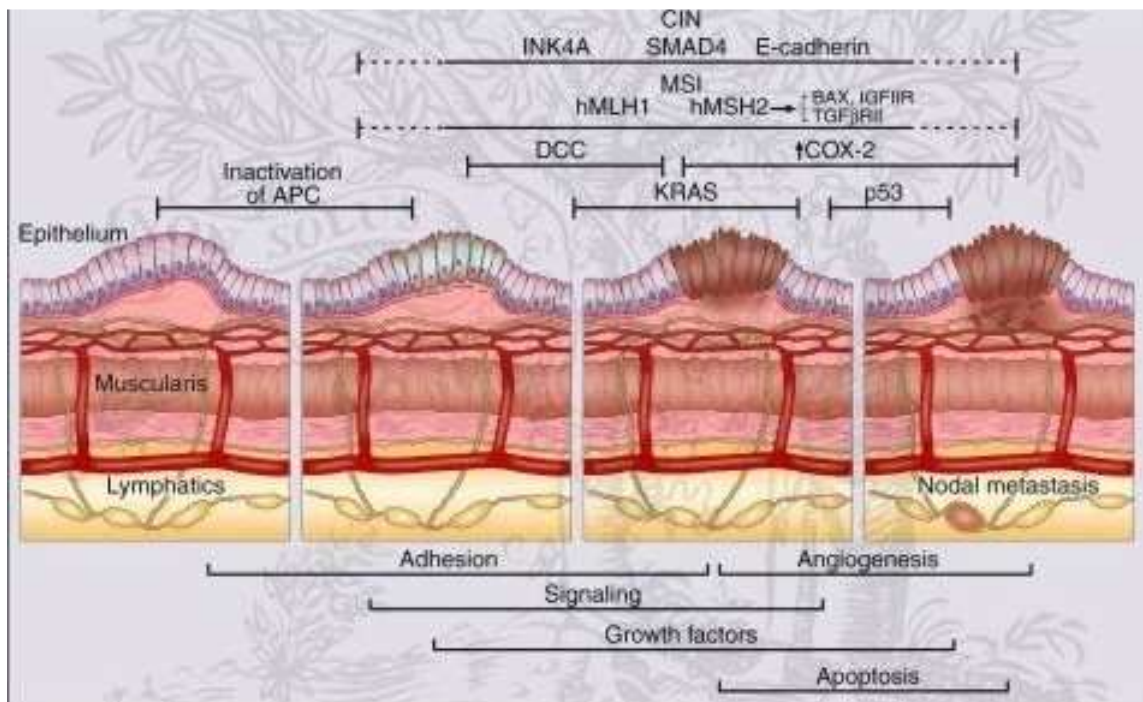


Abbildung 3. Zeitliche Abfolge der histologischen und genetischen Veränderungen im Rahmen der Adenom-Karzinom Sequenz (24).

Protoonkogene kodieren für Proteine, die für die Regulation der Proliferation, Mobilität und Differenzierung der Zelle zuständig ist. Mutiert ein solches wichtiges zelluläres Gen, so spricht man von Onkogenen (25).

In einer normal funktionierenden Zelle laufen komplexe Signalübertragungswege ab, an deren Ende die Mitose der Zelle steht. Um einen solchen proliferativen Prozess überhaupt in Gang zu bringen, muss in der Regel primär eine entsprechende Rezeptor-Liganden-Bindung stattfinden (25).

Mutationen von Protoonkogenen führen nun dazu, dass Onkoproteine entstehen. Diese sind entweder Expressionsprodukte, die auch ohne Ligandenbindung ständig aktiv sind, beziehungsweise es kann auch zu einer übermäßigen Expression eines normalen

Onkoproteins kommen. Die ständige Aktivität eines solchen Proteins bezeichnet man als konstitutive Aktivierung.

Signalkaskaden laufen somit nicht mehr streng reguliert, sondern in kontinuierlichem oder erhöhtem Ausmaß ab (25).

Ein wichtiges Protoonkogen im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom stellt das *K-RAS* Gen dar (dazu siehe weiter unten).

Tumorsuppressorgene sind Gene, die in normalen Zellen dafür zuständig sind die Proliferation und Differenzierung einer Zelle zu supprimieren, ihre Genprodukte sind demnach negative Regulatoren. Wenn in einer Tumorzelle diese Funktion verloren geht, fehlt diese regulierende Bremse auf das Wachstum (25).

6.1.1 Das APC-Tumorsuppressorgen und der APC/WNT/ β -catenin Signalweg

Die Mutation des APC-Tumorsuppressorgens ist nicht nur grundlegend für die Entwicklung der familiären adenomatösen Polypose (FAP), sondern der Regel der Adenom-Karzinom-Sequenz zur Folge, auch ausschlaggebend als erstes und initiiierendes Ereignis bei der Entstehung der sporadischen kolorektalen Karzinome (26).

Der Unterschied liegt darin, dass es sich bei der FAP um eine Keimbahnmutation handelt und beim sporadischen kolorektalen Karzinom um eine Punktmutation, die nur in den Tumorzellen selbst nachweisbar ist (4, 19).

Nachdem sich eine Stammzelle am Boden einer Krypte der Dickdarmschleimhaut geteilt hat, wandert eine Tochterzelle Richtung Lumen. Währenddessen erhält sie von den umgebenden Stromazellen den Wachstumsfaktor WNT. Dieser nimmt, sowie auch andere überlebensnotwendige Faktoren, an Konzentration auf dem Weg nach oben immer mehr ab. Oben angekommen stirbt die Zelle ab und wird in das Lumen des Darmes abgegeben (26).

β -catenin spielt eine Schlüsselrolle im APC/WNT/ β -catenin Signalweg. Ist der WNT Signalweg nicht aktiv, so wird β -catenin phosphoryliert und abgebaut. Dieser Vorgang wird von einem Multiproteinkomplex reguliert, welcher aus Axin, verschiedenen Kinasen und dem APC-Gen besteht. Bei Unterbrechung dieses Komplexes bzw. anhaltendem WNT Signal bleibt β -catenin unphosphoryliert, seine Konzentration steigt an, es stabilisiert sich und wandert von der Zellmembran zum Zellkern (26, 27).

Dort bindet es einen Transkriptionsfaktor der TCF/LEF-Familie um WNT Zielgene zu aktivieren.

APC ist also ein wichtiger Baustein um den Abbau des β -catenin zu gewährleisten und somit ein negativer Regulator des Wnt Signalweges. Ist das Tumorsuppressorgen *APC* nun aber mutiert, so führen erhöhte β -catenin Konzentrationen zu einer ständigen Aktivierung des Wnt Signalweges und damit wandern die Zellen nicht weiter in Richtung Lumen, wo sie eigentlich bald nach Einleitung der Apoptose ins Darmlumen abgegeben werden sollten. Zusätzlich teilen sie sich weiterhin und werden dysplastisch (26).

6.1.2 Das Tumorsuppressorgen *P53*

Das *P53* Gen kodiert für den nuklearen Transkriptionsfaktor *P53*, dem eine sehr wichtige Rolle als ‚Hüter des Genoms‘ zufällt. Die Zelle wird beim G1/S-Kontrollpunkt auf genetische Schäden untersucht. Bei Vorliegen solcher kommt es durch *P53* zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase und nachfolgender Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen. Sind diese nicht in der Lage die Schäden zu beheben, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (25).

Fällt diese wichtige Kontrollfunktion aus, kommt es zu vermehrter Proliferation mit Anhäufung von DNA-Schäden in der Zelle.

Die Mutation des *P53* Gens ist eine der allerhäufigsten genetischen Veränderungen in Tumorzellen des menschlichen Körpers (28).

In über 70 % aller kolorektalen Karzinome kann ein mutiertes *P53* Gen nachgewiesen werden. In den allermeisten Fällen handelt es sich dabei um Punktmutationen (4).

Die *P53* Mutation spiegelt die molekulare Grundlage des Übergangs vom Adenom zum Karzinom im Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz wieder (19).

Die Basis dieses Modells wird durch die Annahme gebildet, dass es durch die Akkumulation von Mutationen zur Entwicklung und zum Fortschreiten eines Adenoms bis hin zum invasiven Karzinom kommt. Dabei spielen vor allem das *APC*, das *K-RAS* und das *P53* Gen eine Rolle und sollen der Sequenz nach in einer bestimmten Reihenfolge mutieren. Neuere Studien zeigen allerdings, dass *K-Ras*, *APC* und *P53* Mutationen sehr selten gleichzeitig in einem Tumor mutiert sind und widerlegen somit die Annahme, dass es sich um einen synergistischen Entwicklungsweg handelt. Vielmehr existieren wahrscheinlich viele alternative Wege, die genomische Integrität unserer Zellen aus dem Gleichgewicht zu bringen (29).

Laut einer Studie aus dem Jahr 2005 wird eine Mutation des P53 Gens umso häufiger in kolorektalen Karzinomen gefunden, umso weiter fortgeschrittenen der Tumor bereits ist. Dies lässt auf eine wichtige Rolle des Gens in Bezug auf die Progression des Karzinoms schließen. Dieser Zusammenhang konnte für das *K-RAS* Gen nicht gefunden werden.

Eine ältere Studie (Smith et al., 2002) wies jedoch auf das genaue Gegenteil hin und konnte nur zwischen *K-RAS* und der Tumorprogression einen Zusammenhang herstellen (29).

In Bezug auf die krebsspezifische Überlebenszeit zeigte die P53 ebenso wie die *APC* Mutation keine Relevanz (28).

6.1.3 Verlust der Heterozygotie (LOH) im Chromosom 18q

Der Verlust der Heterozygotie beschreibt den Verlust von einem der beiden Allele in einem Gen. Bei Tumorsuppressorgenen kommt es dabei auch häufig zur Mutation des übrigen zweiten Alleles.

Der Verlust des langen Armes des Chromosom 18q stellt die häufigste genetische Veränderung beim kolorektalen Karzinom dar und konnte in über 70% nachgewiesen werden. Auf der Suche nach dem betroffenen Tumorsuppressorgen stieß man zuerst auf das *DCC* (deleted in colorectal carcinoma) Gen. *DCC* codiert für das transmembranöse Protein DCC, welches in Abwesenheit von seinem Liganden, Netrin-1, das Zellwachstum blockiert und pro-apoptotisch wirkt. Für die Zellen ist das Vorhandensein von Netrin-1 somit überlebenswichtig. Netrin-1 wird in den Krypten der kolorektalen Schleimhaut gebildet, dies bedeutet, dass die Konzentration während der Differenzierung und Wanderung der Epithelzellen Richtung Lumen hin abnimmt. Normalerweise werden die Zellen der Darmschleimhaut nach einigen Tagen in das Lumen abgegeben, bei Mutationen des *DCC* Gens oder Überexpression von Netrin-1 findet dieser Vorgang nicht statt und es kommt zu abnormalem Zellwachstum.

Es ist jedoch bisweilen umstritten ob *DCC* wirklich das gesuchte Tumorsuppressorgen ist, da unter anderem Punktmutationen des Gens selten mit Karzinomen assoziiert sind und die Expression des Gens in vielen kolorektalen Karzinomen sogar erniedrigt ist. Des Weiteren wurde auf Chromosom 18q das *SMAD4* Gen lokalisiert und als Tumorsuppressorgen bestätigt (30, 31).

SMAD4 gehört zu den Proteinen des TGF- β Signalweges, welcher an der Regulation von Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Zellmigration beteiligt ist. Unter den Genen

dieses Signalweges ist *SMAD4* am häufigsten von einer Mutation betroffen. Eine Keimbahnmutation dieses Gens disponiert für das juvenile Polyposis-Syndrom (JPS) bei welchem Patienten im jugendlichen Alter hamartomatöse Polypen entwickeln, die das Potential zur malignen Entartung mit sich bringen (26).

Eine aktuelle Studie konnte nun aber anhand von Studien an Fliegen und Mäusen den Status des *DCC* Gens nach 15 Jahre langer Diskussion als Tumorsuppressorgen bestätigen (31).

Weiterhin ungelöst bleibt die Frage inwieweit die Prognose und die Mortalität mit einem Verlust der Heterozygotie im Chromosom 18 korreliert. Bekannt ist, dass LOH in 18q vor allem in fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen zu finden ist. Ogino et al. konnten in ihrer Studie allerdings keinen signifikanten Zusammenhang mit der Prognose nachweisen (32).

6.2 Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Die Mikrosatelliteninstabilität wird auch als sogenannter ‚*caretaker pathway*‘ bezeichnet und wird, im Falle des kolorektalen Karzinoms, durch die Mutation von Mismatch-Repair-Genen ausgelöst. Diese Gene kodieren für das sogenannte Mismatch-Reparatursystem (MRS).

Das MRS ist wichtiger Teil bei der Behebung von DNA-Schäden, welche entweder durch externe Mutagene ausgelöst worden sind oder bei der DNA-Replikation selbst entstanden sind. Solche spontane Fehler während der Zellreplikation werden normalerweise noch während der Synthese durch die DNA-Polymerase rückwärts korrekturgelesen und sofort ausgebessert. Doch auch diesem System können Fehler unterlaufen. Darum kontrolliert das Mismatch-Reparatursystem die Arbeit der DNA-Polymerase und repariert bei Bedarf die entstandenen Defekte. Mutiert nun eines der Mismatch-Repair-Gene (*MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*), so führt dies zur Inaktivierung des Reparatursystems und es häufen sich mit der Zeit immer mehr Mutationen in der Zelle an. Es kommt zur Entwicklung eines malignen Phänotyps (4, 19).

Der Funktionsverlust des Mismatch-Reparatursystems kommt entweder durch die verstärkte Methylierung von CpG-Inseln oder durch Punktmutationen zustande (19).

Eine Punktmutation betrifft nur eine einzige Nukleinbase, die durch eine andere ausgetauscht wird (26).

Short Tandem Repeats (STRs) oder Mikrosatelliten werden die kurzen, nicht codierenden DNA-Sequenzen genannt, deren repetitive Sequenz aus 2-4 Nucleotiden besteht und 10-100 mal wiederholt auftreten kann. In HNPCC Tumoren sind die Mutationen der Mikrosatelliten nicht auf einen Genlocus beschränkt, sondern zeigen sich verteilt über das ganze Genom. Die Veränderung der Mikrosatelliten kann aus einer Verlängerung oder einer Verkürzung bestehen. Ein defektes Mismatch-Repair-System gleicht diese Fehler nicht mehr aus und ist somit die Ursache der Mikrosatelliteninstabilität beim HNPCC (26). Die Mikrosatelliteninstabilität bildet die molekulare Grundlage des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC). Bei mehr als 95 % der Patienten mit Lynch-Syndrom kann eine solche Mutation nachgewiesen werden. Bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen macht man das Mismatch Repair System nur für 15-20 % der Fälle verantwortlich.

Dieses Wissen macht man sich auch zur Diagnose des Lynch-Syndroms zunutze. Ist eines der vier Mismatch-Repair-Gene mutiert, kann von einem HNPCC ausgegangen werden.

Die wichtige Rolle des MRS wird durch die Auswirkung einer Keimbahnmutation bei mit Verlust desselben ersichtlich. Solche Patienten entwickeln bereits im Alter von 40 Jahren in 80% der Fälle ein kolorektales Karzinom (19).

Die verschiedenen genetischen Veränderungen bestimmen auch die Charaktereigenschaften des kolorektalen Karzinoms. So befinden sich die Tumore mit Mikrosatelliteninstabilität meist im proximalen Kolon und sind vom muzinösen Typ.

Obwohl diese genetische Eigenschaft mit niedrigerer Differenzierung und früherem Erkrankungsalter assoziiert ist, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Patienten höher, als jener mit anderen chromosomalen Veränderungen (19).

6.3 Die verstärkte Methylierung von CpG-Inseln der DNA

Die bis jetzt besprochenen molekularen Mechanismen, die zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms führen können, beziehen sich auf somatische Mutationen sowie auf spontane Keimbahnmutationen. Es existieren allerdings auch vererbte Veränderungen im Phänotyp oder der Genexpression, die nicht durch die Sequenzen der DNA Basen

bestimmt sind. Die bekannteste unter ihnen ist wohl die Zelldifferenzierung. Solche Mechanismen werden epigenetische Veränderungen genannt (33).

Die DNA-Methylierung gehört der Gruppe der epigenetischen Veränderungen an. Darunter versteht man das Anhängen einer Methylgruppe an ein CpG Dinucleotid (Cytosin verbunden mit Guanosin durch einen Phosphodiester). Die CpG Dinucleotide liegen normalerweise in unmethyliertem Zustand zusammen in Gruppen als sogenannte CpG-Inseln in einer Gen-Promotor Region vor (33).

In diesem Zustand wird das Gen normal exprimiert, wird die Promotorregion allerdings methyliert, so wird die Gentranskription verhindert (silenced). Dies kann zur Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms führen. Die Methylierung des *MLH1* Mismatch-Reparatur-Gens kann in 80 % der sporadischen kolorektalen Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität gefunden werden (19).

7. K-RAS Onkogen

7.1 Die Aufgabe der RAS - Proteine

RAS-Gene stellen eines der wichtigsten Onkogene bei der Entwicklung von kolorektalen Tumoren dar.

Mutationen von *RAS*-Genen sind jedoch nicht nur auf das kolorektale Karzinom beschränkt. Sie finden sich in vielen soliden und auch hämatopoetischen menschlichen Tumoren und stellen mit einer Gesamtinzidenz von 30 % eine der am häufigsten mutierten Onkogene dar (26, 34).

Im Pankreaskarzinom lässt sich eine *RAS*-Mutation in 90 % der Fälle nachweisen. Dahinter folgen das Schilddrüsen- und das Kolonkarzinom mit zumindest 50-prozentigen Anteil an Mutationen. Zur Familie der *RAS*-Proteine gehören H-*RAS*, N-*RAS* und K-*RAS*. Diese drei Proteine unterscheiden sich in ihrer Struktur und ihrer Funktion (34).

K-RAS existiert in 2 verschiedenen Isoformen, die durch Unterschiede im Splicing entstehen. Sie werden entweder als K-RAS4A/4B oder als K-RAS2A/2B bezeichnet. Da die Verwendung von KRAS4A/4B verbreiteter ist, wird sie auch hier Anwendung finden (34, 35).

Oft ist bei einer bestimmten Tumorart vorwiegend eines der drei RAS-Proteine mutiert. Veränderungen am K-RAS Protein können allgemein, aber vor allem auch beim kolorektalen Karzinom, am häufigsten gefunden werden. Auch beim Pankreaskarzinom, welches den bei weitem höchsten Anteil an RAS-Mutation zeigt, ist die *K-RAS* Mutation überwiegend zu beobachten. Dabei ist interessanterweise ausschließlich eine Punktmutation in Codon 12 zuständig. Diese kann häufig schon in Tumorstadien, den prämaligen Mukosazellhyperplasien, nachgewiesen werden.

Das Schilddrüsenkarzinom hingegen weist Mutationen in allen drei Genen der *RAS*-Familie auf (34).

Warum die meisten Mutationen das *K-RAS* Gen betreffen und eine Veränderung des *H-RAS* Gens dagegen sehr selten auftritt, ist unklar. Entweder ist *K-RAS* empfänglicher für genetische Veränderungen oder die Funktion der beiden Proteine ist signifikant unterschiedlich (14).

Seit ihrer Entdeckung in akut transformierenden Viren ist ein vollständiges Verständnis der Funktionen, der möglichen Dysfunktionen und der dazu führenden malignen Entartung von Zellen noch immer ausständig (35).

Die drei RAS-Proteine des Menschen sind wichtiger Teil komplexer Signalwege, die Zellproliferation, Überleben, Differenzierung, Aktin Organisation, vesikulären Transport und die Genexpression regulieren (36).

Die *RAS*-Gene codieren für 21 kD Proteine, welche Guaninnukleotide binden und GTPase-Aktivität zeigen. Auf Grund dieser Eigenschaft werden sie zu den regulativen G-Proteinen gezählt (34, 35).

Ihre Aufgabe ist es, externe Stimuli auf Effektormoleküle im Inneren der Zelle über die Plasmamembran hinweg zu übertragen (37).

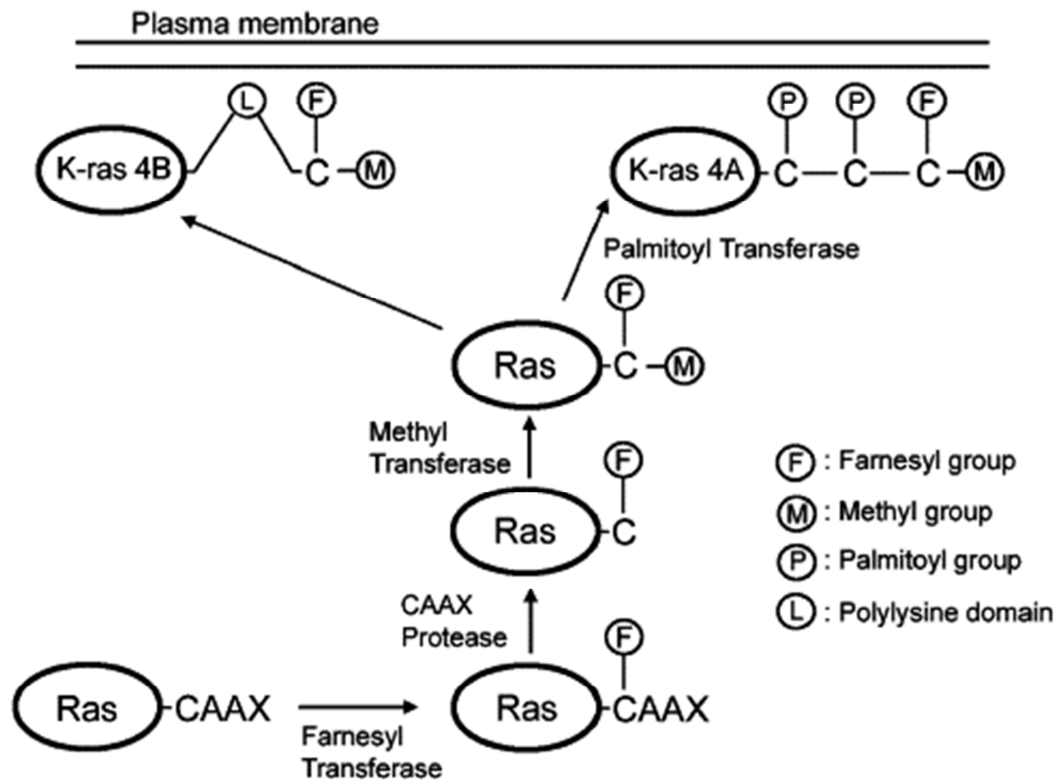


Abbildung 4. Modifizierung und Aktivierung von K – RAS (38).

Um dieser Funktion nachzugehen benötigen sie eine Verankerung an der Innenseite der Zellmembran, daher müssen die primär kleinen und hydrophilen RAS-Proteine einer Lipidmodifikation unterzogen werden (38).

Im Rahmen der Aktivierungsschritte der RAS-Proteine wird ihnen dafür eine Farnesylgruppe über eine Farnesyltransferase (FT) angehängt. Diese sogenannte posttranslationale Modifikation wird im endoplasmatischen Retikulum durchgeführt. Um die Verankerung weiter zu stabilisieren wird eine zusätzliche Proteinmodifikation durchgeführt, welche H- und N-RAS von K-RAS strukturell unterscheidet. Nach Palmitoylierung benachbarter Zysteine werden H- und N-RAS über den Golgi-Apparat zu cholesterolreichen Domänen der Zellmembran transportiert. K-RAS hingegen erreicht, nach Ankopp(e)lung einer aus mehreren Lysinen zusammengesetzten polybasischen Domäne, andere Membranbereiche direkt über das Zytoplasma. Die genaue Kenntnis dieser Modifikationsvorgänge hat klinisch zu neuen therapeutischen Ansätzen geführt (34).

RAS-Proteine besitzen eine intrinsische Guanosintriphosphatase (GTPase), die es ihnen erlaubt nach Signalübertragung von einem aktiven in einen inaktiven Zustand überzugehen. Zur Inaktivierung wird das gebundene GTP von der GTPase zu GDP hydrolysiert. Die Aktivität dieser intrinsischen GTPase ist allerdings schwach und muss zuvor von GAPs (GTPase aktivierenden Proteinen) stimuliert werden. GAPs wie z.B. NF-1GAP/Neurofibromin und P120-GAP schützen somit vor einem zu langen aktiven Zustand der RAS Proteine.

Diese Aufgaben machen Neurofibromin zu einem Tumorsuppressor, typischerweise ist es bei der Neurofibromatose Typ I defekt (38).

Die zweite Gruppe der Regulationsproteine, neben den GAPs, stellen die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) dar. Sie stimulieren den langsamen intrinsischen Prozess des Nukleotidaustausches (34).

Der Übergang der RAS-Proteine in den aktiven Zustand ist sehr komplex, da das Aktivierungssignal des RAS-Signalweges von vielen verschiedenen Stimuli gegeben werden kann. (38) Die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Hormonen an die membranständigen Rezeptoren führt zur Bildung von intrazellulären Andockstellen für verschiedene Proteine, welche die Aufgabe der Signalweitergabe weiter übernehmen.

Die Andockstellen sind Phosphotyrosine, welche durch Phosphorylierung der Tyrosine der Kinasedomäne der Rezeptoren gebildet werden (34).

Der Vorgang entspricht einem Rezeptor-Tyrosinkinase Signaltransduktionsweg. Rezeptor-Tyrosinkinasen stellen das verbindende Glied für die Signalweitergabe von intra- nach extrazellulär. Die glykosylierte extrazelluläre Domäne, an die die Wachstumsfaktoren binden, wird durch eine membrandurchspannende hydrophobe Domäne mit ein oder zwei katalytischen Tyrosinkinasedomänen verbunden. Eine Ligandenbindung führt immer zur Dimerisierung der extrazellulären Domäne, welche auch eine Annäherung der intrazellulären Domänen zur Folge hat. Daraus folgend wird die katalytische Tyrosinkinasedomäne aktiviert und es kommt zur transienten Phosphorylierung des Rezeptors, an den nun weitere Proteine binden können und somit die Signalkette fortführen RAS-vermittelte Signalwege sind in einer normalen Zelle immer nur transient aktiv. (26).

Das Netzwerk dieser Signalwege hat sich in letzter Zeit als immer komplexer erwiesen. Ein besonders wichtiger und gut untersuchter Signalweg ist der sogenannte RAS/RAF/MAPK Signalweg.

7.2 Das K-RAS Gen und der RAS/RAF/MAPK Signalweg

Der MAPK (mitogen activated protein kinase) Signalweg beginnt mit Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) wie z.B. dem EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Die Phosphorylierung ermöglicht Adaptorproteinen wie GRB2 (Growth Factor Receptor bound 2) mittels ihrer SH2 Domäne an die Tyrosinreste zu binden. GRB2 seinerseits rekrutiert GEFs wie SOS-1 oder CDC25. Diese stimulieren die intrinsische GTPase des RAS-Proteins und führen somit zu einer Konformationsänderung und einem Austausch von GDP zu GTP. Das aktivierte RAS-Protein rekrutiert nun die RAF-1 Kinase. Die Aktivierung dieser Kinase der RAF Familie stellt eine Schlüsselrolle im MAPK Signalweg dar. Die molekularen Grundlagen dieser Aktivierung, welche weitere Cofaktoren und Phosphorylierungen voraussetzt, sind noch nicht vollständig verstanden. Nachweislich ist jedoch, dass dieser Vorgang eine Verbindung von RAF mit der Zellmembran erfordert (38, 39).

Bei einer experimentellen Verankerung des RAF-Proteins in der Membran mittels eines Lipidankers konnte nachgewiesen werden, dass dieser Schritt der entscheidende ist, da RAF dann auch in Abwesenheit von RAS-GTP aktiv war (26).

Die Familie der RAF Kinasen umfasst die Isoformen A-RAF, B-RAF und C-RAF/RAF-1 und gehört zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen. *B-RAF* stellt das einzige Gen dieser Familie dar, welches auch in Tumoren von Menschen mutiert ist. Besonders häufig ist dies bei der Entwicklung von malignen Melanomen der Fall. Aber auch beim sporadischen kolorektalen Karzinom tritt die *B-RAF* Mutation bei Vorhandensein von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit einer Häufigkeit von mehr als 40% auf. Ohne MSI ist die Häufigkeit mit ungefähr 4 % deutlich geringer einzustufen (26).

Die wichtige Rolle von GRB2 in der Aktivierung von RAS konnte ebenfalls mittels Experiment gezeigt werden. Die alleinige Injektion von H-RAS und Grb2 in ruhende Fibroblasten führte, im Gegensatz zur gemeinsamen Injektion, zu keiner DNA-Synthese.

Eine Injektion von Antikörpern gegen GRB2 kann somit, trotz Gabe von Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal growth factor) oder PDGF (Platelet derived growth factor), das Eintreten der Zelle in die S-Phase verhindern (26).

Die RAS Isoform, welche RAF-1 am effizientesten stimuliert, ist K-RAS4B, wobei die anderen drei Formen ebenso dazu in der Lage sind (38).

RAF-1 phosphoryliert und aktiviert weiterfolgend in der Signalkaskade die Kinasen MEK (MAP Kinase-ERK-Kinase) 1 und MEK 2. Sie sind Tyrosin/Threonin Kinasen, welche wiederum ERK 1 und ERK 2 phosphorylieren. Die ERK (Extrazellulär regulierte MAP-Kinase) Kinasen (auch MAPK genannt) sind Serin/Threonin Kinasen, die ELK-1, FOS, MYC und weitere Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Die Transkriptionsfaktoren führen schlussendlich über DNA-Bindung zur Transkription der Zielgene im Nukleus der Zellen (26, 39).

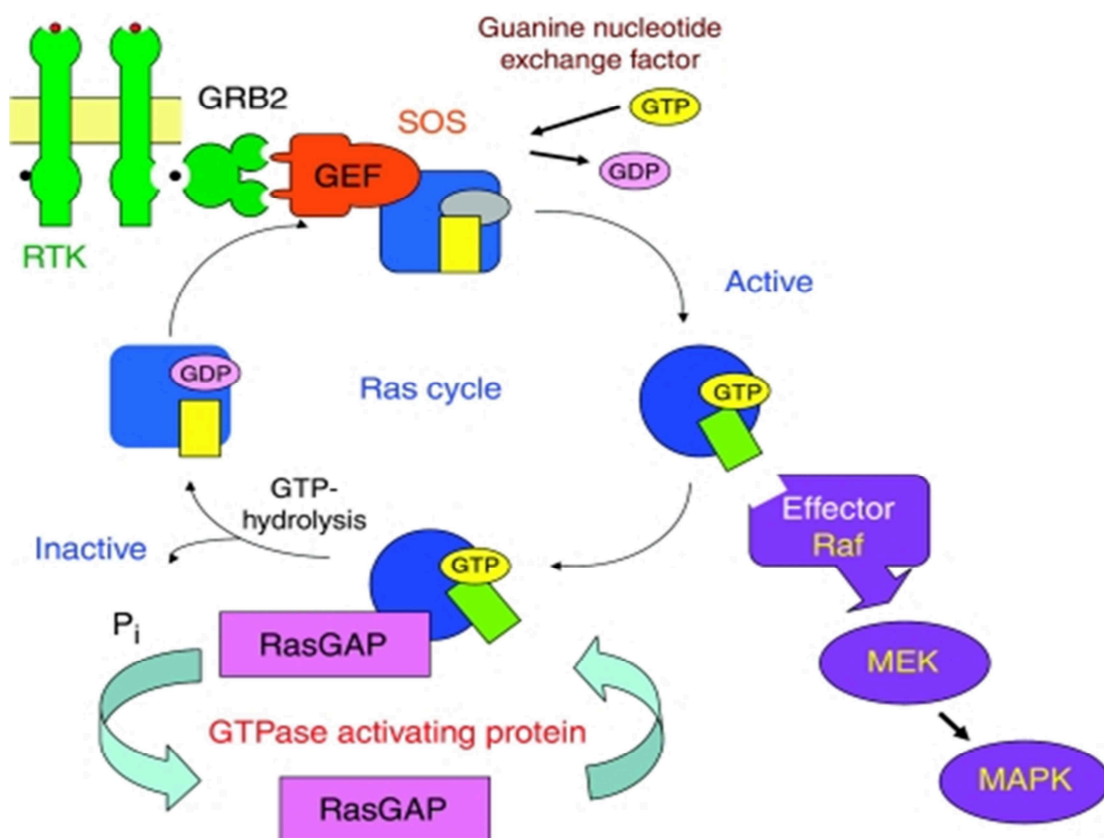


Abbildung 5. Der RAS/RAF/MAPK Signalweg (40).

Jeder einzelne Baustein dieses komplexen Signalweges trägt dazu bei, das Gleichgewicht der Zelle zwischen Proliferation und Apoptose zu halten. Der Funktionsverlust eines Gliedes der Kette könnte somit zur Kaskadenunterbrechung und damit zu pathologischer RAS-Aktivierung führen.

Warum unterschiedliche Tumore meist verschiedene, für ihre Art jedoch typische, Genmutationen dieses Signalweges zeigen ist noch nicht vollständig geklärt. Dass RAS-Mutationen z.B. häufiger als genetische Veränderungen in den darunter liegenden funktionellen Ebenen wie z.B. RAF-Mutationen sind, hat wohl den Grund, dass dies für potenzielle Tumorzellen größere Vorteile schafft. Auf höherer Ebene verzweigt sich die Signalweitergabe wiederum noch auf weitaus mehr weitere Signalwege (26).

Eine Möglichkeit einer pathologischen RAS-Aktivierung besteht in pathologisch aktiviertem GRB2, welches in Folge über ein Überangebot an RAS-GTP zur kontinuierlichen Signalweitergabe führen würde. Bei CML-Patienten ist dies durch das *BCR-ABL* Gen der Fall. Bei der Neurofibromatose hingegen kommt es auf Grund des Verlustes von *NF1* zu einer pathologischen Akkumulation von RAS-GTP.

Im Rahmen des kolorektalen Karzinoms bei der pathologischen RAS-Aktivierung handelt es sich um spezifische Punktmutationen. Punktmutationen stellen auch in der gesamten Onkologie den häufigsten und klinisch relevantesten pathologischen Mechanismus betreffend den RAS/RAF/MAPK Signalweg dar (34).

Die Mutationen führen zu einer Aminosäuresubstitution, welche eine Konformationsänderung der RAS-Proteine bedingt. Die meisten Mutationen treten in den Codonen 12, 13 und seltener in Codon 61 auf. Diese betreffen vor allem die intrinsische GTPase Aktivität. Die schwache Aktivität der GTPase ist begründet in der unzureichenden Möglichkeit den Übergangszustand der Hydrolyse zu stabilisieren. Hierfür ist ein GAP, das P120-GAP, zuständig, welches den Glutaminrest an Position 61 räumlich stabilisiert um das Wassermolekül im Übergangszustand zu koordinieren. Im Falle einer Mutation im Codon 61 kann der Übergangszustand der Hydrolyse nun nicht mehr stabilisiert werden.

Die Mutationen in Codon 12 und 13 führen ebenso, durch Austausch von einem der beiden Glycinreste, zu einer Fixierung des RAS-Proteins in der GTP-gebundenen Form. Der Austausch von Glycin führt zur räumlichen Umorientierung des Glutaminrests 61 und des Argininrests des P120-GAP, welches nun nicht mehr in der Lage ist die GTPase zu aktivieren (26, 34).

Diese Mutationen führen nun alle zu einer unkontrollierten kontinuierlichen Signalweitergabe im RAS/RAF/MAPK Signalweg, vollkommen unabhängig von äußeren Signalen.

Die hohe Frequenz an *K-RAS* Mutationen, die in menschlichen Tumoren und speziell auch im kolorektalen Karzinom gefunden werden kann, zeigt die Bedeutung dieses Gens als Zielangriff für die Therapie (41).

7.2.1 Der PI3K/AKT Signalweg

Die Bindung des Liganden EGF (epidermal growth factor) der Rezeptortyrosinkinase (RTK) EGFR (epidermal growth factor receptor) führt neben der Aktivierung des RAS/RAF/MAPK Signalweges auch zur Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges. Beide Signalkaskaden leiten über Erreichen der Zell DNA Proliferation, Zellmobilität und im Falle von Tumorzellen auch Metastasierung und Neo-Angiogenese ein (42).

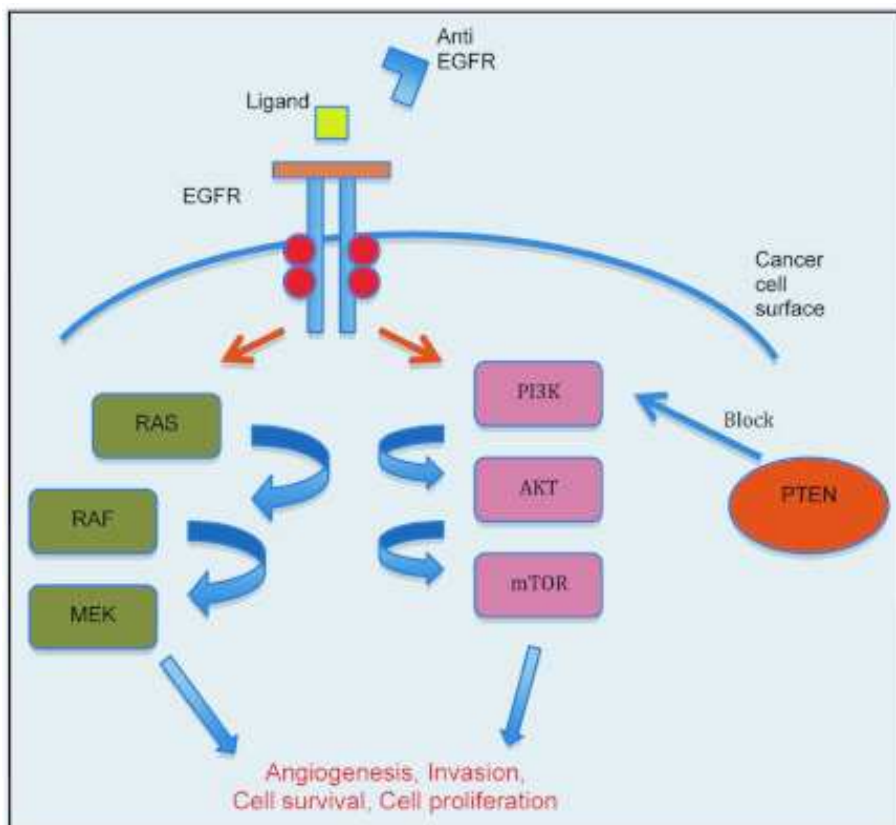


Abbildung 6. Die Bindung von EGF an EGFR und die damit ausgelösten Signalkaskaden (19).

Im Rahmen des PI3K/AKT Signalweges wird durch die Bindung von beispielsweise EGF oder PDGF die Rezeptortyrosinkinase Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) mittels Autophosphorylierung aktiviert. Danach setzt das aktivierte PI3K PIP2 (Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol (3, 4, 5) trisphosphat) um. PIP3 wiederum gibt das Signal an Proteine wie AKT weiter und rekrutiert dieses an die Plasmamembran, wo dieses durch Phosphorylierung aktiviert wird. Aktiviertes AKT führt zu einer Kaskade nachgeschalteter Signale, die am Ende zu Zellwachstum, Metabolismus, Proliferation, Migration, Apoptose und Angiogenese führen.

Einen der wichtigsten Effektoren von AKT stellt die Kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) dar, welches die Proteinsynthese kontrolliert (43).

PTEN (Phosphatase mit Tensin Homologie) reguliert die Schritte der AKT Kinase negativ. Das Hauptsubstrat der Tyrosin-Phosphatase PTEN ist PIP3, welches wieder zu PIP2 dephosphoryliert wird. Ohne PIP3 fällt AKT wieder in einen inaktiven Zustand und ist nicht mehr an der Plasmamembran lokalisiert. Mutationen und damit der Verlust der Funktion von PTEN führen zu einer Akkumulation von aktiviertem AKT, somit gehört PTEN zu den Tumorsuppressorproteinen (44).

Neben der Interaktion mit dem RAS/RAF/MAPK Signalweg, kommt es auch zu Verbindungen zwischen dem PI3K/AKT Signalweg und Östrogen-Rezeptor (ER) Signalwegen, die bei der Entwicklung des Endometriumkarzinoms eine Rolle spielen (43).

Die PI3 Kinasen werden in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt, welche sich in ihrer Struktur und ihren Hauptsubstraten unterscheiden. Bedeutung für die Onkologie haben die PI3Ks der Klasse IA, da sie auch für die Regulation von Zellproliferation und Apoptose zuständig sind. *PIK3CA* codiert für die p110 α Isoform der Klasse IA. Dieses Gen ist in 15-18 % aller kolorektalen Karzinome mutiert. Die meisten dieser Mutationen finden sich in Exon 9 oder Exon 20 und können in den Tumorzellen zusammen mit *K-RAS* oder *B-RAF* Mutationen auftreten (45).

Patienten mit *PIK3CA* Mutationen bei *K-RAS* Wildtyp Stadium I-III kolorektalem Karzinom zeigten eine kürzere karzinomspezifische Überlebenszeit (45).

Der Verlust der Funktion des Tumorsuppressorproteins PTEN konnte ebenfalls mit einer kürzeren Überlebenszeit in Vergleich zu Patienten mit nicht mutiertem *PTEN* bei kolorektalem Karzinom in Verbindung gebracht werden (46).

Dass eine Überexpression von EGFR mit fortgeschrittener Krankheit, schlechter Prognose und mit der Entwicklung von Therapieresistenzen in Zusammenhang steht, konnte mehrmals nachgewiesen werden. 70 – 80 % alle metastasierten kolorektalen Karzinome zeigen eine solche Überexpression (47).

7.3 K-RAS und Therapie

7.3.1 EGFR Antagonisten

Um den ungebremsten Vorgang bei kontinuierlicher Aktivität der EGFR Tyrosinkinase in Tumorzellen zu stoppen konnten 2 Klassen von EGFR Antagonisten entwickelt werden, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) und monoklonale Antikörper (mAbs). Verwendung finden diese für die Behandlung von non small cell lung cancer (NSCLC), Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses, Pankreaskarzinomen sowie für kolorektale Karzinome (42).

EGFR Antagonisten führen nicht nur zur Blockade des Zellwachstums, sondern erreichen auch andere Effekte, unter anderem durch Antiangiogenese-Mechanismen (47).

Die Tyrosinkinaseinhibitoren sind spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinase-Domäne. Gefitinib und Erlotinib sind zwei reversible TKIs, die in der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase binden und damit die Phosphorylierung von EGFR und die folgende Signalkaskade verhindern (42).

Cetuximab und Panitumumab sind monoklonale Antikörper, welche gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle gerichtet sind und so die Bindung des Liganden an den EGFR Rezeptor verhindern (42).

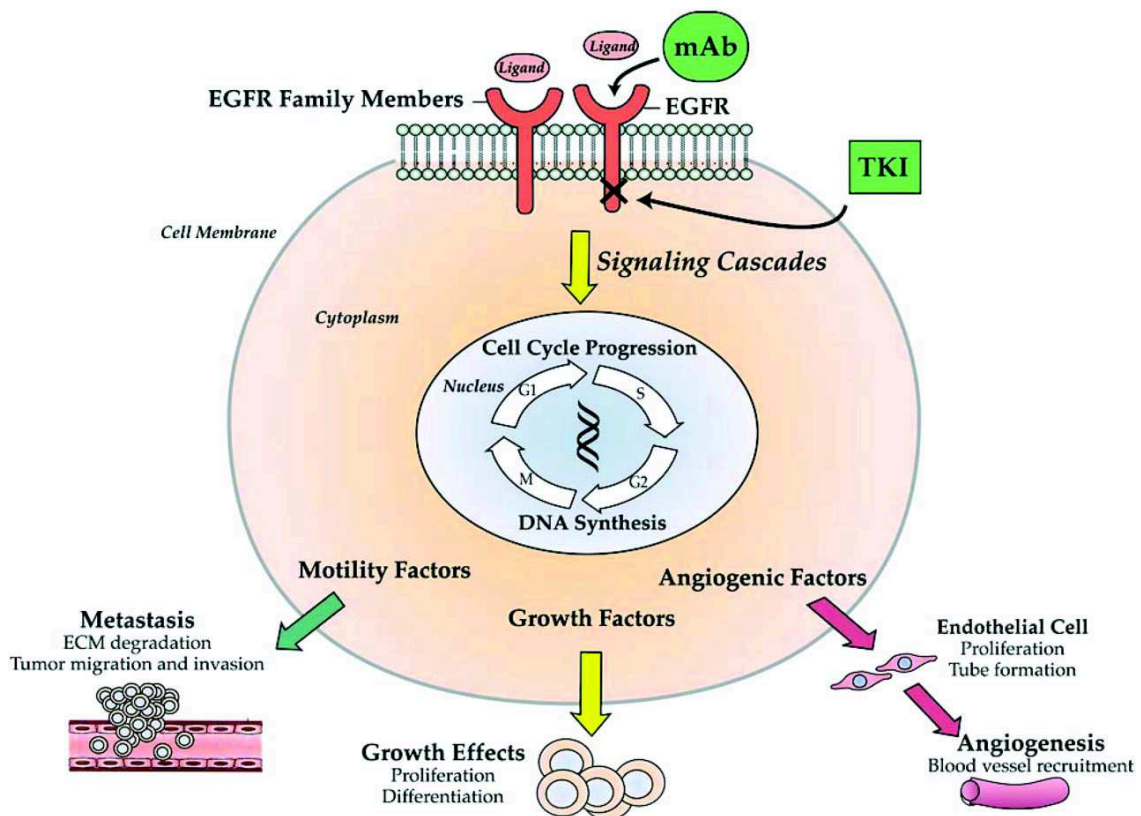


Abbildung 7. Angriffsstellen und Wirkungen der *EGFR* Antagonisten (48).

Die Einführung beider mAbs hat in der Behandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen zu einer Verbesserung des Outcomes der Patienten geführt, unabhängig davon ob sie als alleinige Therapie oder in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika eingesetzt wurden. Die ersten Studien mit Cetuximab und Panitumumab haben jedoch gezeigt, dass nicht alle Patienten mit einer EGFR Überexpression auf diese Therapie ansprechen. Nur 10 % einer unselektierten Gruppe von Patienten mit chemorefraktärem metastasiertem kolorektalem Karzinom (mCRC) haben bei den ersten Studien mit Monotherapie auf die mAbs angesprochen (42).

Die Entwicklung der EGFR Antagonisten stellte zwar einen Meilenstein in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms dar, ein klinischer Nutzen stellte sich jedoch nur für ein sehr kleines Patientengut ein (42).

In weiterer Folge konnten Studien belegen, dass *K-RAS* Mutationen das Ansprechen auf mAbs verhindern. Wenn also dem EGFR Rezeptor nachgeschaltete Proteine im Signalweg wie *K-RAS*, *B-RAF*, *PI3K* oder *PTEN* mutiert sind, wird das Endziel des Signalweges,

nämlich das Zellwachstum, EGFR-unabhängig und kontinuierlich von einem nachgereihten Protein in der Kaskade aktiviert (42).

Gestützt auf systematische Auswertungen hat die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) die Anwendung von mAbs auf Patienten mit kolorektalem Karzinom, welche einen *K-RAS* Wildtyp aufweisen, beschränkt (42).

Jeder für die Therapie in Frage kommender Patient wird nun also auf *K-RAS* Mutationen in Codon 12 und 13 getestet. Verglichen mit den Kosten einer Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab ist dieser Test ökonomischer und die Kosten für diesen sogar weiterhin fallend (49).

Diese Testung hat ermöglicht, die Therapie stärker auf Patienten zu begrenzen, die tatsächlich davon profitieren können. Allerdings sprechen auch von diesem selektierten Patientengut nur 20-40 % auf eine alleinige oder eine Kombinationstherapie mit Cetuximab an.

Weitere Ausschlusskriterien gilt es noch zu ermitteln, wobei die Erforschung eines Einschlusskriteriums wohl effektiver wäre (42).

Ein Aspekt, dem meist keine Beachtung geschenkt wird, ist die Tatsache, dass seltenere, nur wenige Prozent ausmachende Mutationen wie z.B. in Codon 15, 18, 61, und 146, ebenfalls in Zusammenhang mit EGFR Antagonisten Resistenz stehen. Auf diese werden die Tumorzellen jedoch meist nicht untersucht (41).

Aber nicht nur bei *K-RAS* Mutationen, sondern auch im Falle von *B-RAF* Mutationen konnte eine Einstellung des therapeutischen Effekts von mAbs nachgewiesen werden. *B-RAF* Proteine sind dem *K-RAS* Protein in der Signalkaskade nachgereiht und Mutationen führen somit ebenfalls zu einer von EGFR unabhängigen Aktivierung des Signalweges. Da *B-RAF* Mutationen Tumoren ohne *K-RAS* Mutation vorbehalten sind, empfiehlt das NCCN (National Comprehensive Cancer Network) eine optionale Mutationsanalyse von *B-RAF*, um die Entscheidung ob mAbs in das Therapieregime des Patienten zugefügt werden oder nicht, zu optimieren (19).

Die Frage nach molekularen Markern für das Ansprechen auf EGFR mAbs läuft, auf Grund der hohen Anzahl an *K-RAS* Wildtyp, weiter.

Studien zeigen, dass neben *K-RAS* und *B-RAF* Mutationen auch die *PIK3CA* Mutation in Exon 20 primäre Resistenz der Tumorzellen auf EGFR mAbs auslösen könnte (45).

Des Weiteren wird auch ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der PTEN Funktion und dem Ansprechen auf mAbs vermutet (46).

Eine Meta-Analyse der bereits durchgeführten Studien konnte zwar die Bedeutung von *PTEN*, in der Frage ob Cetuximab angewendet werden soll oder nicht, zeigen, jedoch bedarf es weiterer klinischer Studien um präzisere Ergebnisse zu erhalten (50).

Die vollständigen Mechanismen der EGFR Antagonisten Resistenz bei Patienten mit *K-RAS* Mutation ist noch nicht vollständig geklärt. Neue Fragen ergeben sich auch aus Ergebnissen, welche von De Roock et al. veröffentlicht wurden. Demnach zeigen mCRC Patienten mit *K-RAS* Mutation im Codon 13 ein längeres progressionsfreies und ein allgemein längeres Überleben als Patienten mit *K-RAS* Mutationen in anderen Codons, wenn sie mit Cetuximab therapiert werden. Die molekulare Grundlage dahinter bleibt noch unverstanden. Diese Beobachtungen jedoch führen zur Annahme, dass sich bereits auf Grund verschiedener Mutationen im gleichen Gen, Unterschiede in Bezug auf das Ansprechen auf Behandlungen ergeben (42).

Nicht nur EGFR Antagonisten, auch andere Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren sollen in der Tumorthherapie Anwendung finden. Welchen Effekt *K-RAS* Mutationen auf andere RTK bezogene Therapien ausüben ist noch unklar. Möglicherweise sind *K-RAS* mutierte kolorektale Karzinome unabhängig von sämtlichen RTKs und somit resistent gegen all diese Therapiemöglichkeiten, die hier angreifen sollen.

Andererseits könnte die *K-RAS* Mutation auch nur einen Teil der Überlebensvoraussetzungen, den die Tumorzellen benötigen, ausmachen. Andere wichtige Signale könnten zusätzlich von RTK Kaskaden vermittelt werden, welche *K-RAS* mutierte Tumore auf verschiedene RTK Inhibitoren weiterhin sensibel machen würden (45).

7.3.2 RAS und die Farnesyltransferaseinhibitoren

Einen möglichen Zielangriffsort für die Tumorthherapie stellt der Aktivierungsschritt der RAS-Proteine im Rahmen der posttranslationalen Modifikation dar. Das Anhängen der Farnesylgruppe durch die Farnesyltransferase (FT) soll medikamentös verhindert werden und somit auch die Verankerung von RAS in der Zellmembran selbst (51).

Viele Jahre wurde an der Herstellung solcher Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) gearbeitet und viele haben es auch bis zur Phase III klinischer Studien gebracht. Zellkulturen und Tiermodelle konnten in der präklinischen Testphase vielversprechende Ergebnisse zeigen, auch die Nebenwirkungen des neuartigen Medikaments schienen absolut tolerabel zu sein. Ein starker Rückschlag war allerdings die Erkenntnis, dass der Therapieeffekt unerwartet gering ausfiel. Die Empfindlichkeit der Model Tumore, die durch *H-RAS* Mutationen ausgelöst worden waren, war zwar sehr groß, allerdings konnte man bei vorhandenen *N-RAS* und *K-RAS* Mutationen nur enttäuschende Ergebnisse erzielen. Angesichts der Tatsache, dass *K-RAS* die häufigste aller *RAS* Mutationen in menschlichen Tumoren darstellt, kein positives Resultat (51).

Die Ursache der Unwirksamkeit erklärt sich durch die der FTI verwandten Geranylgeranyltransferase I. Sie kann deren Aufgabe bei Blockade für die Modifizierung von *N-RAS* und *K-RAS* übernehmen, jedoch nicht für *H-RAS*.

In weiterer Folge erkannte man ebenfalls, dass die Wirksamkeit der FTIs nicht in Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer *RAS* Mutation stand. Dies führte zur Annahme, dass man mit Farnesyltransferaseinhibitoren nicht nur den Aktivierungsschritt der posttranslationalen Modifikation, sondern auch einen anderen, zur Tumorpherifation fñhrenden Vorgang, blockieren kann. Eine Suche nach diesem weiteren Substrat der FTI hat damit begonnen (51).

Großes Interesse gilt auch der Entwicklung von Geranylgeranyltransferase I (GGTI) Inhibitoren, um die alternative Modifizierung von *N-RAS* und *K-RAS* zu blockieren (51). Einige andere Proteine, die *RAS* in den Signalkaskaden nachgereiht sind, werden ebenfalls von der GGT modifiziert. Zu diesen zählen unter anderem *RHOA*, *ROHC*, *RAP1* und *RAL* (52).

In präklinischen Studien konnte mit GGITs ein Zellzyklusarrest in G1 und Apoptose erreicht werden. Des Weiteren konnte, wie auch für die FTIs, die erwartete Toxizität dieser Medikamente nicht bestätigt werden. Es stellt sich nun auch die Frage ob die Kombination beider Transferaseinhibitoren erreicht werden kann, ohne inakzeptable toxische Reaktionen hervorzurufen (51).

Das Ziel der nächsten Jahre muss es also sein eine immer besser maßgeschneiderte Therapie auf die individuellen molekularen Eigenschaften eines jeden Tumors abzustimmen (42).

Ein noch besseres Verständnis der Signalwege, die durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen in Gang gesetzt werden, ist die Voraussetzung dafür (45).

7.4 K-RAS und Diagnose

K-RAS Mutationen wird man sich in Zukunft nicht nur als therapeutischen Ansatzpunkt zu Nutze machen, *RAS*-Gene bieten sich auch als molekulare Marker für die Diagnostik an. Die Vorteile des Gens liegen in dessen Kürze, in der hohen Mutationsrate und der Begrenzung der Anzahl und Positionen der möglichen Mutationen. Mittels PCR lassen sich die Mutationen nicht nur in Gewebeproben, sondern auch in Körperflüssigkeiten sensitiv und spezifisch nachweisen. Ein Nachweis gelang zuallererst in Stuhlproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom. In den anschließend chirurgisch entfernten Tumoren konnte der Mutationsbefund dann bestätigt werden. In Folge ergab sich die Möglichkeit, durch Analysen des Sputums, Pankreassafts oder Urins die Diagnose von Lungen-, Pankreas- und Blasenkarzinom zu erleichtern (26, 34).

Unser Plasma und Serum führt ebenfalls kleine Mengen an nicht-zellgebundener DNA mit sich. Genetische Veränderungen von Tumorzellen können somit auch in Serum- und Plasmaproben detektiert werden, da der Tumor, im Rahmen der Zellalterung, DNA in die Blutzirkulation abgibt. Die Mutationen dieser DNA sind in den meisten Fällen mit denen, die im Tumorgewebe gefunden werden können, ident. So konnten bereits *K-RAS*, *APC* und *P53* Mutationen sowie MSI und LOH in der frei zirkulierenden DNA (cfDNA) von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachgewiesen werden (53).

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde derart weiterentwickelt, so dass nun auch schon extrem kleine Mengen an Tumor-cfDNA detektiert werden können. Des Weiteren stehen Techniken zur Quantifizierung zur Verfügung, die somit auch die Erfassung der Tumordynamik erlauben (53).

Die Bewertung der DNA, wie sie zurzeit aus Formalin-fixierten und in Paraffin-gebetteten (FFPE) Biopsien oder Resektionsmaterialien gewonnen wird, funktioniert nicht immer problemlos. Unter Umständen kann nicht ausreichend aussagekräftige DNA aus solchen FFPE Proben gewonnen werden. Degeneration der DNA auf Grund der Fixierung und Einbettung sowie kalte Ischämie und verspätete Fixierung können ebenfalls Ursache einer Unbrauchbarkeit sein (54).

Probleme, die mittels PCR vermieden werden könnten.

Die effizienteste und prognostisch wichtigste Behandlung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom stellt die chirurgische Resektion dar. Die frühzeitige Detektion eines Rezidivs oder einer Progression der Erkrankung ist somit eine der Hauptaufgaben in der Behandlung der onkologischen Patienten. Tumormarker wie CEA oder CA 19-9 finden derzeit neben CT, PET und MR Anwendung für diese Fragestellungen (55).

Ebenso für diesen Aufgabenbereich könnte die cfDNA große Verbesserungen bringen.

In einer klinischen Studie wurde bei Patienten vor einer chirurgischen Intervention Tumor cfDNA auf das Vorhandensein einer bestimmten Mutation wie *APC*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA* oder *B-RAF* untersucht, welche man zuvor auch im Primärtumor finden konnte. Nach einer Woche und in weiteren monatlichen Abständen nach der Operation wurde die cfDNA der Patienten evaluiert. Die Ergebnisse konnten cfDNA nicht nur als brauchbaren Marker für die Nachsorge von Patienten mit kolorektalem Karzinom bestätigen, sondern auch zeigen, dass das cfDNA Level in Zusammenhang mit dem klinischen Status der Patienten steht.

Der cfDNA Status korreliert zwar nicht mit dem Tumorstadium, wenn man diesen zwischen verschiedenen Patienten vergleicht, jedoch kann er in jedem Patienten den individuellen Krankheitsverlauf spiegeln. In weiteren klinischen Studien soll nun der Vermutung, einer besseren Verwertbarkeit von cfDNA Spiegeln im Vergleich zu CEA und CA 19-9 Spiegeln in der Nachsorge, nachgegangen werden (55).

In einer größer angelegten Studie konnte ein deutlich schlechteres Outcome von Patienten mit einem hohen Level an mutierter cfDNA gezeigt werden, wobei auch ein großer Unterschied zwischen einem hohen und einem niedrigen Level an *K-RAS* mutierter cfDNA bestand. Mit den Ergebnissen der Studie ergab sich die Hypothese, dass Patienten mit

niedrigem Plasma mutant *K-RAS* Level (pm*K-RAS*) noch immer von einer EGFR Antagonisten Therapie profitieren könnten. Diese werden bis jetzt auf Grund der Gewebsanalyse von der Therapie ausgeschlossen. In zukünftig angelegten Studien wird nun geprüft werden, ob man für diese Fragestellung die Gewebsanalyse durch eine gezielte pm*K-RAS* Analyse ersetzen kann (56).

Schlussendlich kann davon ausgegangen werden, dass die Verwertung von cfDNA aus Serum- und Plasmaproben höchstwahrscheinlich große klinische Bedeutung für die Diagnose, Prognose und die frühzeitige Detektion eines Rezidivs erlangen und die derzeitigen Screeningverfahren, die eine limitierte Sensitivität und Spezifität aufweisen, teilweise ablösen wird.

7.5 *K-RAS* und Prognose

Der prognostische Wert der *K-RAS* Mutation bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ist bereits seit einiger Zeit Thema vieler klinischer Studien. Bis jetzt konnte aber noch kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Ein reduziertes krebsspezifisches Überleben konnte in einigen Studien mit *K-RAS* Mutationen in Verbindung gebracht werden. Andere Studien hingegen konnten in dieser Hinsicht keine Korrelation feststellen (57).

Die Ursache für die kontroversen Ergebnisse liegt möglicherweise in verschiedenen Bereichen wie Studiengröße, Patientenselektion, Eigenschaften der Tumorgewebsprobe, Laboreigenschaften, unterschiedlichen Datenanalysen und vor allem in den Patientencharakteristika (58).

Eine durchgeführte Metaanalyse der bisher publizierten Studien, die die Beziehung zwischen *K-RAS* Mutation und der Prognose für den Patienten untersucht haben, machte es sich zum Ziel, darüber eine präzisere Beurteilung abgeben zu können. Für die Analyse konnten 23 geeignete Studien eingeschlossen werden. Ausgeschlossen wurden Studien mit Datensätzen von Patienten, welche präoperative Chemotherapie oder Radiotherapie erhielten. Um den bestätigten Überlebensvorteil bei Patienten ohne *K-RAS* Mutation mit Cetuximabtherapie zu relativieren, versuchte man auch diese Studien aus der Übersichtsarbeit auszuschließen (57).

Von nun insgesamt 4687 Patienten konnte bei 1364 Patienten eine *K-RAS* Mutation festgestellt werden. Dies entsprach einem Anteil von 29.10%. Bemerkenswert ist, dass die Mutationen in 99.9% (1363 von 1364) in Codon 12 und 13 detektiert wurden. Eine einzige Mutation wurde Codon 61 zugeordnet.

Von den eingeschlossenen Studien und deren Datensätzen konnten 9 zeigen, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *K-RAS* Mutationen und einem schlechterem Outcome der Patienten mit kolorektalem Karzinom besteht. Des Weiteren konnte eine Assoziation von *K-RAS* Mutation mit schlechterem Langzeitüberleben in einer Studie bestätigt werden. Jedoch scheiterten ganze 15 Studien daran jeglichen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Mutation und der Prognose nachzuweisen. Eine Studie wies sogar das Ergebnis auf, dass Patienten mit *K-RAS* mutiertem kolorektalem Karzinom ein besseres Überleben zeigen.

Die systematische Übersichtsarbeit kam zu dem Endresultat, dass *K-RAS* Mutationen keinen signifikanten Zusammenhang mit der Prognose von Patienten aufweisen. Dieses Ergebnis blieb vor und nach der Anpassung an einen möglichen Publikationsbias. Auch brachte die Entfernung von einzelnen Datensätzen aus der Meta-Analyse keine Veränderungen des Resultats mit sich (57).

Den Zusammenhang zwischen Mutation in Codon 12 und der Prognose beim kolorektalen Karzinom betrachtet die systematische Übersichtsarbeit ebenfalls gesondert. Obwohl sich anfangs eine negative Auswirkung auf das Überleben als signifikant herausstellte, konnte dies nach Anpassung des Publikationsbias nicht mehr bestätigt werden und stellte sich als nicht signifikant dar.

Bei *K-RAS* Mutationen im Codon 13 konnte bei Verwendung von PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) oder PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) als Methode der Mutationsdetektion eine signifikante Verschlechterung im krebspezifischen Überleben beobachtet werden. Die Aussagekraft dieses Zusammenhangs wird allerdings durch die kleine Anzahl an Proben limitiert (57).

Der Vergleich des Outcomes von Mutationen in den verschiedenen Codons gibt, ebenso wie der Aussagewert unterschiedlicher Mutationsdetektionsarten, eine interessante Fragestellung für zukünftig größere Studien in diesem Bereich vor (57).

Studien, die sich der Frage des Einflusses des Codons, in welchem die *K-RAS* Mutation auftritt, bereits angenommen haben, zeigen Ergebnisse, die motivieren sich diesem Thema weiterhin anzunehmen.

Bazan *et al* zeigte, dass eine *K-RAS* Mutation in Codon 13 ein unabhängiger Risikofaktor für Rezidiv und Mortalität ist (59).

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer früheren Studie von Samowitz *et al*, die zeigte, dass die Codon 13 Mutationen während der ersten 7 Follow-up Jahre eine signifikant höhere Mortalitätsrate aufwiesen (60).

In einer Studie mit einer großen Patientengruppe aus Saudi Arabien konnten *K-RAS* Mutationen mit einem schlechteren krebsspezifischen Überleben bei kolorektalem Karzinom assoziiert werden und somit als unabhängiger prognostischer Marker eingestuft werden.

Im Gegensatz zu Bazan *et al* und Samowitz *et al* waren in dieser Studie *K-RAS* Mutationen in Codon 12 mit einem schlechteren Outcome assoziiert. Die 5-Jahresüberlebensrate lag bei Codon 12 Mutationen nur bei 64,4 %, dem gegenüber stand eine 5-Jahresüberlebensrate von 75,8% bei Codon 13 Mutationen und 78,2% bei *K-RAS* Wildtyp (35).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht auch die RASCAL II (The Kirsten ras in colorectal-cancer collaborative group) Studie. Diese beruht auf Daten über *K-RAS*, welche Wissenschaftler weltweit zusammengetragen und in eine gemeinschaftliche Datenbank namens RASCAL eingefügt haben.

Es wurde nicht nur das Outcome von Mutationen in Codon 12 und 13 verglichen, sondern die 12 verschiedenen Punktmutationen, welche in den jeweiligen Codons auftreten können, differenziert betrachtet (61).

Bei Codon 12 Mutationen handelt es sich immer um einen Aminosäureaustausch, bei dem Glycin durch eine andere Aminosäure ersetzt wird. Zu diesen gehören die *G12S* (Serin), *G12D* (Aspartat), *G12C* (Cystein), *G12V* (Valin), *G12R* (Arginin) und *G12A* (Alanin).

Bei Codon 13 und 61 handelt es sich um jeweils nur einen Aminosäureaustausch, *G13D* (Aspartat) und *Q61H* (Histidin ersetzt Glutamin) (61).

Der differenzierte Vergleich führte zu dem Resultat, dass nur eine einzige Punktmutation in Codon 12 mit einer statistisch signifikanten Verschlechterung im krebsspezifischen Überleben assoziiert ist und das Risiko für ein Rezidiv oder Tod um 30 % erhöht.

Dabei handelte es sich um die *G12V* Mutation, bei welcher ein Basenaustausch zum Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin führt. Sie konnte bei 8.6% aller Patienten gefunden werden (61).

Dass verschiedene Codon 12 und 13 Mutationen eine unterschiedliche Prognose für die Patienten bedeuten, hat auch die Studie von Deschoolmeester *et al* gezeigt. Die Ergebnisse hingegen konnten nicht die *G12V*, sondern nur die *G12C* (Austausch der Aminosäure Glycin durch Cystein) Mutation als statistisch signifikanten Risikofaktor für ein schlechteres krebsspezifisches sowie krankheitsfreies Überleben belegen. Auf Grund der geringen Anzahl von 164 Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom, die in diese Studie eingeschlossen wurden, und der damit verbundenen geringen Anzahl der einzelnen Mutationen, von welchen manche gar nur einmal vorkamen, sind diese Ergebnisse allerdings mit Vorsicht zu betrachten (37).

Eine Studie aus Basel verglich unter anderem das Outcome von Patienten mit *G13D*, *G12D*, *G12V* Mutationen und *K-RAS* Wildtyp. Es wurden Gewebeproben von insgesamt 404 Patienten mit kolorektalem Karzinom evaluiert.

Verglichen mit allen anderen Patienten zeigten jene mit *K-RAS G12D* Mutationen die schlechteste Prognose. Ein statistisch signifikanter Unterschied im krebsspezifischen Überleben konnte zwischen *G12D* und *G13D* bzw. *G12D* und *G12V* Mutationen eruiert werden. Ebenfalls signifikant war der Unterschied zwischen *G12D* Mutationen und *K-RAS* Wildtyp. Ohne signifikanten Unterschied blieben *K-RAS* Wildtyp und *G12V* bzw. Wildtyp und *G13D* Mutationen (62).

Daten von 342 österreichischen Patienten, welche alle eine radikale chirurgische Operation als Therapie erhielten, wurden in einer Studie auf unterschiedliche *K-RAS* Mutationen und deren Zusammenhang mit dem krebsspezifischen Überleben ausgewertet. Die Gewebeproben wurden auf Mutationen in Codon 12, 13 und 61 untersucht und ergaben eine *K-RAS* Mutationsfrequenz von 28%. Bei 21,7% der Patienten fand man eine Mutation in Codon 12, bei 5,8% in Codon 13 und bei 0,6% in Codon 61.

G12D war mit 31,2% aller *K-RAS* Mutationen am häufigsten in dieser Studie vertreten.

Das krebsspezifische Überleben jeder *K-RAS* Mutation wurde mit dem krebsspezifischen Überleben bei *K-RAS* Wildtyp verglichen und ergab nur bei *G12V* eine statistisch signifikante Erniedrigung. Kombinierte man alle Mutationen, ausgenommen *G12V*, konnte verglichen mit dem Wildtyp sogar eine signifikante Verbesserung im krebsspezifischen Überleben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte das schlechteste Ergebnis im krebsspezifischen Überleben erzielt werden, wenn man die anderen Mutationen mit dem *K-RAS* Wildtyp zusammenlegte und diese mit der *G12V* Mutation verglich. Das beste Ergebnis konnte für die übrigen Mutationen beim Vergleich mit *K-RAS* Wildtyp in Kombination mit *G12V* Mutationen erreicht werden.

Mit Hilfe von Kaplan-Meier-Überlebenskurven konnte die Reihenfolge *K-RAS* Mutationen ausgenommen *G12V*, *K-RAS* Wildtyp und *G12V* Mutationen für das beste krebsspezifische Überleben bestätigt werden (63).

Dass verschiedene *RAS* Mutationen unterschiedliche Effekte auf Signalwege ausüben und damit auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren haben, ist bereits bekannt. In diesen Studien wurde aber auch gezeigt, dass sogar die Heterogenität der *K-RAS* Mutationen zu unterschiedlichen Wirkmechanismen führt und damit in Folge statistisch signifikante Unterschiede in der Prognose der Patienten beobachtet werden können (61, 63).

Eine mögliche Erklärung findet sich in den experimentellen Ergebnissen von Al-Mulla et al, die bereits 1999 publiziert wurden.

Die Guanosintriphosphatase (GTPase) der *RAS* Proteine ist hauptverantwortlich für die Überführung vom aktiven in den inaktiven Zustand, indem sie das gebundene GTP zu GDP hydrolysieren. Die GTPase Aktivität ist allgemein sehr schwach und muss zuvor durch GAPs (GTPase aktivierenden Proteinen) stimuliert werden (64).

Bei *G12V* mutierten *K-RAS* Proteinen beträgt die Grundaktivität der GTPase nur mehr ein Zehntel von jener der Wildtyp Proteine. Im Gegensatz dazu zeigen *G12D* mutierte *K-RAS* Proteine sogar noch eine viermal stärkere Aktivität als *G12V* Proteine.

Bei Wildtyp Proteinen wird die Aktivität durch GAPs 100-mal verstärkt, auf Grund von strukturellen Änderungen kann bei *G12V* und *G12D* mutierten Proteinen allerdings keine Stimulation der GTPase durch GAPs stattfinden.

Es ist zu erwarten, dass diese Eigenschaften zu einer geringen Aktivität der GTPase bei *G12V* und *G12D* Proteinen führen und somit zu einem kontinuierlich aktiviertem RAS Protein beitragen (64).

Noch größeren Einfluss scheint allerdings die GTP Affinität für *RAS* Proteine zu haben. GTP bindet sowohl an Wildtyp Proteine, sowie an *G12V* Proteine stark. Die GTP Affinität für *G12D* ist allerdings gering und ermöglicht dem Protein auf diesem Weg den Austritt aus dem aktiven GTP gebundenen Zustand (64).

Des Weiteren geht man von zusätzlichen strukturellen Veränderungen aus, welche die Signalweitergabe an die nachfolgenden Proteine der Kaskade abändern können.

Diese molekularen Grundlagen sind somit wahrscheinlich Erklärung für das differierende karzinogene Potential und der daraus folgenden unterschiedlichen Prognosen der *K-RAS* Mutationen (64).

Eine US-amerikanische Studie schloss 1.075 Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom, welche einen *B-RAF* Wildtyp aufwiesen, ein.

Wie oben erwähnt sind *B-RAF* Proteine dem *K-RAS* Protein in der Signalkaskade nachgereiht und führen bei Mutationen ebenso zu einer unabhängigen Aktivierung des *RAS/RAF/MAPK* Signalweges. *B-RAF* Mutationen treten bis auf wenigen Ausnahmen nur bei *K-RAS* Wildtyp auf. *B-RAF* mutierte kolorektale Karzinome sind jedoch mit einer schlechteren Prognose als Tumore mit *B-RAF* Wildtyp assoziiert.

Um die Prognose bei *K-RAS* Wildtyp und *K-RAS* mutierten kolorektalen Karzinomen miteinander zu vergleichen, wollte man den Einflussfaktor *B-RAF*, welcher sich negativ auf das Outcome bei *K-RAS* Wildtyp auswirkt, ausschalten.

Der negative prognostische Effekt, welchen Patienten mit mutiertem *B-RAF* Karzinom in einer *K-RAS* Wildtyp Kontrollgruppe aufweisen, schwächt den Effekt, den der *K-RAS* Mutationsstatus auf das krebsspezifische Überleben ausübt, sozusagen ab. Der eigentliche onkogene Effekt von *K-RAS* Mutationen muss also unter Kontrolle von *B-RAF* beurteilt werden (65).

Von den 1.075 eingeschlossenen Patienten konnten bei 451 *K-RAS* Mutationen in Codon 12 und 13 festgestellt werden.

Die karzinomspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit belief sich bei Patienten mit *K-RAS/B-RAF* Wildtyp auf 81,5%, bei denjenigen mit *K-RAS* Codon 12 Mutation/*B-RAF* Wildtyp auf 68,8% und 75,3% bei *K-RAS* Codon 13 Mutation/*B-RAF* Wildtyp.

Sowohl im Kaplan-Meier Verfahren, wie auch in der Cox Regression, wiesen Patienten mit Codon 12 Mutationen verglichen mit *K-RAS* Wildtyp eine statistisch signifikant schlechtere Prognose im krebsspezifischen Überleben auf. Bei Codon 13 Mutationen ergab sich keine signifikante Verkürzung im Überleben.

Verglich man die verschiedenen Codon 12 und 13 Mutationen einzeln mit *K-RAS* Wildtyp so ergab dies eine erneute statistisch signifikante Erhöhung der karzinomspezifischen Mortalität für *G12V* Mutationen.

Des Weiteren konnten auch *G12R* Mutationen mit einer höheren Mortalität assoziiert werden (65).

Um den Einfluss auf die Ergebnisse bei Einschluss von *B-RAF* mutierten kolorektalen Karzinomen abschätzen zu können, wiederholte man die Analysen mit diesen zusätzlichen 180 Patientendaten. Dies führte in einer multivariaten Analyse zu dem Ergebnis, dass Codon 12 Mutationen keine statisch signifikante Verschlechterung in der Prognose zeigten. Das berechnete Hazard Ratio Ergebnis für *G12R* und *G12V* Mutationen stellte sich ebenfalls als wesentlich abgeschwächt dar (65).

Zu beachten ist in dieser Studie, dass Informationen über chemotherapeutische und chirurgische Therapien nicht berücksichtigt wurden. Insbesondere EGFR mAbs, welche in letzter Zeit nur mehr für Patienten mit *K-RAS* Wildtyp Anwendung finden, verbessern die Prognose für diese Subgruppe. *B-RAF* mutierte Tumore sind neuen Erkenntnissen zufolge resistent gegenüber der Wirkung von mAbs (65).

Allerdings wurde bei den meisten eingeschlossenen Patienten die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms schon in den 1990ern und später gestellt und damit noch vor 2006, also bevor *K-RAS* einen Stellenwert als prädiktiver Tumormarker erlangte (65).

In Zukunft werden wohl die Beachtung aller molekularen Eigenschaften eines Tumors und damit das Prinzip des Tumors als Unikat einen immer größeren Stellenwert in der Prognosestellung und Behandlung jedes einzelnen Patienten erlangen.

Den Ergebnissen von De Roock *et al* zu entnehmen, sollten in Zukunft sogar die verschiedenen Mutationen innerhalb eines einzelnen Gens in Hinblick auf die EGFR mAbs Therapie Beachtung finden (66).

Obwohl sich bereits sehr viele Studien der Erfassung von Unterschieden in der Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom in Abhängigkeit des *K-RAS* Status angenommen haben, konnten bis jetzt keine eindeutigen Ergebnisse dargelegt werden.

Allgemein gültige Aussagen mit Hilfe von Daten eines großen Patientenkollektivs sind das angestrebte Ziel.

In unserer retrospektiven Studie mit insgesamt 643 Patienten machten wir uns es zur Aufgabe, die Hypothese, dass ein Unterschied im krebsspezifischen Überleben bei Patienten mit *K-RAS* Mutation besteht, zu belegen, sowie weitere wichtige klinisch pathologische Parameter im Hinblick auf Assoziationen zu untersuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Studienkollektiv

Wir führten eine retrospektive Analyse durch, bei der Daten von 643 Patienten mit kolorektalem Karzinom eingeschlossen wurden.

Dabei wurden alle kolorektalen Karzinome, welche zwischen 2005 und 2011 an der Klinischen Abteilung für Onkologie am LKH Graz, sowie im LKH Fürstenfeld und LKH Leoben behandelt wurden und für die eine *K-RAS* Mutationstestung am Institut für Pathologie Graz durchgeführt wurde, in die Datenbank aufgenommen.

Die Daten wurden retrospektiv aus den gespeicherten Patientenbefunden des Krankenhausinformationssystems MEDOCS im Universitätsklinikum Graz erhoben.

Das Todesdatum aller Patienten, welche bis 31.12. 2011 verstorbenen sind, wurde vom Zentralregister der Statistik Austria zur Berechnung herangezogen, die späteren Todeszeitpunkte wurden über das Medocs abgeleitet. Diese retrospektive Untersuchung wurde durch die Ethikkommission der Med. Universität Graz bewilligt (24-388 ex 11/12).

Folgende klinische Parameter wurden von jedem Patienten erhoben:

- Geschlecht
- Behandlungszentrum
- Tumorlokalisation
- Operationsdatum
- Grading
- TNM Stadium
- Ergebnis: *K-RAS* Mutation + Wert
- Letztes ‚Follow up‘
- Todesdatum bei bereits verstorbenen Patienten

Das krebsspezifische Überleben (CSS) wurde als die Zeit, vom Operationsdatum bis zum Ereignis des tumorspezifischen Tod, in Monaten definiert.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz überprüft und freigegeben (24-388 ex 11/12).

2. Statistische Auswertung

Das Hauptziel der Studie war es Unterschiede hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens bei Patienten mit *K-RAS* Wildtyp und mit *K-RAS* Mutationen zu untersuchen und dabei auch Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern zu berücksichtigen. Die Nullhypothese war, dass kein Unterschied im krebsspezifischen Überleben zwischen *K-RAS* Wildtyp und *K-RAS* mutierten Patienten besteht.

Alle statistischen Analysen erfolgten mittels Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Zur Beschreibung unsers Kollektivs sind für alle erhobenen Parameter die Häufigkeitsverteilungen in Form von Tabellen mittels deskriptiver Statistik berechnet worden.

Zur Berechnung, ob eine Assoziation zwischen der Häufigkeit des Auftretens zwischen *K-RAS* Wildtyp / *K-RAS* Mutation in Codon 12/ *K-RAS* Mutation in Codon 13 und anderen klinisch-pathologischen Parametern besteht, wurden Kreuztabellen verwendet. Es wurden damit die Häufigkeiten und die prozentuellen Werte beschrieben und diese danach mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson verglichen. Signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten wurden bei einem P-Wert kleiner 0,05 angenommen.

Durch Bestimmung von verschiedenen Variablen des Patientenkollektivs (Geschlecht, *K-RAS* Wildtyp/Mutation, Grading, T-Stage und M-Stage) konnte mittels Kaplan-Meier-Kurven beurteilt werden, ob sich verschiedene Parameter einer bestimmten Variablen innerhalb der einzelnen Gruppen hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens unterscheiden.

Zur Berechnung ob ein signifikanter Unterschied besteht, wurde auf Grund mehrerer Gruppen, der paarweise log-rank Test angewandt. Ein signifikanter Unterschied wurde wiederum bei einem P-Wert kleiner 0,05 angenommen.

Zum Abschluss wurde mittels multivariater Cox Analyse überprüft, ob die Variablen, die im log-rank Test als signifikant für das krebsspezifische Überleben identifiziert wurden, unabhängige prognostische Werte darstellen.

Eine signifikante Assoziation wurde wiederum bei einem P-Wert kleiner 0,05 angenommen.

Gestützt auf die Cox Regressionsanalyse wurden die Hazard Ratios (HRs) berechnet.

Hazard Ratios (HRs) zeigen an, um wie viel das Risiko für das Versterben höher ist, wenn die Ausprägung einer Variablen mit einer als Referenz definierten Ausprägung verglichen wird.

Die den HRs korrespondierenden Konfidenzintervalle von 95% wurden ebenfalls berechnet. Sie geben die Streuung des Risikobereichs an.

III. ERGEBNISSE

1. Patientendaten

Daten über das Geschlecht, den Behandlungsort, die Tumorlokalisation und das M-Stadium konnte von allen 643 Patienten erhoben werden. Zur Berechnung der Häufigkeiten des *K-RAS* Status lagen Daten von 642 Patienten vor.

Informationen über das Grading konnte bei insgesamt 615 Patienten dokumentiert werden, betreffend das T-Stadium betrug die Anzahl der Patienten 472.

Von den insgesamt 643 Patienten waren 221 weiblich (34,4%) und 422 männlich (65,6%)

Die Häufigkeiten des *K-RAS* Wildtyp und der verschiedenen *K-RAS* Mutationen sind in Diagramm 1 ersichtlich.

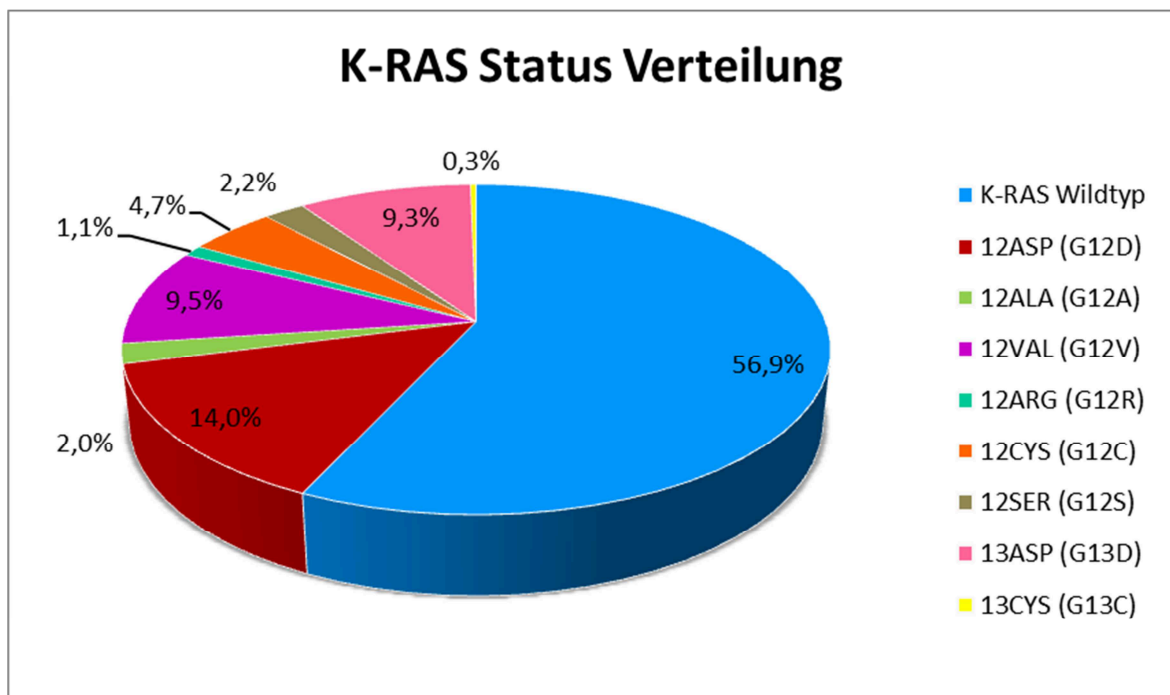


Abbildung 8. Häufigkeitsverteilung des *K-RAS* Status.

In Hinblick auf den *K-RAS* Status standen von den 643 (100 %) Patienten von 642 (99,8 %) Informationen zur Verfügung. Davon waren bei 366 (56,9 %) ein *K-RAS* Wildtyp nachweisbar, bei 276 (42,9 %) Patienten eine *K-RAS* Mutation.

Von den drei Behandlungsorten wurden am LKH Graz mit einem Anteil von 64,9 % (N=417) die meisten Patienten betreut. Auf das LKH Leoben und das LKH Fürstenfeld verteilten sich 18,5 % (N=119) bzw. 16,6 % (N=107).

Bei der Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation konnten die meisten kolorektalen Karzinome mit insgesamt 257 Fällen (40 %) dem Rektum zugeschrieben werden. Ein annähernd gleich hoher Anteil von 35,3 % (N=227) fand sich im Colon ascendens und descendens. Dahinter folgte das Sigma mit 112 Fällen (17,4 %). Den kleinsten Anteil machte das Caecum mit 7,3 % (N=47) aus.

In Bezug auf das Grading konnte Grad 1 bei 41 (6,4 %), Grad 2 bei 440 (68,4 %), Grad 3 bei 131 (20,4 %) und Grad 4 bei 3 (0,5 %) Patienten dokumentiert werden. Für die Auswertung dieser Häufigkeitsverteilung standen uns von den insgesamt 643 (100 %) Patienten die Informationen von 615 (95,7 %) Patienten zur Verfügung.

Bei insgesamt 472 (73,4 %) von 643 (100 %) Patienten konnte das T-Stadium nach der TNM Klassifikation beschrieben werden. Die Häufigkeitsverteilungen zeigten für das T1 Stadium einen Anteil von 2,3 % (N=15), für das T2 Stadium einen Anteil von 3,9 % (N=25), für das T3 Stadium einen Anteil von 39,5 % (N=254) und für das T4 Stadium einen Anteil von 27,7 % (N=178).

Bei mehr als der Hälfte unseres Patientenkollektivs fanden sich bereits zu Diagnosezeitpunkt Fernmetastasen. Das M1 Stadium belief sich auf 52,4 % (N=337). Keine Metastasen zu Diagnosezeitpunkt bzw. ein M0 Stadium zeigte sich bei insgesamt 47,6 % (N=306) der Patienten.

2. Assoziation zwischen *K-RAS* Status und anderen Variablen

Das allgemeine Verhältnis der Häufigkeit des kolorektalen Karzinoms zwischen männlichen und weiblichen Patienten spiegelt sich auch innerhalb des *K-RAS* Wildtyp und den verschiedenen *K-RAS* Mutationen wieder.

Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte das Ergebnis des P-Wertes von 0,754, dass hier keine signifikante Assoziation zwischen dem *K-RAS* Status und dem Geschlecht vorliegt (Tabelle 1).

Ebenso wie bei dem Geschlecht konnte bei der Verteilung der Patienten auf die 3 Behandlungszentren LKH Graz, LKH Fürstenfeld und LKH Leoben eine regelmäßige Verteilung des *K-RAS* Status beobachtet werden und keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeiten an den einzelnen Behandlungszentren nachgewiesen werden. Der P-Wert liegt bei 0,23 (Tabelle 1)

Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen bestehen bei Caecum- und Sigmakarzinomen. Mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson konnte mit einem P-Wert von 0,015 eine signifikante Assoziation zwischen den Tumorlokalisationen und dem *K-RAS* Status nachgewiesen werden.

Auffallend dabei ist ein besonders niedriger Anteil an *K-RAS* Wildtyp bei Lokalisation des Tumors im Caecum (5,5%, Tabelle 1). Im Gegensatz dazu scheint das Auftreten von *K-RAS* Mutationen im Codon 13 bei Caecumtumoren besonders häufig zu sein (16,1%, Tabelle 1). Demgegenüber steht im Vergleich ein überproportional hoher Anteil an *K-RAS* Wildtyp bei Sigmatumoren (20,5%, Tabelle 1).

In der Kategorie Tumorgrading konnte wiederum eine regelmäßige Verteilung des *K-RAS* Status beobachtet werden und bei einem P-Wert von 0,648 keine signifikante Assoziation innerhalb einzelner Gruppen nachgewiesen werden.

Schlussendlich konnte auch keine signifikante Assoziation zwischen den einzelnen Tumorstadien ($p=0,664$), sowie zwischen dem M-Stadium und dem *K-RAS* Mutationsstatus unserer Kohorte festgestellt werden ($p=0,128$, Tabelle 1).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 1. Häufigkeitsverteilung des K-RAS Status bezogen auf verschiedene Variablen.

Variable	<i>K-RAS Wildtyp versus K-RAS Codon 12 versus K-RAS Codon 13 Mutation</i>			
	<i>K-RAS Wildtyp</i>	<i>K-RAS Codon 12 Mutation</i>	<i>K-RAS Codon 13 Mutation</i>	P-Value
<i>Geschlecht</i>				0,754
<i>männlich</i>	66,4% (243)	63,7% (137)	67,7% (42)	
<i>weiblich</i>	33,6% (123)	36,3% (78)	32,3% (20)	
<i>Behandlungsort</i>				0,23
<i>LKH Graz</i>	62,6% (229)	67,0% (144)	71,0% (44)	
<i>LKH Fürstenfeld</i>	17,5% (64)	17,7% (38)	8,1% (5)	
<i>LKH Leoben</i>	19,9% (73)	15,3% (33)	21,0% (13)	
<i>Tumorlokalisation</i>				0,015
<i>Caecum</i>	5,5% (20)	7,9% (17)	16,1% (10)	
<i>Colon</i>	35,0% (128)	38,6% (83)	25,8% (16)	
<i>Sigma</i>	20,5% (75)	12,6% (27)	16,1% (10)	
<i>Rectum</i>	39,1% (143)	40,9% (88)	41,9% (26)	
<i>Grading</i>				0,648
<i>G1</i>	7,1% (25)	5,9% (12)	6,8% (4)	
<i>G2</i>	70,1% (246)	75,1% (154)	67,8% (40)	
<i>G3</i>	22,5% (79)	18,0% (37)	25,4% (15)	
<i>G4</i>	0,3% (1)	1,0% (2)	0,0% (0)	
<i>T-Stage</i>				0,664
<i>T1</i>	2,6% (7)	4,5% (7)	2,1% (1)	
<i>T2</i>	5,5% (15)	5,2% (8)	4,3% (2)	
<i>T3</i>	55,0% (149)	54,5% (84)	44,7% (21)	
<i>T4</i>	36,9% (100)	35,7% (55)	48,9% (23)	
<i>M-Stage</i>				0,128
<i>M0</i>	44,8% (164)	49,3% (106)	58,1% (36)	
<i>M1</i>	55,2% (202)	50,7% (109)	41,9% (26)	

3. Unterschiede im krebsspezifischen Überleben zwischen verschiedenen Parametern

Mittels Kaplan-Meier Kurven wurde für Patienten mit bestimmten Parametereigenschaften die Wahrscheinlichkeit berechnet, bis zu einem bestimmten Zeitpunkt zu überleben.

Auf der x-Achse ist die Überlebenszeit der Patienten (CSS- Cancer specific survival in Monaten) und auf der y-Achse die mit dem Kaplan-Meier-Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit (kumulatives Überleben) aufgetragen. Die Überlebensraten der Kurven geben an, bei wie vielen Patienten bis zu einem bestimmten Zeitpunkt noch

kein Ereignis eingetreten ist. Das Ereignis ist in unserem Fall ein eingetretener Tod auf Grund eines kolorektalen Karzinoms.

3.1 Geschlecht

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten für Männer und Frauen sind in Abbildung 9 ersichtlich.

Der statistische Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen mittels Log Rank Test brachte ein nicht signifikantes Ergebnis mit einem P-Wert von 0,165. Ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Männer und Frauen liegt also nicht vor.

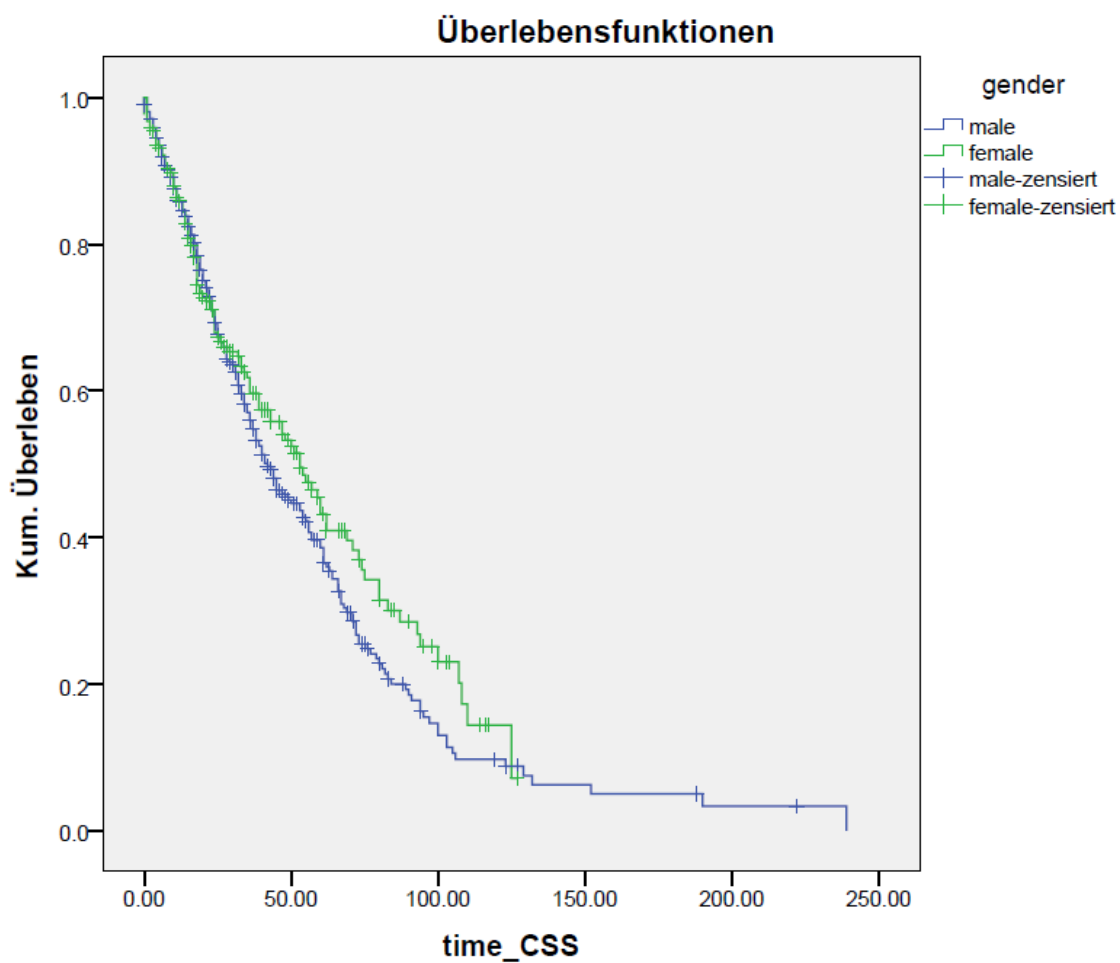


Abbildung 9. Kaplan-Meier Kurve für krebspezifisches Überleben bezogen auf das Geschlecht. (männlich versus weiblich, $p=0,165$).

3.2 K-RAS Status

Abbildung 10 zeigt den Vergleich der Überlebenskurven für alle verschiedenen *K-RAS* Mutationen, einschließlich dem *K-RAS* Wildtyp, im Verlauf von 250 Monaten.

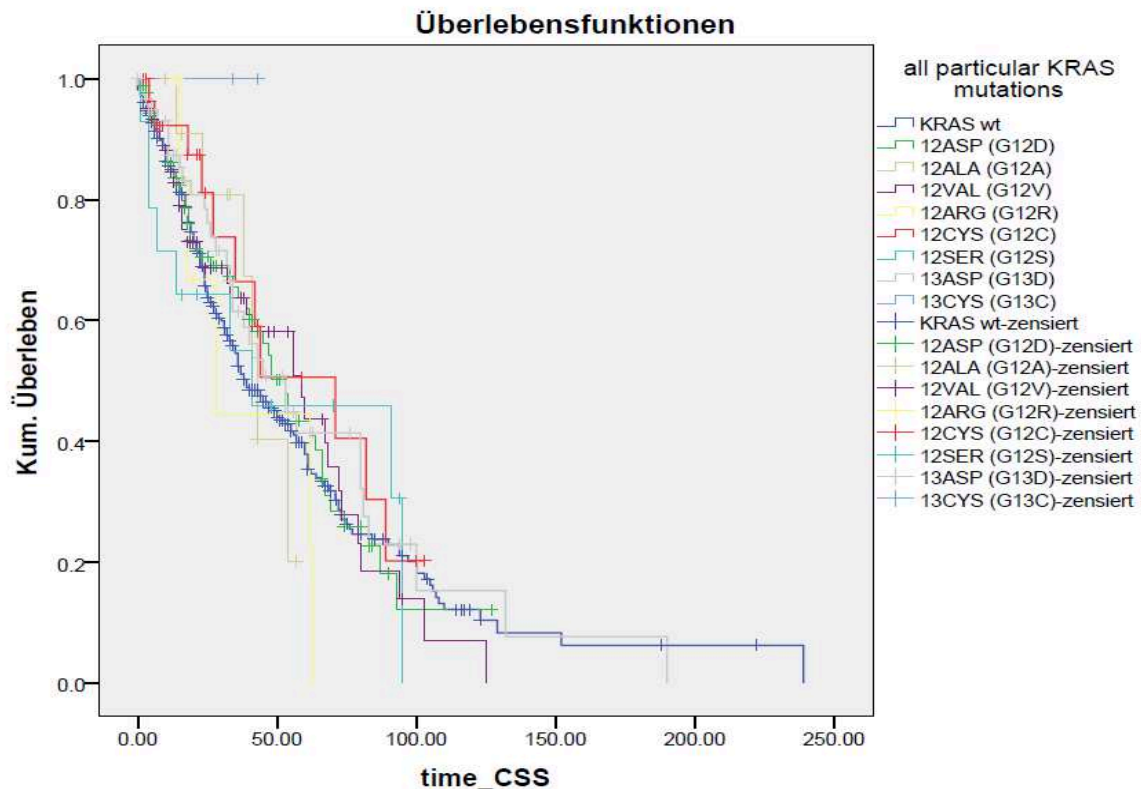


Abbildung 10. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem *K-RAS*-Mutationsstatus entsprechend.

(*K-RAS* wt versus *K-RAS G12D* ($p=0.576$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G12A* ($p=0.777$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G12V* ($p=0.796$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G12R* ($p=0.450$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G12C* ($p=0.301$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G12S* ($p=0.918$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G13D* ($p=0.367$), *K-RAS* wt versus *K-RAS G13C* ($p=0.252$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G12A* ($p=0.821$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G12V* ($p=0.576$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G12R* ($p=0.299$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G12C* ($p=0.378$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G12S* ($p=0.902$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G13D* ($p=0.623$), *K-RAS G12D* versus *K-RAS G13C* ($p=0.328$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G12V* ($p=0.720$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G12R* ($p=0.993$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G12C* ($p=0.500$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G12S* ($p=0.856$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G13D* ($p=0.800$), *K-RAS G12A* versus *K-RAS G13C* ($p=0.312$), *K-RAS G12V* versus *K-RAS G12R* ($p=0.302$), *K-RAS G12V* versus *K-RAS G12C* ($p=0.342$), *K-RAS G12V* versus *K-RAS G12S* ($p=0.943$), *K-RAS G12V* versus *K-RAS G13D* ($p=0.449$), *K-RAS G12V* versus *K-RAS G13C* ($p=0.321$), *K-RAS G12R* versus *K-RAS G12C* ($p=0.120$), *K-RAS G12R* versus *K-RAS G12S* ($p=0.502$), *K-RAS G12R* versus *K-RAS G13D* ($p=0.220$), *K-RAS G12R* versus *K-RAS G13C* ($p=0.239$), *K-RAS G12C* versus *K-RAS G12S* ($p=0.482$), *K-RAS G12C* versus *K-RAS G13D* ($p=0.661$), *K-RAS G12C* versus *K-RAS G13C* ($p=0.372$), *K-RAS G12S* versus *K-RAS G13D* ($p=0.604$), *K-RAS G12S* versus *K-RAS G13C* ($p=0.253$), *K-RAS G13D* versus *K-RAS G13C* ($p=0.294$))

In der nächsten Analyse wurden dann Patienten mit *K-RAS* Wildtyp, Patienten mit Mutationen im Codon 12 und Patienten mit Mutationen im Codon 13 in Gruppen zusammengefasst und miteinander verglichen. Der Kurvenverlauf zeigt in Abbildung 11 durchaus eine Tendenz des *K-RAS* Wildtyp für eine schlechtere Überlebensrate. Im paarweisen Log-Rank Test konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden.

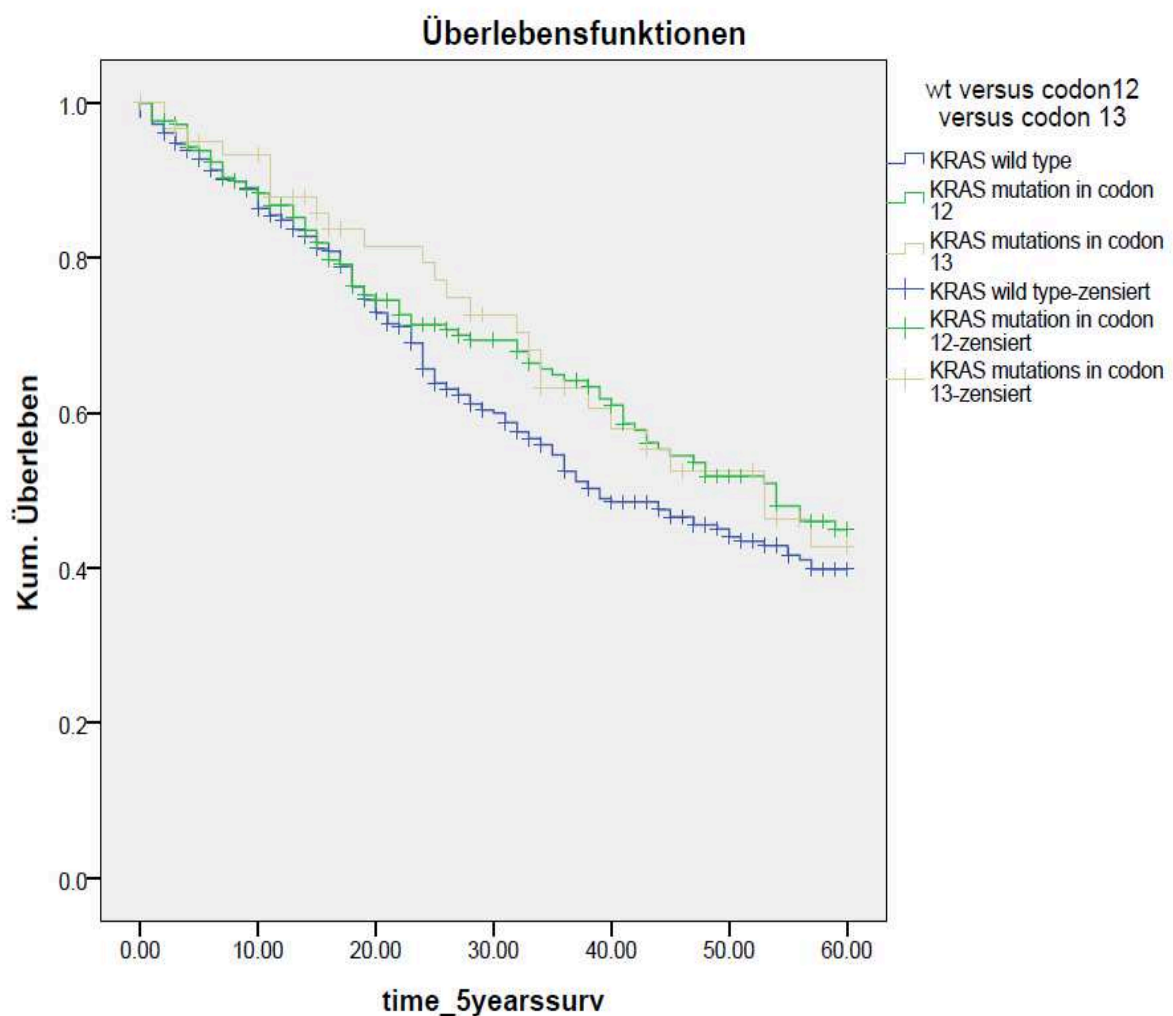


Abbildung 91. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem *K-RAS*-Mutationsstatus entsprechend. (*K-RAS* wild type versus *K-RAS* mutation in codon 12 ($p=0.167$), *K-RAS* wild type versus *K-RAS* mutation in codon 13 ($p=0.314$), *K-RAS* mutation in codon 12 versus *K-RAS* mutation in codon 13 ($p=0.933$))

Die Gegenüberstellung von *K-RAS* Wildtyp und Vorhandensein einer (unabhängig ob Codon 12 oder Codon 13) *K-RAS* Mutation wird in Abbildung 12 ebenfalls mit einem Beobachtungsintervall von 60 Monaten dargestellt. Wiederum zeigt sich in diesem Vergleich in der Überlebenskurve eine optische Tendenz des *K-RAS* Wildtyp für eine prognostisch schlechtere Überlebensrate. Ein P-Wert von 0,316 im Log-Rank Test zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

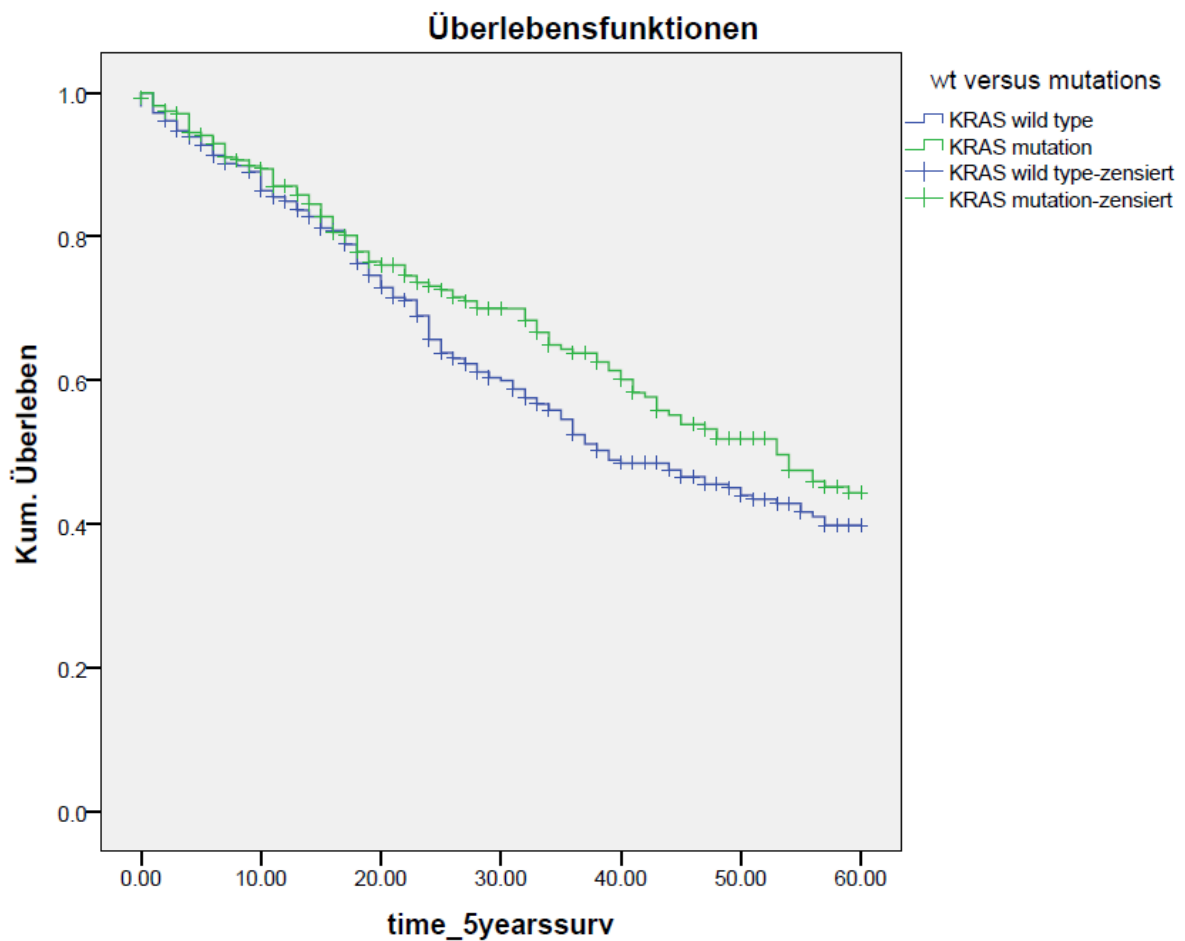


Abbildung 12. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem *K-RAS* Mutationsstatus entsprechend. (K-*RAS* wild typ versus *K-RAS* Mutation (p=0.316))

3.3 Tumorlokalisation

Der optische Vergleich der Überlebensraten bei unterschiedlicher Tumorlokalisation, dargestellt in Abbildung 13, zeigt eine Tendenz für ein längeres krebsspezifisches Überleben bei Sigma und Rectum gegenüber Caecum und Colon.

Die paarweisen Vergleiche mittels Log-Rank Test konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Caecum und Sigma bzw. Caecum und Rektum bestätigen.

Im Gegensatz dazu findet sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Colon und Sigma, sowie Colon und Rektum im krebsspezifischen Überleben.

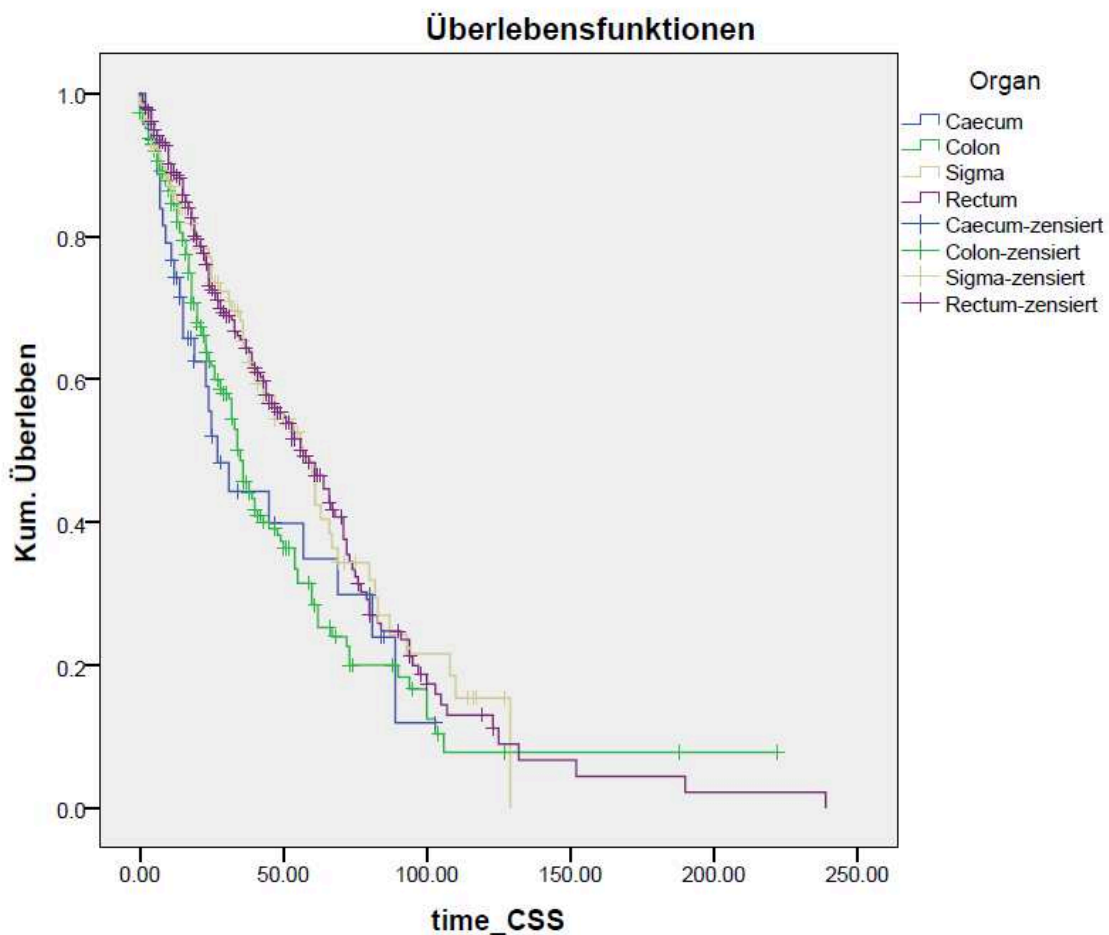


Abbildung 103. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert der Tumorlokalisation entsprechend. (Caecum versus Colon ($p=0.764$), Caecum versus Sigma ($p=0.98$))

3.4 Grading

Die Überlebensfunktionen in Abbildung 14 zeigen klare Überlebensvorteile für Patienten mit kolorektalen Karzinomen, für welche ein niedriges Grading diagnostiziert wurde. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten nehmen kontinuierlich mit höherem Grading ab.

Dies konnte auch mit dem Log-Rank Test nachgewiesen werden. Statistisch signifikante Unterschiede im Überleben zeigen sich im Vergleich von G1 mit G4, G2 mit G3, G2 mit G4 und G3 mit G4.

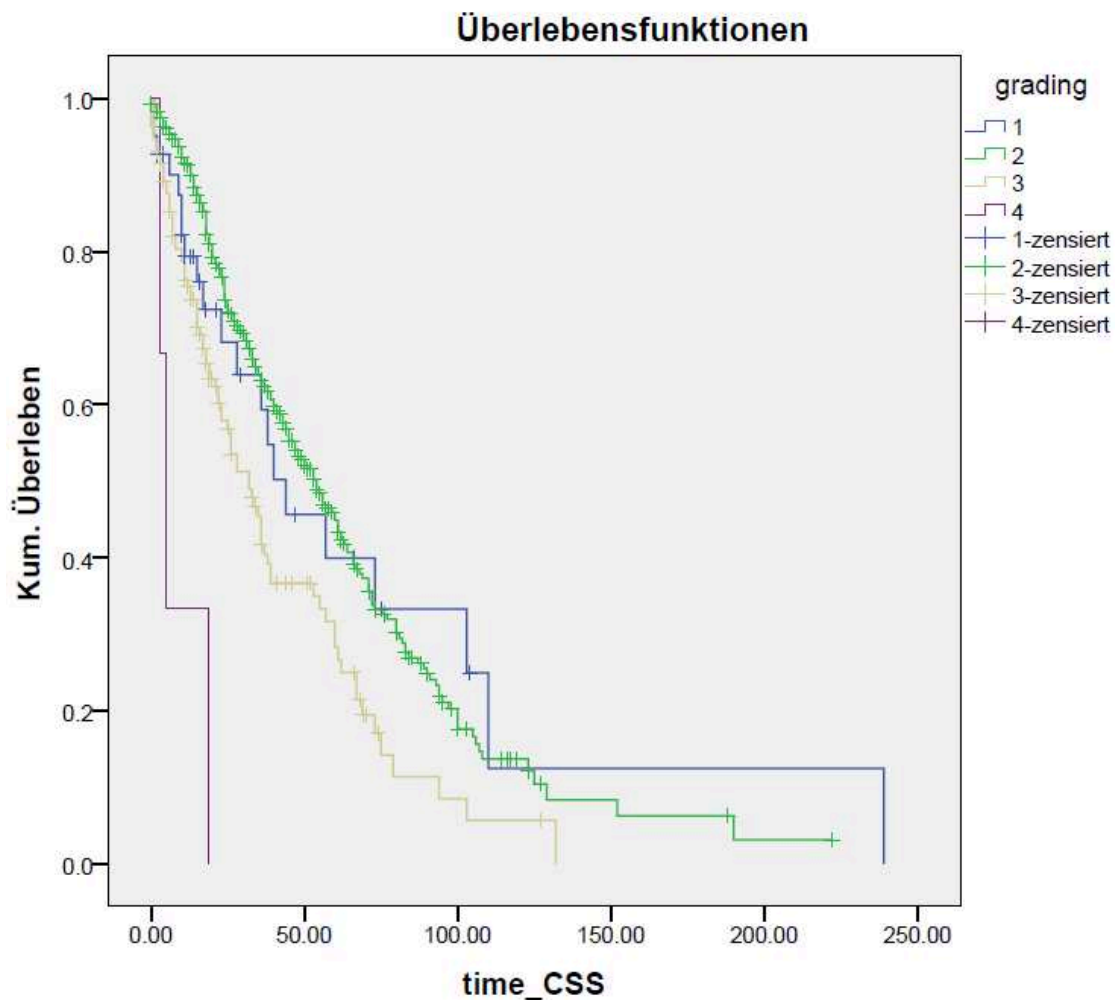


Abbildung 14. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem Tumorgrading entsprechend. (G1 versus G2 ($p=0.796$), G1 versus G3 ($p=0.072$), G1 versus G4 ($p=0.002$), G2 versus G3 ($p<0.001$), G2 versus G4 ($p<0.001$), G3 versus G4 ($p=0.006$))

3.5 T-Stadium

In Abbildung 15 sind die Überlebensfunktionen der verschiedenen Tumorstadien dargestellt, welche, wie auch beim Grading ersichtlich, optisch eindeutig zeigen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit umso höher ist, je niedriger das Tumorstadium ist.

Signifikante Unterschiede im krebspezifischen Überleben, mit einem P-Wert $< 0,05$ wurden für T1 versus T3, T1 versus T4, T2 versus T4, sowie T3 versus T4 berechnet.

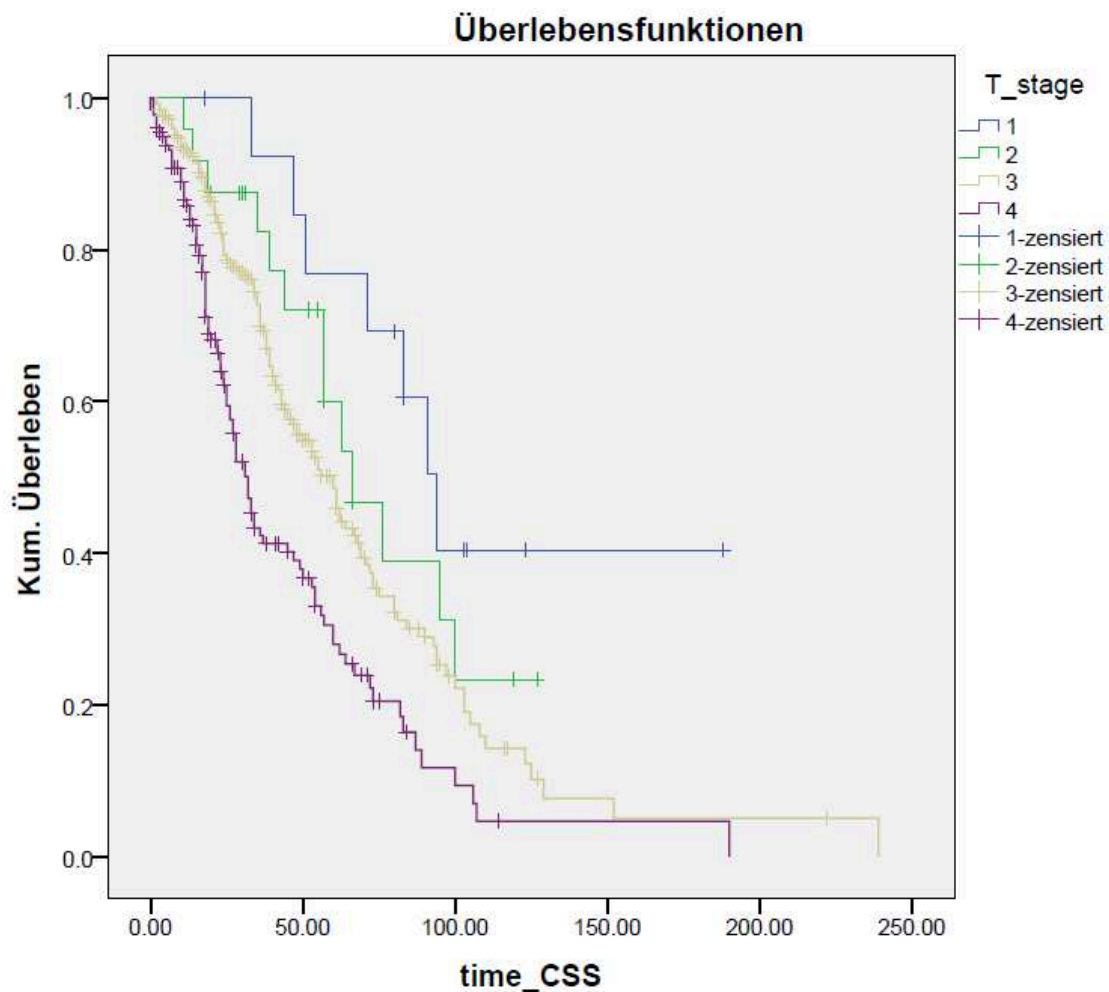


Abbildung 15. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem T-Stadium entsprechend.
(T1 versus T2 ($p=0.245$), T1 versus T2 ($p=0.020$), T1 versus T3 ($p=0.001$), T2 versus T3 ($p=0.235$), T2 versus T4 ($p=0.003$), T3 versus T4 ($p<0.001$))

3.6 M-Stadium

Die Überlebensfunktionen jener Patienten, welche bereits zu Diagnosezeitpunkt Metastasen aufwiesen, zeigen, wie in Abbildung 16 ersichtlich, eine deutlich schlechtere Prognose im krebsspezifischen Überleben.

Mittels Log-Rank Test konnte ein statistisch signifikanter P-Wert von <0.001 berechnet werden.

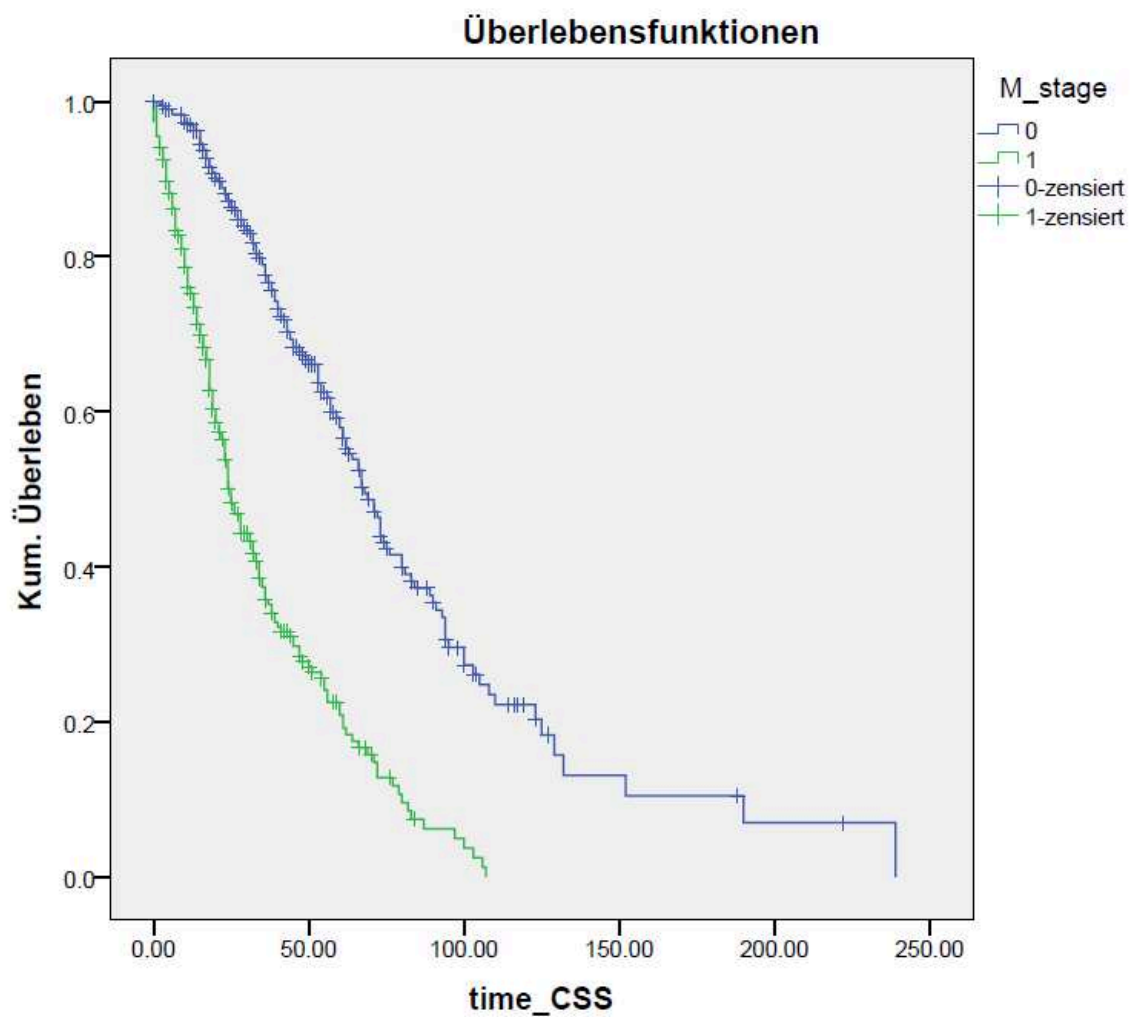


Abbildung 16. Kaplan-Meier Kurve für Patienten gruppiert dem M-Stadium entsprechend. (M0 versus M1 ($p<0.001$))

4. Variablen als unabhängige ungünstige prognostische Faktoren

Die Ergebnisse der multivariaten Cox Analyse, mit welcher die als signifikant für das krebsspezifische Überleben identifizierten Variablen überprüft wurden, sind in Tabelle 7 ersichtlich.

Ein statistisch signifikantes Ergebnis des P-Wertes von $<0,05$ konnte Grading, T-Stage, sowie M-Stage als unabhängige schlechte prognostische Faktoren belegen. Um die Unterschiede innerhalb der Variablen zu berechnen, wurde eine weitere Auftrennung des Grading und T-Stage durchgeführt. Das Ergebnis zeigt einen signifikanten Unterschied beim Vergleich von G1 mit G4 und T1 mit T4.

Tabelle 2. Multivariate Cox Analyse bezogen auf das krebsspezifische Überleben

Parameter	Multivariate Cox Analyse	
	<i>P-Wert</i>	<i>HR (95% CI)</i>
<i>Geschlecht</i>	0,334	0,874 (0,67-1,15)
<i>Behandlungszentrum</i>	0,875	1,013 (0,86-1,19)
<i>Grading</i>	0,001	
<i>G1-G2</i>	0,496	1,252 (0,66-2,39)
<i>G1-G3</i>	0,050	1,978 (1,00-3,92)
<i>G1-G4</i>	0,003	12,910 (2,39-69,64)
<i>T-Stage</i>	0,017	
<i>T1-T2</i>	0,740	1,176 (0,45-3,07)
<i>T1-T3</i>	0,219	1,626 (0,75-3,53)
<i>T1-T4</i>	0,039	2,306 (1,04-5,09)
<i>M-Stage</i>	$<0,001$	2,453 (1,86-3,25)
<i>K-RAS wt versus K-RAS mutiert</i>	0,992	1,001 (0,77-1,30)

HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Interval

IV. DISKUSSION

Vor allem die Erforschung der zugrundeliegenden genetischen Grundlagen von Krebserkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Diagnose, Prognose und Therapie gebracht. Als dritthäufigster Tumor weltweit nimmt das kolorektale Karzinom eine wichtige Stellung sowohl in der Forschung als auch in der Klinik ein.

Eine der am häufigsten mutierten Onkogene in menschlichen Tumoren sind *RAS*-Gene.

K-RAS Mutationen führen zu einer Aminosäuresubstitution, die eine Konformationsänderung der *RAS*-Proteine bedingt. Welcher Aminosäureaustausch stattfindet ist abhängig davon, welches Codon betroffen ist. Die meisten Mutationen finden in Codon 12 und 13 statt, seltener in Codon 61.

Das kolorektale Karzinom betreffend konnte das *K-RAS* Gen in den letzten Jahren vor allem durch die Resistenz gegenüber EGFR Antagonisten Aufmerksamkeit erregen.

Einige aktuelle Studien haben nun auch den Einfluss dieser Mutation auf die Prognose der Patienten untersucht. Bis jetzt konnten allerdings noch keine beweiskräftigen Ergebnisse präsentiert werden.

Wir haben es uns daher zum Ziel gemacht mit unserer Studie neue Aussagen über den prognostischen Wert der *K-RAS* Mutation gewinnen zu können.

Die Stärken unserer Studie sind vor allem unser relativ großes Patientenkollektiv, detaillierte Informationen zu den Tumorcharakteristika, sowie die Einbindung von 3 onkologischen Zentren. Wir haben nicht nur den *K-RAS* Status in unsere Auswertung einbezogen, sondern auch einige weitere Variablen in Hinblick auf Assoziationen und krebsspezifischem Überleben untersucht.

Somit war es uns auch möglich mittels deskriptiver Statistik zu zeigen, dass es sich bei unserem Patientenkollektiv um allgemein repräsentative Daten, welche sich gut mit der internationalen Literatur decken, handelt.

Es müssen aber auch Einschränkungen unserer Studie berücksichtigt werden. Wir haben Daten der Patienten mit kolorektalem Karzinom gesammelt, bei welchen die Information des *K-RAS* Status vorlag. Da eine Untersuchung auf den *K-RAS* Status jedoch überproportional häufiger bei Auftreten von Metastasen durchgeführt wird, kann es hierbei zu einer Verzerrung der Ergebnisse gekommen sein. Weil bei Patienten mit metastasiertem

Karzinom von einem schlechteren Krankheitsverlauf ausgegangen werden kann, wird diese Selektion auf Grundlage der *K-RAS* Mutationsdaten zu einem Bias im Krankheitsverlauf geführt haben.

Die Auswertung der Patientendaten brachte eine Geschlechterverteilung von 34,4 % weiblich und 65,6 % männlich und spiegelte somit die weltweit bekannte höhere Prävalenz bei Männern wieder (1). Ebenso entspricht der Anteil an *K-RAS* Mutationen von 56,9 % in unserem Patientenkollektiv dem oberen Durchschnitt der allgemeinen Literaturangaben von 22-46 % (63).

Die mittels deskriptiver Statistik erhobenen Häufigkeitsverteilungen unseres Patientenkollektivs beschrieben also durchwegs, dass es sich hierbei um allgemein repräsentative Daten handelt.

Hinsichtlich der Frage, ob zwischen morphologischen Parametern und *K-RAS* Status eine Assoziation besteht, konnten wir keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielen. Betreffend Grading und M-Stage finden sich übereinstimmende Ergebnisse bei Armagan et al, Brink et al erzielten für die Differenzierung ebenfalls keine Signifikanz.

In der Studie von Armagan et al zeigte sich jedoch eine statistisch signifikante Häufung von *K-RAS* Mutationen bei T3-T4 (extramural) Karzinomen, verglichen mit T1-T2 Tumoren (intramural). Beim Vergleich des Wildtyp mit Codon 12, sowie Codon 13 Mutationen fanden sich in unserem verhältnismäßig größerem Patientenkollektiv keine Assoziationen mit dem T-Stadium (67, 68).

Die Häufigkeitsverteilungen des *K-RAS* Status innerhalb der Geschlechter, sowie innerhalb der verschiedenen Behandlungszentren, waren in unserer Studie regelmäßig.

Im Gegensatz dazu konnten wir signifikante Assoziationen zwischen Tumorlokalisationen und *K-RAS* Status nachweisen.

Im Sigma zeigte sich ein hoher Anteil an *K-RAS* Wildtyp, im Bereich des Caecum war dieser jedoch besonders niedrig. Häufig fanden sich *K-RAS* Mutationen im Codon 13 bei Caecumtumoren.

Vergleichbar ist hier das Ergebnis von Samowitz et al. In dieser Studie wurden nur Kolonkarzinome eingeschlossen und diese in proximale und distale Tumore eingeteilt. Entsprechend dem Caecum als proximalen Teil des Kolon in unserer Studie zeigten sich *K-RAS* Mutationen allgemein häufiger bei proximalen Tumoren (36%). In den distalen Tumoren fanden sich nur 26,8 %. Zu beachten ist allerdings, dass diese signifikanten

Unterschiede überraschenderweise in allen Codon 12, nicht aber in Codon 13 Mutationen nachgewiesen wurden (60).

Ein signifikanter Unterschied in der Tumorlokalisation ergab sich ebenfalls bei Elnatan et al. *K-RAS* Mutationen fanden sich bei nicht-metastasierten Kolonkarzinomen überproportional häufig auf der rechten Seite des Kolon (69).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich in unserer Studie und der vorhandenen Literatur eine Tendenz für ein häufigeres Auftreten von *K-RAS* Mutationen im proximalen Teil des Kolon abzeichnet.

Die Tumorlokalisation spielt nicht nur bezogen auf den *K-RAS* Status eine Rolle, auch in Hinblick auf das krebsspezifische Überleben konnten wir mit dieser Variablen statistisch signifikante Ergebnisse erzielen. Verglichen mit Tumoren des Kolon zeigen Rektum- sowie Sigmakarzinome klare Überlebensvorteile für die Patienten.

Die Ergebnisse von Wray et al erbrachten das Resultat, dass Sigmakarzinome eine geringere Mortalität aufweisen. Viele andere Studien konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen rechts- und linkssituierten Kolonkarzinomen feststellen (70).

Im Vergleich des krebsspezifischen Überlebens von Männern und Frauen zeigte sich in der Kaplan-Meier-Kurve kein Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Die Frage nach Unterschieden im Überleben bei Frauen und Männern wurde bereits von einigen Studien aufgegriffen. Signifikante Ergebnisse dazu konnten beispielsweise für ein längeres Überleben der weiblichen Patienten, welche sich einer chirurgischen Resektion unterzogen, beschrieben werden (71).

Das männliche Geschlecht als unabhängigen schlechten Prognosefaktor nach chirurgischer Intervention bestätigte auch eine Studie aus Deutschland. Die 5-Jahresüberlebensrate für Männer lag bei 43.5 %, die der Frauen bei 54.7 % (72).

Eine Studie aus den USA mit über 50.000 eingeschlossenen Patienten erbrachte das Ergebnis, dass jüngere Frauen (18-44) mit metastasiertem kolorektalem Karzinom deutlich länger überleben als Männer der gleichen Altersklasse. Im Gegensatz dazu fand man bei älteren Patienten (ab 55) ein signifikant schlechteres krebsspezifisches Überleben für Frauen (73). Insgesamt also kontroversielle Daten in der Literatur verfügbar.

Die Überlebensfunktionen unseres Patientenkollektivs zeigten bei den Variablen Grading, T-Stadium und M-Stadium die zu erwartenden Ergebnisse. Signifikante Vorteile im krebsspezifischen Überleben haben Patienten mit Karzinomen hoher Differenzierung, niedrigem Tumorstadium, sowie Metastasenfreiheit bei Diagnosezeitpunkt.

Die Hauptfragestellung unserer Studie bezog sich auf die Frage nach Unterschieden im krebsspezifischen Überleben mit und ohne *K-RAS* Mutation.

Zahlreiche Studien, die sich dieser Frage bereits angenommen haben, konnten bis jetzt kein eindeutiges Ergebnis erzielen.

Einige Daten haben ein signifikant schlechteres krebsspezifisches Überleben für Karzinome mit *K-RAS* Mutationen gezeigt, andere wiederum zeigten keinerlei relevante Korrelationen.

In unserer Studie brachte die Gegenüberstellung von *K-RAS* Wildtyp und *K-RAS* Mutationen sogar eine optische Tendenz für eine schlechtere Prognose des Wildtyp im 5-Jahresüberleben. Vereinbar mit dem Ergebnis einer systemischen Übersichtsarbeit von Ren et al, berechneten wir mittels Log Rank Test allerdings keinen signifikanten Unterschied. (35, 57).

Die Aufspaltung von *K-RAS* Mutationen in Codon 12 und 13 für den Vergleich im krebsspezifischen Überleben zeigte in der Kaplan-Meier Kurve wiederum eine optische Tendenz für eine schlechtere Prognose des Wildtyps im 5-Jahresüberleben. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht berechnet werden.

Demgegenüber stehen die Studien von Samowitz et al und Bazan et al, welche Mutationen in Codon 13 als unabhängigen Risikofaktor beschrieben (59, 60).

Im Gegensatz dazu berechnete Abubaker et al ein schlechteres Outcome für Codon 12 Mutationen (35).

Unterschiedliche Ergebnisse innerhalb der 12 bekannten Punktmutationen in Codon 12 und 13 finden sich in der Literatur und lassen keinen Hinweis auf ein einheitliches Resultat zu (37, 61-63).

Wir konnten das krebsspezifische Überleben bei Karzinomen aller einzelnen Punktmutationen in Codon 12 und 13 über einen langen Zeitraum von 250 Monaten mittels Kaplan-Meier Kurve darstellen.

Im Vergleich aller verschiedenen Mutationen und dem Wildtyp untereinander ließ sich statistisch kein Unterschied in der Prognose erkennen.

Schlussfolgerung

Es finden sich Hinweise in der publizierten Literatur, dass jede einzelne Mutation unterschiedliche Auswirkungen auf das biologische Verhalten der Tumorzellen haben kann (64). Auch wenn es nun einen Hinweis darauf gibt, dass *K-RAS* Mutation für ein Karzinom nicht gleich *K-RAS* Mutation bedeutet, sondern die Tumoreigenschaften durchaus abhängig von der betroffenen Aminosäure verändert werden, so scheinen sich diese Ungleichheiten nicht signifikant auf die Prognose eines kolorektalen Karzinoms auszuwirken.

Trotz der divergierenden Ergebnisse anderer Studien bestätigt unser Endresultat, dass sich Karzinome mit unterschiedlichem *K-RAS* Status nicht in ihrer Prognose unterscheiden.

Die kontroversen Aussagen anderer Studien, welche oftmals ungleiche Punktmutationen als signifikanten prognostischen Faktor beschrieben haben, erklären sich höchstwahrscheinlich in Merkmalen der Studie wie Studiengröße, Patientenselektion, Eigenschaften der Tumorgewebsprobe, Laboreigenschaften, unterschiedlichen Datenanalysen und vor allem in den Patienteneigenschaften (58).

Die Hypothese, dass *K-RAS* mutierte kolorektale Karzinome mit niedrigerem krebsspezifischem Überleben assoziiert sind, konnten wir nicht bestätigen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011;61(2):69-90.
2. Cavalli F, Kaye, S. B., Heine, H. H., James, O. A., Martine, J.P-G., . Textbook of Medical Oncology. 4 ed. London, UK: Informa Healthcare; 2009:158-83.
3. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. Dordrecht: Springer; 2007: 271-88.
4. Hiddemann W, Bartram, C. Die Onkologie, Teil 2. Heidelberg: Springer; 2010: 849-71.
5. Statistik Austria. Dickdarm, Enddarm (C18-C21) - Krebsinzidenz (Neuerkrankungen pro Jahr), Krebsmortalität (Sterbefälle pro Jahr), Österreich ab 1983, [updated_11.10.2012]; Available from: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html, zuletzt verfügbar am 16.02.2013.
6. Köppen H. Gastroenterologie für die Praxis. Stuttgart: Thieme; 2010: 225-28.
7. Layer P, Rosien, U. Praktische Gastroenterologie. Elsevier, editor. München 2011:182-93.
8. Compton C, Byrd, D., Garcia-Aguilar, J., Kurtzmann, S., Olawaiye, A., Washington, M., . AJCC Cancer Staging Atlas. 2nd Edition ed. New York: Springer 2012:185-220.
9. Messmann H. Klinische Gastroenterologie. Stuttgart: Thieme; 2012: 417-22.
10. Greene FL, Stewart AK, Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. Annals of surgery. 2002;236(4):416-21.
11. Dissertation Freie Universität Berlin, Einleitung – Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms; Available from: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000000635/1_Einleitung.pdf;jsessionid=3261FE4087333D4C6CCDEC08549E7D64?hosts=, zuletzt verfügbar am 16.02.2013.
12. Riemann J, Fischbach, W., Galle, P., Mössner, J., . Gastroenterologie, Das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 1: Intestinum Stuttgart: Thieme; 2008:846-83.
13. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present[quest] symptoms, duration, and clues to location. Am J Gastroenterol. 1999;94(10): 3039-45.
14. Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. Cellular Signalling. 2000;12(7):425-34.
15. Emmanuel A, Inns, S. Lecture Notes: Gastroenterology and Hepatology. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011: 103-9.
16. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, et al. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. Zeitschrift für Gastroenterologie. 2008;46(8):799-840.
17. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. Canadian family physician Medecin de famille canadien. 2007;53(11):1913-20.
18. Jedrychowski W, Maugeri U. An apple a day may hold colorectal cancer at bay: recent evidence from a case-control study. Reviews on environmental health. 2009;24(1):59-74.

19. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*. 2012;5(1):19-27.
20. Panjwani S, Bagewadi A, Keluskar V, Arora S. Gardner's Syndrome. *Journal of clinical imaging science*. 2011;1:65.
21. de Leon MP, Urso ED, Pucciarelli S, Agostini M, Nitti D, Roncucci L, et al. Clinical and molecular features of attenuated adenomatous polyposis in northern Italy. *Techniques in coloproctology*. 2013;17(1):79-87.
22. Böcker W, Denk, H., Heitz, U., Moch, H. *Pathologie*. 4 ed. München: Elsevier GmbH; 2008:261-6323.
23. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
24. Abeloff M, Armitage, J., Niederhuber, J., Kastan, M., McKenna, G. *Abeloff's Clinical Oncology*. Philadelphia: Elsevier; 2008: 4th edition,1480.
25. Pfeifer B, Preiß, J., Unger, C. *Onkologie integrativ*. 1 ed. München: Elsevier; 2006: 21-7.
26. Wagener C, Müller, O. *Molekulare Onkologie*. 3., komplett aktualisiert und erweitert ed. Stuttgart: Thieme; 2010: 207-69.
27. Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, et al. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology*. 2007;50(4):453-64.
28. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005;54(9):1283-6.
29. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F, et al. Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(2):484-8.
30. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011;60(1):116-29.
31. Duman-Scheel M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Pathfinding: Axon Guidance Gene Finally Turned Tumor Suppressor. *Current drug targets*. 2012;13(11):1445-53.
32. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Shima K, Baba Y, Kirkner GJ, et al. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(27):4591-8.
33. Bower M, Waxman, J., . *Lecture Notes Oncology*. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010: 26-7.
34. Hiddemann W, Bartram, C. *Die Onkologie, Teil 1*. Heidelberg: Springer; 2010: 74-8.
35. Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Sultana M, Al-Harbi S, Al-Sanea N, et al. Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. *The Journal of pathology*. 2009;219(4):435-45.
36. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current biology : CB*. 2005;15(14):R563-74.
37. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, Weyler J, Wuyts W, Van Marck E, et al. KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *British journal of cancer*. 2010;103(10):1627-36.
38. Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2005;1756(2):127-44.

39. Fehrenbacher N, Bar-Sagi D, Philips M. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Molecular Oncology*. 2009;3(4):297-307.
40. Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJ, Carey FA, Wolf CR. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *British journal of cancer*. 2010;102(4):693-703.
41. Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, Mountzios G, Papadimitriou C, Papadopoulos S, et al. All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2011;37(3):221-33.
42. Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. EGFR-targeted therapy. *Experimental Cell Research*. 2011;317(19):2765-71.
43. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012, 18: 5856-5864.
44. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007;28(7):1379-86.
45. Roock WD, Vriendt VD, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*. 2011;12(6):594-603.
46. Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, et al. PTEN Gene Expression and Mutations in the PIK3CA Gene as Predictors of Clinical Benefit to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapy in Patients With KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2012;11(2):143-50.
47. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, et al. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene*. 2007;26(25):3654-60.
48. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):689-708.
49. Boyd C, Boyle DP. Molecular diagnosis on tissues and cells: how it affects training and will affect practice in the future. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2012;23(5):286-94.
50. Shen Y, Yang J, Xu Z, Gu DY, Chen JF. Phosphatase and tensin homolog expression related to cetuximab effects in colorectal cancer patients: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(21):2712-8.
51. Philips MR, Cox AD. Geranylgeranyltransferase I as a target for anti-cancer drugs. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1223-5.
52. Lu J, Chan L, Fiji HD, Dahl R, Kwon O, Tamanoi F. In vivo antitumor effect of a novel inhibitor of protein geranylgeranyltransferase-I. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(5):1218-26.
53. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterologie clinique et biologique*. 2010;34(12):662-81.
54. Morgan SR, Whiteley J, Donald E, Smith J, Eisenberg MT, Kallam E, et al. Comparison of KRAS Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples. *Clinical medicine insights Pathology*. 2012;5:15-22.
55. Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, et al. Utility of Cell-free Tumour DNA for Post-surgical Follow-up of Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Research*. 2012;32(5):1621-6.

56. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative Cell-Free DNA, KRAS, and BRAF Mutations in Plasma from Patients with Metastatic Colorectal Cancer during Treatment with Cetuximab and Irinotecan. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(4):1177-85.
57. Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of the colon and rectum*. 2012;55(8):913-23.
58. Yokota T. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2012;12(2):163-71.
59. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2002;13(9):1438-46.
60. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2000;9(11):1193-7.
61. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *British journal of cancer*. 2001;85(5):692-6.
62. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Rufe A, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(11):2569-75.
63. Winder T, Mundlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, et al. Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. *Oncology reports*. 2009;21(5):1283-7.
64. Al-Mulla F, Milner-White EJ, Going JJ, Birnie GD. Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *The Journal of pathology*. 1999;187(4):433-8.
65. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(17):4753-63.
66. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D Mutation With Outcome in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *JAMA*. 2010;304(16):1812-20.
67. Gunal A, Hui P, Kilic S, Xu R, Jain D, Mitchell K, et al. KRAS Mutations are Associated With Specific Morphologic Features in Colon Cancer. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012 Dec 13 [Epub ahead of print].
68. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003;24(4):703-10.
69. Elnatan J, Goh HS, Smith DR. C-KI-RAS activation and the biological behaviour of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *European Journal of Cancer*. 1996;32(3):491-7.

70. Wray CM, Ziogas A, Hinojosa MW, Le H, Stamos MJ, Zell JA. Tumor subsite location within the colon is prognostic for survival after colon cancer diagnosis. *Diseases of the colon and rectum*. 2009;52(8):1359-66.
71. Paulson EC, Wirtalla C, Armstrong K, Mahmoud NN. Gender influences treatment and survival in colorectal cancer surgery. *Diseases of the colon and rectum*. 2009;52(12):1982-91.
72. Wolters U, Stutzer H, Isenberg J. Gender related survival in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1996;16(3A):1281-9.
73. Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(20):6391-7.