

Aus dem Institut für Humangenetik
(Prof. Dr. med. B. Wollnik)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf das
Ansprechen von kolorektalen Zellen auf eine
5-Fluorouracil-basierende Radiochemotherapie in
Anwesenheit von Rezeptortyrosinkinase-
Inhibitoren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Simon Wiedmann

aus

Tübingen

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. P. Burfeind
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. J. Gaedcke
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 15.02.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf das Ansprechen von kolorektalen Zellen auf eine 5-Fluorouracil-basierende Radiochemotherapie in Anwesenheit von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.2 Molekulargenetische Veränderungen beim KRK.....	5
1.3 Die Rezeptortyrosinkinasen <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> und <i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>	6
1.4 Der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg	11
1.5 Das Onkogen <i>KRAS</i> und KRAS-Mutationen im KRK.....	12
1.6 Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	14
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.2 Biochemikalien und Enzyme	18
2.1.3 Gebrauchswaren	18
2.1.4 Geräte	19
2.1.5 Sterilisationsverfahren.....	19
2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	19
2.1.7 Lösungen.....	20
2.1.8 Medium für eukaryotische Zellkulturen.....	21
2.1.9 Biologisches Material	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.2 Proteinchemische Methoden	24
2.2.3 Analyse wichtiger Signalkaskadenproteine und deren Phosphorylierungsstatus nach verschiedenen Wachstumsstimulationen der Zelllinien	27
2.2.4 Funktionelle Analysen eukaryotischer Zellen	28
2.2.5 Analyse der Proliferationsrate im <i>CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i> nach Rezeptortyrosinkinase-Inhibitorbehandlung	29
2.2.6 Analyse des Verhaltens der Zelllinien im Koloniebildungsassay nach einer 5- FU-basierten Radiochemotherapie in Gegenwart von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren	29
2.3 Statistische Auswertung.....	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Einfluss der KRAS-Mutationen auf die Proliferation, Migration und Invasion der KRK-Zelllinie SW48.....	33

3.2	Einfluss von KRAS-Mutationen auf die Expression von EGFR und IGF-1R und auf den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine in der KRK-Zelllinie SW48.....	35
3.3	Einfluss von KRAS-Mutationen in der KRK-Zelllinie SW48 auf die Behandlung mit den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AEW541.....	39
3.4	Der Einfluss der KRAS-Mutationen in KRK-Zellen auf eine 5-FU-basierende kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren.....	41
4	Diskussion.....	51
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4.2	Das biologische Verhalten der verschiedenen Zelllinien <i>in vitro</i> verglichen mit klinischen Daten.....	54
4.3	Der Einfluss von KRAS-Mutationen auf die Aktivität der nachfolgenden Signalkaskaden MAPK und PI3K.....	58
4.4	Der Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren unter einer 5-FU-basierenden Radiochemotherapie beim KRAS-mutierten KRK.....	60
4.5	KRAS im Kontext anderer Biomarker beim KRK.....	66
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Rohe Neuerkrankungsraten für Darmkrebs in Deutschland.....	2
Abbildung 2:	Altersstandardisierte Sterberaten für Darmkrebs in Deutschland, Skandinavien und den USA.....	2
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der drei EGFR Zustände	7
Abbildung 4:	Schematischer Aufbau des Insulin-Rezeptors und des IGF-1-Rezeptors	9
Abbildung 5:	Vereinfachte Darstellung des MAPK- und des PI3K-Signalwegs	12
Abbildung 6:	Zeitlicher Ablauf der Koloniebildungsassays	30
Abbildung 7:	Wachstumsverhalten der Zelllinien SW48 KRAS-Wildtyp (wt), SW48 KRAS- G12V (G12V), SW48 KRAS-G12D (G12D) und SW48 KRAS-G13D (G13D).....	33
Abbildung 8:	Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf das Migrationsverhalten der KRK-Zelllinie SW48.....	34
Abbildung 9:	Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf das Invasionsverhalten der KRK-Zelllinie SW48.....	35
Abbildung 10:	Expression der Transmembranproteine EGFR und IGF-1R und der intrazellulären Proteine ERK und AKT sowie deren Phosphorylierungsstatus in den KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS- G12D und SW48 KRAS-G13D	36
Abbildung 11:	Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT.....	37
Abbildung 12:	Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT durch Stimulation mit FKS.....	38
Abbildung 13:	Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT durch Stimulation mit FKS.....	39
Abbildung 14:	Relative Proliferation der KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS- G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D nach Behandlung mit AEW541, Erlotinib und der Kombination von AEW541 und Erlotinib	41
Abbildung 15:	Vergleich der Überlebensrate der Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS- G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D in Anwesenheit von DMSO, ohne kombinierte Radiochemotherapie	42
Abbildung 16:	Überlebensraten nach einer kombinierten Radiochemotherapie mit entweder DMSO, AEW541, Erlotinib oder der Kombination aus AEW541 und Erlotinib.....	45
Abbildung 17:	Überlebensraten nach der Behandlung mit 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy ohne 5-FU in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und einer Kombinationstherapie aus AEW541 und Erlotinib	47
Abbildung 18:	Überlebensraten nach einer 5-FU-basierenden kombinierten Radiochemotherapie mit 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und einer Kombinationstherapie aus AEW541 und Erlotinib.....	50
Abbildung 19:	Gegenüberstellung der Literatur und unserer Ergebnisse auf die KRAS- Stimulations-Hypothese.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vereinfachte TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome nach der aktuellen UICC-Klassifikation	4
Tabelle 2:	Vereinfachte Stadieneinteilung der kolorektalen Karzinome nach der aktuellen UICC-Klassifikation	5
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller.....	17
Tabelle 4:	Biochemikalien und Enzyme und deren Hersteller.....	18
Tabelle 5:	Gebrauchswaren und deren Hersteller	18
Tabelle 6:	Geräte und deren Hersteller.....	19
Tabelle 7:	Reaktionssysteme und deren Hersteller.....	19
Tabelle 8:	Lösungen/Puffer und deren Zusammensetzung.....	20
Tabelle 9:	Zusammensetzung des Mediums für die Zelllinie SW48	21
Tabelle 10:	Zelllinien und deren Hersteller	21
Tabelle 11:	Primärantikörper und deren Hersteller.....	22
Tabelle 12:	Sekundärantikörper und deren Hersteller	22
Tabelle 13:	Primärantikörper und Verdünnung.....	26
Tabelle 14:	Sekundärantikörper und Verdünnung	26
Tabelle 15:	Beschreibung des Stimulationsschemas <i>steady state</i>	27
Tabelle 16:	Beschreibung des Stimulationsschemas mit verschiedenen FKS-Konzentrationen	27
Tabelle 17:	Beschreibung des Stimulationsschemas mit verschiedenen Stimulanzen	27
Tabelle 18:	Zeitliches Stimulationsschema der Zellen mit FKS für die Western-Blot-Analyse.....	28
Tabelle 19:	Darstellung der <i>pro well</i> ausplattierten Zellzahl bei verschiedener Bestrahlungsdosis.....	30
Tabelle 20:	Einstellungen für die Bestrahlung	31
Tabelle 21:	Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse des Migrations- und Invasionsassays der SW48-Zellen im Vergleich mit experimentellen Arbeiten in der Literatur	56
Tabelle 22:	Vereinfachte Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Proliferationsassays, der Koloniebildungsassays und eine Auswahl von Literaturergebnissen.....	62
Tabelle 23:	Auswahl relevanter Studien über genetische und histologische Nachweise für die Resistenz gegen eine anti-EGFR-Therapie beim KRK.....	69

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
BSA	Bovines Serumalbumin
CFA	Koloniebildungsassay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
5-FU	5-Fluorouracil
FAP	Familiäre Adenomatöse <i>Polyposis</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Aktivierendes Protein
HER	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HNPCC	Hereditäres kolorektale Karzinom ohne <i>Polyposis</i>
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor I</i>
IGF-2R	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor II</i>
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
KRK	Kolorektales Karzinom
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MTT	Colorimetrisches Assay
NRAS	<i>Neuroblastoma Rat Sarcoma</i>
OS	Gesamtüberleben
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PET	Polyethylenterephthalat
PFS	Progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	<i>Rapidly Growing Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RCT	Radiochemotherapie
RR	Ansprechrage
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RTKI(s)	Rezeptortyrosinkinaseinhibitor(en)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS(-T)	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (mit Tween)
TNM	Klassifikation maligner Tumore
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eine der häufigsten Tumorentitäten weltweit und mit hoher Morbidität und Mortalität verknüpft. Daten aus Deutschland zeigen, dass bösartige Neubildungen des Dick- und Enddarms im Jahre 2013 als Tumorneuerkrankung unter allen Krebslokalisationen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) bei Männern einen Anteil von ca. 13,2 Prozent und bei Frauen einen Anteil von ca. 11,8 Prozent haben. Damit liegt Darmkrebs – Dünndarntumore ausgenommen – unter allen Tumorneuerkrankungen bei Männern mit 33.370 Fällen pro Jahr an dritter Stelle nach Prostata- und Lungenkrebs und bei Frauen mit 27.210 Fällen pro Jahr nach Brustdrüsenkrebs an zweiter Stelle. Insgesamt zeigte sich in den letzten Jahren ein leichter Rückgang der Inzidenz von Darmkrebs (RKI 2016). In Abbildung 1 ist die rohe Neuerkrankungsrate für Darmkrebs in Deutschland dargestellt. Neueste Schätzungen aus den USA für das Jahr 2017 gehen von etwa 135.430 neuen Fällen von kolorektalen Karzinomen aus, das entspricht einem Anteil von etwa 8 bis 9 % der zehn häufigsten Tumorentitäten. Klar ausgewiesen werden in den USA Karzinome des Rektums, welche mit 28 % aller kolorektaler Karzinome fast ein Drittel ausmachen. Aus diesen neuesten Schätzungen aus den USA ist somit ersichtlich, dass kolorektale Karzinome beim Mann weiterhin an dritter Stelle der am häufigsten auftretenden Krebsarten, nach dem Prostatakarzinom und Lungen- und Bronchialkarzinomen, liegen. Interessanterweise zeigen diese Daten aber auch, dass bei Frauen in den USA der Neuerkrankungsanteil bei kolorektalen Karzinomen hinter dem von Brustdrüsenkarzinomen und der Lungen- und Bronchialkarzinomen im Gegensatz zu Frauen in Deutschland an dritter Stelle liegt (Siegel et al. 2017).

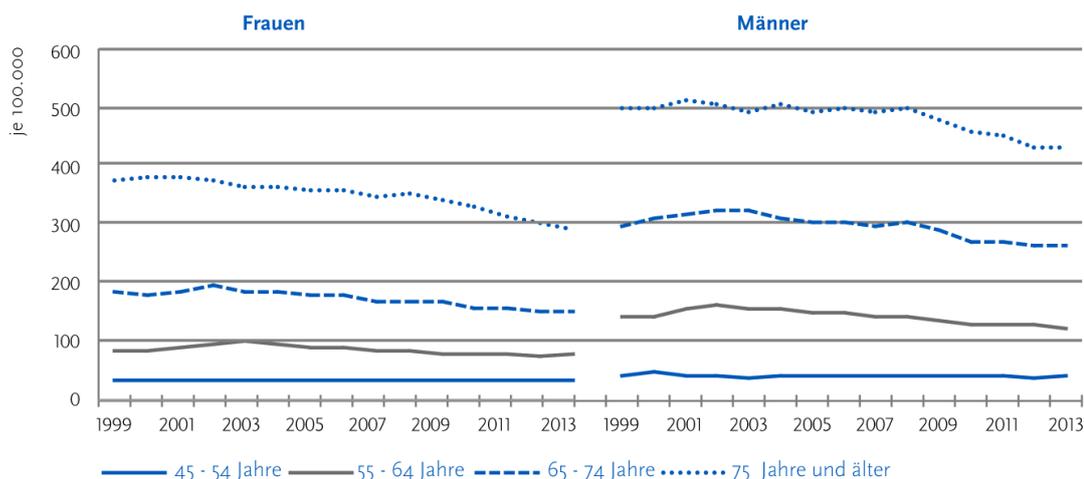


Abbildung 1: Rohe Neuerkrankungsraten für Darmkrebs (ICD-10 C18-C21) in Deutschland, nach Altersgruppen und Geschlecht, 1999 – 2013 (RKI 2016). Die Verwendung der Abbildung erfolgt nach freundlicher Genehmigung durch Dr. Klaus Kraywinkel, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut, Berlin.

Insgesamt wird über die letzten Jahre ein kontinuierlicher Rückgang der Sterberaten beim Darmkrebs in Deutschland wie auch in anderen Industrienationen beobachtet. Abbildung 2 vergleicht die altersstandardisierten Sterberaten mit den skandinavischen Ländern und den USA.

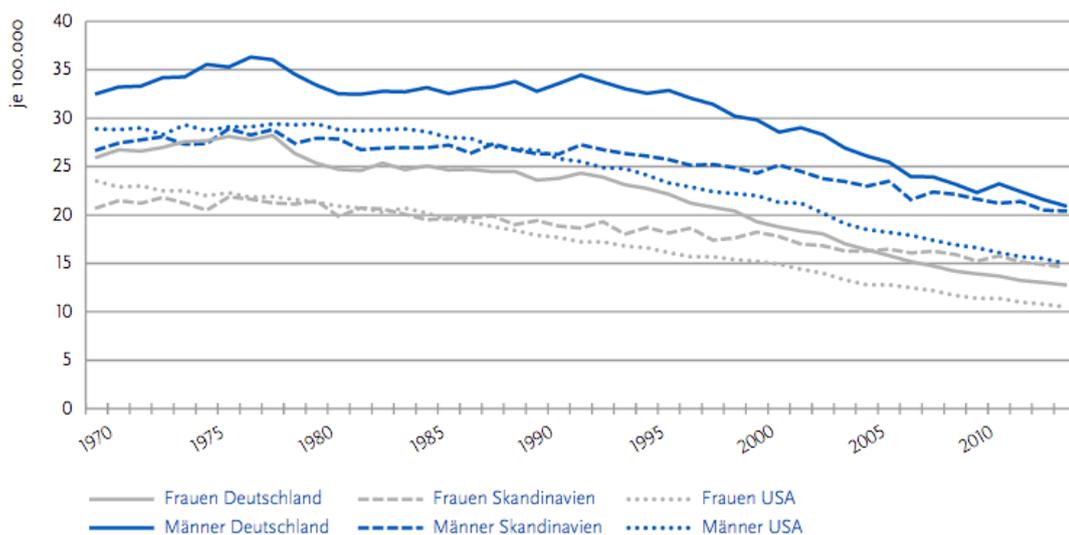


Abbildung 2: Altersstandardisierte Sterberaten für Darmkrebs (ICD-10 C18-C21), in Deutschland, Skandinavien und den USA, nach Geschlecht, 1970 – 2014 (RKI 2016). Die Verwendung der Abbildung erfolgt nach freundlicher Genehmigung durch Dr. Klaus Kraywinkel, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut, Berlin.

Das Auftreten kolorektaler Karzinome ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Zum einen erhöhen allgemein bekannte Risikofaktoren wie Tabakrauchen, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung, Alkohol und erhöhter Wurst- und Fleischkonsum roten Fleisches die Wahrscheinlichkeit an Darmkrebs zu erkranken (Chan und Giovannucci 2010). Eine Elimination dieser Risikofaktoren minimiert das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms. Entsprechend wurden auch die Empfehlungen in den Leitlinien zur Verhütung des kolorektalen Karzinoms festgelegt (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019). Diskutiert wird auch ein Zusammenhang zwischen niedrigem sozioökonomischen Status und dem erhöhten Risiko ein kolorektales Karzinomen zu entwickeln (Doubeni et al. 2012).

Zudem stellen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* in geringem Umfang Risikofaktoren dar (Vagefi und Longo 2005). Auch hereditäre Formen wie das Hereditäre Kolorektale Karzinom ohne *Polyposis* (HNPCC), das Juvenile *Polyposis* Syndrom oder die MUTYH-assoziierte *Polyposis* stellen sowohl große Risikofaktoren als auch ein erhöhtes Lebenszeitrisiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken dar. Bei der Familiären Adenomatösen *Polyposis* (FAP) liegt das Erkrankungsrisiko bei 100 % (Wirtzfeld et al. 2001; Campos et al. 2015). Treten kolorektale Karzinome vermehrt in Familien auf, spricht man von familiären kolorektalen Karzinomen. Diese sind allerdings nicht einer hereditären Form zuzuordnen. So haben Verwandte von Patienten, bei denen mittels Koloskopie Adenome oder fortgeschrittene Adenome diagnostiziert wurden, scheinbar signifikant ein erhöhtes Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Tuohy et al. 2014). Die weitaus häufigste Form von kolorektalen Karzinomen ist die sporadisch auftretende, welche etwa 70 % aller kolorektaler Karzinome ausmacht. Eine familiäre Häufung wird hier nicht beobachtet (Mármol et al. 2017).

Die Unterscheidung zwischen Rektum- und Kolonkarzinom ist klinisch essentiell, da daraus direkt unterschiedliche prognostische, diagnostische und therapeutische Konsequenzen resultieren. Allerdings werden die anatomischen Grenzen zwischen Rektum- und Kolonkarzinomen unterschiedlich definiert. Legt man die Definition des internationalen Dokumentationssystems zugrunde, sind Karzinome des Rektums solche Tumore, deren aboraler Rand nach Messung mit dem starren Rektoskop von der Anokutanlinie 16 cm oder weniger entfernt ist (Fielding et al. 1991). Darüber hinaus werden Rektumkarzinome noch den jeweiligen Rektumdritteln zugeordnet. Wiederum ausgehend von der Anokutanlinie können die Karzinome im unteren Drittel des Rektums (< 6 cm), im mittleren Drittel des Rektums (6 cm – 12 cm) oder im oberen Drittel des Rektums (12 cm – 16 cm) liegen (Soreide et al. 1997)

Hingegen wird in den USA eine andere Definition bevorzugt. Demnach werden Karzinome bzw. Tumore, die mit dem starren Rektoskop einen Abstand von weniger als 12 cm ausgehend von der Anokutanlinie haben, dem Rektum zugeordnet. Alle anderen, die mehr als 12 cm von der Anokutanlinien mit dem starren Rektoskop messen, werden dem Kolon zugeordnet (Nelson et al. 2001). Letztere haben eine geringere Rezidivrate und werden deshalb auch wie Kolonkarzinome und nicht wie Rektumkarzinome behandelt (Pilipshen et al. 1984).

Auf Grundlage der TNM-Klassifikation (Tab.1), welche die Tiefeninvasion des Primärtumors (T), den Lymphknotenstatus (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) beinhaltet, werden kolorektale Karzinome standardmäßig nach Kriterien der UICC in vier Erkrankungsstadien (Tab.2) eingeteilt. Tab. 1 und Tab. 2 zeigt jeweils vereinfacht die TNM-Klassifikation und die UICC-Stadieneinteilung aus *TNM, Classification of Malignant Tumours, Seventh Edition*, Wiley-Blackwell 2009 (Sobin et al. 2009). Die Erkrankungsstadien wiederum sind nicht nur für eine exakte Beschreibung der Tumorerkrankung wichtig, sondern bestimmen regelrecht die Prognoseeinschätzung und vor allem die Therapie.

Tabelle 1: Vereinfachte TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome nach der aktuellen UICC-Klassifikation.

Primärtumor		Regionäre Lymphknoten		Fernmetastasen	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
T1	Tumor infiltriert Submukosa	N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten	M1	Fernmetastasen vorhanden
T2	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i>	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten		
T3	Tumor infiltriert durch die <i>Muscularis propria</i> hindurch in das subseröse Fettgewebe oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe				
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum				

Tabelle 2: Vereinfachte Stadieneinteilung der kolorektalen Karzinome nach der aktuellen UICC-Klassifikation.

Stadium	T-Stadium	N-Status	M-Status
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
III	Jedes T	N1, N2	M0
IV	Jedes T	N1, N2	M1

So ist die Prognose der Erkrankung abhängig vom Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose. Im lokalen Stadium liegt die 5-Jahresüberlebensrate noch bei ca. 90 %. Bei Lymphknotenmetastasierung liegt sie bereits bei ca. 50 % und fällt im fortgeschrittenen metastasierten Stadium auf 10 bis 20 % ab (Beets et al. 2017).

1.2 Molekulargenetische Veränderungen beim KRK

Trotz der klinischen Unterschiede zwischen Rektum- und Kolonkarzinomen wurden bisher in genomischen Untersuchungen noch keine Unterschiede der beiden Tumorentitäten gefunden, die diese molekulargenetisch unterscheiden könnten (*Cancer Genome Atlas Network* 2012). Histologisch handelt es sich mit etwa 95 % bei der Mehrzahl der KRKs um Adenokarzinome, also Karzinome des Drüsenepithels (Thrumurthy et al. 2016). Diese Form kommt bei sporadisch auftretenden KRKs am häufigsten vor. Heute weiß man, dass der Entstehung eines Karzinoms eine Vielzahl von genetischen und molekularen Prozessen und Entstehungsmechanismen zugrunde liegt. Der Begriff Adenom-Karzinom-Sequenz wurde zum ersten Mal bereits von Jackman und Mayo (1951) in einer Übersichtsarbeit verwendet. Dort wurden Ähnlichkeiten von Adenomen und Karzinomen in Bezug auf Lokalisation, Alters- und Geschlechtsverteilung, Assoziation von synchronen Adenomen und KRKs und die hohe Anzahl von Karzinomen bei Patienten mit einer FAP beschrieben. Muto et al. (1975) diskutierten in ihrer Arbeit die Zusammenhänge von polypösen Adenomen und villösen Adenomen mit ihrem unterschiedlichen Risiko für das KRK und wiesen auf das Potenzial von Präventionsmaßnahmen und die Erforschung der Ätiologie hin. Genetische Veränderungen der Adenom-Karzinom-Sequenz als Modell wurden von Fearon und Vogelstein (1990) in ihrer klassischen Publikation genauer beschrieben und bilden bis heute die Grundlage des Verständnisses über die Sequenz. Sie stellten die Hypothese auf, dass zur Entstehung eines Adenokarzinoms mehrere molekulare Veränderungen und Schritte stattfinden, die letztlich zu einem Karzinom führen. Obwohl im Modell eine mögliche Serie von genetischen Veränderungen vorgeschlagen wird, ist die Akkumulation der Veränderungen das wichtigste, nicht die Reihenfolge. Entscheidende Veränderungen werden

in der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *p53* und Aktivierung von Onkogenen wie *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) ebenso beobachtet wie Hypo- und Hypermethylierungen und Chromosomendeletionen, welche in einem Zeitraum von etwa 10 bis 15 Jahren zu einer malignen Entartung von normalem Zellgewebe führen. Bei der FAP beispielsweise führen Keimbahnmutationen zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC (*Adenomatous Polyposis of the Colon*), was bereits in jungen Jahren zu einer beschleunigten Entartung kolorektaler Zellen führt und mit einer Penetranz von 100 % zu einem KRK führt. Dem HNPCC liegen Mutationen in DNA-Reparatur-Genen (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*) zugrunde, was zur Folge hat, dass während der Replikation eine verminderte DNA-Reparatur stattfindet, sich so Mutationen anhäufen und somit die Karzinogenese gefördert wird. Von der fehlerhaften Reparatur sind u. a. auch DNA-Wiederholungssequenzen wie z. B. Mikrosatelliten betroffen. So kommt es zur Veränderung der Anzahl der Wiederholungssequenzen, was als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet wird. Aufgrund der verschiedenen Entstehungswege und damit auch verbundenen Therapieansätze ist eine genaue molekulare und histopathologische Untersuchung der Gewebeentnahmen heutzutage unabdingbar (Hata et al. 2015; Baretton und Aust 2011). Dennoch sind die bisher verfügbaren Biomarker und Mutationstestungen für eine zielgerichtete und individualisierte Therapie aufgrund der großen Heterogenität der KRKs nicht ausreichend, und so gewann in den letzten Jahren die Identifikation bspw. neuer Biomarker und Differenzierung verschiedener Mutationen immer mehr Bedeutung.

1.3 Die Rezeptortyrosinkinasen *Epidermal Growth Factor Receptor* und *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) gehört als Rezeptortyrosinkinase (RTK) zur großen Familie der EGFR-Familie, welche neben dem EGFR, auch ErbB1 oder HER1 genannt, noch ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) beinhaltet (Yarden und Sliwkowski 2001). Aufgebaut ist der EGFR aus einem transmembranen Glykoprotein mit einer intrazellulären Tyrosinkinase und zwei extrazellulären Ligandenbindungsdomänen (Carpenter und Cohen 1990). Letztere dienen beide als Bindungsstelle für spezielle Liganden, wodurch es durch die Bindung zu einer Konformationsänderung und Transphosphorylierung kommt. Dabei kann der EGFR als Homodimer (EGFR-EGFR) oder Heterodimer (z. B. EGFR-HER2/neu) vorliegen, was eine bessere Stabilität für die Ligandenbindung bedeutet (Rubin und Yarden 2001). Liganden sind z. B. *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor* (TGF α), Amphiregulin oder Neuregulin (Citri und Yarden 2006).

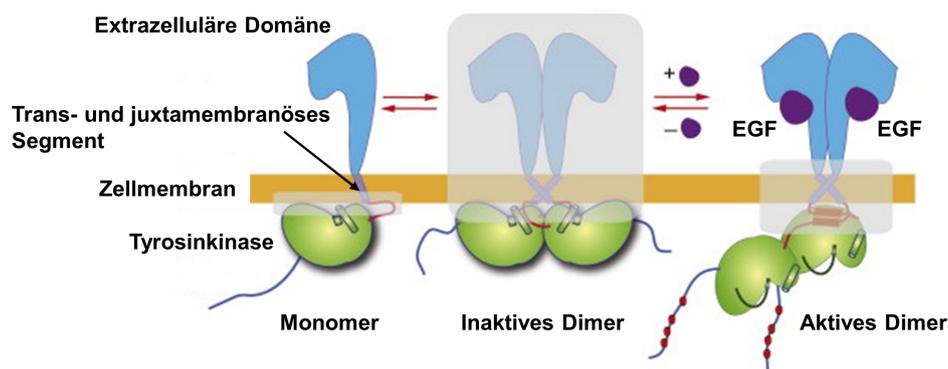


Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei EGFR Zustände. Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem trans- und juxtamembranösen Teil und der Tyrosinkinase. Der EGFR kann als Monomer oder Dimer vorliegen. Die Schattierungen zeigen strukturell ungelöste Teile. Nach Bindung eines Liganden, hier EGF, kommt es zur Konformationsänderung des EGFR-Dimers und damit zum aktiven Zustand. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach Arkhipov et al. (2013). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Durch die Phosphorylierung der Tyrosinkinase des EGFR werden Signalwege in Richtung Zellkern in Gang gesetzt. Die drei am besten charakterisierten Signalwege sind hierbei der *Mitogen-Activated Protein Kinase*-Signalweg (MAPK-Signalweg), der Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Signalweg) und der Phospholipase C Protein Kinase-Signalweg (PLC-PKB) (Marmor et al. 2004). Über vielstufige Signaltransduktionsprozesse werden beispielsweise die DNA-Transkription eingeleitet, die Proteinbiosynthese induziert und antiapoptotische Signale aktiviert, resultierend in Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Förderung des Überlebens der Zellen (Yarden und Sliwkowski 2001).

Mehrere verschiedene bösartige Tumore wie das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC), das Magenkarzinom, das Mammakarzinom und das KRK weisen Mutationen oder eine Überexpression der Rezeptoren der EGFR-Familie auf (Roskoski 2014). Der Prozentsatz der Überexpression von EGFR variiert stark von der Tumorart. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses und der Lunge finden sich in der Mehrzahl der Tumore eine Überexpression des EGFR. Hingegen werden beim KRK Zahlen vom überexprimierten EGFR zwischen 22 % und 75 % angegeben (Shin et al. 1994; Herbst und Shin 2002). Spano et al. (2005) zeigten in ihrer Arbeit, dass es eine Assoziation zwischen der Überexpression vom EGFR und dem Auftreten von lokal fortgeschrittenen KRKs gibt. Eine andere Arbeit weist darauf hin, dass der EGFR in KRKs gerade mit Lymphknotenmetastasierung hochreguliert ist (Lu et al. 2012). Eine EGFR-Überexpression ist mit einer schlechteren Prognose verbunden und führt zu einem niedrigeren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben (Nicholson et al. 2001; Guo et al. 2011).

Bisher gibt es verschiedene Therapieansätze, um über die Hemmung des EGFR Prozessabläufe der Signalwege zu beeinflussen.

Klinische Bedeutung haben beispielsweise die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab. Diese binden kompetitiv an die extrazelluläre Domäne des EGFR, blocken die Ligandenbindungsstelle und hemmen so die Tyrosinkinaseaktivität. Zugelassen sind die beiden Antikörper zur Behandlung des metastasierten KRKs mit RAS-Wildtyp-Status als Kombination zu einer Erstlinien-Chemotherapie oder unter gewissen Voraussetzungen zur Zweitlinientherapie. Für Cetuximab besteht außerdem eine Zulassung zur Therapie von fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen in Kombination mit einer Strahlenbehandlung und bei Rezidiven oder Metastasierungen eines solchen Karzinoms in Kombination mit einer platin-basierten Chemotherapie. Direkte Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib binden kompetitiv mit Adenosin-5-Triphosphat reversibel an der intrazellulären katalytischen Domäne der EGFR-Tyrosinkinase und hemmen so die Autophosphorylierung und die weitere Signalübertragung (Yewale et al. 2013). Aktuell ist Erlotinib als Tarceva® in Deutschland bei der Erstlinien-Therapie bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC mit positiver EGFR-Mutation, als Wechsel-Erhaltungstherapie bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC mit positivem EGFR-Mutationsstatus und unverändertem Krankheitszustand nach Erstlinien-Chemotherapie und bei Versagen mindestens einer vorausgegangenen Chemotherapie zugelassen. Außerdem besteht eine Zulassung zur Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms in Kombination mit Gemcitabin. Die Zulassungsberichte von Tarceva® (Erlotinib), Vectibix® (Panitumumab) und Erbitux® (Cetuximab) sind über die *homepage* der EUROPEAN MEDICINES AGENCY unter ema.europa.eu aufzurufen und sind im Literaturverzeichnis aufgeführt. Eine Weiterentwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren gegen EGFR bildet bspw. Afatinib, welches irreversibel an der intrazellulären katalytischen Domäne der EGFR-Tyrosinkinase wirkt (Keating 2016).

Der *Insulin-like Growth Factor Receptor I* (IGF-1R) bildet zusammen mit dem IGF-2R, dem *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-1) und *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-2) und den sechs IGF-Bindeproteinen das *Insulin-like Growth Factor System*. Dieses System hat neben seiner Funktion im Glukosestoffwechsel eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Zellüberleben (Annunziata et al. 2011). Der IGF-1R gehört wie der EGFR zu den Rezeptortyrosinkinasen. Er ist wesentlich in die Prozesse von Tumorgenese, Tumorzellproliferation und Metastasierung verschiedenster Tumorarten eingebunden (Baserga 2000).

Der IGF-1R ist ein Transmembranprotein, aufgebaut aus zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten mit je einer extrazellulären Alpha-Kette, die zur Ligandenbindung dienen, und je einer transmembranen Beta-Kette mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (Fujita-Yamaguchi et al. 1986; Ullrich et al. 1986). Der IGF-1R kann entweder Homodimere (IGF-1R/IGF-1R) oder Heterodimere (IGF-1R/IR) mit dem Insulin-Rezeptor (IR) bilden. Eine Ligandenbindung mit IGF-1 und IGF-2 führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und die beiden Beta-Untereinheiten können sich gegenseitig transphosphorylieren (Siddle et al. 2001). Über die Aktivierung des Rezeptors werden dann u. a. der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg aktiviert.

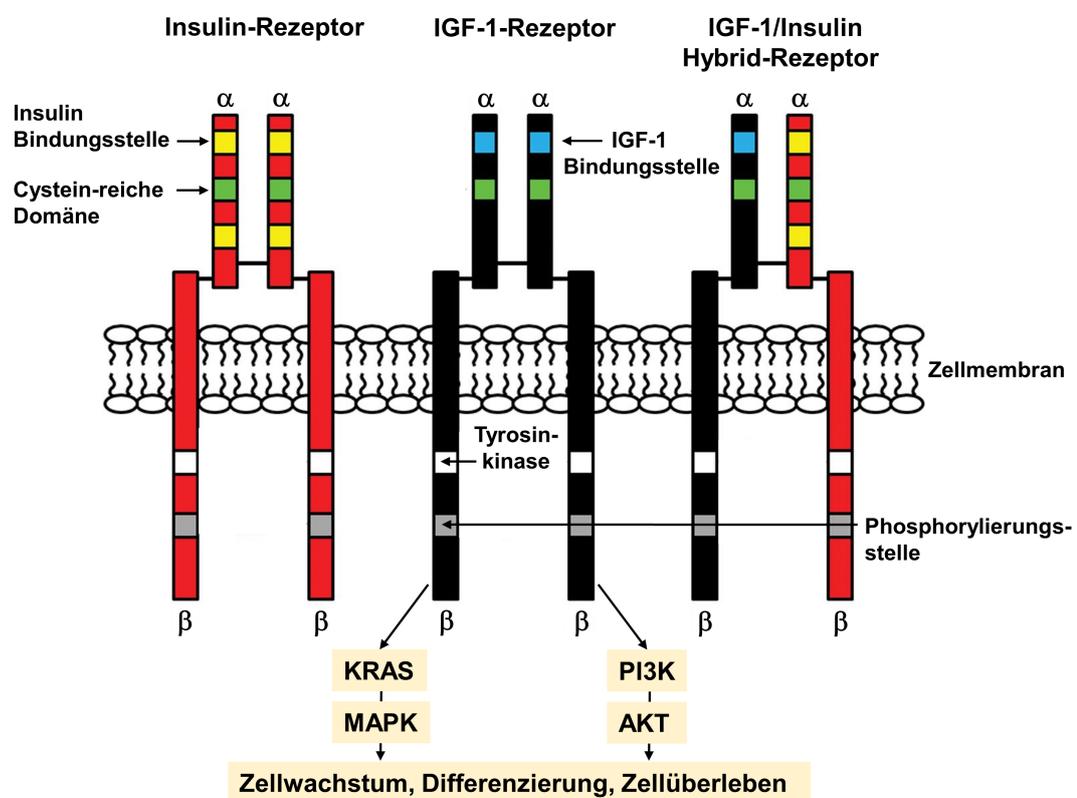


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Insulin-Rezeptors und des IGF-1-Rezeptors. Beide Rezeptoren bestehen aus zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten mit je einer extrazellulären α -Kette, die zur Ligandenbindung dienen, und je einer transmembranen β -Kette mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Nach Bindung eines Liganden, z. B. durch IGF-1, kommt es zur Konformationsänderung und Transphosphorylierung mit Signalkaskadenaktivierung wie den MAPK-Signalweg oder den PI3K-Signalweg. Abbildung entnommen aus Hawkes und Kar (2004) und modifiziert nach Hale und Coward (2013) und Hawkes und Kar (2004). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

In der Tumorgenese ist das IGF-System und insbesondere der IGF-1R in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus gerückt. Beispielsweise liegt in neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes eine erhöhte Expression von IGF-1R vor (Zhang und Yee 2004). Andere Daten zeigen, dass die Expression von IGF-1R und IGF-2R in *Glioblastoma multiforme*

verglichen zu gesundem Gehirngewebe erhöht ist und die IGF-1R-Positivität als ein unabhängiger prognostischer Faktor mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist. Deshalb wird IGF-1R als Therapieziel vorgeschlagen (Maris et al. 2015). Im Gewebe kolorektaler Karzinome und entsprechendem Metastasengewebe wurde in über 90 % eine Überexpression des IGF-1R beobachtet (Hakam et al. 1999). Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass gerade bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms ein aktiviertes IGF-System eine elementare Rolle spielt (Samani et al. 2007). Der Einfluss des IGF-Systems mit seinen Rezeptortyrosinkinasen auf die Tumorgenese macht es zu einem interessanten Therapieziel. Leiphrakpam et al. (2014) zeigten in ihrer Arbeit, dass jeweils der humanisierte monoklonale Antikörper MK-0646 und der Tyrosinkinaseinhibitor OSI-906 gegen den IGF-1R bei IGF-1R-abhängigem KRK einen Zelltod hervorriefen und potentielle Kandidaten für eine anti-IGF-1R-Therapie sind. Ein weiterer in der präklinischen und klinischen Erprobung befindlicher Tyrosinkinaseinhibitor ist AEW541. AEW541 ist ein sogenanntes kleines Molekül, das zur Gruppe der Pyrrol(2,3-d)pyrimidine gehört. Es inhibiert selektiv die Kinaseaktivität des IGF-1R, in dem es an die Beta-Untereinheit des Rezeptors bindet. AEW541 ist so optimiert, dass es selektiv zwischen dem naheverwandten Insulin-Rezeptor und dem IGF-1R unterscheiden kann. Auf zellulärer Ebene ist die Affinität von AEW541 gegenüber dem IGF-1R 27-fach höher als zum Insulin-Rezeptor. AEW541 hemmt sowohl das IGF-1 vermittelte Zellüberleben als auch substratunabhängig das Wachstum von Tumorzellen (García-Echeverría et al. 2004). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen humanen gastrointestinalen Karzinomzelllinien und im Tiermodell mit AEW541 über die Blockierung der ERK- (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*) und Proteinkinase B- (AKT) Aktivierung das Tumorstadium, die Zellmigration und das Zellüberleben supprimiert werden konnte (Piao et al. 2008). AEW541 hat sich als antitumoröse Substanz bewiesen und ist somit in der Tumorforschung interessant.

Zwischen dem IGF-1R und EGFR bestehen interessante Interaktionen. An Zelllinien von *Glioblastoma multiforme* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor gegen EGFR zu einer Hochregulation von IGF-1R mit erhaltener Signalwirkung über den PI3K-Weg führte, resultierend in antiapoptotischer Wirkung und proinvasivem Effekt. Eine Co-Inhibition von EGFR und IGF-1R verbesserte deutlich die apoptotische Wirkung und reduzierte das invasive Potential (Chakravarti et al. 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung einer doppelten Inhibition gegen den EGFR und IGF-1R in kolorektalen Tumorzellen ebenfalls intensiv untersucht.

Im Vergleich zur Inhibition nur eines Rezeptors, führte die gemeinsame Inhibition von EGFR und IGF-1R zu einem deutlich stärkeren therapeutischen Effekt (Oberthür et al. 2017; Kaulfuß et al. 2009).

1.4 Der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg

Der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg sind zwei entscheidende Signalwege in zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Förderung des Überlebens der Zellen. Wie im Abschnitt 1.3 beschrieben, werden diese Wege u. a. über Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR und IGF-1R induziert.

Schlüsselproteine des MAPK-Signalwegs sind RAS, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase* RAF, MAP-Kinase-Kinase MEK und *Extracellular Signal-Regulated Kinase* ERK. Über vielstufige intrazelluläre Transphosphorylierungs- und Proteininteraktionsprozesse über jene Schlüsselproteine werden zelluläre Prozesse in Gang gesetzt (Wee und Wang 2017). Am Ende des MAPK-Signalwegs steht die Proteinkinase ERK. Bis heute konnten mehrere Isoformen von ERK identifiziert werden. Funktionell wichtig und am bekanntesten sind die Isoformen ERK1 und ERK2. ERK1 und ERK2 sind Serin/Threonin-Kinasen, die scheinbar immer gemeinsam aktiviert sind (Lefloch et al. 2009). Eine neuere Arbeit äußert die Vermutung, dass beide Formen allerdings funktionell als redundant angesehen werden können (Buscà et al. 2016). Nachgeschaltet steht ERK mit über einhundert zytoplasmatischen und im Zellkern befindlichen Substraten in Wechselwirkung, um ein großes Spektrum an physiologischen und pathologischen Antworten, resultierend in Zellwachstum, Differenzierung, Migration und antiapoptotischer Wirkung, auszulösen (Yoon und Seger 2006).

Ein weiterer die Zellabläufe kontrollierender Signalweg ist der PI3K-Signalweg. Schlüsselproteine dieses Signalwegs sind Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, Proteinkinase B (AKT) und *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Eine Hyperaktivierung oder Fehlregulation dieses Signalweges findet sich nicht nur in vielen bösartigen Tumoren – häufig aufgrund von aktivierenden Mutationen in EGFR –, sondern auch bei *Diabetes mellitus*, Autismus oder dem Alterungsprozess (Dibble und Cantley 2015). Der PI3K-Signalweg ist komplex und die einzelnen molekularen Abläufe noch Gegenstand intensiver Forschung. Initialschritt des Signalweges ist die Phosphorylierung und somit Aktivierung von PI3K über entweder aktivierte Rezeptortyrosinkinasen oder über bindende GTPasen wie RAS. Die aktivierte PI3K verursacht dann an der Zellplasmamembran eine Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat (PIP3). PIP3 wiederum kann AKT binden und aktivieren. AKT ist wie ERK1 und ERK2

eine Serin/Threonin-Kinase, die mit einer Vielzahl von Substraten insbesondere den Metabolismus, die Proliferation, die Proteinsynthese, die Zellgröße, das Überleben, die Proteinsynthese und die Zellmotilität beeinflusst (Franke et al. 1997). Sato et al. (2004) vermuteten in ihrer Arbeit, dass ein *crossstalk* innerhalb der beiden Signalwege von MAPK und PI3K existiert.

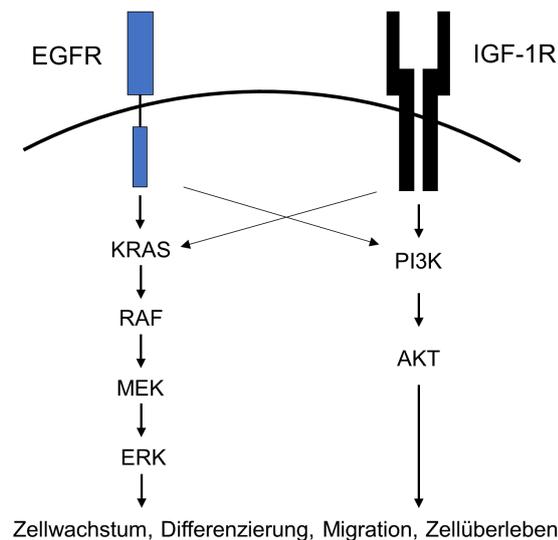


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des MAPK- und des PI3K-Signalwegs. Über die Rezeptortyrosinkinasen EGFR und IGF-1R werden die nachfolgenden Signalkaskaden aktiviert, resultierend in Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Zellüberleben. Modifiziert nach Heinemann et al. (2013). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

1.5 Das Onkogen *KRAS* und *KRAS*-Mutationen im KRK

Onkogene im Allgemeinen sind Gene, welche zur Zellregulation beitragen und für das Zellwachstum mitverantwortlich sind. Finden in Onkogenen Mutationen statt, die zu einer konstitutiven Aktivierung ihrer Genprodukte führen, wachsen die Zellen unkontrolliert. Im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen, die in der Karzinogenese dem Prinzip des „*loss of function*“ unterliegen, erlangen Onkogene durch Mutationen ein „*gain of function*“, das heißt ein Zugewinn ihrer Funktion, das Zellwachstum zu fördern. Das Onkogen *KRAS* gehört wie die zellulären Varianten *NRAS* und *HRAS* zur Familie der *RAS* Onkogene. Lokalisiert ist das *KRAS*-Gen im Genom auf Chromosom 12p12.1. Es kodiert für ein Protein, welches zur Superfamilie der kleinen GTPasen zählt. Über dieses Protein können Signale durch die Umwandlung von der inaktiven Guanosindiphosphat (GDP) gebundenen Form in eine aktive Guanosintriphosphat (GTP) gebundene Form von der Zellmembran in das Innere der Zelle übertragen werden. Ein einziger Aminosäureaustausch kann zu einer aktivierenden Funktion dieses Proteins führen (Fukushima und Takenoshita 2001). Dieser Weg ist mit

entscheidend für die Kontrolle in Pathogenitätsprozessen und Zellentartungsprozessen wie Angiogenese, Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und Metastasierung (Fang und Richardson 2005). Findet durch eine – üblicherweise – Punktmutation im *KRAS* Onkogen ein entscheidender Aminosäureaustausch im Protein statt, so führt dies zu einer erfolglosen Hydrolyse der GTPase des GTP zu GDP. Das Protein befindet sich dann in einem durchgehenden aktiven Zustand. Durch diese kontinuierliche Aktivität kann eine konstitutive Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen wie der MAPK-Signalweg oder der PI3K-Signalweg erklärt werden. Bei dieser Erklärung wird allerdings nicht ausreichend auf den molekularen Unterschied mit möglicher Relevanz auf die Signalwege zwischen den zahlreichen und verschiedenen *KRAS*-Mutationen eingegangen, sondern lediglich zwischen *KRAS*-Wildtyp und mutiertem *KRAS*.

Insbesondere bei der Entstehung des KRK nimmt *KRAS* eine zentrale Rolle ein. Shirasawa et al. (1993) zeigten, dass das aktivierte *KRAS* Protein eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese von KRKs spielt. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Größe und das Gewicht von kolorektalen Tumoren im Xenograft-Mausmodell mit mutiertem *KRAS*-Gen deutlich ausgeprägter waren als beim Modell mit nicht-mutiertem *KRAS*-Gen (Moon et al. 2014). In der weltweit großangelegten RASCAL *Multi Centre*-Studie wurden Informationen über den *KRAS*-Genotyp und dem klinischen Ausgang von Patienten gesammelt und analysiert. In der 1998 veröffentlichten RASCAL I Studie konnte gezeigt werden, dass *KRAS*-Mutationen nicht nur wichtig für die Entstehung von KRKs sind, sondern auch für die Tumorprogression. Die Anwesenheit einer *KRAS*-Mutation steigerte signifikant das Sterberisiko um 26 %. Außerdem konnte zum ersten Mal bei einem weitverbreiteten Tumor schlüssig erklärt werden, dass verschiedene Mutationen unterschiedliche Effekte ausüben. Jede Mutation von Guanin zu Thymin, aber nicht die von Guanin zu Adenin oder Cytosin führte signifikant zu einer Erhöhung der Sterberate um 44 %. Die häufigsten Mutationen fanden sich demnach im Kodon 12 und 13. Durch Punktmutationen fand der häufigste Aminosäureaustausch in Kodon 12 von Glycin (G) zu Aspartat (D) statt. Es folgte der Austausch in Kodon 12 von Glycin zu Valin (V) und in Kodon 13 von Glycin zu Aspartat. Als einzelne Mutationen untersucht wurden, konnte die Mutation G12V, welche bei unter 10 % der untersuchten Patienten vorkam, als signifikant unabhängiger Risikofaktor für ein Rezidiv und den Tod identifiziert werden. Um diese Punkte genauer untersuchen zu können, wurden in der RASCAL II Studie zusätzliche Patienten rekrutiert. Dort wurde die Rolle der *KRAS*-Mutationen in den verschiedenen Tumorstadien untersucht. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass sich die Mutation G12V insbesondere im Stadium C nach Dukes, entsprechend Stadium III nach UICC, aggressiv verhält und mit einem 50 % höherem

Rezidiv- und Sterberisiko verbunden ist. Interessanterweise konnte zwischen dem Auftreten einer G12V Mutation und dem Stadium B nach Dukes, entsprechend Stadium II nach UICC, dieser Zusammenhang nicht gesehen werden (Andreyev et al. 2001).

1.6 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Festlegung der Therapie setzt eine exakte klinische, histopathologische und apparative Diagnostik voraus und richtet sich dann, abgesehen von anderen individuellen Faktoren, nach dem UICC-Stadium.

Wichtigste Therapieoption des KRK ist die chirurgische Resektion mit Entfernung der Lymphknoten, bei der eine R0-Situation angestrebt wird, also Entfernung des Tumors im Gesunden ohne histopathologischen Nachweis von Tumorgewebe im Resektionsrand. Zwischen den Therapiemaßnahmen des Kolonkarzinoms und Rektumkarzinoms bestehen deutliche Unterschiede. Beim Kolonkarzinom ist nach einer chirurgischen Therapie stadienabhängig eine adjuvante, also postoperative oxaliplatinhaltige bzw. fluoropyrimidinhaltige Chemotherapie indiziert. Beim Rektumkarzinom ist im Stadium II und III nach UICC eine neoadjuvante, also präoperative Radio- oder Radiochemotherapie auf 5-Fluorouracil (5-FU) Basis mit oder ohne Folinsäure indiziert. Für bereits metastasierte Situationen bestehen verschiedene Chemotherapiekombinationen, am häufigsten mit 5-FU und Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan (Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019).

Zu den etablierten Behandlungen mit Chemotherapie und Radiotherapie wurden in den letzten Jahren mit Erfolg gezielt Antikörpertherapien eingesetzt. Dieses Prinzip fand auch beim KRK mit Antikörpern gegen den EGFR und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Eingang in die Therapie mit einer deutlichen Besserung der Prognose. Beispielsweise wird Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper mit hoher Bindungskapazität zu VEGF, sowohl in der Erstlinien- als auch Zweitlinien- Therapie beim metastasierten KRK eingesetzt. Bevacizumab verhindert so die Neovaskularisation des Tumors und führt zur Apoptose der Tumorzellen. Therapien mit Antikörpern gegen EGFR zeigen in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapieschemata eine Verbesserung der Prognose. In der EPIC Studie, einer Phase III Studie, konnte gezeigt werden, dass der gegen EGFR wirksame Antikörper Cetuximab und Irinotecan gegenüber Irinotecan alleine bei Patienten mit metastasiertem, EGFR-exprimierendem Kolonkarzinom, die bereits eine oxaliplatinbasierte Chemotherapie erhalten hatten, signifikant das progressionsfreie Überleben, die Ansprechrate (RR) und die Lebensqualität verbesserte (Sobrero et al. 2008). Van Cutsem et al. (2007) berichtete in einer anderen Phase III Studie über ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben mit dem gegen EGFR vollständig humanen monoklonalen

Antikörper Panatimumab bei Patienten mit progredientem, metastasiertem Kolonkarzinom nach vorangegangener Chemotherapie mit 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan gegenüber einer rein supportiven Therapie.

Es zeigte sich allerdings, dass lediglich Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-Status von einer anti-EGFR-Therapie profitierten, denn nur diese hatten ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (Bokemeyer et al. 2009). Neueste Ergebnisse bestätigen die letzten Empfehlungen, dass KRKs mit Mutationen in *KRAS* (Codon 12, 13, 59, 61, 117, 146) wohl kaum von einer anti-EGFR-Therapie mit monoklonalen Antikörpern profitieren und deshalb eine Mutationstestung vor dem Einsatz einer solchen bei einem metastasierten KRK immer stattfinden sollte (Allegra et al. 2016).

Der mechanistische Hintergrund für diese Beobachtungen wurde lange Zeit auf die Hypothese gestellt, dass *KRAS*-Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung der *Downstream*-Signalwege des EGFR führen – ohne dies eindeutig bewiesen zu haben. Vor allem indirekte Beweise wie die oben erwähnte anti-EGFR-Therapie mit bspw. Cetuximab stützen diese These. In dieser Arbeit sollte deswegen zu Beginn anhand des biologischen Verhaltens die Unterschiede zwischen der SW48 *KRAS*-Wildtyp Zelllinie und den in *KRAS* mutierten SW48 *KRAS* G12V, G12D und G13D Zelllinien herausgearbeitet werden.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Onkogen *KRAS* hat als wichtiger Bestandteil der Signalweiterleitung in der Zellregulation und Karzinogenese des KRK eine enorme Bedeutung. *KRAS*-Mutationen führen zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalkaskadensystems und beeinflussen nachhaltig die Zellregulationen und das biologische Verhalten der Tumore. Darüber hinaus sind sie nach dem derzeitigen Wissensstand ein entscheidender Faktor für Ansprechen oder Nichtansprechen von zielgerichteten Antikörpertherapien. Untersuchungen an Tumorzelllinien bieten modellhaft Einblicke in die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung. In der vorliegenden Arbeit wurden die kolorektalen Karzinomzelllinien SW48 *KRAS*-Wildtyp (wt), SW48 *KRAS*-G12V, SW48 *KRAS*-G12D und SW48 *KRAS*-G13D verwendet. *KRAS* Mutationen in den Kodons 12 und 13 machen ca. 40 % aller *KRAS* Mutationen im KRK aus, unter denen wiederum die Mutationen G12D, G12V und G13D den höchsten Anteil haben (Neumann et. al. 2009). Die o.g. Zelllinien mit einer jeweiligen *KRAS*-Mutation wiesen daher ein Allel mit der *KRAS*-Wildtypsequenz und ein Allel mit der *KRAS*-Mutation auf, und waren demnach heterozygot für die Mutation.

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, welchen Einfluss verschiedene *KRAS*-Mutationen in der kolorektalen Karzinomzelllinie SW48 auf das Ansprechen einer 5-FU-

basierenden Radiochemotherapie in der Gegenwart von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren haben.

Dazu wurde diese Arbeit in vier Abschnitte aufgebaut:

1) Zunächst wurde in verschiedenen Experimenten untersucht, ob es im Verhalten der KRK-Zelllinie SW48 mit einer *KRAS*-Mutation Unterschiede zu der KRK-Zelllinie SW48-KRAS-wt gibt. Dazu wurden Proliferationsassays angefertigt, um das Wachstumsverhalten der Zellen zu vergleichen. In Migrationsassays wurde das Einwanderungsverhalten der Zellen untersucht und in Invasionsassays wurde die Fähigkeit zur Invasion getestet.

2) Nachfolgend wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um auf Proteinebene eventuelle Unterschiede in der Expression von Schlüsselproteinen im MAPK- und PI3K-Kinase- Signalweg der jeweiligen Zelllinien darzustellen.

3) Nachfolgend wurden die Zellen mit den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib, einem EGFR Inhibitor, und AEW541, einem IGF1-R Inhibitor, behandelt, das Wachstumsverhalten der Zellen auf diese Inhibition in Proliferationsassays verglichen und untersucht, ob eine gegenseitige Beeinflussung der dualen Tyrosinkinaseinhibition besteht.

4) Zum Abschluss dieser Arbeit wurden die Zellen einer 5-Fluorouracil basierenden Radiochemotherapie, der gegenwärtigen Basistherapie für fortgeschrittene Rektumkarzinome, unter der Gegenwart von oben genannten Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren ausgesetzt, und ihr Ansprechen auf diese Therapie mittels Koloniebildungsassays untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	PAN, Aidenbach
EGF	Invitrogen, Waltham, USA
Erlotinib	Roche, Mannheim
Ethanol	Chemie Vertrieb Hannover, Hannover
Formaldehyde	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
IGF	Gro Pep, Adelaide, Australien
McCoy's 5A Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
NuPAGE™ MES Running buffer (20x)	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE™ LDS Sample buffer (4x)	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE™ See Blue Plus2	Life Technologies, Darmstadt
AEW-541	Novartis, Nürnberg
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	PAN, Aidenbach
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Biochemikalien und Enzyme

Tabelle 4: Biochemikalien und Enzyme und deren Hersteller

Biochemikalie	Hersteller
Fetales Kälberserum (SeraPlus)	PAN, Aidenbach
Matrigel™	BD Bioscience, San Jose, USA
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Gebrauchswaren

Tabelle 5: Gebrauchswaren und deren Hersteller

Gebrauchsware	Hersteller
6-, 24- oder 96- <i>well</i> - Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg Corning Inc., New York, USA
BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber	San Jose, USA
Blottingpapier GB 002, 003, 004	Schleicher & Schüll, Dassel
Deckgläser 24x60mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Millicell® Hanging Cell Culture Inserts	Billerica, USA
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
NuPAGE™ 4 – 12 % Bis-Tris Gele	Life Technologies, Darmstadt
Objektträger Superfrost®Plus	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg Corning Inc., New York, USA
PVDF-Membran	GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg

2.1.4 Geräte

Tabelle 6: Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
FluorChem [®] Q	Alpha Innotech, Logan, Utah, USA
Irradiation device 225A	Gulmaymedical, Camberley, UK
Synergy Mx	Bio Tek, Bad Friedrichshall
Accu-jet [®]	Brand, Wertheim
CO ₂ Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, München
Zentrifugen	Thermo Scientific, Langenselbold; Sigma-Alderich, Deisenhofen
Elektroblotter	Biometra, Göttingen
Elektrophorese power supply PS-304	Life technologies, Darmstadt
Vortexer	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland

2.1.5 Sterilisationsverfahren

Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert.

2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 7: Reaktionssysteme und deren Hersteller

Reaktionssystem	Hersteller
CellTiter 96 [®] AQueous Non-Radioactive Proliferation Assay (MTS)	Promega, Mannheim
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Diff-Quick-Färbeset	Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche, Mannheim

2.1.7 Lösungen

In dieser Arbeit wurden die Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch nach Sambrook et al. (1989) angesetzt.

Tabelle 8: Lösungen/Puffer und deren Zusammensetzung

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer (Western Blot)	1x TBS-Tween 5 % Magermilchpulver
Lysispuffer I für Proteine (modified RIPA)	150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 % NP-40 0,25 % Natriumdeoxycholat Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail 1 % PhosSTOP Phosphatase Inhibitor
10x PBS	1,37 M NaCl 81 mM Na ₂ HPO ₄ 27 mM KCl 14,7 mM KH ₂ PO ₄
10x TBS	1,37 M NaCl 100 mM Tris mit HCl auf pH 7,6
1x TBS-Tween (TBS-T)	1x TBS 0,1 % Tween 20
Transferpuffer IIa (Western Blot)	25 mM Tris pH 8,3 150 mM Glycin 20 % Methanol
20x Turbopuffer	0,2 M NaOH mit festem H ₃ BO ₃ auf pH 8,0
Waschlösung I (Western Blot)	1x TBS-Tween 2,5 % Magermilchpulver

2.1.8 Medium für eukaryotische Zellkulturen

Das für die Zellkultur verwendete Medium wurde von der Firma Life Technologies in Darmstadt erworben. Vor Gebrauch wurde das Medium mit fetalem Kälberserum (FKS) und einer Antibiotikaprophylaxe (Penicillin/Streptomycin) versetzt. Wird in der Arbeit von Kulturmedium oder Medium gesprochen, bezieht es sich auf die unten genannte Zusammensetzung.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mediums für die Zelllinie SW48

Zelllinie	Zusammensetzung des Mediums
SW48	McCoy's 5A Medium 10 % FKS 0,1 % Penicillin/Streptomycin

2.1.9 Biologisches Material

2.1.9.1 Eukaryotische Zelllinien

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien von der Firma Horizon, Cambridge, United Kingdom käuflich erworben:

Tabelle 10: Zelllinien und deren Hersteller

Zelllinie	Hersteller
SW48 K-Ras parental	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie, Horizon, Cambridge, United Kingdom
SW48 K-Ras (G12V/+)	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie, Horizon, Cambridge, United Kingdom
SW48 K-Ras (G12D/+)	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie, Horizon, Cambridge, United Kingdom
SW48 K-Ras (G13D/+)	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie, Horizon, Cambridge, United Kingdom

Die Zelllinie SW48 K-Ras parental ist die Wildtyp-Zelllinie. Von der Firma Horizon wurde mittels homologer Rekombination diese Zelllinie so verändert, dass jeweils ein *KRAS* Wildtyp-Allel gegen eine Mutation ausgetauscht wurde. Dadurch entstanden für die jeweilige Mutation heterozygote Zelllinien, dargestellt als (Mutation/+).

2.1.9.2 Antikörper

Tabelle 11: Primärantikörper und deren Hersteller

Primärantikörper	Hersteller
AKT Monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
α - Tubulin Monoklonaler Antikörper, Maus	Sigma Alderich, Deisenhofen
EGFR Polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
ERK Monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling, Technologies, Danver, USA
IGF1-R β Polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
pAKT Monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danver, USA
pERK Monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danver, USA

Tabelle 12: Sekundärantikörper und deren Hersteller

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP (horse radish peroxidase) konjugiert, Ziege	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch
Anti-Maus IgG HRP konjugiert, Kaninchen	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt) bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Das verwendete Kulturmedium wurde je nach Zelldichte alle zwei bis drei Tage gewechselt. Je nach Wachstumsrate wurde der am Kulturflaschenboden adhärenzte Zellrasen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Für den Teilungsvorgang wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen solange in EDTA/Trypsin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sich alle Zellen vom Kulturflaschenboden lösten. Die entstandene Zellsuspension wurde je nach Zelldichte und Wachstumsrate mit Kulturmedium im Verhältnis 1: 5 bis 1: 10 verdünnt und wieder in Kultur gebracht.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl einer bestimmten Zellsuspension erfolgte mit Hilfe einer Neubauer *improved* Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension auf die Zählkammer aufgetragen und die Zellen in vier Feldern der Kammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Der Mittelwert der vier ausgezählten Felder ergab die Anzahl der Zellen in 0,1 µl Zellsuspension.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen

Um die Zellen zu kryokonservieren, wurden zunächst die adhärenzten Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben durch Zugabe von EDTA/Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt und die Zellsuspension in einer Zentrifuge bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um das restliche Trypsin zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellsuspension mit 10 % DMSO versetzt und in 2 ml Kryogefäße pipettiert. Durch die Verwendung der Einfrierhilfe Mr. Frosty (Thermo Scientific, Langenselbold) wurde die Zellsuspension in einem auf -80°C gekühlten Gefrierschrank 1°C pro Minute auf -80°C herunter gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

2.2.1.4 Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination mit Mykoplasmen

Mit Hilfe des MycoAlert® Mycoplasma Detections Kits wurden routinemäßig ca. alle vier Wochen die eukaryotischen Zellkulturen auf eine Verunreinigung durch Mykoplasmen-Bakterien durchgeführt. Es wurde lediglich jeweils die Hälfte des Ansatzes verwendet. Bei

dem Test wird die Aktivität spezifischer Mykoplasmen-Enzyme durch ATP-Bestimmung vor und nach Zugabe eines spezifischen Substrates gemessen.

2.2.1.5 Bestimmung der Todesrate mittels des LDH Cytotoxicity Assays

Mittels des LDH Cytotoxicity Assays kann man indirekt die Anzahl sterbender Zellen messen. Der Assay beruht darauf, dass sterbende Zellen Lactat-Dehydrogenase freisetzen, die die Reaktion von Lactat zu Pyruvat unter Freisetzung von NADH^+ katalysiert. Die dabei entstandene Menge an NADH^+ wird durch ein im Reagenz enthaltendes Salz dargestellt. Die Farbreaktion kann gemessen werden und stellt proportional die Anzahl sterbender Zellen dar.

Die Todesrate verschiedener Zelllinien wurde in dieser Arbeit nach einer Behandlung mit Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren bestimmt. Hierfür wurden 4000 Zellen pro *well* einer flachbodigen 96-*well*-Platte in 50 μl Kulturmedium ausplattiert und für 2 h in 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden 50 μl Kulturmedium mit den jeweiligen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren in entsprechender Konzentration in die entsprechenden *wells* zugeführt. Die Zellen wurden nun für 72 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Cytotoxicity Assay nach Herstellerangaben durchgeführt und die Messung der Farbintensität mit Hilfe des Plattenphotometers SynergyMx (Bio Tek, Bad Friedrichshall) durchgeführt.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

Zunächst wurden die Zellen in einem *well* einer 6-*well*-Platte ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von ca. 80 bis 90 % unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Isolierung des Gesamtproteins wurden die Zellen mit ca. 200 μl PBS gewaschen und anschließend den Zellen ca. 150 μl Lysispuffer I pro *well* hinzugegeben. Die Menge an verwendetem Lysispuffer I wurde der Konfluenz der Zellen und dem verwendeten Kulturgefäß angepasst. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zellysate in ein Reaktionsgefäß überführt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren für 10 min bei 16000 rpm bei 4°C pelletiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Proteinkonzentration, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, gemessen. Das Proteinlysate wurde bei -20°C aufbewahrt. Eine Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C .

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Protein nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Zellen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Danach wird ein Coomassie-Brillant-Blau-Farbstoff verwendet, der in saurer Lösung unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen bindet. Die Stabilisierung des Farbstoffes durch diese Bindung in seine unprotonierte, anionische Sulfatform, führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 nm zu 595 nm. Durch die Messung einer Standardreihe mit einem Proteinstandard konnte eine Eichgerade extrapoliert werden. Das wie in Kapitel 2.2.2.1. beschriebene isolierte Proteinlysate wurde mit destilliertem H₂O 1: 100 verdünnt und es wurden je 50 µl der Verdünnung in drei *wells* einer 96-*well*-Platte pipettiert. Die fünffach konzentrierte Roti®-Nanoquant-Farbstoff-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) wurde mit destilliertem H₂O auf einfach verdünnt und es wurden je 100 µl Farbstoff-Lösung zu der Proteinlösung in die zu messenden *wells* hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion mit dem Plattenlesegerät SynergyMx (BioTek, Friedrichshall) gemessen und die Proteinkonzentration mit dem dazugehörigen PC-Programm Gene5 berechnet.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Hilfe des NuPAGE®-Systems der Firma Life Technologies (Darmstadt) durchgeführt. Den Proteinen wurde ¼ Volumen 4x LDS Sample Buffer (NuPAGE®, Life Technologies, Darmstadt), der zuvor mit 10 % DTT versetzt wurde, hinzugefügt und die entstandene Mischung wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Unverzüglich danach wurden die Proben auf ein NuPAGE® 4 - 12 % Bis-Tris Gel geladen. Ein gefärbter Marker (NuPAGE® See Blue Plus2, Life Technologies, Darmstadt) als Größenstandard wurde mitgeführt. Die anschließende Elektrophorese wurde für ca. 2 h, unabhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins, bei 160 V und 160 mA in MES-Puffer durchgeführt.

2.2.2.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Für die Übertragung der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurde ein sog. *Semi-dry*-Blot angewendet. Dafür wurde eine zugeschnittene PVDF-Membran für 10 sec. in 100 % Methanol aktiviert und direkt danach für 10 min in Transferpuffer IIa äquilibriert. Für den *Semi-dry*-Blot wurden drei in Transferpuffer IIa getränkte Whatman-Filter auf die Anode des Elektrobloßter gestapelt, gefolgt von der äquilibrierten PVDF-Membran und dem proteinenthaltenen Polyacrylamidgel. Zum Schluss wurden wiederum

drei in Transferpuffer IIa getränkte Whatman-Filter auf das Gel gelegt, die Kathode geschlossen und der Transfer der Proteine auf die Membran bei 25 V und 220 mA für ca. 90 min durchgeführt.

2.2.2.5 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Für die Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern wurde die PVDF-Membran zunächst in Blockpuffer I für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen der Proteine zu binden. Danach wurde die Membran in TBS-T geschwenkt und mit in TBS-T verdünnten, gewünschten primären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran zweimal für je 15 min in Waschlösung I gewaschen. Hiernach wurde die Membran für zwei Stunden in mit Blockpuffer I verdünntem, sekundärem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 min in Waschlösung I gewaschen und einmal für 5 min in TBS-T geschwenkt. Frisch angesetzte ECL-Prime-Detektionslösung (GE Healthcare, Freiburg) wurde auf die Membran gleichmäßig verteilt, um unter Verwendung des Detektionsgerätes FluorChem® Q. (Alpha Innotech, Logan, USA) die Signale zu detektieren.

Tabelle 13: Primärantikörper und Verdünnung

Primärantikörper	Verdünnung
AKT	1: 3000
α - Tubulin	1: 20000
EGFR	1: 2000
ERK	1: 3000
IGF1- R β	1: 2000
pAKT	1: 2000
pERK	1: 3000

Tabelle 14: Sekundärantikörper und Verdünnung

Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	1: 10000/ 1: 20000
Anti-Maus IgG	1: 40000

2.2.3 Analyse wichtiger Signalkaskadenproteine und deren Phosphorylierungsstatus nach verschiedenen Wachstumsstimulationen der Zelllinien

Um Unterschiede in der Expression der verschiedenen Signalkaskadenproteine und deren Phosphorylierungsstatus der Zelllinien zu analysieren, wurden vor der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Methode die Zelllinien auf unterschiedliche Weise mit Wachstumsfaktoren stimuliert.

Für diese Methode wurde die zu untersuchende Zelllinie in einem *well* einer 6-*well*-Platte ausplattiert und in Standardwachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70 – 80 % inkubiert. Vor der Stimulation mit der jeweiligen Substanz wurden die Zellen kurz mit 200 µl PBS gewaschen und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ einem FKS-freien Kulturmedium ausgesetzt (Serumentzug). Folgende Schemata wurden für die Stimulation angewendet:

Tabelle 15: Beschreibung des Stimulationsschemas *steady state*. Alle untersuchten Zelllinien wurden für 48 h mit 10 % FKS behandelt. Anschließend wurden die Proteine sofort isoliert.

Substanz	FKS
Konzentration	10 %
Stimulationszeit	48 h

Tabelle 16: Beschreibung des Stimulationsschemas mit verschiedenen FKS-Konzentrationen. Alle untersuchten Zelllinien wurden für 10 min mit den in der Tabelle beschriebenen FKS-Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurden die Proteine sofort isoliert.

Substanz	FKS				
Konzentration in %	0	0,1	1	5	10
Stimulationszeit in min	10				

Tabelle 17: Beschreibung des Stimulationsschemas mit verschiedenen Stimulanzen. Alle untersuchten Zelllinien wurden für 10 min mit den in der Tabelle eingesetzten Substanzen stimuliert. Anschließend wurden die Proteine sofort isoliert.

Substanz	FKS	FKS	EGF	IGF	EGF/IGF
Konzentration	0 %	10 %	100 ng/ml	1 nM	100ng/ml/1nM
Stimulationszeit in min	10				

Tabelle 18: Zeitliches Stimulationsschema der Zellen mit FKS für die Western-Blot-Analyse. Die Proteine der untersuchten Zellen wurden nach der Stimulation mit 5 % FKS nach unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert.

Substanz	FKS					
Konzentration	5 %					
Stimulationszeit	0 min	10 min	30 min	1 h	4 h	8 h

2.2.4 Funktionelle Analysen eukaryotischer Zellen

2.2.4.1 Migrationsassay

Mittels des *In-vitro*-Zellmigrationsassays (Millicell® 8.0 µm hanging PET inserts, Millipore, Billerica, USA) wurde das Migrationsverhalten der Zellen gegen einen FKS-Gradienten untersucht. Dafür wurde in ein *well* einer 24-*well*-Platte 500 µl Medium mit einer Konzentration von 20 % FKS gegeben. Die Inserts wurden für 10 min in serumfreiem Medium bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert und anschließend in die entsprechenden *wells* mit dem Medium gestellt. Dann wurden pro *well* je 4000 Zellen in 500 µl 5 % FKS-haltigen Medium in die Inserts überführt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die in der Innenseite der Inserts verbliebenden Zellen mit Wattestäbchen entfernt und die Zellen, die durch die Membran migriert sind, unter Verwendung des Diff Quick Färbesets (Eberhard Lehmann GmbH, Berlin) fixiert und gefärbt. Mit einem Skalpell wurden die Membranen aus den Inserts gelöst und auf Objektträgern in Öl fixiert. Für die Auswertung wurden unter einem Mikroskop die migrierten Zellen in jeweils fünf zufällig eingestellten Feldern in 40-facher Vergrößerung gezählt und deren Mittelwert berechnet.

2.2.4.2 Invasionsassay

Im *In-vitro*-Zellinvasionsassay (BioCoat™ Matrigel™ Invasions Chambers, BD Bioscience, San Jose, USA) wurde die Invasivität der Zelllinien untersucht. Die porenenthaltenden Membranen der Inserts sind mit lamininreicher Extrazellulärmatrix (Matrigel™) beschichtet, die eine Basalmembran *in vitro* darstellt. Nur invasive Zellen haben die Fähigkeit diese zu durchdringen und auf die Unterseite der Membran zu gelangen. In ein *well* einer 24-*well*-Platte wurden 500 µl Medium mit einer Konzentration von 20 % FKS gegeben. Die Inserts wurden für 10 min in serumfreiem Medium bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert und anschließend in die entsprechenden *wells* mit dem Medium gestellt. Dann wurden pro *well* je 4000 Zellen in 500 µl 5 % FKS-haltigen Medium in die Inserts überführt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die in der Innenseite der Inserts

verbliebenen Zellen mit Wattestäbchen entfernt und die Zellen, die durch das Matrigel™ und durch die Membran migriert sind, unter Verwendung des Diff Quick Färbeset fixiert und gefärbt. Mit einem Skalpell wurden die Membranen aus den Inserts gelöst und auf Objektträgern in Öl fixiert. Für die Auswertung wurden unter einem Mikroskop fünf zufällig eingestellte Felder in 40-facher Vergrößerung eingestellt, die migrierten Zellen gezählt und der Mittelwert berechnet.

2.2.5 Analyse der Proliferationsrate im CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay nach Rezeptortyrosinkinase-Inhibitorbehandlung

Im CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim) lässt sich die Proliferationsrate von Zellen messen. Dieser Assay beruht darauf, dass aktive Mitochondrien lebender Zellen schwach gefärbte Tetrazoliumsalze (MTS) in intensiv gefärbte Formazanderivate umwandeln. Eine Messung der Farbintensität lässt einen Rückschluss auf die Proliferationsrate der Zellen zu.

In dieser Arbeit wurde die Proliferationsrate der Zelllinien vor und nach einer Behandlung mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren bestimmt.

Dazu wurden 4000 Zellen pro *well* einer flachbodigen 96-*well*-Platte in 50 µl Kulturmedium ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen (2 h) bei 37°C und 5 % CO₂ wurden 50 µl Kulturmedium mit den jeweiligen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren in entsprechender Konzentration in die entsprechenden *wells* zugeführt. Die Messung des Nullwertes und die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Weitere Messungen erfolgten nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Plattenphotometers SynergyMx (Bio Tek, Bad Friedrichshall).

2.2.6 Analyse des Verhaltens der Zelllinien im Koloniebildungsassay nach einer 5-FU-basierten Radiochemotherapie in Gegenwart von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

Für den Koloniebildungsassay wurden die Zellen in unterschiedlicher Zellzahl in einer 6-*well*-Zellkulturplatte ausplattiert. Die ausplattierte Zellzahl richtete sich nach der Bestrahlungsdosis. Tabelle 19 zeigt die pro *well* ausplattierte Zellzahl bei verschiedener Bestrahlungsdosis.

Tabelle 19: Darstellung der pro well ausplattierten Zellzahl bei verschiedener Bestrahlungsdosis.

Dosis in Gy	Zellzahl pro well
0	1000
1	2000
2	4000
3	8000
4	12000

Das Standard-Kulturmedium für die Ausplattierung wurde entweder mit 0,5 µg/µl Erlotinib, 0,5 µM AEW541 oder einer Kombination aus beiden Substanzen versetzt. Die Kontrolle wurde mit DMSO versetzt.

Die Zellen wurden nach der Ausplattierung für 8 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden den Zellen im unteren Triplet der 6-well-Platten 3 µM 5-FU hinzugefügt. Die Zellen wurden für weitere 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy bestrahlt. Abbildung 6 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf des Versuchsaufbaus der Koloniebildungsassays.

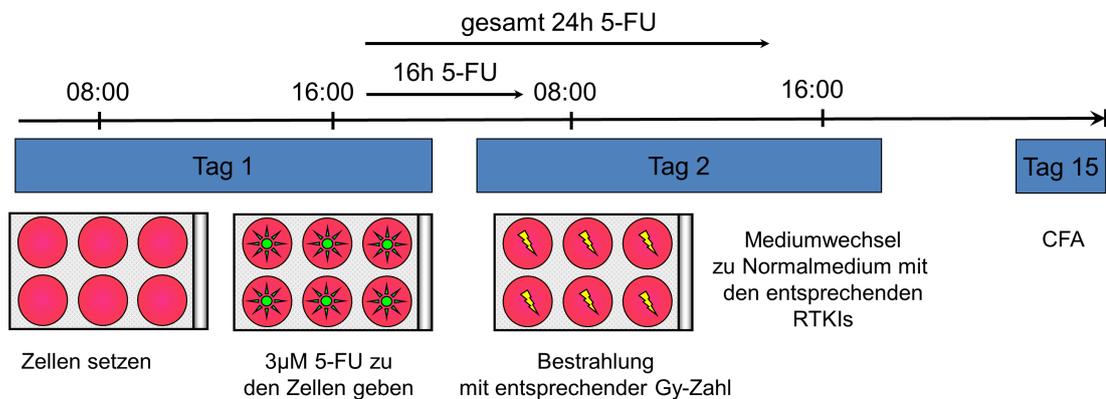


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Koloniebildungsassays (CFAs). Nach der Ausplattierung der Zellen wurden die Zellen mit einer 5-FU basierten Radiochemotherapie behandelt. Das Standard-Kulturmedium war mit den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren (RTKIs) Erlotinib und/oder AEW541 versetzt. Am Tag 15 wurde der Versuch beendet und ausgewertet.

Für die Bestrahlung wurde das Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225 A (Gulmay medical, Camberley, England) verwendet. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei in Tab. 20 aufgeführten Einstellungen.

Tabelle 20: Einstellungen für die Bestrahlung

Röhrenspannung:	220 kV
Röhrenstrom:	15 mA
Temperatur:	23,3°C
Filter 5:	0,5 mmCu

Durch diese Einstellung entsprach die Tischhöhe von 500mm im Bestrahlungsgerät 1Gy/min. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 8 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit 2 ml PBS gewaschen und neu angesetztes Standard-Kulturmedium mit den entsprechenden Inhibitoren, jedoch ohne 5-FU, auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun für 15 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein routinemäßig 2x wöchentlicher Mediumwechsel gewährte eine konstante Konzentration von FKS und den zugesetzten Inhibitoren. Nach Ablauf der 15 Tage wurde das Medium vorsichtig entfernt, die Zellkolonien kurz mit 200 ml PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 100 ml Ethanol fixiert. Die Zellkolonien wurden mittels einer Hämalaunlösung für ca. 5 min gefärbt und getrocknet. Schließlich wurden die Kolonien auf einem Lichttisch manuell ausgezählt. Dabei wurden nur die Zellkolonien ab einer Größe von ca. 50 Zellen gezählt.

Für die Auswertung wurde nun die Plattierungseffizienz berechnet, um die Anzahl der entstandenen Zellkolonien gegen die Anzahl der ausplattierten Zellen zu normalisieren:

Plattierungseffizienz (PE) = Koloniezahl/Anzahl ausplattierter Zellen

Die Berechnung der Überlebensraten SF 1 bis 3 erfolgte folgendermaßen:

SF1 = PE x (1/PE der 0 Gy Kontrolle)

SF2 = PE x (1/ PE der 0 Gy DMSO Kontrolle)

SF3 = PE x (1/ PE der Wildtyp 0 Gy DMSO Kontrolle)

Mithilfe der SF3 konnte der Therapieeffekt auf die verschiedenen Therapieschemata und der verschiedenen Zelllinien verglichen werden.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Tim Beißbarth, Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Göttingen.

Die verwendeten statistischen Verfahren sind im jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der KRAS-Mutationen auf die Proliferation, Migration und Invasion der KRK-Zelllinie SW48

Zur Charakterisierung der SW48-Zelllinien mit unterschiedlichem KRAS-Mutationsstatus wurde zunächst im Proliferationsassay das Wachstumsverhalten der KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D ermittelt. Die Zellen wurden über 72 Stunden unter Standardbedingungen in 10 % FKS-haltigem Medium inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Zellumsatz mithilfe eines colorimetrischen (MTT) Assays gemessen und daraus das Wachstum der Zellen ermittelt (Abb. 7). Keine der Zelllinien zeigte ein signifikant verändertes Wachstumsverhalten.

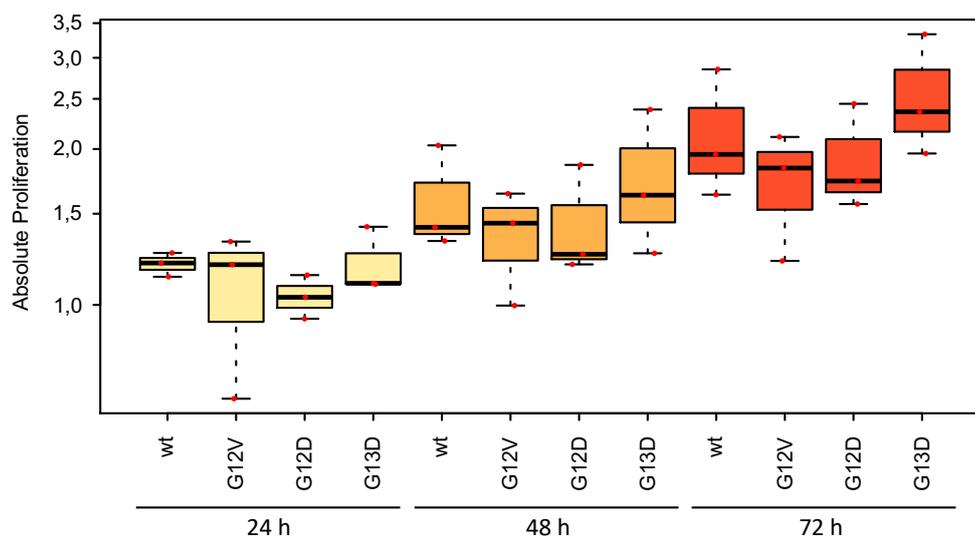


Abbildung 7: Wachstumsverhalten der Zelllinien SW48 KRAS-Wildtyp (wt), SW48 KRAS-G12V (G12V), SW48 KRAS-G12D (G12D) und SW48 KRAS-G13D (G13D). Die Zelllinien wurden für 72 Stunden inkubiert und alle 24 Stunden wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt wurde die Zunahme der Proliferation über die Zeit von drei unabhängigen Experimenten. Keine der Zelllinien zeigte eine signifikant veränderte Proliferation. Dargestellt sind Boxplots berechnet aus den relativen Proliferationswerten der Kontrollen von sechs unabhängigen Experimenten.

Um die Migrationsfähigkeit der verschiedenen SW48 KRAS-Zelllinien zu vergleichen, wurde ein Transwell-Migrationsassay durchgeführt. Dabei wurden die Zellen entlang eines FKS-Gradienten zur Migration durch eine PET-Membran angeregt. Nach 24 Stunden wurden die durchgewanderten Zellen fixiert, mittels HE gefärbt, im Lichtmikroskop ausgezählt und quantitativ ausgewertet. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt (Abb. 8).

Es ist zu erkennen, dass die Zelllinien SW48 KRAS- wt, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D nur eine geringe Migrationsfähigkeit zeigen. Ebenso ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien mit den KRAS-Mutationen G12D, G13D und dem Wildtyp zu beobachten. Hingegen zeigt die Zelllinie SW48 KRAS-G12V eine signifikant um das 6-fache ($p = 0,0071$) erhöhte Migrationsfähigkeit.

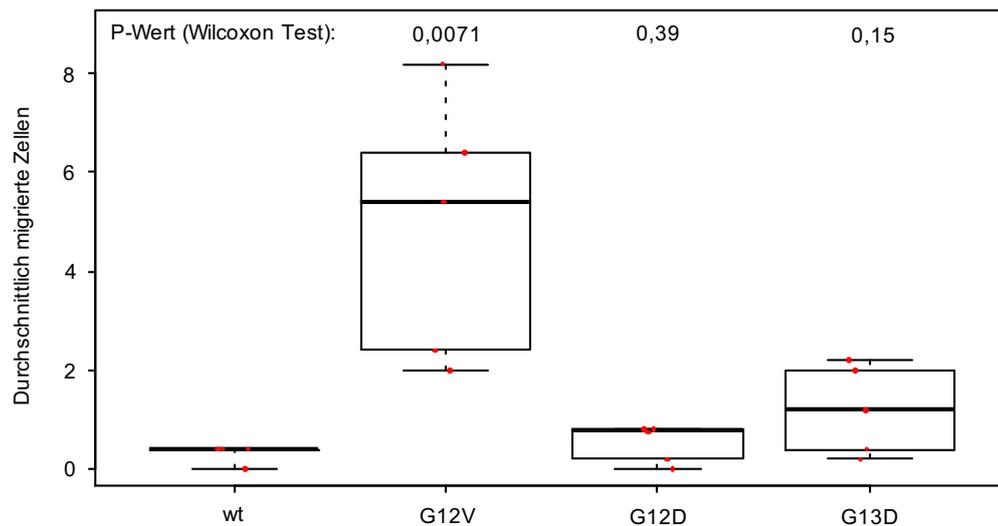


Abbildung 8: Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf das Migrationsverhalten der KRK-Zelllinie SW48. Mithilfe eines Transwell-Migrationsassays wurde das Migrationsverhalten der dargestellten Zelllinien im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollzelllinie (wt) untersucht. Es ist zu erkennen, dass die KRK-Zelllinie SW48 KRAS-G12V signifikant ($p = 0.0071$) die höchste Migrationsfähigkeit besaß. Die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten wurden im Boxplot dargestellt. Mit einem Wilcoxon-Test wurde jeweils der Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Um die Invasivität der verschiedenen SW48 KRAS-Zelllinien zu vergleichen, wurde ein Matrigel-Invasionsassay durchgeführt. Die Zellen wurden entlang eines FKS-Gradienten zur Invasion durch eine mit lamininreicher Extrazellulärmatrix beschichteten PET-Membran angeregt. Nach 48 Stunden wurden die eingewanderten Zellen fixiert, mittels HE gefärbt und im Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden sieben unabhängige Experimente durchgeführt. Aus Abbildung 9 ist zu entnehmen, dass SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D im Vergleich zu SW48 KRAS-wt ein signifikant höheres Invasionsverhalten aufwies. Dabei zeigte die Zelllinie SW48 KRAS-G12V eine um das 10-fach erhöhte Invasivität.

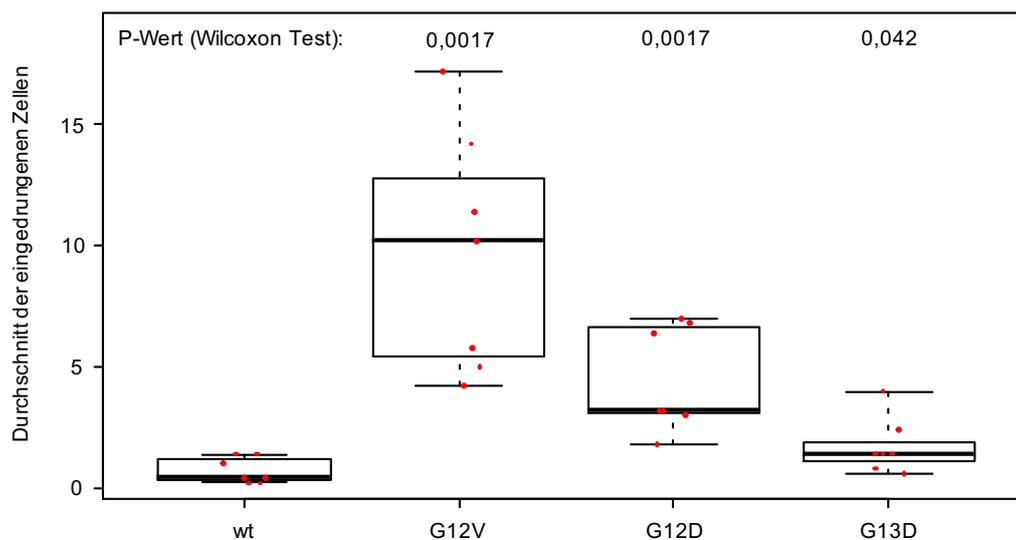


Abbildung 9: Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf das Invasionsverhalten der KRK-Zelllinie SW48. Mithilfe eines Matrigel-Invasionsassay wurde das Invasionsverhalten der dargestellten Zelllinien im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollzelllinie (wt) untersucht. Es ist zu erkennen, dass die KRK-Zelllinie SW48 KRAS-G12V die höchste Invasivität aufwies. Die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D wiesen eine niedrigere Invasivität als die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-G12V auf, dennoch auch eine signifikant höhere Invasionsfähigkeit im Vergleich zu SW48 KRAS-wt. Im Boxplot dargestellt sind die Ergebnisse aus sieben unabhängigen Experimenten. Mit einem Wilcoxon Test wurde jeweils der Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

3.2 Einfluss von KRAS-Mutationen auf die Expression von EGFR und IGF-1R und auf den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine in der KRK-Zelllinie SW48

Western-Blot-Analysen wurden durchgeführt, um das Expressionslevel der Transmembranrezeptoren EGFR und IGF1-R und den Phosphorylierungsstatus der nachfolgenden Signalwegskomponenten ERK und AKT in den KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D zu vergleichen. Es konnten keine Unterschiede im Expressionslevel der Transmembranproteine EGFR und IGF1-R und der intrazellulären Proteine ERK und AKT gezeigt werden (Abb. 10). Obwohl postuliert wird, dass KRAS-Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung der nachfolgenden Signalwege über AKT und ERK führen, zeigten die Western-Blot-Analysen keinen Unterschied im Phosphorylierungsstatus von ERK und AKT zwischen der wt-Kontrollzelllinie und den KRK-Zelllinien SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D.

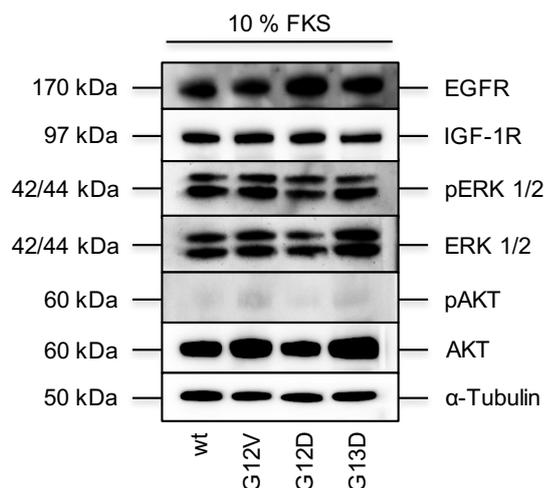


Abbildung 10: Expression der Transmembranproteine EGFR und IGF-1R und der intrazellulären Proteine ERK und AKT sowie deren Phosphorylierungsstatus in den KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D. Das Gesamtprotein der Zelllinien wurde nach 48 Stunden Zellwachstum in 10 % FKS-haltigem Wachstumsmedium isoliert und mittels Western Blot analysiert. Es waren keine Expressions- und Aktivitätsunterschiede für die oben dargestellten Proteine zwischen den einzelnen Zelllinien zu erkennen. α -Tubulin diente als Kontrolle für das gleichmäßige Beladen des Gels.

Nachfolgend wurden von KRAS *downstream* liegende Ziele wie ERK und AKT nach verschiedener Zellstimulation mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Dazu wurden die Zellen über Nacht einem Serumentzug ausgesetzt, anschließend mit 10 % FKS, 100 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF) und 1 nM *Insulin-like Growth Factor* (IGF) für 10 min stimuliert und Gesamtprotein isoliert. Die Aktivierung von AKT und ERK wurde mittels Western-Blot-Analyse mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 11). Sowohl bei der Zelllinie SW48 KRAS-wt als auch bei den Zelllinien SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D rief EGF die stärkste Phosphorylierung von ERK hervor. Ein Unterschied der Phosphorylierung ließ sich zwischen den getesteten Zelllinien nicht nachweisen. Auch bei der Stimulierung mit FKS und IGF ließ sich in der Phosphorylierung von ERK kein Unterschied zwischen den getesteten Zelllinien erkennen. Die Kombination aus EGF und IGF zeigte in der Western-Blot-Analyse bei allen getesteten Zelllinien die gleiche Intensität wie die alleinige Stimulation mit EGF.

Bei allen getesteten Zelllinien zeigte pAKT bei der Stimulation mit FKS einen sehr schwachen Phosphorylierungsstatus, wohingegen die Stimulation mit EGF und IGF eine deutliche Phosphorylierung von AKT hervorriefen. Dabei ist zusätzlich zu erkennen, dass es geringe Unterschiede bei der alleinigen Stimulation mit EGF zwischen den verschiedenen SW48 KRAS-Zelllinien gab.

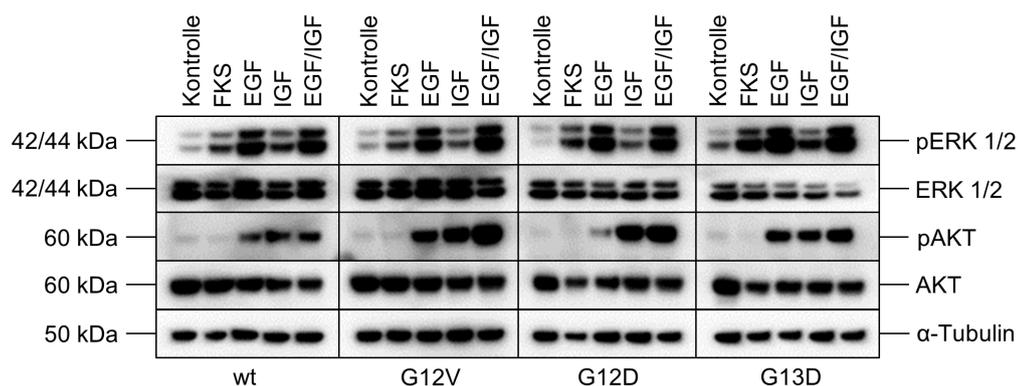


Abbildung 11: Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT. Die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D wurden nach Serumentzug über Nacht für 10 min mit FKS, EGF, IGF und EGF/IGF stimuliert, als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Anschließend wurde Gesamtprotein isoliert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Aktiviertes ERK und AKT wurde mithilfe phosphorylierungsspezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde sowohl Gesamt-ERK und -AKT als auch α -Tubulin detektiert. Bei der Stimulation der verschiedenen Substanzen war kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus von ERK zwischen den getesteten Zelllinien zu erkennen. EGF erwies sich als stärkstes Stimulanz. Die Stimulation mit EGF und IGF führten zu einer starken Phosphorylierung von AKT, wobei die Zelllinie SW48 KRAS-G12D bei EGF eine deutlich schwächere Aktivierung von AKT zeigte.

Um zu überprüfen, ob die SW48 KRAS-Zelllinien einen Unterschied in der Stimulierbarkeit von ERK und AKT aufweisen, wurden sie nach Serumentzug über Nacht mit aufsteigenden FKS-Konzentrationen (0 %, 1 %, 5 %, 10 % und 20 %) stimuliert und anschließend mittels Western Blot analysiert (Abb. 12). Mit aufsteigenden Konzentrationen von FKS nahm die Intensität der Phosphorylierung von pERK zu. Allerdings ließ sich zwischen der wt-Kontrollzelllinie und den KRK-Zelllinien mit Mutationen in KRAS kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus von ERK erkennen. Im Phosphorylierungsstatus von AKT war durch den Einsatz von verschiedenen FKS-Konzentrationen keine Veränderung zu beobachten. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen der wt-Kontrollzelllinie und den Zelllinien mit Mutation in KRAS zu beobachten.

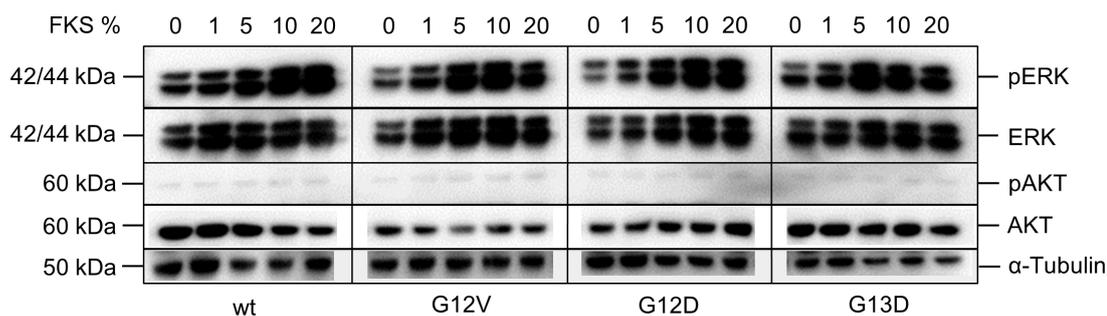


Abbildung 12: Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT durch Stimulation mit FKS. Die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D wurden nach Serumentzug über Nacht für 10 min mit FKS in aufsteigenden Konzentrationen (0 %, 1 %, 5 %, 10 % und 20 %) stimuliert, als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Anschließend wurde Gesamtprotein isoliert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Aktiviertes ERK und AKT wurde mithilfe phosphoryierungsspezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde sowohl Gesamt-ERK und -AKT als auch α -Tubulin detektiert. Mit aufsteigenden Konzentrationen führte FKS zu einer leichten Zunahme der Phosphorylierung von ERK. AKT konnte durch Zugabe von FKS nicht aktiviert werden. Ebenfalls war kein Unterschied zwischen der wt-Kontrollzelllinie und den verschiedenen KRAS mutierten Zelllinien zu erkennen.

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt nach der Zellstimulation mit FKS die stärkste Phosphorylierung von ERK und AKT vorliegt, wurden die KRK-Zelllinien nach FKS-Entzug entweder für 10 min, 30 min, 1 Stunde, 4 Stunden oder 8 Stunden mit FKS stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen (0 min). Mit dem anschließend isolierten Gesamtprotein wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 13). Bei der wt-Kontrollzelllinie und der KRK-Zelllinien SW48 KRAS-G13D war die stärkste Phosphorylierung von ERK nach der 10-minütigen FKS-Stimulation nachzuweisen. Bei der Zelllinie SW48 KRAS-G12V und SW48 KRAS-G12D war die stärkste Phosphorylierung von ERK nach einer 30-minütigen FKS-Stimulation zu beobachten. Eine Phosphorylierung von AKT war lediglich bei der Zelllinie SW48 KRAS-G13D nach 1 h, 4 h und 8 h Stimulation mit FKS zu beobachten.

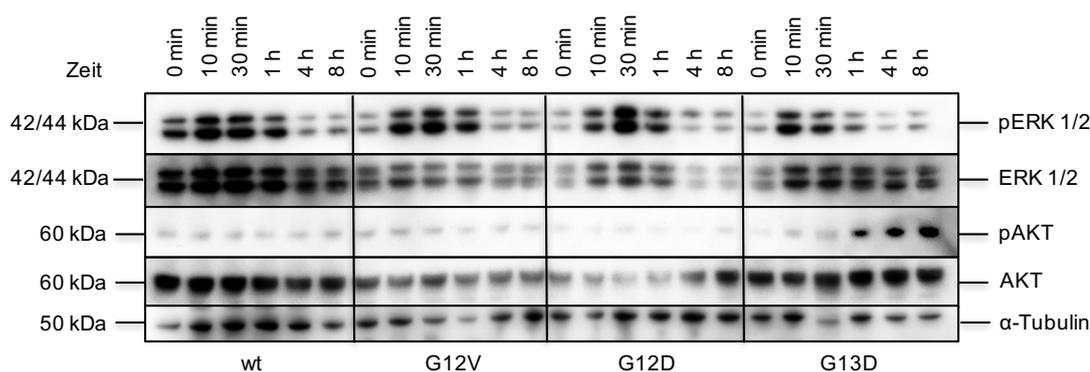


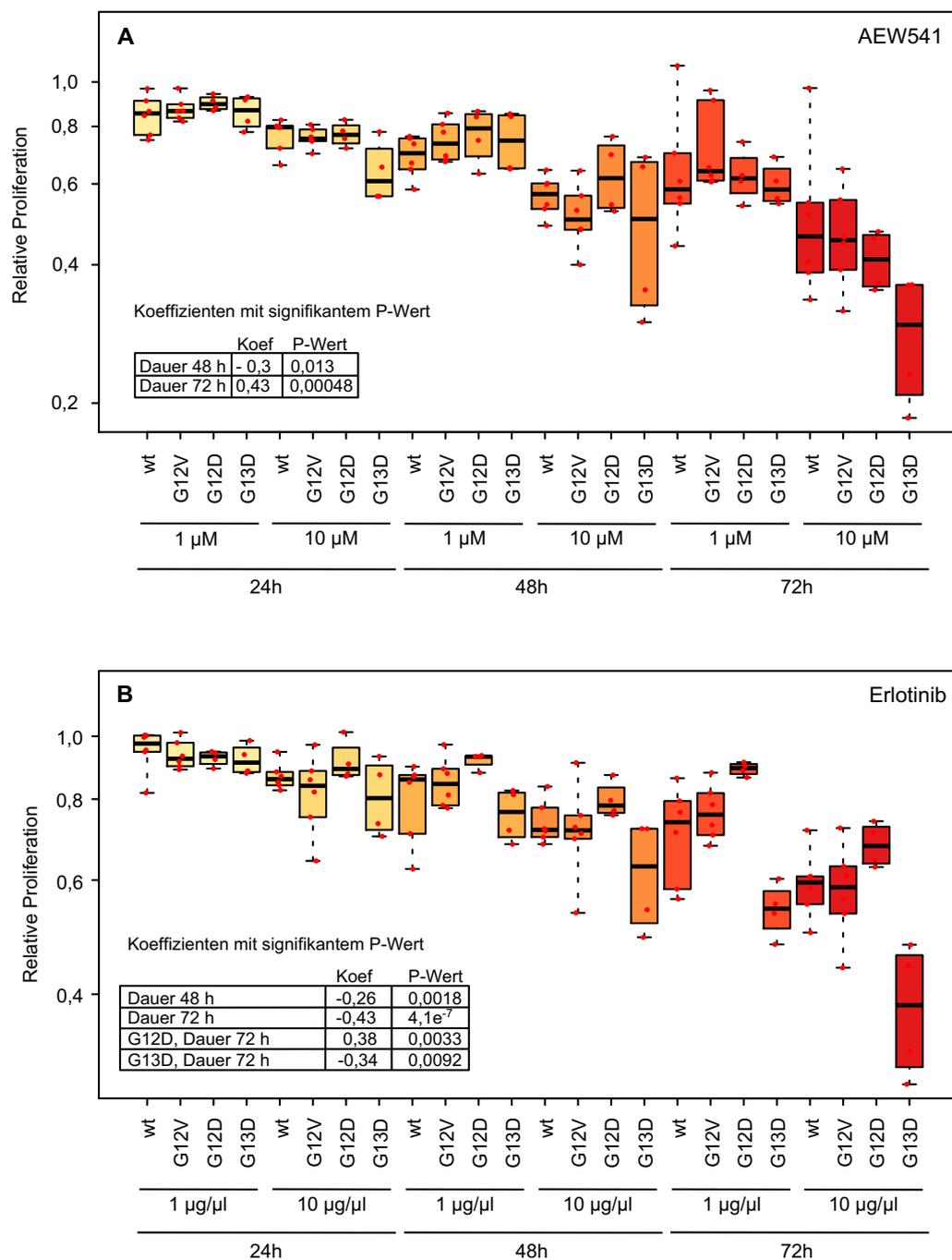
Abbildung 13: Einfluss der verschiedenen KRAS-Mutationen auf die Aktivierbarkeit von ERK und AKT durch Stimulation mit FKS. Die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D wurden nach Serumentzug über Nacht für 0 min, 10 min, 30 min, 1 Stunde, 4 Stunden und 8 Stunden mit FKS stimuliert, Gesamtprotein isoliert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Aktiviertes ERK und AKT wurde mithilfe phosphorylierungsspezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde sowohl Gesamt-ERK und -AKT als auch α -Tubulin detektiert. Die Zelllinien SW48 KRAS-wt und SW48 KRAS-G13D zeigten nach einer 10-minütigen Stimulation die stärkste Phosphorylierung von ERK. Hingegen war bei den Zelllinien SW48 KRAS-G12V und SW48 KRAS-G12D die stärkste Phosphorylierung von ERK nach einer 30-minütigen Stimulation zu beobachten. Eine Phosphorylierung von AKT war lediglich bei der Zelllinie SW48 KRAS-G13D nach 1 Stunde, 4 Stunden und 8 Stunden Stimulation mit FKS zu beobachten.

3.3 Einfluss von KRAS-Mutationen in der KRK-Zelllinie SW48 auf die Behandlung mit den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AEW541

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss KRAS-Mutationen in der KRK-Zelllinie SW48 auf die Therapie mit den Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AEW541 ausüben und ob es einen Unterschied zwischen der wt-Kontrollzelllinie und den Zelllinien mit Mutation in KRAS gibt. Dazu wurden gleiche Zellzahlen der Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D ausplattiert, mit verschiedenen Konzentrationen Erlotinib, AEW541 bzw. der Kombination aus beiden behandelt und die Proliferation nach 24, 48 und 72 Stunden mithilfe eines MTT-Assays gemessen. In der Abbildung 14 ist jeweils das relative Wachstum zur nichtbehandelten Kontrolle für jede Zelllinie unter der Behandlung mit entweder AEW541 (Abb. 14A), Erlotinib (Abb. 14B) oder der Kombination aus AEW541 und Erlotinib (Abb. 14C) dargestellt.

Die Behandlung der SW48 KRAS-Zelllinien mit AEW-541 (Abb. 14A) zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Proliferation bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen. Auch bei der Behandlung mit Erlotinib (Abb. 14B) und der Kombination

von AEW541 und Erlotinib (Abb. 14C) spielte die eingesetzte Konzentration keine Rolle. Allerdings zeigte sich für alle drei Behandlungen eine signifikant negative Wirkung auf die Zellproliferation aller Zelllinien über die Zeit. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Zelllinie SW48 KRAS-G12D nach 72 Stunden signifikant weniger sensitiv auf die Behandlung mit Erlotinib ansprach. Hingegen reagierte die Zelllinie SW48 KRAS-G13D nach 72 Stunden signifikant sensitiver auf eine Behandlung mit Erlotinib (Abb. 14B). Außerdem ist zu erkennen, dass die Zelllinie SW48 KRAS-G13D nach 72 Stunden signifikant sensitiver auf die Kombinationsbehandlung mit AEW-541 und Erlotinib reagierte als die anderen getesteten Zelllinien (Abb. 14C).



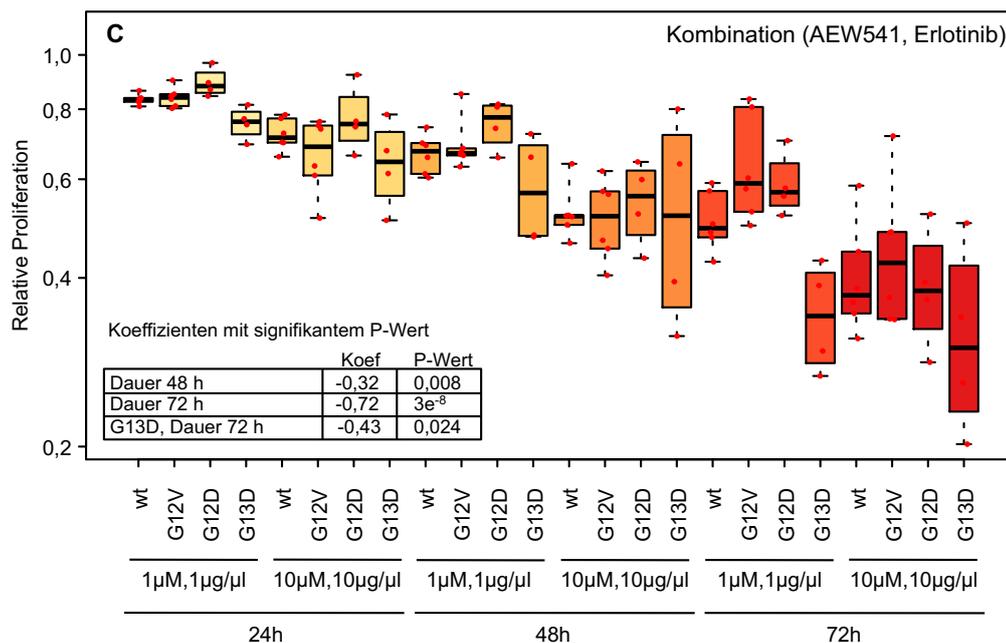


Abbildung 14: Relative Proliferation der KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D nach Behandlung mit AEW541 (A), Erlotinib (B) und der Kombination von AEW541 und Erlotinib (C). Die dargestellten Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und nach 24, 48 und 72 Stunden das Zellwachstum im MTT-Assay gemessen. **A)** Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit AEW541 eine signifikant negative Wirkung auf das Zellwachstum aller Zelllinien nach 48 Stunden und 72 Stunden Behandlung unabhängig von der Konzentration hatte. **B)** Die Behandlung mit Erlotinib zeigte auf alle getesteten Zelllinien über die Zeit (48 Stunden und 72 Stunden) eine signifikant negative Wirkung auf das Zellwachstum. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte nach 72 Stunden Behandlung signifikant weniger sensitiv. Hingegen erwies sich die Zelllinie SW48 KRAS-G13D als signifikant sensitiver auf diese Therapie. **C)** Ebenfalls zeigte eine Kombinationstherapie auf alle Zelllinien signifikant eine negative Wirkung über die Zeit (48 und 72 Stunden). Hier erwies sich die Zelllinie SW48 KRAS-G13D als signifikant sensitiver über 72 Stunden Behandlungszeit. Die Abbildungen zeigen Boxplots mit den relativen Proliferationswerten aus drei unabhängigen Experimenten. Als statistischer Test wurde ein lineares Modell mit den logarithmischen relativen Proliferationswerten als abhängige Variable und mit Replikat, Konzentration, Zelllinie und Behandlungszeit als Einflussgrößen sowie den Interaktionstermen aus Konzentration, Zelllinie und Behandlungszeit gefittet. In den Tabellen wurden nur Koeffizienten (Koef) mit signifikanten P-Werten angegeben.

3.4 Der Einfluss der KRAS-Mutationen in KRK-Zellen auf eine 5-FU-basierende kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

Die KRK-Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D wurden im folgenden Experiment mit einer 5-FU-basierenden kombinierten Radiochemotherapie in Anwesenheit der RTK-Inhibitoren Erlotinib und AEW541 behandelt und mittels Koloniebildungsassays miteinander verglichen. Das dem Versuch

zugrundeliegende Therapieschema ist der Abbildung 6 in Material und Methoden Punkt 2.2.6 zu entnehmen.

In Abbildung 15 wurde zunächst die Überlebensrate der verschiedenen KRAS-mutierten Zelllinien bezogen auf den Wildtyp ohne Bestrahlung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zelllinien mit KRAS-Mutationen im Überleben ohne RCT keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, womit eine Vergleichbarkeit der nachfolgenden Experimente gewährleistet war.

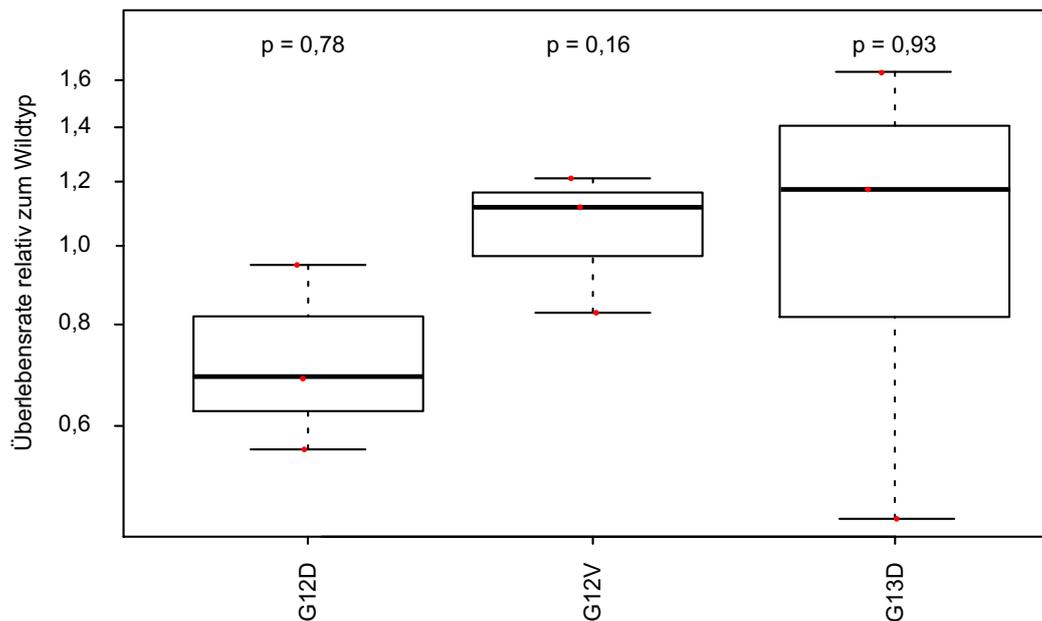
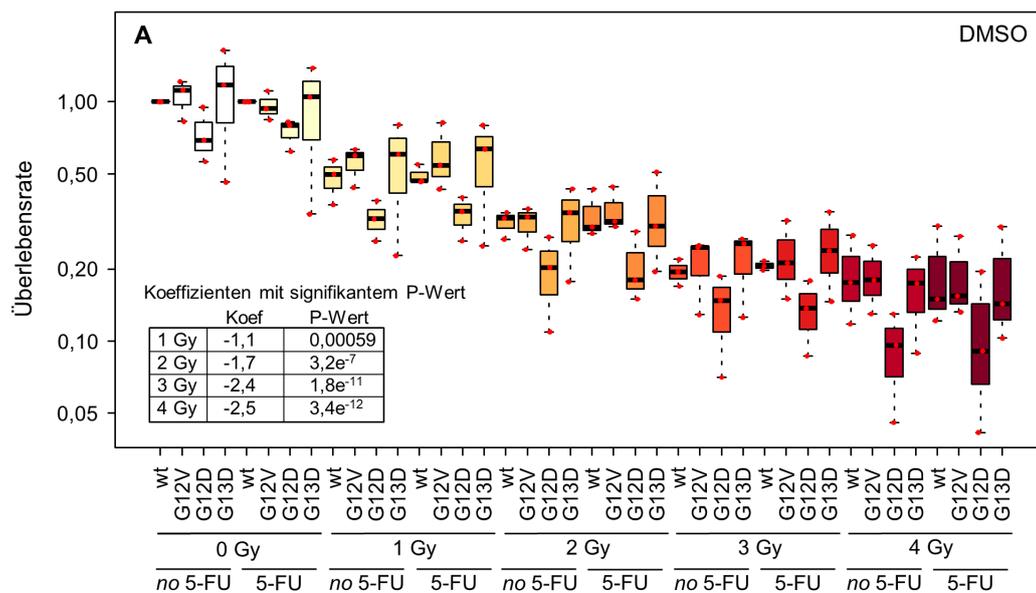
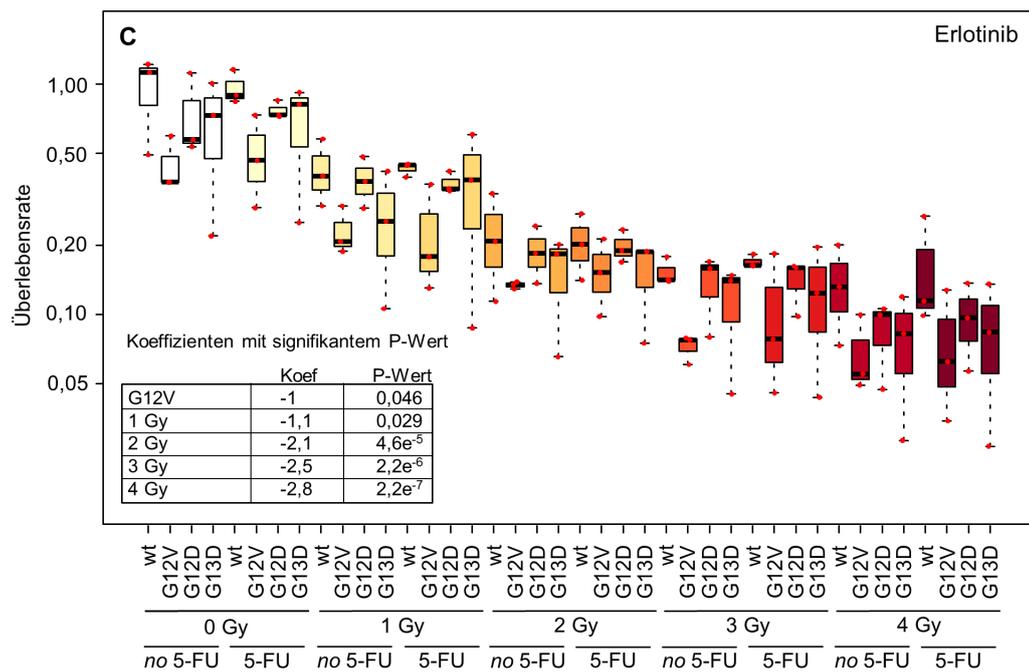
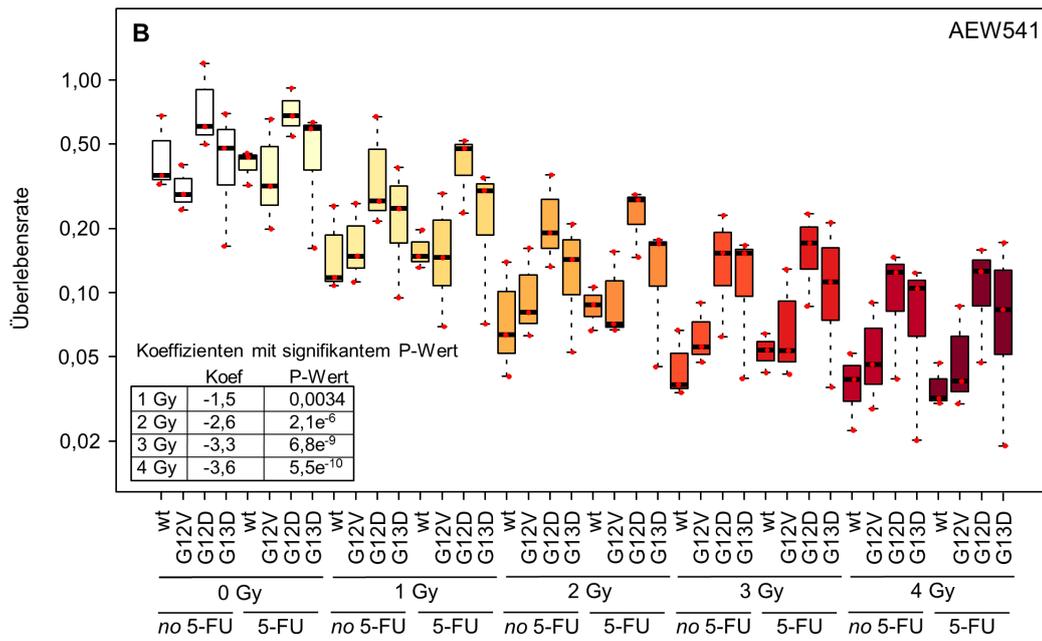


Abbildung 15: Vergleich der Überlebensrate der Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D in Anwesenheit von DMSO, ohne kombinierte Radiochemotherapie. Die Zelllinien mit KRAS-Mutationen wiesen im Überleben ohne RCT keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp auf. Die Überlebensraten der dargestellten Zelllinien aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf die Zelllinie SW48 KRAS-wt bezogen und in einem Boxplot dargestellt. P-Werte wurden durch einen Einstichproben t-Test auf den logarithmierten Überlebensraten berechnet.

In Abbildung 16 wurden die Überlebensraten nach der Behandlung einer kombinierten Radiochemotherapie mit der Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 16A), den RTK-Inhibitoren AEW541 (Abb. 16B), Erlotinib (Abb. 16C) und deren Kombination (Abb. 16D) zusammengefasst dargestellt und der Effekt von den verschiedenen Zelllinien, 5-FU und Bestrahlung für jede Behandlung einzeln betrachtet. Die Überlebensraten standen relativ zur Kontrollprobe SW48 KRAS-Wildtyp unter DMSO und 0 Gy. Unter DMSO (A), AEW541 (B) und Erlotinib (C) hatten alle Behandlungsdosen von 1Gy bis 4Gy signifikant einen negativen Effekt auf das Überleben aller getesteten Zelllinien. Hingegen zeigte die Behandlung mit 5-FU keine signifikanten Unterschiede. Die Betrachtung des Einflusses des Mutationsstatus von KRAS auf die Behandlung mit RTK-Inhibitor zusätzlich zu der kombinierten RCT zeigte, dass lediglich die Zelllinie SW48 KRAS-G12V unter Erlotinib signifikant sensitiver reagierte (Abb. 16C). Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D erwies sich als signifikant resistenter unter einer Kombinationstherapie (Abb. 16D).





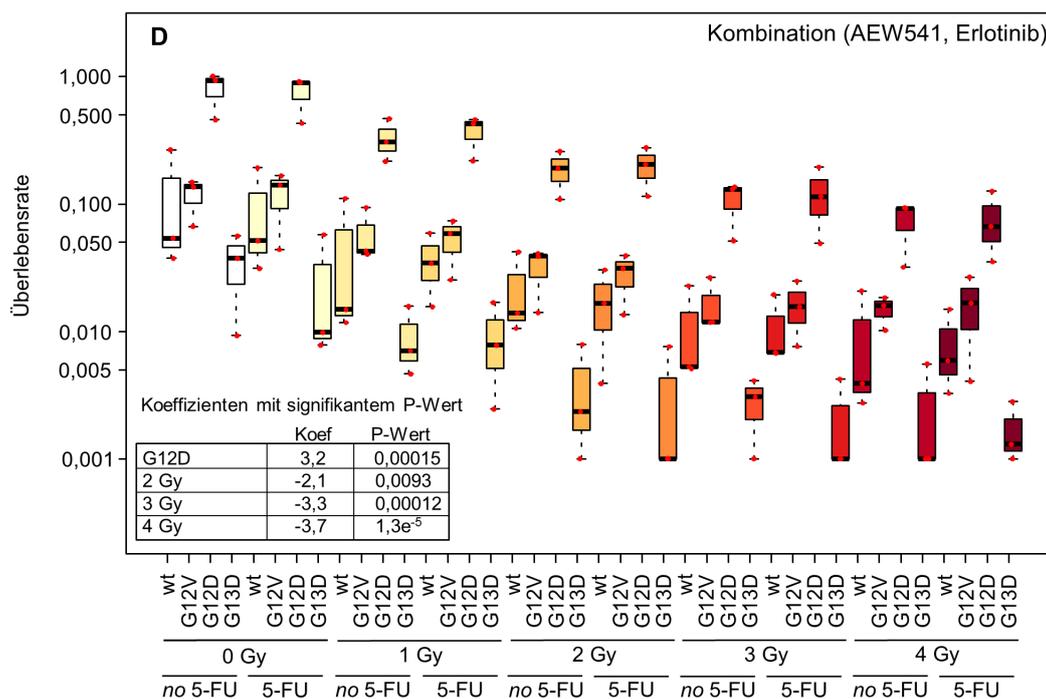
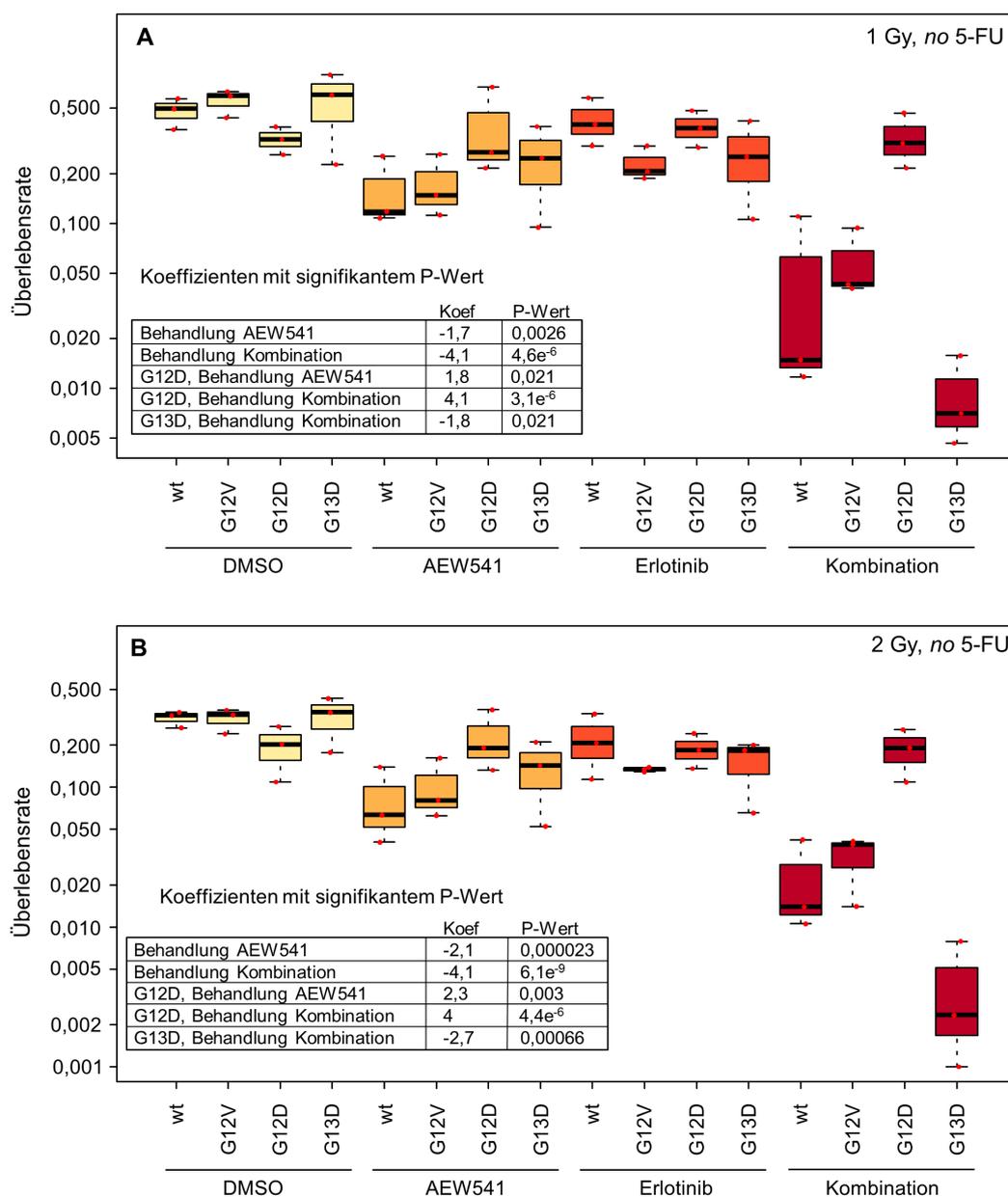


Abbildung 16: Überlebensraten nach einer kombinierten Radiochemotherapie mit entweder DMSO (A), AEW541 (B), Erlotinib (C) oder der Kombination aus AEW541 und Erlotinib (D). Betrachtet wurde der Effekt der Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D, 5-FU und die Bestrahlung. Es ist zu sehen, dass unter DMSO (A), AEW541 (B) und Erlotinib (C) die Bestrahlungsdosen von 1Gy bis 4 Gy signifikant einen negativen Effekt auf die Koloniebildung aller getesteten Zellen hatten. Dabei weist der absteigende Koeffizient darauf hin, dass je stärker die Dosis desto stärker der negative Effekt auf das Überleben der Zellen war. Allein SW48 KRAS-G12V reagierte signifikant sensitiver auf eine kombinierte RCT unter Erlotinib (C). Unter einer Kombinationstherapie (D) hatten die Bestrahlungsdosen 2 Gy bis 4 Gy einen signifikant negativen Effekt auf das Wachstum der getesteten Zellen. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D erwies sich darunter als signifikant resistenter als die anderen Zelllinien. Abgebildet wurden Boxplots mit den Überlebensraten aus drei unabhängigen Experimenten (Koloniebildungsassay). Als statistischer Test wurde ein lineares Modell mit den logarithmischen relativen Überlebensraten als abhängige Variable und mit Replikate, Zelllinie, 5-FU und Bestrahlung als Einflussgrößen sowie den Interaktionstermen aus Zelllinie, 5-FU und Gy gefittet. In der Tabelle wurden nur Koeffizienten mit signifikanten P-Werten angegeben.

In den Abbildungen 17 und 18 wurden die Überlebensraten nach Bestrahlung mit und ohne 5-FU zusammengefasst dargestellt und der Behandlungseffekt von den RTK-Inhibitoren AEW541, Erlotinib und der Kombinationstherapie betrachtet. Dargestellt wurden Überlebensraten der Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D relativ zur Kontrollprobe SW48 KRAS-wt unter DMSO Behandlung bei 0 Gy ohne 5-FU.

Die Abbildung 17 zeigt die Behandlung der Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) ohne 5-FU in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und der Kombination aus

AEW541 und Erlotinib. Hier zeigte sich ein signifikant negativer Effekt auf das Überleben aller Zelllinien bei 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy unter AEW541 und der Kombination aus AEW541 und Erlotinib. Die Kombinationstherapie stellte sich als sensitiver dar als die alleinige Behandlung mit AEW541. Erlotinib alleine zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Zellen. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte bei allen Strahlendosen signifikant weniger sensitiv auf die Behandlung mit AEW541 alleine als auf die Kombination aus AEW541 und Erlotinib. Hingegen erwies sich die Zelllinie SW48 KRAS-G13D bei 1 Gy, 2 Gy und 3 Gy als signifikant sensitiver auf eine Kombinationsbehandlung aus AEW541 und Erlotinib.



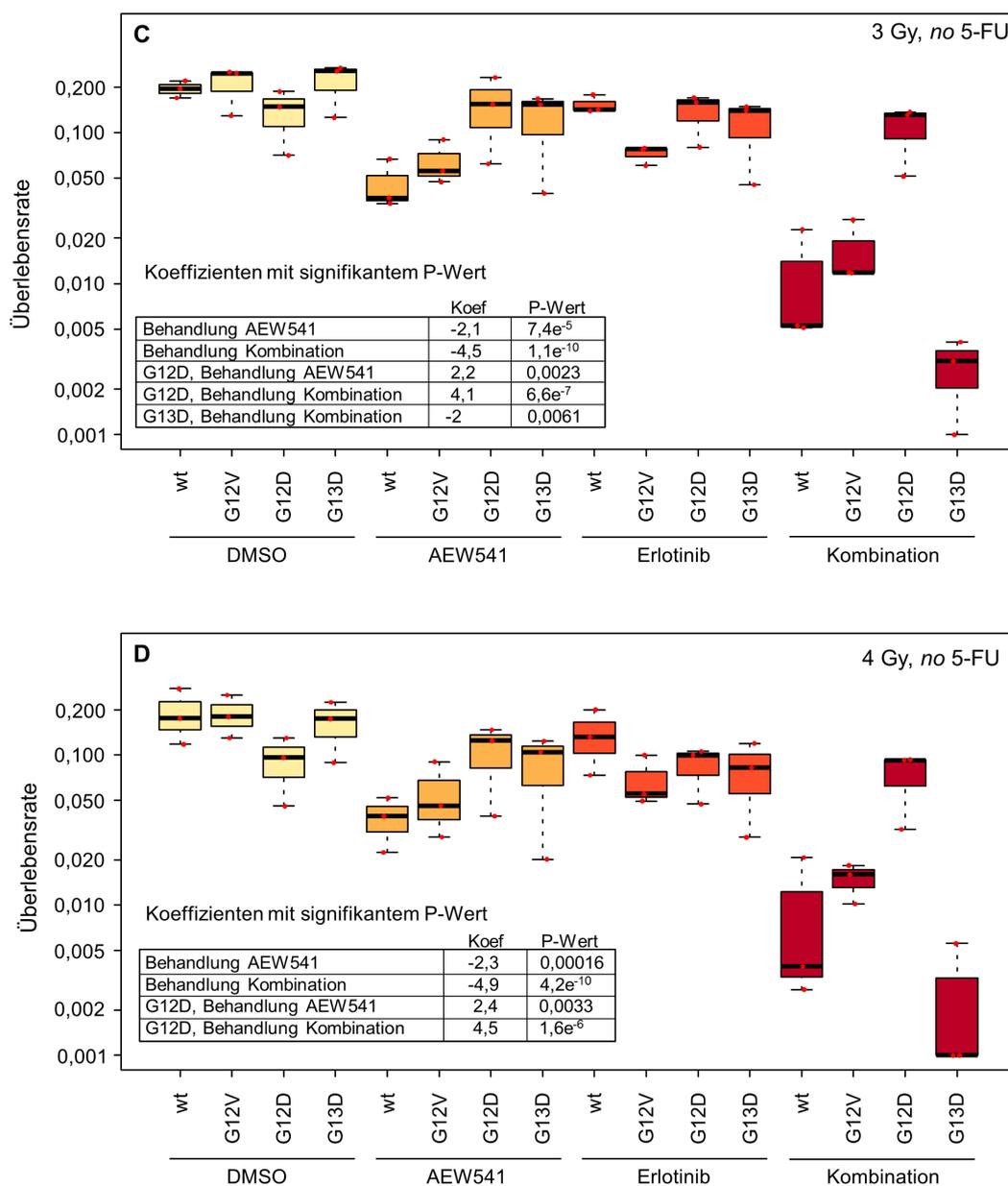
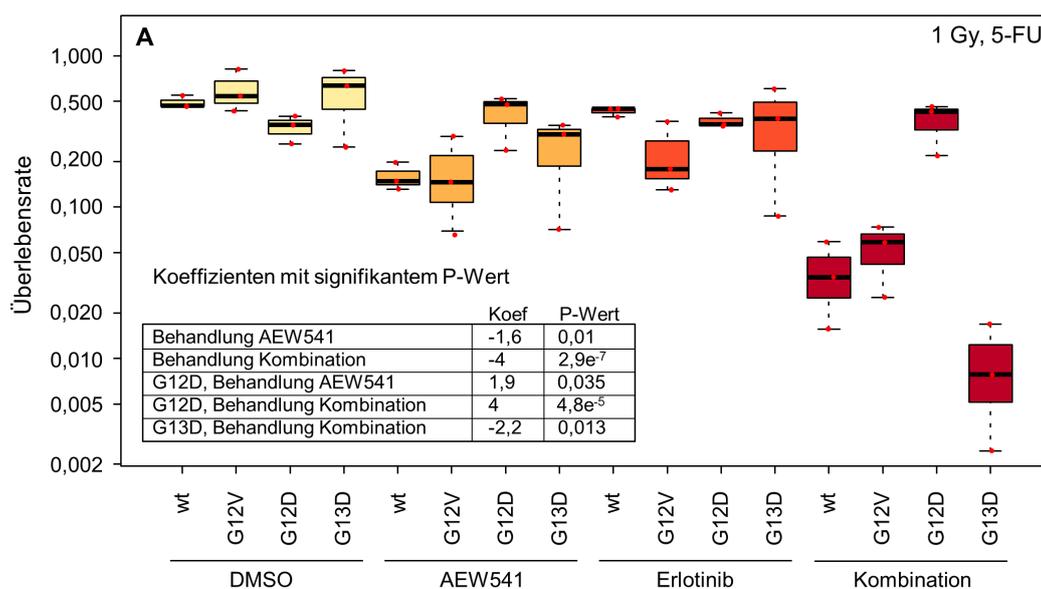
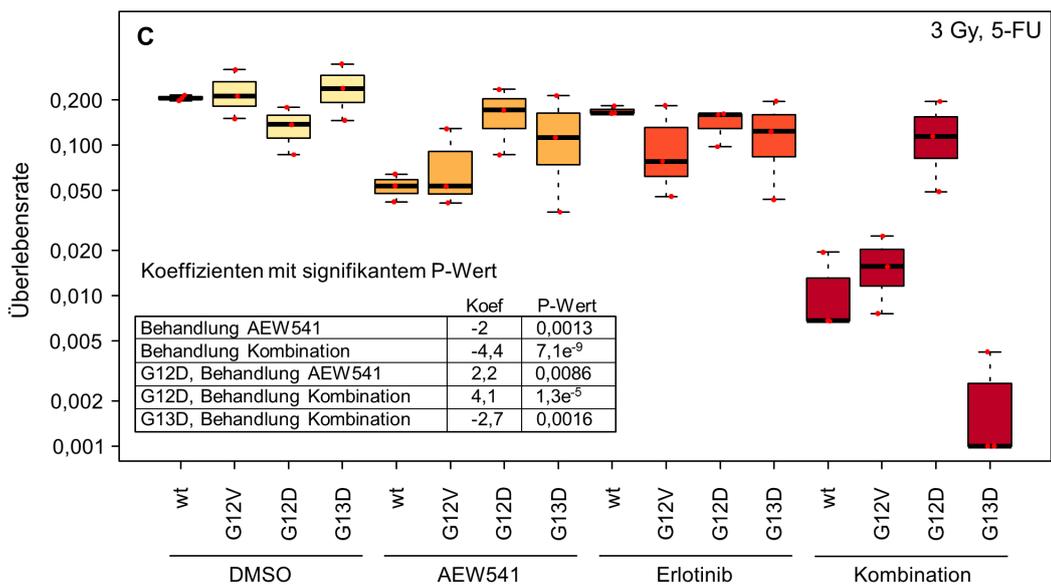
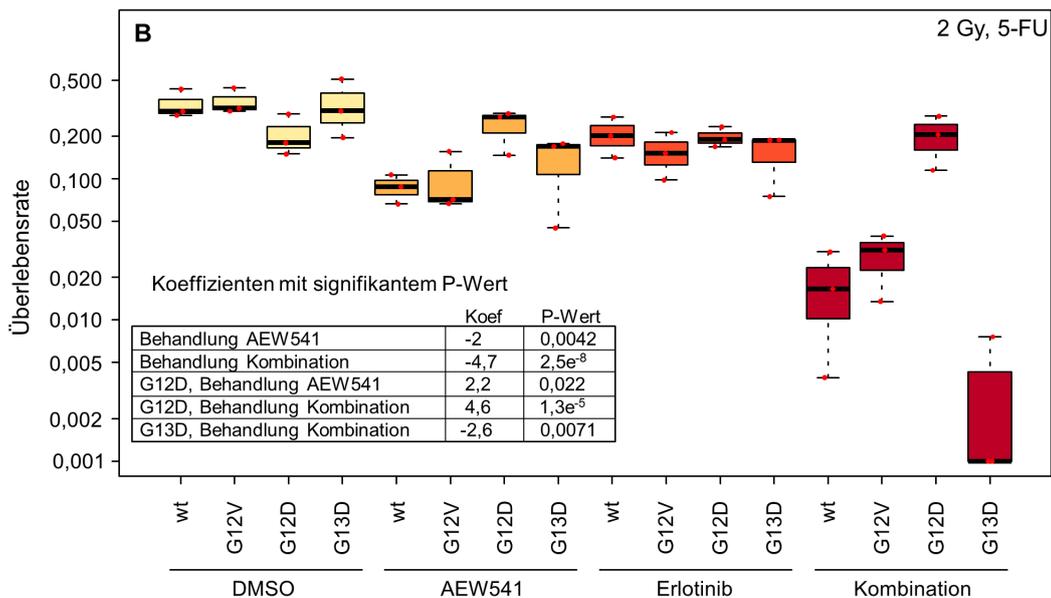


Abbildung 17: Überlebensraten nach der Behandlung mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) ohne 5-FU in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und einer Kombinationstherapie aus AEW541 und Erlotinib. Die Behandlung bei 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) hatte sowohl mit AEW541 als auch mit der Kombination aus AEW541 und Erlotinib signifikant einen negativen Einfluss auf das Überleben aller getesteten Zelllinien. Die Kombinationstherapie hatte mit einem höheren negativen Koeffizienten einen stärkeren Effekt als die alleinige Therapie mit nur AEW541. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte bei der Behandlung mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) sowohl in Anwesenheit von AEW541 und als auch von der Kombinationstherapie signifikant mit einem positiven Koeffizienten und somit resistenter als alle anderen getesteten Zelllinien. Hier wiederum wies die Kombinationstherapie einen höheren Koeffizienten als AEW541 auf und war somit resistenter. Bei der Zelllinie SW48 KRAS-G13D sprach die Kombinationsbehandlung bei 1 Gy (A), 2 Gy (B) und 3 Gy (C) signifikant sensitiver an als bei allen anderen getesteten Zelllinien. Bei allen Bestrahlungsdosen hatte Erlotinib alleine keinen signifikanten Behandlungseffekt. Die Überlebensraten der dargestellten Zelllinien aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf die Zelllinie SW48 KRAS-wt unter der Behandlung 0 Gy ohne 5-FU und DMSO bezogen und in einem Boxplot dargestellt. Als statistischer Test wurde ein lineares Modell mit den logarithmischen relativen Überlebensraten als abhängige Variable und

mit Replikate, Zelllinie und Behandlung als Einflussgrößen sowie den Interaktionstermen aus Zelllinie und Behandlung gefittet. Es wurden nur Koeffizienten mit signifikanten P-Wert in der Tabelle angegeben. P-Werte wurden durch einen Einstichproben t-Test auf den logarithmierten Überlebensraten berechnet.

Die Abbildung 18 zeigt die 5-FU-basierte kombinierte Radiochemotherapie mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und der Kombination aus AEW541 und Erlotinib. Es zeigte sich ein signifikant negativer Effekt auf das Überleben aller Zelllinien bei 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy unter AEW541 und der Kombination aus AEW541 und Erlotinib. Erlotinib alleine zeigte hier ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Zellen. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte bei allen Bestrahlungsdosen signifikant weniger sensitiv auf die Behandlung mit AEW541 alleine und die Kombination aus AEW541 und Erlotinib. Die Zelllinie SW48 KRAS-G13D erwies sich bei allen Bestrahlungsdosen als signifikant sensitiver auf eine Kombinationsbehandlung aus AEW541 und Erlotinib.





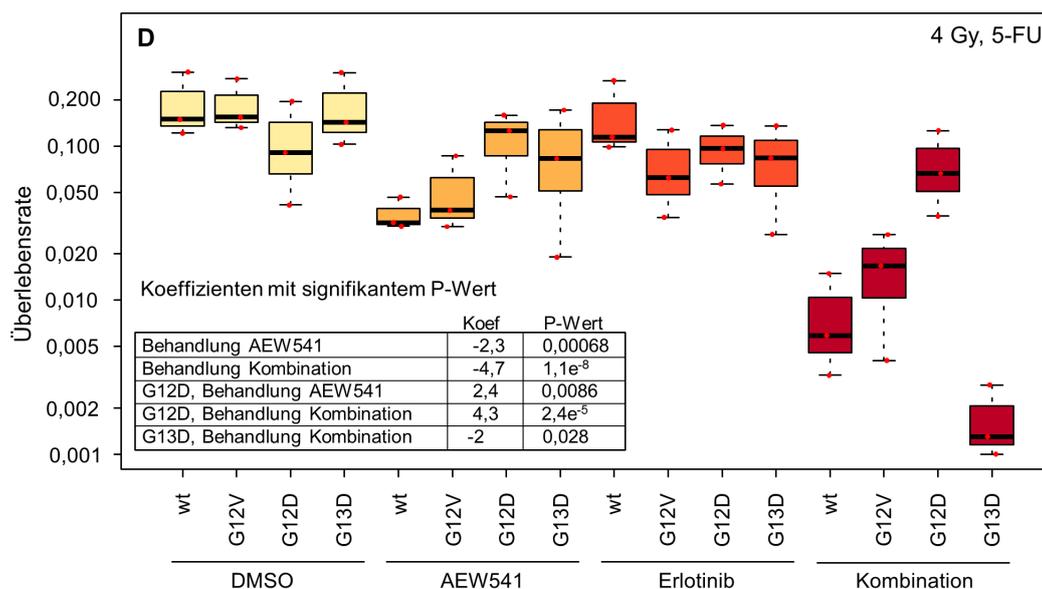


Abbildung 18: Überlebensraten nach einer 5-FU-basierenden kombinierten Radiochemotherapie mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) in Anwesenheit von DMSO, AEW541, Erlotinib und einer Kombinationstherapie aus AEW541 und Erlotinib. Die Überlebensraten der dargestellten Zelllinien aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf die Zelllinie SW48 KRAS-wt unter der Behandlung 0 Gy ohne 5-FU und DMSO bezogen und in Boxplots dargestellt. Die Behandlung bei 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) hatte sowohl mit AEW541 als auch mit der Kombination aus AEW541 und Erlotinib signifikant einen negativen Einfluss auf das Überleben aller getesteten Zelllinien. Die Kombinationstherapie hatte mit einem höheren negativen Koeffizienten einen stärkeren Effekt als die alleinige Therapie mit nur AEW541. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte bei der Behandlung mit 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) sowohl in Anwesenheit von AEW541 als auch von der Kombinationstherapie signifikant mit einem positiven Koeffizienten und somit resistenter als alle anderen getesteten Zelllinien. Hier wiederum wies die Kombinationstherapie einen höheren Koeffizienten als AEW541 auf und war somit resistenter. Bei der Zelllinie SW48 KRAS-G13D sprach die Kombinationsbehandlung bei 1 Gy (A), 2 Gy (B), 3 Gy (C) und 4 Gy (D) signifikant sensitiver an als bei allen anderen getesteten Zelllinien. Bei allen Bestrahlungsdosen hatte Erlotinib alleine keinen signifikanten Behandlungseffekt. Als statistischer Test wurde ein lineares Modell mit den logarithmischen relativen Überlebensraten als abhängige Variable und mit Replikate, Zelllinie und Behandlung als Einflussgrößen sowie den Interaktionstermen aus Zelllinie und Behandlung gefittet. Es wurden nur Koeffizienten mit signifikantem P-Wert in der Tabelle angegeben. P-Werte wurden durch einen Einstichproben t-Test auf den logarithmierten Überlebensraten berechnet.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, den Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen in der kolorektalen Karzinomzelllinie SW48 auf das Ansprechen einer 5-Fluorouracil basierenden Radiochemotherapie in der Gegenwart von Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren zu untersuchen.

Der Hypothese folgend, dass KRAS-Mutationen zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalkaskadensystems führen und nachhaltig die Zellregulationen und das biologische Verhalten der Tumore beeinflussen, wurden zu Beginn dieser Arbeit die kolorektalen Karzinomzelllinien SW48 KRAS-wt, KRAS-G12V, KRAS-G12D und KRAS G13D in Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays miteinander verglichen.

In den durchgeführten Proliferationsassays konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der KRAS-wt Zelllinie und den KRAS-mutierten Zelllinien gesehen werden. Im Migrationsverhalten zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12V zeigte gegenüber den Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS G13D ein signifikant stärkeres Migrationsverhalten. Zur Beurteilung der Zellaggressivität wurden die Zelllinien in Invasionsassays miteinander verglichen. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen einerseits allen getesteten KRAS-mutierten Zellen gegenüber der Wildtyp-Zelllinie und andererseits zwischen den Zelllinien mit verschiedenen KRAS-Mutationen. Die SW48-Zellen mit der Mutation G12V zeigten ein invasiveres Verhalten als die Zelllinien mit den Mutationen G12D und G13D.

Weiter sollten anhand von Western-Blot-Analysen Unterschiede im Expressionslevel der Rezeptortyrosinkinasen EGFR und IGF-1R, den nachgeschalteten Signalwegskomponenten ERK und AKT als wichtige Vertreter des MAPK- und PI3K-Signalweges, und deren Phosphorylierungsstatus als Aktivitätszustand detektiert werden. Hier konnten zwischen der KRAS-Wildtyp-Zelllinie und den KRAS-mutierten Zelllinien keine Unterschiede sowohl im Expressionslevel von EGFR, IGF-1R, ERK und AKT als auch im phosphorylierten Aktivierungszustand pERK und pAKT gesehen werden. Nachfolgend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Stimulanzen (1), mit aufsteigenden Konzentrationen von FKS (2) und unterschiedlichen FKS-Expositionszeiten (3) behandelt und der Phosphorylierungsstatus als Aktivitätsparameter von ERK und AKT in Western-Blot-Analysen untersucht.

1) Als Stimulanzen wurden FKS, EGF und IGF eingesetzt. Es konnte bei der Stimulation der verschiedenen Substanzen kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus von ERK zwischen den Zelllinien erkannt werden. Insgesamt zeigte sich hier EGF als stärkste

Stimulanz. FKS rief im Vergleich zu der Kontrolle bei der Phosphorylierung von AKT keine stärkere Intensität hervor, hingegen zeigte sich unter EGF, mit Ausnahme bei G12D, und IGF bei der Phosphorylierung von AKT eine ausgeprägte Intensität.

2) FKS führte in aufsteigenden Konzentrationen zu einer Zunahme der Phosphorylierung von ERK. FKS, auch in hoher Konzentration, konnte allerdings nicht zu einer Aktivierung von AKT führen. Ein Unterschied zwischen KRAS-wt und den KRAS-mutierten Zellen konnte in diesem Versuch nicht gesehen werden.

3) Die Zellen wurden zeitlich aufsteigend mit 10 % FKS stimuliert. Die Wildtyp-Zelllinien und Zellen mit der KRAS-G13D-Mutation zeigten nach der 10-minütigen Stimulation die stärkste Intensität der Phosphorylierung von ERK. Bei den beiden anderen getesteten Zelllinien (KRAS-G12V und KRAS-G12D) wurde nach 30 min die stärkste Stimulation detektiert. Ausschließlich bei der Zelllinie KRAS-G13D konnte eine Stimulation nach 1, 4 und 8 Stunden bei der Phosphorylierung von AKT gesehen werden.

Nach den Untersuchungen des biologischen Verhaltens wurden die Zellen mit den Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren AEW541(1), Erlotinib (2) und deren Kombination (3) in niedriger und hoher Dosierung behandelt und die Wirkung der Behandlung auf die verschiedenen Zelllinien anhand von Proliferationsassays untersucht.

1) AEW541 inhibierte das Zellwachstum aller Zelllinien nach 48 Stunden und 72 Stunden in beiden Dosierungen (1 μM und 10 μM) signifikant.

2) Erlotinib zeigte ebenfalls in beiden Dosierungen (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine signifikant negative Wirkung auf das Zellwachstum aller Zelllinien. Allerdings reagierte die KRAS-G12D-Mutation nach 72 Stunden auf die Behandlung signifikant weniger sensitiv. Die Mutation KRAS-G13D reagierte auf die 72-stündige Behandlung hingegen signifikant sensitiver als die anderen Zelllinien.

3) Unter der Kombinationstherapie mit AEW541 und Erlotinib zeigte sich auf alle Zelllinien eine signifikant negative Wirkung. Die Mutation KRAS-G13D reagierte hier nach 72 Stunden Behandlungszeit signifikant sensitiver als die übrigen Zelllinien.

Aus klinischen Daten ist ersichtlich, dass es beim KRK zwischen den verschiedenen KRAS-Mutationen bzw. gegenüber dem KRAS-Wildtyp große Unterschiede in der Prognose und Tumorprogression und somit unterschiedliche therapeutische Konzepte gibt. Zum Abschluss der Arbeit wurden deshalb in Koloniebildungsassays die Zelllinien einer kombinierten Radiochemotherapie unterzogen. In diesen Versuchen sollte modellhaft eine neoadjuvante Therapie beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom simuliert werden und Unterschiede auf das Ansprechen der verschiedenen Therapieoptionen zwischen der SW48 KRAS-wt Zelllinien und den SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-

G12D untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss der Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren AEW541 und/oder Erlotinib im Rahmen der Radiochemotherapie untersucht werden. Zu Beginn der Versuchsreihe mit den Koloniebildungsassays wurde die Überlebensrate zwischen den Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D in Anwesenheit von DMSO ohne kombinierte Radiochemotherapie verglichen. Die Zelllinien mit KRAS-Mutationen zeigten im Überleben ohne RCT keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. In den folgenden Koloniebildungsassays wurden folgende Fragen untersucht:

- 1.) Wie wirkt sich der Effekt der RTK-Inhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien, das 5-FU und die Bestrahlung aus.
- 2.) Wie wirkt die Bestrahlung ohne 5-FU auf die RTK-Inhibitoren und die verschiedenen Zelllinien.
- 3.) Wie wirkt die auf 5-FU basierte kombinierte Radiochemotherapie auf die RTK-Inhibitoren und die verschiedenen Zelllinien.

Zu 1.): Sowohl unter der Kontrolle mit DMSO als auch unter der Therapie mit AEW541 und Erlotinib hatten die Bestrahlungsdosen von 1 Gy bis 4 Gy einen signifikant negativen Effekt auf die Koloniebildung aller Zelllinien. Lediglich die KRAS-G12V-Mutation reagierte signifikant sensitiver auf eine kombinierte RCT und Erlotinib. Die Bestrahlungsdosen von 2 Gy bis 4 Gy hatten unter der Kombinationstherapie einen signifikant negativen Effekt auf das Zellüberleben. Unter dieser Kombinationstherapie war die KRAS-G12D-Mutation signifikant resistenter als die übrigen getesteten Zelllinien.

Zu 2.) Die Radiotherapie hatte mit AEW541 und der Kombination aus AEW541 und Erlotinib signifikant einen negativen Einfluss auf das Überleben aller getesteten Zelllinien. Die Kombinationstherapie zeigte einen stärkeren Effekt als die alleinige Therapie mit nur AEW541. Die Zellen mit der KRAS-G12D-Mutation reagierten bei allen Bestrahlungsdosen unter AEW541 und unter der Kombinationstherapie signifikant resistenter als alle anderen getesteten Zelllinien. Die Zelllinie SW48 KRAS-G13D sprach auf die Kombinationsbehandlung von 1 Gy bis 3 Gy signifikant sensitiver an als alle anderen Zelllinien. Bei allen Bestrahlungsdosen hatte Erlotinib alleine keinen signifikanten Behandlungseffekt.

Zu 3.) Die 5-FU basierte Radiochemotherapie hatte bei allen Bestrahlungsdosen sowohl mit AEW541 als auch mit der Kombination aus AEW541 und Erlotinib einen signifikant negativen Einfluss auf das Überleben aller getesteten Zelllinien. Die Kombinationstherapie hatte hier einen stärkeren Effekt als die alleinige Therapie mit nur AEW541. Die Zelllinie SW48 KRAS-G12D reagierte bei allen Bestrahlungsdosen sowohl unter AEW541 als auch

unter der Kombinationstherapie resistenter als alle anderen getesteten Zelllinien. Hier wiederum war die Kombinationstherapie weniger effektiv als AEW541. Bei den Zellen mit KRAS-G13D-Mutation sprach die Kombinationsbehandlung bei allen Bestrahlungsdosen signifikant besser an als bei allen anderen getesteten Zelllinien. Auch unter der kombinierten Radiochemotherapie hatte Erlotinib alleine keinen signifikanten Behandlungseffekt.

4.2 Das biologische Verhalten der verschiedenen Zelllinien *in vitro* verglichen mit klinischen Daten

Im Hinblick auf das Wachstumsverhalten, gemessen in Proliferationsassays, zeigten die SW48 KRAS-G12V-, SW48 KRAS-G12D- und SW48 KRAS-G13D-Zelllinien verglichen mit der Wildtypzelllinie SW48 KRAS keinen Unterschied.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu wissenschaftlichen Erkenntnissen, dass KRAS-Mutationen zu einer unkontrolliert nachfolgenden konstitutiven Aktivierung der Signalwege führt und u. a. das Wachstum der Zellen fördert (Marshall 1991; Guerra et al. 2003; Tuveson et al. 2004). Die KRAS-Mutationen in den kolorektalen Karzinomzelllinien SW48 liegen jeweils auf einem Allel vor, so dass die Zellen somit heterozygot für die entsprechende Mutation sind. Die jeweilige KRAS-Mutation in den Zelllinien wurde über homologe Rekombination eingefügt, um eine stabile Expression vom endogenen Promotor und somit eines entsprechenden KRAS-Proteins zu gewährleisten. Vartanian et al. (2013) zeigten in ihrer Arbeit, dass trotz KRAS-Mutation (G13D) und unterschiedlicher Stimulation mit FKS und EGF bei insgesamt erhöhter RAS-GTPase-Aktivität keine Intensitätsunterschiede in der Expression von KRAS-gebundenem GTP zwischen der SW48 KRAS-Wildtypzelllinie und der SW48-Zelllinie mit der KRAS-Mutation G13D vorlagen. Dieser Versuch lässt zunächst daran zweifeln, dass die heterozygot vorliegende KRAS-Mutation der Zelllinie SW48 KRAS-G13D einen ständigen aktiven Zustand einnimmt bzw. die vorhandene Menge an GTP nicht an der KRAS Isoform, sondern an den anderen RAS Isoformen bindet. In Proliferationsassays beobachteten sie bei der Zelllinie SW48 mit KRAS-Mutation (G13D) allenfalls einen geringfügigen Wachstumsunterschied zu den KRAS-Wildtyp-Zellen. Eine Aussage über signifikante Wachstumsunterschiede wurden hier allerdings nicht getätigt. Des Weiteren ist erkennbar, dass der Wachstumsunterschied erst nach über ca. 100 Stunden im Wachstumsmedium auftrat. In unserem Proliferationsversuch lag die maximale Expositionszeit bei 72 Stunden. Zu prüfen ist, ob sich durch eine noch längere Inkubationszeit auch Wachstumsunterschiede zwischen den Wildtypzellen und den bei uns getesteten KRAS-mutierten Zellen zeigen lassen.

Histopathologische Untersuchungen von verschiedenen soliden Tumoren einschließlich des Kolonkarzinoms deuten darauf hin, dass durch KRAS-Mutationen noch vor einer gesteigerten Proliferation eine ausgeprägte Metaplasie einsetzt (Kiyokawa und Minato 2014). Interessanterweise zeigten sich in unseren *In-vitro*-Experimenten im Gegensatz zu den Proliferationsassays im Migrations- und Invasionsassay signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Zelllinien. Als Modell für die Zellmotilität diente der Migrationsassay. Im Assay werden diejenigen Zellen, die sich erfolgreich entlang eines FKS-Gradienten durch eine porenreiche PET-Membran bewegten, gefärbt und ausgezählt. Hier präsentierte die Zelllinie SW48 KRAS-G12V als einzige der getesteten mutierten Zelllinien einen signifikanten Migrationsunterschied gegenüber der Wildtypzelllinie. Auffallend war insbesondere, dass sich die Zelllinie SW48 KRAS-G12V auch im Invasionsassay als aktivste Zelllinie zeigte, wobei hier auch die Zelllinien SW48 KRAS-G12D und -G13D eine signifikant gesteigerte Invasivität gegenüber der Wildtypzelllinie zeigten. Die lamininreiche Extrazellulärmatrix im Invasionsassay, durch die die Zellen infiltrieren müssen, sollte hier die Basalmembran eines Hohlorgans simulieren. So zeigten Monticone et al. (2008) in ihrer Arbeit, dass in mit KRAS-G12V transfizierten Colo741-Zellen eine Deregulierung verschiedener Gene nachgewiesen werden konnte, was zu einer Hemmung der Apoptose und durch Interleukin-8 verstärkter Angiogenese führte, resultierend in einem aggressiveren Phänotyp. Rachagani et al. (2011) beschrieben in einem Nacktmausmodell, dass in den Mäusen mit orthotoper Transplantation von KRAS-G12D ausgeschalteten Pankreaskarzinomzelllinien eine niedrigere Inzidenz von Metastasen auftrat. Die KRAS-G12D ausgeschalteten Zellen zeigten *in vitro* ebenso eine signifikante Abnahme der Motilität, Invasion und Proliferation. Zellen mit einer KRAS-G12V-Mutation scheinen ein etwas höheres lymphogenes Metastasierungspotential zu haben als diejenigen mit einer KRAS-G13D-Mutation. Nach orthotoper Injektion von SW48 KRAS-G12V und KRAS-G13D Zelllinien in das Coecum von Mäusen war der Prozentsatz der Tiere, die Lymphknotenmetastasen entwickelten, mit KRAS-G12V höher als mit KRAS-G13D Mutation (Alamo et al. 2015). Genannte Arbeit erhärtet unsere erzielten *In-vitro*-Ergebnisse im Migrations- und Invasionsassay, wonach die kolorektale Karzinomzelllinie SW48 KRAS-G12V ein signifikant stärkeres Migrations- und Invasionsverhalten als die übrig getesteten Zelllinien aufzeigte.

Tabelle 21: Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse des Migrations- und Invasionsassays der SW48-Zellen im Vergleich mit experimentellen Arbeiten in der Literatur.
 Zeichenerklärung: - bedeutet kein Unterschied des Zellverhaltens. Pfeil nach oben: Stärkere Aggressivität. Pfeil nach unten: Schwächere Aggressivität. Je mehr Pfeile, desto aggressiver verhalten sich die Zellen

	KRAS-wt	KRAS-G12V	KRAS-G12D	KRAS-G13D
Migrationsassay:	-	↑	-	-
Invasionsassay:	-	↑↑↑	↑	↑
Literatur (Moticone et al. 2008)		↑		
Literatur (Rachagani et al. 2011)			↓	
Literatur (Alamo et al. 2015)		↑↑		↑

Aus Patientendaten ist immer deutlicher zu sehen, dass Metastasenbildung, Prognose und Therapieansprechen abhängig vom KRAS-Mutationsstatus ist. Allerdings wird der Effekt der einzelnen KRAS-Mutationen auf das Tumorstadium, Prognose und Therapieansprechen noch kontrovers in der Literatur diskutiert.

Lièvre et. al (2008) veröffentlichten eine Arbeit, in der Tumorgewebe von 89 Patienten mit metastasiertem KRK, die ein Therapieversagen auf eine Irinotecan basierte Chemotherapie hatten und folglich mit Cetuximab behandelt wurden, auf eine KRAS-Mutation untersucht wurde. Analysiert wurde der Zusammenhang zwischen KRAS-Mutationen und Tumoransprechen, progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben. Das Ergebnis war, dass Patienten mit einer KRAS-Mutation signifikant ein niedrigeres progressionsfreies Überleben hatten. Als die Daten der 89 Patienten mit Patientendaten einer vorherigen Studie zusammengeführt wurden, zeigten die Ergebnisse, dass der KRAS-Mutationsstatus ein unabhängiger prognostischer Faktor war, der mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben assoziiert war. Eine größere zusammengefasste Analyse von fünf randomisierten Studien mit insgesamt 1239 Patienten zeigte ebenfalls ein niedrigeres progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) bei Patienten mit KRAS-Mutation. Diese Studie betrachtete auch die verschiedenen KRAS-Mutationen und deren Unterschiede in Bezug auf OS und PFS. Hervorzuheben war hier die KRAS-G12C Mutation, welche signifikant mit einem niedrigeren OS gegenüber den nicht mutierten KRAS Trägern assoziiert war (Modest et al. 2016). Aus noch unveröffentlichten Daten eines Patientenkollektivs (n = 318) unserer Arbeitsgruppe gemeinsam mit Prof. Dr. med. J. Gaedcke, Universitätsmedizin Göttingen, ging hervor, dass der Anteil von KRAS-Mutationen im Rektumkarzinom mit 40,2 % (n = 128) gegenüber den 59,8 % (n = 190) mit dem KRAS-Wildtyp wie erwartet bei den in der Literatur beschriebenen Zahlen liegt. Die

drei häufigsten Mutationen waren demnach die Mutation G12D mit 10,7 % (n = 34), gefolgt von der Mutation G13D mit 7,2 % (n = 23) und G12V mit 5 % (n = 16). In den übrigen 17,3 % Patienten (n = 55) fanden sich seltene Mutationen in den Exons 2, 3 und 4 des *KRAS*-Gens. In der Differenzierung der drei häufigsten *KRAS*-Mutationen (G13D, G12D und G12V) stellte sich die Mutation G12V als signifikant mit der am schlechtesten Prognose dar. Imamura et al. (2012) veröffentlichten Daten eines Patientenkollektivs, wonach die Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom mit *KRAS*-Mutation in Kodon 12 und *BRAF*-wt erkrankt waren, gegenüber Patienten mit *KRAS*-wt und *BRAF*-wt eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen. Patienten mit einer Mutation in Kodon 13 hatten keine signifikant schlechtere Prognose gegenüber den Patienten mit *KRAS*-wt und *BRAF*-wt. Unter den getesteten *KRAS*-Mutationen zeigte die *KRAS*-Mutation G12V eine signifikant höhere kolorektale Krebs-spezifische Mortalität im Vergleich zu den *KRAS*-wt Fällen. In einer retrospektiven Studie an 841 Patienten mit einem NSCLC war die *KRAS*-Mutation G12V sowohl mit einem schlechteren Überleben assoziiert als auch mit einem kürzeren rezidivfreien Zeitraum (Renaud et al. 2015). In mehreren unabhängigen Arbeiten erwies sich somit die *KRAS*-Mutation G12V als die prognostisch ungünstigste Mutation. Andere Arbeiten identifizierten *KRAS*-Mutationen in Kodon 13 aggressiver als Mutationen in Kodon 12. So legten Daten aus einem populationsbasiertem Patientenkollektiv mit 1018 Patienten mit einem metastasierten KKK nahe, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem *KRAS*-Wildtyp und den in Kodon 12 und Kodon 13 mutierten Tumoren hinsichtlich einer Lymphknotenmetastasierung und Organmetastasierung gibt. In diesem Kollektiv erwiesen sich die metastasierten KKKs mit einer Mutation in Kodon 13 im Gegensatz zu den in Kodon 12 mutierten KKKs als klinisch aggressiver in Form eines vermehrten Auftretens von lokoregionären Metastasen und Fernmetastasen (Modest et al. 2011).

Die Daten aus unseren Migrations- und Invasionsassays stehen im Gegensatz zu eben genannter Publikation, wonach Mutationen in Kodon 13 als aggressivere Mutation beschrieben wurden. Weshalb einzelne *KRAS*-Mutationen sich im biologischen Verhalten erheblich und signifikant unterschiedlich verhalten, bedarf weiterer Differenzierung auf molekulargenetischer Ebene. Die unterschiedlichen und teilweise auch konträren Daten zeigen auch, dass es weitere noch aussagekräftigere Studien geben und weiterhin verstärkt auf den individuellen *KRAS*-Mutationsstatus geachtet werden muss und nicht nur auf die Unterscheidung *KRAS*-Mutation oder *KRAS*-Wildtyp. Die Gruppe der KKK ist also offensichtlich heterogen und in Abhängigkeit vom *KRAS*-Status klinisch unterschiedlich.

4.3 Der Einfluss von KRAS-Mutationen auf die Aktivität der nachfolgenden Signalkaskaden MAPK und PI3K

KRAS hat eine Schlüsselstellung in der Regulierung von Zellfunktionen und in der Karzinogenese von soliden Tumoren und dem kolorektalen Karzinom im Speziellen. Mutationen in KRAS beeinflussen in unterschiedlicher Weise das biologische Verhalten von Tumorzellen und gelten als prognostische Marker für das Ansprechen einer zielgerichteten Antikörpertherapie. Akzeptiert ist, dass Patienten mit einem Wildtyp-Status in KRAS von einer anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab und Panitumumab profitieren. Kolorektale Karzinome mit KRAS-Mutation zeigen auf diese Therapie kein Ansprechen. Dementsprechend gelten die aktuellen therapeutischen Empfehlungen.

Eine molekularbiologische Erklärung für eine Tumor- und Karzinomentwicklung, aber auch für Entwicklungsstörungen, findet man in den durch RAS-Mutationen nachfolgend liegenden, angeblich konstitutiv aktivierten Signalkaskaden. So ist bekannt, dass Keimbahnmutationen, die die Komponenten des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges beeinflussen, einer Gruppe von Entwicklungsstörungen wie dem Noonan-Syndrom, dem Costello-Syndrom und dem kardio-fazio-kutanen Syndrom zugrunde liegen (Schubbert et al. 2007). Der Einfluss von somatischen Mutationen in KRAS auf den MAPK-Signalweg in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten wird in der Literatur weiter kontrovers diskutiert. In einer Arbeit von Lee et al. (2016) wurde in Pankreaskarzinomzellen mit KRAS-Mutation die Signalgebung von EGFR zum MAPK-Signalweg untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalgebung über eine EGF-Stimulierung selektiv über den EGFR (HER1) auftrat. Über das Ausschalten aller RAS-Isoformen konnte über die EGF-Stimulation die Phosphorylierung von ERK nicht blockiert werden. Die Autoren konnten somit zeigen, dass die EGFR-vermittelte Signalweitergabe in KRAS-mutierten Pankreaskarzinomzellen nicht dem klassischen MAPK-Signalweg folgt. In unserer Arbeit mit den SW48-Zellen wurden die von KRAS *downstream* liegenden Ziele wie ERK nach Zellstimulation mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Bei der Stimulation mit EGF konnte mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern eine Aktivierung von ERK nachgewiesen werden. Sowohl beim KRAS-Wildtyp als auch den KRAS-Mutanten rief EGF eine starke Phosphorylierung von ERK hervor. Ein Unterschied der Phosphorylierung ließ sich zwischen der SW48 KRAS-Wildtyp Zelllinie und den SW48 KRAS-mutierten Zelllinien hier nicht erkennen. In bereits zitierter Arbeit von Vartanian et al. (2013) konnte im Phosphorylierungsstatus von ERK nach EGF-Stimulation verglichen zu unseren Ergebnissen ebenso kein Unterschied zwischen den KRAS Wildtyp-Zellen und KRAS-mutierten Zellen gesehen werden. Eine erweiterte Stimulation zu EGF mit IGF über IGF-1R-vermittelte Signalkaskaden konnte bei den Zellen mit KRAS-

Mutation gegenüber den Wildtyp-Zellen keine gesteigerte Aktivität von ERK erkennen lassen. Ein Zusammenhang zwischen KRAS-Mutationen in KRK-Zelllinien im Kontext einer verstärkten Migration- und Invasion aufgrund einer gesteigerten MAPK-Signalverstärkung konnte somit nicht gezeigt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass es einen Signalweiterleitungsumweg ausgehend von KRAS gibt, der nicht primär über ERK läuft. In unseren Western-Blot-Analysen konnten im Expressionslevel der Transmembranproteine EGFR und IGF-1R und der intrazellulären Proteine ERK und AKT keine Unterschiede zwischen der kolorektalen Karzinomzelllinie SW48 mit und ohne KRAS-Mutation gesehen werden. Auch in der Aktivität des MAPK- und des PI3K-Signalweges, gemessen am Phosphorylierungsstatus von ERK und AKT unter Wachstumsbedingungen mit FKS, konnte zwischen den KRAS-Wildtypzellen und KRAS-mutierten Zellen kein Unterschied gesehen werden.

Diese Ergebnisse hinterfragen die übliche Ansicht, dass eine KRAS-Mutation ursächlich für eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweg ist. Im Kontext einer Publikation von Blaj et al. (2017) stellt sich umso mehr die Frage, inwieweit Mutationen in KRAS einen Einfluss auf die MAPK-Signalgebung in kolorektalen Zellen haben. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass in den kolorektalen Karzinomzelllinien SW48, HT29, COLO320 und RKO mit KRAS-Wildtyp eine Stimulation mit EGF zu einer starken Phosphorylierung von ERK und mutmaßlichen Aktivierung des MAPK-Signalwegs führte. Eine Blockierung des EGFR mit Cetuximab und zusätzliche Stimulation mit EGF verhinderte hingegen eine Phosphorylierung von ERK in oben genannten kolorektalen Karzinomzelllinien. In den kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 mit KRAS-G12V Mutation, LOVO mit KRAS-G13D-Mutation, DLD-1 mit KRAS-G13D-Mutation und HCT116 mit KRAS-G13D Mutation fanden sich unerwarteterweise die gleichen Antworten auf eine kombinierte Stimulation mit EGF und EGFR Blockierung mit Cetuximab.

Diese Ergebnisse relativieren unsere Erwartung an die von uns durchgeführten Western-Blot-Versuche, in denen keine Aktivitätsunterschiede zwischen den KRAS-Wildtypzellen und KRAS-mutierten Zellen zu sehen waren. Die RAS-Wildtyp Isoformen, die in kolorektalen Karzinomzellen mit heterozygot vorliegenden KRAS-Mutationsstatus verbleiben, könnten somit für die Regulation des MAPK-Signalwegs nach aktuellem Kenntnisstand eine herausgehobene Rolle spielen.

Dass in der Zellregulierung kolorektaler Karzinome der PI3K-Signalweg eine Rolle spielt, wurde in den Abschnitten 1.3. und 1.4. dargelegt. Über eine Stimulation mit IGF über den IGF-1R konnte in unseren Western-Blot-Analysen keine Phosphorylierung des Schlüsselproteins AKT im PI3K-Signalweg nachgewiesen werden. In oben genannter Arbeit

von Vartanian et al. (2013) konnte bei den SW48-Zelllinien ebenfalls nur eine schwache Phosphorylierung von AKT in Western Blots erzielt werden. Hier wurde die Aktivität von AKT mit einer Stimulation mit EGF sowohl in der SW48 KRAS-Wildtyp-Zelllinie als auch der SW48 KRAS-G13D Zelllinie erzielt. In unseren Western-Blot-Analysen rief eine Stimulation mit EGF und IGF sowohl in den Wildtyp-Zelllinien als auch in den KRAS-mutierten Zelllinien eine Phosphorylierung von AKT hervor. Eine Aktivitätssteigerung von AKT konnte als Ausnahme bei zeitlicher Stimulierung mit FKS nach 1, 4 und 8 h bei der Zelllinie SW48 KRAS-G13D beobachtet werden. Warum die Mutation G13D sensibler auf eine Stimulation reagiert, bleibt weiter zu prüfen.

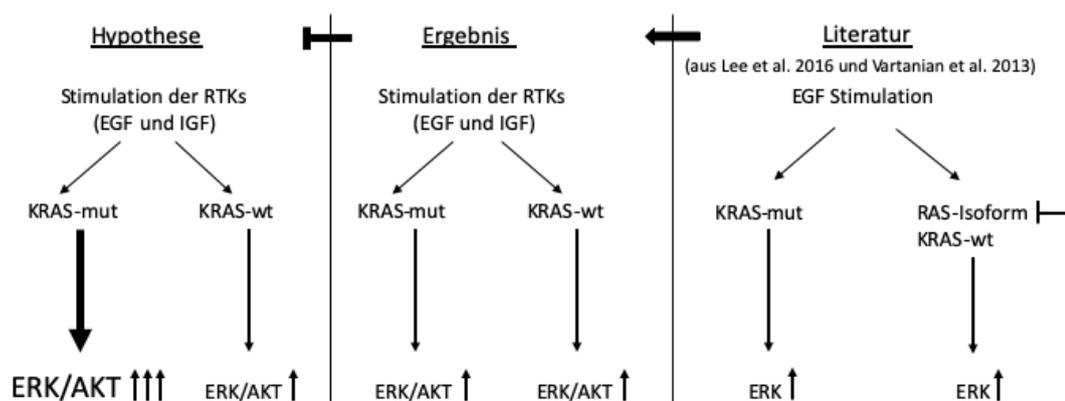


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Literatur und unserer Ergebnisse auf die KRAS-Stimulations-Hypothese. Die Hypothese besagt, dass eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren bei KRAS-mutierten Zellen im Gegensatz zu KRAS-wt-Zellen zu einer Aktivitätssteigerung der Signalwegskomponenten ERK und AKT führt. Das Ergebnis unserer Western-Blot-Analysen zeigte, dass nach Zellstimulation mit EGF und IGF keine Aktivitätssteigerung von ERK und AKT gesehen wurde. Lee et al. (2016) zeigten, dass nach Ausschalten aller RAS-Isoformen nach Zellstimulation die Phosphorylierung von ERK nicht blockiert werden konnte. In Experimenten von Vartanian et al. (2013) konnte wie in unseren Ergebnissen kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus von ERK nach EGF-Stimulation zwischen den KRAS-wt Zellen und KRAS-mutierten Zellen gesehen werden. Die Literatur bestätigt unsere Ergebnisse, die die Hypothese nicht stützen konnten.

4.4 Der Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren unter einer 5-FU-basierenden Radiochemotherapie beim KRAS-mutierten KKK

Nach den Erkenntnissen des unterschiedlichen biologischen Verhaltens der SW48 KRAS-Zelllinien sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob und wie die kolorektalen Karzinomzellen mit verschiedenen KRAS-Mutationen auf eine Therapie mit Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren unter einer 5-FU-basierenden Radiochemotherapie reagieren. In der aktuellen Leitlinie KKK wird empfohlen, bei Tumoren des unteren und

mittleren Rektumdrittels in den UICC-Stadien II und III (cT3/4 und/oder cN+) eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder Kurzzeit-Radiotherapie durchzuführen. Die Radiochemotherapie sollte orales Capecitabine oder infusionales 5-FU beinhalten (Leitlinie kolorektales Karzinom 2019). Auf diesem Prinzip aufbauend wurde das den Versuchen abschließende Zellmodell unserer Arbeitsgruppe unter Beinhaltung der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AEW541 gestaltet. Der Versuchsaufbau ist aus Teil 2 der Arbeit, Material und Methoden in Punkt 2.2.6., Abbildung 6, detailliert zu entnehmen. In den aktuellen Empfehlungen zur Behandlung des metastasierten KRKs finden sich als zielgerichtete Therapien gegen den EGF-Rezeptor die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab. Aus mehreren randomisierten Studien geht hervor, dass der zusätzliche Einsatz dieser Antikörper auf der Basis einer 5-FU-basierenden Chemotherapie zu einer signifikanten Effektivitätssteigerung in Bezug auf die Gesamtansprechrate, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben führt (Douillard et al 2013; Heinemann et al. 2014; Bokemeyer et al. 2015). Der Einsatz der zielgerichteten Antikörper gegen den EGFR ist aktuell nur bei KRAS-Wildtyp-Tumoren empfohlen. Im Zuge der Etablierung der monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab wurde hauptsächlich auf die Unterscheidung KRAS-Wildtyp und KRAS-Mutation Wert gelegt, ohne die einzelnen KRAS-Mutationen weiter zu differenzieren.

Als Therapieoption zur Hemmung von Tumorwachstum stehen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren zur Verfügung. Diese sind gegenwärtig noch kein Therapiestandard beim fortgeschrittenen KRK. Die aktuellen deutschen Empfehlungen der S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom sehen den Multikinase-Inhibitor Regorafenib in späteren Therapielinien bei mit Chemotherapie und Antikörpern vorbehandelten Patienten vor. Grundlage hierfür war die CORRECT-Studie, die einen Überlebensvorteil von 6,4 Monaten bei mit Regorafenib behandelten Patienten gegenüber 5 Monaten einer Placebo-Gruppe zeigte. Jedoch wurde der Einsatz von Regorafenib aufgrund seiner Toxizität kritisch bewertet (Grothey et al. 2013). So kann nach aktueller Leitlinie Regorafenib eingesetzt werden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019). Eine 2017 veröffentlichte Cochrane-Analyse hatte als Ergebnis, dass die Zugabe von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren gegen EGFR zur Standardtherapie beim metastasierten KRK bei einem molekular unselektierten Patientengut keinen Nutzen zeigte. Anzumerken ist hier, dass diesen Daten bisher nur begrenzte Datensätze zugrunde liegen und keine Metaanalysen vorliegen (Chan et al. 2017).

Die in unseren Experimenten gewählten Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D gewährleisteten eine stabile Expression vom endogenen Promotor und somit eines entsprechenden KRAS-Proteins (siehe Teil 4.3.).

Die Verwendung dieser Zelllinien hatte den Vorteil, dezidiert die Unterschiede und Wirkungen der einzelnen KRAS-Mutationen herausarbeiten zu können ohne dabei auf andere tumorbiologische Einflüsse eingehen zu müssen. Die Zelllinien und sehr gut etablierten Methoden in unserer Arbeitsgruppe waren daher geeignet, um Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien mit und ohne KRAS-Mutation herauszuarbeiten, Unterschiede auf ein Ansprechen der Therapien zu sehen und eine Vergleichbarkeit herzustellen.

Tabelle 22 fasst zunächst noch einmal die Ergebnisse der durchgeführten Proliferationsassays und Koloniebildungsassays vereinfacht zusammen. Des Weiteren ist darin zum Vergleich mit unseren biologischen Experimenten eine Aufstellung relevanter klinischer Studien zusammengefasst.

Tabelle 22: Vereinfachte Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Proliferationsassays, der Koloniebildungsassays und eine Auswahl von Literaturergebnissen.

a) Bei der Kontrolle zeigten die Zelllinien SW48 KRAS-wt, SW48 KRAS-G12V, SW48 KRAS-G12D und SW48 KRAS-G13D keinen Unterschied im Wachstumsverhalten. **b)** Alle Zelllinien reagierten sensitiv (+) auf eine Therapie mit Erlotinib; KRAS-G13D (+++) und KRAS-G12V (++) reagierten gegenüber den anderen Zellen noch sensitiver. **c)** Unter AEW541-Behandlung zeigten sich alle Zelllinien sensitiv auf die Therapie. **d)** Die Kombinationstherapie wirkte auf alle Zelllinien; hier reagierte KRAS-G13D sensitiver gegenüber den anderen Zelllinien. Zeichenerklärung: + bedeutet, dass die Zelllinien sensitiv auf die entsprechende Therapie reagierten. Je stärker das Ansprechen, desto höher die Anzahl der (+)-Zeichen; * bedeutet kein Unterschied untereinander. Die Bedeutung der Pfeile ergibt sich aus dem jeweiligen Text.

	KRAS-wt	KRAS-G12V	KRAS-G12D	KRAS-G13D
Proliferationsassays				
a) Kontrolle	*	*	*	*
b) Erlotinib	++	++	+	+++
c) AEW541	+	+	+	+
d) Erlotinib/AEW541	+	+	+	++
Koloniebildungsassays				
5-FU-basierende kombinierte RCT unter Hinzunahme von RTKIs	++	++	+	+++
Literatur				
Schanzer et al. 2016: Eine doppelte Hemmung gegen den EGFR und IGF-1R zeigte kein Ansprechen bei SW48-Zellen	-			
Bai et al. 2018: Mutationen in Kodon 12 assoziiert mit schlechterem Überleben		↓	↓	

Literatur	KRAS-wt	KRAS-G12V	KRAS-G12D	KRAS-G13D
<u>Imamura et al. 2012:</u> KRAS-Mutation G12V mit signifikant höherer kolorektaler Krebs spezifischer Mortalität im Vergleich zu den KRAS-wt Fällen.		↓		
<u>Osumi et al. 2015:</u> Trend zum besseren progressionsfreien Überleben in der Gruppe mit KRAS-Mutation G13D im Rahmen einer Irinotecan-basierenden Chemotherapie unter Hinzunahme von Cetuximab				↑
<u>De Roock et al. 2010:</u> KRAS-Mutation G13D bei Patienten mit metastasiertem KRK im Vergleich zu anderen KRAS-Mutationen unter einer Cetuximab-Therapie mit besserem PFS und OS assoziiert				↑
<u>Tejpar et al. 2012:</u> Analyse aus Datensätzen der CRYSTAL- und OPUS-Studie. Patienten mit einer KRAS-G12V-Mutation ohne Profit von einer Chemotherapie in Kombination mit einer Cetuximab-Therapie gegenüber einer Chemotherapie alleine. Patienten mit einer KRAS-G13D- Mutation mit signifikant besserem PFS und Tumoransprechen ohne einen Vorteil im medianen Überleben		↓		↑
<u>Gajate et al. 2012:</u> Patienten mit einem metastasierten KRK und KRAS-Mutation G13D profitieren nicht von einer Cetuximab-Therapie				↓
<u>Rowland et al. 2016:</u> (Metaanalyse von acht randomisierten kontrollierten Studien) Kein signifikanter Unterschied zwischen der KRAS-Mutation G13D und anderen KRAS-Mutationen auf eine anti-EGFR-Therapie	*	*	*	*

Als Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren zur Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalwegs wurden von uns Erlotinib gegen den EGFR und AEW541 gegen den IGF-1R verwendet.

Die inhibitorische Wirkung des Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors AEW541 gegen den IGF-1R konnte von Hopfner et al. (2006) an den kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29 und HCT-116 Zellen gezeigt werden. AEW541 bewirkte eine zeit- und dosisabhängige Wachstumshemmung der Zellen. Zusätzlich bewirkte die AEW541-Behandlung eine Dephosphorylierung von ERK und AKT und eine Expressionsminderung von Cyclin D1 als Hinweis auf einen Zellzyklusarrest. Cunningham et al. (2008) zeigten in ihrer Arbeit, dass kolorektale Karzinomzelllinien mit niedriger EGFR- und IGF-1R-Expression auf eine alleinige Inhibition mit dem monoklonalen Antikörper ICR62 gegen EGFR oder dem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AEW541 gegen IGF-1R relativ resistent wirkten. Die Kombination der beiden Substanzen äußerte sich bei der Hemmung von einigen Karzinomzelllinien (Colo13-, CCL235- und CCL244-Zellen) jedoch als additiv, bei anderen allerdings antagonistisch.

Die Aktivität des PI3K- und MAPK-Signalwegs wird hauptsächlich über den EGFR und IGF-1R induziert. Histopathologische Untersuchungen an fortgeschrittenen KRKs weisen häufig eine Koexpression von EGFR, IGF-1R und HER-2 auf (Cunningham et al. 2006). Darüber hinaus interagieren die beiden Rezeptoren über *cross-talk* Mechanismen miteinander, was diese RTKs zu interessanten Therapiezielen machen (van der Veecken et al. 2009; Xue et al. 2012; Oberthür et al. 2017). Die Existenz eines *cross-talk* Mechanismus zwischen dem EGFR und IGF-1R im KRK wurde bisher in verschiedenen Arbeiten diskutiert (Burgaud und Baserga 1996; Roudabush et al. 2000; Ahmad et al. 2004; Hu et al. 2008). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibition des EGFR und IGF-1R in den kolorektalen Karzinomzelllinien DLD-1 und Caco-2 zu einer verminderten Proliferationsrate und einer gesteigerten Todesrate der Zellen führte (Kaulfuß et al. 2009).

Ein neu erprobter bispezifischer Antikörper namens XGFR* gegen den EGFR und IGF-1R bewirkte am Beispiel des Pankreaskarzinoms sowohl in *In-vivo*- als auch in *In-vitro*-Modellen eine starke Signal- und Tumorstillungshemmung. Interessanterweise zeigte dieser Antikörper als doppelte Hemmung gegen den EGFR und IGF-1R an 9 von 13 getesteten KRK-Zelllinien, darunter die Zelllinie SW48, kein Ansprechen auf diese Therapie (Schanzer et al. 2016). Die doppelte Hemmung mit Erlotinib und AEW541 zeigte an der SW48 KRAS-Zelllinie in unseren Proliferationsassays hingegen ein Therapieansprechen.

KRAS-G12V und G12D-Mutation im KRK:

Eine kürzlich publizierte Arbeit von Bai et al. (2018) identifizierte neben der KRAS-Mutation G12V die KRAS-Mutation G12D bei Patienten mit metastasiertem KRK als ungünstig mit negativer Prognose. Weitere Studien von Imamura et al. (2012) und Raynaud et al. (2015)

(siehe Punkt 4.2.) identifizierten KRAS-G12V für das Überleben der Patienten als prognostisch ungünstigste Mutation.

KRAS-G13D-Mutation im KRK:

Insbesondere die Rolle der KRAS-Mutation G13D im KRK wird bei der Behandlung mit einer anti-EGFR-Therapie in der Literatur unterschiedlich betrachtet und bewertet.

Interessanterweise stützen einige Studien die Ergebnisse unserer Proliferationsassays, wonach die Zellen mit KRAS-Mutation G13D auf eine Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase mit Erlotinib signifikant sensitiver als die übrigen KRAS-Mutationen reagierten. Osumi et al. (2015) zeigten anhand eines Patientenkollektiv, dass sich im Gegensatz zu der univarianten Analyse immerhin in der multivarianten Analyse ein Trend zum besseren progressionsfreien Überleben in der Gruppe mit KRAS-Mutation G13D im Rahmen einer Irinotecan-basierenden Chemotherapie unter Hinzunahme von Cetuximab darstellen ließ. De Roock et al. (2010) zeigten in einer Arbeit, dass die KRAS-Mutation G13D bei Patienten mit einem metastasierten KRK im Vergleich zu anderen KRAS-Mutationen unter einer Cetuximab-Therapie ein besseres PFS und OS aufwies. Ähnliche Ergebnisse lieferte Tejpar et al. (2012), die die aktualisierten gepoolten Datensätze der CRYSTAL- und OPUS-Studie analysierten. Von den untersuchten Patienten wiesen 39 % (533 Personen) eine KRAS-Mutation auf, von denen wiederum 16 % eine KRAS-G13D-Mutation und 23 % eine KRAS-G12V-Mutation aufwies. Während Patienten mit einer KRAS-G12V-Mutation nicht von einer Chemotherapie in Kombination mit einer Cetuximab-Therapie gegenüber einer Chemotherapie alleine profitierten, zeigten Patienten mit einer KRAS-G13D-Mutation ein signifikant besseres PFS und Tumoransprechen ohne einen Vorteil im medianen Überleben. Unsere *in vitro* erhobenen Ergebnisse weisen, verglichen mit klinischen Daten, in der Tendenz der ähnlichen Ergebnisse eine interessante Gemeinsamkeit auf. Die Beobachtungen *in vitro* führen so zu einem Beweis, dass der Unterschied in der Prognose in der Arbeit von Tejpar et al. (2012) in den unterschiedlichen KRAS-Mutationen zu suchen ist und nicht in anderen molekularen Unterschieden. Die Ergebnisse unserer Proliferationsassays, wonach die KRAS-Mutation G13D als insgesamt sensitiver ansprechende Mutation zu werten ist, werden durch zuletzt genannte Publikationen ebenso unterstützt.

Im Gegensatz dazu konnte Gajate et al. (2012) an einem Patientenkollektiv von 110 Patienten zeigen, dass Patienten mit einem metastasierten KRK und KRAS-Mutation G13D nicht von einer Cetuximab-Therapie profitierten. Auch eine Metaanalyse von acht randomisierten kontrollierten Studien ließ erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der KRAS-Mutation G13D und anderen KRAS-Mutationen auf eine anti-EGFR-Therapie gab (Rowland et al. 2016). Die Anwendung einer anti-EGFR-Therapie

mit Cetuximab könnte bei verschiedenen mutierten KRAS-Formen möglicherweise sogar einen negativen prognostischen Effekt haben. Während bei Patienten mit KRAS-Mutationen im Kodon 13 gegenüber Patienten mit KRAS-Wildtypform kein signifikanter Unterschied im medianen OS gesehen wurde, wiesen Patienten mit Mutationen im Kodon 12 unter einer Therapie mit Cetuximab ein deutlich schlechteres medianes OS auf (Liang et al. 2015). Die Ergebnisse unserer molekularbiologischen Experimente im Kontext mit bisher erhobenen klinischen Daten zeigen die Kontroverse des noch unklaren biologischen Verhaltens und Ansprechen auf die Therapie der unterschiedlichsten KRAS-mutierten KRKs sehr gut.

Insgesamt überraschten die unterschiedlichen Ergebnisse unserer Experimente insofern, dass eine in der Signalkaskade oberhalb liegende Inhibition theoretisch und nach aktuellem biologischen Verständnis keinen Einfluss auf KRAS-mutierte Zellen haben müsste.

Es bleibt fraglich, warum insbesondere die SW48 KRAS-G13D Zelllinie in unseren Experimenten sensitiver auf eine Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Therapie alleine und mit einer 5-FU-basierenden Radiochemotherapie und die Zelllinie SW48 KRAS G12D Zelllinie weniger sensitiv reagierte. Aus klinischen Daten und Studien, die in Tabelle 22 aufgeführt sind, geht hervor, dass die Prognose beim KRAS-G13D mutiertem KRK besser ist als bei anderen KRAS-Mutationen. In unseren Therapieversuchsreihen sprach die Zelllinie mit KRAS-G13D Mutation passend dazu auch sensitiver an. Die Zelllinie mit der KRAS-G12V-Mutation, die sich im biologischen Experiment als aggressivste Zelllinie präsentierte, sprach auf die Therapieversuchsreihen ebenso wie die KRAS-wt- und KRAS-G12D-Mutation in vergleichbarer Weise an.

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen, dass das Konzept des Ausschaltens von Signalkaskaden beim KRAS-mutierten KRK auf einer noch nicht vollständig verstandenen Signalübertragung und Resistenzentwicklung beruhen.

4.5 KRAS im Kontext anderer Biomarker beim KRK

KRAS-Mutationen sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei ca. 40 % aller KRKs nachzuweisen und bilden die Primärresistenz gegenüber einer anti-EGFR-Therapie (Sforza et al. 2016). Dennoch treten bei KRAS-Wildtyp KRKs eine signifikante Anzahl von sogenannten *Non-respondern* auf, die nicht auf eine anti-EGFR-Therapie ansprechen bzw. nach initialem Ansprechen im Verlauf einer Therapie möglicherweise eine Resistenz entwickeln (van Cutsem et al. 2011; Bokemeyer et al. 2012; Heinemann et al. 2014; Schwartzberg et al. 2014). Neben der KRAS-Mutationstestung sind u. a. aktuell noch NRAS-Mutationen und BRAF-Mutationen als Vorhersagemarker relevant und werden routinemäßig getestet (Douillard et al. 2013; Sorich et al. 2015). Das gleichzeitige Vorliegen

einer RAS- und einer BRAF-Mutation ist sehr selten und wird aktuell als sich ausschließend akzeptiert. Unter den BRAF-Mutationen ist insbesondere die BRAF-V600E Mutation mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Tran et al. 2011). Beim Nachweis einer BRAF-V600E Mutation wird in der Leitlinie KRK gegenwärtig aufgrund der eingeschränkten Datenlage auf niedrigem Empfehlungsgrad eine intensiviertere Chemotherapie wie z. B. mit dem FOLFOXIRI-Regime und Bevacizumab empfohlen (Leitlinie KRK 2019). Zwei Metaanalysen diskutieren konträr den Einsatz von anti-EGFR Substanzen bei BRAF-Mutationen. In der Analyse von Pietrantonio et al. (2015) konnte durch die Zugabe von Cetuximab oder Panitumumab in der BRAF-mutierten Subgruppe kein signifikant verbessertes PFS (HR = 0,88; p = 0,33) und OS (HR = 0,91; p = 0,63) verglichen mit den Kontrollregimen erzielt werden. Hingegen argumentierte Rowland et al. (2015), dass aufgrund der Datenlage aus acht randomisierten kontrollierten Studien keine ausreichenden Beweise vorliegen, um BRAF-Mutationen endgültig als negativ prädiktiven Biomarker beim metastasierten KRK für ein besseres *outcome* aufgrund einer anti-EGFR-Therapie zu betrachten. Kuremsky et al. (2009) beschrieb in einer Metaanalyse sechs verschiedene Biomarker, die zuvor in mindestens fünf Studien als relevant beschrieben wurden. Von den untersuchten Biomarkern p53, p21, Thymidylatsynthase, EGFR, Ki-67 und bcl-2/bax erwies sich EGFR und Thymidylatsynthase als erfolgsversprechend. Ein weiterer Biomarker, dem prognostisches Potential zugeschrieben wird, ist die Tyrosinkinase SRC. Das SRC Molekül ist an einer Vielzahl von Zellinteraktionen, darunter Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix- Adhäsion beteiligt und spielt eine Schlüsselrolle in molekularen Signalwegen, darunter der MAPK-Signalweg (Yeatman 2004). Am Beispiel des KRK zeigte de Heer et al. (2008) an einem Patientenkollektiv (n = 104), dass eine erhöhte SRC-Expression mit einer erhöhten Lokalrezidivrate assoziiert war. An der Cetuximab resistenten KRK-Zelllinie DiFi5 konnten Lu et al. (2007) zeigen, dass eine Inhibition der SRC-Kinase die resistenten DiFi5-Zellen gegen eine Cetuximab-Behandlung resensibilisierte. Exemplarisch wird hier deutlich, dass das Zusammenspiel der einzelnen Signalwegskomponenten, beginnend bei den Rezeptortyrosinkinasen bis hin zu den (Proto-) onkogenen, eine zentrale Rolle beim Einsatz zielgerichteter Therapien aufweist. KRAS als Teil des MAPK-Signalweges und von EGFR *downstream* gelegenes Protein zeigt seine Relevanz, aber auch Limitierung im Kontext einer anti-EGFR-Therapie als Biomarker. Gerade die anti-EGFR-Therapie bei nachgewiesenen KRAS-Mutationen im Kodon 13 wird, wie bereits oben erwähnt, kontrovers diskutiert (De Roock et al. 2010; Gajate et al. 2012; Tejpar et al. 2012). Messner et al. (2013) veröffentlichten eine Arbeit, in denen sie die Wirkung einer anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab und Panitumumab auf 15 verschiedene kolorektale Karzinomzelllinien untersuchten. Sieben

Zelllinien enthielten eine Mutation in KRAS, von denen wiederum vier eine KRAS G13D Mutation, zwei eine Mutation in Kodon 12 und eine in Kodon 61 aufwiesen. Die drei Zelllinien mit Mutation in Kodon 12 oder 61 zeigten eine Resistenz gegenüber einer anti-EGFR-Therapie. Hingegen konnte mittels der anti-EGFR-Therapie eine deutliche Reduktion des Zellwachstums aller vier Zelllinien mit KRAS-G13D-Mutation erreicht werden. Zwischen den KRAS-G13D-mutierten Zelllinien und den übrigen KRAS-mutierten Zelllinien offenbarte sich wiederum ein signifikanter Unterschied.

Die Ergebnisse unserer Proliferationsassays sind in diesem Kontext bemerkenswert. Erlotinib zeigte zwar auf die kolorektalen Karzinomzelllinien SW48 KRAS-wt, KRAS-G12V, KRAS-G12D und KRAS G13D eine signifikant negative Wirkung auf das Zellwachstum, allerdings reagierte hier die KRAS-G12D-Mutation nach 72 Stunden auf die Behandlung signifikant weniger sensitiv. Die Mutation KRAS-G13D reagierte auf die 72-stündige Behandlung hingegen signifikant sensitiver als die anderen Zelllinien. In Zusammenschau der publizierten Arbeiten wird die Relevanz von Biomarkern beim KRK mit ihrem prognostischen Wert und Angriffsziele für eine zielgerichtete Therapie, insbesondere auf eine anti-EGFR-Therapie, deutlich und spiegelt sich in zahlreichen Arbeiten wider (Chen et al. 2015; Schütte et al. 2017; Zarkavelis et al. 2017). Zhao et al. (2017) fasste relevante Studien über genetische und histologische Nachweise für die Resistenz gegen eine anti-EGFR-Therapie beim KRK zusammen. Tabelle 23 zeigt eine Auswahl der Studien in einer Übersicht.

Tabelle 23: Auswahl relevanter Studien über genetische und histologische Nachweise für die Resistenz gegen eine anti-EGFR-Therapie beim KRK (nach Zhao et al. 2017). AREG = Amphiregulin, EREG = Epiregulin, PTEN = *Phosphatase and Tensin homolog*, EMT = *epithelial-mesenchymal transition*, **a)**: Analyse aus fünf Einzelgruppenstudien und fünf randomisierten klinischen Studien, **b)**: Analyse aus 11 systematischen Übersichtsarbeiten mit Metaanalysen, zwei retrospektive Analysen und zwei Beurteilungen der Medizintechnik-Folgenabschätzung auf der Grundlage einer systematischen Übersichtsarbeit.

Genetischer und histologischer Nachweis für Resistenzen gegen eine anti-EGFR-Therapie beim KRK			
Referenz/Studie	Eingeschlossene Patienten in den Analysen, n	Studientyp	Genetische und histologische Aussage
Erniedrigte EGFR-Genkopienzahl			
Moroni et al. 2005	31	Klinische Studie	Eine erniedrigte EGFR-Genkopienzahl war signifikant mit einem Nichtansprechen nach Behandlung mit Cetuximab oder Panitumumab (mit oder ohne Chemotherapie) assoziiert.
Sartore-Bianchi et al. 2007	92	Klinische Studie	Eine erniedrigte EGFR-Genkopienzahl war signifikant mit einem Nichtansprechen und einem kürzeren PFS und OS nach Behandlung mit Panitumumab assoziiert.
Erniedrigte Expression von AREG und EREG			
Khambata-Ford et al. 2007	110	Klinische Studie	Eine verminderte Expression von AREG und EREG war signifikant mit einem Nichtansprechen und einem kürzeren PFS und OS nach der Behandlung mit Cetuximab verbunden.
Jacobs et al. 2009	220	Klinische Studie	Eine verminderte Expression von AREG und EREG war signifikant mit einem Nichtansprechen und einem kürzeren PFS und OS nach Behandlung mit Cetuximab plus Irinotecan assoziiert.
EGFR S492R Mutation			
Montagut et al. 2012	10	Präklinische und klinische Studie	Die erworbene EGFR-Ektodomänenmutation (S492R) verhindert die Bindung von Cetuximab und verleiht der menschlichen mKRK-Zelllinie DiFi eine Resistenz gegen Cetuximab. Zwei von zehn Personen mit mKRK und Krankheitsprogression nach Cetuximab-Behandlung erwarben die S492R-Mutation.

Referenz/Studie	Eingeschlossene Patienten in den Analysen, n	Studientyp	Genetische und histologische Aussage
RAS Mutation			
Allegra et al. 2009 (a)	-	Klinische Studie	KRAS-Exon-2-Mutationen (Kodon 12 und 13) waren bei mKRK-Patienten, die mit Cetuximab oder Panitumumab (mit oder ohne Chemotherapie) behandelt wurden, signifikant mit Nichtansprechen und kürzerem PFS und OS assoziiert.
Allegra et al. 2016 (b)	-	Klinische Studie	RAS-Mutationen in den Exons 2 (Kodons 12 und 13), 3 (Kodons 59 und 61) und 4 (Kodons 117 und 146) von KRAS und NRAS waren bei mit Cetuximab oder Panitumumab (mit oder ohne Chemotherapie) behandelten mKRK-Patienten mit nicht ansprechendem und kürzerem PFS und OS assoziiert.
BRAF V600E Mutation			
De Roock et al. 2010	1022	Klinische Studie	Die BRAF V600E-Mutation war signifikant mit einer niedrigen RR bei Patienten mit mKRK-assoziert, die mit Cetuximab plus Chemotherapie behandelt wurden.
Rowland et al. 2015	463	Metaanalyse	Die BRAF-Mutation war nach Behandlung mit Cetuximab oder Panitumumab (mit oder ohne Chemotherapie) signifikant mit kürzerem PFS und OS assoziiert.
PTEN-Verlust			
Sartore-Bianchi et al. 2009	110	Klinische Studie	Der PTEN-Verlust war bei Patienten mit mKRK-Patienten, die mit Panitumumab oder Cetuximab (mit oder ohne Chemotherapie) behandelt wurden, signifikant mit einem verkürzten RR, PFS und OS assoziiert.
Laurent-Puig et al. 2009	102	Klinische Studie	Die PTEN-Expression war bei Patienten mit mKRK, die mit Cetuximab plus Chemotherapie behandelt wurden, nicht signifikant mit RR, PFS oder OS assoziiert.

Referenz/Studie	Eingeschlossene Patienten in den Analysen, n	Studientyp	Genetische und histologische Aussage
Aktivierter IGF-1R			
Scartozzi et al. 2012	168	Klinische Studie	Eine erhöhte Expression von IGF-1 war nach Behandlung mit Cetuximab plus Irinotecan signifikant mit einem niedrigeren RR und kürzeren PFS und OS assoziiert.
HER2-Amplifikation			
Yonesaka et al. 2011	303	Präklinische und klinische Studie	Die HER2-Genamplifikation oder Überexpression des HER3/4-Liganden Heregulin war nach Behandlung mit Cetuximab (mit oder ohne Chemotherapie) signifikant mit einem niedrigeren RR und einem kürzeren PFS und OS assoziiert.
Bertotti et al. 2011	-	Präklinische Studie	Die HER2-Genamplifikation war spezifisch mit einem Nichtansprechen auf Cetuximab in von KRK-Patienten abgeleiteten Tumor-Xenotransplantaten verbunden.
EMT			
Buck et al. 2007	-	Präklinische Studie	Das Auftreten von EMT war mit einer Erlotinib-Resistenz in KRK-Zellen assoziiert.

Das unterschiedliche Ansprechen der von uns getesteten SW48-KRAS-wt-, KRAS-G12V-, KRAS-G12D- und KRAS-G13D-Zelllinien auf verschiedene Therapieansätze spiegelt modellhaft die Bedeutung wider, dass weitere prädiktive Marker mit wegweisender Relevanz für eine zielgerichtete Therapie bei KRAS-mutierten KRKs identifiziert werden müssen. Eine Möglichkeit einer besseren Vorhersage auf das Ansprechen einer anti-EGFR-Therapie präsentierte Chen et al. (2015) in einer Arbeit. Sie zeigten an einer Reihe definierter Allele für onkogene Mutationen, dass die Reaktion auf eine Cetuximab-Therapie in KRK-Xenotransplantaten in dieser besser vorherzusagen war als KRAS-Mutationen in Kodon 12 und 13.

5 Zusammenfassung

Die Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms erfolgt in Deutschland im Rahmen multimodaler Behandlungskonzepte. Die Grundlage der Therapie beinhaltet eine 5-FU-haltige neoadjuvante Radiochemotherapie mit anschließender onkologischer Tumorresektion und anschließender 5-FU haltigen Chemotherapie. Der Einsatz zielgerichteter Therapien wie anti-EGFR-Medikamente, VEGF-Inhibitoren oder Multikinaseinhibitoren bei Vorliegen gegebener Voraussetzungen wie Metastasierungsstatus und molekulargenetischer Untersuchungen haben für die Patienten eine Verbesserung der Prognose erreicht. Die Herausforderungen für weitere Therapieansätze sind in den letzten Jahren aufgrund der besser verstandenen Tumorbilogie weiter gewachsen. Die KRAS-Mutationstestung als prädiktiver Marker für den Einsatz einer anti-EGFR-Therapie ist nach vorherrschender Datenlage unverzichtbar. Hinweise aus mehreren Arbeiten deuten jedoch daraufhin, dass einzelne KRAS-Mutationen, insbesondere im Kodon 12 und 13 ein unterschiedliches Metastasierungsmuster und unterschiedliches Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie aufweisen. Unsere Arbeit zielte darauf ab, am Beispiel der KRK-Karzinomzelllinie SW48 das biologische Verhalten anhand von Proliferations-Migrations- und Invasionsassays und Western-Blot-Analysen zwischen dem KRAS-Wildtyp und den KRAS-Mutationen G12V, G12D und G13D zu untersuchen und diese anschließend einer kombinierten Radiochemotherapie unter Zusatz der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AEW541 zu unterziehen. Interessanterweise zeigte sich sowohl im Wachstumsverhalten als auch in der Expression wichtiger Komponenten (EGFR, ERK, IGF-1R, AKT) des MAPK- und des PI3K-Signalweges kein Unterschied zwischen der KRAS-Wildtyp- und den KRAS-mutierten Zelllinien. Im Migrations- und Invasionsverhalten als experimentelles Korrelat zur Tumordinfiltration bzw. Metastasierung zeigten die KRAS-mutierten Zelllinien allerdings ein signifikant aggressiveres Verhalten als der KRAS-Wildtyp. Die Zelllinie mit der KRAS-G12V-Mutation zeigte hier mit Abstand innerhalb der KRAS-Mutationen das aggressivste Verhalten. Entgegen der Vermutung zeigte sich isoliert auf eine gegen den EGFR und IGF-1R gerichtete Therapie und auf eine kombinierte Radiochemotherapie mit RTK-Inhibitoren ein signifikant gutes Ansprechen sowohl bei der KRAS-Wildtyp-Zelllinie als auch bei den KRAS-mutierten Zelllinien. Allerdings konnten wir innerhalb der KRAS-Mutationen signifikante Unterschiede auf das Ansprechen der Therapie feststellen. Tendenziell erwies sich in allen Therapiemodellen die Zelllinie mit der KRAS-Mutation G12D als signifikant resistenter, die Zelllinie mit der KRAS-Mutation G13D stellte sich insgesamt als signifikant sensitiver dar. Unsere Ergebnisse sind im Kontext mit der gegenwärtigen Literatur zu sehen, wonach KRAS beim KRK ein

weiterer kontrovers diskutierter Biomarker in Bezug auf eine anti-EGFR-Therapie ist. Insbesondere die KRAS-G13D-Mutation nimmt innerhalb aller KRAS-Mutationen aufgrund des sensitiveren Ansprechens in unseren Therapiemodellen und der besseren klinischen Prognose eine besondere Stellung ein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die KRAS-G13D-Mutation als negativ prädiktiver Marker für den Einsatz einer anti-EGFR-Therapie im Gegensatz zu neuen prädiktiven Markern in Zukunft einen eingeschränkteren Vorhersagewert haben wird. Durch die Ergänzung neuer prädiktiver Marker auf das Ansprechen einer anti-EGFR-Therapie könnte sich die Therapieentscheidung in der klinischen Praxis zum Vorteil der Patienten mit metastasiertem KRK und KRAS-Mutationen ändern.

6 Literaturverzeichnis

Ahmad T, Farnie G, Bundred NJ, Anderson NG (2004): The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279, 1713-1719

Alamo P, Gallardo A, Di Nicolantonio F, Pavón MA, Casanova I, Trias M, Manges MA, Lopez-Pousa A, Villaverde A, Vázquez E (2015): Higher metastatic efficiency of KRas G12V than KRas G13D in a colorectal cancer model. *FASEB J* 29, 464-476

Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL (2009): American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27, 2091-2096

Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, Schilsky RL (2016): Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: american society of clinical oncology provisional clinical opinion update 2015. *J Clin Oncol* 34, 179-185

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N et al. (2001): Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the „RASCAL II“ study. *Br J Cancer* 85, 692-696

Annunziata M, Granata R, Ghigo E (2011): The IGF system. *Acta Diabetol* 48, 1-9

Arkipov A, Shan Y, Das R, Endres NF, Eastwood MP, Wemmer DE, Kuriyan J, Shaw DE (2013): Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 152, 557-569

Bai B, Shan L, Xie B, Huang X, Mao W, Wang X, Wang D, Zhu D (2018): Mutations in KRAS codon 12 predict poor survival in Chinese patients with metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett* 15, 3161-3166

Baretton GB, Aust DE (2011): Neues von der Adenom-Karzinom-Sequenz. *Endo Heute* 24, 164-170

Baserga R (2000): The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 19, 5574-5581

Beets G, Sebag-Montefiore D, Andritsch E, Arnold D, Beishon M, Crul M, Dekker JW, Delgado Bolton R, Fléjou JF, Grisold W et al. (2017): ECCO Essential Requirements for Quality Cancer Care: Colorectal Cancer. A critical review. *Crit Rev Oncol Hematol* 110, 81-93

Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C (2011): A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1, 508-523

- Blaj C, Schmidt EV, Lamprecht S, Hermeking H, Jung A, Kirchner T, Horst D (2017): Oncogenic Effects of High MAPK Activity in Colorectal Cancer Mark Progenitor Cells and Persist Irrespective of RAS Mutations. *Cancer Research* 77, 1763-1774
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C et al. (2009): Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 663-671
- Bokemeyer C, van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I, Köhne CH (2012): Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer* 48, 1466-1475
- Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, Lenz HJ, Heinemann V, Klinkhardt U, Beier F, Duecker K, van Krieken JH, Tejpar S (2015): FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 51, 1243-1252
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D, Iwata KK, Gibson NW, Cagnoni P, Haley JD (2007): Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther* 6, 532-541
- Burgaud JL, Baserga R (1996): Intracellular transactivation of the insulin-like growth factor I receptor by an epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res* 223, 412-419
- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P (2016): ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol* 4, 53
- Campos FG, Figueiredo MN, Martinez CAR (2015): Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes. *World J Gastrointest Surg* 7, 25-32
- Cancer Genome Atlas Network (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337
- Carpenter G, Cohen S (1990): Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265, 7709-7712
- Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ (2002): Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res* 62, 200-207
- Chan AT, Giovannucci EL (2010): Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029-2043
- Chan DLH, Segelov E, Wong RS, Smith A, Herbertson RA, Li BT, Tebbutt N, Price T, Pavlakis N (2017): Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 6, CD007047

Chen D, Huang X, Cai J, Guo S, Qian W, Wery JP, Li QX (2015): A set of defined oncogenic mutation alleles seems to better predict the response to cetuximab in CRC patient-derived xenograft than KRAS 12/13 mutations. *Oncotarget* 6, 40815-40821

Citri A, Yarden Y (2006): EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505-516

Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, Marks C, Modjtahedi H (2006): Coexpression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 28, 329-35

Cunningham MP, Thomas H, Marks C, Green M, Fan Z, Modjtahedi H (2008): Co-targeting the EGFR and IGF-IR with anti-EGFR monoclonal antibody ICR62 and the IGF-IR tyrosine kinase inhibitor NVP-AEW541 in colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 33, 1107-1113

de Roock W, Claes B, Bernasconi D, de Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P (2010): Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11, 753-762

de Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H (2010): Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304, 1812-1820

DGVS (2019): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registriernummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> (abgerufen am 18.05.2020)

Dibble CC, Cantley LC (2015): Regulation of mTORC1 by PI3K Signaling. *Trends Cell Biol* 25, 545-555

Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, Graubard BI, Hollenbeck AR, Sinha R (2012): Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 118, 3636-3644

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369, 1023-1034

EMA (2013): EPAR summary for the public. Erbitux. EMA/13275/2014. Quelle: <https://www.ema.europa.eu> (abgerufen am 18.05.2020)

EMA (2018): An overview of Tarceva and why it is authorised in the EU. EMA 841615/2018. Quelle: <https://www.ema.europa.eu> (abgerufen am 18.05.2020)

EMA (2019): An overview of Vectibix and why it is authorised in the EU. EMA 457824/2019. Quelle: <https://www.ema.europa.eu> (abgerufen am 18.05.2020)

Fang JY, Richardson BC (2005): The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6, 322-327

Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6, 325-344

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A (1997): Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668

Fujita-Yamaguchi Y, LeBon TR, Tsubokawa M, Henzel W, Kathuria S, Koyal D, Ramachandran J (1986): Comparison of insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor purified from human placental membranes. *J Biol Chem* 261, 16727-16731

Fukushima T, Takenoshita S (2001): Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci* 47, 1-11

Gajate P, Sastre J, Bando I, Alonso T, Cillero L, Sanz J, Caldés T, Díaz-Rubio E (2012): Influence of KRAS p.G13D mutation in patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Clin Colorectal Cancer* 11, 291-296

García-Echeverría C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro H-G, Cozens R et al. (2004): In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5, 231-239

Grothey A, van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, CORRECT Study Group. (2013): Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 381, 303-312

Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V, Barbacid M (2003): Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111-120

Guo GF, Cai YC, Zhang B, Xu RH, Qiu HJ, Xia LP, Jiang WQ, Hu PL, Chen XX, Zhou FF, Wang F (2011): Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol* 28, 197-203

Hakam A, Yeatman TJ, Lu L, Mora L, Marcet G, Nicosia SV, Karl RC, Coppola D (1999): Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 30, 1128-1133

Hale LJ, Coward RJ (2013): Insulin signalling to the kidney in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 124, 351-370

Hata K, Yamamoto Y, Kiyomatsu T, Tanaka T, Kazama S, Nozawa H, Kawai K, Tanaka J, Nishikawa T, Otani K et al. (2015): Hereditary gastrointestinal cancer. *Surg Today* 46, 1115-1122

Hawkes C and Kar S (2004): The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res.* 44, 117-140

Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M (2013): Targeted therapy in metastatic colorectal cancer – An example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev* 39, 592-601

Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmüller C, Kahl C, Seipelt G (2014): FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15, 1065-1075

Herbst RS, Shin DM (2002): Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 94, 1593-1611

Hopfner M, Sutter AP, Huether A, Baradari V, Scherubl H. (2006): Tyrosine kinase of insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 12, 5635-5643

Hu YP, Patil SB, Panasiwicz M, Li W, Hauser J, Humphrey LE, Brattain MG (2008): Heterogeneity of receptor function in colon carcinoma cells determined by cross-talk between type I insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 68, 8004-8013

Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Haigis KM, Fuchs CS, Ogino S (2012): Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin. Cancer Res* 18, 4753-4763

Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuws S, Vandesompele J, Peeters M, van Laethem JL (2009): Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 27, 5068-5074

Kaulfuß S, Burfeind P, Gaedcke J, Scharf JG (2009): Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 8, 821-833

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK (2007): Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25, 3230-3237

Keating GM (2016): Afatinib: A Review in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Target Oncol* 11, 825-835

Kiyokawa E, Minato H (2014): Activated K-RAS and its effect on morphological appearance. *J Biochem* 156, 137-145

Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL (2009): Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74, 673-688

Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lièvre A, Landi B, Boige V (2009): Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 27, 5924-5930

Lee S, Heinrich EL, Lu J, Lee W, Choi AH, Luu C, Chung V, Fakih M, Kim J (2016): Epidermal Growth Factor Receptor Signaling to the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway Bypasses Ras in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* 45, 286-292

Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P (2009): Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* 8, 705-711

Leiphrakpam PD, Agarwal E, Mathiesen M, Haferbier KL, Brattain MG, Chowdhury S (2014): In vivo analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. *Oncol Rep* 31, 87-94

Liang YH, Lin YL, Liao JY, Tsai JH, Liang JT, Lin BR, Hung JS, Tseng LH, Lin LI, Chang YL (2015): Cetuximab Might Be Detrimental to Metastatic Colorectal Cancer Patients with KRAS Codon 12 Mutations. *Anticancer Res* 35, 4207-4214

Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C (2008): KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26, 374-379

Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z (2007): Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res* 67, 8240-8247

Lu Y, Jingyan G, Baorong S, Peng J, Xu Y, Cai S (2012): Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 11, 219-226

Maris C, D'Haene N, Trépant A-L, Le Mercier M, Sauvage S, Allard J, Rorive S, Demetter P, Decaestecker C, Salmon I (2015): IGF-IR: a new prognostic biomarker for human glioblastoma. *Br J Cancer* 113, 729-737

Marshall CJ (1991): How does p21ras transform cells? *Trends Genet* 7, 91-95

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ (2017): A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18, 197

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004): Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 903-913

Messner I, Cadeddu G, Huckenbeck W, Knowles HJ, Gabbert HE, Baldus SE, Schaefer KL (2013): KRAS p.G13D mutations are associated with sensitivity to anti-EGFR antibody treatment in colorectal cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 139, 201-209

Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewich-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, Stintzing S, Graeven U, Arnold D, von Weikersthal LF et al. (2016): Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 27, 1746-1753

Modest DP, Stintzing S, Laubender RP, Neumann J, Jung A, Giessen C, Haas M, Aubele P, Schulz C, Boeck S (2011): Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status. *Anticancer Drugs* 22, 913-918

Moon B-S, Jeong W-J, Park J, Kim TI, Min DS, Choi K-Y (2014): Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *J Natl Cancer Inst*, 106, 373

Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP (2012): Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 18, 221-223

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

Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A (2005): Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6, 279-286

Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-2270

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D, National Cancer Institute Expert Panel (2001): Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 93, 583-596

Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A (2009): Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 205, 858-62

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001): EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37, 9-15

Oberthür R, Seemann H, Gehrig J, Rave-Fränk M, Bremmer F, Halpape R, Conradi LC, Scharf JG, Burfeind P, Kaulfuß S (2017): Simultaneous inhibition of IGF1R and EGFR enhances the efficacy of standard treatment for colorectal cancer by the impairment of DNA repair and the induction of cell death. *Cancer Lett* 407, 93-105

Osumi H, Shinozaki E, Osako M, Kawazoe Y, Oba M, Misaka T, Goto T, Kamo H, Suenaga M, Kumekawa Y (2015): Cetuximab treatment for metastatic colorectal cancer with KRAS p.G13D mutations improves progression-free survival. *Mol Clin Oncol* 3, 1053-1057

Piao W, Wang Y, Adachi Y, Yamamoto H, Li R, Imsumran A, Li H, Maehata T, Ii M, Arimura Y et al. (2008): Insulin-like growth factor-I receptor blockade by a specific tyrosine kinase inhibitor for human gastrointestinal carcinomas. *Mol Cancer Ther* 7, 1483-1493

Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, Cabiddu M, Iacovelli R, Bossi I, Lonati V (2015): Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 51, 587-594

Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SH, Sternberg SS, Enker WE (1984): Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer. *Cancer* 53, 1354-1362

Rachagani S, Senapati S, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Kumar S, Smith LM, Jain M, Batra SK (2011): Activated KrasG12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. *Br J Cancer* 104, 1038-1048

Renaud S, Falcoz PE, Schaëffer M, Guenot D, Romain B, Olland A, Reeb J, Santelmo N, Chenard MP, Legrain M (2015): Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. *Br J Cancer* 113, 1206-1215

RKI (Robert-Koch-Institut) (Hrsg.): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Berlin, 2016, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am 19.05.2019)

RKI (Robert-Koch-Institut) (Hrsg.): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Berlin, 2016, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Grafiken_Online/2_3_o2.png?__blob=publicationFile (abgerufen am 11.11.2020)

Roskoski R (2014): The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 79, 34-74

Roudabush FL, Pierce KL, Maudsley S, Khan KD, Luttrell LM (2000): Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *J Biol Chem* 275, 22583-22589

Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Soric MJ (2015): Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 112, 1888-1894

Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Soric MJ (2016): Meta-analysis comparing the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibody therapy between KRAS G13D and other KRAS mutant metastatic colorectal cancer tumours. *Eur J Cancer* 55, 122-130

Rubin I, Yarden Y (2001): The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12, 3-8

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007): The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28, 20-47

Sambrook J, Fritsch EF, Mariatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S. 1989

Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, de Dosso S, Mazzucchelli L (2009): PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 69, 1851-1857

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G (2007): Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25, 3238-3245

Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2004): Involvement of 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 in the MEK/MAPK Signal Transduction Pathway. *J Biol Chem* 279, 33759-33767

Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, Mandolesi A, Giustini L, Silva R, Zaniboni A, Biscotti T, Biagetti S, Galizia E (2012): Analysis of HER-3, insulin growth factor-1, nuclear factor-kB and epidermal growth factor receptor gene copy number in the prediction of clinical outcome for K-RAS wild-type colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. *Ann Oncol* 23, 1706-1712

Schanzer JM, Wartha K, Moessner E, Hosse RJ, Moser S, Croasdale R, Trochanowska H, Shao C, Wang P, Shi L (2016): XGFR*, a novel affinity-matured bispecific antibody targeting IGF-1R and EGFR with combined signaling inhibition and enhanced immune activation for the treatment of pancreatic cancer. *MAbs* 8, 811-827

Sforza V, Martinelli E, Ciardiello F, Gambardella V, Napolitano S, Martini G, Corte C, Cardone C, Ferrara ML, Reginelli A (2016): Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22, 6345-6361

Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN (1994): Dysregulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Premalignant Lesions during Head and Neck Tumorigenesis. *Cancer Res* 54, 3153-3159

Siddle K, Ursø B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, Soos MA (2001): Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 29, 513-525

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2017): Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67, 7-30

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: UICC, TNM, Classification of Malignant Tumours. 7. Auflage, Wiley-Blackwell, West Sussex, U.K. 2009, 1-336

Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J et al. (2008): EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 2311-2319

Soreide O, Norstein J, Fielding LP, Silen W (1997): International Standardization and Documentation of the Treatment of Rectal Cancer. In: Soreide O, Norstein J (Hrsg.) Rectal Cancer Surgery. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 405-445

Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS (2015): Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 26, 13-21

Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007): Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308

Schütte M, Risch T, Abdavi-Azar N, Boehnke K, Schumacher D, Keil M, Yildiriman R, Jandrasits C, Borodina T, Amstislavskiy V (2017): Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat Commun* 8, 14262

Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, Yu H, Oliner KS (2014): PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 32, 2240-2247

Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, van Cutsem E (2012): Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 30, 3570-3577

Thrumurthy SG, Thrumurthy SSD, Gilbert CE, Ross P, Haji A (2016): Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *BMJ* 354, i3590

Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J (2011): Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117, 4623-4632

Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ (2014): Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer* 120, 35-42

Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, Mercer KL, Grochow R, Hock H, Crowley D (2004): Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5, 375-387

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E (1986): Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5, 2503-2512

Vagefi PA, Longo WE (2005): Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Colorectal Cancer* 4, 313-319

van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S (2011): Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29, 2011-2019

van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, van Laethem JL, Maurel J, Richardson G et al. (2007): Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25, 1658-1664

van der Veeken J, Oliveira S, Schifflers RM, Storm G, van Bergen En Henegouwen PMP, Roovers RC (2009): Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets* 9, 748-760

Vartanian S, Bentley C, Brauer MJ, Li L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kim J-S, Haverty P, Stawiski E, Modrusan Z (2013): Identification of Mutant K-Ras-dependent Phenotypes Using a Panel of Isogenic Cell Lines. *J Biol Chem* 288, 2403-2413

Wee P, Wang Z (2017): Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 9, E52

Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA (2001): Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Ann Surg Oncol* 8, 319-327

Xue M, Cao X, Zhong Y, Kuang D, Liu X, Zhao Z, Li H (2012): Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) kinase inhibitors in cancer therapy: advances and perspectives, *Curr Pharm Des* 18, 2901-2913

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001): Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137

Yeaman TJ (2004): A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4, 470-480

Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A (2013): Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 34, 8690-8707

Yoon S, Seger R (2006): The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44

Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, Ercan D, Rogers A, Roncalli M, Takeda M (2011): Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 3, 99ra86

Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, Katsanos KH, Christodoulou DK, Pentheroudakisa G (2017): Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* 30, 613-621

Zhang H, Yee D (2004): The therapeutic potential of agents targeting the type I insulin-like growth factor receptor. *Expert Opin Investig Drugs* 13, 1569-1577

Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, Yu Q, Yuan X (2017): Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 3980-4000
