

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. Guido Sauter

## **Intratumorale Homogenität von *KRAS* Mutationen des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Winfried Henning Alsdorf,

aus Buchholz in der Nordheide.

**Hamburg 2012**

***Meiner Frau***  
***Meiner Familie***

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.06.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Ronald Simon**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Walter Fiedler**

**Datum der mündlichen Prüfung: 10.06.2013**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Bronchialkarzinom.....	3
1.2 Ätiologie und Pathogenese des Bronchialkarzinoms.....	3
1.3 Mechanismen der Karzinogenese.....	9
1.4 Bedeutung und Funktion des <i>KRAS</i> Onkogens.....	11
1.5 Klassifikation und Therapie des Bronchialkarzinoms.....	15
1.5.1 Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	21
1.5.2 Staging des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	23
1.5.3 Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.....	26
1.6 Molekular zielgerichtete Therapie.....	27
1.6.1 Tyrosinkinaserzeptoren der HER-Familie.....	28
1.6.2 Anti-EGFR-Therapie.....	30
1.6.3 <i>KRAS</i> als prädiktiver Marker.....	32
<b>2 Hypothese und Fragestellung</b> .....	<b>33</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
3.1 Patientenkollektiv.....	38
3.2 Gewebeentnahme ..	40
3.3 DNA Extraktion.....	42
3.4 PCR.....	43
3.5 Sequenzierung von <i>KRAS</i> Exon 2 ..	46
3.6 Validierungsstudie.....	48
3.6.1 Lasergestützte Mikrodissektion.....	50
3.6.2 Real-Time-PCR.....	51
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
4.1 Mutationsanalyse.....	55
4.2 Mutationspektrum.....	57
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>72</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>8 Danksagung</b> .....	<b>88</b>
<b>9 Lebenslauf</b> .....	<b>89</b>
<b>10 Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAH	Atypische adenomatöse Hyperplasie
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADCA	Adenokarzinom
ALK	Anaplastische Lymphom Kinase
ARMS	amplification refractory mutation system
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
COSMIC	catalogue of somatic mutations in cancer
C	Cytosin
Ct	Cycle threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EML	echinoderm microtubulus associated protein like
ERK	extracellular signal regulated kinases
G	Guanin
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guaninnucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HER	Human epidermal growth factor receptor
IARC	International Agency on Research of Cancer
kD	Kilodalton
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCLC	large cell lung cancer
MAP	Mitogen aktivierte Protein-(Kinase)
MEK	MAP-Kinase/ERK-Kinase
µL	Mikroliter
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
nm	Nanometer

NNK	nicotine derived nitrosamine keton
NNN	N-Nitrosonor nicotine
PCR	polymerase chain reaction
PI3KCA	Phosphatidylinositol-3-Kinase catalytic subunit alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PTHrp	parathyroid hormone related peptide
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RAF	rat fibrosarcoma
RFLP	Restriktionsfragmentslängenpolymorphismus
SIADH	syndrom of inappropriate ADH secretion
SOS	son of sevenless
SQLC	squamous cell lung cancer
T	Thymin
TGF	Transforming growth factor
TNM	Tumor Nodus Metastasis Klassifikation
TP 53	Tumor protein p53
TTF	thyroid transcription factor
UICC	Union internationale contre cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom ist eine sehr häufig auftretende und häufig zum Tode führende maligne Erkrankung. Die jährliche Inzidenz in Deutschland beträgt etwa 50/100.000 Personen. Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen (Robert-Koch Institut 2010). Weltweit ist das Bronchialkarzinom die häufigste zum Tode führende Tumorerkrankung. Jährlich erkranken 1,6 Millionen Menschen auf der Welt an einem Lungenkarzinom (Ferlay et al. 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Durchschnitt (alle Tumorstadien) bei ungefähr 15% (Herbst et al. 2008), somit sterben jährlich über eine Million Menschen auf der Welt durch eine Lungenkrebserkrankung. Im Vergleich zu anderen häufig auftretenden Krebserkrankungen wie Tumoren der Mamma, Prostata oder colorektalen Karzinomen ist die Prognose des Lungenkarzinoms deutlich ungünstiger. Angesichts dieser Tatsachen ist eine Verbesserung der derzeitig etablierten Behandlungsmöglichkeiten durch neue Therapieoptionen dringend notwendig.

Die hohe Anzahl an Neuerkrankungen ist auf den weit verbreiteten inhalativen Noxenabusus zurückzuführen: etwa 90% aller Bronchialkarzinome entstehen nach langjähriger Cancerogenexposition durch das Rauchen von Zigaretten. Hierbei steigt das Risiko einer Tumorerkrankung dosisabhängig mit Dauer der Exposition und Zahl der konsumierten Zigaretten an.

Etwa 15% aller langjährigen Raucher entwickeln ein Bronchialkarzinom. Aufgrund des zunehmenden Nikotinkonsums steigt daher die Neuerkrankungsrate bei Frauen derzeit an, während die der Männer in Folge ihres abnehmenden Konsums langsam abfällt. Eine Vermeidung des inhalativen Nikotinabusus stellt somit die wirksamste Maßnahme zur Senkung der Inzidenz und Mortalität des Bronchialkarzinoms dar.

Im Tabakrauch wurden bisher mehr als 70 cancerogen wirkende Substanzen beschrieben (IARC 2004). Zu diesen zählen polycyclische Kohlenwasserstoffe, Benzo(a)pyren, die Nitrosamine NNK und NNN und das radioaktive Polonium 210. Zudem werden mit einem Zigarettenzug  $10^{13}$  freie Radikale inhaliert, die ebenfalls mutagen und damit cancerogen wirken. Der Konsum von Zigaretten führt zu einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit für Tumoren verschiedener Organe, wie bei-

spielsweise für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, Karzinome der Lunge sowie der Harnblase (Demarini 2004).

Der spezifische Einfluß von cancerogenen Substanzen auf die Entstehung des Bronchialkarzinoms ist auf genetischer Ebene feststellbar. Es zeigt sich, dass Tumoren von Rauchern häufig andere genetische Veränderungen aufweisen als solche von Nichtrauchern. (Riely et al. 2008).

Dies resultiert auch in dem bevorzugten Auftreten bestimmter Subtypen des Bronchialkarzinoms bei entsprechender Cancerogeneinwirkung.

Neben den Inhaltsstoffen des Tabakrauchs sind weitere Cancerogene wie Radon, Asbest, Arsen, Nickel oder Chrom(VI)-Verbindungen nur für einen im Vergleich geringen Anteil der neu auftretenden Lungenkarzinome mitverantwortlich. Diese Noxen besitzen jedoch einen synergistischen, potenzierenden Effekt, wenn sie zur Tabakexposition hinzukommen und können daher das Erkrankungsrisiko drastisch erhöhen. So ist die Wahrscheinlichkeit für einen Nichtraucher nach Asbestexposition an einem Bronchialkarzinom zu erkranken um ca. den Faktor 5 erhöht. Für einen Raucher bedeutet eine Asbestbelastung jedoch eine 55-fache Risikoerhöhung im Vergleich zu Nichtrauchern ohne Asbestexposition. Oftmals sind die zuvor aufgeführten Stoffe im Zuge einer beruflichen Exposition ein Grund für ein erhöhtes Auftreten von Lungentumoren bei Bergarbeitern und anderen exponierten Berufsgruppen. Darüberhinaus kann es auch zur malignen Entartung vernarbter Lungenabschnitte kommen, welche zuvor durch eine Tuberkulose, Pneumokoniose oder Lungenembolie geschädigt wurden. Bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen wird in einigen Fällen eine pathogenetische Bedeutung von humanen Papilloma-Viren vermutet (Guliani et al. 2007).

Die schlechte Prognose des Bronchialkarzinoms liegt begründet in den meist unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten. Diese resultieren häufig aus der Tatsache, dass diese Tumorerkrankung aufgrund fehlender Frühsymptome meist erst bei bereits ausgedehntem Fortschreiten der Erkrankung diagnostiziert wird. Dann ist in vielen Fällen eine potentiell kurative Operation nicht mehr möglich und es liegt zudem bereits oft eine Fernmetastasierung vor.

Es mangelt darüberhinaus an geeigneten Methoden der Früherkennung; Tumoren in einem frühen Stadium werden bisweilen lediglich zufällig als Rundherd auf Röntgen-

übersichtsaufnahmen des Thorax im Rahmen anderer Fragestellungen erkannt. Wird die Erkrankung in einem frühen Stadium hierdurch diagnostiziert, besteht bei Operabilität eine kurative Perspektive. Es sind auch keine geeigneten Tumormarker oder Screeningverfahren zur Früherkennung etabliert. Diskutiert wird ein Screening von Risikopatienten mittels thorakaler Computertomographie (The National Lung Screening Trial Research Team 2011).

Spätsymptome eines Bronchialkarzinoms sind chronischer trockener Husten, Hämoptysen, Dysphagie, Heiserkeit bei Infiltration des Nervus laryngeus recurrens, Dyspnoe bei neu aufgetretenem Pleuraerguss oder einseitiger Zwerchfellhochstand durch Läsion des Nervus Phrenicus. Bei fortgeschrittener Erkrankung zudem Stauungszeichen bis hin zur oberen Einflusstauung bei Affektion der Vena Cava superior, Thoraxschmerz, sowie Zeichen der systemischen Tumorerkrankung wie Leistungsminderung, Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust (Spiro et al. 2001, Beckles et al. 2003). Ebenso kann ein bronchusobstruierendes zentral wachsendes Bronchialkarzinom Ursache rezidivierender poststenotischer Pneumonien sein.

Im Stadium der metastasierten Erkrankung können Knochenschmerzen, Zeichen einer Leberfunktionseinschränkung oder neurologische Symptome auftreten. Bei einem Pancoast Tumor der Pleuraspitze besteht die Symptomatik häufig aus Schulter- und Armschmerzen, Lähmungen des Armes und der Hand bei Schädigung des Plexus Brachialis und einem Horner-Syndrom mit Miosis, Ptosis und Enophthalmus durch Tumordinfiltration des sympathischen Grenzstrangs. Alle diese genannten Symptome sind bisweilen unspezifisch, sodass zwischen deren Manifestation und Diagnose eines Bronchialkarzinoms weitere Zeit durch Fehldiagnosen (z.B: „Schulter-Arm-Syndrom“, „chronische Bronchitis“) verloren gehen kann.

Zusätzlich können paraneoplastische Syndrome auf ein Lungenkarzinom hinweisen. Diese Erkrankungen werden durch Hormone, Cytokine oder andere Mediatoren verursacht, die durch den Tumor produziert werden oder durch Antikörper, die aufgrund der körpereigenen Immunantwort auf den Tumor entstehen können.

Diese paraneoplastischen Veränderungen treten vor allem bei neuroendokrinen Tumoren auf (meist kleinzellige Bronchialkarzinome), die in der Lage sind, verschiedene Hormone oder Peptide zu sezernieren. Hierzu gehört die ektope ACTH-Produktion, in deren Folge ein Hypercortisolismus und damit ein Morbus Cushing manifest werden kann. Ebenso kann eine übermäßige Freisetzung des antidiuretischen Hormons

durch die Tumorzellen stattfinden, die ein Syndrom der inadäquaten Sekretion des antidiuretischen Syndroms (SIADH) auslöst.

Hierdurch kommt es zur gesteigerten Wasserretention mit konsekutiver hyponatriämischer Hyperhydratation und Bewußtsteinseintrübung durch die Hyponatriämie, charakteristischerweise aber zu keiner Ödembildung. Häufig tritt auch eine Hypercalciämie durch Sekretion von Parathormon ähnlichem Peptid (PTHrP) mit entsprechenden neurologischen Symptomen auf.

Neben diesen endokrinen Manifestationen sind auch neurologische Erkrankungen wie das Lambert-Eaton Syndrom und andere Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems bei Bronchialkarzinomen aufgrund einer Expressierung onkoneuraler Antigene durch die Tumorzellen feststellbar (Graus et al. 1985)

Überdies können paraneoplastisch auch hämatologische und dermatologische Symptome verursacht werden.

Aufgrund dieser Vielzahl möglicher Erkrankungsmanifestationen sind diese paraneoplastischen Syndrome meist nicht spezifisch genug, um sofort eine Erkennung des zugrunde liegenden Tumorleidens zu ermöglichen.

Durch das indolente Wachstum eines primären Lungenkarzinoms und die ausgeprägte Neigung zur Metastasierung sind oft Beschwerden, die durch die Absiedelung des Tumors in andere Organe entstehen, die ersten, welche auf diese Erkrankung hinweisen. In diesen Fällen existieren bislang nur unzureichende Therapieoptionen und das 5-Jahres-Überleben liegt im Stadium der metastasierten Erkrankung bei 5%. Jegliche Therapieansätze sind daher palliativer Natur.

Bevorzugte Metastasierungsorte des Bronchialkarzinoms sind die regionären Lymphknotenstationen, die Leber, das Skelettsystem, die Nebennieren und das zentrale Nervensystem.

## **1.2 Ätiologie und Pathogenese des Bronchialkarzinoms**

Das Bronchialkarzinom ist wie alle anderen malignen Tumoren eine Erkrankung des Genoms, bei der durch den Einfluß exogener Noxen und endogener, zum Teil spontan ablaufender Prozesse, eine Akkumulation von Mutationen der genomischen DNA sowie chromosomalen Veränderungen stattfinden, durch welche Zellen mit malignem Wachstumsverhalten entstehen. Diese sind durch die Eigenschaften Metastasierungsfähigkeit und Gewebsinvasion, Apoptoseresistenz, unabhängiges, selbststimu-

liertes Wachstum, unbegrenzte Teilungsfähigkeit und verstärkte Angiogenese gekennzeichnet (Hanahan und Weinberg 2000).

Hinsichtlich der auslösenden Noxen wird zwischen chemischen (polycyclischen Kohlenwasserstoffen, elektrophilen DNA bindende Substanzen), biologischen (Toxinen wie beispielweise dem Aflatoxin, verschiedenen Viren) und physikalischen Cancern (ionisierender oder nichtionisierender energiereicher Strahlung) unterschieden. Durch diese exogenen Einflüsse und durch spontane endogene Modifikationen der Molekülstruktur der DNA und Replikationsfehler der DNA Polymerase können chromosomale Aberrationen und DNA Mutationen entstehen.

Hierbei kommt es durch Genamplifikationen, Translokationen sowie Deletionen oder Mutationen der DNA zur verstärkten Aktivität oder Exprimierung von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren („gain of function“). Die durch diese Alterationen veränderten Gene werden als Onkogene bezeichnet, ihre physiologisch in nicht neoplastischen Zellen vorhandenen Äquivalente als Proto-Onkogene.

Die veränderten oder verstärkten Funktionen der Onkogene sind verantwortlich für Tumorwachstum, abnorm erhöhte Zellteilungsrate, Apoptoseresistenz, verstärkte Angiogenese und die Fähigkeit zur lokalen Invasion und Metastasierung. Beispiele für die in Bronchialkarzinomen relevanten Onkogene sind *MYC* und *KRAS*.

*MYC* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen verstärkt, welche für die Zellproliferation essentielle Proteine kodieren. Die Transkription von ungefähr 15% aller menschlichen Gene wird direkt oder indirekt durch *MYC* reguliert (Gearhart et al. 2007).

Onkogen amplifiziertes *MYC* ist häufig beim kleinzelligen Bronchialkarzinom nachweisbar (Takahashi et al. 1989). *KRAS* Mutationen finden sich in ca. 20-30% aller nichtkleinzelligen Tumoren, fast ausschließlich bei Adenokarzinomen (Bos 1989, Rodenhuis und Slebos 1992, Ding et al. 2008). *KRAS* Mutationen kleinzelliger Karzinome stellen hingegen eine Rarität dar (Mitsudomi et al. 1991).

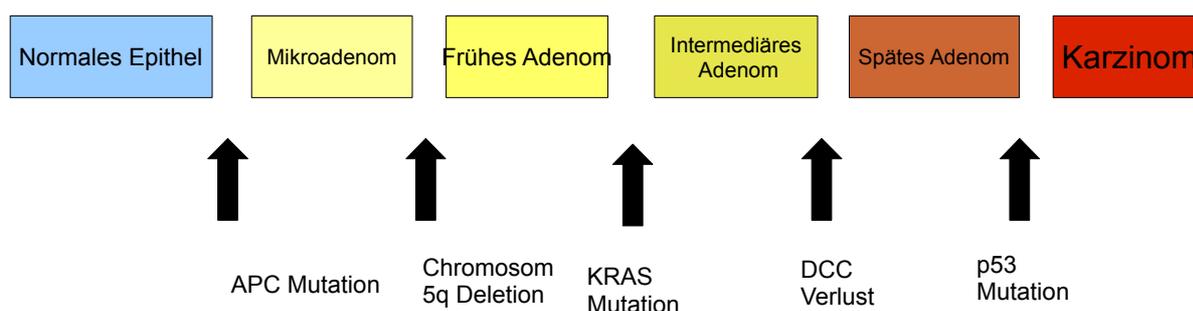
Diese je nach histologischem Differenzierungstyp unterschiedlichen genetischen Veränderungen bedingen verschiedene tumorbiologische Eigenschaften.

Neben der Überaktivität der Onkogene findet sich in Neoplasien ein Funktionsverlust anderer Gene durch chromosomale Deletionen und inaktivierende "loss of function" Mutationen. Die betroffenen Gene sind im Allgemeinen an der DNA Reparatur sowie der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Tumorsuppressorgene wie *TP53* oder das Retinoblastomgen *Rb* sind entschei-

dende Regulatoren bei der Kontrolle des Zellwachstums, der Progression des Zellzyklus und der Bewältigung und Reparatur von DNA Schädigungen. Bei schweren, irreparablen DNA Veränderungen kann p53 die Apoptose induzieren oder durch Zellzyklusarrest weitere Teilungen verhindern. Durch den Verlust derartiger Kontrollgene werden Zellen mit erworbenen DNA Mutationen nicht apoptotisch und der Zellzyklus nicht reguliert, so dass eine Proliferation trotz vorliegender DNA Schädigungen möglich ist. Durch diese Veränderungen sind derartige Zellen in der Lage, einen malignen Genotyp durch Akkumulation von DNA Mutationen und chromosomale Veränderungen zu erwerben.

Im Allgemeinen sind Mutationen und genomische Veränderungen in mehreren relevanten Genen und Chromosomen erforderlich, damit aus einem Zellklon mit diesen Veränderungen ein maligner Tumor entsteht. Mit zunehmender Anzahl genetischer Veränderungen nimmt auch das maligne Potential der betroffenen Zellen zu.

Für das colorektale Karzinom konnte durch die Entdeckung der Adenom-Karzinom-Sequenz gezeigt werden, dass in einer bestimmten zeitlichen Abfolge spezifische Mutationen in für die Tumorentstehung entscheidenden Genen stattfinden, durch deren Akkumulation in den betroffenen Zellen zunehmend schwerere phänotypische Veränderungen stattfinden (Fearon und Vogelstein 1990). Der Prozess von Entstehung eines Adenoms über Entwicklung einer Dysplasie hin zu einem invasiven Karzinom ist in den verschiedenen Entwicklungsstufen jeweils mit dem Neuauftreten bestimmter genetischer Veränderungen assoziiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Modell der Karzinogenese des sporadischen colorektalen Karzinoms auf Grundlage der Adenom-Karzinom-Sequenz. (Nach Moran et al. 2010, Fearon und Vogelstein 1990).

Für das Bronchialkarzinom ist eine derartige genaue chronologische Erfassung der Carcinogenese bisher nicht erfolgt. Es kann aber angenommen werden, dass den verschiedenen histologischen Subtypen unterschiedliche Mechanismen und genotypische Korrelate der Tumorentstehung zugrunde liegen. So sind jeweils verschiedene

chromosomale Veränderungen für die unterschiedlichen Phänotypen des Bronchialkarzinoms beschrieben worden (Petersen et al. 1997, Sanchez-Cespedes et al. 2001).

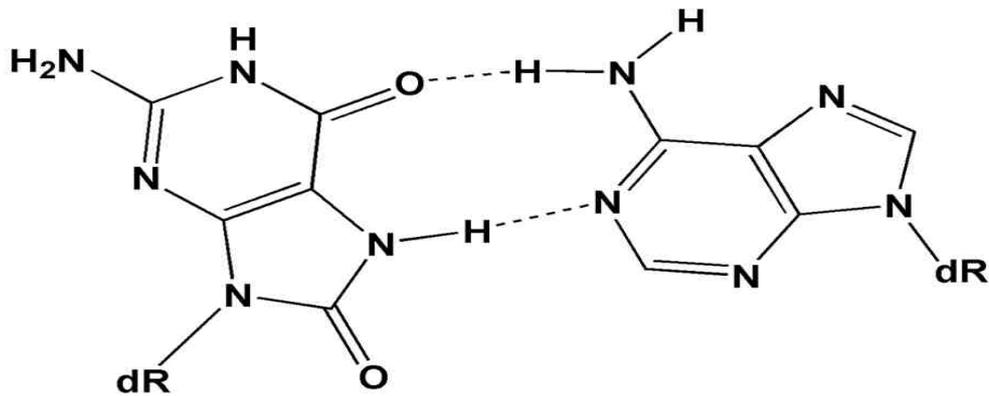
### 1.3 Mechanismen der Karzinogenese

Umfangreiche Untersuchungen zeigen, dass Cancerogene des Tabakrauchs Punktmutationen in *TP53* oder *KRAS* induzieren können (Gealy et al. 1999, Ahrend et al. 2001, Le Calvez et al. 2005, Hecht 2008).

Hierbei handelt es sich um Substitutionsmutationen, bei denen eine kodierende Base durch eine andere ersetzt wird. Dies kann zu einer Veränderung des Codons führen, wodurch es bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch und somit zu einer strukturellen Veränderung des kodierten Proteins kommt. Durch diese sogenannte Missense-Mutation können sich aufgrund der anderen biochemischen Eigenschaften der neu eingebauten Aminosäure die Interaktionscharakteristika des gesamten Proteins oder einer für seine Funktion essentiellen Domäne verändern. Diese Mutationen führen im Falle von *TP53* zu einem Verlust der Fähigkeit zur DNA Interaktion von p53 und damit einem Wegfall seiner regulatorischen Funktion und im Falle von *KRAS* zu einer konstitutiven Aktivierung des *KRAS* Onkogens.

Mutationsanalysen zeigen in der Mehrzahl der Bronchialkarzinome einen Basenaustausch von Guanin zu Thymin, der als G zu T Transversion (Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase) bezeichnet wird. Bei Nichtrauchern treten hingegen häufiger G zu A Transitionen (Austausch von Purinbasen bzw. Pyrimidinbasen untereinander) auf. Dieser Unterschied wird auf die chemischen Eigenschaften der Cancerogene des Tabakrauchs zurückgeführt. Sie induzieren eine Reaktion von Guanin zu 8-Oxo-Guanin (Abbildung 2). Dieses DNA Addukt entsteht bevorzugt durch die im Zigarettenrauch in hoher Konzentration nachweisbaren polycyclischen Kohlenwasserstoffe und freien Sauerstoffradikale. Wird diese veränderte Base nicht durch das Enzym 8-Oxo-Guanin DNA Glycolyase entfernt, findet eine Basenfehlpaarung statt und es erfolgt damit zu einem Austausch zu Thymin (Grollman et al. 1993).

Andere Cancerogene und spontane Modifizierungen der DNA führen zur Bildung von O<sup>6</sup>-Methyl-Desoxyguanosin. Diese DNA Veränderung ist dann Vorstufe einer Transitionsmutation zu Adenin (Hecht 2008).



**Abbildung 2:** Basenfehlpaarung von Oxoguanin (links) mit Adenin (rechts). Aus dieser Veränderung resultiert eine G-T Transversionsmutation. Diese treten häufig bei Bronchialkarzinomen auf (Sheila et al. 2007).

Damit ist das Muster der DNA Mutation charakteristisch für die Wirkung bestimmter Cancerogene. Insgesamt sind *KRAS* und *TP53* Mutationen häufiger in Tumoren von Rauchern zu finden. Diese zeigen häufig die oben genannten, spezifischen DNA-Veränderungen und die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens korreliert mit dem Ausmaß der Cancerogenexposition (Westra et al. 1993, Ahrendt et al. 2001, Pfeifer et al. 2002, Lea et al. 2007, Riely et al. 2008).

Die Bedeutung der im Tabakrauch enthaltenen Cancerogene als entscheidende pathogenetische Faktoren bei der Entstehung der Mehrzahl der Lungenkarzinome zeigt sich auch im erhöhten Erkrankungsrisiko bei Personen, die aufgrund von genetischen Polymorphismen eine verstärkte Aktivierung procancerogener Substanzen oder einen verzögerten Abbau cancerogener Metabolite exogener Noxen besitzen. (Wu et al. 2004, Sörensen et al. 2004).

## 1.4 Bedeutung und Funktion des *KRAS* Onkogens

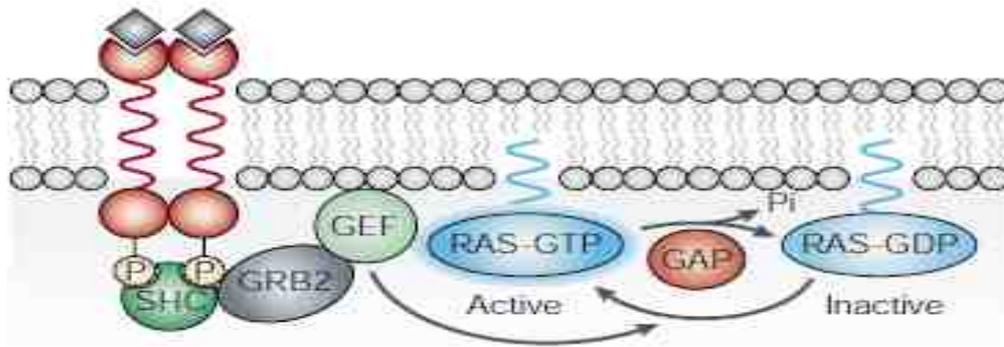
Ungefähr 20-40% aller nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome weisen aktivierende Punktmutationen im Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog auf, welches abgekürzt als *KRAS* bezeichnet wird (Bos 1989). Es gehört zu einer Genfamilie homologer Gene, zu denen die Isoformen *HRAS*, *NRAS* und *KRAS* gezählt werden. *HRAS* und *KRAS* sind nach ihren Entdeckern (Harvey 1964, Kirsten 1967) und den beobachteten Knochentumoren bei Ratten benannt worden. *NRAS* wurde erstmal aus einer Neuroblastomzelllinie isoliert. Je nach Gewebetyp werden die *RAS* Gene unterschiedlich stark exprimiert.

*HRAS* und *KRAS* wurden zunächst in murinen Tumorstämmen entdeckt. Erst später wurde erkannt, dass diese retroviralen Gene mutierten Analoga zelleigener menschlicher Gene entsprechen (Wong-Staal et al. 1981, Der et al 1982).

Die *RAS* Onkogene gehören zu den am häufigsten mutierten menschlichen Onkogenen. Mutationen im *KRAS* Gen können häufig bei Tumoren des Pankreas (ca. 90%), des Colons und Rektums (ca. 50%), der Lunge (bis zu 40%) der Schilddrüse und anderer Organe nachgewiesen werden. *NRAS* Mutationen treten bei Leukämien, myelodysplastischen Syndromen sowie malignen Melanomen auf. (Almaguera et al. 1988, Bos 1989, Downward 2003).

Die verschiedenen *RAS* Gene kodieren für GTPasen, die unter anderem Bestandteil der Phosphorylierungskaskade des MAP-Kinase Signalwegs sind. Durch die Weiterleitung extrazellulärer mitogener Signale führt diese Signalkaskade zur Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung durch verstärkte Expression der hierfür relevanten Gene auslösen.

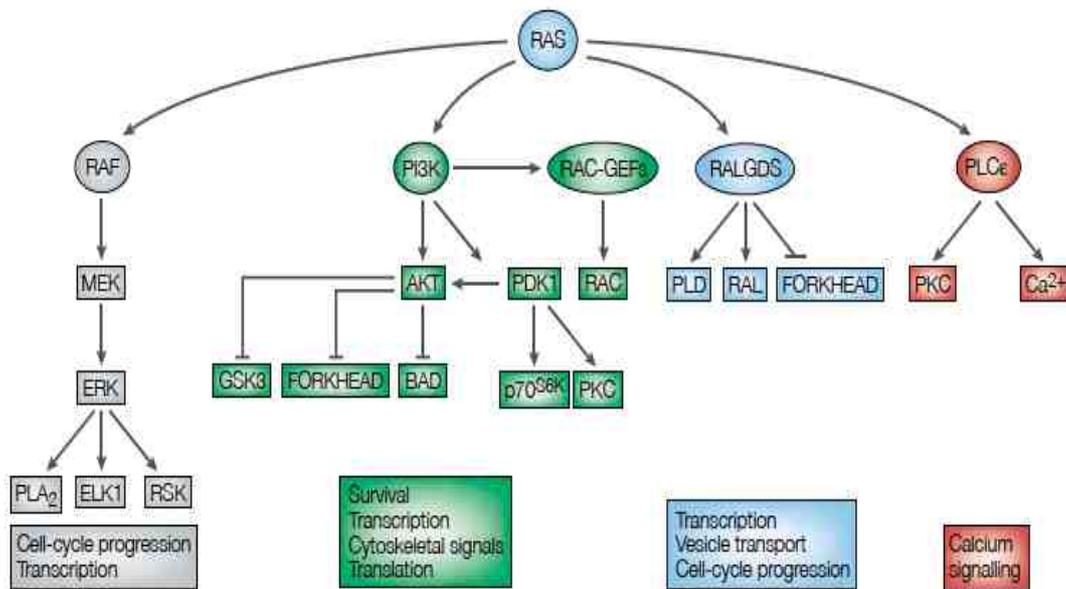
Das *KRAS* Gen auf Chromosom 12p12.1 kodiert für ein monomeres, GTP bindendes Protein (im Folgenden als p21ras bezeichnet) mit einem Molekulargewicht von 21kD und einer Proteinlänge von 189 Aminosäuren. Im inaktiven Zustand ist p21ras an GDP gebunden. Durch den Austausch von GDP zu GTP erfolgt eine Konformationsänderung von p21ras in den aktiven Zustand (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Mechanismus der p21ras Aktivierung durch GTP-Bindung. Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren führt zur Rekrutierung von GEF, die den Austausch von GDP zu GTP beschleunigen und so p21ras in den aktiven Zustand überführen. GAP dient der Kontrolle der p21ras Aktivität durch Verstärkung der Aktivität der ras-GTPase und Lyse von GTP zu GDP. Onkogene Punktmutationen des KRAS Gens führen zur dauerhaften GTP-Bindung und somit zur konstitutiven Aktivierung der MAP-Kinase Signalkaskade und anderer p21ras Effektoren. (Downward 2003)

Im aktiven Zustand phosphoryliert p21ras die Kinase RAF, die wiederum MEK phosphoryliert, welche ERK1/2 durch Phosphorylierung in den aktiven Zustand überführt. Diese Kinasen aktivieren die Transkriptionsfaktoren jun und fos, die als Heterodimer an das AP1 Motiv der DNA binden und so die Transkription für die Proliferation relevanter Gene wie *Cyclin D1* oder *MYC* verstärken (Pearson et al. 2001, Kerkhoff und Rapp 1998).

Rezeptortyrosinkinasen wie beispielsweise EGFR sind in der Lage, durch Aktivierung der Adapterproteine GrB2 und SOS (dieses Protein wird auch als GEF bezeichnet) den Austausch von GDP zu GTP zu beschleunigen und so p21ras in den aktiven Zustand zu überführen. Dies führt zur Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs und erhöhter Zellproliferationsrate. Neben diesem Signalweg induziert das aktivierte ras Protein weitere Signaltransduktionswege, die ebenfalls Funktionen wie Proliferation, Zellzyklusprogress oder Cytoskelettveränderungen vermitteln (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Übersicht der RAS assoziierten Signaltransduktion Das aktivierte G-Protein p21ras aktiviert multiple nachgeschaltete Signaltransduktionswege. Diese vermitteln Zellproliferation, Zellzyklusprogression und regulieren die Expression zahlreicher an diesen Vorgängen beteiligter Gene. (Downward 2003).

Zur Regulierung dieser Prozesse dient die intrinsische GTPase Aktivität des ras Proteins, die nach einer gewissen Zeit eine Abschaltung des Signalweges durch Austausch von GTP zu GDP bewirkt. Dieser negative Feedbackmechanismus wird durch ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) reguliert, welches die GTPase Aktivität von ras verstärkt und so das Proliferationsverhalten der Zelle in physiologischen Bereichen halten kann. Die biologische Bedeutung der Regulation des MAP-Kinase Signalwegs wird durch die Auswirkungen inaktivierender Mutationen eines GAP deutlich: Die hereditäre Neurofibromatose Typ 1 ist durch eine solche Mutation im *NF1* Gen verursacht, das für ein GAP ähnliches Protein namens Neurofibromin kodiert. Durch Mutationen verliert Neurofibromin seine GAP Funktion (Martin et al. 1990). Infolgedessen kommt es zur unkontrollierten Aktivität von p21ras und dem Auftreten von multiplen Tumoren.

Die onkogene Mutation des *KRAS* Gens in Tumoren führt ebenfalls zu einem Ausfall dieses Regulationsmechanismus: Durch Substitution einer hydrophoben (Glycin) gegen eine polare Aminosäure (zum Beispiel Aspartat oder Cystein) wird die räumliche

Interaktion zwischen p21ras und GAPs beeinträchtigt und das gebundene GTP kann nicht mehr hydrolysiert werden.

Hierdurch sind p21ras und dementsprechend der MAP-Kinase Signalweg auch in Abwesenheit mitogener extrazellulärer Signale dauerhaft aktiviert. Daraus resultiert eine von Wachstumsfaktoren oder Regulationsmechanismen autonome, stark erhöhte Proliferationsrate im Sinne einer malignen Transformation (Mansour et al. 1994).

Aufgrund der häufig beobachteten Mutationen von *KRAS* in Tumoren und der bedeutenden Funktion dieses Gens für die Zellproliferation und die maligne Transformation stellt diese genetische Veränderung ein potentiell Ziel für eine zielgerichtete Therapie dar.

Bisherige Versuche, mutiertes p21ras pharmakologisch zu inhibieren, waren jedoch nicht erfolgreich. Problematisch hierbei ist die Beeinflussung einer loss-of-function Veränderung wie dem Verlust der GTPase Interaktion von p21ras. Etablierte zielgerichtete medikamentöse Therapien beruhen im Allgemeinen auf der Blockierung eines Signalwegs durch die Hemmung enzymatischer Aktivität, nicht jedoch auf der Aktivierung einer Enzymfunktion wie der GTPase im Falle von p21ras.

Aus diesem Grund wurde als therapeutisches Ziel die Membranverankerung von p21ras ausgewählt, da die Membranlokalisation für die Funktion dieses Proteins notwendig ist.

Diese besteht aus einem Farnesylanker, ohne welchen das Protein funktionslos ist. Farnesyltransferaseinhibitoren erwiesen sich jedoch nicht als wirksame Therapie *KRAS* mutierter Tumore, da die Verankerung auch durch posttranslationale Modifikation durch das Enzym Geranylgeranyltransferase möglich ist. Eine Inhibition beider Enzyme erwies sich hingegen als zu nebenwirkungsreich und toxisch (Lobell et al. 2001). Es werden daher Substanzen erprobt, die durch *KRAS* aktivierte Signalwege inhibieren (Murphy et al. 2006, Rinehart et al. 2004, Blumenschein et al. 2009). Diese haben jedoch bisher noch keine Relevanz für die Therapie des Bronchialkarzinoms.

In der Therapie des malignen Melanoms zeigt bei Tumoren mit einer *BRAF* Mutation ein Inhibitor der BRAF-Kinase einen therapeutischen Effekt. (Chapman et al. 2011) Dieses Beispiel zeigt die prinzipielle Möglichkeit der zielgerichteten Therapie von Veränderungen des MAP-Kinase Signalwegs bei malignen Tumoren.

Untersuchungen zu der Prävalenz von Veränderungen des MAP-Kinase-Signalwegs in Adenokarzinomen der Lunge zeigen, dass in etwa 70% der Tumoren mindestens

eine Mutation in einem der Bestandteile dieses Signaltransduktionswegs vorliegt (Ding et al. 2008). Weitere Untersuchungen zu den in Bronchialkarzinomen stattfindenden Veränderungen des MAP-Kinase-Wegs und damit assoziierten Genen wie *KRAS* sind daher von großer Bedeutung für ein präziseres Verständnis der Tumorbio- logie dieser Erkrankung und die Entwicklung neuer Therapieansätze.

## 1.5 Klassifikation und Therapie des Bronchialkarzinoms

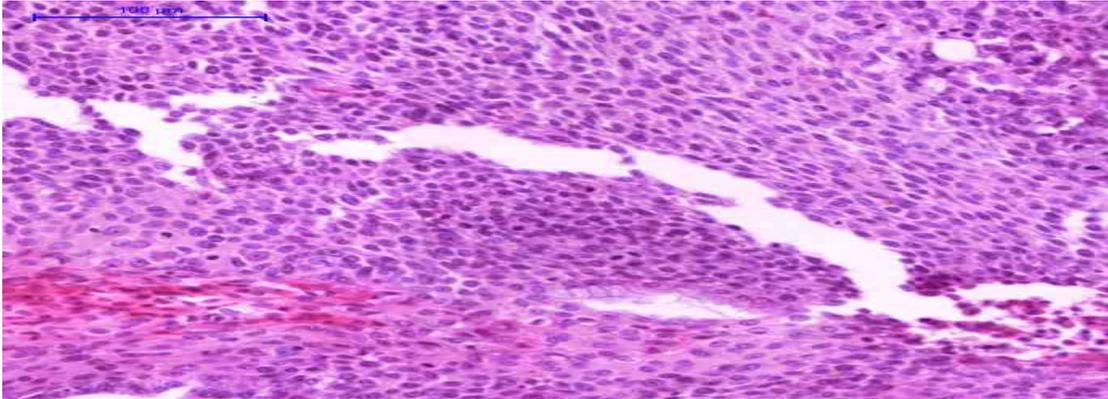
Das Bronchialkarzinom wird nach der WHO Klassifikation der Lungentumoren (Travis et al. 2004) durch histopathologische Kriterien in folgende Entitäten unterteilt:

### Plattenepithelkarzinom

Differenzierungstypen:

- Papillär,
- klarzellig
- kleinzellig
- basaloid

Das Plattenepithelkarzinom ist ein in 75% der Fälle zentral wachsender Tumor, 25% entstehen in der Lungenperipherie. Je nach Population wird seine Häufigkeit mit 25-40% aller Bronchialkarzinome angegeben. Das Plattenepithelkarzinom wird häufig bei langjähriger Cancerogenexposition durch Rauchen gefunden, jedoch selten bei Nichtrauchern. Meist wachsen die Tumoren zentral an Teilungsstellen der Bronchien und sind somit diagnostisch einer Bronchoskopie zugänglich. Große Tumoren neigen zu zentralen Nekrosen. Die Diagnose wird histologisch durch das Auftreten von Plattenepithel mit Verhornungszeichen und Interzellulärbrücken gestellt. Epitheliale Dysplasie und Carcinoma in situ werden als Vorstufen des Plattenepithelkarzinoms beschrieben. Dieser Tumortyp zeigt in bis zu 80% der Fälle eine Überexpression des EGF-Rezeptors. *KRAS* Mutationen werden sehr selten bei diesen Tumoren festgestellt. (Rodenhuis et al. 1987, Graziano et al. 1999).



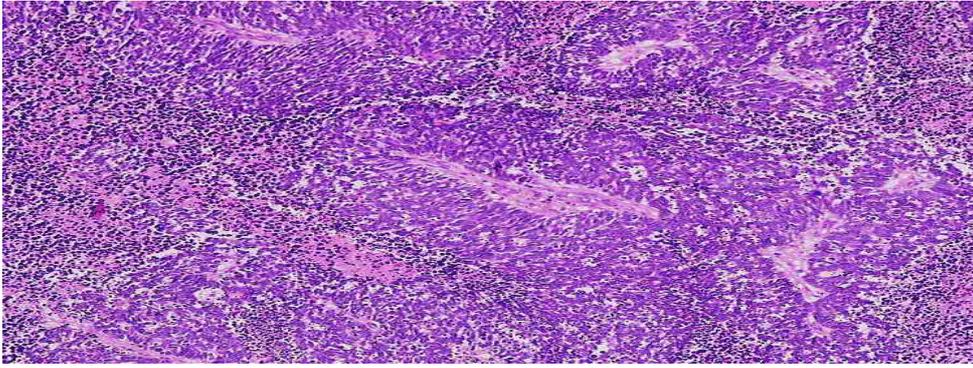
**Abbildung 5:** Plattenepithelkarzinom der Lunge

### **Kleinzelliges Bronchialkarzinom**

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein undifferenzierter, hoch maligner aggressiver neuroendokriner Tumor, der ungefähr 15-20% aller Lungenkarzinome ausmacht und wie das Plattenepithelkarzinom vor allem Raucher betrifft. Histologisch zeigen sich kleine, runde, basophile Zellen ohne prominente Nucleoli mit fein granuliertem Chromatin. Häufig sind entnahmebedingt Quetschartefakte zu beobachten. Charakteristisch ist ein sehr schnelles, meist zentral hilusnahes Wachstum (Tumorverdopplungszeit ca. 50-100 Tage) und eine sehr früh im Verlaufe der Erkrankung auftretende, ausgeprägte hämatogene Fernmetastasierung.

Die hohe Proliferationsneigung bedingt ein gutes Ansprechen dieses Tumors auf eine cytostatische Chemotherapie.

Aufgrund der ausgeprägten genetischen Instabilität dieser Erkrankung kommt es jedoch rasch zu chemotherapieresistenten Rezidiven, daher ist die Prognose in den allermeisten Fällen infaust. Aufgrund des fast immer vorhandenen systemischen Befalls ist eine kurative operative Therapie fast nie möglich. Zur Abgrenzung gegenüber anderen kleinzelligen pulmonalen Infiltraten, dient der Nachweis der neuroendokrinen Differenzierung durch immunhistochemische Untersuchung von CD56 (NCAM), Synaptophysin oder Chromogranin A. Die neuroendokrine Herkunft dieses Tumors erklärt auch das häufige Auftreten der zuvor beschriebenen paraneoplastischen Syndrome. Analog der kleinzelligen Morphologie ist auch der Chromosomensatz des kleinzelligen Karzinoms reduziert, es findet sich häufig eine Hypodiploidie und der Verlust ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme (Junker et al. 2000)



**Abbildung 6:** Histologie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms

### **Adenokarzinom**

Das Adenokarzinom entsteht häufig in der Lungenperipherie und hat einen Anteil von ca. 30-40% an allen Bronchialkarzinomen. Es ist der häufigste Tumor bei Nichtrauchern, jüngeren Patienten und Frauen und zeigt eine ansteigende Inzidenz, für die unter anderem der zunehmende Konsum von Filterzigaretten mit entsprechend tieferer Inhalation der Carcinogene in die Lungenperipherie sowie veränderte diagnostische Kriterien und verbesserte histopathologische Methoden verantwortlich gemacht werden (Charloux et al. 1997). Mikroskopisch finden sich drüsenartige Strukturen und/oder extra- oder intrazelluläre Mucinansammlungen. Differenzialdiagnostisch zur Abgrenzung gegenüber einer pulmonalen Metastase eines extrapulmonalen Adenokarzinoms (beispielsweise des Gastrointestinaltrakts oder der Mamma) oder eines Pleuramesothelioms dient der Nachweis der Expression von TTF-1 durch die Tumorzellen. Ca. 75% aller bronchialen Adenokarzinome exprimieren diesen Marker (Travis et al. 2004). Bis zu 80% aller Adenokarzinome zeigen zwei verschiedene morphologische Differenzierungen, innerhalb eines Tumors wie zum Beispiel einen papillären und acinären Anteil.

Das nichtinvasive bronchioloalveoläre Karzinom stellt eine bemerkenswerte Entität dar, da es eine bessere Prognose als die übrigen Adenokarzinome besitzt und durch seine klinischen Symptomatik und radiologischen Präsentation als Pneumonie fehlgedeutet werden kann. Häufig finden sich bei diesem Subtyp *EGFR* Mutationen (Blons et al. 2006). 30-50% aller Adenokarzinome zeigen eine *KRAS* Mutation.

Als präneoplastische Läsion des Adenokarzinoms ist die atypische adenomatöse Hyperplasie beschrieben (Mori et al. 2001).

Auf Grundlage von Studien zur Prognose der verschiedenen histologischen Differenzierungstypen des Adenokarzinoms wurde im Jahr 2010 eine neue Klassifikation des

pulmonalen Adenokarzinoms erarbeitet (Travis et al. 2010). Aufgrund des häufigen kombinierten Vorliegens verschiedener histologischer Subtypen fordert die neue Klassifikation eine Quantifizierung und Bestimmung des vorherrschenden, prädominanten Subtyps innerhalb eines Tumors.

Hiernach werden folgende Einteilungen getroffen:

#### **Präinvasive Läsionen:**

- atypische adenomatöse Hyperplasie
- Adenokarzinom in situ (<3cm)

Subtypen: mucinös, nicht mucinös, gemischt mucinös/nichtmucinös

#### **Minimal invasives Karzinom:**

- Lepidische Wuchsform (bis zu 3cm Durchmesser, Invasionsfront<5mm)
- Subtypen: mucinös, nicht mucinös, gemischt mucinös/nichtmucinös

#### **Invasives Adenokarzinom:**

- Prädominant lepidisch
- Prädominant acinär
- prädominant papillär
- prädominant mikropapillär
- prädominant solide und mucinös

#### **Varianten des invasiven Adenokarzinoms:**

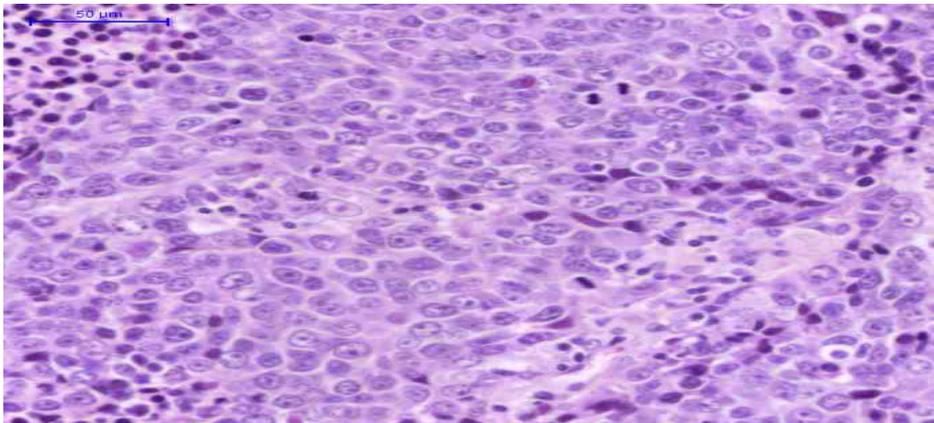
- Invasives mucinöses Adenokarzinom
- Kolloidales Adenokarzinom
- Fetales Adenokarzinom
- Intestinales Adenokarzinom

## Großzelliges undifferenziertes Karzinom

Differenzierungstypen:

- neuroendokrin
- basaloid
- lymphoepithelioma-ähnlich
- klarzellig
- großzellig mit rhabdoidem Phänotyp

Als großzelliges undifferenziertes Karzinom werden entdifferenzierte nichtkleinzellige Karzinome klassifiziert, die histologisch zytoplasmareiche Zellen mit großen, prominenten Nucleoli ohne jegliche lichtmikroskopische Zeichen einer drüsenartigen oder plattenepithelialen Differenzierung zeigen. Die Diagnose eines großzelligen Bronchialkarzinoms ist somit eine Ausschlußdiagnose. Elektronenmikroskopische sowie immunhistochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass diese Tumorzellen ultrastrukturell plattenepithelial oder drüsenhaft differenziert sein können. Dementsprechend sind dies stets undifferenzierte Tumoren mit einem aggressiven Wachstum und einer schlechten Prognose. Entsprechend der vergleichsweise großen Zellkerne zeigt sich eine starke chromosomale Aneuploidie mit einer Vermehrung des DNA Gehalts. Etwa 10% aller Bronchialkarzinome werden als großzellig diagnostiziert.



**Abbildung 7:** Histologisches Bild eines großzelligen undifferenzierten Bronchialkarzinoms mit deutlichen Zellatypien und prominenten Nucleoli.

Weitere seltenere Subtypen, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden:

- **Adenosquamöses Karzinom**
- **Sarkomatoides Karzinom**
- **Karzinoidtumoren**
- **Karzinome der Bronchialwanddrüsen**
- **Unklassifizierbare Karzinome**

In letztere Kategorie fallen Tumore, die nicht mit den bisher dargestellten Kriterien klassifiziert werden können. Es kann aber auch ein unklassifizierbares Karzinom vorliegen, wenn aufgrund von nicht ausreichend aussagekräftigen Biopsiematerials eine eindeutige Diagnose nicht möglich ist. In diesen Fällen sollte aus therapeutischen und prognostischen Gründen zumindest festgestellt werden, ob ein kleinzelliges oder nicht kleinzelliges Karzinom vorliegt.

Neben der Feststellung des histologischen Differenzierungstyps wird zudem der Differenzierungsgrad, das Grading, bestimmt. Anhand des morphologischen Erscheinungsbildes und der Ausgeprägtheit der Zellatypien werden Tumoren als gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2), wenig differenziert (G3) oder undifferenziert/anaplastisch (G4) beurteilt. Kleinzellige und großzellige undifferenzierte Karzinome werden hierbei aufgrund ihrer Entdifferenzierung grundsätzlich stets als undifferenziert (G4) beurteilt.

### **Tumorheterogenität**

Eine wichtige Eigenschaft des Bronchialkarzinoms ist die morphologische und genetische Heterogenität. In bis zu 50% aller Tumoren finden sich mindestens zwei verschiedenartige Zelldifferenzierungstypen innerhalb eines Tumors und eine ausgeprägte morphologische intratumorale Heterogenität (Hirsch et al. 1983, Roggli et al. 1985, Dunnill und Gatter 1986, Fraire et al. 1987, Travis et al. 2004).

Zum Beispiel können Plattenepithelkarzinome einen Tumoranteil mit kleinzelliger Differenzierung enthalten. Dies muss bei der Beurteilung kleiner Biopsien berücksichtigt werden, auf deren Grundlage eine adäquate Diagnostik bei heterogenen Lungentumoren oft nicht möglich ist. Bei Adenokarzinomen handelt es sich in 80% der Fälle um den sogenannten gemischten Subtyp, in dem verschiedene Differenzierungsgra-

de und Ausprägungen morphologischer Atypien zu beobachten sind (Travis et al. 2004). Die neue Klassifikation des Adenokarzinoms fordert daher die Festlegung auf die quantitativ prädominante Wuchsform dieser Tumoren (Travis et al. 2010).

Das Bronchialkarzinom zeigt auch auf molekularer und genetischer Ebene eine ausgeprägte Heterogenität durch ein sehr instabiles Genom (Carey et al. 1990, Cahill et al. 1999, Balsara et al. 2002). Eine heterogene Tumorzellpopulation bedingt eine Neigung zu einer schnell auftretenden Therapieresistenz und erfordert eine Berücksichtigung seiner veränderten biologischen Charakteristika im Vergleich zu Tumoren mit einer homogenen Zellpopulation. (Goldie und Coldman 1984, Dexter und Leith 1986). Bisher fand dieses Phänomen jedoch keine Berücksichtigung bei Diagnostik oder Therapie des Bronchialkarzinoms.

Die genauere Charakterisierung des Ausmaßes von Tumorheterogenität auf molekularer Ebene könnte daher eine Relevanz für die Verbesserung der Therapie des Bronchialkarzinoms besitzen.

Klinisch relevant ist neben der genauen histopathologischen Klassifikation von Bronchialkarzinomen vor allem die Unterscheidung von kleinzelligen und den übrigen nicht kleinzelligen Karzinomen, da diese beiden Untergruppen deutlich verschiedene tumorbiologische Charakteristika aufweisen und deshalb unterschiedliche Therapieansätze sowie Stagingmethoden erfordern.

### **1.5.1 Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Kleinzellige Karzinome metastasieren sehr früh und häufig und zeigen eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit mit einer mittleren Tumorverdoppelungszeit von etwa 50-100 Tagen. Sie besitzen also einen großen Anteil von in der Zellproliferationsphase befindlichen Zellen und sind somit sehr empfindlich gegenüber einer cytostatischen Therapie mit Chemotherapeutika oder einer Strahlentherapie.

Durch die hohe Metastasierungsneigung und das schnelle Wachstum werden diese Tumoren meist in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wodurch eine operative Therapie in den meisten Fällen nicht mehr möglich ist. Anstelle des TNM Staging Systems wird beim kleinzelligen Karzinom daher eine Unterscheidung in eine lokal begrenzte sogenannte limited disease (entspricht TNM Stadien I-IIIb) oder ausgedehnte extensive disease (entspricht TNM Stadium IV) vorgenommen. 66% der Fälle werden im Stadium der extensive disease diagnostiziert, daher ist die Primärtherapie

der Wahl die systemisch wirksame Chemotherapie. Hierdurch lässt sich häufig ein rasches Abnehmen der Tumormasse und ein Regress der Erkrankung bis hin zu einer Remission erreichen. Nach diesem ersten Therapieerfolg kommt es jedoch in den meisten Fällen zu Rezidiven, die dann chemotherapieresistent geworden sind und nicht mehr erfolgreich behandelt werden können (Patel et al. 2003). Für die stark ausgeprägte Fähigkeit, eine Therapieresistenz zu entwickeln, wird das instabile, stark mutationsanfällige Genom dieser Tumoren verantwortlich gemacht.

Bei lokal begrenzter Erkrankung ist eine kurative operative Therapie in wenigen Fällen möglich. Standardtherapie ist hier eine simultane Radiochemotherapie.

Als Chemotherapie wird am häufigsten eine Kombinationstherapie mit einem Cytostatikum auf Platinbasis, meist Cisplatin oder das weniger toxische Carboplatin, zusammen mit Etoposid oder Irinotecan verwendet. Diese und andere Schemata sind in der Lage, eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von durchschnittlich 4 Monaten zu erreichen, bis es zu einem Progress oder Rezidiv der Erkrankung kommt (Simon und Turrisi 2007).

Aufgrund der hohen Metastasierungsneigung des kleinzelligen Lungenkarzinoms wird bei Patienten ohne Nachweis von Metastasen im cerebralen CT oder MRT eine prophylaktische Ganzhirnbestrahlung zur Verhinderung der Ausbildung von Hirnmetastasen durchgeführt. Die Prognose dieser Erkrankung ist trotz dieser Behandlungsschemata weiterhin sehr schlecht. Das Fünfjahresüberleben liegt bei ca. 5%. Der Versuch neue, auf die genetischen Veränderungen dieser Neoplasie ausgerichteten Therapeutika in die Behandlung einzuführen, scheitert bisher an der enormen molekularen Komplexität und den zahlreichen genetischen Veränderungen dieser Neoplasie, so dass eine zielgerichtete Inhibition einzelner Signalwege bisher keine Verbesserung der Therapie erbringen konnte (Rossi et al. 2008).

Aufgrund der sehr geringen Prävalenz von *KRAS* Mutationen in kleinzelligen Karzinomen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich nichtkleinzellige Bronchialkarzinome untersucht.

## **1.5.2 Staging des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms**

### **TNM Staging**

Das Staging des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms wird wie bei anderen soliden Tumoren nach der TNM-Klassifikation durchgeführt. Hierbei beschreibt die Kategorie T die Ausdehnung des Primärtumors, N den Befall regionärer Lymphknoten und M das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Die mittlerweile 7. Auflage der TNM Klassifikation des Bronchialkarzinoms wurde auf der Basis von epidemiologischen Daten aus über 60.000 Erkrankungsfällen entwickelt, um anhand der Verlaufsdaten eine adäquate Stratifizierung von Prognose und Therapieoptionen zu ermöglichen (Rami-Porta et al. 2009).

<b>T:Primärtumor</b>
<b>Tx:</b> Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder positiver cytologischer Nachweis maligner Zellen
<b>T 0:</b> Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis:</b> Carcinoma in situ
<b>T 1a:</b> Größte Tumorausdehnung kleiner als 2 cm ohne Invasion von visceraler Pleura oder Hauptbronchus
<b>T 1b:</b> Größte Tumorausdehnung größer 2 und kleiner als 3 cm ohne Invasion von visceraler Pleura oder Hauptbronchus
<b>T 2a:</b> Tumorausdehnung größer als 3 und kleiner als 5 cm, Befall des Hauptbronchus weiter als 2 cm distal der Carina, Invasion der visceralen Pleura, Atelektase oder obstruktive Pneumonie eines Lungenabschnitts
<b>T 2b:</b> Tumorausdehnung größer als 5 und kleiner als 7 cm, Befall des Hauptbronchus weiter als 2 cm distal der Carina, Invasion der visceralen Pleura, Atelektase oder obstruktive Pneumonie eines Lungenabschnitts.
<b>T 3:</b> Tumor größer 7 cm oder Invasion einer der folgenden Strukturen: Thoraxwand, Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikardium, Hauptbronchus weniger als 2 cm von der Carina entfernt ohne direkten Befall derselbigen; oder Atelektase, obstruktiv bedingte Pneumonie einer gesamten Lunge oder multiple isolierte Tumorherde im selben Lungenlappen
<b>T 4:</b> Tumor jeglicher Größe mit Befall einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Carina, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper; Auftreten eines malignen Pleuraergusses oder Tumorbefall eines anderen ipsilateralen Lungenlappens.
<b>N: regionäre Lymphknotenstationen</b>
<b>N X :</b> regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N 0:</b> keine Metastasen in den regionären Lymphknoten
<b>N 1:</b> Metastasen in ipsilateralen peribronchialen, intrapulmonalen oder perihilären Lymphknoten
<b>N 2:</b> Metastasen in ipsilateralen mediastinalen oder subcarinalen Lymphknoten
<b>N 3:</b> Befall kontralateraler perihilärer oder mediastinaler, ipsilateraler oder kontralateraler supraclaviculärer Lymphknoten oder der Scalenusgruppe
<b>M : Fernmetastasen</b>
<b>M X:</b> Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>M 0:</b> Keine Fernmetastasen
<b>M 1a :</b> Tumorknoten in einem kontralateralen Lappen; Pleurabefall oder maligner Pleura- bzw. Perikarderguss
<b>M 1b :</b> Fernmetastasen außerhalb der Lunge

**Tabelle 1:** TNM Klassifikation des Bronchialkarzinoms, 7.Auflage (UICC)

### Stadieneinteilung nach UICC:

Anhand der TNM-Klassifikation wird das Stadium eines Bronchialkarzinoms bestimmt. Das Stadium ist Ausdruck des Ausmaßes der Erkrankung, korreliert mit der Prognose und dient somit der Einschätzung therapeutischer Optionen für das jeweilige Tumorstadium.

Stadium	Tumor	Nodalstatus	Metastasen
<b>Okkultes Carcinom</b>	T x	N 0	M 0
<b>Stadium 0</b>	T in situ	0	M 0
<b>Stadium Ia</b>	T1a, T1b	N 0	M 0
<b>Stadium Ib</b>	T2a	0	M 0
<b>Stadium IIa</b>	T 1a, T1b, T 2a	N 1	M 0
	T 2b	N0	M 0
<b>Stadium IIb</b>	T 2b	N 1	M 0
	T 3	N 0	M 0
<b>Stadium IIIa</b>	T 1, T 2	N 2	M 0
	T 3	N 1, N 2	M 0
	T 4	N 0, N 1	M 0
<b>Stadium IIIb</b>	T 4	N 2	M 0
	Jedes T	N 3	M 0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M 1a oder M1b

**Tabelle 2:** Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms nach UICC (7.Auflage, 2010)

In den Stadien Ia bis IIIa ist eine potentiell kurative chirurgische Resektion des Tumors anzustreben. Ist eine Operation aus funktionellen Gründen nicht möglich, wird eine definitive Radiotherapie durchgeführt. Im lokal fortgeschrittenen Stadium IIIa wird eine adjuvante Chemotherapie nach Resektion empfohlen. Bei Inoperabilität wird eine simultane Radiochemotherapie durchgeführt. In den fortgeschrittenen Stadien IIIb und IV ist in den allermeisten Fällen eine Operation nicht möglich, da technische oder prognostische Irresektabilität besteht, und es ist in diesen Fällen eine Chemotherapie indiziert (Goeckenjan et al. 2010).

### 1.5.3 Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt je nach Stadium der Erkrankung durch Operation, Strahlentherapie oder Chemotherapie. Diese verschiedenen Therapieformen werden einzeln, in Kombination (z.B. simultane Radiochemotherapie) , und im Falle der Chemotherapie adjuvant oder neoadjuvant eingesetzt. Hierbei ist die vollständige chirurgische Entfernung eines primären Lungenkarzinoms in einem frühen Krankheitsstadium die einzige Therapieoption mit der Aussicht auf Heilung bei lokal begrenzter Erkrankung. Bis zum Stadium IIIa, also bishin zu einer lokal fortgeschrittenen Erkrankung, ist dies grundsätzlich möglich. Nur ein geringer Teil der neu diagnostizierten Bronchialkarzinome ist jedoch einer Operation zugänglich: Häufig sind bereits Fernmetastasen sowie nicht resektable mediastinale Lymphknotenmetastasen aufgetreten oder es zeigt sich eine Infiltration nicht resezierbarer angrenzender Organe und Strukturen. Zudem sind viele Patienten aufgrund kardialer Risikofaktoren, weiterer Begleiterkrankungen oder unzureichender prognostizierter postoperativer Restlungenfunktion funktionell inoperabel.

Daher werden die meisten Bronchialkarzinome primär chemotherapiert und diese gegebenenfalls mit einer Strahlentherapie kombiniert. Hierbei wird in Studien für etablierte Therapieschemata von medianen Überlebenszeiten von maximal 12-14 Monaten berichtet (Herbst, 2008).

Als Standardchemotherapie hat sich eine Zweierkombination aus einem Alkylans auf Platinbasis (Cisplatin oder Carboplatin) und einem Antimetaboliten (Gemcitabine), Mikrotubulusinhibitor (Vinorelbine, Docetaxel, Paclitaxel) oder Topoisomeraseinhibitor (Etoposid) bewährt.

Die verschiedenen Therapieschemata zeigen alle eine ähnlichen Effektivität mit einer medianen Überlebenszeitverlängerung von 8-11 Monaten (Schiller et al. 2002). Diese Therapie hat jedoch nur eine palliative Intention mit Ansprechraten von lediglich ca. 30% und ist mit erheblicher Toxizität verbunden. So treten häufig eine Knochenmarksdepression mit Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie, Übelkeit und Erbrechen, Hörminderung, Neuropathien und Nierenschädigungen auf. Speziell bei älteren Patienten in schlechterem Allgemeinzustand und weiteren Erkrankungen ist eine solch nebenwirkungsreiche Therapie nicht durchführbar und es wird lediglich eine Monotherapie durchgeführt (Hurria und Kris 2003).

Therapiestudien zur kombinierten Behandlung mit mehr als zwei cytotoxischen Substanzen zeigten keinen signifikanten Überlebensvorteil bei inakzeptablen Nebenwirkungsspektren (Niho et al. 2002).

Die medikamentöse Therapie des Bronchialkarzinoms benötigt daher dringend eine Verbesserung durch Etablierung und Entwicklung neuartiger Substanzklassen mit erhöhter Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen.

## **1.6 Molekular zielgerichtete Therapie**

Aufgrund der geringen Wirksamkeit klassischer Chemotherapeutika und ihrer erheblichen toxischen Nebenwirkungen bei der Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms und anderer Tumoren wurden neue genspezifische Medikamente entwickelt, um ausschließlich die für das Wachstum maligner Tumoren notwendigen zellulären Signaltransduktionsprozesse zu blockieren und so gezielt die Proliferation von Tumorzellen bei geringen systemischen Nebenwirkungen zu inhibieren. Zu diesem Zweck werden unter anderem monoklonale Antikörper eingesetzt, die an Oberflächenmoleküle binden, welche von Tumorzellen vermehrt exprimiert werden und Bestandteil von für das Tumorwachstum essentiellen zellulären Signalkaskaden sind.

Die Bindung des Antikörpers verhindert daraufhin die Signalweiterleitung durch Hemmung einer möglichen Ligandenbindung des Rezeptors und seiner Kinaseaktivität oder führt zu einer Tumorzelllyse durch Aktivierung von Mediatorzellen des Immunsystems.

Ein erfolgreiches, klinisch etabliertes Beispiel für die zielgerichtete Therapie ist Trastuzumab (Herceptin®), ein monoklonaler Antikörper gegen den HER2/Neu Rezeptor, der bei 20% aller Mammakarzinome bei Vorliegen einer HER2 Genamplifikation wirksam ist.

Die Gabe von Trastuzumab bei Mammakarzinomen mit nachgewiesener Amplifikation des *HER2* Gens führt zu einer Überlebenszeitverlängerung und Verringerung des Rezidivrisikos um bis zu 50% (Romond et al. 2005).

Eine weitere klinisch gebräuchliche Substanz ist ein mit dem Ziel der Angiogenesehemmung entwickelter Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab, Avastin®), der für die Behandlung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen ist (Sandler et al. 2006). Für diese Erkrankung finden desweiteren monoklonale Antikörperpräparate gegen den EGF-Rezeptor (Cetuximab,

Panitumumab) Verwendung. Dieser Rezeptor wird von vielen epithelialen Tumoren überexprimiert und stellt daher ein attraktives therapeutisches Ziel dar (Salomon et al. 1995, Yarden 2001).

Neben der Etablierung therapeutischer Antikörperpräparate gegen von Tumoren überexprimierter Oberflächenantigene wurden Pharmaka entwickelt, die intrazellulär an der Zellproliferation beteiligte Moleküle inhibieren. Zu diesen Substanzen gehören Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib (Gleevec®). Dieses Therapeutikum hemmt die Tyrosinkinaseaktivität der durch Translokation entstehenden bcr/abl Kinase und anderer Kinasen (KIT, PDGFR) und erzielt sehr gute Ergebnisse bei der Behandlung der Philadelphia-chromosom positiven chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumoren.

Eine Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren der EGFR Familie ist die bisher am weitesten klinisch etablierte zielgerichtete Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms und ihre Wirksamkeit wurde in zahlreichen Studien untersucht (Shepherd et al. 2005, Miller et al. 2003, Kris et al. 2003, Kim et al. 2003, Herbst et al. 2005, Mok et al. 2009).

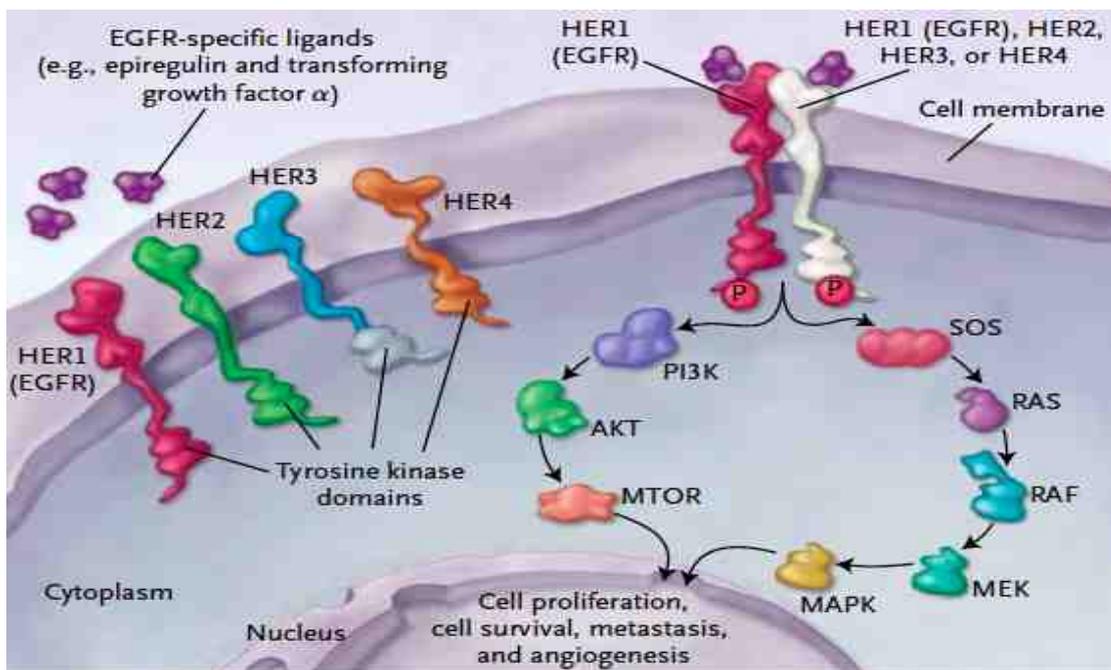
### **1.6.1 Tyrosinkinase Rezeptoren der HER Familie**

Der EGF Rezeptor gehört zu einer Gruppe von vier strukturverwandten Rezeptortyrosinkinase Rezeptoren, die als HER oder ErbB bezeichnet werden. Diese Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Wachstumsregulation epithelialer Zellen, indem sie extrazelluläre Wachstumssignale über eine Signalkaskade in den Zellkern weiterleiten, wodurch die Proliferationsaktivität der Zelle verstärkt wird. EGFR/HER1(ErbB1), HER2/ErbB2 (bisweilen auch mit dem Zusatz NEU aufgrund des Nachweises in Neuroblastomzellen bezeichnet) und HER4/ErbB4 sind Rezeptortyrosinkinasen mit einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer hydrophoben transmembranen Domäne und einer cytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (Mendelsohn und Baselga 2000). HER3 verfügt lediglich über eine ligandenbindende Domäne, zeigt aber keine Tyrosinkinaseaktivität, während bei HER2 keine Ligandenbindung beobachtet wird. Der EGF Rezeptor kann durch Bindung verschiedener extrazellulärer Liganden aktiviert werden. Zu diesen gehören EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin. Durch Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung der cytoplasmatischen Kinaseuntereinheiten und zur gegenseitigen Autophosphorylierung. Hierbei ist

auch die Bildung verschiedener Heterodimere möglich (z.B. HER2/HER3), wodurch eine Vielzahl von Interaktionen zwischen den verschiedenen Rezeptoren möglich ist (Tzahar et al. 1996). Diese Möglichkeit der Aktivierung ist insbesondere für HER2 von großer Bedeutung, da für diesen sogenannten Orphan-Rezeptor kein Ligand bekannt ist und er durch Heterodimerisierung mit anderen Monomeren der HER Familie aktiviert wird.

Infolge der Dimerisierung sind die Tyrosinkinasedomänen in der Lage, verschiedene Effektorproteine an Tyrosinresten zu phosphorylieren und damit zu aktivieren.

Der EGF-Rezeptor ist in der Lage, diverse zelluläre Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren: Hierzu zählen der PI3K/Akt/mTOR Signalweg, der JAK/STAT Signalweg und der MAP-Kinase-Weg (siehe Abbildung 8.) Diese Effektormechanismen führen zur Aktivitätssteigerung von Genen, die wichtige Funktionen für Angiogenese, Proliferation, Zellüberleben und Zellmotilität besitzen.



**Abbildung 8:** Überblick über assoziierte Signalwege der EGF Rezeptor Familie. EGFR und andere HER Moleküle aktivieren verschiedene wachstumsinduzierende Signalkaskaden, als wichtigste sind hier der PI3K/AKT/mTOR und der MAP-Kinase Signalweg abgebildet. Es ist ersichtlich, dass aufgrund ihrer pleiotropen Effekte die EGF Rezeptorfamilie ein zentraler Regulator von Zellproliferation und weiteren malignen Charakteristika in Tumoren ist. Daher kann durch eine Inhibition des EGF Rezeptors eine ausgeprägte Abschwächung dieser nachgeschalteten Effektoren erreicht werden. Die zahlreichen beteiligten Signalproteine bedingen jedoch auch eine Vielzahl möglicher onkogener Veränderungen (Cataldo et al. 2011).

Aufgrund dieser vielfältigen wachstumsinduzierenden sowie potentiell onkogenen Effekte der EGFR assoziierten Signalwege und der in vielen epithelialen Tumoren beobachteten verstärkten Expression dieses Rezeptors und seiner Liganden ist die pharmakologische Inhibition der Aktivität des EGF Rezeptors eine vielversprechende Möglichkeit eines zielgerichteten Ansatzes in der medikamentösen Tumorthherapie. (Salomon et al. 1995, Mendelsohn und Baselga 2000, Normanno et al. 2005, Hynes und Lane 2005).

### **1.6.2 Anti-EGFR Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Zahlreiche Studien haben die Expression von EGFR bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen untersucht (Pastorino et al. 1997, Cappuzzo et al. 2005, Dacic et al. 2006, Pennell et al. 2007 ). Hierbei zeigten sich je nach Nachweismethode und untersuchter Kohorte EGFR überexprimierende Tumoren in bis zu 80% aller Fälle.

Daher erscheint die Inhibition des EGFR-Signalwegs als eine aussichtsreiche Therapieoption des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. Zu diesem Zweck wurden niedermolekulare Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors entwickelt (Erlotinib/Tarceva®, Gefitinib/Iressa®), die reversibel die ATP-Bindung der katalytischen Domäne inhibieren und somit die Phosphorylierung nachgeschalteter Mediatoren und dadurch eine Signalweiterleitung verhindern.

Klinische Studien bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit diesen Tyrosinkinaseinhibitoren zeigten jedoch zunächst enttäuschende Ergebnisse: Es konnte entweder keiner oder nur ein geringer Überlebensvorteil gegenüber einer konventionellen Chemotherapie festgestellt werden (Giaccone et al. 2004, Herbst et al. 2005, Sheperd et al. 2005).

Bei einem geringen Teil der Patienten (ca. 10%) konnte jedoch ein deutlicher Therapieerfolg bishin zu zeitweisen Remissionen festgestellt werden. Daher wurde Erlotinib als Therapieoption nach Versagen einer Erstlinientherapie zugelassen. Die Nebenwirkungen bestehen meist in einem akneartigen Hautauschlag und Diarrhoen, während schwere toxische Wirkungen beim Einsatz dieser Substanzen selten sind (Herbst et al. 2005). Bei sensitiven Tumoren verfügen diese neuen Therapeutika somit über eine verbesserte Wirksamkeit bei weit weniger ausgeprägten Nebenwirkungen als konventionelle Cytostatika.

Aufgrund dieser Erfahrungen wurde eine Etablierung prädiktiver Marker angestrebt, um jene Patienten mit einer hohen Aussicht auf ein Ansprechen auf die Therapie zu identifizieren. Jedoch erwiesen sich Untersuchungen zur Amplifikation oder Expression von EGFR zu diesem Zwecke als ungeeignet, da diese keine oder nur eine unzureichende Assoziation mit einem Ansprechen auf eine Anti-EGFR Therapie zeigen konnten (Sequist et al. 2007, Pennell et al. 2007).

Weitergehende Untersuchungen ergaben in den Tumoren derjenigen Patienten, die auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren sensibel reagieren, den Nachweis von Mutationen im *EGFR*-Gen im Bereich der katalytischen Domäne (Lynch et al. 2004, Pao et al. 2004, Paez et al. 2004, Takano et al. 2005, Jackman et al. 2006). Am häufigsten wurden hierbei eine *in-frame* Deletion in Exon 19 (Deletion p.E746-A750) und eine Punktmutation in Exon 21 (p.L858R) beschrieben.

Es wurde postuliert, dass diese Mutationen eine Stabilisierung der aktiven Struktur des EGF Rezeptors bewirken (Bose und Zhang 2009), wodurch die Aktivität der Signalweiterleitung des EGFR erheblich gesteigert wird und die Tumorzellen von genau diesem Signaltransduktionsschritt in ihrem Wachstum abhängig sind. Eine solche Abhängigkeit von einem einzigen, spezifischen Signaltransduktionsprozess stellt also einen geeigneten Angriffspunkt für eine Therapie dar, weil mit der Blockierung eines einzigen Moleküls die Wachstumsdynamik der gesamten Tumorzelle unterbrochen werden kann (Weinstein 2002).

Daher führt die Inhibition dieser mutierten Rezeptortyrosinkinase zu sehr deutlichen Tumorregressionen bis hin zu zeitweisen Remissionen. Eine weitere Studie zeigte die Überlegenheit der alleinigen Anti-EGFR Therapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie in selektionierten Patientenpopulationen, die häufig Träger von *EGFR* Mutationen sind (Mok et al. 2009). Für diese Gruppe von Patienten ermöglicht die Verwendung von Anti-EGFR Medikamenten eine verbesserte Wirksamkeit der Therapie bei weit geringeren Nebenwirkungen als die konventionelle Therapie mit unselektiven Cytostatika.

Trotz dieser zunächst eindrucksvollen Therapieerfolge kommt es auch bei Patienten mit *EGFR* Mutationen nach einiger Zeit zu Rezidiven oder einem erneuten Tumorprogress.

Diese Entwicklung beruht auf einer Resistenzentwicklung einiger Tumorzellen gegenüber den Tyrosinkinaseinhibitoren. Hierfür verantwortlich sind am häufigsten sekundäre resistenzvermittelnde *EGFR* Mutationen, die zu einer verstärkten ATP-Bindung der katalytischen Domäne führen, so dass die bisher eingesetzten Substanzen nicht mehr in der Lage sind, die Signaltransduktion an dieser Stelle ausreichend zu unterbrechen. Meist liegt hierbei eine T790M Mutation im *EGFR* Gen vor. Es sind zudem weitere *EGFR* unabhängige resistenzvermittelnde Veränderungen beschrieben (Engelman et al. 2007, Guix et al. 2008). Daher sind die bisher verfügbaren Tyrosinkinaseinhibitoren bei *EGFR* mutierten Tumoren meist in der Lage, eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von durchschnittlich 12 Monaten zu ermöglichen (Jackman et al. 2006). Jedoch bedeutet dieser enorme Fortschritt in der medikamentösen Therapie noch keine kurative Perspektive.

Eine therapiesensibilisierende *EGFR* Mutation findet sich in nur etwa 10% aller nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome in Europa und Nordamerika und tritt mit höherer Frequenz bei Nichtrauchern und bei Vorliegen eines bronchioloalveolären Karzinoms sowie anderer Subtypen des Adenokarzinoms auf (Pao et al. 2004, Blons et al. 2006). Patienten aus dem asiatischen Raum sind häufiger Träger einer *EGFR* Mutation, seltener von *KRAS* Mutationen betroffen und diese profitieren daher mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Wu et al. 2008). Die Ursache dieser geographisch unterschiedlichen Häufigkeit von Mutationen ist nicht bekannt.

Darüberhinaus wurden genetische Veränderungen beschrieben, die eine negative prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine Anti-*EGFR* Therapie besitzen.

### **1.6.3 *KRAS* als prädiktiver Marker**

Untersuchungen von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom konnten zeigen, dass das Auftreten einer Mutation des *KRAS* Gens in Codon 12,13 oder 61 ein Ansprechen auf eine Anti-*EGFR* Therapie unwahrscheinlich macht (Pao et al. 2005, Eberhard et al. 2005) und daher eine *KRAS* Mutation einen negativen prädiktiven Marker für die Therapie des Bronchialkarzinoms mit *EGFR*-Inhibitoren darstellen könnte.

Dies wird auf Ebene der Signaltransduktion dadurch erklärt, dass p21 durch *EGFR* aktiviert wird und so Proliferation und Wachstumsprozesse auslöst. Wird die Tyrosin-

kinaseaktivität von EGFR durch Therapeutika gehemmt, so ist folglich p21ras herunterreguliert und der MAP-Kinase Signalweg gehemmt. Hierdurch nehmen Tumorstadium und Proliferationsrate ab. Kommt es zu einer Punktmutation und damit einhergehenden Strukturveränderung in p21ras die zu seiner konstitutiven Aktivierung führt, ist die Signalübertragung durch den EGF Rezeptor nicht mehr notwendig und p21ras unabhängig von externen Signalen dauerhaft aktiviert.

In dieser Situation ist eine Inhibition des EGF Rezeptors ohne Einfluß auf die Signaltransduktionsaktivität von p21ras. Dies führt zu einer primären Resistenz der mutationstragenden Tumorzellen gegen eine Anti-EGFR Therapie.

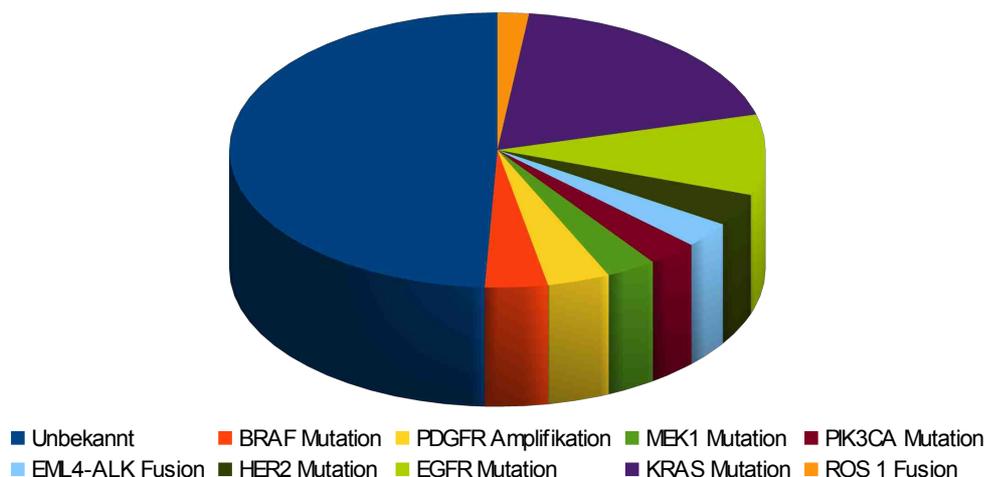
Zudem zeigten Mutationsanalysen von Bronchialkarzinomen, dass diese Tumoren entweder eine *KRAS* oder eine *EGFR* Mutation besitzen, jedoch nur höchst selten beide Gene mutiert sind (Riely 2009, Suda et al. 2010). Dies wird durch die Redundanz der beteiligten Signalwege erklärt, sodass eine Mutation bereits einen ausreichenden Selektions- und Wachstumsvorteil vermittelt. Der Nachweis entweder einer *EGFR* oder *KRAS* Mutation schließt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit die jeweils andere Mutation aus.

Zusammen mit der Beobachtung, dass *EGFR* Mutationen mit fehlender und *KRAS* Mutationen mit starker Tabakrauchexposition assoziiert sind, führt dies zu der Annahme, dass diesen Tumoren unterschiedliche Carcinogeneseprozesse zugrunde liegen und somit unterschiedliche tumorbiologische Eigenschaften vorliegen. *EGFR* und *KRAS* Mutationen zeigten in Studien auch stark verschiedene prognostische Assoziationen (Eberhard et al. 2005, Marks et al. 2008). *KRAS* Mutationen scheinen darüber hinaus ein prognostischer Marker für eine geringere Überlebensrate und ein geringeres Ansprechen auf Chemotherapie zu sein, während Tumoren mit *EGFR* Mutationen anscheinend klinisch weniger aggressiv sind. Ein Teil des verbesserten Überlebens dieser Patienten könnte daher nicht auf der Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren, sondern dem weniger aggressiven Verhalten *EGFR* mutierter Tumoren beruhen.

Die prädiktive Bedeutung der *KRAS* Mutation wurde zuvor bereits für die Anti-EGFR Therapie des metastasierten colorektalen Karzinoms festgestellt (Lievre et al. 2006, Karapetis et al. 2008, Amado et al. 2008). Lediglich Patienten, in deren Tumoren keine aktivierenden *KRAS* Mutationen nachgewiesen werden können, profitieren von einer Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab. Die Gabe dieser Substanzen ist daher nur nach Nachweis des *KRAS* Wild-Typs zugelassen.

Neben der EGF Rezeptormutation und *KRAS* Mutation wurden in der Folge weitere charakteristische genetische Veränderungen in Bronchialkarzinomen identifiziert, die eine zielgerichtete Therapie ermöglichen könnten. Ein weiteres vielversprechendes Beispiel hierfür ist die Inhibition der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) bei Tumoren mit nachgewiesener *EML4-ALK*-Fusion (Solomon et al. 2009, Kwak et al. 2010). Auch in diesem Fall zeigt eine zielgerichtete Therapie bei Nachweis dieser Chromosomenaberration eine gute Wirksamkeit. Leider sind sowohl die *EGFR* Mutation als auch die *ALK*-Fusion relativ seltene Veränderungen, die nur bei wenigen Patienten nachgewiesen werden können.

Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Häufigkeit genetischer Veränderungen des pulmonalen Adenokarzinoms, für das bis zum jetzigen Zeitpunkt zahlreiche charakteristische onkogene Veränderungen beschrieben worden sind. Diese stellen potentielle Zielstrukturen neuentwickelter Therapeutika dar.



**Abbildung 9: Häufigkeit genetischer Veränderungen des Adenokarzinoms**

*Diese Abbildung zeigt die ungefähre Häufigkeit spezifischer genetischer Veränderungen des pulmonalen Adenokarzinoms. Für diese Entität sind zahlreiche charakteristische genetische Veränderungen entdeckt worden. Hierbei treten diese Alterationen fast immer isoliert auf. Es findet sich in Adenokarzinomen also jeweils nur eine dieser Aberrationen. Einige dieser Alterationen können bereits therapeutisch gezielt behandelt werden (EGFR Mutation sowie ALK oder ROS1 Fusion). In der Mehrzahl der Fälle sind jedoch noch keine spezifischen Mutationen oder andere therapeutisch relevante Genveränderungen bekannt (nach Horn et al., aus: Harrison's Principles of Internal Medicine, 18. Auflage, 2011).*

## 2 Hypothese und Fragestellung

Für die Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit Tyrosinkinase- Inhibitoren wurde eine zum Vorgehen beim colorektalen Karzinom analoge Verwendung des *KRAS* Mutationsstatus als negativer prädiktiver Marker vorgeschlagen, um Patienten zu identifizieren, die nicht von einer Behandlung mit Anti-EGFR Medikamenten profitieren (Pao et al. 2005, Massarelli et al. 2007, Baselga und Rosen 2008).

Trotz zahlreicher Studien ist die prädiktive sowie prognostische Relevanz des *KRAS* Mutationsstatus für eine Anti-EGFR Therapie nicht widerspruchsfrei geklärt, da keine eindeutigen Resultate erbracht werden konnten, ob das Vorliegen einer *KRAS* Mutation einen eindeutig negativen Prädiktor für eine Therapie mit EGFR-Inhibitoren darstellt (Jackman et al. 2009, Roberts et al. 2010, Ferte et al. 2010, Langer 2011).

Bisher wurde für die molekularpathologische Analyse des *KRAS* Mutationsstatus die ausgeprägte morphologische und genetische Heterogenität von Lungenkarzinomen nicht berücksichtigt.

Grundsätzlich wird bei bisher klinisch etablierten molekularpathologischen Analysen von malignen Tumoren wie dem Bronchialkarzinom eine einzelne Gewebeprobe zur Gewinnung von Tumor DNA verwendet und diese zur Sequenzierung des relevanten Gens verwendet. Das Ergebnis dieser Analyse eines Tumoreals wird als repräsentativ für alle Tumorzellen gewertet und ist dann gegebenenfalls Grundlage einer Therapieentscheidung.

Diese Vorgehensweise ist jedoch potentiell fehleranfällig bei Tumoren wie dem Bronchialkarzinom, welches morphologisch und genetisch sehr häufig eine starke Heterogenität zeigt (Hirsch et al. 1983, Roggli et al. 1985, Carey et al. 1990, Durnill und Gatter 1986).

Bis zu 50% aller Tumoren zeigen zwei verschiedene histologische Differenzierungen, so dass in diesen Fällen auch heterogene genetische Aberrationen vorliegen können. In derartig heterogenen Karzinomen existieren verschiedene klonale Zellpopulationen, die sich während des Tumorwachstums herausgebildet haben. Die Entstehung verschiedenartiger Zellklone könnte mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen der jeweiligen Tumoranteile einhergehen.

Im Zuge des Tumorwachstums sind Subklone eines Tumors in der Lage, weitere genetische Veränderungen zu erwerben, die einen zusätzlichen Selektions- und Wachstumsvorteil vermitteln können (Schilsky 1987).

Durch diese klonale Evolution entstehen verschiedene Tumorzellpopulationen mit unterschiedlichen genetischen Eigenschaften. (Nowell 1976, Heppner 1984, Tsao et al. 1999.).

Aufgrund dieser Überlegungen ist es denkbar, dass in Bronchialkarzinomen sowohl Areale mit Wild-Typ als auch solche mit mutierten Allelen eines Onkogens wie *KRAS* existieren. Diese Heterogenität würde die widersprüchlichen Resultate von Studien zur prädiktiven sowie prognostischen Relevanz von *KRAS* bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen zum Teil erklären können. Eine heterogene intratumorale Verteilung von *KRAS* Mutationen würde zudem die Möglichkeit einer zukünftigen gezielten Inhibition von p21ras und seiner Effektorproteine deutlich einschränken, da eine spezifische Therapie nicht alle Tumorzellen erfassen könnte.

Taniguchi und Mitarbeiter sowie Sakurada et al. (2008) und Jiang et al. (2008) postulierten, dass *EGFR* Mutationen bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen heterogen verteilt sein können. Homogen mutierte Tumoren prädestinierten nach Verlaufsdaten von Taniguchi et al. (2008) hierbei für eine längere Zeit bis zur Progression der Erkrankung und längere Überlebenszeit unter Anti-EGFR Therapie als heterogene Tumoren, da im Fall der homogenen Verteilung alle Tumorzellen die Zielstruktur dieser Therapie exprimieren.

Analog zu diesen Beobachtungen würden auch heterogen *KRAS* mutierte Tumoren andere diagnostische und therapeutische Maßnahmen erfordern als homogen mutierte Tumoren. Neuere Untersuchungen von Yatabe und Mitarbeitern (2011) legen jedoch nahe, dass die vorgenannten Studien aufgrund einer Pseudoheterogenität durch mutationsallel spezifische Imbalance die Häufigkeit der Heterogenität von *EGFR* Mutationen deutlich überschätzt haben könnten. Hierbei kommt es in *EGFR* mutierten Tumoren zu einer selektiven Amplifikation des mutierten Allels in einigen Tumorebenen. In Gewebeanteilen ohne diese Amplifikation kann daher möglicherweise eine falsch negative Mutationsanalyse erfolgen, wenn das mutierte Allel in zu geringer Konzentration bei der Analyse vorliegt. Hieraus resultiert dann eine Pseudoheterogenität (Yatabe et al. 2011)

Diese Betrachtungen zeigen, dass eine Studie zur Prävalenz intratumoraler Heterogenität einer genetischen Veränderung hochsensitive und präzise Methoden einset-

zen muss, um eine Pseudoheterogenität zu erkennen und valide Resultate zu erreichen.

Ziel dieser Dissertation und der mit ihr verbundenen Studie war es zu untersuchen, ob primäre Bronchialkarzinome eine intratumorale Heterogenität von *KRAS* Mutationen aufweisen und ob eine Heterogenität zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen nachweisbar ist. Die Existenz solcher heterogen mutierter Tumoren hätte eine hohe Relevanz für die Diagnostik und Therapie des Bronchialkarzinoms mit Hilfe prädiktiver Marker wie *KRAS*. Es bestünde bei Weiterverwendung der momentan etablierten Methodik die Gefahr der Fehldiagnose und Vorenthaltung einer potentiell wirksamen Therapie in heterogenen Fällen, die fälschlicherweise als homogen mutiert betrachtet werden.

Eine unerkannte Heterogenität der *KRAS* Mutation in Bronchialkarzinomen könnte zudem die zuvor beschriebenen widersprüchlichen Studienergebnisse zum prädiktiven und prognostischen Wert der *KRAS* Mutation teilweise erklären.

Der Nachweis einer heterogenen Mutationsverteilung würde somit eine neue diagnostische Vorgehensweise bei der Analyse genetischer Parameter des Bronchialkarzinoms notwendig machen. Zur Validierung der Ergebnisse ist eine Methodik notwendig, die in der Lage ist, falsch positive oder falsch negative Mutationsresultate auszuschließen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 40 primäre nicht kleinzellige Bronchialkarzinome in jeweils mehreren verschiedenen Gewebearealen auf das Vorhandensein von *KRAS* Mutationen untersucht. Wenn zudem Lymphknotenmetastasen zur Verfügung standen, erfolgte zusätzlich ein Vergleich des Mutationsstatus zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.

Zu diesem Zweck wurden histologische Schnittpräparate und Paraffinblöcke von insgesamt 380 verfügbaren Tumoren aus den Archiven des Instituts für Pathologie herausgesucht und eine Tumordatenbank erstellt. Die Erstellung dieser Datenbank erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. Tobias Hoenig.

Die jeweiligen Befunde der makroskopischen und mikroskopischen pathologischen Untersuchung und relevante klinische und histopathologische Daten wurden aus der elektronischen Datenbank des Institutes für Pathologie erfasst. Hierzu gehörten die histologische Diagnose, das TNM Stadium, das histologische Grading und Angaben zur Anzahl verfügbarer Tumorblöcke sowie Lymphknotenpräparate.

Tumoren, die nicht sicher als primäre Lungenkarzinome klassifiziert werden konnten, wurden nicht erfasst, um eine Verfälschung der Resultate durch Metastasen anderer Tumorentitäten zu vermeiden.

Um eine mögliche Heterogenität nachzuweisen, wurden pro Tumor mindestens vier verschiedene Blockpräparate analysiert.

Pro Gewebestück wurde jeweils ein Stanzzylinder zur DNA Isolierung und Mutationsanalyse verwendet. Bei 161 der in der Datenbank erfassten Tumoren waren vier oder mehr verschiedene Blockpräparate verfügbar. Aus diesen für die Studie geeigneten Fällen wurden 20 Adenokarzinome, 10 großzellige Karzinome und 10 Plattenepithelkarzinome für eine Mutationsanalyse ausgewählt. Die Selektion erfolgte unabhängig von Faktoren wie Tumorstaging, Grading oder bereits bekanntem *KRAS* oder *EGFR* Mutationsstatus. Wenn möglich wurden Fälle neueren Datums verwendet, da formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe mit längerer Verweildauer eine stärkere DNA Fragmentierung aufweist und hierdurch eine DNA Sequenzierung erschweren kann.

Nr.	Histologie	Grading	TNM-Stadium
1	Adenokarzinom	2	pT1pN2M0
2	Adenokarzinom	3	pT2pN1M0
3	Adenokarzinom	2	pT3pN2M0
4	Adenokarzinom	3	pT2pNM0
5	Adenokarzinom	3	pT2pN1M0
6	Adenokarzinom	2	pT2pN2M0
7	Adenokarzinom	3	pT2pN2M0
8	Adenokarzinom	2	pT2pN2M0
9	Adenokarzinom	3	pT2pN1M0
10	Adenokarzinom	3	pT2pN2M0
11	Adenokarzinom	2	pT2pN2M0
12	Adenokarzinom	3	pT2pN2M0
13	Adenokarzinom	3	pT2pN1M0
14	Adenokarzinom	2	pT2pN2M0
15	Adenokarzinom	2	pT2pN2M0
16	Adenokarzinom	2	pT1pN0M0
17	Adenokarzinom	1	pT1pN1M0
18	Adenokarzinom	2	pT4pN0M0
19	Adenokarzinom	3	pT2pN1M0
20	Adenokarzinom	3	pT2pN3M0
21	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN0M0
22	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN2M0
23	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN0M0
24	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN0M0
25	Großzelliges Karzinom	4	pT1pN2M0
26	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN0M0
27	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN1M0
28	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN1M0
29	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN2M0
30	Großzelliges Karzinom	4	pT2pN1M0
31	Plattenepithelkarzinom	3	pT2pN1M0
32	Plattenepithelkarzinom	2	pT2pN1M0
33	Plattenepithelkarzinom	3	pT3pN1M0
34	Plattenepithelkarzinom	2	pT2pN1M0
35	Plattenepithelkarzinom	3	pT1pN1M0
36	Plattenepithelkarzinom	3	pT4pN2M0
37	Plattenepithelkarzinom	2	pT2pN0M0
38	Plattenepithelkarzinom	3	pT1pN0M0
39	Plattenepithelkarzinom	3	pT4pN1M0
40	Plattenepithelkarzinom	2	pT4pN1M0

**Tabella 3:** *Klinisch-pathologische Daten der untersuchten Karzinome*

Bei allen 40 Fällen wurden zunächst vier verschiedene Tumorblöcke auf die zuvor beschriebene Weise analysiert. Bei Verfügbarkeit von Lymphknotenmetastasen wurde neben mehreren Blöcken des Primärtumors auch Gewebe aus metastatischen Lymphknoten untersucht. Dies war bei 18 Tumoren möglich. Als mutiert wurde ein Tumor gewertet, wenn in mindestens einem der untersuchten Blöcke eine mutierte Sequenz im *KRAS* Gen nachgewiesen werden konnte.

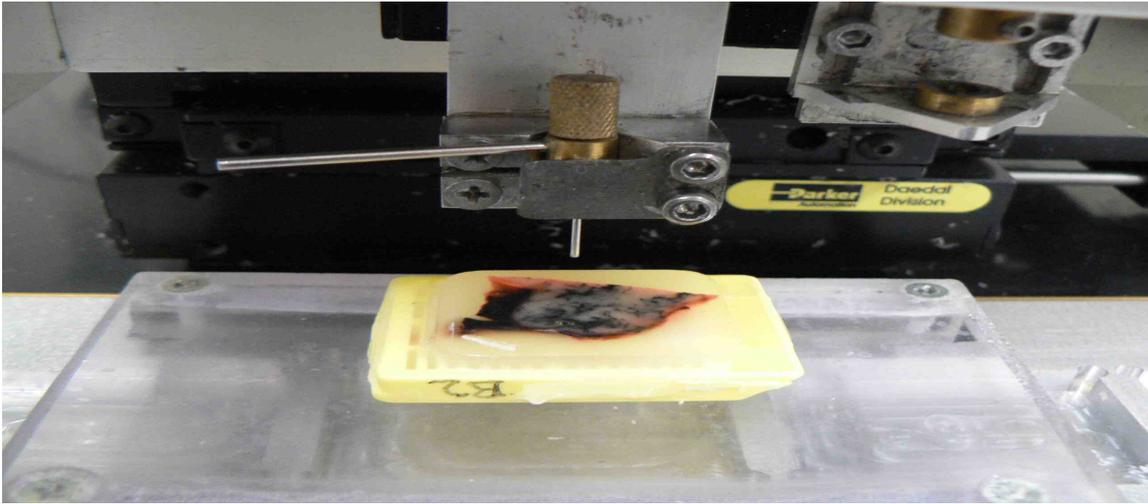
Bei allen mutationstragenden Tumoren wurden, wenn verfügbar, weitere zusätzliche Paraffinblöcke untersucht. Hierbei wurden bis zu vier zusätzliche Tumorstanzen analysiert. Dies erfolgte, um eventuell weitere heterogene Areale zu entdecken oder um zu zeigen, dass Tumoren auch in vielen verschiedenen Gewebsarealen homogen mutiert sein können.

Diskrepante Resultate der Mutationsanalyse wurden dann durch Analyse nach Anreicherung des Tumorgewebes durch lasergestützte Mikrodissektion sowie mit Hilfe einer hochsensitiven, mutationsspezifischen Real-Time-PCR erneut überprüft, um die Resultate zu verifizieren und eine mögliche Pseudoheterogenität auszuschließen.

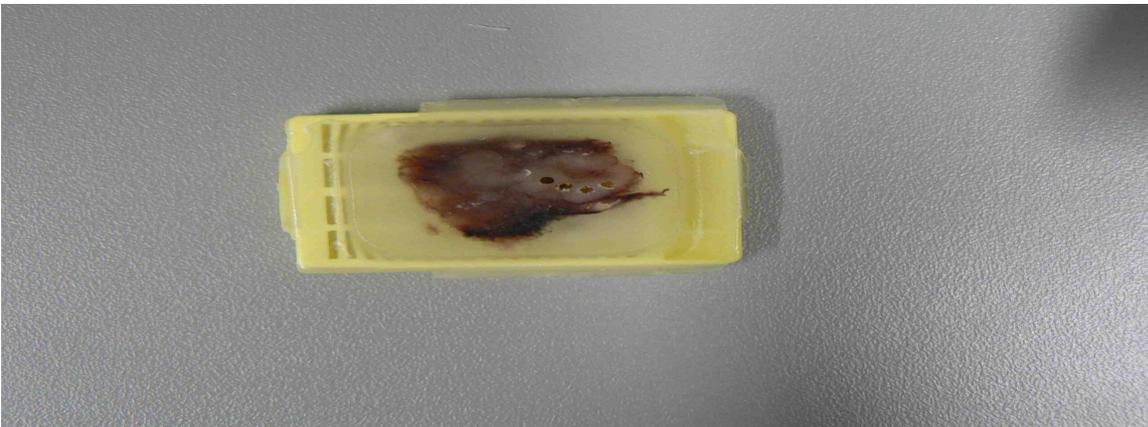
### **3.2 Gewebeentnahme**

Zur Probengewinnung wurde aus jedem der ausgewählten Tumorblöcke eine Gewebestanze mit einem Durchmesser von 0,6mm entnommen und in einem 2mL Eppendorf Tube aufgefangen. Hierzu wurde ein halb automatischer Tissue-Micro-Arrayer verwendet (Abbildung 10). Zur Lokalisation des Tumorgewebes auf den Paraffinblöcken (Abbildung 11) wurde das zugehörige histologische Schnittpräparat als Schablone verwendet, auf dem das Tumorgewebe durch einen Pathologen zuvor markiert worden war.

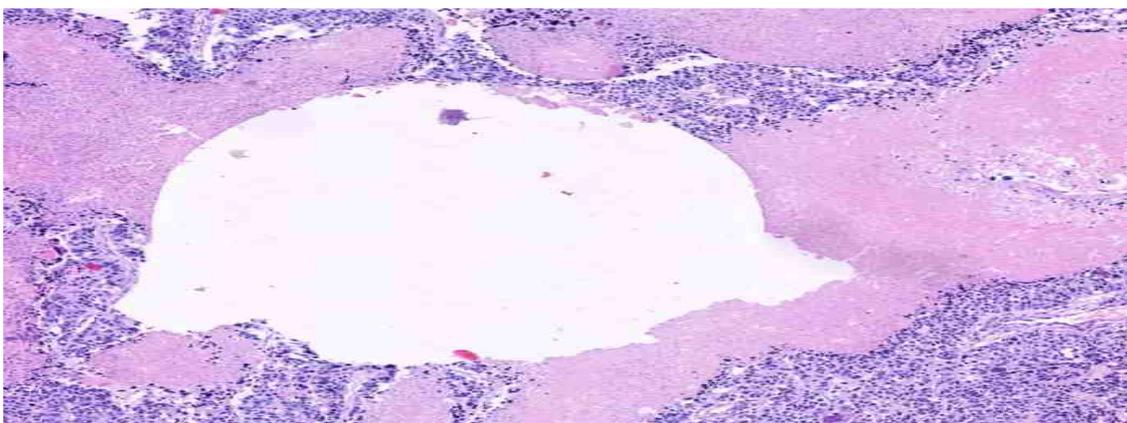
Abbildung 12 zeigt exemplarisch ein histologisches Bild eines solchen gestanzten Tumorareals. Aus den Stanzzyindern erfolgte dann nach Entparaffinierung die DNA Extraktion und mit dieser wurde die Sequenzierung von *KRAS* Exon 2 durchgeführt.



**Abbildung 10:** Halbautomatischer Tissue Microarrayer mit Tumorblock unter einer 0,6mm Stanznadel



**Abbildung 11:** Tumorblock nach mehreren Stanzbiopsien. Das Tumorgewebe ist als unscharf begrenztes, weißliches Areal bereits makroskopisch abgrenzbar.



**Abbildung 12:** Histologisches Bild eines Adenokarzinoms der Lunge nach Entnahme einer 0,6mm Gewebsstanze.

### 3.3 DNA Extraktion

Vor Isolation der DNA aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe ist ein Verfahren zur Entparaffinierung und die Zugabe eines Gewebelysators sowie einer Endopeptidase (Proteinase K) notwendig. Diese Peptidase spaltet zelluläre Proteine und inaktiviert DNasen. Dies verbessert die Ausbeute der DNA Extraktion.

#### Laborprotokoll Entparaffinierung

- Stanzen mit 100µL Xylol bedecken
- 5 Minuten stehen lassen
- Zentrifugation bei 13.200U/min für 5 Minuten
- Überstand abziehen
- Prozedur wiederholen
- 100µL Ethanol hinzugeben
- Zentrifugation bei 13.200 U/min für 10 Minuten
- Überstand abziehen
- Prozedur wiederholen
- Trocknen bei 70°C für 10 Minuten im Heizblock
- Hinzugabe von 40µL ATL-Pufferlösung (Qiagen, Hilden) zur Lysierung des Gewebes und 10µL Proteinase K (Qiagen,Hilden)
- Aufmischen des Pellets mit der Pipettenspitze
- Verdau über Nacht im Wasserbad bei 56°C

Aus diesen so behandelten Proben wurde dann DNA mit dem QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Das Extraktionsverfahren beruht auf einer Trennung der DNA von den übrigen Gewebesbestandteilen durch Zentrifugation in einer Säule, welche eine Silicatmembran enthält, an die DNA Moleküle spezifisch binden. Da sehr geringe Mengen Gewebe eingesetzt wurden, wurde Carrier RNA (cRNA) zur Verbesserung der Ausbeute verwendet. Der Einsatz von cRNA führt zur stärkeren Bindung der DNA an die Membran und verbessert so die Ausbeute des Extraktionsprozesses erheblich.

## Laborprotokoll für die DNA Extraktion mit dem QIAamp DNA Micro Kit

- Proben 1 Minute bei 13.200 U/min zentrifugieren
- Pellet mit 5µL Proteinase K aufmischen
- 1h bei 56°C verdauen
- 1 Minute bei 13.200 U/min zentrifugieren
- 50µL AL+1µL cRNA dazugeben
- kurz vortexen (15x pulsvortexen)
- 50µL Ethanol dazugeben
- kurz vortexen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Probe auf die Säule geben
- Säule 1 Minute bei 8.000 U/min zentrifugieren
- Säule in neues Tube stellen, 500µL Puffer AW1 dazugeben, zentrifugieren bei 8.000U/min für 1 Minute
- Säule in neues Tube stellen, 500µL AW2 dazugeben, zentrifugieren bei 8.000U/min für 1 Minute
- Säule in 1,5mL Eppendorf Tube mit abgeschnittenem Deckel stellen und 3 Minuten bei 13.200 U/min trocken zentrifugieren
- Säule in Elutionseppendorftube stellen, 20µL Wasser dazugeben
- 5min bei Raumtemperatur inkubieren lassen, anschließend 1 Minute bei 13.200U/min zentrifugieren

Anschließend wurde die DNA Menge und Reinheit mit dem Nanodrop Photometer (Peqlab) gemessen. Als Maß der Reinheit der DNA wird die Absorption der Lösung bei 260nm und 280nm photometrisch gemessen.

Reine DNA hat ein Absorptionsverhältnis 260nm/280nm im Bereich von 1,8-2.

Die durch diesen Extraktionsprozeß gewonnene Tumor DNA wurde dann für die Analyse des *KRAS* Mutationsstatus verwendet.

### 3.4 PCR

98% aller onkogenen Punktmutationen von *KRAS* in Lungenkarzinomen finden sich in den Codons 12 und 13 des *KRAS* Exons 2 (COSMIC Database, Forbes et al. 2006). Es sind auch Mutationen in Exon 3, Codon 61 beschrieben. Diese sind jedoch

sehr selten (Rodenhuis und Slebos 1992). Daher wurde aus praktischen Erwägungen nur Exon 2 des *KRAS* Gens sequenziert.

Zur Sequenzierung eines Gens ist zunächst dessen Vervielfältigung durch die Polymerase-Kettenreaktion notwendig. Hierbei wird durch eine hitzestabile DNA Polymerase unter Zugabe der notwendigen Nukleotidbausteine und geeigneter Primer spezifisch ein durch die Primersequenzen definierter DNA Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Diese Amplifikate sind dann einer Detektion durch ein Elektrophoreseverfahren zugänglich.

### **Primersequenzen der PCR für *KRAS* Exon 2:**

forward: 5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'

reverse: 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'

Es wurde die hitzestabile DNA-Polymerase AmpliTaqGold® (Applied Biosystems) verwendet.

Für die PCR wurde ein Ansatzvolumen von 25µL mit 100 ng genomischer Tumor-DNA (Konzentration:50 ng/µL) verwendet. Ein Ansatz enthält:

- 2 µL Template DNA
- 3 µL Pufferlösung
- 2 µL dNTPs
- 1 µL Primer
- 0,3 µL DNA Polymerase AmpliTaqGold
- 17,7 µL H<sub>2</sub>O

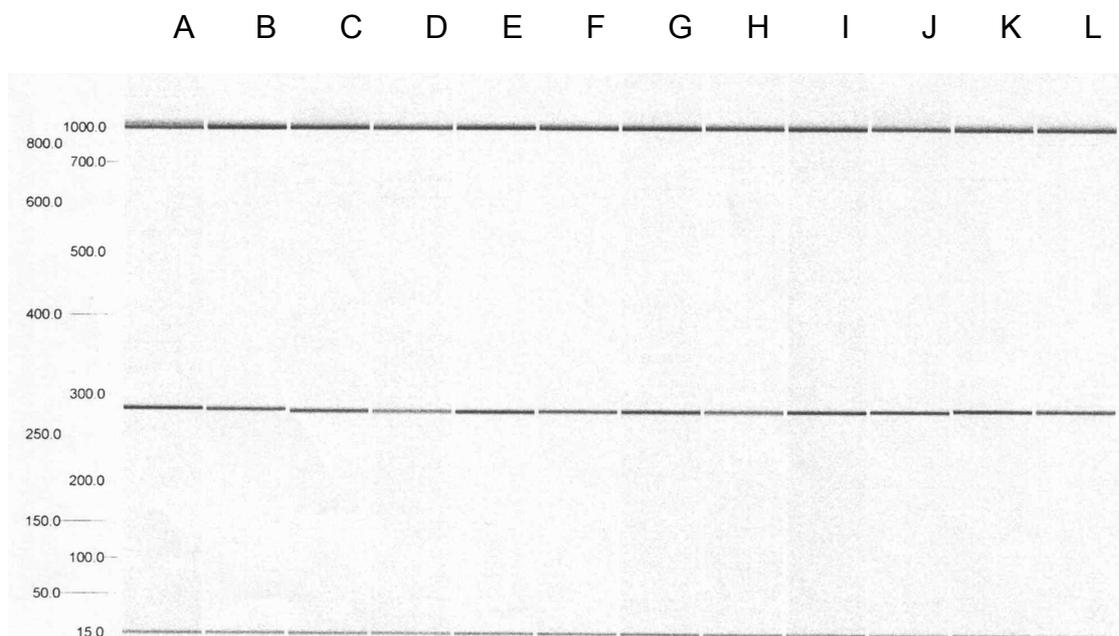
Nach Ansatz der PCR wurden 34 Zyklen mit folgenden Schritten in einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt:

- Denaturierung: 95°C für 20 Sekunden
- Primer Annealing: 58°C für 20 Sekunden
- Elongation: 72°C für 40 Sekunden

## Nachweis der PCR Produkte

Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation des *KRAS* Exons 2 wurde eine Kapillarelektrophorese mit dem QIAxcel Elektrophoresesystem (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Nukleotidfragmente entsprechend ihrer Größe durch das elektrische Feld und sind dadurch charakterisierbar. Die hier verwendete Elektrophoresemethode ermöglicht die automatisierte Auswertung mit Bestimmung der Größe der Amplifikate. Ein Beispiel für die Auswertung eines solchen Nachweises ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13:** Ausdruck der computergestützten Auswertung einer PCR mittels Kapillarelektrophorese. Die Laufbahnen A-L repräsentieren die Elektrophorese je einer Probe. Deutliche Banden bei ca. 280bp zeigen eine erfolgreiche Amplifikation von *KRAS* Exon 2. Die Banden bei 0 und 1000bp resultieren aus der Verwendung eines Laufmarkers zur Erzeugung von Referenzbanden.

Nach dem erfolgreichem Amplifikationsnachweis wurden die PCR Produkte für eine möglichst präzise Sequenzierung von störenden dNTPs und Primern durch die Behandlung mit der ExoSAP Reagenz (USB Products, High Wycombe, UK) befreit. Dies ist ein Enzymgemisch aus Exonuclease 1 und Shrimp Alkaline Phosphatase, welches einzelsträngige Nukleotide spaltet. Hierzu wurden 5µL des PCR Ansatzes mit 2µL ExoSAP Reagenz in einem Thermocycler bei 37°C für 15 Minuten behandelt. Danach sorgte eine Inkubation bei 80°C für 15 Minuten für die Inaktivierung der ExoSAP Rea-

genz. Die so behandelten Ansätze wurden dann mit der DNA Sequenzierungsmethode nach Sanger analysiert.

### 3.5 Sequenzierung von KRAS Exon 2

Die Sequenzierung eines DNA Abschnitts nach Sanger beruht auf dem partiellen Einbau von markierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) in die neusynthetisierten Amplifikate der gesuchten Sequenz. Die ddNTPs besitzen keine freie 3' Hydroxyl-Gruppe und ihr Einbau in ein Nukleotid führt daher zum vorzeitigen Kettenabbruch. Es entsteht ein Gemisch von Nukleotiden verschiedener Länge, deren letztes eingebautes Nukleotid jeweils detektiert werden kann (Sanger et al. 1977) . Die laseroptische Detektion fluoreszenzmarkierter Nukleotide und die Bestimmung ihrer Länge mittels Kapillarelektrophorese erlaubt dann die Ermittlung und Darstellung der DNA Sequenz (Smith et al. 1986).

Analog zur PCR wird auch bei diesem Verfahren eine DNA Amplifikation durchgeführt, in diesem Fall jedoch nur linear mit einem Sequenzierprimer. Ein Sequenzieransatz enthielt folgende Bestandteile:

- 7 µL ExoSAP behandeltes PCR Produkt
- 1 µL Sequenzierprimer 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'
- 2 µL Big Dye (Big Dye Terminator cycle sequencing Kit Version 1.1 Applied Biosystems)
- 6 µL Sequenzierpuffer
- 4 µL H<sub>2</sub>O

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Mastercycler 35 Zyklen lang durchgeführt.

Ein Zyklus beinhaltete folgende Schritte:

- 95°C für 10 Minuten
- 95°C für 10 Sekunden
- 55°C für 10 Sekunden
- 60°C für 2 Minuten

## **DNA Fällung**

Die markierte DNA musste nun für die Detektion vorbereitet werden. Hierzu wurde sie mit Ethanol gefällt. Durch dieses Vorgehen gelingt eine Konzentrierung der DNA durch Trennung von Oligonukleotiden und Proteinen.

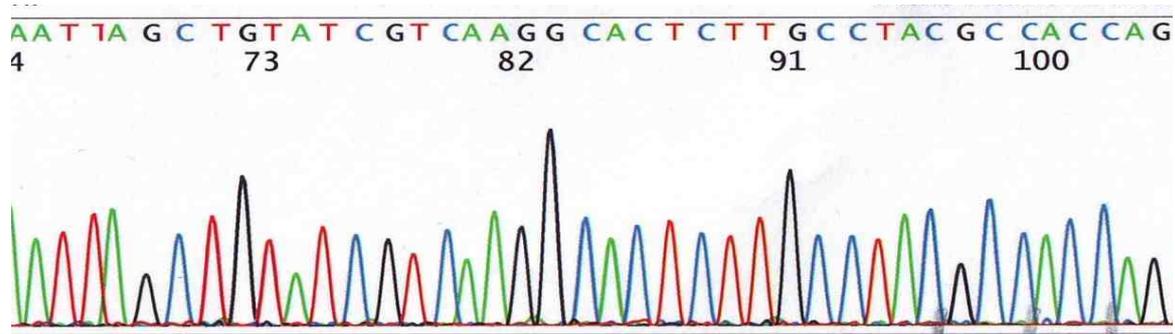
### **Laborprotokoll für die DNA Fällung**

- Ansatz in 2mL Eppendorf Tube:
- 20µL Sequenzierreaktion
- 17 µL Natriumacetat
- 170 µL H<sub>2</sub>O
- 500µL Ethanol
- Vortexen und schwenken
- Zentrifugation bei 4°C für 20 Minuten bei 14.000 U/min
- Sorgfältiges Absaugen ohne Entfernung des DNA Pellets

Die so vorbereiteten Proben konnten dann nach Versetzung mit Formamid mittels eines Sequenziergeräts (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems) ausgewertet werden.

Dieses Sequenziergerät detektiert mittels Kapillarelektrophorese die Länge der durch die Sequenzierreaktion erzeugten Nukleotide und erkennt durch Laserabtastung den Farbstoff des jeweils eingebauten Didesoxynukleotids.

Mithilfe einer computergestützten Analysesoftware ist so ein Ausdruck der automatisch ermittelten DNA Sequenz möglich. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 8 dargestellt. Die so erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin durch Abgleich mit Referenzsequenzen ausgewertet. Bei nicht eindeutig mutierten oder durch DNA Überladung nicht auswertbaren Sequenzen wurde das Sequenzierverfahren wiederholt. Wenn dies kein eindeutiges Resultat ergab, wurde erst die PCR und dann die Sequenzierreaktion nochmals durchgeführt.



**Abbildung 14:** Beispiel einer Sequenzanalyse von *KRAS* Exon 2. Abgebildet ist eine Wildtypsequenz. Jedes Farbsignal ist einem Nukleotid zugeordnet, die Sequenz ist somit eindeutig auswertbar. Aufgrund der reversen Sequenzierung ist die Sequenz von rechts nach links zu lesen und es sind die komplementären Basen der Originalsequenz ermittelt worden. So ist die Sequenz von Codon 12 (GGT) hier (Position 103-100) CCA.

Im Falle einer Basensubstitution in Codon 12 oder 13 wurde dann überprüft, welche Aminosäure durch das neu entstandene Basentriplett kodiert wird. Im allgemeinen sind Mutationen des *KRAS* Gens in Bronchialkarzinomen stets Missense Mutationen, es findet also durch jede Punktmutation eine Veränderung der kodierten Aminosäure statt. Im Wildtyp des *KRAS* Gens kodieren Codon 12 (GGT) und Codon 13 (GGC) jeweils die Aminosäure Glycin.

### 3.6 Validierungsstudie

Bei heterogenen Resultaten wurde eine erneute Untersuchung zur Bestätigung der Resultate und zum Ausschluß von falsch positiven oder falsch negativen Mutationsergebnissen durchgeführt. Falsch positive Ergebnisse können durch eine Kontamination mit DNA aus einer anderen Probe oder eine fehlerhafte Replikation durch die DNA Polymerase bedingt sein. Bei einer zu geringen Menge eingesetzter DNA sind ebenfalls artifizielle Basensubstitutionen beschrieben (Franklin et al. 2010).

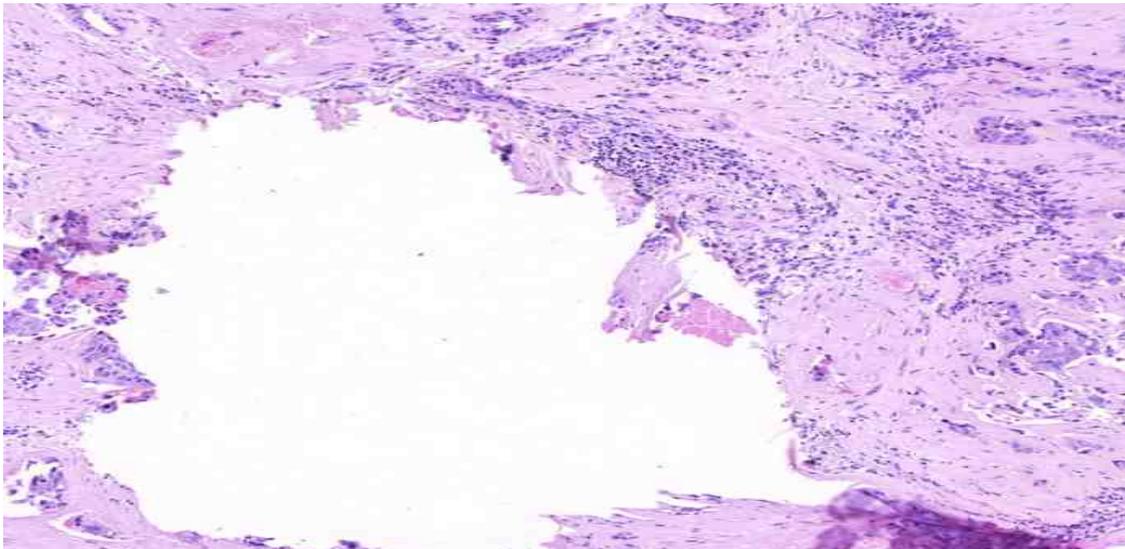
Die Sequenzierung nach Sanger besitzt nur eine relativ geringe Sensitivität. Der falsch negative, irrtümliche Nachweis einer Wildtyp Sequenz bei tatsächlich vorliegender Mutation durch eine unzureichende Menge an Tumor DNA in Folge einer Kontamination mit nicht malignen Zellen ist deshalb bei den hier untersuchten Tumoren eine potentielle Fehlerquelle.

Onkogene Mutationen wie die *KRAS* Mutation besitzen einen dominanten Effekt. Daher ist ein mutiertes Allel hinreichend für einen onkogenen Effekt auf das Proliferati-

onsverhalten und die nachgewiesenen Mutationen sind im Allgemeinen somit stets heterozygot. In einem homogen mutierten Tumor finden sich also 50% mutierte Allele. Die hier verwendete Sequenziermethode ist ab einer Menge mutierten Allels von ca. 20% sensitiv. Bei heterozygoten Mutationen ist somit ein Tumorzellanteil von wenigstens 40% zum Nachweis notwendig. Diese Menge ist bei bestimmten Tumoren durch Gewebegewinnung mit einer Stanzbiopsie oder ähnlichen Verfahren wie der Makrodissektion nicht mit Sicherheit gewährleistet.

Problematisch ist vor allem die Untersuchung von diffus wachsenden Tumoren, da in diesen Fällen durch eine Gewebsstanze ein ausreichender Anteil an Tumorzellen nicht immer erreichbar ist. Abbildung 15 zeigt ein derartiges Beispiel. Ebenfalls schwierig zu untersuchen sind Tumoren, die große Areale fibrotischen oder nekrotischen Gewebes enthalten.

Desweiteren sind Karzinome mit ausgedehnten leukozytären Infiltraten häufig anzutreffen, bei deren Untersuchung ebenfalls eine Verfälschung der Mutationsanalyse durch einen zu hohen Anteil an nicht malignen Zellen zu bedenken ist.



**Abbildung 15:** Histologie eines diffus wachsenden Bronchialkarzinoms. Vereinzelte Anteile eines Plattenepithelkarzinoms mit leukozytären Infiltraten, nekrotischen Arealen sowie ausgedehntem Tumorstroma nach erfolgter Stanzbiopsie.

### 3.6.1 Lasergestützte Mikrodissektion

Aus diesen Gründen wurde für die Validierung der Resultate in allen potentiell heterogenen Tumorarealen eine DNA Extraktion und erneute Sequenzierung nach lasergestützter mikroskopischer Mikrodissektion durchgeführt. Hierzu wurde ein PALM Micro Beam Laser System (Zeiss Microimaging) verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht eine mikroskopische Selektion und Isolierung von Tumorzellen aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika und muss daher von einem erfahrenen Pathologen durchgeführt werden (Fend und Raffeld 2000). Hierdurch ist eine ausreichend hohe Tumorzellkonzentration auch bei schwierig zu untersuchenden Fällen erreichbar. Die Mikrodissektion wurde von Herrn Dr. Dr. Tobias Grob und Herrn Dr. Till Clauditz durchgeführt.

Die lasergestützte Mikrodissektion beruht auf dem Heraustrennen der gewünschten Gewebebestandteile aus einem speziell angefertigten, nicht eingedeckelten Schnittpräparat durch ein Lasersystem unter mikroskopischer Kontrolle. Die am Monitor markierten Zellen werden durch einen Laserimpuls aus dem Gewebe herausgelöst und direkt in ein Auffanggefäß befördert. Auf diese Weise ist eine Anreicherung von Tumorzellen mit minimaler Beimengung von nicht malignen Zellen möglich.

Aus den so isolierten Zellen wurde nach folgender Arbeitsanweisung DNA mittels des QIamp DNA Laser Micro Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert:

#### **Laborprotokoll: DNA Extraktion mit dem QIAamp DNA Laser Micro Kit**

- Deckel des Auffangtubes entfernen
- 15 µL ATL auf den Deckel geben
- 15µL ATL und Zellen in ein 0,2 mL Tube geben
- 10µL Proteinase K dazugeben, mit Pipettenspitze aufmischen, mit Parafilm abdecken. Verdau bei 56°C über Nacht.
- 25µL ATL in die Probe geben
- 50µL AL+1µL cRNA dazugeben, 15x pulsvortexen
- 50µL Ethanol dazugeben, 15x pulsvortexen
- 5min bei RT inkubieren, 5 Sekunden zentrifugieren
- Probe auf die Säule geben
- Säule 1min bei 8000 U/min zentrifugieren

- Säule in neues Tube stellen, 500µL Puffer AW1 dazugeben, zentrifugieren bei 8.000 U/min für 1 Minute
- Säule in neues Tube stellen, 500µL AW2 dazugeben, zentrifugieren bei 8.000 U/min für 1 Minute
- Säule in 1,5 mL Eppendorf Tube mit abgeschnittenem Deckel stellen und 3min bei 13.200 U/min trocken zentrifugieren
- Säule in Elutionstube stellen, 20µL Wasser dazugeben
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen, anschließend 1 Minute bei 13.200 U/min zentrifugieren
- Anschließend DNA Konzentration und Reinheit am Nanodrop (Pepqab) messen.

Durch dieses Verfahren war die Isolation von DNA aus mikrodisektierten Proben mit einem Tumorzellanteil von mindestens 90% möglich. Mit dieser wurde dann mit den bereits beschriebenen Methoden eine Sequenzanalyse durchgeführt.

Bei einem abweichenden Ergebnis der erneuten Analyse durch dieses Bestätigungsverfahren vom ursprünglichen Resultat der ersten Sequenzierung wurde das Ergebnis der ersten Sequenzierung auf Grundlage der Stanzbiopsie als falsch positiv oder falsch negativ gewertet.

### **3.6.2 Real-Time-PCR**

Als ein zweites Verfahren zur Validierung der Mutationsanalyse wurde eine mutationsspezifische Real-Time-PCR benutzt. Hierzu wurde das TheraScreen KRAS Kit ® (DxS Diagnostics, Manchester) verwendet. Diese Methode erlaubt den hoch sensitiven Nachweis von KRAS Mutationen bis hin zu einer Konzentration mutierten Allels von lediglich 1%. Mittels dieses weiteren Bestätigungstests konnten so falsch negative Resultate ausgeschlossen werden, da so auch bereits sehr geringe Anteile mutierter Tumorzellen messbar sind. Diskrepante Resultate nach der Analyse durch direkte Sequenzierung wurden erneut mittels TheraScreen Kit untersucht.

Zudem wurde in allen 40 Tumoren jeweils mindestens ein Gewebeareal mittels TheraScreen untersucht, um die Resultate der direkten Sequenzierung zu bestätigen und im Falle eines Wildtyp Resultats in der direkten Sequenzierung einen geringen Anteil mutationspositiver Tumorzellen nachweisen zu können.

Für die Mutationsanalyse mit dieser Methodik wurde die aus den Stanzbiopsien gewonnene DNA verwendet.

#### **Aufbau des TheraScreen *KRAS* Kits:**

Das TheraScreen *KRAS* Kit ist ein kommerziell vertriebenes System zur *KRAS* Mutationsanalyse, welches das ARMS System zur Amplifikation verwendet (Newton et al., 1989).

Dieses System beruht auf einer mutationsspezifischen Real-Time PCR, bei welcher lediglich mutierte Allele des *KRAS* Gens selektiv amplifiziert werden. Hierdurch ist eine Detektion von sehr geringen Mengen mutierten Allels bishin zu einem Anteil von lediglich 1% möglich. Durch die Mutationsspezifität der Genamplifikation ist eine Sequenzierung des Gens nicht notwendig.

Das TheraScreen System ist in der Lage, sieben verschiedene *KRAS* Mutationen in den Codons 12 und 13 zu detektieren.

<b>Mutation</b>	<b>Basensubstitution</b>
G12A	GGT <sup>→</sup> G <u>C</u> T
G12D	GGT <sup>→</sup> G <u>A</u> T
G12R	GGT <sup>→</sup> <u>C</u> GT
G12C	GGT <sup>→</sup> <u>I</u> GT
G12S	GGT <sup>→</sup> <u>A</u> GT
G12V	GGT <sup>→</sup> G <u>I</u> T
G13D	GGC <sup>→</sup> G <u>A</u> C

**Tabelle 4:** Detektierte Mutationen durch das TheraScreen Kit

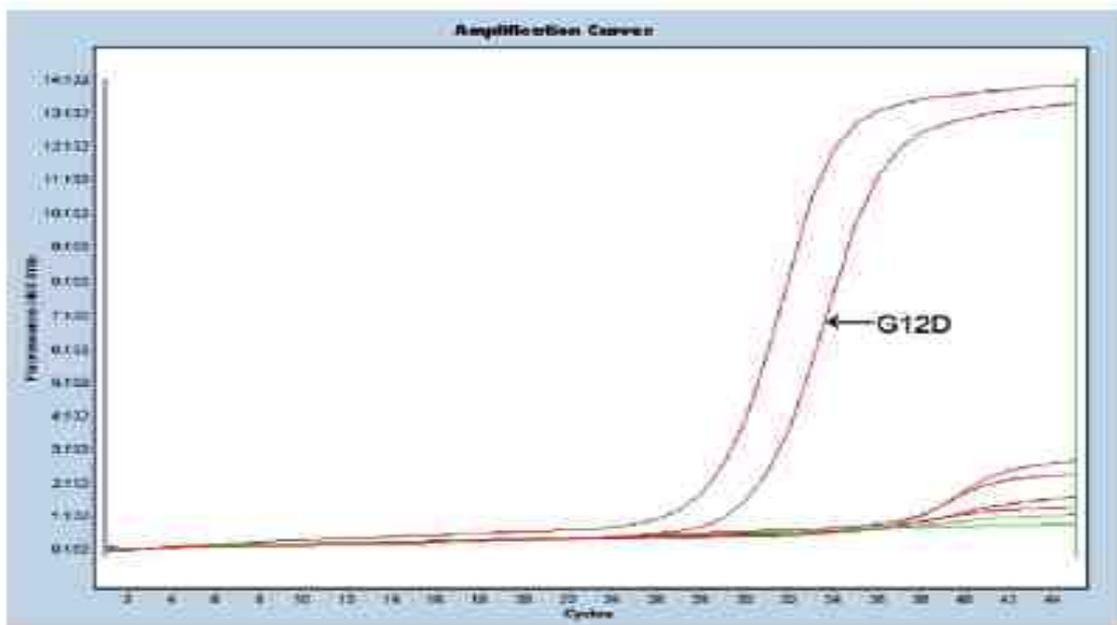
Die Detektion erfolgt durch sogenannte Scorpions. Diese bifunktionellen Moleküle bestehen aus einem PCR Primer, welcher kovalent mit einer Fluoreszenzsonde verbunden ist (Thelwell et al. 2000).

Bindet der Primer an das Amplifikat, wird der Fluoreszenzbestandteil des Moleküls freigesetzt und erhöht somit die messbare Fluoreszenz im Reaktionsgefäß. Somit ist die Stärke der Fluoreszenz proportional zur Menge des gesuchten Amplifikats.

Es wird die Anzahl der benötigten PCR Zyklen ermittelt, durch welche ein messbares Fluoreszenzsignal entsteht, welches über das Maß der Hintergrundfluoreszenz hinausgeht. Dieser Wert wird als Cycle treshold (Ct) bezeichnet. Je

höher die Konzentration des selektiv amplifizierten DNA Abschnitts in der Ausgangsprobe ist, desto weniger Amplifikationszyklen werden benötigt. Dementsprechend geringer ist der Ct-Wert. Als Kontrollassay wird eine Amplifikation von *KRAS* Exon 4 durchgeführt.

Die Differenz dieses Wertes zwischen dem Mutationssassay und Kontrollassay der Probe wird als  $\Delta C_t$  bezeichnet. Liegt dieser unter dem 1%  $\Delta C_t$  Wert, wird das Ergebnis als Nachweis einer Mutation gewertet.



**Abbildung 16:** Graphische Darstellung der Fluoreszenzmessung des TheraScreen

Verfahrens: Aufgetragen ist die Anzahl der Amplifikationszyklen gegen das Maß der Fluoreszenz. Der Zykluspunkt, an welchem der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz beginnt, wird als Cycle threshold bezeichnet. Die Kurve auf der linken Seite zeigt den Amplifikationsvorgang für den Kontrollassay (*KRAS* Exon 4). Die Kurve rechts daneben resultiert aus der Amplifikation einer Probe, die ein mutiertes *KRAS*-Allel enthält. (Franklin et al. 2010)

## **Anwendung des Thera-Screen Kits**

Für die Analyse mittels des TheraScreen Kits wurden jeweils 10 Proben in einem Durchlauf analysiert. Hierbei wurde ein 96 *well plate* verwendet. Die Proben wurden jeweils zu den sieben mutationsspezifischen Reaktionsgemischen und zu einem Kontrollgemisch gegeben. Zudem erfolgte zusätzlich jeweils eine Negativ- sowie Positivkontrolle für jeden Mutationsassay. Für die Durchführung der PCR wurde ein Light Cycler® 480 System (Roche Diagnostics) und zur Auswertung die Light Cycler® Adapt Software V1.1 (Roche Diagnostics) verwendet.

Folgende Reaktionsbedingungen lagen der Real-Time-PCR zugrunde:

- 95°C für 4 Minuten
- 45 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und Annealing bei 60°C für eine Minute
- Detektion der Fluoreszenz nach jedem Zyklus

Die Auswertung der Resultate erfolgte dann durch die zugehörige Light Cycler Software, welche für jeden Probendurchlauf den jeweiligen Ct Wert ermittelte. Hieraus erfolgte automatisch die Berechnung des  $\Delta Ct$ -Werts als Differenz der Ct-Werte von Kontrollassay und Mutationsassay. Auf Grundlage dieses Werts wurde die Probe als mutiert oder Wildtyp gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Mutationsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde der *KRAS* Mutationsstatus von 40 primären Bronchialkarzinomen und dazugehörigen Lymphknotenmetastasen in jeweils mindestens vier verschiedenen Gewebearealen ermittelt. In allen untersuchten Fällen war eine Amplifikation von *KRAS* Exon 2 durch PCR oder Real-Time-PCR möglich und es konnte eine eindeutig auswertbare Sequenz erlangt werden.

13 der 40 untersuchten Tumore (32,5%) zeigten eine *KRAS* Mutation.

9 von 20 Adenokarzinomen (45%), 4 von 10 großzellig undifferenzierten Karzinomen (40%) und keines von 10 Plattenepithelkarzinomen wiesen eine *KRAS* Mutation auf. In allen 13 dieser Fälle ergab die Mutationsanalyse in allen untersuchten Gewebeblöcken einen Mutationsnachweis. Diese Tumoren zeigten in verschiedenen Abschnitten jeweils dieselbe Mutation mit identischem Basenaustausch. Diese Homogenität wurde in acht verschiedenen Tumorblöcken bei fünf der untersuchten Karzinome beobachtet. In allen Tumoren mit homogener Verteilung von Mutation oder Wildtyp konnte dieses Resultat in mindestens einem Gewebeareal mittels Real-Time-PCR bestätigt werden.

Die primäre Untersuchung mittels direkter Sequenzierung nach Sanger ergab vier potentiell heterogene Tumoren. In diesen Fällen lagen jeweils mehrere Areale mit Mutationsnachweis und ein Tumorblock mit Wildtyp vor.

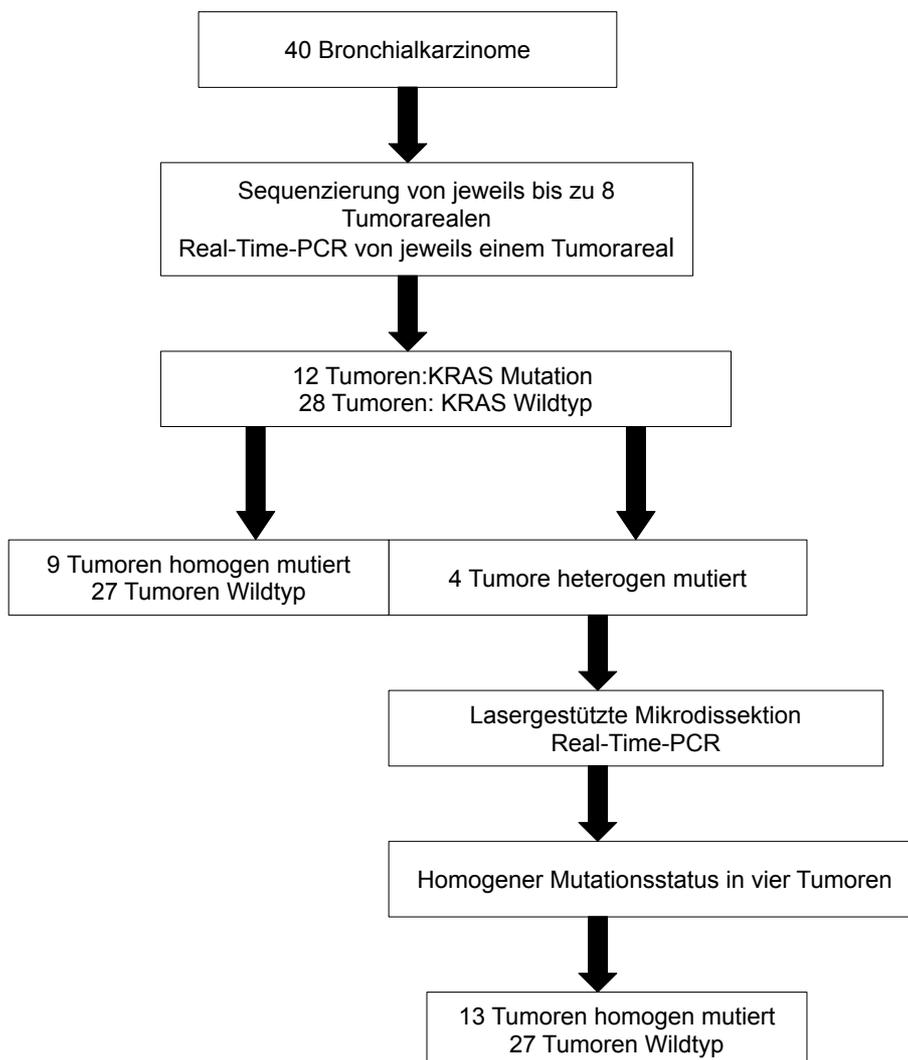
Reanalysen nach Mikrodissektion und mittels Real-Time-PCR zeigten in allen vier Fällen falsch negative Mutationsanalysen in der ersten Untersuchungsreihe, vermutlich aufgrund eines unzureichenden Tumorzellanteils. Bei vier Tumoren waren diese Methoden damit in der Lage, eine Pseudoheterogenität nachzuweisen. Somit zeigten alle 40 Tumoren nach Validierung einen homogenen *KRAS* Mutationsstatus. Tabelle 5 zeigt die Resultate der Sequenzanalyse nach Überprüfung der Resultate durch die Validierungsverfahren. Mit (L) gekennzeichnet sind hierbei Gewebeblöcke aus Lymphknotenmetastasen.

Zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen zeigte sich ebenfalls in 18 Fällen kein Unterschied im Mutationsstatus. In vier Tumoren wurden mehrere verschiedene Lymphknotenmetastasenpräparate analysiert. Hierbei fand sich keine Heterogenität zwischen den Metastasen eines Karzinoms.

Histologie	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Block 5	Block 6	Block 7	Block 8
ADCA	WT	WT	WT	WT (L)				
ADCA	WT	WT	WT	WT(L)				
ADCA	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C (L)	G12C(L)	G12C(L)
ADCA	WT	WT	WT	WT(L)				
ADCA	WT	WT	WT	WT	WT(L)			
ADCA	G12C	G12C	G12C	G12C(L)	G12C(L)	G12C(L)	G12C(L)	G12C(L)
ADCA	WT	WT	WT	WT	WT	WT(L)		
ADCA	WT	WT	WT	WT(L)				
ADCA	WT	WT	WT	WT(L)				
ADCA	G12D	G12D	G12D	G12D	G12D	G12D(L)	G12D(L)	G12D(L)
ADCA	WT	WT	WT	WT				
ADCA	WT	WT	WT	WT	WT	WT		
ADCA	WT	WT	WT	WT				
ADCA	G12D	G12D	G12D	G12D				
ADCA	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D		
ADCA	G12D	G12D	G12D	G12D	G12D			
ADCA	G13C	G13C	G13C	G13C				
ADCA	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C
ADCA	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D(L)	G13D(L)	G13D(L)
ADCA	WT	WT	WT	WT(L)				
LCLC	WT	WT	WT	WT				
LCLC	WT	WT	WT	WT				
LCLC	G12C	G12C	G12C	G12C				
LCLC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
LCLC	WT	WT	WT(L)	WT(L)				
LCLC	G12C	G12C	G12C	G12C				
LCLC	G12C	G12C	G12C	G12C				
LCLC	WT	WT	WT	WT				
LCLC	WT	WT	WT	WT				
LCLC	G12C	G12C	G12C	G12C				
SQLC	WT	WT	WT	WT(L)				
SQLC	WT	WT	WT	WT(L)				
SQLC	WT	WT	WT	WT(L)				
SQLC	WT	WT	WT	WT(L)				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT				
SQLC	WT	WT	WT	WT(L)				

**Tabelle 5: Resultate der Mutationsanalyse nach Validierung**

Abbildung 17 zeigt schematisch das Vorgehen im Rahmen dieser Untersuchung:



**Abbildung 17:** Algorithmus der Mutationsanalyse

## 4.2 Mutationsspektrum

98% aller onkogenen aktivierenden Punktmutationen des *KRAS* Gens finden sich in Exon 2 in den Codons 12 und 13. Die Wildtypsequenz dieser Codons ist GGT (Codon 12) und GGC (Codon 13). Beide codieren die hydrophobe Aminosäure Glycin.

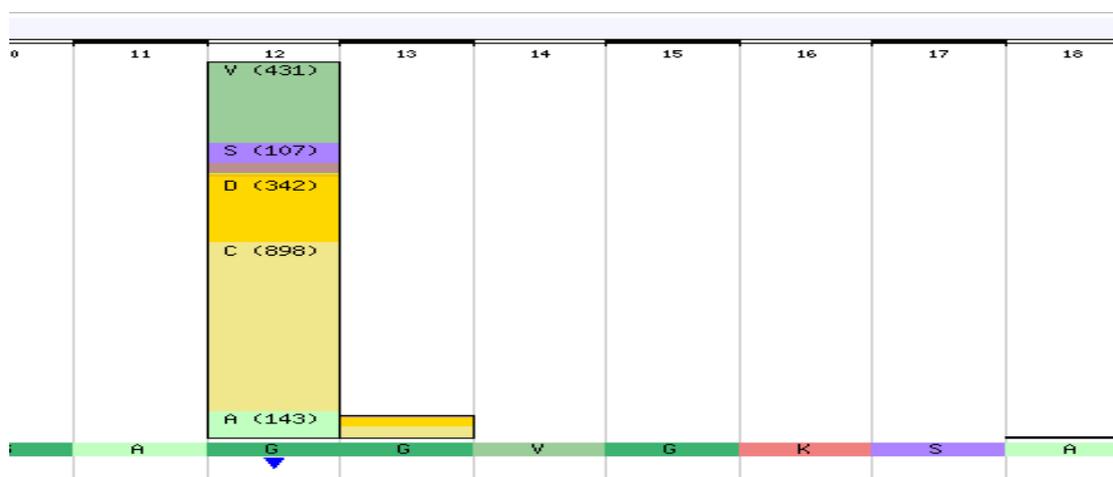
Folgende Mutationen und daraus resultierende Aminosäureaustausche wurden in dieser Untersuchungsreihe beobachtet:

- **c.34G >T p.G12C (Glycin in Codon 12 wird ersetzt durch Cystein)**
- **c.35G >A p.G12D (Glycin in Codon 12 wird ersetzt durch Aspartat)**
- **c.37G >T p.G13C (Glycin in Codon 13 wird ersetzt durch Cystein)**
- **c.38 G>A p.G13D (Glycin in Codon 13 wird ersetzt durch Aspartat)**
- **c.32\_34 CTG> TTT p.A11\_G12 >VC (Aspartat in Codon 11 wird ersetzt durch Valin, Glycin in Codon 12 wird ersetzt durch Cystein)**

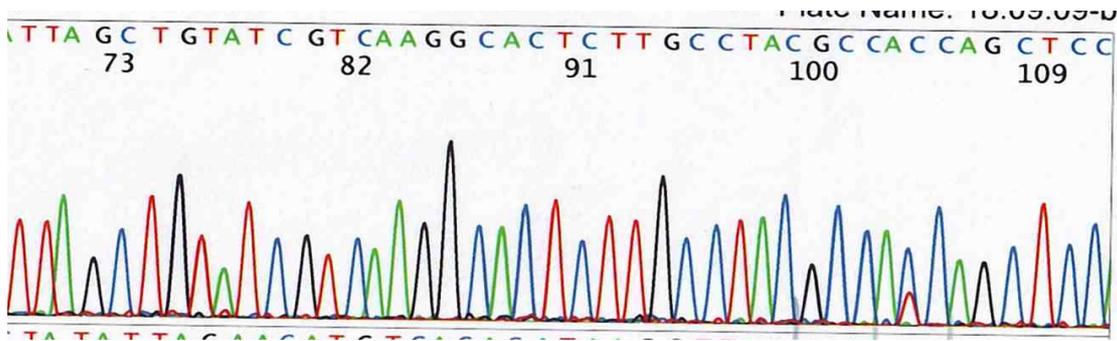
Die zuletzt aufgeführte komplexe Mutation ist bisher noch nicht beschrieben worden. Sämtliche andere Mutationen sind in der COSMIC Mutationsdatenbank bereits verzeichnet und zuvor beschrieben worden (Forbes et al. 2006).

Hierbei stimmte die Häufigkeit der verschiedenen Mutationstypen in dieser Studie mit der in dieser Datenbank verzeichneten gut überein. So war die Mehrzahl (85%) der hier beobachteten Mutationen in Codon 12 lokalisiert, lediglich 3 Mutationen wurden in Codon 13 nachgewiesen.

Die in einem Tumor durch direkte Sequenzierung und durch Analyse nach Mikrodissektion bestätigte G13C Mutation konnte durch die Real-Time-PCR nicht bestätigt werden, da das Thera-Screen Kit für die Mutationsanalytik des colorektalen Karzinoms entwickelt wurde und daher diesen Mutationstyp nicht erfasst.



**Abbildung 18:** Auszug aus der COSMIC Mutationsdatenbank. Das Balkendiagramm zeigt die Häufigkeit der angegebenen Aminosäuresubstitutionen in Codon 12 und 13 des KRAS Gens in Bronchialkarzinomen. Eine derartige Verteilung konnte auch in der vorliegenden Untersuchung gefunden werden.



**Abbildung 19:** Die vorliegende reverse Sequenzierung zeigt eine Mutation in KRAS Exon 2 (G12D). In Codon 12 ist ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position Nr. 104 zu erkennen. Aus dem Codon GGT (kodiert für Glycin) ist also das Codon GAT entstanden, welches für die Aminosäure Aspartat kodiert. Die Höhe des Peaks lässt wie erwartet auf eine heterozygote Mutation schließen.

Mutationstyp	Adenokarzinom	Großzelliges Karzinom	Plattenepithelkarzinom
<b>Wildtyp</b>	11	6	10
<b>p.G12C(c.34 G&gt;T )</b>	3	3	
<b>p.G12D (c.35 G&gt;A)</b>	3		
<b>p.A11_G12&gt;VC (c.32_34CTG&gt;TTT)</b>		1	
<b>p.G13C (c.37 G&gt;T)</b>	1		
<b>p.G13D (c.38 G&gt;A)</b>	2		
<b>Summe</b>	20	10	10

**Tabelle 6:** Mutationsspektrum KRAS Exon 2. Angegeben ist die Verteilung der unterschiedlichen Mutationstypen auf die verschiedenen histologischen Subtypen.

Von den 13 beobachteten Mutationen sind acht Transversionsmutationen (G12C sowie G13C) und fünf Transitionsmutationen (G12D sowie G13D).

Diese Häufigkeitsverteilung ist bei der Untersuchung von Bronchialkarzinomen zu erwarten, da diese Tumoren, wie eingangs erläutert, häufig Transversionsmutationen aufweisen, weil diese bevorzugt durch die im Tabakrauch enthaltenen Carcinogene hervorgerufen werden.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt eine hohe Prävalenz intratumoraler Homogenität von *KRAS* Mutationen in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen. In bis zu acht verschiedenen Gewebearealen eines Tumors zeigte sich ein identischer Mutationsstatus.

Die ermittelten Mutationsfrequenzen für das Adenokarzinom (45%) und großzellige Karzinom (40%) waren dabei etwas höher als die in der Literatur aufgeführten Werte. (Bos 1989, Ding et al. 2008, Riely et al. 2008). Für das Adenokarzinom wird in der Regel eine Mutationshäufigkeit von ca. 20-30% angegeben.

Die geringe Prävalenz (ungefähr 5-10%) von Mutationen in Plattenepithelkarzinomen ist bereits zuvor beschrieben worden (Rodenhuis et al. 1987, Sagawa et al. 1998, Graziano et al. 1999, Rekhtman et al. 2012 ).

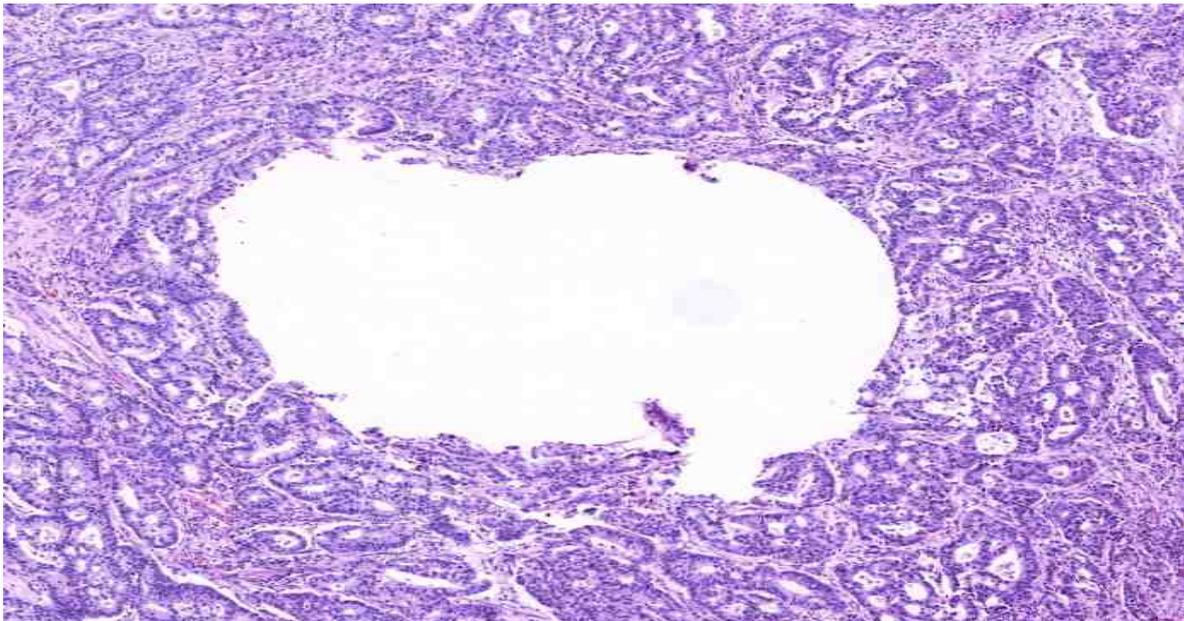
Bei großzelligen Karzinomen wurde eine Mutationsfrequenz von 40% beobachtet. Zuvor wurde für diese Entität von einer Mutationshäufigkeit von ca. 10% berichtet (Graziano et al. 1999). Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass eine Differenzierung zwischen gering differenziertem Adenokarzinom und großzelligem entdifferenziertem Karzinom nicht eindeutig festgelegt und untersucherabhängig ist. Nur durch aufwendige immunhistologische Zusatzuntersuchungen ist eine genaue Differenzierung dieser unterschiedlichen Tumorentitäten möglich. Daher könnte es sich bei einigen der hier untersuchten großzelligen entdifferenzierten Karzinome eventuell auch um Adenokarzinome handeln: Diese weisen häufig, wie bereits ausgeführt, *KRAS* Mutationen auf.

Das beobachtete Mutationsspektrum und die Verteilung der einzelnen Mutationstypen stimmt gut mit anderen Studien zum Spektrum von *KRAS* Mutationen im Bronchialkarzinom überein (Pao et al. 2005, Riely et al. 2008). Die Mehrzahl der Mutationen beruht auf G zu T Transversionen, welche durch die Carcinogene des Tabakrauchs bevorzugt erzeugt werden. In Karzinomen des Colons oder Pankreas finden sich aufgrund einer anderen Ätiologie entsprechend andere Mutationsspektren als im Bronchialkarzinom.

Durch die Durchführung einer Validierungsstudie mit einem in der Routinediagnostik erprobten Mikrodissektionsverfahren und einer zweiten Validierungsmethode durch ein hochsensitives mutationsspezifisches Real-Time-PCR Verfahren konnte das Risiko einer artifiziellen Heterogenität aufgrund falsch negativer Mutationsnachweise minimiert werden. In 4 der 13 mutierten Tumoren zeigte die Validierungsstudie fehler-

hafte Resultate der direkten Sequenzierung auf. Somit konnte durch die Anwendung dieser Verfahren eine Pseudoheterogenität vermieden werden.

Ein Beispiel für ein Tumorareal mit zunächst falsch negativem Mutationsnachweis durch die direkte Sequenzierung ist in Abbildung 20 dargestellt. Durch eine Reanalyse nach Mikrodissektion des Areals in der Umgebung der Stanzbiopsie konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Eine Analyse mittels Real-Time-PCR wies ebenfalls diese Mutation nach.



**Abbildung 20:** Pulmonales Adenokarzinom nach Stanzbiopsie. Die direkte Sequenzierung ergab einen KRAS Wildtyp. Erneute Sequenzierung nach Mikrodissektion im Bereich der Stanze sowie eine Analyse durch Real-Time-PCR ergaben den Nachweis einer G12D Mutation.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Stanzzyylinder mit einem Volumen von weniger als  $1\text{mm}^3$  verwendet. Durch die Analyse mehrerer derartiger Stanzzyylinder ist die Wahrscheinlichkeit der Mutationsheterogenität innerhalb eines einzelnen Zylinders aufgrund des geringen Volumens sehr gering. Diese Vorgehensweise erscheint geeigneter für eine Studie zur Untersuchung einer möglichen Mutationsheterogenität als vergleichbare Methoden zur Gewebeakquisition wie beispielsweise die Makrodissektion von Großflächenschnitten. Bei diesem Verfahren werden Tumorbestandteile von einem histologischen Schnittpräparat mechanisch entfernt. Hierdurch wird ein größeres Tumorareal erfasst, so dass eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Heterogenität innerhalb der Probe besteht als bei einem Stanzzyylinder. Ebenso ermöglicht die lasergestützte Mikrodissektion die Selektion von Tumorzellen innerhalb eines um-

schriebenen Bereichs, wodurch ebenfalls die Wahrscheinlichkeit für eine Heterogenität innerhalb des dissezierten Areals verringert wird.

Die Erfahrungen dieser Studie zeigen die Wichtigkeit einer sorgfältigen Auswahl und Verarbeitung von Tumorproben für molekulare Analysen, damit mögliche Fehlerquellen, vor allem eine zu geringe Anzahl an Tumorzellen, vermieden werden. Dies betrifft in besonderem Maße Situationen, in denen das Tumorgewebe einen hohen Anteil nicht neoplastischer Zellen in Form von Leukozyten oder Stromazellen beinhaltet.

Für eine valide Mutationsanalytik derartiger Tumoren ist die Verwendung eines Mikrodissektionsverfahrens zur Erhöhung der Tumorzellkonzentration oder die Anwendung eines hochsensitiven Sequenzierungsverfahrens notwendig.

Franklin und Mitarbeiter (2010) konnten für die Analytik von *KRAS* Mutationen in colorektalen Karzinomen zeigen, dass die Verwendung der hochsensitiven Real-Time-PCR gegenüber der direkten Sequenzierung in einer höheren Rate an detektierten Mutationen resultiert. Da die Mutationsanalytik derartiger prädiktiver Marker wie *KRAS* oder *EGFR* zum Teil Basis von Therapieentscheidungen darstellt, sollte daher ein möglichst sensibles Analyseverfahren verwendet werden, um die Rate fehlerhafter Resultate zu minimieren.

Marchetti et al. (2009) konnten mit einer hoch sensitiven Sequenzierungsmethode durch Verwendung einer "mutant enriched" PCR bei Patienten nach erfolgter Anti-EGFR Therapie im Vergleich zur Analyse mittels direkter Sequenzierung eine deutlich höhere Rate an *KRAS* Mutationen feststellen (19% im Vergleich zu 30%). Diese Diskrepanz interpretierte diese Arbeitsgruppe als Vorliegen von quantitativ geringen, *KRAS* mutierten Subklonen, welche durch die direkte Sequenzierung nicht erkannt wurden. Als Ursache für das Auftreten heterogen mutierter Tumore sahen die Autoren eine sekundäre Resistenzentwicklung durch das Auftreten *KRAS* mutierter Tumorzellen als Reaktion auf die Anti-EGFR Therapie an. Hierbei wurde pro Tumor jedoch nur ein Gewebeareal untersucht. Aufgrund der geringen Sensitivität der direkten Sequenzierung kann dies jedoch auch Ursache für die diskrepanten Resultate zwischen direkter Sequenzierung und hochsensitiver Analyse darstellen. Dennoch erscheint die Hypothese plausibel, dass Bronchialkarzinome mit dem Wildtyp des *KRAS* Gens unter einer Therapie mit EGFR Inhibitoren eine *KRAS* Mutation im Sinne eines sekundären Resistenzmechanismus entwickeln können und somit eine sekundäre intratumorale Heterogenität von *KRAS* Mutationen entstehen könnte.

Kürzlich wurde eine dementsprechende Resistenzentwicklung im Zuge einer Anti-EGFR Therapie in colorektalen Karzinomen beobachtet (Diaz et al. 2012).

Zuvor berichteten mehrere Arbeitsgruppen von einer homogenen intratumoralen Verteilung von KRAS Mutationen in Adenokarzinomen der Lunge (Li et al. 1994, Sugio et al. 1994, Ohshima et al. 1993, Sagawa et al. 1998, Mattsson et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser und der hier vorliegenden Untersuchung unterstützen die Hypothese, dass die KRAS Mutation in Bronchialkarzinomen ein frühes Ereignis der Carcinogenese ist. KRAS Mutationen wurden zuvor bereits in Vorstufen invasiver Bronchialkarzinome, der sogenannten atypischen adenomatösen Hyperplasie (AAH), gefunden (Westra et al. 1996, Ohshima et al. 1994, Cooper et al. 1997). Hieraus wurde ebenfalls geschlossen, dass die KRAS Mutation ein frühes Ereignis in der Entstehung des Bronchialkarzinoms darstellen muss (Li et al. 1994).

Im Tiermodell des Bronchialkarzinoms zeigt die KRAS Mutation eine tumorinitiierende Wirkung, was ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung in der frühen Entstehungsphase dieser Tumoren ist (Johnson et al. 2001).

Die nun durchgeführte Beobachtung einer homogenen Mutationsverteilung in bis zu acht unterschiedlichen Tumorarealen stärkt die Hypothese, dass diese genetische Veränderung ein irreversibles Ereignis in der frühen Entstehungsphase des Bronchialkarzinoms ist und daher in allen verschiedenen klonalen Anteilen dieser Tumoren nachweisbar ist. In diesen homogen mutierten Karzinomen ist die KRAS Mutation somit ein verlässlicher und stabiler genetischer Parameter, da trotz der starken morphologischen Heterogenität und genetischen Instabilität des Bronchialkarzinoms diese Alteration in allen Tumorarealen zu finden ist.

Eine intratumorale Heterogenität von KRAS Mutationen wurde zuvor bereits in colorektalen Karzinomen beobachtet (Giaretti et al. 1996, Baisse et al. 2001, Baldus et al. 2010, Watanabe et al. 2011).

Jedoch existieren hierzu keine eindeutigen Aussagen in welcher Größenordnung sich das Ausmaß dieser Heterogenität befindet und welche Auswirkungen sich hieraus für die Diagnostik und Therapie des colorektalen Karzinoms ergeben.

Angesichts der vorliegenden Resultate ist die Inhibition von Elementen des MAP-Kinase Signalwegs oder weiterer Effektoren von p21ras bei Vorliegen einer KRAS Mutation als therapeutischer Ansatzpunkt in der Therapie des Bronchialkarzinoms vorstellbar.

Die homogene Ausprägung einer genetischen Veränderung ist Voraussetzung für die Effektivität einer zielgerichteten medikamentösen Tumorthapie, da diese bei einer homogen vorliegenden Zielstruktur alle Tumorzellen erfassen kann. Zudem reguliert das *KRAS* Gen einen zentralen Bereich der Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen. Daher ist davon auszugehen, dass analog zur Situation in *EGFR* mutierten Tumoren das Wachstum *KRAS* mutierter Tumoren von der Aktivität der *KRAS* assoziierten Signalwege abhängig ist. Damit wären diese Tumoren potentiell empfindlich gegenüber einer medikamentösen Therapie, welche die Aktivität von p21ras oder der nachgeschalteten Effektorproteine inhibieren könnte.

Da die *KRAS* Mutation ein derartig homogenes Merkmal des Bronchialkarzinoms darstellt, kann der Nachweis dieser Veränderung auch zur Differenzierung von synchron aufgetretenen Karzinomen zu intrapulmonalen Metastasen eines singulären Karzinoms verwendet werden (Warth et al. 2012). Zeigen sich bei der Analyse verschiedener pulmonaler Raumforderungen unterschiedliche Resultate hinsichtlich des *KRAS* Mutationsstatus, ist von synchronen Karzinomen auszugehen. Ergibt sich der Nachweis der identischen Mutation in den jeweiligen Tumorherden, ist hingegen von intrapulmonalen Metastasen eines singulären Karzinoms auszugehen.

Es konnte in dieser Untersuchung keine Mutationsheterogenität zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden.

Bisher gibt es keine eindeutigen Daten zur Bedeutung des *KRAS* Mutationsstatus für die Metastasierungsneigung von Bronchialkarzinomen. Untersuchungen bei colorektalen Karzinomen deuten auf eine Assoziation von *KRAS* Mutationen mit der Entstehung von Lungenmetastasen hin (Smakman et al. 2005, Cejas et al. 2009, Tie et al. 2011).

Inwiefern *KRAS* jedoch das Metastasierungsverhalten des Bronchialkarzinoms beeinflusst, ist nicht bekannt. In tierexperimentellen Studien finden sich Hinweise, dass die onkogene Aktivierung von *MYC* einen metastatischen Phänotyp induziert. (Rapp et al. 2009).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ergibt sich die Erkenntnis, dass es klinisch für die Bestimmung des *KRAS* Mutationsstatus ausreichend ist, eine einzelne Biopsie aus dem Primärtumor oder einer Lymphknotenmetastase für die Analyse zu verwenden, da das Resultat repräsentativ für den Mutationsstatus des gesamten Tumors ist. Dieses Vorgehen kann die Gewinnung ausreichenden bioptischen Materials für eine Mutationsanalyse bei Patienten mit inoperablem Primärtumor erleichtern, da in die-

sen Fällen die Diagnose häufig aus kleinen Biopsien aus dem Primarius oder Lymphknotenmetastasen histologisch oder cytologisch gestellt wird.

Zuvor beschrieben Schmid et al. (2009) sowie Monaco et al. (2010) eine Diskrepanz zwischen dem *KRAS* Mutationsstatus von primären Lungenkarzinomen und den dazugehörigen lymphonodalen Metastasen. Dieser Widerspruch zu den hier gefundenen Resultaten kann durch die verwendete Methodik erklärt werden.

In den genannten Studien wurde keine Validierung durch ein geeignetes Mikrodisektionsverfahren oder sensitive Sequenzierungsmethoden durchgeführt. Dies ist jedoch essentiell, um eine artifizielle Heterogenität durch einen zu geringen Anteil an malignen Zellen mit falsch negativen Resultaten auszuschließen zu können. (Clayton et al. 2000, Franklin et al. 2010). In beiden genannten Studien bestand die vermutete Heterogenität in einer Vielzahl von mutierten Primärtumoren mit Lymphknotenmetastasen, in denen ein Wild-Typ beobachtet wurde. Dies könnte auf einer hohen Zahl falsch negativer Analysen aufgrund zu geringer Tumorzellanteile bei der Analyse des Metastasengewebes beruhen, da in Lymphknotenmetastasen ein großer Anteil nicht maligner Zellen vorhanden sein kann.

Zwei weitere Studien berichteten über die *KRAS* Mutationsheterogenität zwischen Bronchialkarzinomen und ossären Metastasen (Badalian et al. 2007) sowie Fernmetastasen (Kalikaki et al. 2008). Diese Resultate implizieren in diesen Fällen das Vorliegen heterogen mutierter Primärtumoren.

In der Tumordatenbank, welche der hier vorliegenden Untersuchung zugrunde liegt, lag nur eine sehr geringen Anzahl verfügbarer Gewebelöcke aus Fernmetastasen vor. Daher war es nicht möglich, eine Untersuchung zur Heterogenität zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Fernmetastasen durchzuführen.

Kürzlich berichteten Mattsson und Mitarbeiter (2012) über eine vergleichende Untersuchung an histologisch unterschiedlich differenzierten Arealen von Bronchialkarzinomen. Hierbei zeigte sich keinerlei intratumorale Heterogenität hinsichtlich des *KRAS* oder *EGFR* Mutationsstatus. Diese Studie verwendete ebenfalls ein hochsensitives Sequenzierverfahren für die Mutationsanalytik.

Somit bestätigt diese Studie die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über Studien zur Mutationsheterogenität von Bronchialkarzinomen und korrespondierenden Metastasen.

In der verfügbaren Literatur zeigen sich somit diskrepante Resultate und Aussagen zur Frage einer möglichen Heterogenität der *KRAS* Mutation in Bronchialkarzinomen sowie deren korrespondierenden Metastasen. Zudem wurden in den aufgeführten Studien eine Reihe verschiedener Methoden zur Mutationsanalyse verwendet und zum Teil Verfahren mit einer niedrigen Sensitivität bezüglich der Detektion von Mutationen eingesetzt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützen die Ergebnisse mehrerer vorangegangener Studien, die ebenfalls eine homogene *KRAS* Mutationsverteilung nachweisen konnten.

Studie	Studiendesign	Resultat	Methodik
<b>Li et al. (1994)</b>	Vergleich von Primarius und Fernmetastasen (n=15)	Mutation in fünf Primärtumoren und allen korrespondierenden Metastasen	Direkte Sequenzierung
<b>Sugio et al. (1994)</b>	Mikrodissektion von 74 Arealen aus fünf <i>KRAS</i> mutierten Bronchiakarzinomen	Homogene Mutationsverteilung	RFLP, direkte Sequenzierung
<b>Ohshima et al. (1994)</b>	131 Mutationsanalysen aus 29 Adenokarzinomen und Vorläuferläsionen	Homogene Mutationsverteilung	Nested-PCR
<b>Sagawa et al. (1998)</b>	Analyse von 74 Arealen aus 13 <i>KRAS</i> mutierten Tumoren	Homogene Mutationsverteilung	RFLP
<b>Kalikaki et al. (2008)</b>	Vergleich von Primarius und Fernmetastasen (n=25)	Mutation in fünf Primärtumoren und zwei Fernmetastasen	Mikrodissektion Direkte Sequenzierung
<b>Schmid et al. (2009)</b>	Vergleich von Primärtumor (n=96) und Lymphknotenmetastasen	36 Tumoren mutiert, in 9 Fällen Heterogenität zwischen Primarius und Metastasen	Direkte Sequenzierung Makrodissektion
<b>Cortot et al. (2010)</b>	Vergleich von Primärtumor und Fernmetastasen (n=6)	Mutation in allen Primärtumoren, mit direkter Sequenzierung keine Mutationen in den Metastasen. ME-PCR zeigt Mutationen in drei Metastasen	Direkte Sequenzierung mutant enriched PCR
<b>Monaco et al. (2010)</b>	Vergleich von Primärtumor (n=40) und Lymphknoten	11 Primärtumore mutiert, 4 Metastasen mutiert, 9 Fälle heterogen	Direkte Sequenzierung
<b>Sun et al. (2011)</b>	Vergleich von Primarius und Lymphknotenmetastasen (n=80)	Nachweis von <i>KRAS</i> Mutation in einem Primärtumor und sechs Metastasen	Direkte Sequenzierung
<b>Mattsson et al. (2012)</b>	Vergleich von jeweils drei Tumora- realen von 6 <i>KRAS</i> mutierten Tumoren	Homogene Mutationsverteilung	Pyrosequenzierung

**Tabelle 7:** Übersicht über Studien zur Heterogenität der *KRAS* Mutation in Bronchiakarzinomen und korrespondierenden Metastasen

Die Therapie des Bronchiakarzinoms mit neuen cytotoxischen oder selektiven antiproliferativen Substanzen hat zum Teil deutliche Fortschritte erzielt. Hierbei erweist sich eine individuelle Auswahl jeweils geeigneter Pharmaka durch Ermittlung prädiktiver Marker als notwendig, um die Effektivität der medikamentösen Therapie zu maximieren. Neben der *EGFR* Mutation als positivem prädiktivem Marker für eine Anti

EGFR Therapie werden weitere histopathologische, genetische und molekulare Parameter für die Planung und Selektion einer Therapie untersucht (Olaussen et al. 2006, West et al. 2009, Kwak et al. 2010, Kim et al. 2011).

Eine derartige Unterscheidung und Subklassifikation von Bronchialkarzinomen anhand ihrer unterschiedlichen molekularen Eigenschaften könnte eine wirksamere, zielgerichtete Therapie und eine deutliche verbesserte Wirksamkeit im Vergleich zu früheren unselektiven Therapien ermöglichen.

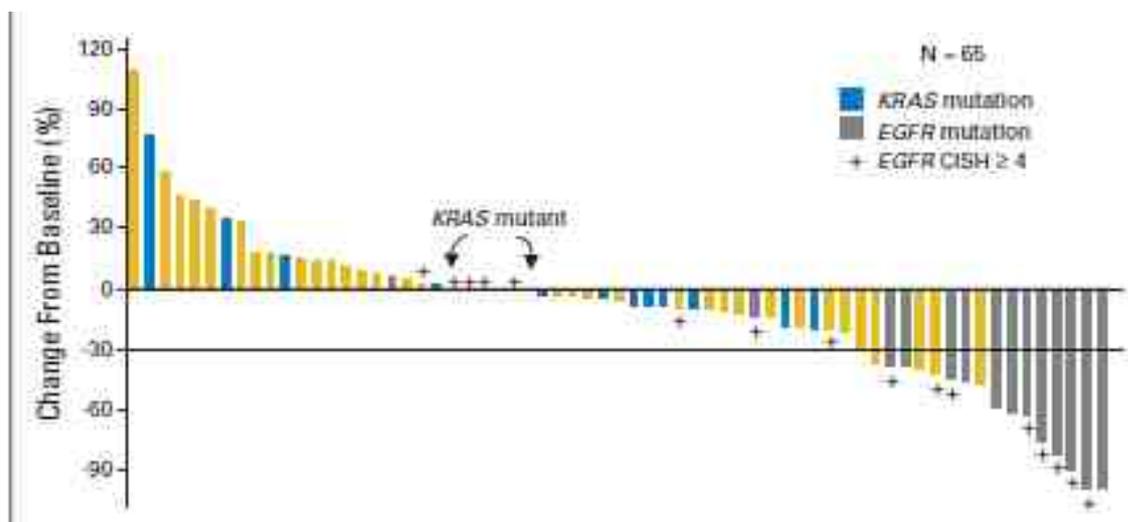
Jedoch muss bei der Bestimmung aller molekularer Eigenschaften von Tumorzellen berücksichtigt werden, dass maligne Tumoren im Allgemeinen und besonders häufig Bronchialkarzinome aus heterogenen Zellpopulationen bestehen und somit genetische und tumorbiologische Charakteristika innerhalb eines Tumors nicht allen Zellen gemein sind.

Hinsichtlich der Bedeutung der *KRAS* Mutation als prädiktiver Marker für die Anti-EGFR Therapie existieren bisher zum Teil widersprüchliche Daten darüber, ob *KRAS* mutierte Tumoren tatsächlich eine vollständige Resistenz gegen eine Inhibition der EGFR Signaltransduktion zeigen. Es besteht kein Konsens darüber, ob der Nachweis einer *KRAS* Mutation ein Ausschlußkriterium für eine solche Therapie darstellen sollten. Es wird zwar vorgeschlagen, *KRAS* Mutationen als negativen prädiktiven Marker für die Therapie des Bronchialkarzinoms zu verwenden (Massaralli et al. 2007, Riely et al. 2009), jedoch ist dieses Vorgehen nicht leitlinienbasiert oder allgemein akzeptiert wie beim colorektalen Karzinom (Roberts et al. 2010, Langer 2011). Diese Unklarheit resultiert aus der Tatsache, dass in den bisher durchgeführten Studien *KRAS* mutierte Tumoren zwar mit einer Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren assoziiert waren, aber dennoch ähnliche Überlebensraten zeigten wie *KRAS/EGFR* Wild-Typ Tumoren (Mao et al. 2009, Jackman et al. 2009) und somit anscheinend für die Selektion der Patienten, die auf Tyrosinkinaseinhibitoren ansprechen, eine Bestimmung des *EGFR*-Mutationsstatus ausreichend ist.

Weitere Zweifel an einem Nutzen des *KRAS* Mutationsstatus als geeignetem negativen prädiktiven Marker ergaben sich aus Beobachtungen, dass der Nachweis einer *KRAS* Mutation nicht in allen Fällen mit einer Therapieresistenz gegen Anti-EGFR Medikamente einhergeht (Ferte et al. 2010). Miller und Mitarbeiter (2008) berichteten über eine Behandlungsstudie mit Erlotinib bei Bronchialkarzinomen, in welcher einige *KRAS* mutationspositive Tumoren entgegen der Erwartung einen Rückgang der Tu-

mormasse zeigten. Zwar war diese Abnahme der Tumormasse stets geringer als 30%, also nach radiologischen Kriterien kein Therapieansprechen, jedoch wurde erwartet, dass *KRAS* mutierte Tumore keinerlei Reaktion auf eine Anti-EGFR Therapie zeigen. Diese Fallbeobachtungen sprechen somit zunächst gegen die Verwendung der *KRAS* Mutation als Ausschlußkriterium hinsichtlich einer Anti-EGFR Therapie. Es ist bisher nicht bekannt, was die Ursachen dieser Resultate sind.

Eine unerkannte Heterogenität von *KRAS* Mutationen ist nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie somit nicht Ursache des unklaren Stellenwerts des *KRAS* Mutationsstatus in der Anti-EGFR Therapie des Bronchialkarzinoms. Zusätzliche, bisher nicht berücksichtigte genetische oder epigenetische Veränderungen dieser Tumoren, die eine Empfindlichkeit gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren trotz einer vorhandenen *KRAS* Mutation bedingen, könnten diese Beobachtung erklären.



**Abbildung 21:** Maximaler Rückgang der Indikatorläsionen von Bronchialkarzinomen durch Anti-EGFR Therapie nach radiologischer Verlaufskontrolle. Einige *KRAS* mutierte Tumoren (blaue Balken) zeigten entgegen der Erwartung einen Rückgang der Tumormasse unter Tyrosinkinaseinhibitorthherapie (Miller et al. 2008). Beinahe alle Tumoren mit einer *EGFR* Mutation zeigten ein Therapieansprechen (graue Balken).

Eine weitere Hypothese für die Ursache der bisher nicht eindeutigen Bedeutung der *KRAS* Mutation in Bronchialkarzinomen wurde kürzlich von Ihle und Mitarbeitern (2012) vorgestellt. Hiernach sei der spezifische Typ der *KRAS* Mutation, also die jeweilige Art der Aminosäuresubstitution verantwortlich für ein unterschiedliches biologisches Verhalten. Demnach seien vor allem G12C Mutationen sowie G12V Mutationen mit einer schlechteren Prognose als die anderen Mutationstypen assoziiert. In

der Therapie des colorektalen Karzinoms zeigte sich bereits, dass Mutationen des *KRAS* Gens in Codon 13 einen anderen prädiktiven Stellenwert für eine Anti-EGFR Therapie besitzen als solche in Codon 12 (De Roock et al. 2010, Tejpar et al. 2012).

Die Kenntnis einer möglichen intratumoralen Heterogenität von *KRAS* Mutationen ist im Besonderen von Bedeutung, wenn in näherer Zukunft Therapien verfügbar werden sollten, die spezifisch bei *KRAS* mutierten Tumoren wirksam sind. Vorstellbar ist zu diesem Zweck eine Verwendung von Inhibitoren des MAP-Kinase Signalwegs.

So zeigen erste durchgeführte Behandlungsstudien mit Sorafenib (Nexavar®), einem Multityrosinkinaseinhibitor, dass diese Substanz eine effektive Therapie *KRAS* mutierter Tumoren ermöglichen könnte (Engelman et al. 2008a, Blumenschein et al. 2009, Lind et al. 2010, Scagliotti et al. 2010, Kim et al. 2011). Der Wirkmechanismus dieser Substanz beruht unter anderem auf einer Inhibition der RAF-Kinase sowie der ERK-Kinase. Diese Kinasen sind wichtige Effektorproteine von p21ras.

Ist eine genetische Veränderung homogen in allen klonalen Anteilen eines Tumors vorhanden, bietet dies die Möglichkeit, dass eine auf diese Alteration spezifisch ausgerichtete Therapie einen Nutzen zeigt, da alle Tumorzellen durch die Therapie beeinflusst werden können (Weinstein, 2002). Zudem ist bei Vorliegen einer stabilen, homogenen genetischen Aberration eine einzelne Analyse einer geringen Menge von Tumorgewebe für eine valide Aussage zu einer möglichen Sensibilität des Tumors auf bestimmte Medikamente möglich. Denn unerkannte und damit in Therapiestudien nicht berücksichtigte genetische Veränderungen von Tumoren können dafür verantwortlich sein, dass Studien mit neuen Therapeutika nicht die erwarteten positiven Resultate zeigen oder die mögliche Effektivität einer neuen Substanz unterschätzt wird (Betensky et al. 2002, Pintilie et al. 2009).

Über diese bisher dargelegten Überlegungen hinaus muss die enorme Komplexität der EGFR assoziierten Signalwege beachtet werden. So sind neben der *KRAS* Mutation weitere Resistenzmechanismen gegen eine Inhibition des EGF Rezeptors beschrieben worden: Hierzu gehören unter anderem eine Amplifikation des *c-MET* Gens, eine aktivierende Mutation im *PI3KCA* Gen, inaktivierende Mutationen oder Deletionen des Tumorsuppressorgens *PTEN* oder eine *HER3* Amplifikation (Engelman et al. 2007, Engelman und Settleman 2008, Sos et al. 2009).

Daher wäre es für eine optimale Therapieselektion notwendig, neben den Genen *EGFR* und *KRAS* weitere prädiktive Parameter zu untersuchen. Hierbei sollten diese genannten onkogenen Veränderungen daraufhin untersucht werden, ob sie stabile,

homogen verteilte Ereignisse wie die *KRAS* Mutation darstellen, oder ob diese eine intratumorale Heterogenität aufweisen, welche diagnostisch und therapeutisch berücksichtigt werden müsste.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung an nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigt die *KRAS* Mutation keine intratumorale Heterogenität und stellt somit eine stabile genetische Veränderung dieser morphologisch und genetisch heterogenen Tumoren dar. Für die Mutationsanalytik ist somit die Bestimmung des Mutationsstatus aus einem Tumorareal oder Metastasen repräsentativ für den gesamten Tumor.

Dieses Resultat impliziert, dass die Mutation des *KRAS* Gens stets ein früh einsetzendes Ereignis in der Karzinogenese des Bronchialkarzinoms darstellt. Aufgrund der Homogenität der *KRAS* Mutation und des im Vergleich zu anderen molekularen Alterationen des Bronchialkarzinoms relativ häufigen Auftretens stellen p21ras und dessen Effektorproteine somit potentiell nutzbare Ziele in der Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms dar.

In welchem Maße die verschiedenen Mutationstypen des *KRAS* Gens eine unterschiedliche tumorbiologische Funktion und Bedeutung besitzen, sollte durch weitere Studien untersucht werden, um darauf ausgerichtet gezielte Therapien entwickeln zu können.

Die Erfahrungen dieser Studie und der Vergleich mit weiteren Untersuchungen zur Heterogenität der *KRAS* Mutation zeigt die Wichtigkeit der verwendeten Methodik auf, um artifizielle Heterogenität auszuschließen. Untersuchungen zum Vorliegen einer möglichen Heterogenität genetischer Parameter von Tumoren müssen daher hochsensitive analytische Methoden einsetzen.

Die widersprüchlichen Resultate der Studien zur prädiktiven und prognostischen Bedeutung der *KRAS* Mutation in der Anti-EGFR Therapie des Bronchialkarzinoms beruhen nicht auf einer bisher unerkannten Heterogenität. Hierfür ursächlich könnten weitere bisher nicht berücksichtigte genetische Veränderungen dieser Tumoren sein, die einen Einfluß auf die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors und der MAP-Kinase Signalkaskade ausüben.

## 6 Zusammenfassung

Die Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnte durch Etablierung neuartiger spezifischer Inhibitoren der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors für einen Teil der betroffenen Patienten erheblich verbessert werden. Um potentiell sensitive Tumoren zu identifizieren, werden prädiktive molekulare Parameter verwendet. Hierzu gehören als positiver prädiktiver Marker die *EGFR* Mutation und als Hinweis auf eine primäre Therapieresistenz der Nachweis einer *KRAS* Mutation. Jedoch zeigt das Bronchialkarzinom sehr häufig eine morphologische und genetische Heterogenität, aufgrund welcher molekulare Alterationen nicht in allen Anteilen eines Tumors vorhanden sein können.

Diese Studie erbringt den Nachweis einer intratumoralen Homogenität von *KRAS* Mutationen in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

45% (9/20) der Adenokarzinome, 40% (4/10) der großzelligen Karzinome und keines der Plattenepithelkarzinome zeigten eine *KRAS* Mutation. Alle 13 mutierten Tumoren zeigten eine intratumorale Homogenität der *KRAS* Mutation.

Homogen mutierte Tumoren zeigten keine Veränderung des Mutationsstatus in den jeweils analysierten Lymphknotenmetastasen.

Um eine möglichst präzise Analyse der Mutationsverteilung zu ermöglichen und artifizielle Pseudoheterogenität auszuschließen, wurden zwei hochsensitive Verfahren (lasergestützte Mikrodissektion und Real-Time-PCR) zur Verifizierung der Resultate verwendet.

Die ausschließlich homogene Verteilung von *KRAS* Mutationen und ihre im Vergleich zu anderen onkogenen Aberrationen relativ hohe Prävalenz macht diese genetische Veränderung zu einem potentiellen Ziel für eine molekular zielgerichtete Therapie des Bronchialkarzinoms mit Inhibitoren des MAP-Kinase Signalweges. Bisher widersprüchliche Daten zur prädiktiven und prognostischen Relevanz des *KRAS* Mutationsstatus beruhen nicht auf einer heterogenen Mutationsverteilung.

## 7 Literaturverzeichnis

- (IARC), I. A. f. R. o. C. (2004). "Tobacco Smoke and Involuntary Smoking." Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 83.
- Ahrendt, S. A., P. A. Decker, et al. (2001). "Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung." Cancer 92(6): 1525-1530.
- Almoguera, C., D. Shibata, et al. (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." Cell 53(4): 549-554.
- Amado, R. G., M. Wolf, et al. (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol 26(10): 1626-1634.
- Bach, P. B., M. W. Kattan, et al. (2003). "Variations in lung cancer risk among smokers." J Natl Cancer Inst 95(6): 470-478.
- Badalian, G., T. Barbai, et al. (2007). "Phenotype of bone metastases of non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and K-RAS mutational status." Pathol Oncol Res 13(2): 99-104.
- Baisse, B., H. Bouzourene, et al. (2001). "Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma." Int J Cancer 93(3): 346-352.
- Baldus, S. E., K. L. Schaefer, et al. (2010). "Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases." Clin Cancer Res 16(3): 790-799.
- Balsara, B. R. and J. R. Testa (2002). "Chromosomal imbalances in human lung cancer." Oncogene 21(45): 6877-6883.
- Baselga, J. and N. Rosen (2008). "Determinants of RASistance to anti-epidermal growth factor receptor agents." J Clin Oncol 26(10): 1582-1584.
- Beau-Faller, M., J. C. Weber, et al. (2003). "Genetic heterogeneity in lung and colorectal carcinoma as revealed by microsatellite analysis in plasma or tumor tissue DNA." Cancer 97(9): 2308-2317.
- Beckles, M. A., S. G. Spiro, et al. (2003). "Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes." Chest 123(1 Suppl): 97S-104S.
- Betensky, R. A., D. N. Louis, et al. (2002). "Influence of unrecognized molecular heterogeneity on randomized clinical trials." J Clin Oncol 20(10): 2495-2499.

- Blons, H., J. F. Cote, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer are linked to bronchioloalveolar differentiation." Am J Surg Pathol 30(10): 1309-1315.
- Blumenschein, G. R., Jr., U. Gatzemeier, et al. (2009). "Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 27(26): 4274-4280.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res 49(17): 4682-4689.
- Bose, R. and X. Zhang (2009). "The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition." Exp Cell Res 315(4): 649-658.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, et al. (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." Trends Cell Biol 9(12): M57-60.
- Cappuzzo, F., F. R. Hirsch, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer." J Natl Cancer Inst 97(9): 643-655.
- Carey, F. A., D. Lamb, et al. (1990). "Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer." Cancer 65(10): 2266-2269.
- Cataldo, V. D., D. L. Gibbons, et al. (2011). "Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib." N Engl J Med 364(10): 947-955.
- Cejas, P., M. Lopez-Gomez, et al. (2009). "KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis." PLoS One 4(12): e8199.
- Chapman, P. B., A. Hauschild, et al. (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." N Engl J Med 364(26): 2507-2516.
- Clayton, S. J., F. M. Scott, et al. (2000). "K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification." Clin Chem 46(12): 1929-1938.
- Cooper, C. A., F. A. Carby, et al. (1997). "The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung." J Pathol 181(4): 401-404.
- Dacic, S., M. Flanagan, et al. (2006). "Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma." Am J Clin Pathol 125(6): 860-865.

- DeMarini, D. M. (2004). "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review." Mutat Res 567(2-3): 447-474.
- Der, C. J., T. G. Krontiris, et al. (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." Proc Natl Acad Sci U S A 79(11): 3637-3640.
- De Roock, W., D. J. Jonker, et al. (2010). "Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." JAMA 304(16): 1812-1820.
- Diaz, L. A., R.T. Williams, et al. (2012). "The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers." Nature 486(7404): 537-540.
- Ding, L., G. Getz, et al. (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." Nature 455(7216): 1069-1075.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer 3(1): 11-22.
- Dunnill, M. S. and K. C. Gatter (1986). "Cellular heterogeneity in lung cancer." Histopathology 10(5): 461-475.
- Eberhard, D. A., B. E. Johnson, et al. (2005). "Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib." J Clin Oncol 23(25): 5900-5909.
- Engelman, J. A., L. Chen, et al. (2008a). "Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers." Nat Med 14(12): 1351-1356.
- Engelman, J. A. and J. Settleman (2008b). "Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy." Curr Opin Genet Dev 18(1): 73-79.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, et al. (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." Science 316(5827): 1039-1043.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell 61(5): 759-767.
- Fend, F. and M. Raffeld (2000). "Laser capture microdissection in pathology." J Clin Pathol 53(9): 666-672.
- Ferlay, J., H. R. Shin, et al. "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:

- GLOBOCAN 2008." Int J Cancer.
- Ferte, C., B. Besse, et al. (2010). "Durable responses to Erlotinib despite KRAS mutations in two patients with metastatic lung adenocarcinoma." Ann Oncol 21(6): 1385-1387.
- Fey, M. F., A. Zimmermann, et al. (1993). "Studying clonal heterogeneity in human cancers." Cancer Res 53(4): 921.
- Finberg, K. E., L. V. Sequist, et al. (2007). "Mucinous differentiation correlates with absence of EGFR mutation and presence of KRAS mutation in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features." J Mol Diagn 9(3): 320-326.
- Forbes, S., J. Clements, et al. (2006). "Cosmic 2005." Br J Cancer 94(2): 318-322.
- Fraire, A. E., V. L. Roggli, et al. (1987). "Lung cancer heterogeneity. Prognostic implications." Cancer 60(3): 370-375.
- Franklin, W. A., J. Haney, et al. (2010). "KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer." J Mol Diagn 12(1): 43-50.
- Fukuoka, M., S. Yano, et al. (2003). "Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]." J Clin Oncol 21(12): 2237-2246.
- Gealy, R., L. Zhang, et al. (1999). "Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8(4 Pt 1): 297-302.
- Gearhart, J., E. E. Pashos, et al. (2007). "Pluripotency redux--advances in stem-cell research." N Engl J Med 357(15): 1469-1472.
- Giaccone, G., R. S. Herbst, et al. (2004). "Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1." J Clin Oncol 22(5): 777-784.
- Giaretti, W., R. Monaco, et al. (1996). "Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy." Am J Pathol 149(1): 237-245.
- Giuliani, L., C. Favalli, et al. (2007). "Human papillomavirus infections in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature." Anticancer Res 27(4C): 2697-2704.
- Goeckenjan, G., H. Sitter, et al. (2010). "[Prevention, diagnosis, therapy, and follow-

- up of lung cancer]." Pneumologie 64 Suppl 2: e1-164.
- Goldie, J. H. and A. J. Coldman (1984). "The genetic origin of drug resistance in neoplasms: implications for systemic therapy." Cancer Res 44(9): 3643-3653.
- Graus, F., C. Cordon-Cardo, et al. (1985). "Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer." Neurology 35(4): 538-543.
- Graziano, S. L., G. P. Gamble, et al. (1999). "Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 17(2): 668-675.
- Grollman, A. P. and M. Moriya (1993). "Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within." Trends Genet 9(7): 246-249.
- Guix, M., A. C. Faber, et al. (2008). "Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins." J Clin Invest 118(7): 2609-2619.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
- Hecht, S. S. (2008). "Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis." Chem Res Toxicol 21(1): 160-171.
- Herbst, R. S., G. Giaccone, et al. (2004). "Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2." J Clin Oncol 22(5): 785-794.
- Herbst, R. S., J. V. Heymach, et al. (2008). "Lung cancer." N Engl J Med 359(13): 1367-1380.
- Herbst, R. S., D. Prager, et al. (2005). "TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 23(25): 5892-5899.
- Hirsch, F. R., G. Ottesen, et al. (1983). "Tumor heterogeneity in lung cancer based on light microscopic features. A retrospective study of a consecutive series of 200 patients, treated surgically." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 402(2): 147-153.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis." J Clin Oncol 21(20): 3798-3807.
- Horn, L. and W. Pao (2009). "EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell

- lung cancer." J Clin Oncol 27(26): 4232-4235.
- Horn, L., Pao W., Johnson, D. H. (2011) "Neoplasms of the lung". In: Harrison's Principles of Internal Medicine. U.Longo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, J. Jameson, J. Loscalzo (Hrg.) McGraw Hill, New York.
- Hurria, A. and M. G. Kris (2003). "Management of lung cancer in older adults." CA Cancer J Clin 53(6): 325-341.
- Husgafvel-Pursiainen, K., P. Hackman, et al. (1993). "K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos." Int J Cancer 53(2): 250-256.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer 5(5): 341-354.
- Ihle, N. T., L. A. Byers, et al. (2012). "Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome." J Natl Cancer Inst 104(3): 228-239.
- Jackman, D. M., V. A. Miller, et al. (2009). "Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials." Clin Cancer Res 15(16): 5267-5273.
- Jackman, D. M., B. Y. Yeap, et al. (2006). "Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib." Clin Cancer Res 12(13): 3908-3914.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin 58(2): 71-96.
- Jiang, S. X., K. Yamashita, et al. (2008). "EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance." Int J Cancer 123(11): 2480-2486.
- Johnson, L., K. Mercer, et al. (2001). "Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice." Nature 410(6832): 1111-1116.
- Junker, K., T. Wiethage, et al. (2000). "Pathology of small-cell lung cancer." J Cancer Res Clin Oncol 126(7): 361-368.
- Kalikaki, A., A. Koutsopoulos, et al. (2008). "Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC." Br J Cancer 99(6): 923-929.

- Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, et al. (2008). "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." N Engl J Med 359(17): 1757-1765.
- Kerkhoff, E. and U. R. Rapp (1998). "Cell cycle targets of Ras/Raf signalling." Oncogene 17(11 Reviews): 1457-1462.
- Kim, E. S., V. Hirsh, et al. (2008). "Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial." Lancet 372(9652): 1809-1818.
- Kirsten, W. H. and L. A. Mayer (1967). "Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus." J Natl Cancer Inst 39(2): 311-335.
- Kris, M. G., R. B. Natale, et al. (2003). "Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial." JAMA 290(16): 2149-2158.
- Kwak, E. L., Y. J. Bang, et al. (2010). "Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer." N Engl J Med 363(18): 1693-1703.
- Langer, C. J. (2011). "Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment Of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer." P T 36(5): 263-279.
- Le Calvez, F., A. Mukeria, et al. (2005). "TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers." Cancer Res 65(12): 5076-5083.
- Lea, I. A., M. A. Jackson, et al. (2007). "Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns." Carcinogenesis 28(9): 1851-1858.
- Li, Z. H., J. Zheng, et al. (1994). "c-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung." Am J Pathol 144(2): 303-309.
- Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2006). "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." Cancer Res 66(8): 3992-3995.
- Linardou, H., I. J. Dahabreh, et al. (2008). "Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer." Lancet Oncol 9(10): 962-972.
- Lind, J. S., A. M. Dingemans, et al. (2010). "A multicenter phase II study of erlotinib and sorafenib in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res 16(11): 3078-3087.
- Lobell, R. B., C. A. Omer, et al. (2001). "Evaluation of farnesyl:protein transferase and

- geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models." Cancer Res 61(24): 8758-8768.
- Losi, L., B. Baisse, et al. (2005). "Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression." Carcinogenesis 26(5): 916-922.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, et al. (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." N Engl J Med 350(21): 2129-2139.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years." Nat Rev Cancer 3(6): 459-465.
- Mansour, S. J., W. T. Matten, et al. (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." Science 265(5174): 966-970.
- Mao, C., L. X. Qiu, et al. (2009). "KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis of 22 studies." Lung Cancer.
- Marchetti, A., M. Milella, et al. (2009). "Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones." Neoplasia 11(10): 1084-1092.
- Marks, J. L., S. Broderick, et al. (2008). "Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol 3(2): 111-116.
- Martin, G. A., D. Viskochil, et al. (1990). "The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21." Cell 63(4): 843-849.
- Massarelli, E., M. Varella-Garcia, et al. (2007). "KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer." Clin Cancer Res 13(10): 2890-2896.
- Mattsson, J. S., J. Imgenberg-Kreuz, et al. (2012). "Consistent mutation status within histologically heterogeneous lung cancer lesions." Histopathology.
- Mendelsohn, J. and J. Baselga (2000). "The EGF receptor family as targets for cancer therapy." Oncogene 19(56): 6550-6565.
- Miller, V. A., D. H. Johnson, et al. (2003). "Pilot trial of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib plus carboplatin and paclitaxel in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 21(11):

2094-2100.

- Miller, V. A., G. J. Riely, et al. (2008). "Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib." J Clin Oncol 26(9): 1472-1478.
- Mitsudomi, T., J. Viallet, et al. (1991). "Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines." Oncogene 6(8): 1353-1362.
- Mok, T. S., Y. L. Wu, et al. (2009). "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma." N Engl J Med 361(10): 947-957.
- Monaco, S. E., M. N. Nikiforova, et al. (2010). "A comparison of EGFR and KRAS status in primary lung carcinoma and matched metastases." Hum Pathol 41(1): 94-102.
- Moran, A., P. Ortega, et al. (2010). "Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance." World J Gastrointest Oncol 2(3): 151-158.
- Mori, M., S. K. Rao, et al. (2001). "Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a probable forerunner in the development of adenocarcinoma of the lung." Mod Pathol 14(2): 72-84.
- National Lung Screening Trial Research, T., D. R. Aberle, et al. (2011). "Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening." N Engl J Med 365(5): 395-409.
- Neumann, J., E. Zeindl-Eberhart, et al. (2009). "Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer." Pathol Res Pract 205(12): 858-862.
- Newton, C. R., A. Graham, et al. (1989). "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)." Nucleic Acids Res 17(7): 2503-2516.
- Niho, S., K. Kubota, et al. (2002). "Triplet chemotherapy with vinorelbine, gemcitabine, and cisplatin for advanced non-small cell lung cancer: a phase II study." Br J Cancer 87(12): 1360-1364.
- Normanno, N., C. Bianco, et al. (2005). "The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview." Curr Drug Targets 6(3): 243-257.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science 194(4260): 23-28.
- Ohshima, S., Y. Shimizu, et al. (1994). "Detection of c-Ki-ras gene mutation in paraffin

- sections of adenocarcinoma and atypical bronchioloalveolar cell hyperplasia of human lung." Virchows Arch 424(2): 129-134.
- Olaussen, K. A., A. Dunant, et al. (2006). "DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy." N Engl J Med 355(10): 983-991.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science 304(5676): 1497-1500.
- Pao, W., V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A 101(36): 13306-13311.
- Pao, W., V. A. Miller, et al. (2005). "Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain." PLoS Med 2(3): e73.
- Pao, W., T. Y. Wang, et al. (2005). "KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib." PLoS Med 2(1): e17.
- Pastorino, U., S. Andreola, et al. (1997). "Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis." J Clin Oncol 15(8): 2858-2865.
- Patel, J. D., L. M. Krug, et al. (2003). "Targeting lethal minimal residual disease in small cell lung cancer." Semin Oncol 30(1): 79-85.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev 22(2): 153-183.
- Pennell, N. A. and L. V. Sequist (2007). "Assessing the roles of EGFR gene copy number, protein expression and mutation in predicting outcomes in non-small-cell lung cancer after treatment with EGFR inhibitors." Biomark Med 1(1): 203-207.
- Petersen, I., M. Bujard, et al. (1997). "Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung." Cancer Res 57(12): 2331-2335.
- Pfeifer, G. P. and A. Besaratinia (2009). "Mutational spectra of human cancer." Hum Genet 125(5-6): 493-506.
- Pfeifer, G. P., M. F. Denissenko, et al. (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." Oncogene 21(48): 7435-7451.
- Pintilie, M., V. Iakovlev, et al. (2009). "Heterogeneity and power in clinical biomarker

- studies." J Clin Oncol 27(9): 1517-1521.
- Rami-Porta, R., J. J. Crowley, et al. (2009). "The revised TNM staging system for lung cancer." Ann Thorac Cardiovasc Surg 15(1): 4-9.
- Rapp, U. R., C. Korn, et al. (2009). "MYC is a metastasis gene for non-small-cell lung cancer." PLoS One 4(6): e6029.
- Riely, G. J., M. G. Kris, et al. (2008). "Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma." Clin Cancer Res 14(18): 5731-5734.
- Riely, G. J., J. Marks, et al. (2009). "KRAS mutations in non-small cell lung cancer." Proc Am Thorac Soc 6(2): 201-205.
- Rinehart, J., A. A. Adjei, et al. (2004). "Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer." J Clin Oncol 22(22): 4456-4462.
- Roberts, P. J., T. E. Stinchcombe, et al. (2010). "Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy?" J Clin Oncol 28(31): 4769-4777.
- Rodenhuis, S. and R. J. Slebos (1992). "Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer." Cancer Res 52(9 Suppl): 2665s-2669s.
- Rodenhuis, S., M. L. van de Wetering, et al. (1987). "Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung." N Engl J Med 317(15): 929-935.
- Roggli, V. L., R. T. Vollmer, et al. (1985). "Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases." Hum Pathol 16(6): 569-579.
- Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." N Engl J Med 353(16): 1673-1684.
- Rossi, A., P. Maione, et al. (2008). "New targeted therapies and small-cell lung cancer." Clin Lung Cancer 9(5): 271-279.
- Sagawa, M., Y. Saito, et al. (1998). "K-ras point mutation occurs in the early stage of carcinogenesis in lung cancer." Br J Cancer 77(5): 720-723.
- Sakurada, A., H. Lara-Guerra, et al. (2008). "Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol 3(5): 527-529.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit Rev Oncol Hematol 19(3): 183-232.

- Sanchez-Cespedes, M., S. A. Ahrendt, et al. (2001). "Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers." Cancer Res 61(4): 1309-1313.
- Sandler, A., R. Gray, et al. (2006). "Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer." N Engl J Med 355(24): 2542-2550.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-5467.
- Scagliotti, G., S. Novello, et al. (2010). "Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 28(11): 1835-1842.
- Schiller, J. H., D. Harrington, et al. (2002). "Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer." N Engl J Med 346(2): 92-98.
- Schilsky, R. L. (1987). "Clinical implications of tumor heterogeneity." Haematol Blood Transfus 31: 278-282.
- Schmid, K., N. Oehl, et al. (2009). "EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases." Clin Cancer Res 15(14): 4554-4560.
- Sequist, L. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 25(5): 587-595.
- Sequist, L. V., V. A. Joshi, et al. (2007). "Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing." Oncologist 12(1): 90-98.
- Sharma, S. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." Nat Rev Cancer 7(3): 169-181.
- Shepherd, F. A., J. Rodrigues Pereira, et al. (2005). "Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer." N Engl J Med 353(2): 123-132.
- Simon, G. R., A. Turrisi, et al. (2007). "Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)." Chest 132(3 Suppl): 324S-339S.
- Smaill, J. B., G. W. Rewcastle, et al. (2000). "Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(Phenylamino)quinazoline- and 4-(Phenylamino)pyrido." J Med Chem 43(16):

3199.

- Smakman, N., I. H. Borel Rinkes, et al. (2005). "Control of colorectal metastasis formation by K-Ras." Biochim Biophys Acta 1756(2): 103-114.
- Smith, L. M., J. Z. Sanders, et al. (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." Nature 321(6071): 674-679.
- Solomon, B., M. Varella-Garcia, et al. (2009). "ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol 4(12): 1450-1454.
- Sos, M. L., M. Koker, et al. (2009). "PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR." Cancer Res 69(8): 3256-3261.
- Spiro, S. G., M. K. Gould, et al. (2007). "Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition)." Chest 132(3 Suppl): 149S-160S.
- Suda, K., K. Tomizawa, et al. (2010). "Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation." Cancer Metastasis Rev 29(1): 49-60.
- Sugio, K., Y. Kishimoto, et al. (1994). "K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas." Cancer Res 54(22): 5811-5815.
- Sun, L., Q. Zhang, et al. (2011). "Comparison of KRAS and EGFR gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice." J Exp Clin Cancer Res 30: 30.
- Suzuki, Y., M. Orita, et al. (1990). "Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products." Oncogene 5(7): 1037-1043.
- Takahashi, T., Y. Obata, et al. (1989). "Expression and amplification of myc gene family in small cell lung cancer and its relation to biological characteristics." Cancer Res 49(10): 2683-2688.
- Takano, T., Y. Ohe, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 23(28): 6829-6837.
- Taniguchi, K., J. Okami, et al. (2008). "Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to

- gefitinib." Cancer Sci 99(5): 929-935.
- Tejpar, S., I. Celik, et al. (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(29): 3570-3577.
- Thelwell, N., S. Millington, et al. (2000). "Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection." Nucleic Acids Res 28(19): 3752-3761.
- Tie, J., L. Lipton, et al. (2011). "KRAS Mutation Is Associated with Lung Metastasis in Patients with Curatively Resected Colorectal Cancer." Clin Cancer Res.
- Travis , W. D., Brambilla, E., Mueller-Hermelink, H.K., Harris, C.C., et al. (2004). "World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart." Lyon:IARC Press:2004
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, E. Et al. (2011). "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma" J Thorac Oncol 6(2): 244-285
- Tsao, J. L., S. Tavare, et al. (1999). "Colorectal adenoma and cancer divergence. Evidence of multilineage progression." Am J Pathol 154(6): 1815-1824.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." Mol Cell Biol 16(10): 5276-5287.
- Warth, A., Macher-Goeppinger S., et al. (2012). "Clonality of multi-focal non small cell lung cancer: implications for staging and therapy." Eur Resp J 39(6):1437-1442
- Watanabe, T., T. Kobunai, et al. (2011). "Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer." Dis Colon Rectum 54(9): 1170-1178.
- Weinstein, I. B. (2002). "Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer." Science 297(5578): 63-64.
- West, H., R. Lilenbaum, et al. (2009). "Molecular analysis-based treatment strategies for the management of non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol 4(9 Suppl 2): S1029-1039; quiz S1041-1022.
- Westra, W. H., I. O. Baas, et al. (1996). "K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung." Cancer Res 56(9): 2224-2228.
- Westra, W. H., R. J. Slebos, et al. (1993). "K-ras oncogene activation in lung

- adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung." Cancer 72(2): 432-438.
- Wong-Staal, F., R. Dalla-Favera, et al. (1981). "Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes of mammalian sarcoma retroviruses." Science 213(4504): 226-228.
- Wu, C. C., H. Y. Hsu, et al. (2008). "Reversed mutation rates of KRAS and EGFR genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications." Cancer 113(11): 3199-3208.
- Wu, X., H. Zhao, et al. (2004). "Genetic susceptibility to tobacco-related cancer." Oncogene 23(38): 6500-6523.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer 37 Suppl 4: S3-8.
- Yatabe, Y., K. Matsuo, et al. (2011). "Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma." J Clin Oncol 29(22): 2972-2977.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Möglichkeit danken, diese Arbeit im Institut für Pathologie durchführen zu können. Dank gebührt ihm zudem für die vorbildliche Unterstützung sowie kontinuierliche und zeitintensive Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Dr. Tobias Grob danke ich für die Anleitung bei der Auswertung der Resultate und seinem unermüdlichen Engagement während der Erarbeitung der Publikation.

Herrn cand. med. Tobias Hoenig danke ich ganz herzlich für die erfolgreiche gemeinsame Zusammenarbeit bei der Erarbeitung der Tumordatenbank.

Frau Charlotte Alsdorf danke ich herzlich für die Einarbeitung, gute Zusammenarbeit und die Unterstützung während der Arbeit im Labor.

Frau Gabriele Rieck, Frau Sina Dietrich und Frau Veronika Strag danke ich ebenfalls herzlich für die hervorragende Unterstützung und Hilfestellung während der Arbeit im Labor.

Herrn Dr. Till Clauditz danke ich für die Durchführung der Mikrodissektion und die Markierung der Tumoreale auf den histologischen Schnittpräparaten.

Frau Christina Koop danke ich für die hilfsbereite und freundliche Betreuung sowie Organisation während der gesamten Arbeit.

## 9. Lebenslauf

### Schulbildung

1997-2006 Friedrich-Ebert Gymnasium Hamburg

2006 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

2006-2012 Studium der Humanmedizin Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

September 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Juli 2009 – September 2012 Promotion im Institut für Pathologie des UKE

Oktober 2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

November 2012 Approbation als Arzt

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Alsdorf WH, Clauditz TS, Hoenig T, Quaas A, Sirma H, Koenig AM, Izbicki J, Sauter G, Marx AH, Grob TJ (2012). Intratumoral heterogeneity of KRAS mutation is rare in non small cell lung cancer. *Exp Mol Pathol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.016>

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....