



**Technische Universität München**

**Fakultät für Medizin**

**Molekulargenetisches Risikoprofil zur Prädiktion im  
adjuvanten Setting bei Patienten mit lymphogen  
metastasiertem Kolonkarzinom**

**Alexander Maxim Balmert M.Sc. (TUM)**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
2. Prof. Dr. Dieter Saur

Die Dissertation wurde am 24.01.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Epidemiologie und Vorsorge .....	5
1.2	Klinische Einteilung .....	6
1.3	Signalwege der kolorektalen Karzinogenese.....	9
1.4	Chemotherapie beim Kolonkarzinom im Vergleich zu anderen Therapieformen 12	
1.5	Biomarker für Kolorektalkarzinom.....	15
1.5.1	KRAS .....	15
1.5.2	BRAF .....	17
1.5.3	Mikrosatelliteninstabilität .....	18
1.5.4	Osteopontin (OPN) als Surrogatmarker für den kanonischen WNT Signalweg .....	20
1.5.5	SASH1 .....	23
1.5.6	MACC1 .....	24
1.5.7	Immunmodulation .....	26
2	Zielsetzung.....	26
3	Material und Methoden .....	28
3.1	Materialien .....	28
3.1.1	Chemikalien .....	28
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	28
3.1.3	Geräte .....	29
3.1.4	Enzyme .....	30
3.1.5	Stammlösungen .....	30
3.1.6	Oligonukleotide .....	31
3.1.7	Reagenzienkits .....	31
3.1.8	Zelllinien.....	31

3.1.9	Patientenkollektiv .....	32
3.2	Methoden .....	32
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.2	Statistische Auswertverfahren.....	39
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Gewinnung RNA / DNA .....	41
4.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	42
4.3	Expressionsanalyse.....	44
4.3.1	Osteopontin (OPN) .....	44
4.3.2	MACC1 .....	46
4.3.3	SASH1 .....	47
4.3.4	MMR .....	49
4.4	Mutationsanalysen HRMA .....	50
4.4.1	KRAS Status im Patientenkollektiv .....	52
4.4.2	BRAF Status im Patientenkollektiv.....	53
4.5	Biomarker Korrelation mit Prognose und Überleben .....	54
4.6	Spearman Rho und multivariable Cox- Regressionsanalyse zur Risikobeurteilung.....	58
4.7	Prädiktive Biomarker für Therapieansprechen bei adjuvantem Setting .....	61
4.8	Molekulare Subgruppen mit unterschiedlichem Risikoprofil .....	62
5	Diskussion.....	66
5.1	Kolonkarzinom.....	66
5.2	Zielsetzung .....	67
5.3	Biomarker auf mRNA Basis- Vergleich von Stadium II und III .....	68
5.4	Biomarker auf somatischer DNA- Basis .....	70
5.5	Risikobeurteilung mit der Cox- Regressionsanalyse im Stadium III .....	74
5.6	Risikovorhersage im Stadium III („2-Step-Cluster“-Verfahren) .....	75
5.7	Osteopontin als Prädiktor auf Therapieansprechen.....	76

5.8	Signalwege des Kolonkarzinoms.....	77
6	Schlussfolgerung.....	79
7	Zusammenfassung.....	80
8	Summary.....	81
9	Publikationsnachweise.....	82
10	Literaturverzeichnis.....	83
11	Anhang .....	96
11.1	Abkürzungsverzeichnis .....	96
11.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
11.3	Tabellenverzeichnis.....	100
12	Danksagung.....	101

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Vorsorge

Als Darmkrebs werden maligne Krebserkrankungen des Dickdarms (Kolonkarzinom) und des Mastdarms (Rektumkarzinom) verstanden. Zusammenfassend werden sie als kolorektales Karzinom bezeichnet. Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit dar. In Deutschland verzeichnet das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2016 etwa 59.040 Neuerkrankungen, davon rund 44 % Frauen und 56 % Männer. Frauen mit der Diagnose KRK waren im Mittel 76 Jahre, Männer im Mittel 72 Jahre alt (Kaatsch P et al. 2016). Circa 23787 (Krebsregisterdaten 5.11.2021) Patienten starben im selben Jahr infolge ihres KRK (Kaatsch P et al. 2016). Wesentlich häufiger tritt nur noch Prostatakrebs (bei Männern) bzw. Brustkrebs (bei Frauen) sowie Lungenkrebs auf (Ferlay et al. 2021). Weltweit gesehen ist das kolorektale Karzinom bei Frauen sogar die zweithäufigste Krebserkrankung (Siegel et al. 2018). Die Mehrheit der kolorektalen Karzinome tritt mit circa 80 % sporadisch auf. Als allgemeine Risikofaktoren gelten eine ballaststoffarme Kost, der Konsum von hohen Mengen tierischer Fette, der Verzehr von so genanntem „roten Fleisch“, eine geringe körperliche Aktivität, hohes Alter, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, männliches Geschlecht, Rauchen und Alkoholkonsum, sowie ein kolorektales Karzinom in der eigenen Vorgeschichte (Zarkavelis et al. 2017). Auch eine positive Familienanamnese geht mit einem relativen erhöhten Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, einher. Das Lynch-Syndrom ist mit einem Anteil von etwa 3 % aller Darmkrebserkrankungen die häufigste genetische Tumorerkrankung des Kolons (Pellat et al. 2019). Es zeichnet sich durch einen Defekt der Basenpaarmismatch-Reparatur aus, wobei dieser Reparaturmechanismus dafür sorgt, dass bei Fehlpaarungen von Nukleinbasen das falsche Nukleotid aus dem nicht-methylierten Tochterstrang ausgeschnitten und ersetzt wird (Boland et al. 2018). Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit variierenden Graden der Manifestationswahrscheinlichkeit. Unbehandelt, entwickeln die Patienten 100-1000 Polypen im Kolon und Rektum, welche sich mit einer Wahrscheinlichkeit von nahezu 100% um das vierzigste Lebensjahr zu einem kolorektalen Karzinom entwickeln (Kanth et al. 2017). Als risikominimierend gilt eine obst- und gemüsereiche Kost. Allerdings weisen 75 % der Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom außer ihrem Alter keine spezifischen Risikofaktoren auf

(Cunningham et al. 2010). Durch die Einführung präventiver Maßnahmen wie der Koloskopie und fäkalem okkultem Bluttest (FOBT) und der digital-rektalen Untersuchung ist die Mortalität von Kolonkarzinomen stark zurückgegangen. Dabei stellt die Koloskopie (ab dem 55. Lebensjahr) durch die hohe Sensitivität und Spezifität den „Goldstandard“ dar und sollte bei negativem Befund alle 10 Jahre wiederholt werden (Pox and Schmiegel 2019). Bei einer familiären Prädisposition wird die Vorsorgeuntersuchung mit bereits 50 Jahren empfohlen oder 10 Jahre vor dem Auftreten eines KRK in der Familie und sollte auch bei negativem Befund alle zwei Jahre wiederholt werden (Schmiegel W et al. 2017, Pox and Schmiegel 2019). Bei frühzeitig erkannten Fällen kann eine kurative Resektion vorgenommen werden, die im Großteil der Fälle die Heilung des Patienten ermöglicht. Allerdings weisen heutzutage circa 40 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose Lymphknotenmetastasen, und in 20 % der Fälle befindet man sich im palliativen Setting, da der Tumor bereits Fernmetastasen gebildet hat und eine kurative Resektion daher unmöglich wird (Xu et al. 2020) (Yu and Cheung 2018). Vor Therapieeinleitung wird heutzutage ein Staging durchgeführt, das sich aus Koloskopie, CT Thorax, Abdomen und Becken zur Beurteilung des Lymphknotenstatus und zur Suche nach Fernmetastasen zusammensetzt (Pox and Schmiegel 2019).

## **1.2 Klinische Einteilung**

Der „Goldstandard“ der Prognose-Stellung ist zurzeit die klinisch-histopathologische Einstufung nach der international empfohlenen TNM Klassifizierung (Wittekind 2017). Je früher kolorektale Läsionen erkannt werden, desto wahrscheinlicher ist die Möglichkeit der operativen Intervention und das tumorfreie Überleben. Durch die Endoskopie ist es mittlerweile möglich, bereits Vorstufen der Kolonkarzinome zu entdecken, zu entfernen, und somit die Überlebenschancen zu verbessern. Die Überlebensprognose für den Patienten ist vor allem abhängig von der Ausbreitung des Tumors und vom Zeitpunkt der Diagnosestellung. Eine Einteilung der Patienten in spezifische Gruppen ausgehend von der jeweiligen Tumorausbreitung ist eine zentrale Empfehlung für das weitere therapeutische Vorgehen sowie für die individuelle Prognose. Ein ideales Klassifikationssystem erlaubt ein frühes Staging, ist robust und gut durchführbar im klinischen Alltag und erreicht eine gute Prognoseeinschätzung. Aktuell werden die Tumorentitäten und die histologischen Subtypen nach der „International Classification of Diseases for Oncology“ (ICD-O) eingeteilt. Der

Goldstandard ist die TNM Klassifikation („tumor“, „node“, „metastasis“) der UICC (International Union Against cancer) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer) (Webber et al. 2014). Dieses beschreibt die Invasionstiefe des Primärtumors (T1-T4), die Tumordinfiltration ins lymphatische Gewebe bzw. Lymphknoten (N0-N2) und Fernmetastasen (M0/M1). In Abhängigkeit vom Tumorstadium und prognostischen Faktoren variieren die Therapien und die Prognosen der Patienten sehr stark. Patienten, die dem Stadium I (T1-T2 N0M0, ca 19 %) angehören haben nach chirurgischer Intervention ein sehr niedriges Rezidivrisiko sowie eine gute Prognose. Diese Tumore sind gut differenziert und zeigen keine Infiltration der Lymphgefäße (Gertler et al. 2009). Ca. 30 % der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung im Tumorstadium II. Dieses wird charakterisiert durch eine größere Eindringtiefe des Primärtumors ohne Lymphinfiltration und ohne Fernmetastasen (T3-4, N0 M0). Auch diese Patienten profitieren von einer alleinigen Tumoresektion. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Überlebensraten sehr stark variieren können bei dieser Patientengruppe (Gertler et al. 2009). Denn ca. 20 % der Patienten erleiden ein Rezidiv und klinische Studien zeigen, dass dieses Patientenkollektiv von einer adjuvanten Therapie profitiert (Gertler et al. 2009), (Benson et al. 2004). Eine generelle Empfehlung zur adjuvanten Therapie wurde allerdings für Stadium II Patienten nicht ausgesprochen, da nur 5 % der Patienten hiervon profitieren würden und die finanzielle Belastung sowie die Toxizität der Chemotherapie dagegensprechen. Trotzdem haben klinischen Studien eine Subgruppe an Hochrisiko-Patienten identifizieren können, welche von einer Chemotherapie im Stadium II profitieren würden. Allerdings finden sich in dieser Subgruppe keine molekularen Marker zur Klassifikation (Gangadhar and Schilsky 2010). Als klinische Marker werden bisher herangezogen: T4 Tumore mit schlechter Differenzierung, eine Notfall-OP, Invasion in Lymphgefäße, Perforation und Komorbiditäten (Romanus et al. 2009). Annähernd 30 % der Patienten haben zum Diagnosezeitpunkt eine Infiltration der Lymphgefäße, jedoch ohne Fernmetastasen (UICC/AJCC Stadium III). Das Tumorspezifische 5-Jahres-Überleben variiert sehr stark: von 89 % bei IIIA bis 36 % bei IIIC (Nitsche et al. 2011). Die empfohlene Therapie ist die Tumoresektion inklusive der Lymphknotenresektion mit anschließender adjuvanter Chemotherapie. Seit den frühen 1980er Jahren bestand die Chemotherapie aus 5-FU mit oder ohne Oxaliplatin (Ades 2009, Brenner et al. 2014). Die adjuvante Chemotherapie reduziert das Rezidivrisiko von ca. 50 % auf bis zu 30 % (Gill et al. 2004), jedoch werden dabei alle Patienten den Nebenwirkungen der Therapie

ausgesetzt, unabhängig davon, ob sie von der Therapie profitieren oder nicht. In der Ära der personalisierten Therapie wird der Nutzen einer standardisierten Chemotherapie für alle Stadium- III- Patienten immer mehr hinterfragt (Brenner et al. 2014), da das Stadium III sehr heterogen ist und aus mehreren Untergruppen mit unterschiedlicher Tumorbiologie besteht. Weder die TNM Klassifikation, noch aktuell verfügbare histopathologische Marker können eine genaue Prädiktion des Rezidivrisikos in diesem Stadium leisten (Nitsche et al. 2011). Bemerkenswerterweise haben Patienten im Stadium II ein signifikant besseres Langzeitüberleben nach Tumorresektion auch ohne adjuvante Chemotherapie, als Patienten in Stadium III (Nitsche et al. 2011). Dieses schlechtere postoperative Überleben im Stadium III kann Hinweis sein für ein frühes systemisches Streuen der Erkrankung in Form von disseminierten Mikrometastasen, oder für tumorintrinsic molekulare Veränderungen, die eine Metastasierung erleichtern und somit häufiger in Stadium III anzutreffen sind als in Stadium II. Auch spielen molekulare Veränderungen, welche eine Tumorzelle resistent gegen Chemotherapie machen, in Stadium III eine stärkere Rolle als in Stadium II, was neben prognostischen auch prädiktive Konsequenzen ergibt. Im Stadium IV (Fernmetastasen, 22 % der Patienten) ist das mediane Überleben generell niedrig. Es konnte durch verbesserte Chemotherapeutika und den Einsatz von „Small molecules“ über die letzten Jahrzehnte von 6 Monaten auf 20 Monate verbessert werden (Meyerhardt and Mayer 2005) (Yu and Cheung 2018). Klinische sowie molekulare Marker erlauben eine Selektion Patienten des Stadium IV, welche von spezifischen multimodalen therapeutischen Ansätzen profitieren und in einem verbesserten Langzeitüberleben münden (Deschoolmeester et al. 2010). Die Identifizierung von Hochrisiko- Patienten ist schwierig und die Herausforderung ist groß, das Wissen über die molekulare Tumorbiologie in klinische Anwendungen umzusetzen (Markowitz and Bertagnolli 2009).



Tabelle 1: 8. Version der TNM Klassifikation

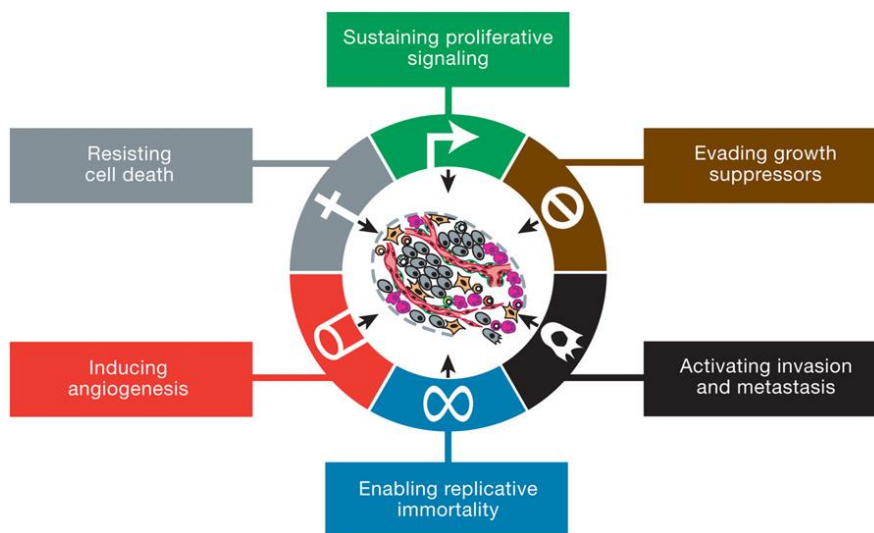
UICC Stadium	T	N	M
0	Tis	N 0	M 0
I	T1, T2	N 0	M 0
II	T3, T4	N 0	M 0
Ila	T3	N 0	M 0
IIB	T4a	N 0	M 0
IIC	T4b	N 0	M 0
III	Jedes T	N1, N2	M 0
IIIA	T1-T2	N1a	M 0
	T1	N 2a	M 0
IIIB	T1-T2	N 2b	M 0
	T2-T3	N2a	M 0
	T3-T4a	N1	M 0
IIIC	T3-T4a	N2b	M 0
	T4a	N2a	M 0
	T4b	N1-N2	M 0
IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b
IVC	jedes T	jedes N	M1c

TNM Klassifikation nach Wittekind (Wittekind 2017)

### 1.3 Signalwege der kolorektalen Karzinogenese

Ein weitgehend anerkanntes Modell der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist die Adenom-Karzinom-Sequenz. Bei diesem Modell wird von einem kontinuierlichen Übergang einer hyperproliferativen Schleimhaut zum frühen Adenom, intermediären Adenom, späten Adenom bis zum Karzinom ausgegangen. Fearon und Vogelstein (1990) ordneten der histologischen Entwicklung der Neoplasie und deren Progression die jeweilige Mutation eines oder mehrerer Gene zu. Der „gatekeeper pathway“ entspricht einer Akkumulation von Mutationen von Protoonkogenen und

Tumorsuppressorgenen. Der „caretaker pathway“ basiert auf einer Mutation der Mismatch-Repair-Gene, deren Aufgabe es ist, während der Replikation entstandene DNA-Fehler zu beheben. Die Akkumulation von Mutationen in unterschiedlichen Signalwegen entlang der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ ist entscheidend (Vogelstein 1990), wodurch es zu gravierenden Folgen für das Zellwachstum, die Zellteilung und –differenzierung kommt. Seit der ersten Veröffentlichung von Fearon und Vogelstein hat sich unser Verständnis der molekularen Pathogenese verbessert und zu einigen Änderungen des Modells geführt. Dieses Modell wurde von Hanahan und Weinberg 2011 überarbeitet und beschreibt Krebs ganz allgemein (Hanahan and Weinberg 2011).



**Abbildung 1 Hallmarks of Cancer**

Dargestellt sind die 6 „Hallmarks of Cancer“ welche 2011 von Hanahan und Weinberg postuliert wurden (Hanahan and Weinberg 2011).

Die sechs Kennzeichen der Tumorentstehung bestehen aus: Aufrechterhalten von proliferativen Signalen, Entgehen von Wachstumssuppressoren, Aktivierung von Invasion und Metastasierung, replikative Unsterblichkeit, Induzierung von Angiogenese und Widersetzen gegen den Zelltod. Wichtig dabei ist das Zusammenspiel von genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorzellen sowie der Interaktion mit den sie umgebenden Zellen, Organstrukturen und Komponenten der extrazellulären Matrix. Makroskopisch und mikroskopisch lassen sich von den klassischerweise über ein Adenom entwickelten Karzinomen die serratierten Adenokarzinome, die medullären Karzinome und die mikropapillären Karzinome voneinander abgrenzen, wobei die histologische Erscheinung zu einem gewissen Grad die molekulare Entstehungsgrundlage widerspiegelt (Fearon and

Vogelstein 1990). Der „traditionelle“ Weg beschreibt Tumore mit stabilen Mikrosatelliten, welche auf inaktivierenden Mutationen im APC-Gen basieren und der Adenom-Karzinom-Sequenz entsprechen. Als „Gatekeeper-Mutation“ gilt eine Mutation des APC Gens („adenomatöse polyposis coli“) mit einer konsekutiven Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs über das Signalmolekül  $\beta$ -Catenin (Powell et al. 1992). Durch das Eingreifen in die Zellvorgänge der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Zellmigration und Chromosomensegregation kommt es zur Bildung dysplastischer Krypten in der Kolonschleimhaut und zur Entstehung früher Adenome (Kinzler and Vogelstein 1996). Im Verlauf kommt es in etwa 40 % der Fälle zu KRAS-Mutationen oder in 5 -10 % der Fälle zu BRAF- Mutationen. Des Weiteren können c-myc und der EGF-Rezeptor überexprimiert sein. Durch die Akquirierung weiterer Mutationen kommt es zur chromosomalen Instabilität, welche durch die Anhäufung der Mutationen zunimmt und dadurch zu weiteren Mutationen führen kann. Weitere Schlüsselmutationen sind hierbei u.a. Veränderungen in p53, dem „Wächter des Genoms“, DCC („deleted in colorectal carcinoma“) und Smad4 (Fearon and Vogelstein 1990, Markowitz and Bertagnolli 2009). Dies führt zu einem weiteren Wachstum und zu einem selektiven Vorteil der mutierten Zellen und somit zur weiteren Progression (Behrens 2005). Es gibt jedoch auch APC unabhängige Entstehungsmechanismen von Tumoren, welche z.B. auf einer Tumorinduktion durch das Onkogen Ras beruhen (Janssen et al. 2002). Diese Entstehungswege unterscheiden sich zum einen in der Mutationsabfolge und zum anderen in der Form der genetischen Instabilität, die sich als chromosomale oder Mikrosatelliten-Instabilität äussern kann. So spielen beispielsweise die aberrante Methylierung von CpG-Inseln („CpG island methylator phenotype“) sowie eine erhöhte Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H), welche auf Grund der Inaktivierung von Mismatch-Reperaturgenen entsteht, eine entscheidende Rolle beim serratierten Signalweg. Beim sessilen serratierten Adenom handelt es sich um einen flachen kaum über das Schleimhautniveau erhabenen Tumor, der endoskopisch meist schwer zu erkennen ist. Meist tritt er im rechtsseitigen Kolon auf und ist mit BRAF Mutationen assoziiert. Auf die unterschiedlichen Gene und Mechanismen wird im Folgenden eingegangen.

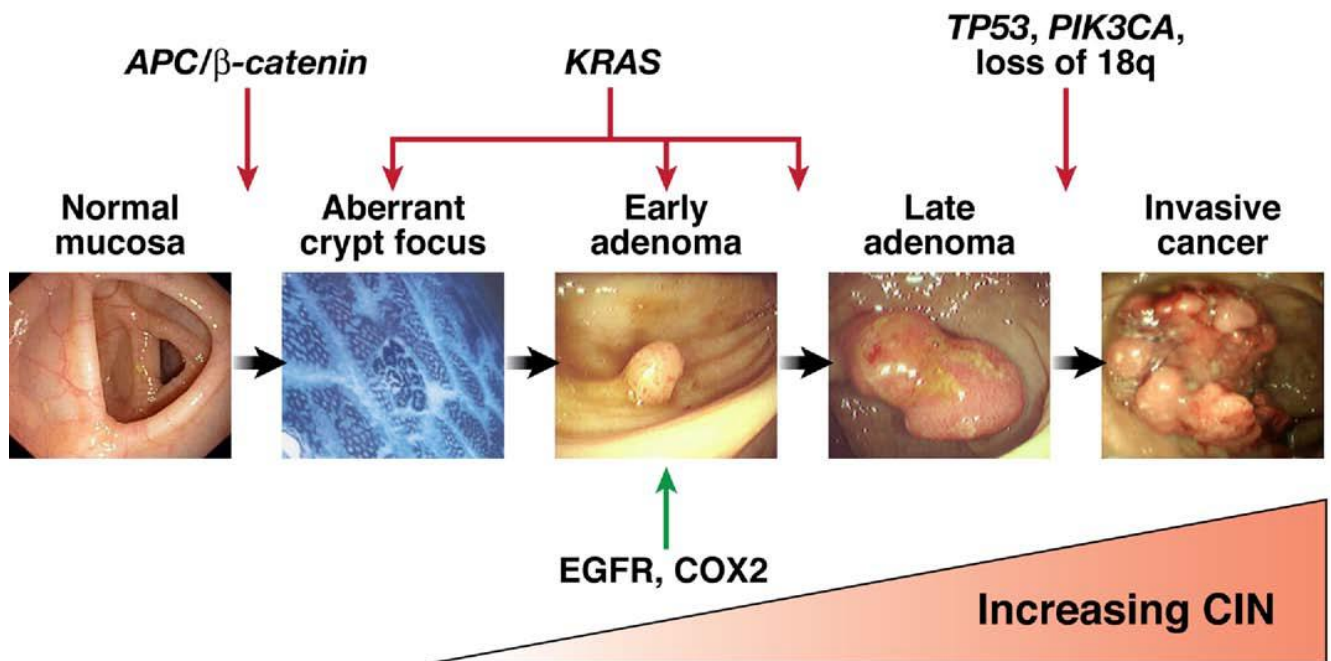


Abbildung 2: Modell der Adenom-Karzinom Sequenz für chromosomale Instabilität in Kolonkarzinomen (Pino and Chung 2011)

Mutationen in Tumorsuppressorgenen (APC, p53, DCC) und einem Onkogen (KRAS) führen zusammen zur Tumorgenese. Mutationen in APC und KRAS treten bereits sehr früh auf, während p53 erst in späteren Stadien mutiert ist. Von aberranten Krypten (ACF), den frühesten beobachtbaren Tumorstadien, bis hin zum malignen Karzinom ist eine stetige Zunahme der chromosomalen Instabilität, sowie von β-Catenin im Zellkern zu beobachten.

## 1.4 Chemotherapie beim Kolonkarzinom im Vergleich zu anderen Therapieformen

Die systemische Behandlung des Kolonkarzinoms bestand bis Ende der 1990er Jahre weitgehend aus dem Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU), welches vor allem in Kombination mit dem Modulator Folinsäure eingesetzt wird. 5-FU wirkt zumeist über eine Hemmung der Thymidilatsynthase und erreicht als Bolus appliziert beim metastasierten kolorektalen Karzinom Remissionsraten um 20 %, als kontinuierliche Infusion um 30 % (de Gramont et al. 2007). Im Laufe der Zeit kamen der Topoisomerase-Typ I Hemmer Irinotecan und das Platinderivat Oxaliplatin hinzu, die unter anderem den Thymidilatsynthespiegel senken sollen und so synergistisch mit 5-Fluoruracil wirken. Des Weiteren stehen mit den 5-FU-Vorläufersubstanzen, den oralen Fluoropyrimidinen Tegafur/Uracil und Capecitabin, gut verträgliche und durch ihre orale Verabreichungsform auch patientenfreundlichere Alternativen zur Verfügung (Pox and Schmiegel 2019). Cetuximab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an den EGF-Rezeptor der Tumorzelle bindet und so den wachstumsfördernden Stimulus des EGF auf die Tumorzelle verhindert. Bevacizumab ist als Antikörper

gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gerichtet (Yu and Cheung 2018, Pox and Schmiegel 2019). Proliferierende Tumorzellverbände produzieren VEGF, was zur Neoangiogenese führt. Beide Antikörper kommen im UICC IV Stadium im palliativen Fall zum Einsatz (Yu and Cheung 2018). Neben der direkten Wirkung auf EGFR vermitteln sie noch zusätzlich die „Antikörper-abhängige-Zytotoxizität“ (ADCC) durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen, T-Zell Rekrutierung zum Tumor und T-Zell Priming über eine dendritische Zellreifung (Garcia-Foncillas et al. 2019).

Das klinisch-pathologische Staging nach kurativer Resektion eines Kolonkarzinoms ist entscheidend für die Prognose und die weitere Therapie. Grundlage für die Indikation zur adjuvanten Therapie nach Tumorresektion ist insbesondere die Bestimmung des pN-Status. Patienten des UICC-Stadiums II und III sollten möglichst in kontrollierte, prospektive Studien eingeschlossen werden, um auf diese Weise Aufschluss über die Indikationsstellung und die optimale adjuvante Therapie zu erhalten. Patienten im Stadium II kann die adjuvante Behandlung derzeit nicht generell empfohlen werden, mit Ausnahme von jungen Patienten oder Hochrisikopatienten (T4-Tumor, Tumorperforation, Ileus, geringer Differenzierungsgrad des Tumors, Gefäß- oder Lymphinfiltration des Tumors (V1 oder L1), weniger als 10 untersuchte Lymphknoten, also ein potenzielles Understaging). Eine Oxaliplatin-haltige Therapie stellt den Standard in der adjuvanten Therapie im UICC Stadium III dar. Dabei wird meist das FOLFOX-Schema verwendet, bestehend aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin. Ein Therapiezyklus umfasst 2 Wochen, insgesamt werden 12 Zyklen laut S3- Leitlinien empfohlen. Dabei unterscheiden sich die Schemata FOLFOX4 und FOLFOX6 in der Dosierung der Folinsäure und der 5-FU Dosis, welche im FOLFOX6 Schema höher sind. Zudem gibt es noch das XELOX Schema mit Oxaliplatin und Capecitabine (orales Fluoropyrimidin). In der MOSAIC-Studie wurde das FOLFOX4 Schema mit der Kombination aus 5-Fluorouracil und Folinsäure mit 12 Zyklen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung des krankheitsfreien Überlebens von 7,2 % kommt (André et al. 2009). Die Prognose für Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom ist schlecht und liegt bei einem medianen 5-Jahres- Überleben von ca. 12,5 % (Siegel et al. 2014). Jedoch profitieren Patienten mit MSI nicht von einer rein 5-FU basierten Therapie (des Guetz et al. 2007) (Nitsche et al. 2011). In den letzten Jahren hat die Immuntherapie in verschiedenen Tumorentitäten die Behandlungszulassungen erhalten. Physiologischerweise

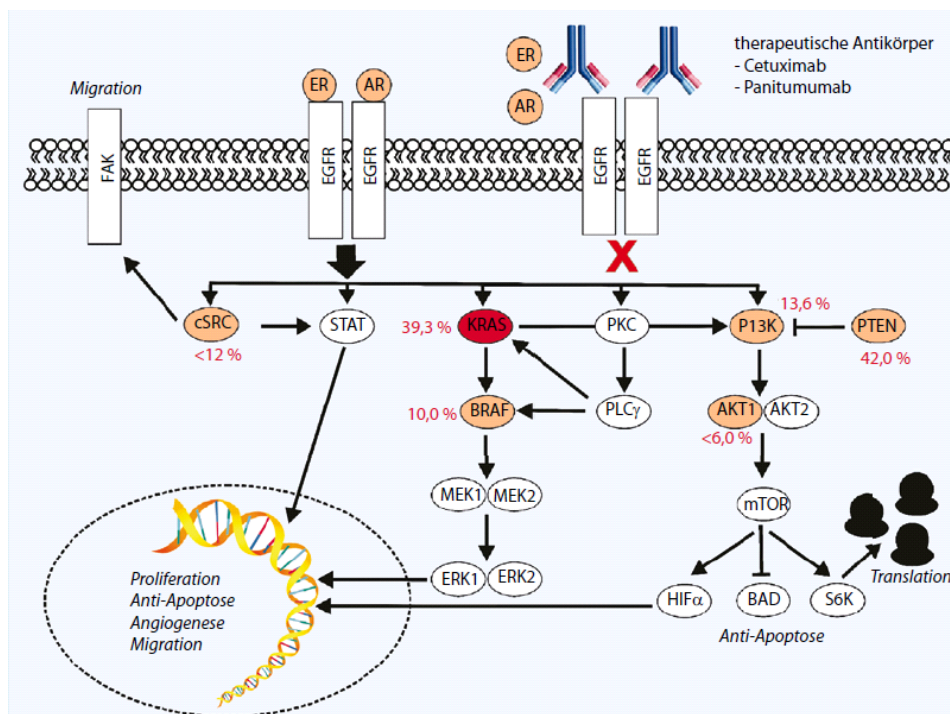
unterbindet der PD-1-Signalweg eine dauerhafte T-Zell-Aktivierung, um den Körper vor überschießenden Immunreaktionen zu schützen. Dies kann von Krebszellen genutzt werden, um die Immunreaktion zu dämpfen. Die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab binden an den Checkpoint-Rezeptor PD-1 auf aktivierten T-Zellen. Atezolizumab hingegen bindet an den PD-1-Liganden (PD-L1) und hemmt so die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand (Ganesh et al. 2019). Darüber hinaus blockiert es noch einen weiteren Signalweg. Im Tumor kommt es zur Reaktivierung der Immunantwort, in den Lymphknoten kann durch die teilweise Wiederherstellung des T-Zell-Primings die Bildung von zytotoxischen T-Zellen verstärkt werden. 2017 wurde Pembrolizumab von der FDA zur Behandlung aller MSI-H Tumore beim Kolonkarzinom zugelassen. Eine weitere randomisierte Phase-III-Studie im Tumorstadium III mit MSI-H (ca. 12%) in der die Kombination aus Atezolizumab und Chemotherapie, verglichen mit Chemotherapie allein, ist gerade Gegenstand der klinischen Forschung (Sinicrope et al. 2017). Die Immuntherapie könnte somit eine neue Ära der Krebstherapie einläuten. Bei vielen anderen Tumoren gibt es neben der Chemotherapie heute die Check-point-Immuntherapie oder „zielgerichtete Therapien“ mit therapeutischen Antikörpern oder „small-molecule“ Inhibitoren, welche beim kolorektalen Karzinom aktuell nur eine Anwendung im palliativen Setting haben. Im Gegensatz zu anderen Karzinomen wie dem malignen Melanom, bei dem die Immuntherapie sehr erfolgreich war, spielt die Chemotherapie in der Therapie beim Kolonkarzinoms eine entscheidende Rolle, da andere Therapieformen inklusive Immuntherapien gerade beim kolorektalen Karzinom mit stabilen Mikrosatelliten nicht erfolgreich waren (Taieb and Gallois 2020). Beim Rektumkarzinom ist eine Radiotherapie ebenfalls Teil der Therapie in den UICC-Stadien II und III. Hier soll bei Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder Kurzzeit-Radiotherapie erfolgen (Pox and Schmiegel 2019). Die Chemotherapie spielt eine entscheidende Rolle in der Therapie des Kolonkarzinoms, nichtsdestotrotz profitieren nur 30% der Patienten von der adjuvanten Behandlung. 50% der Patienten werden allein durch die chirurgische Resektion geheilt und wiederum 20% der Patienten werden ein Rezidiv bekommen trotz der adjuvanten Therapie. Daher ist es notwendig das individuelle Rezidivrisiko der Patienten vorauszusagen sowie den Nutzen der adjuvanten Therapien und bessere Biomarker für das Therapieansprechen zu finden (Taieb and Gallois 2020).

## 1.5 Biomarker für Kolorektalkarzinom

### 1.5.1 KRAS

Eine KRAS- Mutation (Kirsten-RAS) kommt bei 37 % der Dickdarmkarzinome vor und bewirkt eine konstitutive Aktivierung des KRAS-Proteins, sodass auf diesem Weg eine Autonomie des Signalwegs hergestellt wird, der nicht mehr von EGFR reguliert werden kann (Lievre et al. 2010, Siddiqui and Piperdi 2010). Eine „Gain of function“ KRAS-Mutation führt zu EGFR unabhängiger Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die in Tumorzellproliferation, Schutz gegen Apoptose, erhöhter Invasion und Metastasierung sowie in tumorinduzierter Angiogenese resultieren (van Krieken et al. 2008). An der „RASCAL“ -Studie nahmen 22 Arbeitsgruppen aus 13 Ländern mit insgesamt 2721 Patienten mit kolorektalen Karzinomen teil. Die genomische DNA der Tumorsektate wurde mittels „Einzelstrang PCR (SSPCR)“, „Allel Spezifischer PCR“, Hybridisierung mit allel-spezifischen Primern oder direktem Sequenzieren der Proben auf Mutationen im Kodon 12 und 13 untersucht. Insgesamt 37,7 % der Tumoren wiesen eine Mutation im KRAS-Gen auf, davon lagen 74 % in Kodon 12 und 25 % befanden sich in Kodon 13 (Forrester et al. 1987, Deschoolmeester et al. 2010). In genetisch definierten Maus-Modellen für Kolonkarzinome konnte nachgewiesen werden, dass eine aktivierende KRAS- Mutation für die Entstehung invasiver Karzinome, in Abwesenheit von APC-Mutationen, ausreicht (Janssen et al. 2002). Das Protoonkogen KRAS ist ein Mitglied der RAS Familie und kodiert für ein G-Protein von 21 kDa, welches verschiedene Signaltransduktionswege, Wachstums- und Differenzierungsprozesse reguliert (Rizzo et al. 2010). Zu dieser Familie gehören zudem das Harvey-RAS (HRAS), Kirsten-RAS (KRAS) und N-RAS (Heinemann et al. 2009). Im GTP gebundenen Zustand können die Proteine der RAS-Familie mit weiteren Signalmolekülen interagieren und so die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren, was zur Aktivierung proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren führt (Boutin et al. 2017). Die Mutationen in KRAS treten hauptsächlich in Codon 12 (74%) und 13 (25 %) auf, GTP kann daher nicht mehr hydrolysiert werden und es kommt zur konstitutiven Aktivierung des G-Proteins und zur Entkoppelung des MAPK Signalwegs vom Rezeptorsignal (Lievre et al. 2010, Steele et al. 2019). Dadurch kommt es zur gesteigerten Proliferation und Invasion der Tumorzellen, sowie zur Ausbreitung von Metastasen, antiapoptotischen Signalen und zur tumorinduzierten Angiogenese (van Krieken et al. 2008). Insgesamt sind 12 verschiedene Mutationen in den Kodons 12 und 13 (Exon 2) bekannt (Andreyev et al.

2001, Krypuy et al. 2006). In laboreigenen Voruntersuchungen konnte kein signifikanter Einfluss von KRAS-Mutationen auf das Überleben bei Kolonkarzinomen des Stadiums UICC II nachgewiesen werden (Nitsche et al. 2012). Die prognostische Bedeutung von KRAS-Mutationen wird umstritten gesehen, jedoch hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass Patienten mit einer KRAS-Mutation ein schlechteres Gesamtüberleben sowie rezidivfreies Überleben haben (Hutchins et al. 2011). Für die Therapieentscheidung spielt KRAS eine Rolle als prädiktiver Biomarker in Bezug auf die Behandlung mit EGFR-Inhibitoren. So zeigen Therapien mit den Anti-EGFR Antikörpern Panitumumab und Cetuximab nur eine Wirkung, wenn der EGFR-Signalweg physiologisch intakt ist (Kirchner and Jung 2010). Entsprechend ist vor Beginn einer anti-EGFR-Therapie der Ausschluss einer RAS-Mutation erforderlich (Rizzo et al. 2010)



**Abbildung 3: EGFR vermittelte Signaltransduktion in kolorektalen Zellen**

Der EGFR ist Mitglied der Rezeptortyrosinkinase-Familie. Nach Bindung seiner Liganden kommt es zur Aktivierung von 5 Signalwegen, die miteinander vernetzt sind. Der wichtigste Weg in kolorektalen Zellen ist der KRAS/BRAF/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg. Aktivierung dieses Signalwegs durch Amphiregulin (AR) und Epiregulin (ER) führt zu erhöhter Proliferation, Angiogenese, Migration und gleichzeitiger Hemmung der Apoptose. (Kirchner and Jung 2010)



## 1.5.2 BRAF

Bei den RAF-Proteinen („rapidly growing fibrosarcoma“) handelt es sich um eine Familie von Serin-Threonin-Proteinkinasen (Caputo et al. 2019). RAF spielt eine wichtige Schlüsselrolle bei der Kontrolle des zellulären Wachstums, der Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und Überleben. Des Weiteren sind sie als zentrale Effektoren der RAS- abhängigen Signalkaskaden im MAP-Kinase-Signalweg beschrieben, wobei sie die Kinasen MEK1 und 2 aktivieren (Rajagopalan et al. 2002). BRAF-Mutationen kommen beim Kolonkarzinomen in ca. 5 -15 % der Fälle vor (Jin and Sinicrope 2019). Mutationen kommen gehäuft im Exon 11 und 15 vor, mit 90 % aller Mutationen im Codon V600E (Seth et al. 2009). Üblicherweise tritt die V600E Mutation in der Form einer missense transversion am Nukleotid 1796 auf, und führt dazu, dass das Glutamat durch Valin ersetzt wird. Dieser spezifische Austausch zieht eine 500-fach stärkere Kinaseaktivität im Vergleich zum Wild-typ Protein nach sich (Seth et al. 2009). Beim Kolonkarzinom trägt mutiertes BRAF dazu bei, dass es zu einer erhöhten Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli kommt. Mutationen in den Genen KRAS und BRAF schließen sich allerdings gegenseitig aus (Walther et al. 2009). RAF-Mutationen korrelieren meist mit Mikrosatelliten-instabilen Tumoren, dem Vorkommen im rechten Kolon, mit dem weiblichen Geschlecht und spielen eine wichtige Rolle im serratierten Signalweg (Boland and Goel 2010). Zudem korrelieren sie in Mikrosatelliten-stabilen Tumoren mit einem schlechten Gesamtüberleben und dem Hypermethylierungs-Phänotyp (CIMP) (Samowitz et al. 2005). Tumore mit BRAF-Mutationen zeigen eine größere Tendenz, ins Peritoneum oder Lymphknoten zu streuen und führen zu einer größeren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lungenmetastasen (Tran et al. 2011). Analog zur KRAS-Mutation erfahren Patienten mit BRAF-Mutation keinen signifikanten Nutzen von einer Behandlung mit Panitumumab oder Cetuximab (Di Nicolantonio et al. 2008). Allerdings wird die BRAF-Mutationsanalyse bei Erstdiagnose der metastasierten Erkrankung empfohlen (S3 Leitlinie 2019). Laboreigene Untersuchungen bei Kolonkarzinomen des Stadiums UICC II zeigten für BRAF keinen signifikanten Zusammenhang mit der postoperativen Prognose (Nitsche et al. 2012). Vor kurzem veröffentlichte Daten zeigen des Weiteren, dass BRAF V600E transkriptionell die PD-L1 Expression in Kolonkarzinomzellen hochreguliert und damit die Chemotherapie induzierte Apoptose verstärken kann (Feng et al. 2019).

### 1.5.3 Mikrosatelliteninstabilität

Zahlreiche molekulargenetische Marker wurden im Hinblick auf ihre prognostische bzw. prädiktive Rolle beim Kolonkarzinom bislang untersucht. Molekular definierte Gruppen teilen sich auf in CIN, MSI und CpG island methylator phenotype (CIMP). Die meisten Fälle generieren sich aus dem CIN Weg mit Ungleichgewicht der Chromosomenanzahl und dem Verlust der Heterozygotie. Eine Vielzahl der sporadischen Fälle (60 -75 %) weist chromosomale Instabilität auf (Pino and Chung 2010). Beim serratierten Karzinogeneseweg kommt es zunächst zu einer Störung der physiologischen Apoptose in den Krypten. Dies wird oft durch Mutationen im BRAF oder KRAS Gen ausgelöst. Durch die resultierende verlängerte Lebenszeit der Kryptenepithelien kann es im Rahmen der Seneszenz zu einer vermehrten Methylierung der DNA kommen und so zum Silencing von Zellzyklus-Chekpoin Genen und DNA-Reparaturgenen, was wiederum zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI) führt (Jass et al. 2002). Die Mikrosatelliteninstabilität ist ein Charakteristikum des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC), kommt aber auch in etwa 12 –15 % sporadischer Kolonkarzinome als Folge einer epigenetischen Inaktivierung von MLH1 durch Promotor-Hypermethylierung von CpG- Inseln vor (Boland and Goel 2010). Bei der HNPCC kommt es zu Keimbahnmutationen in den MMR-Genen (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2) (des Guetz et al. 2007). Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer, auch als Lynch-Syndrom bezeichnet, macht ca. 2-3 % der Kolonkarzinomfälle aus (Lynch and Hoops 2002, Al-Sohaily et al. 2012). Das HNPCC-Syndrom, welches autosomal dominant vererbt wird, tritt vor allem ab dem Alter von 45 Jahren gehäuft auf (Kinzler and Vogelstein 1996). Patienten mit Lynch-Syndrom zeigen einen charakteristischen Phänotyp, der durch die Amsterdam-Kriterien und die später modifizierten Bethesda-Kriterien beschrieben wird (Umar et al. 2004). Darin wird ein erhöhtes Auftreten rechtsseitiger Karzinome (80 % proximal der linken Flexur), junges Erkrankungsalter (durchschnittlich 45 Jahre vs. 63 Jahre bei Nicht-Lynch-Karzinomen), schnelles Entstehen des Karzinoms aus Vorläuferläsionen (2,3 Jahre vs. 10 Jahre), schlechte Tumordifferenzierung – aber auch ein postoperatives besseres Langzeitüberleben als bei sporadischen Karzinomen der gleichen Stadien beschrieben (Lynch and Hoops 2002). Diese Patienten entwickeln Kolonkarzinome mit einem deutlich jüngeren Alter, haben den Tumor meist proximal im rechten Kolon (70 -85 %) und haben ein erhöhtes Risiko für synchrone Zweitkarzinome. Das Lebenszeitrisiko für Patienten mit einem Lynch-Syndrom, an

einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt annähernd 80 %. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko einen Tumor außerhalb des Kolons zu entwickeln, nämlich im Endometrium, Ovar, Magen, Pankreas, im hepatobiliären System, der Haut, im Gehirn oder im Urogenitaltrakt (Cunningham et al. 2010). Das Lebenszeitrisko eines Zweittumors außerhalb des Kolons besteht bei Frauen bei 47 % und bei Männern bei 27 % (Vasen 2007). Patienten mit einem Lynchsyndrom haben einen spezifischen Phänotyp, welcher in den Amsterdam Kriterien und in den modifizierten Bethesda Kriterien zusammengefasst wurde (Vasen et al. 1999). Im Vergleich zu chromosomal instabilen Tumoren scheinen Patienten mit sporadischen MSI eine bessere Prognose im Hinblick auf den Verlauf und die Gesamtüberlebenszeit zu haben (Pino and Chung 2010). Die MSI ist die Folge eines defekten Mismatch-Reparatur- (MMR-) Systems im Tumor. Durch das Ausbleiben der Korrektur von Replikationsfehlern kommt es zur Anreicherung von Basenfehlpaarungen und kurzen Deletionen/Insertionen, bevorzugt an repetitiven Sequenzen (Mikrosatelliten). Folgendes Panel für die Identifizierung von MSI wird empfohlen: 2 mononukleotid Repeats (BAT25 und BAT26) sowie 3 Dinukleotid Repeats (D5S346, D2S123, und D17S250). Zeigen mindestens 2 Marker eine Instabilität, werden die Tumore als MSI-H („MSI-high“) bezeichnet. Ist nur ein Marker MSI, handelt es sich um MSI-L („MSI-low“), ist keine MSI nachweisbar, wird der Tumor als MSS (Mikrosatelliten-stabil) bezeichnet (Grady and Carethers 2008). Bereits durch Untersuchungen an Bakterien konnte gezeigt werden, dass inaktivierende Mutationen im bakteriellen MMR-Komplex einen Mutatorphänotyp verursachen, der zur Toleranz gegenüber DNA-schädigenden Agenzien führt (Fram et al. 1985). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Mikrosatellitenstatus eine prädiktive Aussage hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, einem etablierten Chemotherapeutikum für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms, erlaubt (Carethers et al. 1999). Bei Patienten mit MSI-Tumoren konnte eine längere Überlebensdauer gezeigt und bei einer 5-FU Chemotherapie ein ungünstiger Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden (Ribic et al. 2003) Der MSI Status scheint also einen hohen prognostischen Wert bezüglich des Überlebens, sowie einen prädiktiven Wert im Hinblick auf das Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung zu haben (Tejpar et al. 2010).

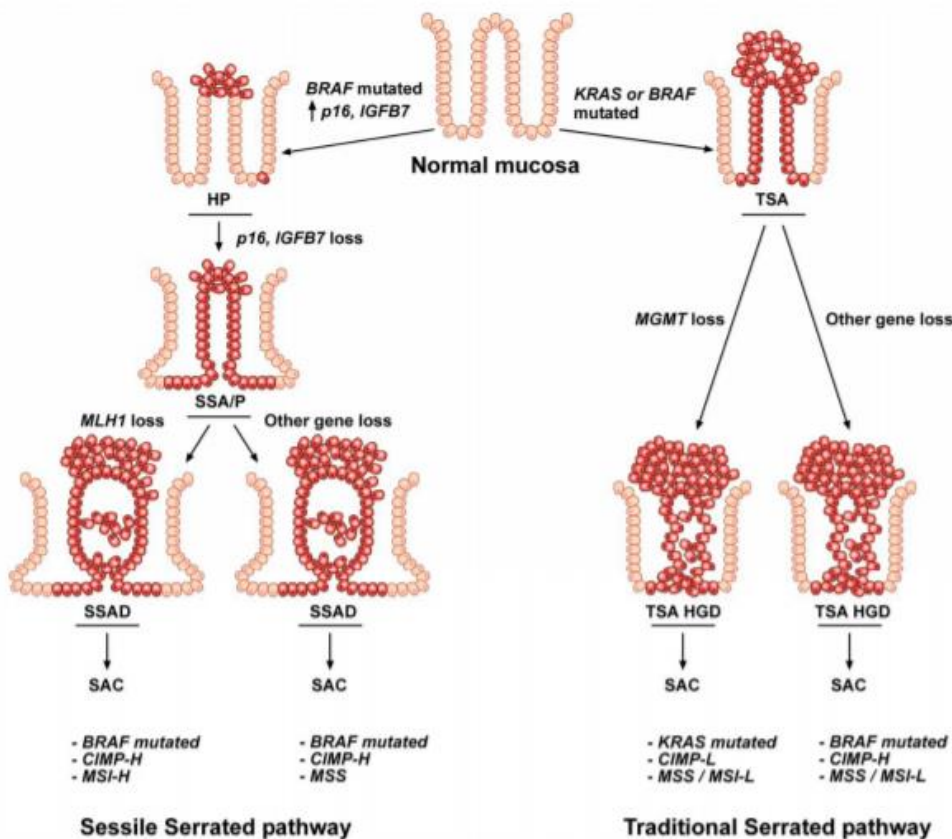


Abbildung 4 Die Signalwege der serratierten Kolonkarzinome aus (De Palma et al. 2019)

Es gibt aktuell zwei verschiedene Signalwege, die zu serratierten Kolonkarzinomen führen können. Die Tumorentstehung beinhaltet Prozesse wie die Akkumulation von spezifischen genetischen und epigenetischen Mutationen in den Epitelzellen der Kolonschleimhaut. Der sessile serratierte Signalweg beginnt mit einer BRAF Mutation gefolgt von p16 und IGFBP7 Promotorhypermethylierung und der Progression zu einem Karzinom über epigenetische Veränderungen durch MLH1. Der traditionelle Weg beginnt mit einer KRAS oder BRAF Mutation in Kolonschleimhautgewebe zusammen mit MGMT oder anderen Gen Methylierungsveränderungen.

### 1.5.4 Osteopontin (OPN) als Surrogatmarker für den kanonischen WNT Signalweg

In einigen soliden Tumoren wird OPN mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert und stellt ein Zielgen des kanonischen WNT-Signalwegs dar (Rohde et al. 2007). OPN spielt in diversen biologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Wundheilung, Immunantwort, Tumorgenese sowie Knochenaufbau und Kalzifizierung eine entscheidene Rolle (Sodek et al. 2000). Als Zytokin ist OPN eingebettet in die zelluläre Immunantwort und aktiviert die zellvermittelte sowie granulozytäre Entzündungsreaktion. Auf der anderen Seite stellt OPN ein wichtiges Knochenmatrixprotein dar, welches die Adhäsion von Osteoklasten vermittelt und so zur Knochenresorption beiträgt und bei der Entstehung von Osteoporose beteiligt ist. Osteopontin ist ein sekretiertes Phosphoprotein. Es ist ein Sialoprotein, welches Hydroxylapatit bindet und in der extrazellulären Matrix von Knochen vorkommt (Sodek

et al. 2000). Es wird durch das gleichnamige Gen kodiert, welches 7 Exons beinhaltet, und sich auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms (4q13) befindet. Osteopontin entsteht in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben wie Osteoblasten, Osteozyten, der Plazenta, im Gehirn, Odontoblasten, in Knochenmarkszellen, Knorpelzellen, endotheliale Zellen und Makrophagen (Sodek et al. 2000). Mutationen im APC Gen sind Schlüsselmutationen einer genetischen Veränderung beim Kolonkarzinom (Janssen et al. 2006). In Zellen, in denen der Wnt-Signalweg inaktiv ist, liegt  $\beta$ -Catenin in einem Komplex gebunden vor, der dazu führt, dass  $\beta$ -Catenin ständig abgebaut wird. Auf diese Weise wird  $\beta$ -Catenin daran gehindert, die Transkription bestimmter Gene zu aktivieren. Dieser Komplex, auch als "destruction-Komplex" bezeichnet, besteht aus verschiedenen Proteinen, unter anderem Axin, die Kinase GSK3-beta und das Tumorsuppressor-Protein APC. Wenn  $\beta$ -Catenin in diesem Komplex vorliegt, kann es von beta-TrCP gebunden und ubiquitiniert werden. Diese Ubiquitinierung führt dazu, dass  $\beta$ -Catenin im Proteasom abgebaut wird. Bindet Wnt an den Rezeptor "Frizzled" und den Co-Rezeptor "LRP" (Low-density lipoprotein receptor-related protein), wird das Protein "DVL" (Dishevelled) aktiviert, welches den destructions-Komplex inhibiert.  $\beta$ -Catenin wird nun nicht mehr abgebaut. Es akkumuliert und gelangt in den Zellkern. Hier bindet es zusammen mit anderen Proteinen an Transkriptionsfaktoren, die die Transkription verschiedener Gene, z.B. Cyclin D1, MYC und OPN, welche die Zellproliferation regulieren.  $\beta$ -catenin kann auch mit der zytoplasmatischen Domäne von Cadherinen z.B. E-cadherin in Epithelzellen interagieren und hat so einen Bezug zum Aktin Zytoskelett (Behrens 2005). In Tumorzellen kann dieser Signalweg auch ohne den Liganden Wnt aktiviert werden. Dies geschieht unter anderem durch eine loss-of-function-Mutation eines Proteins des „destructions-Komplexes“. Bei dem durch die Erbkrankheit FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis, 1 % der hereditären und 0,1 % aller Kolonkarzinome) ausgelösten Kolonkarzinom ist der Tumorsuppressor APC betroffen. Sie entstehen über eine Schleimhauthyperproliferation und die Entwicklung von hunderten Adenompolyphen, mit einem Risiko von fast 100 % der malignen Entartung in einem Alter von 40 Jahren aufweisen (Half et al. 2009). Auf diese Weise kann der Komplex nicht mehr gebildet und  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut werden. Die  $\beta$ -Catenin-abhängigen Gene werden nicht mehr stimulusabhängig, sondern konstitutiv transkribiert. Es können jedoch verschiedenen Mutationen dazu führen, dass der WNT-Signalweg aktiviert wird, was eine Messung dieser Faktoren schwierig macht

(Segditsas and Tomlinson 2006). Das Osteopontin Gen wurde Zusammenhang mit Transkriptom-Analysen als eines der am stärksten hochregulierten Transkripte in Kolonkarzinomen beschrieben (16-fach, (Friederichs et al. 2005). Vorbefunde der Arbeitsgruppe belegen, dass die Osteopontin-Expression in Darmtumoren sowohl bei Mutationen im Tumorsuppressor APC, als auch bei aktivierenden  $\beta$ -Catenin Mutationen stark erhöht ist (Rohde et al. 2007). Daher kann Osteopontin als prädiktiver Marker für eine WNT-Signalweg-Mutation dienen, was durch eine Metaanalyse für das kolorektale Karzinom bestätigt wurde (Zhao et al. 2015).

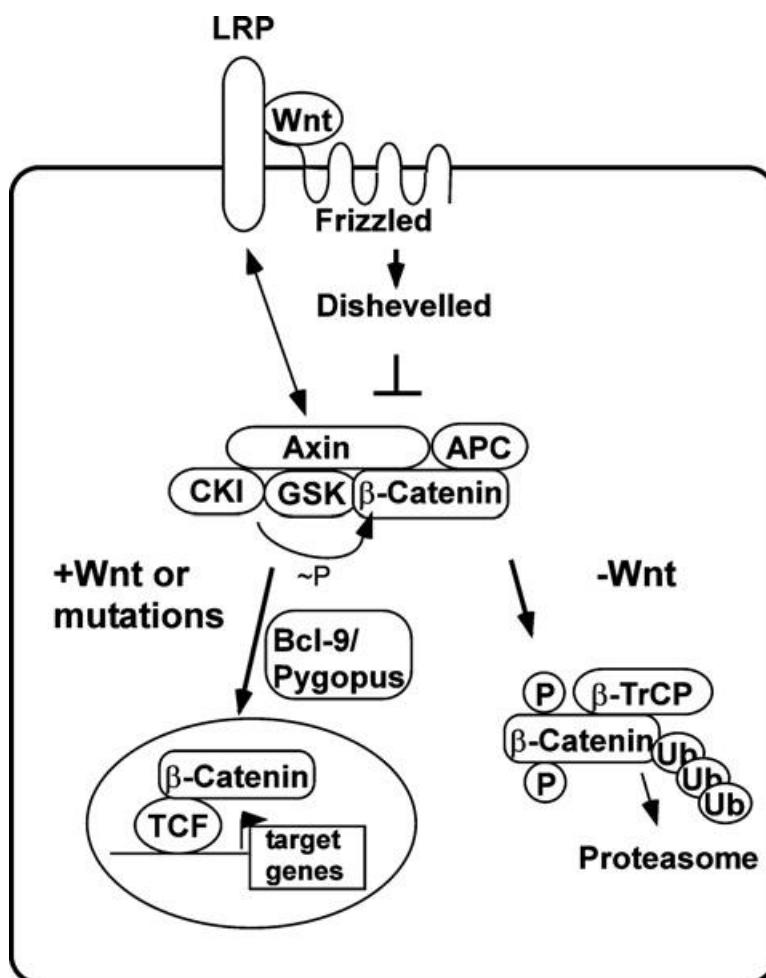


Abbildung 5 WNT Signalweg aus „The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis (Behrens 2005).

Die Bindung von Wnt Frizzled Rezeptoren aktiviert Dishevelled, was die Funktion eines Komplexes blockiert welcher aus Zellgerüstprotein axin und conductin besteht. In der Abwesenheit von Wnt phosphoryliert der axin/conductin Komplex  $\beta$ -catenin mit der Hilfe von GSK3 $\beta$ . Phosphoryliertes  $\beta$ -catenin wird ubiquitiniert und in den Proteasomen degradiert. Bei Anwesenheit von Wnt oder nach einer Mutation in APC, axin/conductin oder  $\beta$ -catenin, wird die Phosphorylierung und der Abbau von  $\beta$ -catenin geblockt, was dazu führt, dass  $\beta$ -catenin mit der Hilfe von Bcl9/pygopus Faktoren in den Zellkern gelangt und zu einer Assoziation mit den TCF Transkriptionsfaktoren führt (Wnt+ oder Mutationen). Der TCF/ $\beta$ -catenin Komplex bindet an DNA und aktiviert die Wnt Zielgene.

### 1.5.5 SASH1

SASH1 ist auf dem chromosomalen Abschnitt 6q24.3 des humanen Genoms lokalisiert und umfasst einen Bereich von 209 kb. Das Protein besteht aus 1247 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 135 kDa. (Zeller et al. 2003). Auf Grund seiner hohen sequenziellen Homologie wird SASH1 der SLY-Familie (SH3 domain containing expressed in lymphocytes gene family) zugeordnet (Beer et al. 2001). Das Protein SASH1 ist mit 135 kDa das größte der SLY-Familie. Es beinhaltet zwei SAM Domänen, eine SH3 (Src homology domain 3) Domäne sowie einen prolinreichen Abschnitt. Expression von SASH1 ist ubiquitär, weist jedoch eine besonders hohe Expressionsrate in Brust, Lunge, Schilddrüse, Milz, Plazenta und Thymus auf (Zeller et al. 2003). SASH1 interagiert hauptsächlich als Signaladapterprotein z.B. im Tyrosinkinase-Signalweg. In laboreigenen Vorarbeiten konnte auch gezeigt werden, dass SASH1 eine direkte oder indirekte Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts übernimmt. Es reichert sich F-Actin reichen Strukturen sowie in Cortactin an (Martini et al. 2011). Als Tumorsuppressor spielt es eine Rolle in vielen Geweben als Modulator zahlreicher tumorfordernder Prozesse, wie beispielsweise Zellproliferation, Zellmigration und Invasion. Des Weiteren konnte in laboreigenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Überexpression von CrkL die Phosphorylierung von ERK (Extracellular signal-regulated kinase) nach Serumstimulation verstärkt. Dieser Effekt blieb jedoch komplett aus, wenn die Zellen mit SASH1 kotransfiziert wurden. Dies zeigte, dass SASH1 fähig ist, die CrkL-induzierte Phosphorylierung von ERK zu unterdrücken und damit der Onkogenese entgegenzuwirken (Franke et al. 2019). In der ERK MAPK Kaskade, wird ERK (ERK1 and ERK2) durch Phosphorylierung durch MEK (MEK1 and MEK2) aktiviert (Dhillon et al. 2007). Die ERK1/2 Kaskade überträgt hauptsächlich mitogene Signale (Wortzel and Seger 2011). Bisher konnte noch keine tumorrelevante Mutation im Allel des SASH1-kodierenden Bereichs gefunden werden. Die Inaktivierung muss somit über einen anderen Mechanismus erfolgen. Diskutiert wird eine Regulierung von SASH1 auf epigenetischer Ebene entweder durch Promotormethylierung oder Histonacetylierung (Houshdaran et al. 2007). In laboreigenen Expressions-Analysen in Kolorektalkarzinomen konnte gezeigt werden, dass es in ca. 42 % der Fälle zu einer mehr als 10-fachen Reduktion der SASH1-mRNA kommt (Rimkus et al. 2006). Besonders in höheren Stadien (UICC II, III, IV) konnte eine starke und signifikante Reduktion an mRNA festgestellt werden (Rimkus et al. 2006). In frühen Tumorstadien (UICC I) war dagegen keine veränderte

Expression im Vergleich zum Normalgewebe zu erkennen. Es zeigte sich außerdem eine enge Korrelation zwischen einer niedrigeren Expression von SASH1 und der Bildung von metachronen und synchronen Metastasen. SASH1 spielt daher in späten tumorbiologischen Prozessen eine Rolle, wie der Tumorinvasion in das umliegende Gewebe und der Streuung in andere Organe. In dieser Phase der Tumorentwicklung spielt vor allem die Motilität und Adhäsion und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Tumorzellen eine Rolle. Eine starke Expression von SASH1 und das Vorkommen im Zellkern können zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase und zur Apoptose führen (Zeller et al. 2003). Bereits zuvor konnte eine reduzierte SASH1-Expression als ein unabhängiger negativer Prognose-Parameter für das Überleben des Patienten definiert werden (Rimkus et al. 2006).

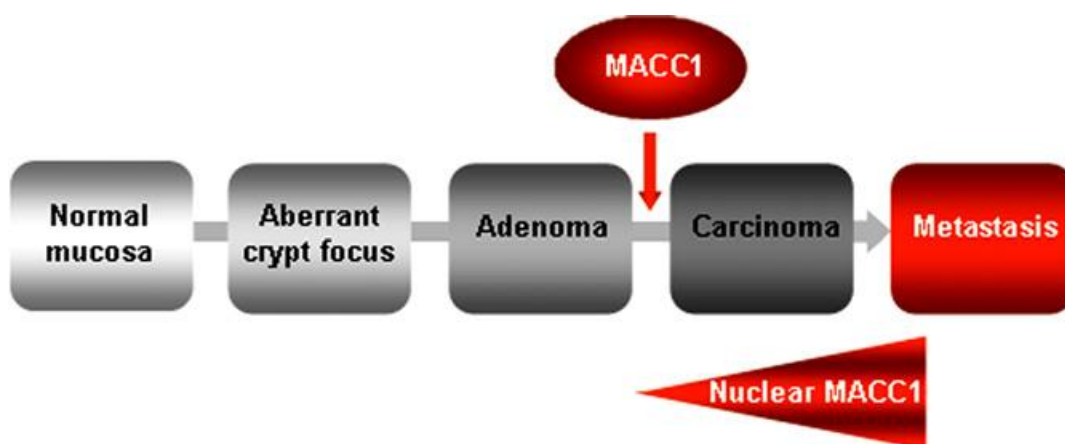
### **1.5.6 MACC1**

Metastasierung ist ein molekularer Netzwerkprozess, welcher für 90 % der Patienten tödlich endet. Das Verständnis von regulatorischen Funktionen von Metastasen-induzierenden Molekülen ist von hohem Interesse für verbesserte therapeutische Behandlungsansätze. Circa 50 % der Patienten mit einem Kolonkarzinom entwickeln Fernmetastasen. Der Tumor streut zu 30 -70 % in die Leber, 20- 40 % in die Lunge, 5- 10 % in die Knochen. Zu einem deutlich geringen Prozentsatz streut der Tumor ins Gehirn, ins Ovar und die Nebennieren (Stein and Schlag 2007). Bei Diagnosestellung haben 25 % der Patienten bereits eine Fernmetastase (Arlt and Stein 2009). Ein ähnlicher Prozentsatz an Patienten wird nach Diagnosestellung während der Behandlung Fernmetastasen bilden. Diese entwickeln sich meist in einer Zeitspanne von 2 Jahren nach erfolgreicher chirurgischer Intervention des Primärtumors (Millikan et al. 1997).

Stein et al. entdeckten das Gen MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) durch die Analyse der genomweiten Genexpression in Primärtumoren und Metastasen von Kolonkarzinom-Patienten sowie in physiologischer Kolonmukosa mittels Display RT-PCR. MACC1 ist auf dem Chromosom 7 angesiedelt 7p21.1 und reguliert Entzündungsreaktionen und Gewebewachstum über den HGF/MET-Signalweg (Boardman 2009). HGF reguliert die sinoidalen Endothelzellen der Leber und interagiert mit Interleukin 7 um die Immunantwort zu regulieren hauptsächlich über Lymphozythen in der Mukosa. C-Met ist eine Rezeptorthyrosinkinase, die den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) bindet. Der aktivierte Rezeptor induziert



verschiedene Signalwege, welche die Proliferation und Migration und Metastasierung von Zellen steuern (Weidle et al. 2015). Die Bindung von HGF an die extrazelluläre Domäne induziert die Dimerisierung zweier c-Met-Rezeptoren und die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der C-terminalen intrazellulären Domäne. Der dadurch aktivierte Rezeptor aktiviert verschiedene Signalwege wie zum Beispiel die MAP-Kaskaden, der PI3K-Akt-Signalweg, der JAK-STAT-Signalweg und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Harshman and Choueiri 2013). Eine Dysregulation des HGF/Met-Signalwegs wurde inzwischen für viele Tumorentitäten nachgewiesen, so in Karzinomen der Brust, Lunge, Leber und des Kolons (Maulik et al. 2002). In vielen Fällen liegt eine Überexpression des Rezeptors vor, z.B. durch Genamplifikation oder Induktion der Expression durch andere Onkogene. Hohe Expressionsniveaus führen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der Signaltransduktion. Die erhöhte Invasivität und Metastasenbildung resultiert unter anderem aus der Aktivierung der VEGF-Expression und Downregulation von Thrombospondin-1 mit resultierender Neovaskularisation, wodurch HGF in der Lage ist, die endotheliale Zellproliferation und Migration zu fördern (Ma et al. 2009). Daher hat MACC1 großes Potential als neuer, prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms und ist ein möglicher Kandidat als Ziel effektiver, molekularer Interventionsstrategien zur Metastasierungs-Prävention (Stein et al. 2009, Radhakrishnan et al. 2018).



**Abbildung 6: MACC1 Rolle in der Adenom-Karzinom Sequenz in Kolonkarzinomen.**

Eine Überexpression von MACC1 ist einer der entscheidenden Schritte vom benignen zum malignen Phänotyp (Arlt and Stein 2009).

### **1.5.7 Immunmodulation**

An der Entstehung und der Progression von Tumoren ist das Immunsystem maßgeblich beteiligt, es wurden sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Effekte beschrieben. In den letzten Jahren rückte das Immunsystem, und hierbei vor allem die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten, immer weiter in den Fokus. Eine positive Korrelation zwischen der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten und einem längeren Überleben der Patienten wurde bereits gezeigt und aus diesem Grund wird diskutiert, dass immunologische Kriterien zur TNM Klassifikation ergänzend hinzugezogen werden sollten (Deschoolmeester et al. 2010, Galon et al. 2014). Eine stärkere Lymphozytheninfiltration wird in Mikrosatelliten instabilen Tumoren beobachtet, was mit einer größeren Anzahl an abnormalen Peptiden zusammenhängen kann, welche durch Frameshift-Mutationen ausgelöst werden. Tumor-spezifische Antigene sind Folge von DNA-Mutationen, Spleiss-Varianten oder chromosomaler Translokationen. Deren Genprodukte werden auf der Zelloberfläche präsentiert und können dort von Immunzellen als fremd erkannt werden, da diese Antigene in gesunden Körperzellen nicht vorkommen. Die dadurch entstandenen Epitope können eine Immunantwort bedingen durch die Aktivierung von CD4+ Helferzellen, die über Zytokine (IL 2 und IF alpha) CD8+ Effektorzellen stimulieren, Perforin und Granzyme B zu sekretieren, was einen zytotoxischen Effekt auf die Zielzellen hat (Galon et al. 2014). Tumorinfiltrierende Immunzellen können als zentrale Komponente des tumorumgebenden Milieus („Microenvironment“) aufgefasst werden. Des Weiteren stellt das Immunsystem einen Ansatz für neue Therapien dar, welche bereits in klinischen Studien an metastasierten Kolonkarzinomen getestet werden in Form von PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren (Hanahan and Weinberg 2011, O'Neil et al. 2017).

## **2 Zielsetzung**

Laboreigene Vorarbeiten beschäftigten sich in den letzten Jahren intensiv mit der Identifikation von Risikogruppen bei Kolonkarzinomen des Stadiums II, welche einen eventuellen Nutzen von einer bisher nicht vorgesehenen Chemotherapie hätten (Gertler et al. 2009, Nitsche et al. 2012, Zeestraten et al. 2012, Maak et al. 2013, Malinowsky et al. 2014). Hierbei konnte beispielsweise die Expression des Metastasierungsmarkers MACC1 als sehr guter prädiktiver Marker beschrieben werden (Nitsche et al. 2012). In Stadium III wird im Gegensatz zu Stadium II nach jeder

R0 Resektion standardmäßig eine auf 5-FU basierte Chemotherapie angeschlossen (Pox and Schmiegel 2013, Pox and Schmiegel 2019). Es ist jedoch bekannt, dass viele Patienten die Chemotherapie vermutlich nicht benötigen, da sie ein sehr geringes Rezidiv Risiko aufweisen, oder auf Grund von mangelndem Ansprechen nicht ausreichend von einer Chemotherapie profitieren. Interessanterweise zeigen Patienten mit T1-2N1M0-Tumoren (Stage IIIA) häufig ein besseres Überleben, als viele Patienten in Stadium IIB. Dies lässt Rückschlüsse darauf ziehen, dass die aktuellen Entscheidungswege, nach denen eine Chemotherapie verabreicht wird, optimiert werden müssen (O'Connell J et al. 2004). Bisher gelten überwiegend klinische und histopathologische Befunde (TNM-Klassifikation) als maßgebliche prognostische und prädiktive Parameter. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass gerade Gen-Expressionsmuster, die auf Veränderungen in Signaltransduktionsnetzwerken hinweisen, eine große Rolle bei der Prognose und Prädiktion spielen können. Dies bedeutet, dass eine effektive Therapie zukünftig genau diese individuell relevanten Signalnetze adressieren muss. Es konnte bereits in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass mutiertes KRAS ein hochsignifikanter negativer Biomarker für das Ansprechen der Patienten auf eine Anti-EGFR-Antikörpertherapie ist (Karapetis et al. 2008, Kirchner and Jung 2010). Es sind jedoch weitere prädiktive Biomarker notwendig, um die Patienten besser und zielgerichteter behandeln zu können.

Ziel dieser Arbeit ist, in einer retrospektiven Analyse den Mutationsstatus der Onkogene KRAS und BRAF eines Patientenkollektivs des Stadiums UICC III (definiert als: T1-4N1-2M0) mit Hilfe des „High Resolution Meltings“ an genomischer DNA zu erheben, daneben die Mikrosatelliten-Instabilität zu bestimmen, und molekularen Parameter OPN, SASH1 und MACC1 zu vergleichen. So sollen Rückschlüsse auf das Rezidiv freie Überleben, sowie das Gesamtüberleben gezogen werden, indem die erhobenen Daten in univariaten und multivariaten Regressions-Analysen mit klinischen Parametern korreliert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

<b>Agarose</b>	Invitrogen, Leek, NL
<b>Bromphenolblau</b>	Merck, Darmstadt
<b>Desoxynukleotide</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	Sigma-Aldrich, Stammheim
<b>Eosin</b>	Sigma-Aldrich, Stammheim
<b>Ethanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ethidiumbromid</b>	Roth, Karlsruhe
<b>GeneRuler™ 100 bp DNA Marker</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>GeneRuler™ 1 kb DNA Marker</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Hämatoxylin</b>	Sigma-Aldrich, Stammheim
<b>Isopropanol</b>	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Random Hexamer Primer</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>SYBR® Green PCR Master Mix</b>	ABI, Foster City, USA
<b>Tissue Tek®</b>	Sakura, Umkirch, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Gen Pulser Küvetten</b>	Biorad, München
<b>Plastikwaren</b>	Falcon, Heidelberg BD, Heidelberg Nunc, Naperville, USA Corning, New York, USA Eppendorf, Hamburg
<b>PCR Plate 96-well semi-skirte natural</b>	Star Lab, Ahrensburg

<b>PCR Plate 96-well semi-skirted for Roche systems</b>	Star Lab, Ahrensburg
<b>Spitzen</b>	BD Pharmingen, San Diego, USA

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

### 3.1.3 Geräte

<b>7300 Real-Time PCR System</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>Elektrophoresekammer für Agarosegele</b>	Fisher Scientific, Ulm
<b>GeneAmp PCR-System 7900</b>	Perkin Elmer, Boston, USA
<b>GeneAmp PCR-System 9700</b>	Perkin Elmer, Boston, USA
<b>Heizblock</b>	Liebisch, Bielefeld Kleinfled, Gehrden
<b>Inkubator Innova 4230</b>	New Brunswick Scientific, Edison, USA
<b>Kryostat</b>	Leica, Wetzlar
<b>Mikroskope (Stemi 2000-C, Axiovert 200M, Axiolab)</b>	Zeiss, Jena
<b>NanoDrop ND-1000</b>	Nanodrop Techn., Wilmington, USA
<b>Plattformschüttler Polymax 1040</b>	Heidolph, Schwabach
<b>Plattenzentrifuge Perfect Spin</b>	Peqlab, Erlangen
<b>Reinstwasseranlage</b>	Millipore, Eschborn
<b>Rotationsrad Mixing Rotor</b>	Renner, Darmstadt
<b>Sterilbank</b>	Kendro Laboratory Products, München
<b>T3 Thermocycler</b>	Biometra, Göttingen
<b>Tissue Lyser II</b>	Qiagen GmbH/Retsch, Hilden
<b>Vortexer</b>	Scientific Industries, New York, USA
<b>Waagen</b>	Sartorius, Göttingen
<b>Wasserbäder</b>	Memmert, Schwabach
<b>Zentrifugen</b>	Heraeus, Hanau Hettich, Tuttlingen

Tabelle 4: Geräte

### 3.1.4 Enzyme

<b>RevertAid™ H-Minus M-MuLV</b>	
<b>Reverse Transkriptase</b>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Taq DNA Polymerase</b>	Qiagen, Hilden
<b>DNase</b>	Qiagen, Hilden
<b>RNAsin</b>	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 5: Enzyme

### 3.1.5 Stammlösungen

<b>DNA-Auftragspuffer (6x)</b>	1 ml 1 ml 5 ml 3 ml	10x TAE-Puffer Orange G [10 mg/ml] Glycerin ddH2O	
<b>Eosin</b>		1 g/l Eosin in ddH2O 10 Tropfen Essigsäure (100 %)	→ steril filtrieren
<b>RNA-Auftragspuffer (2x)</b> → Aufbewahrung bei -20°C	160 µl 80 µl 720 µl 720 µl 160 µl 120 µl	MOPS (10x) Bromphenolblau Formamid 37 % Formaldehyd Glycerin ddH2O	
<b>RNA-Laufpuffer (10x)</b>	133,4 ml 40 ml 830 ml	NaOAc (3M) pH 4,8 EDTA pH 8,0 H2O (DEPC)	

Tabelle 6: Stammlösungen

### 3.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
<b>KRAS 189bp fwd HPLC</b>	TCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAA	HRM (Krypuy et. al 2006)
<b>KRAS 189bp rev HPLC</b>	CAAAGACTGGTCCTGCACCCAGTA	HRM (Krypuy et. al 2006)
<b>BRAF_147_fwd_HPLC</b>	GGTGATTTTGGTCTAGCTACAG	HRM (Pichler et. al 2009)
<b>BRAF_147_rev_HPLC</b>	AGTAACTCAGCAGCATCTCAGG	HRM (Pichler et. al 2009)
<b>hHPRT for</b>	GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T	qRT-PCR
<b>hHPRT rev</b>	AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT G	qRT-PCR
<b>hHPRT for</b>	GACCAGTCAACAGGGGACAT	UPL- qRT-PCR
<b>hHPRT rev</b>	GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG	UPL- qRT-PCR
<b>hOPN for</b>	TTG CAG CCT TCT CAG CCA A	qRT-PCR
<b>hOPN rev</b>	GGA GGC AAA AGC AAA TCA CTG	qRT-PCR
<b>hSASH1- for</b>	CTT GGC ACA GGA CTG AGG A	UPL- qRT-PCR
<b>hSASH1- rev</b>	GTT CAA AGA GAA CCG CAC TAA	UPL- qRT-PCR
<b>MACC1- for</b>	GGC ATA TGA AAT TCC TCA TCG	UPL- qRT-PCR
<b>MACC1- rev</b>	GGC AGG TTT CAT CAT CT	UPL- qRT-PCR

Tabelle 7: Oligonukleotide

### 3.1.7 Reagenzienkits

<b>Taqman Gene Expression Master Mix</b>	Applied Biosystems,
<b>Universal Probe Library Set Mouse</b>	Roche, Mannheim
<b>SYBR POWER</b>	Applied Biosystems
<b>DNeasy blood and tissue Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>HotStarTaq<sup>®</sup>PCR</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 8: Reagenzienkits

### 3.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
<b>CaCo2</b>	Humane Kolorektal-Adenokarzinom Zelllinie, HTB-37 (ATCC)
<b>DLD1</b>	CCL-221 (ATCC) Rockville, Maryland, USA

<b>HCT116</b>	CCL-247 (ATCC) Rockville, MD, USA
<b>Hek293</b>	CRL-1573 (ATCC) Rockville, MD, USA
<b>HT29</b>	HTB-38 (ATCC) Rockville, MD, USA
<b>SW480</b>	CCL-228 (ATCC) Rockville, MD, USA

Tabelle 9: Zelllinien

### 3.1.9 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 84 Patienten mit einem Kolonkarzinom, darunter waren 54 Männer und 30 Frauen. Zusätzlich wurden 36 Normalschleimhautgewebeproben als Kontrollgewebe untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten des Kollektivs betrug 67 Jahre. Als Einschlusskriterium galt, dass die Patienten in Stadium 3 (nach der TNM Klassifikation eingeteilt in T(jedes)N1-2M0) eingestuft sein mussten sowie eine lokale R0-Resektion des Tumors an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar oder am Marienhospital Vechta in der Zeitspanne zwischen 1987 und 2014 erhielten. Für alle Patienten waren histopathologische Daten und Nachsorgedaten verfügbar. Die Patienten erhielten keine neoadjuvante Vorbehandlung. Die resezierten Gewebeproben wurden von der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, München, bereitgestellt. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten zur Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken, sowie die Zustimmung der Ethikkommission zur Verwendung der Proben, liegt vor (Ethikvotum 1926-07). Die Bestimmung des histologischen Typs, des pathologischen Tumorstadiums sowie die Einteilung der TNM-Klassifikation erfolgten anhand der UICC Kriterien durch einen erfahrenen Pathologen. Die Angaben für Gewebe aus Stadium II Gewebe entstammen aus vorbestehenden Arbeiten (Balmert 2011, Nitsche et al. 2012).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Aufbereitung Gewebeproben

##### 3.2.1.1.1 Gefrierschnitte

Nach der Tumorresektion wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um reproduzierbare, dünne Gewebeschnitte zu erhalten und ein Auftauen der



Patientenproben zu verhindern, wurde das Patientengewebe auf einem Kryoblock mit TissueTek fixiert und im Leica CW 3050 S Kryostat zur weiteren Verarbeitung für die DNA/RNA Gewinnung auf die Schnittdicke von 100 µm bei -25 °C geschnitten. Die 100 µm Schnitte wurden sofort in einer 2ml Eppendorftube in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss bei -80 °C aufgehoben. Zusätzlich wurde der erste und der letzte Schnitt auf einen Objektträger aufgebracht und anschließend HE gefärbt, um den Tumorgehalt der Patientenprobe festzustellen. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit einer Stärke von 6-8 µm angefertigt und auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Kryoschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und entweder direkt für Färbungen verwendet oder bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.1.1.2 HE-Schnitte

Für die histologische Beurteilung des Gewebes wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Zellkernfärbung) und Eosin (Zytoplasmafärbung) gefärbt und der Tumorgehalt des ersten und letzten Schnittes von einem Pathologen beurteilt. Dafür wurden die Objektträger zunächst eine Minute lang in 4 %igem Formalin fixiert und anschließend in H<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin folgte die 1-minütige Gegenfärbung mit Eosin. Nach kurzem Waschen in H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydriert. Zur Verdrängung des Alkohols wurden die Objektträger dann in Xylol (3 mal 3-4 min) inkubiert und anschließend in Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckelt.

### 3.2.1.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 3.2.1.2.1 DNA (Desoxyribonukleinsäure)

DNA-Lösungen wurden bei -80 °C aufbewahrt. Arbeiten mit DNA-Molekülen sollten nach Möglichkeit immer auf Eis durchgeführt werden. Zur Kontrolle der Reinheit von DNA-Lösungen wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient der beiden Werte ( $A_{260}/A_{280}$ ) sollte dabei  $\geq 1,70$  betragen.

#### 3.2.1.2.2 RNA (Ribonukleinsäure)

Bei Arbeiten mit RNA-Lösungen besteht immer die Gefahr des Enzymatischen Abbaus durch RNasen. Daher wurden nur RNase-freie Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte verwendet und es wurde zudem darauf geachtet, möglichst alle Arbeitsschritte

auf Eis durchzuführen. Die kurzfristige Lagerung erfolgte auf Eis, die Langfristige bei -80 °C.

#### 3.2.1.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA Lösungen

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des Photometers NanoDrop® ND-1000 bestimmt. Nach der Kalibrierung mit dem entsprechenden DNA/RNA-Puffer wurden 1,5 µl der DNA/RNA-Lösung zur Messung aufgetragen.

#### 3.2.1.3 Isolation genomischer DNA

Die genomische DNA der Patientenproben wurde mittels DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurden von den Gewebeproben im Kryostat 100 µm Schnitte angefertigt. Zum genauen Abwiegen wurden die vorgefertigten Schnitte in flüssigem Stickstoff gekühlt und während des Wiegens auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Abwiegen der Schnitte erleichtert die Arbeit zu zweit die Vermeidung des Auftauens der Patientenproben. Dazu mussten Pinzetten, Kunststoffblock und 2 ml Eppendorftubes mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Bevor das Patientenmaterial gewogen wurde, wurden die Eppendorftubes in flüssigem Stickstoff gekühlt und daraufhin leer gewogen. Danach wurden sie schnell in den mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kunststoffblock gestellt, das Patientenmaterial mit der Pinzette aus dem Trockeneis genommen und möglichst 25 mg Patientenmaterial abgewogen (Bereich: 15-30), was je nach Material ca. 5x 100 µm Schnitten entsprach. Sofort nach dem Abwiegen wurden die Patientenproben wieder auf Trockeneis gekühlt und das abgewogene Patientenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um ein Auftauen der Proben zu vermeiden, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zum Arbeitsplatz unter dem Abzug getragen, ein Kunststoffblock wurde wiederum im Stickstoff gekühlt und die Proben wurden in den gekühlten Kunststoffblock gesteckt. Anschließend wurde sofort 600µl mit Mercaptoethanol versetzter RLT-Plus-Puffer auf die Proben pipettiert. Zur Zellyse wurde eine RNase-freie Edelstahlkugel zu den Proben hinzugefügt und gekühlt 1 min lang bei 30 Hz im Tissue Lyser gerüttelt.

#### 3.2.1.4 Aufreinigung von DNA Lösungen

Nach dem Zellaufschluss folgte die DNA Aufreinigung über Säulchen (DNeasy blood and tissue Kit, Qiagen). Dazu wurde das Lysat 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand

wurde in DNA Spin Säulchen überführt und 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Im Durchfluss befand sich die RNA, wohingegen auf der Säulchenmatrix die DNA gebunden wurde. Der Extrakt musste nun von RNA und Proteinen gereinigt werden. Um die DNA zu waschen wurden 500µl AWI-Puffer auf die Säulenmatrix pipettiert und 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und es folgte ein zweiter Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer, sowie ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 12000 rpm, um die Säule zu trocknen. Die Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml Tube gesteckt, mit 100 µl Elutionspuffer gefüllt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eluiert wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 rpm. Die Elution wurde wiederholt und die Eluate wurden vereinigt.

### **3.2.1.5 Mikrosatelliten Instabilität Analyse**

Die Mikrosatelliten Instabilität wurde mittels MSI-Analysis-System Version 1.2 (Promega, Mannheim) ermittelt. Diese Analysen wurden am Institut für Pathologie der TUM durch Frau Prof. Dr. Gisela Keller durchgeführt. Dieser Test amplifiziert die 5 Mononukleotid Repeat Marker BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, und MONO-27 um den MSI-Status zu bestimmen. Hierfür wurde das Type-it Mikrosatelliten PCR Kit verwendet. 81 Patientenproben wurden mit dem Bethesda Panel (BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250) analysiert. Als Mikrosatelliten instabil galten Proben wenn 2 von 5 Marker eine Instabilität aufwiesen. Weist der Tumor 5 normale Marker auf wird er als Mikrosatelliten stabil eingestuft. Ab einer Veränderung in 1 der 5 Marker spricht man von einer leichten Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-L). Sobald 2 oder mehr Marker verändert sind wird der Tumor als stark Mikrosatelliten instabil eingestuft (MSI-H).

### **3.2.1.6 HRMA**

Die Schmelztemperaturanalyse ist als Untersuchungsmethode gut geeignet, um die schnell ansteigende Nachfrage nach schnellen und zuverlässigen Mutationsscreenings bei Krebs zur Diagnose von klinischen Proben, besonders vor dem Hintergrund der zielgerichteten Therapie, zu erfüllen. Die Methode basiert auf dem Dissoziationsverhalten der DNA, wenn sie einer ansteigenden Temperatur ausgesetzt wird. Das Besondere an dieser Methode ist, dass der Farbstoff sättigend an die doppelsträngige DNA bindet und somit auch kleinste Schmelzunterschiede beim Temperaturanstieg von 50 auf 95 °C in Echtzeit detektierbar werden, da das Fluoreszenzsignal mit steigender Temperatur abnimmt.

Für die HRMA wurden 20 ng DNA (10ng/µl) in einem finalen Volumen von 20 µl amplifiziert. Hierbei wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Reaktionsgemisch von 20µl bestand aus 10 µl High Resolution Master Mix, 1,6 µl MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0,8 µl HPLC aufgereinigter forward und reverse Primer (1 mM), 2 µl Template-DNA und 4,8 µl deionisiertem Wasser. Die PCR wurde in einem Lightcycler 480 II PCR System (Roche, Mannheim) Thermocycler durchgeführt. Für die Schmelztemperaturanalyse wurde folgendes Protokoll (SYBR Green I /HRM Dye Protocol) angewendet: Präinkubation bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen Amplifikation: Denaturierung 15 s bei 95 °C, Annealing 15 s bei 61 °C, Extension 15 s bei 72 °C wobei die Fluoreszenz gemessen wird. Für das HRMA Profil wurden die Proben denaturiert durch eine initiale Phase von 5 s bei 95 °C und 1,5 min bei 72 °C. Das Schmelzkurvenprofil lief von 72 °C bis 95 °C für 25 min. Der LightCycler 480 II misst während dieser Zeit kontinuierlich das Fluoreszenzsignal.

HRM	Denaturierung		Annealing		Elongation		Zyklenzahl	Produkt [bp]
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit		
<b>BRAF Exon 15</b>	95°C	30 sec	61 °C	30 sec	72 °C	30 sec	40	147
<b>KRAS Exon 2</b>	95°C	30 sec	61 °C	30 sec	72 °C	30 sec	50	189

**Tabelle 10: HRMA- Programme**

Um sicher zu gehen, dass das komplette Template als Einzelstrang vorliegt, wurde die erste Denaturierung auf 10 min verlängert. Am Ende des letzten Zyklus folgte eine 10 min Inkubation bei 72 °C.

### 3.2.1.7 Isolation RNA

Hierzu wurden die Gewebeschnitte nicht wie bereits oben beschrieben in RLT Puffer (Quiagen), sondern in Trizol Reagenz (ThermoFisher) inkubiert. Dazu wurde das Probenmaterial unter dem Abzug mit Trizol Reagenz und einer Edelstahlkugel versetzt und in einem Tissue Lyser (Qiagen) mechanisch gerüttelt. Danach folgte ein Inkubationsschritt von 5 min bei Raumtemperatur, um die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu erlauben. Im Folgenden wurden 200µl Chloroform hinzugefügt und 15 s mit der Hand geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben 15 min bei 12000g und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden 400 µl 70 % Ethanol (DEPC Wasser und Ethanol Absolut) in Sammelröhrchen unter dem Abzug vorgelegt. Beim Zentrifugieren trennte sich das Trizol in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA. 400 µl dieser Phase wurden abgenommen, mit dem vorgelegten Ethanol durch mehrfaches

Auf- und Abpipettieren vermischt und danach in eine RNeasy-Spin-Säule überführt. Die RNA Waschschrirte wurden wie im ersten Beispiel durchgeführt.

### **3.2.1.8 Denaturierendes RNA Gel**

RNA-Gelelektrophorese wurde genutzt, um den Zustand und die Integrität der RNA nach der Extraktion beurteilen zu können. Dazu wurden 85 ml DEPC Wasser mit 1,5 g Agarose aufgekocht und nach kurzem Abkühlen wurden 10 ml MOPS-Puffer und 5 ml Formaldehyd hinzugefügt. Um eine RNase Kontamination auszuschließen wurden die Kämme und die Kammer mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gewaschen. Zur Kontrolle der RNA wurden 10 µl RNA (1µg) jeweils mit Ethidiumbromid und RNA-Auftragspuffer gemischt und bei 50 V für 120 min aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht photographiert und dokumentiert.

### **3.2.1.9 C-DNA Synthese**

Bei der cDNA Synthese wird die mRNA durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Um zu verhindern, dass genomische DNA amplifiziert wird, wurde ein DNase Verdau vorgeschaltet. Dabei wurde 1 µl DNase mit 1 µg RNA-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Bindung der Reversen Transkriptase an die mRNA werden 2 synthetische Primer benötigt. Der Oligo-dT Primer bindet an den Poly-A Schwanz und der Random Hexamer Primer besteht aus einer zufälligen Kombination von sechs Nukleotiden. Um Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen wurde die mRNA (1 µg) mit je 1 µl Oligo dt (1:20) und 1 µl Random Hexamer Primer (1:150) in einem Gesamtvolumen von 27 µl für 10 min auf 70 °C erhitzt und danach sofort kurz auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 8 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl RNAsin (Ribonuklease Inhibitor), 2 µl Reverse Transkriptase und dann eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die Umschreibung der mRNA in cDNA bei 42 °C für 60 min im Thermocycler und das Stoppen der Reaktion bei 95 °C für 5 min. Die Konzentration der erhaltenen cDNA wurde im Nanodrop vermessen und für den Einsatz bei der qRT-PCR auf 10 ng/µl eingestellt.

### **3.2.1.10 Quantitative Real time PCR SYBR**

Um cDNA quantitativ nachzuweisen, wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. Hierdurch lässt sich auf die Menge an mRNA und somit auf die Transkriptionsrate im Ausgangsmaterial schließen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten SYBR®Green

System der Firma Applied Biosystems Inc., Foster City USA, handelt es sich um einen in die dsDNA Helix interkalierenden Farbstoff. In Lösung sendet der ungebundene Farbstoff nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal aus; jedoch nimmt die Fluoreszenz (100fach) stark zu, sobald es an die DNA bindet. Daher ist das Ansteigen der SYBR Green Fluoreszenz direkt proportional zur generierten DNA. Als Schwellenwert wird die Zyklenzahl bezeichnet, ab der die Fluoreszenz messbar wird. In den darauffolgenden Zyklen verläuft die Reaktion exponentiell. In dieser Phase ist auch die korrekte Quantifizierung möglich.

Da jedoch SYBR Green an jede dsDNA bindet, kann der Farbstoff nicht zwischen verschiedenen dsDNA unterscheiden, wie etwa dem spezifischen Produkt sowie unspezifischen Produkten, wie Primer-Dimeren. Jedes doppelsträngige PCR-Artefakt trägt allerdings zur Signalintensität bei, was in einer falschen Einschätzung der Konzentration des gewünschten Produkts resultiert. Um nun zu bestimmen ob nur das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Vergl. hierzu auch: HRMA). Die Schmelzkurvenanalyse basiert auf der Tatsache, dass jedes doppelsträngige PCR-Molekül eine charakteristische Schmelztemperatur aufweist ( $T_m$ ), bei der 50 % der DNA noch doppelsträngig ist und die anderen 50 % bereits aufgeschmolzen, also einzelsträngig, ist. Wenn bei der Schmelzkurvenanalyse die  $T_m$  eines Produktes erreicht wird, nimmt die SYBR Green Fluoreszenz stark ab.

In einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l wurden 100 ng cDNA, 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l sense und antisense Primer [20  $\mu$ M] und 15  $\mu$ l 2x SYBR®Green-Mastermix eingesetzt. Die Reaktionszyklen umfassen die in Tabelle 11 aufgeführten Schritte. Die qRT-PCR wurde mit dem ABIPrism™ 7300 Sequence Detector durchgeführt und mit dem Programm Sequence Detection Software v.1.4 ausgewertet. Gerät und Programm wurden von der Firma Applied Biosystems Inc., USA, bezogen.

qRT PCR Zyklus		
58 °C / 60°C	120 sec	
95 °C	60 sec	
95 °C	15 sec	40 x
60 °C	60 sec	
Dissoziationskurve	60-95°C	

Tabelle 11: Zyklus für qRT-PCR

### 3.2.1.11 Quantitative Real Time PCR UPL

Der "Hydrolysis Probe Assay" ist eine weitere Methode, um cDNA mittels qRT-PCR quantitativ nachzuweisen (Roche). Technisch kann die Methodik beschrieben werden als homogener 5'-Nuklease Assay, da das 3' Ende der Probe phosphoryliert ist, welches durch die 5'-Exonuklease Aktivität der Polymerase abgespalten wird. Die Einzel-Probe enthält zwei Labels, einen Fluoreszenz Reporter und einen Quencher, die räumlich nahe beieinander sind. Wenn die Probe intakt ist, ist der Quencher Farbstoff nah genug, um das Reporter Fluoreszenzsignal zu unterdrücken. In der abgespaltenen Probe, ist der Reporter nicht länger „gequencht“ und emittiert ein Fluoreszenzsignal.

### 3.2.2 Statistische Auswertverfahren

Die Patientendaten wurden in einer Microsoft® Excel 2007 Datenbank dokumentiert. Rezidivfreies Überleben bzw. Fernmetastasen-freies Überleben war der primäre Endpunkt für die Risikovorhersage. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Software 20.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA). Die Normalverteilung der Daten wurde sowohl graphisch im Histogramm, als auch statistisch mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft. Nicht normalverteilte Daten wurden für weitere Analysen logarithmiert. Die erste statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte mit dem Student's t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Daten sowie mit dem Mann-Whitney-Test für nicht normalverteilte Daten in GraphPadPrism, um unabhängige Patientengruppen explorativ miteinander zu vergleichen. Um optimale cut-off Werte der Genexpressions-levels zu erhalten, wurde „maximally selected log-rank statistics mit der Software Version R 2.13.0 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) verwendet. Die R-Funktion maxstat.test (Hothorn & Zeileis, 2008) wurde angewendet um multiple Testergebnisse innerhalb dieser Analysen zu berücksichtigen. Assoziationen zwischen Proteinexpression und

pathologischen Eigenschaften wurden mittels Kreuztabellen mit dem  $\chi^2$  Test und dem Mann-Whitney-U Test analysiert. Das zeitabhängige Tumorspezifische Überleben, sowie das Rezidiv-freie Überleben wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode dargestellt. Für den Vergleich der Überlebenskurven unabhängiger Subgruppen wurde der Log-Rang Test verwendet. Um den simultanen Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben in einer multivariablen Analyse zu untersuchen, kam das Cox proportional Hazard Modell zur Anwendung. Multivariable Analysen für binäre Überlebensdaten wurden mit Hilfe der logarithmischen Regression berechnet. Für Rezidiv-freies Überleben sowie für die Hazard Ratios wurde ein Konfidenzintervall von 95 % verwendet. Das Einsortieren der Patienten in unterschiedliche Gruppen bezüglich des KRAS und BRAF Mutationstatus, der Mikrosatelliteninstabilität und der logarithmisierten Gen-expressions- Levels von Osteopontin, SASH-1 und MACC-1 wurde mit Hilfe der SPSS „Two-step-cluster analysis“ Funktion durchgeführt. Prognostische Modelle, welche Gen-Expressionsergebnisse und alle weiteren Daten enthalten, wurden für 83 Patienten berechnet. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt und gelten als signifikant sobald ein Unterschied zwischen Messdaten bei einem Wert von  $p < 0,05$  vorlag, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht. Zudem wurde keine Korrektur von P-Werten durchgeführt um sie auf multiple Testergebnisse anzuwenden.

### Work- Flow Diagramm:

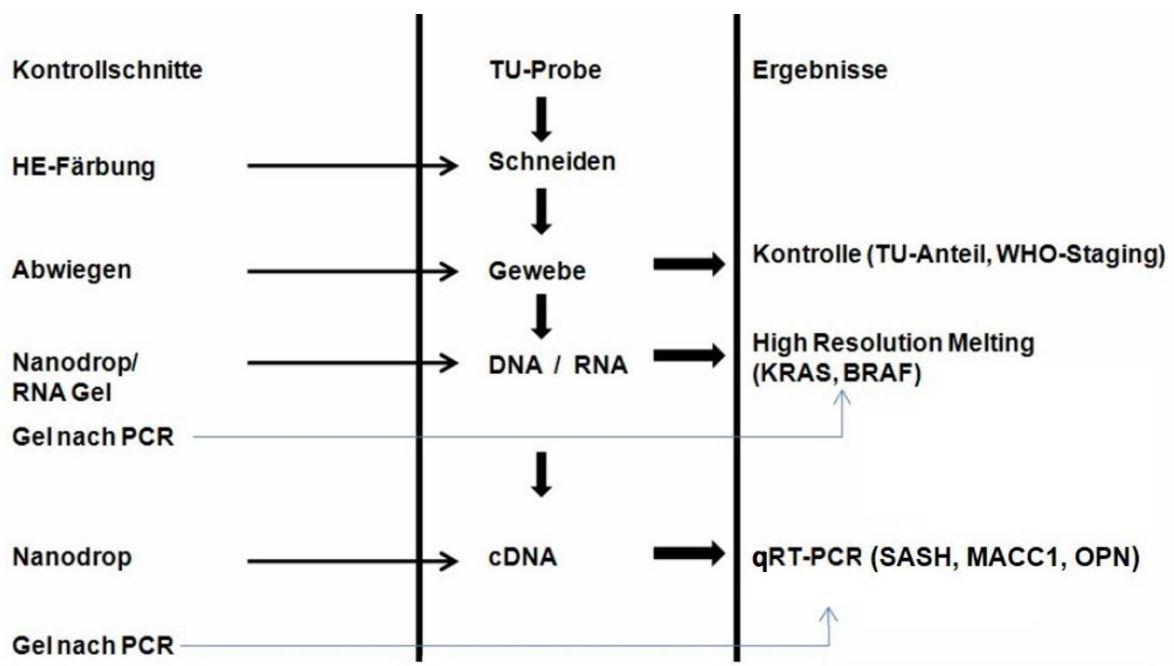


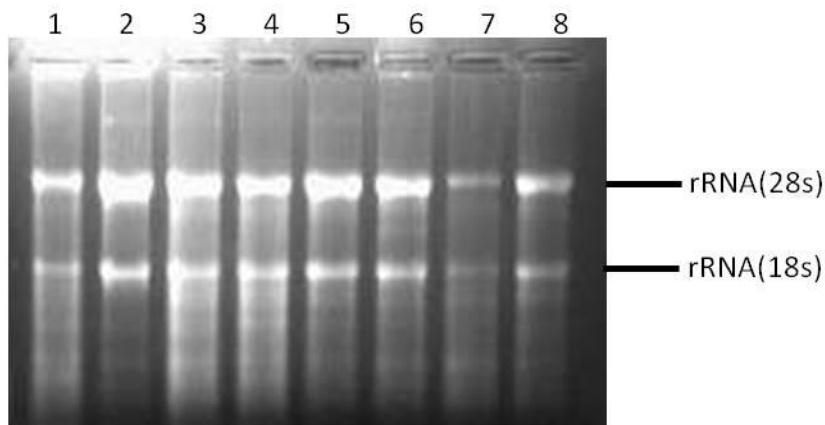
Abbildung 7: Work-Flow Diagramm



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung RNA / DNA

Ein ergebnisbestimmender Schritt ist die RNA/DNA Extraktion. Es wurde in Vorarbeiten eine Methode etabliert, um RNA/DNA in einer guten Qualität und Quantität aus Patientengewebe zu extrahieren. Das verwendete Protokoll ist bereits im Detail publiziert. Es hatte sich etabliert, die DNA und RNA in 2 getrennten Schritten zu gewinnen, da eine Kombi-Extraktion nicht die gewünschten Ergebnisse bezüglich der RNA Qualität und Quantität ergab. Die DNA konnte mit dem RLT Plus Puffer (Quiagen) in einer hohen Ausbeute und guten Qualität extrahiert werden. Die RNA musste mit Trizol als Lysepuffer extrahiert werden. Es zeigte sich, dass mindestens 10 mg schockgefrorenes Gewebe pro Extraktionsschritt nötig waren, folglich für RNA und DNA 20 mg. Nach der Extraktion wurde die Konzentration photometrisch vermessen. Bei der DNA konnte man bei diesem Schritt bereits Rückschlüsse auf die Güte ziehen, bei der RNA war es allerdings notwendig, ein denaturierendes RNA-Gel als zusätzliche Kontrolle der RNA-Güte und ihrer Ingetrität laufen zu lassen.



**Abbildung 8: Denaturierendes RNA-Gel zur RNA-Qualitätskontrolle.**

Die RNA Extraktion erfolgte mit dem Trizol. Alle Banden zeigen die ausgeprägten 18s und 28s rRNA Banden und konnten zur weiteren Analyse genutzt werden.

Abbildung 8 zeigt die Trizol-basierte RNA-Extraktion. Um die RNA-Qualität zu garantieren, wurden alle extrahierten RNA-Lösungen auf ein RNA-Gel aufgetragen, und abgebaute Proben wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Proben, die keine erkennbaren 18S und 28S Banden oder Degradationen („Schmier“) zeigten, wurden als abgebaut gewertet und von weiteren Analysen ausgeschlossen. Für die weiteren Analysen konnte n=84 DNA und RNA Proben verwendet werden.

## 4.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt umfasste das Patientenkollektiv 84 Patienten (54 Männer und 30 Frauen), mit einem medianen Alter von 67 Jahren. Patienten mit Rektumkarzinom wurden in dieser Arbeit ausgeschlossen, nachdem dies als eigene Entität angesehen werden kann und die Prognose hierbei durch eine präoperative Chemo-Strahlentherapie beeinflusst werden kann (Brenner et al. 2014). Nach entsprechender Aufklärung der Patienten und ihrer Einwilligung in die OP wurde eine kurative Resektion des Primärtumors (R0) an zwei Zentren zwischen 1987-2014 durchgeführt. 81 Patienten kamen aus der Viszeralchirurgischen Abteilung des Klinikums Rechts der Isar und 8 Patienten aus dem Marienhospital Vechta. Es mussten aufgrund von RNA Abbau 5 Patienten aus dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Zudem standen 79 Darmschleimhautgewebe zur Verfügung, welches aus Patienten mit Stadium II und Stadium III Tumoren gewonnen wurde und zum Teil aus einer Vorstudie (Nitsche et al. 2012) stammte. Patienten mit einem Lokalrezidiv wurden in dieser Arbeit nicht eingeschlossen um zu verhindern, dass eine Verzerrung der Ergebnisse durch die chirurgische Technik bzw. keine erfolgreiche vollständige Tumorsektion stattfindet. Es sollte in diesem Fall gezeigt werden, welchen Einfluss die intrinsische Tumorbilogie auf die Rezidivrate besitzt (Zeestraten et al. 2012). Im Median wurden 19 Lymphknoten bei den Patienten reseziert (Spannbreite 7-52). Der Primärtumor wurde bei 6 Patienten als T2, bei 57 Patienten als T3 und in 21 Patienten als T4 eingestuft. Der Lymphknotenstatus (N) wurde als N1a bei 32 Patienten, N1b bei 26 Patienten, N2a bei 16 Patienten und N2b bei 10 Patienten beobachtet. Es lagen keine Patienten mit N1c vor. Dies führt zur UICC Tumorklassifikationsstadium IIIa bei 4, IIIb bei 63 und IIIc bei bei 17 Patienten. Metachrone Metastasierung wurde definiert als Fernmetastase während des Follow ups (>30 Tage nach OP). Patienten mit metachronen Metastasen zeigten sich in der Leber (n=20), Lunge (n=1), Peritonealkarzinose (n=8), Hirnmetastasen (n=1) und Knochenmetastasen (n=2). 37 Patienten entwickelten ein Rezidiv. Das mediane postoperative Follow-up betrug 9,5 Jahre. Während des Follow-ups entwickelten 37 Patienten eine Fernmetastase nach einem median von 17 Monaten. 33 Patienten verstarben tumorbedingt nach einem median von 112 Monaten. Das 5 Jahre rezidivfreie Überleben betrug im median für das Patientenkollektiv  $52 \pm 6$  %. Als einziger klinischer Faktor zeigte sich ein erhöhter Lymphknotenstatus (erhöhtes pN Stadium pN2 vs pN1) assoziiert mit einer höheren

Rate an zeitversetzten Fernmetastasen im Stadium III ( $p=0,002$ ). Das Tumorstadium (T) verpasste nur knapp einen signifikanten Wert ( $p=0,054$ ).

### Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs

		Alle Patienten		Auftreten von Metastasen		
		N=84	(100%)	Metachr. Metastasen (n=37)	Metachr. Metastasen (n=44)	p (metachr. Metastasen)
Geschlecht	Männlich	54	(64)	25	46	0.578
	Weiblich	30	(36)	12	40	
Alter (Jahre, median)		67 (Spannweite 35-86)		37	44	0.423
Registrierungsperiode	Vor 1993	42	(50)	22	52	0.124
	1994 und später	42	(50)	15	36	
Seite	Kolon rechts	35	(42)	17	49	0.633
	Kolon links	44	(52)	19	43	
	unbekannt	5	(6)	1	20	
Histologie	Adenokarzinom	75	(89)	34	46	0.076
	Muzinöses Adenokarzinom	7	(9)	1	14	
	Siegelzellkarzinom	2	7(2)	2	100	
Grading	Niedrig (G1-2)	48	(57)	18	38	0.163
	Hoch (G3-4)	36	(43)	19	53	
pT	T1	0	(0)	0	0	<b>0.054</b>
	T2	6	(7)	4	67	
	T3	57	(68)	20	35	
	T4	21	(25)	13	62	
pN	N1	58	(69)	19	33	<b>0.002</b>
	N2	26	(31)	18	69	
Lymphinvasion	L0	57	(68)	25	44	0.960
	L+	27	(32)	12	44	
Angioinvasion	V0	79	(94)	34	43	0.459
	V+	5	(6)	3	60	
Adjuvante Chemotherapie	Keine	41	(49)	16	39	0.500
	5-FU alleine	27	(32)	12	44	
	andere	16	(19)	9	56	
Überlebensstatus	Am Leben	31	(37)	2	6	<0.001
	Tumor bedingter Tod	33	(39)	33	100	
	Nicht-tumor bedingter Tod	20	(24)	2	10	
Metastasierung	Keine Metastase	47	(56)	0	0	
	Metachr. Metastase	37	(44)	37	100	

---

Der P-wert bezieht sich auf die unterschiedlichen Faktoren bezüglich des metachronen Metastasierungsrisikos bezogen auf pN1. Analyse mit  $\chi^2$ -test.

**Tabelle 12: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs**

## 4.3 Expressionsanalyse

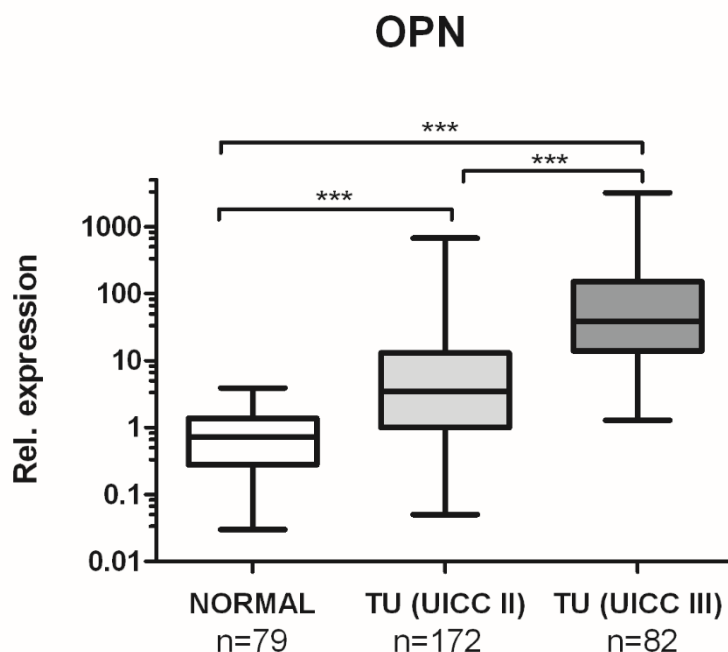
Die Expression der untersuchten Gene wurde sowohl in Tumoren n=84 Tumore, UICC Stadium III, als auch in Normalgewebe mittels quantitativer „Realtime PCR“ untersucht. Hierbei diente die humane Zelllinie HEK 293 als Kalibrator. Als „Housekeeping“ Transkript wurde bei allen Transkripten HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) verwendet. Um die Primerspezifität zu evaluieren, wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Dissoziationskurve erstellt.

Intratumorale Genexpression von Osteopontin, ein Surrogatmarker für eine abnorme Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs, sowie der Tumorsupressor SASH1 und das Metastasen-assoziierte Gene MACC1 wurden mittels qRT-PCR analysiert und mit Normal-Kolonschleimhautgewebe verglichen. Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede bei der Normal-Kolongewebes Schleimhaut bei den Patienten aus den Stadien II und III. Allerdings zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied aller drei Gene bei Tumoren im Vergleich zur Normal-Kolonschleimhaut.

### 4.3.1 Osteopontin (OPN)

Die qRT-PCR stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um Patientenproben auf veränderte Osteopontin-Expression zu testen. Um Unterschiede der Expressionsstärke in den verschiedenen Patientenproben sowie als Vergleich in Normalgewebe und Zelllinien zu erkennen, wurden insgesamt 82 Patientenproben auf Expressionsunterschiede im Osteopontin-Gen getestet. Als Kalibrator dienten bei der qRT-PCR die humane Zelllinie HEK-293 und als Positiv-Kontrolle die humane Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2. Das „Normal“- Darmschleimhautgewebe (Kolon), also die nicht erkrankte Mukosa, die zusammen mit dem Tumor operativ reseziert wurde, stammte aus der bereits erwähnten Vorstudie (Nitsche et al. 2012). Die Ergebnisse zeigten, dass sich im Normalgewebe die Osteopontin-Expression bei allen untersuchten Proben auf einem vergleichbaren Niveau befand. Die Durchschnittsexpression der Normalgewebe lag bei 132,1 (x-fach von Hek 293; 1,0 = Hek 293, nach der  $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode). Bei einer 9-fach erhöhten Osteopontin-Expression

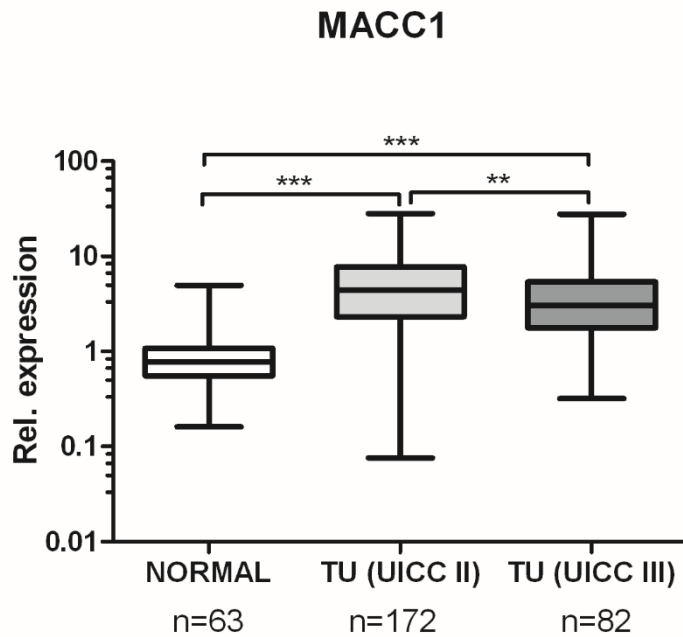
wird im Vergleich zum Normalgewebe in der Literatur eine Mutation im Wnt-Signalweg diskutiert (Rohde et al. 2007). Als Referenz wurde der Mittelwert der Expression (n=79) aus Normalschleimhautproben aus Stadium 2 und Stadium 3 Patienten gewählt. Dieser Wert lag bei 84540. Mit Hilfe des Statistikprogramms R software version 2.13.0 (R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria) konnten die optimalen Messwertgrenzen der Gen-Expressionsausprägungen berechnet werden. Dieser statistische Wert lag bei 1.163.939. Um multiple Testfragen mit dieser Analyse anzusprechen und zu korrigieren, wurde in der R.Funktion maxstat.test verwendet. Daher wurde von einer pathologischen Dysregulation des WNT Signalwegs ausgegangen ab einem relativen OPN Expressionswert von 1.163.939. Von den 82 Patientenproben wiesen insgesamt 26 (31%) eine derart erhöhte Osteopontin-Expression auf. 56 der Tumورproben hatten eine niedrigere Osteopontin-Expression und damit nach der aufgestellten Definition keine erhöhte Aktivierung des WNT-Signalwegs. Der Durchschnittswert der OPN-Expression der Tumorgewebe lag bei 189,19 (x-fach von Normalgewebe). Der t-Test ergab für Normalgewebe zu Stadium II und zu Stadium III einen P-Wert von < 0,0001, und war folglich signifikant.



**Abbildung 9: Relative Osteopontin-Expression in Normal Kolongewebe und Tumoren der Stadien 2 und 3**  
 Normalgewebe zeigt die basale Osteopontinexpression mit einem MW  $\pm$  SD 1,00  $\pm$  0,91 N=79. Bei Patienten im Tumorstadium II ist die Osteopontinexpression deutlich erhöht und weist auf eine Mutation im Wnt Signalweg hin mit einem MW  $\pm$  SD 17,48  $\pm$  12,92 N=172. Im Tumorstadium III weist die Osteopontinexpression nochmals einen Anstieg auf mit einem MW  $\pm$  SD 200, 24  $\pm$  450,63 N=82. Der t-Test zeigt einen signifikanten p-Wert beim Vergleich von Stadium II, sowie Stadium III und Normalgewebe. Zudem zeigte der t-Test einen signifikanten Unterschied zwischen Stadium II und III.

### 4.3.2 MACC1

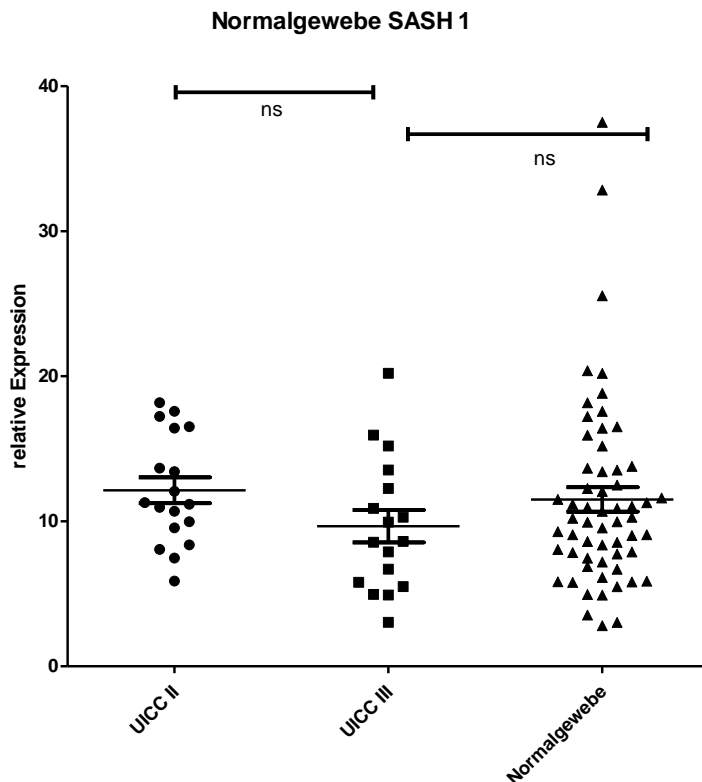
Insgesamt 82 Patientenproben wurden auf Expressionsunterschiede im MACC1-Gen getestet. Als generischer Kalibrator dienten bei der qRT-PCR die humanen Zelllinie HEK-293 zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass sich im Normalgewebe die MACC1-Expression bei allen untersuchten Proben auf einem vergleichbaren Niveau befand. Als Referenz wurde der Mittelwert (n=63) aus Normalschleimhautproben aus Stadium 2 und Stadium 3 Patienten gewählt. Dieser Wert lag bei 0,93. Mit Hilfe des Statistikprogramms R software version 2.13.0 (R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria) konnten die optimalen Messwertgrenzen der Gen-Expressionsausprägungen berechnet werden. Dieser statistische Wert lag bei 4,23 (A-Censor) und 1,39 (R-Censor). Um multiple Testfragen mit dieser Analyse anzusprechen, wurde in der R-Umgebung die Funktion `maxstat.test` verwendet. Von den 82 Patientenproben wiesen insgesamt 29 (32%) (A-Censor) eine erhöhte MACC1-Expression auf, bezogen auf den Mittelwert der Normalgewebe. Beim R-Censor zeigten 71 (87%) der 82 Patienten eine erhöhte MACC1 Expression, erneut bezogen auf den Mittelwert der Normalgewebe. Der A-Censor beschreibt das tumorspezifische Ableben wohingegen der R-Censor das Rezidiv angibt. Der Durchschnittswert der MACC1-Expression der Tumorgewebe lag bei 4,2 (x-fach von Normalgewebe). Der t-Test ergab beim Vergleich von Normalgewebe zu Stadium II und zu Stadium III einen P-Wert von  $< 0,0001$ , folglich signifikant. Zudem zeigte sich, dass im Tumorstadium III im Vergleich zum Tumorstadium II die MACC1 Expression leicht rückläufig war ( $p=0.0089$ ).



**Abbildung 10: Relative MACC1-Expression in Normal Kolongewebe und Tumoren der Stadien 2 und 3**  
 Normalgewebe zeigt die basale MACC1-Expression mit einem MW  $\pm$  SD  $0,93 \pm 0,71$  N=63. Bei Patienten im Tumorstadium II ist die MACC1- Expression deutlich erhöht mit einem MW  $\pm$  SD  $5,68 \pm 4,76$  N=172. Im Tumorstadium III weist die MACC1-expression einen Rückgang im Vergleich zum Stadium II auf mit einem MW  $\pm$  SD  $4,2 \pm 4,0$  N=82. Der t-Test zeigt einen signifikanten p-Wert zwischen Stadium II und Normalgewebe sowie zwischen Stadium III und Normalgewebe. Zudem zeigt t-Test einen signifikanten p-Wert zwischen Stadium II und III.

### 4.3.3 SASH1

Um Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Patientenproben, sowie als Vergleich in Normalgewebe zu bestimmen, wurden insgesamt 82 Patientenproben auf Expressionsunterschiede im SASH1-Gen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass sich im Normalgewebe die SASH1-Expression bei allen untersuchten Proben auf einem vergleichbaren Niveau befand. Als Referenz wurde der Mittelwert (n=71) der Normalschleimhautproben aus Stadium II und Stadium III Patienten gewählt. Dieser Wert lag bei 1,00.



**Abbildung 11: Relative SASH1-Expression in Normal-Kolongewebe** von Patienten ohne Tumoren und im Normalgewebe von Patienten im Tumorstadium II und III normalisiert auf die Expression der Zelllinie HEK293. Der t-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Normalgewebe.

Mit Hilfe des Statistikprogramms R software version 2.13.0 (R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria) konnten die optimalen Messwertgrenzen der Gen-Expressionsausprägungen berechnet werden. Um multiple Testfragen mit dieser Analyse anzusprechen wurde in der R-Funktion `maxstat.test` verwendet. Es wurde daher von einer Mutation im Tumorsuppressorgan SASH1 ausgegangen ab einem SASH1 Expressionswert von 0,42 (A-Censor) und 0,32 (R-censor) SASH1-Expression. Von den 82 Patientenproben wiesen insgesamt 42 (51%) eine erniedrigte Expression auf bezogen auf den Mittelwert der Normalgewebe. Der Durchschnittswert der SASH1-Expression der Tumorgewebe lag bei 0,54 (x-fach von Normalgewebe). Der t-Test ergab für Normalgewebe zu Stadium II und zu Stadium III einen P-Wert von  $< 0,0001$ , folglich signifikant. Auch zwischen den Tumorstadien II und III bestand ein signifikanter Wert von ( $p < 0,05$ ).



## SASH1

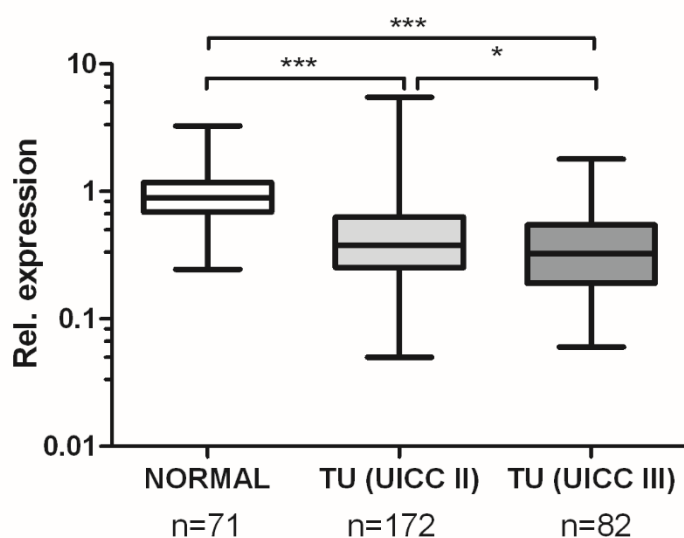
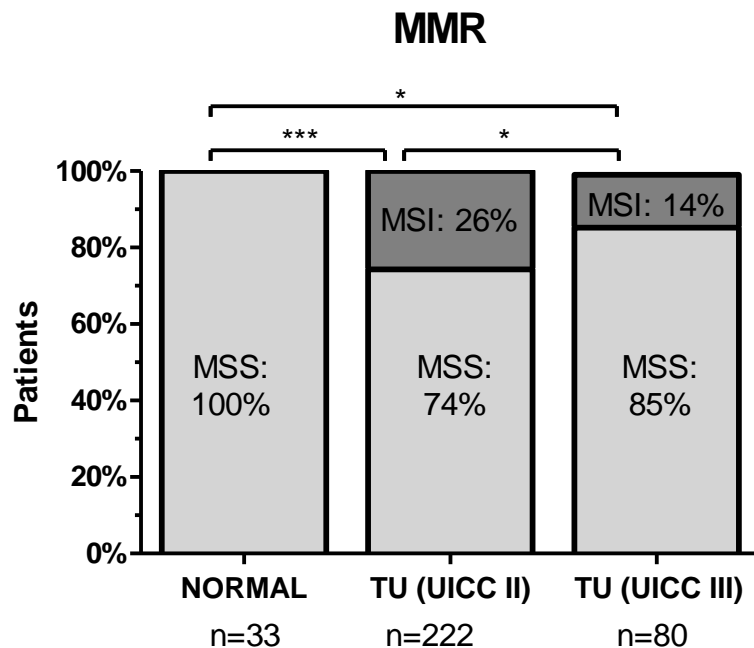


Abbildung 12: Relative SASH1-Expression in Normal-Kolongewebe und Tumoren der Stadien 2 und 3

Normalgewebe zeigt die basale SASH1 Expression mit einem MW  $\pm$ SD  $1,00 \pm 0,53$  N=71. Bei Patienten im Tumor Stadium II ist die SASH 1 Expression deutlich erniedrigt mit einem MW  $\pm$ SD  $0,59 \pm 0,73$  N=172. Im Tumorstadium III weist die SASH 1 Expression eine weitere Reduzierung auf mit einem MW  $\pm$ SD  $0,43 \pm 0,33$  N=82. Der t-Test zeigt einen signifikanten p-Wert zwischen Stadium II und Normalgewebe sowie zwischen Stadium III und Normalgewebe. Zudem zeigt der t-Test im UICC Stadium II eine signifikant verringerte SASH-1 Expression als im Stadium III.

### 4.3.4 MMR

High-grade Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high) wurde bei 11 Patienten detektiert. Wie erwartet traten bei Mikrosatelliteninstabile Tumoren gehäuft BRAF-Mutationen auf (26 % vs. 2 % in Patienten ohne BRAF- Mutation,  $p=0.002$ ) und traten ebenso gehäuft im rechten Kolon auf (90 % vs 10 % im linken Kolon,  $p=0.002$ ). Frauen wiesen eine erhöhte Mikrosatelliteninstabilität (24 % vs 8 % bei Männern  $p=0.042$ ) sowie BRAF-Mutation (20 % vs 4 % bei Männern,  $p=0.016$ ). Desweiteren zeigte sich, dass die MSI-high Fälle signifikant reduziert waren im Tumorstadium III beim Kolonkarzinom verglichen mit dem Stadium II ( $p=0.0451$ , Fishers exact test), wohingegen Mutationen in KRAS und BRAF in Stadium II und III mit derselben Häufigkeit auftraten. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten sich MSI und BRAF Mutationen gehäuft bei älteren Patienten (Aparicio et al. 2014). Die Abbildung 13 zeigt die Mikrosatelliteninstabilität in Normal-Kolonschleimhautgewebe und Tumore der Stadien II und III. Im Normalgewebe (n=33) wurde keine Mikrosatelliteninstabilität detektiert. Im Tumorstadium II hatten 26 % der Patienten eine Mikrosatelliteninstabilität. Im Tumorstadium III nahm die Anzahl auf 14 % ab.



**Abbildung 13: Rate der Patienten die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen**

Normalgewebe ist MSS. Im UICC II Stadium zeigen 26 der Patienten ein MSI. Im Stadium III fällt die Rate auf 14 % der Patienten. Der P-Wert ist signifikant zwischen dem Normalgewebe und den Tumorstadien II und III. Zwischen den Tumorstadien II und III besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied.

#### 4.4 Mutationsanalysen HRMA

„High Resolution Melting“ ist ein zuverlässiges Verfahren zur effizienten Detektion von DNA-Mutationen. In dieser Arbeit wurde die HRMA für die Untersuchung von 81 Kolonkarzinom-Patientenproben genutzt, um Mutationen in den Onkogenen KRAS und BRAF zu detektieren. Die Zelllinien CaCo2, SW480 und HCT116 dienten hierbei als Kontrollen, wobei CaCo2 für beide Gene Wildtyp war. SW480 weist eine homozygote Mutation im KRAS-Gen G12V (Glycin zu Valin) auf, und HCT 116 eine heterozygote Mutation (G13D). Zusätzlich diente eine Probe ohne zugesetzte DNA (ddH<sub>2</sub>O) als Kontaminationskontrolle. Mit den Primern wurde ein 189bp langes Fragment amplifiziert in Anlehnung an ein publiziertes Verfahren (Krypuy et al. 2006). Die Proben wurden von der Software Roche Lightcycler 480 mit Hilfe des Programms „Gene Scanning“ normalisiert und die Ergebnisse als Differenzplot dargestellt. Analysiert wurden die Proben mittels absoluter Quantifizierung und „second derivative“ Maxima (Maxima der zweiten Ableitung). Zusätzlich wurde CaCo2 als Basislinie für die Wildtyp-Situation ausgewählt. In der Schmelzkurvenanalyse werden diese Daten als Schmelzkurvendiagramm dargestellt (fluorescence [F] vs temperature [T]). Der T<sub>m</sub>

eines PCR Produktes kann über den Wendepunkt der Schmelzkurve berechnet werden. Jedoch kann der  $T_m$  leichter ermittelt werden, indem man mit Hilfe der Software eine abgeleitete Schmelzkurve darstellt ( $-dF/dT$ ), bei der das Zentrum des Schmelzpunktes mit dem Wendepunkt korrespondiert. Die Analyse wurde mit dem Analysetyp "Gene Scanning" durchgeführt. Die Software (LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP3) bestimmte automatisch Unterschiede im Genotyp aller Proben, indem alle Schmelzkurvenprofile mit einer Referenzkurve verglichen wurden. Zuvor wurden die „Roh-Schmelzkurve“ normalisiert, indem man das „pre-melt“-Signal (Initiale Fluoreszenz) und das „post-melt“-Signal (finale Fluoreszenz) auf einen einheitlichen Wert festlegte. Danach folgte der „Temperature Shift“ der normalisierten Kurven entlang der Temperaturachse, um sie an den Punkt anzugleichen, bei dem die dsDNA in jeder Probe vollständig denaturiert wird. Als letzter Schritt folgt der „Difference Plot“, den man durch die Subtraktion der „geschifteten“ und normalisierten Kurven von einer Referenzkurve erhielt, um somit klar die Schmelzkurvenunterschiede darzustellen.

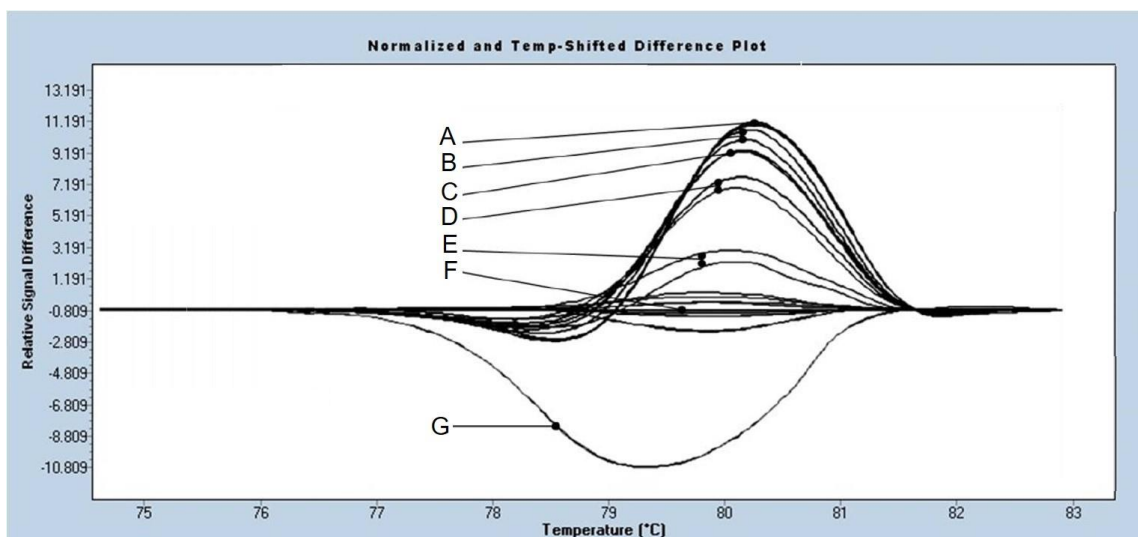
Zelllinie	Herkunft	Mutationen
<b>CaCo2</b>	Humane Kolorektal-Adenokarzinom Zelllinie	Keine Mutation KRAS/BRAF
<b>HCT116</b>	Humane Kolorektal-Adenokarzinom Zelllinie	G13D, heterozygot
<b>HT29</b>	Humane Kolon Adenokarzinom Zelllinie	V600E
<b>SW480</b>	Humane Kolorektal-Adenokarzinom Zelllinie	G12V, homozygot

**Tabelle 13: Zelllinien mit ihrer jeweiligen Mutation**

Die Tabelle beinhaltet verschiedene Zelllinien, deren Herkunft und die Mutation, die sie tragen (Quelle: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

In Vorarbeiten der Gruppe Janssen und in meiner Masterarbeit wurde ein Protokoll evaluiert das zeigte, dass es mittels der HRMA möglich ist, Tumor-DNA in geringen Konzentrationen nachzuweisen (Balmert 2011). Dazu wurde Normalgewebe mit verschiedenen Verdünnungen der humanen kolorektalen Krebszelllinie HCT116 gespickt (Abb.:14). Durch das „spiken“ (spicken) erzeugte man quasi einen heterozygoten und verdünnten Zustand, welcher auch in Patientenproben, die neben Tumorzellen auch Stroma enthalten, erwartet wurde. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der HRMA. Die oberste Kurve beinhaltet die HCT116 Zelllinie. Sie wird vom

Algorithmus mit dem größten Unterschied zur Kontrolle (Caco2) eingestuft. In absteigender Tendenz folgten die Normalgewebe, die mit Verdünnungen der Zelllinie gespickt wurden. Die Detektionsschwelle lag bei der 1:20 Verdünnung. Somit waren also 5 % Tumor-DNA-Gehalt noch detektierbar. Die 1:50 Verdünnung wurde vom Algorithmus als Normalgewebe eingestuft. Somit ließe sich allerdings auch in Patientenproben abschätzen, wie hoch der Gehalt an DNA mit KRAS Mutation war. Zudem konnte bei Proben, die der Algorithmus als normal einstuft, eine nachträgliche manuelle Zuordnung vorgenommen werden, wenn der Kurvenverlauf zwischen der 1:20 und der 1:50 Kurve verlief, da abgeschätzt werden konnte, wie viel DNA mit einer KRAS Mutation sich darin befand.



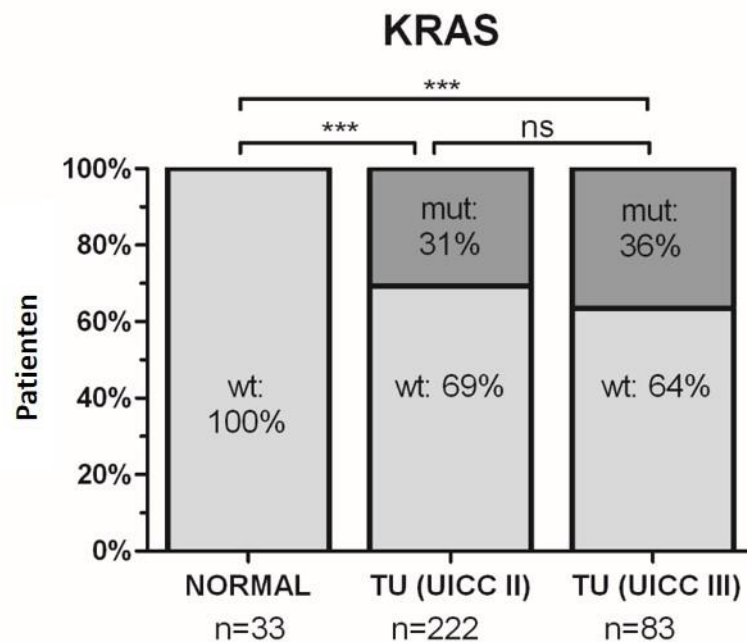
**Abbildung 14:** „Difference Plot“ Normalgewebe mit HCT116 Verdünnungen.

Modifiziert aus Balmert 2011. Normalgewebe wurde mit verschiedenen Verdünnungen der humanen kolorektalen Krebszelllinie HCT116 gespickt. Der Detektionsgrenzwert liegt bei der 1:20 Verdünnung; somit ist der Grenzwert bei 5 % Tumor-DNA Gehalt. Der Algorithmus stuft das Normalgewebe sowie auch eine 1:50 HCT116 Verdünnung als normal ein. A: HCT 116, heterozygot (mut/wt) B: Normalgewebe gespickt mit HCT 116 1:5 (20%), C: Normalgewebe gespickt mit HCT 116 1:10 (10%) D: Normalgewebe gespickt mit HCT 116 1:20 (5%) E: Normalgewebe gespickt mit HCT 116 1:50 (2%) F: Normalgewebe G: homozygot SW 480 (mut/mut)

#### 4.4.1 KRAS Status im Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurde von 83 Patientenproben der KRAS-Status mittels HRMA ermittelt. Bei 30 Proben konnte eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden, was einer Häufigkeit von 36 % entspricht. Die 33 Normalgewebeproben wiesen keine Mutation im KRAS-Gen auf. Abbildung 15 zeigt den KRAS Status im UICC II und UICC III Stadium. Zwischen Normalgewebe und Stadium II und III herrscht ein hochsignifikanter Unterschied ( $P < 0,001$ ). Zwischen den Stadien II und III zeigte sich

kein signifikanter Unterschied. Jedoch sieht man im Stadium III bereits eine Zunahme der KRAS-Mutationen.

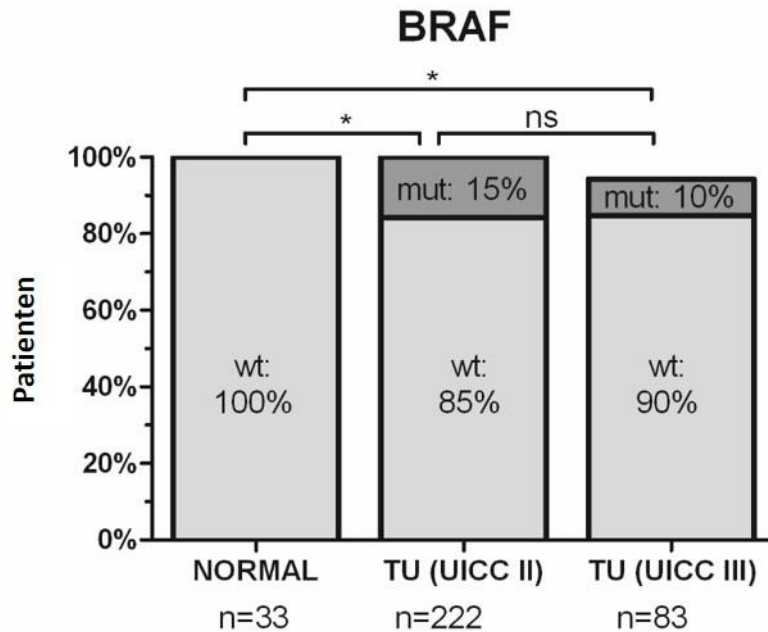


**Abbildung 15: Rate der Patienten die eine KRAS Mutation aufweisen**

Normalgewebe zeigte keine KRAS Mutation Im UICC II Stadium zeigen 31 % der Patienten eine Mutation in KRAS. Im Stadium III steigerte sich die Rate sogar auf 36 % der Patienten. Der P-Wert ist hochsignifikant zwischen dem Normalgewebe und den Tumorstadien II und III.

#### 4.4.2 BRAF Status im Patientenkollektiv

Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie HT29 verwendet, die eine V600E (TACAGAGAAAT V600E (GTG>GAG)) Mutation im BRAF-Gen trägt. Wiederum wurde Normalgewebe mit verschiedenen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:20, 1:50) der DNA der Zelllinie HT29 versetzt. Als Basiskurve diente CaCo2. Die Detektionsschwelle liegt bei der 1:20 Verdünnung. Somit sind 5 % Tumor-DNA-Gehalt noch detektierbar (Balmert 2011). Der BRAF-Status wurden von 83 Patientenproben im UICC III mittels HRMA ermittelt. Von diesen hatten 8 eine BRAF-Mutation, was einer Häufigkeit von 10 % entspricht. Die 33 Normalgewebeproben wiesen keine Mutation im BRAF Gen auf. Im UICC Stadium II zeigten 15 % der Patienten eine BRAF Mutation. Der P-Wert zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Normalgewebe und den Tumorstadien II und III. Zwischen den beiden Tumorstadien herrscht kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 16: Rate der Patienten, die eine BRAF Mutation aufweisen**  
 Normalgewebe zeigt keine BRAF Mutation Im UICC II Stadium zeigen 15 % der Patienten eine Mutation in BRAF. Im Stadium III verringert sich die Rate auf 10 % der Patienten. Der Unterschied ist signifikant zwischen dem Normalgewebe und den Tumorstadien II und III.

## 4.5 Biomarker Korrelation mit Prognose und Überleben

Das mediane postoperative Nachsorgeintervall der Studiengruppe betrug 9,5 Jahre. Während dieser Zeit entwickelten 37 Patienten (44 %) nach einem median von 17 Monaten Fernmetastasen, 33 (39 %) der Patienten starben nach durchschnittlich 112 Monaten auf Grund des Tumors. Fernmetastasen zeigten sich eher beim männlichen Geschlecht ( $p=0,0578$ , log rank) sowie bei Patienten die bereits einen Befall der Lymphgefäße aufzeigten ( $p=0,002$ , log rank). Ein hohes pN Stadium (pN2 versus pN1) war der einzige kliniko-pathologische Faktor, der mit einer höheren Rate an zeitversetzten (metachronen) Fernmetastasen assoziiert war. Das 5-jahre Rezidivfreie Überleben für das Patientenkollektiv lag bei  $52 \pm 6$  %. Die univariable Risikobeurteilung ergab ein höheres Risiko bei zeitversetzten (metachronen) Fernmetastasen für die KRAS-Mutation (HR 2.9, 95% CI 1.4-6.4,  $p=0.005$ ). Passend zu diesem Ergebnis zeigte sich auch, dass das zeitabhängige Risiko für Fernmetastasen bei Patienten mit KRAS Exon2 Mutation in der Kaplan-Meier Analyse signifikant erhöht war ( $p=0.015$ , log-rank). Der BRAF Exon 15 Mutation Status ( $p=0.541$ , log-rank), ebenso wie der MSI Status ( $p=0.423$ , log-rank), zeigten keine signifikante Assoziation bezüglich des Risikos Fernmetastasen zu entwickeln, was

aber vermutlich an der geringen Anzahl an Patienten mit BRAF Mutation (n=8) und MSI high-Status (n=11) lag. Im Gegensatz zu den eindeutigen (kategorialen) Parametern (mutiert, wildtyp) waren die Daten der Expressionsanalysen kontinuierliche Daten. Die cut-off Werte wurden mit dem Statistik Programm R ermittelt und um multiple Testfragen mit dieser Analyse anzusprechen, wurde in der R.Funktion `maxstat.test` verwendet (Abbildung 17 zeigt die Cut off Werte von OPN, SASH1, und MACC1). Ebenso zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von MACC1 mit einer schlechten Prognose einhergeht, allerdings konnte auch hier kein signifikantes Ergebnis erreicht werden. Desweiteren wurde eine Assoziation zwischen erhöhter SASH1 Expression und reduziertem Rezidiv-freiem Überleben beobachtet ( $p=0.016$ ). Abbildung 18 zeigt die Kaplan-Meier Kurven für Rezidiv-freies Überleben, hinweisend auf Risiko von Fernmetastasen. Hierbei zeigt sich nur bei KRAS ein signifikanter Unterschied beim rezidiv-freiem Überleben. Zudem zeigte sich, dass Osteopontin signifikant höher exprimiert wurde in Stadium III verglichen mit Stadium II ( $p<0.001$ ), wohingegen MACC1 ( $p=0.009$ ) und SASH1 ( $p=0.045$ ) signifikant herabreguliert wurden in Tumorstadium III verglichen mit Tumorstadium II. MACC1 und SASH1 werden als Metastasierungs-assoziierte Gene mit inverser Ausprägung beschrieben. Übereinstimmend dazu gab es eine inverse Korrelation zwischen SASH1 und MACC1 ( $p=0.012$ ). Eine erhöhte Osteopontin Expression ging zudem einher mit erhöhter SASH1 Expression ( $p=0.003$ ).

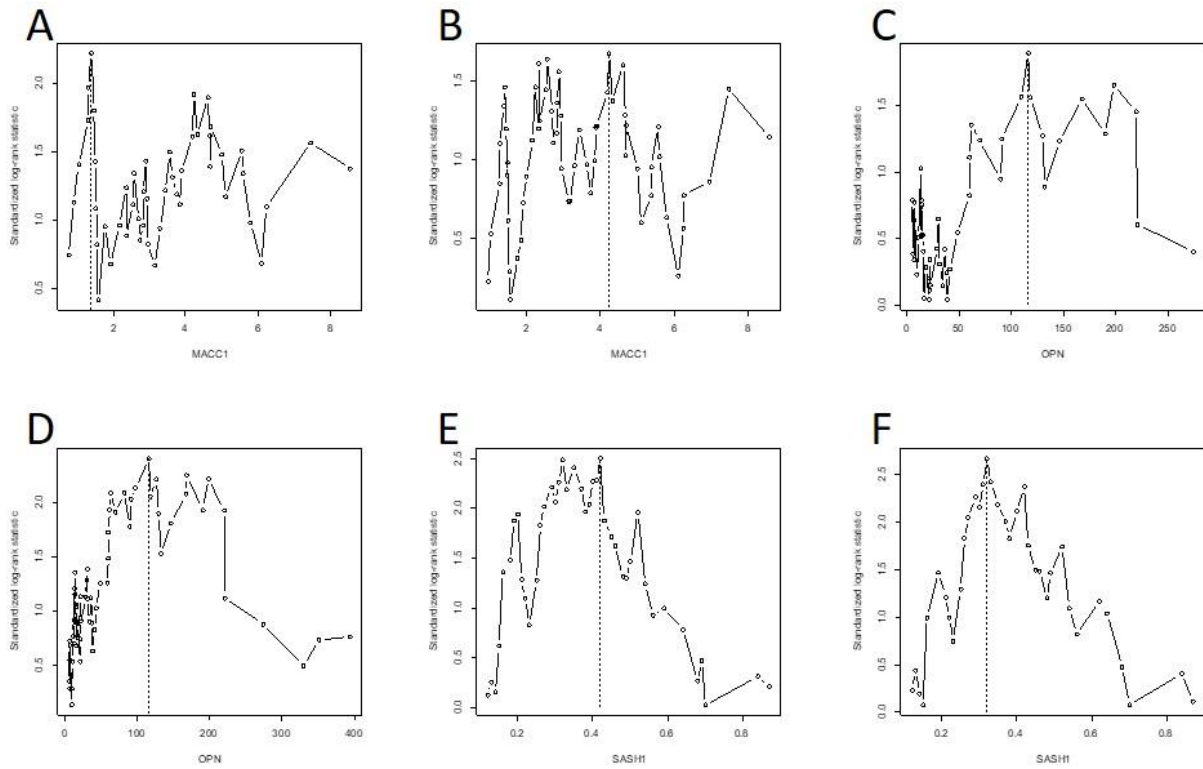
## Univariate Analyse der klinischen Faktoren:

		no recurrence		distant met.		p
		n	%	n	%	
Sex	Male	29	54	25	46	0.578
	Female	18	60	12	40	
Age			67±12		65±11	0.426
WHO	Adenocarcinoma (AC)	40	54	34	46	0.076
	Mucin. Adenoca..	6	86	1	14	
	Signet ring CA	0	0	2	100	
G	G1-2	30	62	18	38	0.163
	G3-4	17	47	19	53	
T	T2	2	33	4	67	0.054
	T3	37	65	20	35	
	T4	8	38	13	62	
N	N1	39	67	19	33	0.002
	N2	8	31	18	69	
L	L0	32	56	25	44	0.960
	L+	15	56	12	44	
V	V0	45	57	34	43	0.459
	V+	2	40	3	60	
Status	alive	47	92	7	8	<0.001
	tumor related death	0	0	33	100	

**Tabelle 14: Univariate Analyse der klinischen Faktoren**

Ein hohes N Stadium (N2 versus N1) war der einzige kliniko-pathologische Faktor, der mit einer höheren Rate an zeitversetzten (metachronen) Fernmetastasen assoziiert war.





**Abbildung 17: Cut off Wert Berechnung für OPN; SASH1, MACC1**

Für die Bestimmung der cut-offs wurde die „maximally selected log rank“ Statistik verwendet. Der Grenzwert wurde für Gesamtüberleben (A, C, E) und Rezidiv-freie Überleben (B, D, F) getrennt berechnet. Allein für OPN ergibt sich für beide Grenzwerte der gleiche Wert. Keiner der p-Werte zeigte einen signifikanten Wert. Da wo der Graph seinen Hochstand erreicht ist die Trennung der beiden Gruppen am signifikantesten.

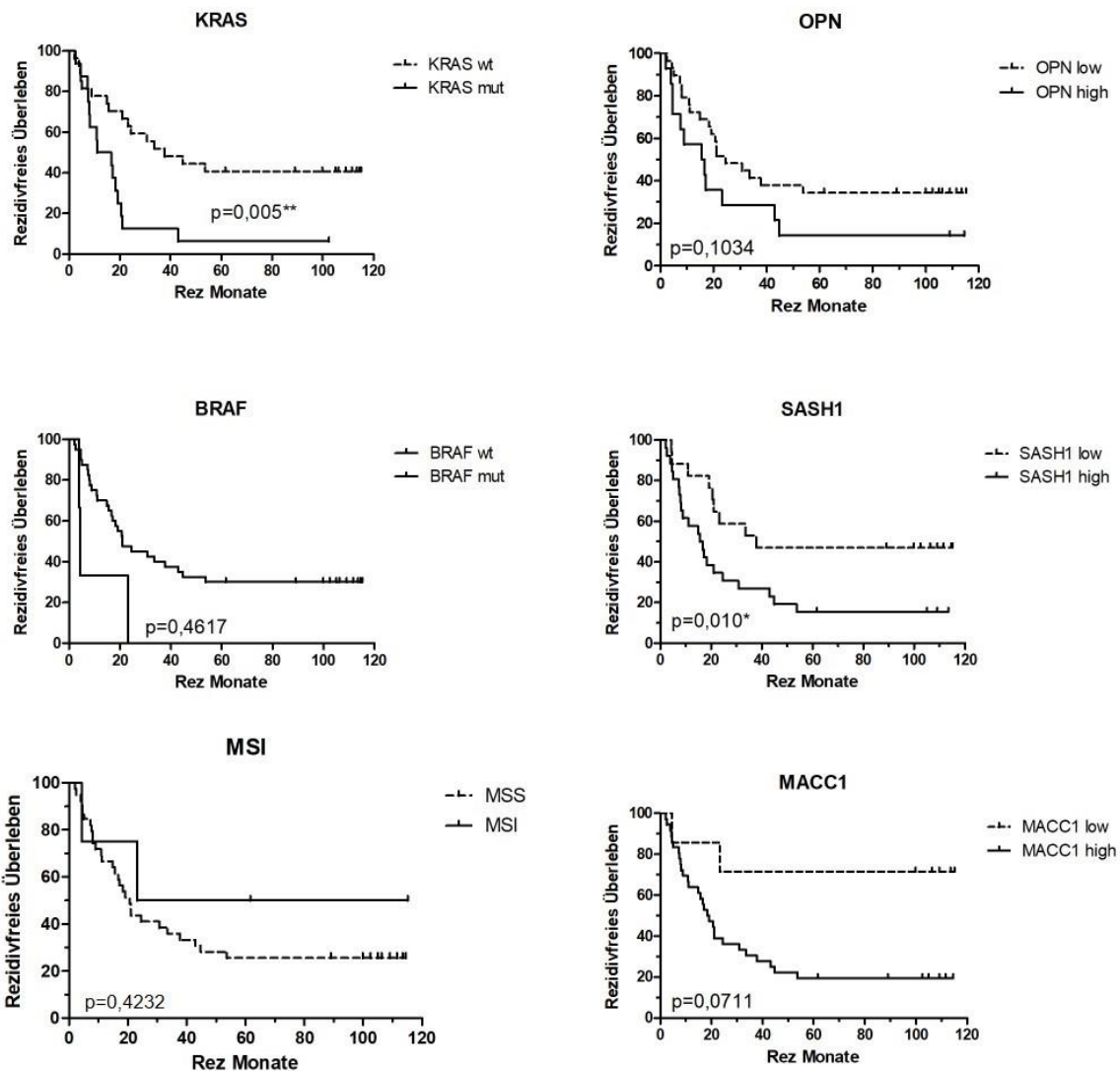


Abbildung 18: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von KRAS Mutationen, BRAF Mutationen und dem Mikrosatelliten-Status, MAAC1, OPN und SASH1 Expression (Daten veröffentlicht in BMC Cancer)

Aufgetragen ist die Zeit (x) gegen die rezidivfreie Überlebensrate (y). Im Falle von KRAS zeigen Patienten mit einer KRAS Mutation einen schlechteren Krankheitsverlauf ( $p=0,005$ ). Für die Marker BRAF, MSI und MACC1 zeigen die Kurven keinen signifikanten Unterschied. Eine niedrige SASH1 Expression geht mit einer längeren rezidivfreien Überlebensrate einher.

## 4.6 Spearman Rho und multivariable Cox- Regressionsanalyse zur Risikobeurteilung

Als molekulare Parameter wurden der KRAS, BRAF-Mutationenstatus, der MSI-Status, sowie die Expressionsdaten von OPN und SASH1 mit einbezogen. Da davon ausgegangen werden musste, dass die kontinuierlichen klinischen Daten nicht normalverteilt sind, wurde der Spearman r Test verwendet. Dabei ist zu beachten, dass es sich um eine rein explorative Analyse handelt. Zur Beurteilung der Stärke der

Korrelation wurde bei einem Korrelationskoeffizienten  $<0,2$  von einer schwachen Korrelation ausgegangen. Ein Koeffizient von  $0,2$  bis  $0,5$  stellt eine mittel starke Korrelation dar, während bei  $>0,5$  von einem sehr starken Zusammenhang ausgegangen wird. Der KRAS-Status korrelierte negativ mit dem BRAF-Status, was der Tatsache entspricht, dass in Tumoren mit mutiertem KRAS keine BRAF-Mutation vorliegt ( $p=0,035$ ). Eine Korrelation mit dem MSI-Status lag nicht vor. Im Gegensatz dazu zeigte der BRAF Status eine starke Korrelation mit MSI-Status ( $p<0,001$ ). Der BRAF-Mutationsstatus korrelierte positiv mit dem Geschlecht ( $p=0,016$ ), wobei Frauen ein erhöhtes Mutationsrisiko zeigen, sowie mit der WHO Klassifikation ( $p=0,005$ ). Dies bedeutet, dass BRAF mutierte Tumore gehäuft dem muzinösen Typ oder dem Siegelringzelladenom angehören. OPN zeigte eine Korrelation mit SASH1 ( $p= 0,007$ ) und MSI ( $p=0,03$ ). Des Weiteren zeigten MACC1 und SASH1 eine inverse Korrelation ihrer Expressionshöhen im Patientenkollektiv.

In der multivariablen Regressions-Analyse mit den molekularen Markern KRAS, BRAF und dem MSI-Status, sowie den immunologischen Markern MACC1, SASH1 und OPN, daneben den etablierten prognostischen Markern WHO-Status, Grading und dem Lymphknoten-Quotienten wurde nach und nach die am wenigsten signifikanten Marker aus der Analyse entfernt. Die Multivariable Analyse wurde mit Hilfe der Cox Regressionsanalyse berechnet und identifizierte KRAS als einzigen unabhängigen prognostischen Faktor bezüglich des metachronen Metastasen freien Überleben in Stadium III beim Kolonkarzinom, trotz der Einbeziehung aller molekularen, histopathologischen und klinischen Faktoren. Die schrittweise Einbeziehung aller klinischen und histopathologischen Faktoren führte dazu, dass KRAS keine Signifikanz als prognostischer Faktor zeigte. Dabei konnte der molekulare Faktor OPN die größte Signifikanz erreichen ( $p=0,054$ ). Zudem stellten sich die klinischen Faktoren Tumorstadium (T2) ( $p=0,057$ ) und der Lymphnotenstatus (N2) ( $p=0,001$ ) sowie das Vorhandensein eines Siegelringkarzinoms ( $p=0,0001$ ) als beste Prognosefaktoren dar.

Korrelationen

			MSI Status MSS=0; MSI=1	BRAF (HRM) wt=0 mut=1	KRAS (HRM) wt=0 mut=1	Log MACC1 (x-fach von nSH-Mean)	log OPN	log SASH1
Spearman-Rho	MSI Status MSS=0; MSI=1	Korrelationskoeffizient	1,000	,551**	-,211	-,132	,244*	-,005
		Sig. (2-seitig)	.	,000	,062	,247	,030	,965
		N	79	79	79	79	79	79
	BRAF (HRM) wt=0 mut=1	Korrelationskoeffizient	,551**	1,000	-,237*	-,174	,198	-,018
		Sig. (2-seitig)	,000	.	,035	,125	,080	,878
		N	79	79	79	79	79	79
	KRAS (HRM) wt=0 mut=1	Korrelationskoeffizient	-,211	-,237*	1,000	,130	-,045	-,100
		Sig. (2-seitig)	,062	,035	.	,253	,694	,380
		N	79	79	79	79	79	79
	Log MACC1 (x-fach von nSH-Mean)	Korrelationskoeffizient	-,132	-,174	,130	1,000	-,069	,145
		Sig. (2-seitig)	,247	,125	,253	.	,544	,201
		N	79	79	79	79	79	79
	log OPN	Korrelationskoeffizient	,244*	,198	-,045	-,069	1,000	,299**
		Sig. (2-seitig)	,030	,080	,694	,544	.	,007
		N	79	79	79	79	79	79
	log SASH1	Korrelationskoeffizient	-,005	-,018	-,100	,145	,299**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,965	,878	,380	,201	,007	.
		N	79	79	79	79	79	79

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).  
\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 15: Spearman Rho Korrelation der molekularen Marker

Multivariable Analyse einschließlich molekularer Marker

	p	HR	95% CI	
			Lower	Upper
MACC1	,467	,964	,875	1,063
Osteopontin	,215	1,001	,999	1,002
SASH1	,543	1,430	,452	4,530
KRAS (mutiert)	,005	2,966	1,384	6,359
BRAF (mutiert)	,130	4,098	,659	25,479
MMR (MSI-H)	,244	,401	,086	1,866

Tabelle 16: Multivariable Analyse einschließlich Molekularer Faktoren

Multivariable Analysis Including Clinical Factors and Molecular Markers				
	P	HR	95% CI	
			Lower	Upper
MACC1 (continuously)	,877	1,009	,897	1,135
Osteopontin (continuously)	,054	1,002	1,000	1,003
SASH1 (continuously)	,304	2,007	,532	7,574
KRAS (mutated)	,120	1,995	,836	4,761
BRAF (mutated)	,453	,346	,022	5,523
MMR (MSI-H)	,614	,593	,078	4,524
SEX (female)	,415	1,590	,521	4,851
AGE	,833	,996	,956	1,037
Adenocarcinoma	,000	1		
Mucin. Adenocarcinoma	,471	,386	,029	5,148
Signet Ring AC	,000	117,293	10,715	1283,997
Grading (1/2 vs 3/4)	,858	1,091	,419	2,842
PT 2	,057	1		
PT 3	,142	,375	,101	1,387
PT 4	,713	1,298	,324	5,204
PN 2	,001	6,315	2,191	18,204
Lymphangiosis	,429	,709	,302	1,664
Angioinvasion	,868	1,163	,194	6,967

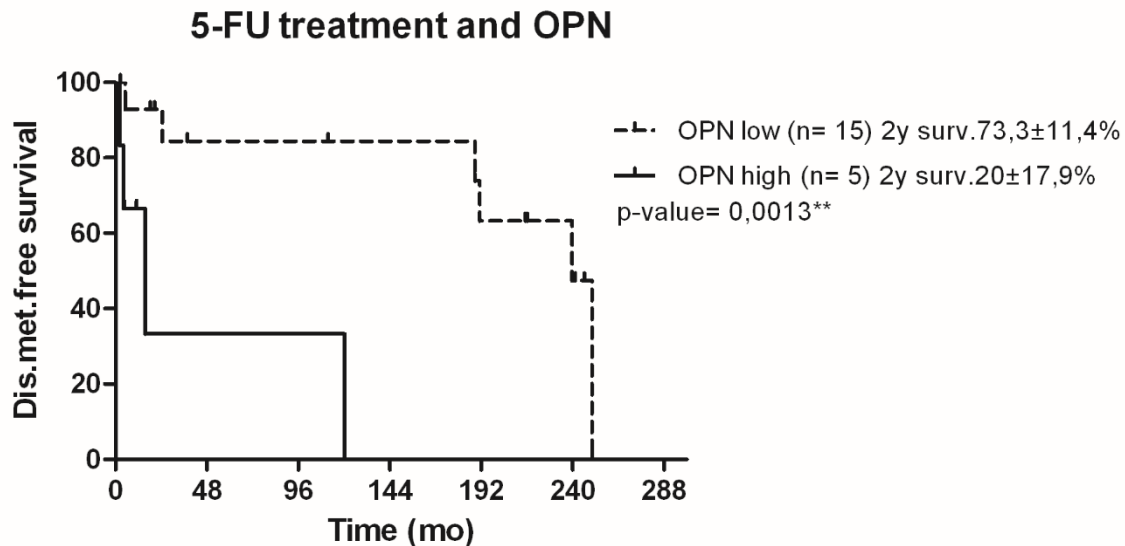
**Tabelle 17: Multivariate Analyse einschließlich klinischer und molekularer Faktoren**

Hierbei zeigt sich der Lymphknotenstatus, das Tumorstadium sowie die das Vorhandensein eines Siegelringkarzinom als beste Prognosefaktoren. Weiterhin zeigt sich der KRAS Status nicht mehr signifikant, vermutlich auf Grund der Tatsache, dass es bei Einschluss von vielen zu testenden Faktoren in der multivariaten Analyse auch genug statistische Ereignisse geben muss.

## 4.7 Prädiktive Biomarker für Therapieansprechen bei adjuvantem Setting

Von den Biomarkern im Stadium III wird nicht nur ein Vorhersagen zur Prognose erwartet, sondern auch auf das Therapieansprechen, also nicht nur eine prognostische, sondern auch prädiktive Aussage. Im klinischen Alltag verwendete adjuvante chemotherapeutische Behandlungskonzepte beim Kolonkarzinom im Stadium III bestehen aus verschiedenen Kombinationen von Medikamenten, die sich ebenso stark verändert haben über die letzten Jahrzehnte. Daher wurde die hier vorliegende Analyse auf eine Untergruppe beschränkt, die eine 5-FU Monotherapie erhalten hat, um die Analysen auf eine verlässliche Basis zu stellen. Jedoch hat die statistische Analyse aufgrund der kleinen Patientengruppe nur eine begrenzte Aussagekraft. Von Bedeutung zeigte sich das Ergebnis, dass Patienten, die eine 5-FU Behandlung erhielten, ein signifikant längeres Fernmetastasen-freies Überleben aufwiesen, wenn ihr Tumor nur eine geringe Expression des WNT-Signalweg-Markers Osteopontin aufzeigte ( $p=0.001$ ). Kein anderer der in dieser Arbeit getesteten

Parameter zeigte eine signifikante Assoziation zum Therapieansprechen bei adjuvanter Behandlung.



**Abbildung 19: 5-FU Behandlung korreliert mit der Expression von OPN**

Patienten mit einer hohen OPN Expression profitieren nicht von einer 5-FU Behandlung. Dagegen haben Patienten mit einer niedrigen OPN Expression und einer 5-FU Behandlung ein deutlich längeres Fernmetastasenfreies Überleben.

## 4.8 Molekulare Subgruppen mit unterschiedlichem Risikoprofil

Eine unüberwachte (unsupervised) Two-step-cluster Analyse, welche die Anzahl der vorgegebenen Cluster automatisch vorgibt und die Einbeziehung von sowohl kontinuierlichen als auch kategorialen Variablen erlaubt, wurde durchgeführt. Gemäß ihrem genetischen Profil hatte die Clusteranalyse drei molekulare genetisch unterschiedliche Patientenkohorten identifiziert, welche sich auch beim Rezidiv-Risiko und im 2-Jahre Rezidiv-freien Überleben signifikant unterschieden in Bereichen von 30 % (Cluster 1) bis zu 70 % (cluster 3,  $p=0.043$ , log-rank). Das Niedrig-Risiko Cluster #1 lässt sich folgendermaßen charakterisieren: BRAF-Mutation, Mikrosatelliteninstabilität, hohe Aktivierung des WNT-Signalweg Surrogatmarker Osteopontin, niedrige Expression des Metastasen Markers MACC1 und hohe Expression des Tumorsuppressors SASH1. Patienten des hoch-Risiko Clusters (Cluster #3) hatten beinahe ein 2-fach erhöhtes Rezidivrisiko von 57 %, charakterisiert

durch KRAS-Mutation, Mikrosatelliten-stabil, mittlere Osteopontin-Expression, hohe Expression von MACC1 und reduzierter Expression von SASH1. Patienten des mittleren Clusters (cluster #2, 41 %) zeigten weder eine KRAS noch eine BRAF-Mutation, waren Mikrosatelliten-stabil, zeigten niedrige WNT-Signalweg Surrogatmarker Expression und zeigten eine mittlere Expression von MACC1 und SASH1.

In den Vorarbeiten der Gruppe wurde bereits eine 2-Step Cluster Analyse am UICC II Stadium an 222 Patienten durchgeführt. Dabei resultierten aus der 2-Step Cluster Analyse 4 verschiedene Gruppen. Zum Vergleich wurde am Patientenkollektiv im Stadium III noch in eine supervisierte Cluster Analyse durchgeführt, wobei wir vier Cluster vorgaben. Auch hier unterschieden sich die Gruppen beim Rezidiv-Risiko und im 2-Jahre Rezidiv-freien Überleben signifikant in Bereichen von 17 % (Cluster 1) bis zu 57 % (cluster 4,  $p=0,048$ ). Das Niedrig-Risiko Cluster #1 lässt sich folgendermaßen charakterisieren: BRAF Wt, Mikrosatelliteninstabilität, mittlere Aktivierung des WNT-Signalweg Surrogatmarker Osteopontin, mittlere Expression des Metastasen Markers MACC1 und hohe Expression des Tumorsuppressors SASH1. Patienten des hoch-Risiko Clusters (Cluster #4) hatten beinahe ein 2-fach erhöhtes Rezidivrisiko von 57%, charakterisiert durch KRAS-Mutation, Mikrosatelliten-Stabilität, wildtyp-Status für BRAF, mittlere Osteopontin-Expression, hohe Expression von MACC1 und reduzierte Expression von SASH1. Patienten des mittleren Clusters (cluster #3, 41%) zeigten weder eine KRAS noch eine BRAF-Mutation, waren Mikrosatelliten-stabil, zeigten niedrige WNT-Signalweg Surrogatmarker Expression und zeigten eine mittlere Expression von MACC1 und SASH1. Das Cluster #2 charakterisierte sich durch BRAF mut, KRAS wt, MSI high (71 %), OPN hoch, MACC1 niedrig und SASH1 mittlere Expression. Dieses Cluster hatte ebenso wie das Cluster 3 eine 41 % Rezidivrisiko. Das Rezidivrisiko der Cluster ist im Stadium III (größtes Risiko 57 %) im Vergleich zum Stadium II (größtes Risiko 16 %) deutlich erhöht. Die Clustereinteilung aus Stadium II und III gleichen sich bezüglich der Daten KRAS, BRAF und MSI. Bei den molekularen Daten unterscheiden sich die Expressionslevel von MACC1, SASH1 und OPN in ihrer Ausprägung.

## Ergebnis der 2-Step Cluster Analyse

Cluster	1	2	3
Size	n =13(16%)	n =39(49%)	n =28 (35%)
KRAS mut	8%	0%	100%
MSI	84% <sup>†</sup>	0%	0%
BRAF mut	54%	0%	0%
OPN expr	high	low	intermediate
MACC1 expr	low	intermediate	high
SASH expr	high	intermediate	Low
Risk of distant metastasis	31% (4)	41% (16)	57% (16)

<sup>†</sup>No cases for MSI-L were detected

Expr indicates expression; MSI, mismatch repair instable; Mut, mutated;

### Abbildung 20: 2-Step Cluster Analyse

Es wurden 3 Gruppen identifiziert, die jeweils eine unterschiedliche molekulare Signatur besitzen. Die absteigende Ordnung der Marker zeigt ihre jeweilige Gewichtung und Signifikanz als Prognosefaktor.

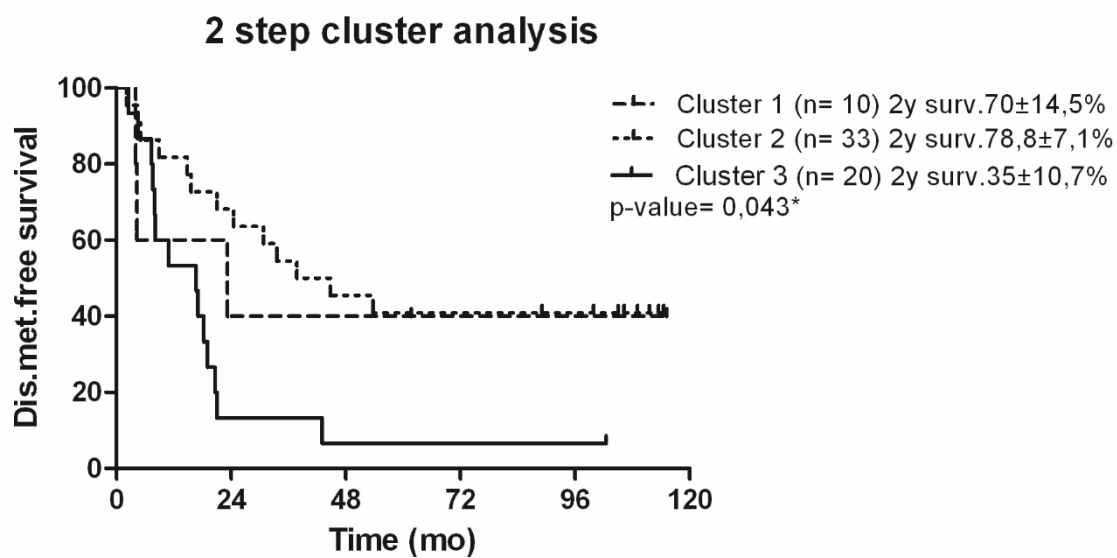


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve mit den Gruppen aus der 2-step Cluster Analyse



## Ergebnis der supervisierten 2-Step Cluster Analyse

Cluster	1	2	3	4
Size	n =6(7%)	n =7(9%)	n = 39(49%)	n =28(35%)
BRAF mut	0%	100%	0%	0%
KRAS mut	17%	0%	0%	100%
MSI	100%	71%)‡	0%	0%
OPN expr	intermediate	high	low	intermediate
MACC1 expr	intermediate	low	intermediate	high
SASH1 expr	high	intermediate	intermediate	low
Risk of distant metastasis	17% (1)	43% (3)	41% (16)	57% (16)

‡No cases for MSI-L were detected

Expr indicates expression; MSI mismatch repair instable; Mut, mutated;

### Abbildung 22: 2-Step Cluster Analyse

Es wurden 4 Gruppen vorgegeben, die jeweils eine unterschiedliche molekulare Signatur besitzen. Die absteigende Ordnung der Marker zeigt ihre jeweilige Gewichtung und Signifikanz als Prognosefaktor. Vergleiche: (Nitsche et al. 2012)

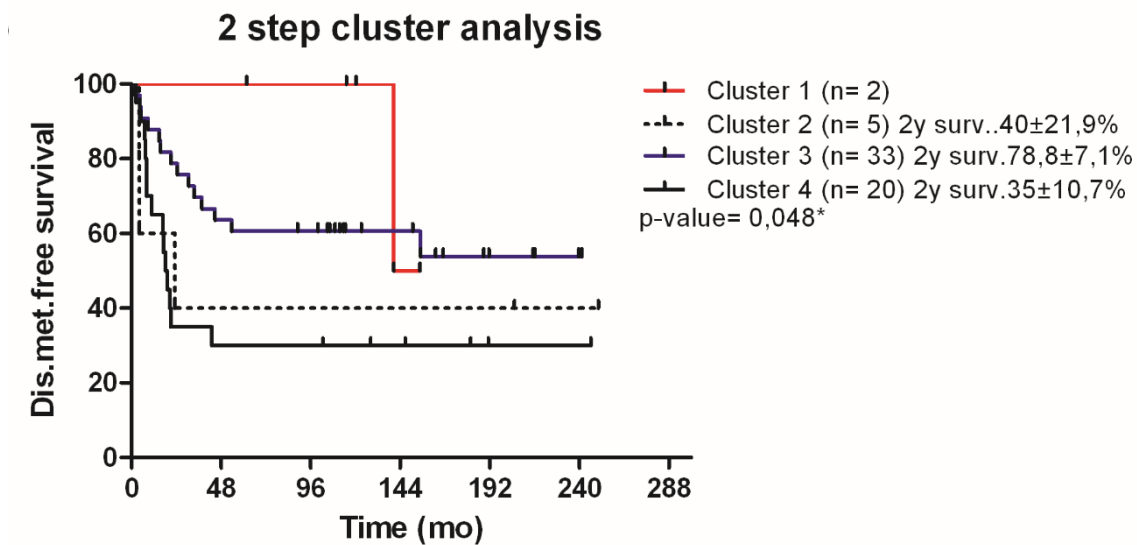


Abbildung 23: Kaplan-Meier Kurve mit den Gruppen aus der 2-step Cluster Analyse mit 4 Gruppen

## 5 Diskussion

### 5.1 Kolonkarzinom

Das Kolonkarzinom gehört zu den molekularbiologisch und histopathologisch am besten erforschten soliden Tumoren. Es ist die viert häufigste Krebsentität weltweit bezüglich der Inzidenz und dritt häufigste der Mortalität (Taghizadeh and Prager 2020). Ein mehrstufiger Prozess, in dessen Verlauf es zu einer Anhäufung genetischer und epigenetischer Aberrationen in der Zelle kommt, liegt der Erkrankung zu Grunde. Um den Patienten eine frühe Diagnose, sowie eine optimale und „individuelle“ Therapie zu ermöglichen, ist es zwingend, die molekulargenetischen Signalwege zu kennen und zu verstehen. Im Zuge dessen wird es immer wichtiger, molekulare Biomarker an Hand dieser Signalwege zu etablieren, um eine frühzeitige Risikostratifizierung vorzunehmen und eine zielgerichtete Therapie für jeden einzelnen Patienten anbieten zu können (Nitsche et al. 2012). 30 % der Patienten mit Kolonkarzinom werden bei Erstdiagnose dem Stadium III zugeordnet, da sie bereits ein Fortschreiten des Tumors in die Lymphknoten aufweisen, aber noch keine nachweisbaren Fernmetastase haben (UICC/AJCC Stadium III). Das Therapieregime gestaltet sich komplex in diesem Tumorstadium, auch wenn der Standard aus einer onkologischen Tumorresektion mit Lymphnotenexstirpation besteht. Seit den 1980er Jahren werden Patienten mit einer 5-FU basierten Chemotherapie mit oder ohne Oxaliplatin behandelt (Ades 2009, Papamichael et al. 2015). Die aktuellen Therapieempfehlungen richten sich aktuell nach der Ausbreitung des Tumors bei Diagnosestellung und sind abhängig vom Tumorstadium (Nitsche et al. 2012, Pox and Schmiegel 2019). Derzeit sollten alle Patienten im Stadium III nach R0 Resektion eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Jedoch variiert das tumorspezifische 5-Jahres Überleben in diesem Tumorstadium von 89 % (IIIA) bis 36 % (IIIC) (Nitsche et al. 2011). Eine adjuvante Therapie führt im Tumorstadium III zu einer Reduktion des Rezidivrisikos auf ca. 30 % verglichen mit 50 % ohne Chemotherapie (Gill et al. 2004), führt jedoch auch dazu, dass alle Patienten gleichermaßen einer zytotoxischen Therapie ausgesetzt werden. Im Zeitalter der personalisierten Medizin wird genau dieses Vorgehen zunehmend hinterfragt (Pahlman et al. 2016). Weder die TNM Klassifikation noch histopathologische und molekulare Marker können aktuell das Rezidivrisiko solide vorhersagen (Erstad et al. 2015).

## 5.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der zuvor aufgeführten molekularen Marker an einem Kollektiv von 83 Patienten mit Kolonkarzinom des TNM/UICC-Stadiums III genauer untersucht werden. Das sogenannte Tumor-Node-Metastasis (TNM)-Staging“ wird von den internationalen Fachgesellschaften (UICC; AJCC) weltweit empfohlen, es berücksichtigt sowohl die Größe der Tumore (T-Stadium), als auch das Vorhandensein von Lokal- bzw. Fernmetastasen (N- bzw. M-Stadium) (Sobin and Fleming 1997, Wittekind 2017). In laboreigenen Vorarbeiten konnte in den letzten Jahren mehrfach nachgewiesen werden, dass eine Risikostratifizierung mithilfe molekular definierter Biomarker für lokal begrenzte Kolonkarzinome des UICC Stadiums II möglich ist, die die etablierten klinischen Prognosemarker deutlich übertrifft (Nitsche et al. 2012, Maak et al. 2013). Allerdings ist fraglich, ob diese genetisch und molekular definierten Biomarker auch bei Kolonkarzinomen des UICC Stadiums III, die bereits lokale Lymphknotenmetastasen ausgebildet haben, prognostisch und/oder prädiktiv von Nutzen sind.

Aktuelle Behandlungsstandards sehen bei den frühen UICC Stadien I und II eine chirurgische Tumorentfernung ohne adjuvante Chemotherapie vor, während bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen eine multimodale Therapie angezeigt ist (Benson et al. 2004, Gunderson et al. 2010). Klinisch kommt der Patientengruppe des Stadiums III, ein besonders hohes Interesse zu, da in allen Fällen gemäß den Leitlinien eine adjuvante Chemotherapie empfohlen wird, obwohl vermutlich nur ein Teil der Patienten ein post-operatives Rezidiv entwickeln wird, und somit eine Form von Übertherapie zu verzeichnen ist (Pox and Schmiegel 2019).

An Hand der Daten zur Genexpression auf mRNA-Ebene (getestet mittels qRT-PCR), dem Vorliegen mutierter somatischer Allele in der genomischen DNA (analysiert mittels „High-resolution melting analysis“, HRMA), und der Mikrosatelliteninstabilität (getestet mittels Multiplex-PCR am Institut für Pathologie) sollte hier eine Aussage über die prognostische und prädiktive Qualität dieser Parameter bei Patienten mit der Diagnose Kolonkarzinom des Stadiums UICC III in einem retrospektiven Kollektiv getroffen werden. Ziel war es, Patienten dieser Gruppe mit identischen klinisch-pathologischen Parametern nach dem individuellen Risiko für post-operative Krankheitsrezidive, auf der Basis der oben aufgeführten molekularen und immunologischen Biomarker zu stratifizieren. Die der Arbeit zugrunde liegende

Hypothese ist, dass sich eine Hoch-Risikogruppe identifizieren lässt, welche trotz adjuvanter Chemotherapie mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv entwickeln wird. Bei dieser Patientengruppe könnte eine aggressivere Therapie und engmaschigere Nachsorge angezeigt sein, oder aber auf Basis der Ergebnisse ein Wechsel auf eine andere Therapieform zum Beispiel eine zielgerichtete oder Immuncheckpoint-Therapie, nötig sein. Des Weiteren wird postuliert, dass Patienten einer Niedrig-Risikogruppe auf die bisher vorgegebene adjuvante Chemotherapie verzichten können, da sie auf Grund ihrer Tumorbiologie kein Rezidivrisiko haben und hier die Nebenwirkungen gegenüber dem Nutzen vermutlich überwiegen.

### **5.3 Biomarker auf mRNA Basis- Vergleich von Stadium II und III**

Nachdem das individuelle tumorspezifische Überleben im Stadium III von 89 % bis 39 % schwanken kann, wie laboreigene Vorarbeiten zeigen (Nitsche et al. 2012) ist es nötig, verlässliche Biomarker für eine Evidenz-basierte Therapie zu entwickeln. Jedoch ist aktuell unklar, in welchem Ausmaß sich Kolonkarzinome im Stadium II und III voneinander molekular unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die molekularen Ergebnisse des Stadium III mit denen aus Stadium II, die aus einer Vorstudie stammten, ebenfalls verglichen (Nitsche et al. 2012).

Bei einer Mutation im APC-Gen, die zu den häufigsten und frühesten genetischen Veränderungen im Kolonkarzinom gehört, kann  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut werden und gelangt als Koaktivator für die Transkription von Zielgenen des WNT-Signalwegs in den Zellkern (Segditsas and Tomlinson 2006). Da es technisch verhältnismäßig aufwändig ist, eine Mutation in dem Tumorsuppressor APC nachzuweisen, und es daneben noch weitere unabhängige Möglichkeiten der Deregulierung im WNT-Signalweg gibt, z.B. aktivierende  $\beta$ -Catenin Mutationen, (Segditsas and Tomlinson 2006) eignet sich Osteopontin als Surrogatmarker für eine aktivierende Mutation im WNT Signalweg, da es eines der am stärksten hochregulierten Transkripte in humanen Kolonkarzinomen darstellt, wie Vorbefunde zeigten (Friederichs et al. 2005, Rohde et al. 2007, Zhao et al. 2015).

Der WNT-Surogat Marker Osteopontin war im Stadium III höher exprimiert als im Stadium II. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Literaturdaten unserer Arbeitsgruppe die zeigen, dass die Osteopontin-Expression mit dem Tumorfortschreiten ansteigt

(Rohde et al. 2007). Die Expressionslevel der Normalgewebe aus Stadium II und III befanden sich alle auf einem vergleichbaren Niveau. Nichtsdestotrotz wurden über das Statistikprogramm R mit dem Algorithmus „multiple log-rank statistics“ verschiedene optimale Cut-offs für die R-Censor (Rezidiv-Ereignis) und A-Censor (Überleben) Daten zwischen den Stadien II (relative Expression ; 2,57) und III (relative Expression: 116,39) errechnet. Um besser vergleichbare Daten zu erhalten, müsste bei deutlich mehr Patienten der Osteopontin-Wert ermittelt werden und dann ein einheitlicher Wert festgelegt werden, ab wann eine Osteopontin-Expression als erhöht anzusehen ist. Weiterhin sollten somatische Mutationsanalysen von Axin und  $\beta$ -Catenin mit der daraus resultierenden Änderung der Osteopontin-Expression korreliert werden. Jedoch darf es hierbei auch zu keinen Schwankungen in der Expression der „Housekeeping“-Transkripte kommen, da die Osteopontin-Daten auf diese normalisiert werden. Die Ergebnisse der Überlebenskurven zeigen zwar kein statistisch signifikantes Ergebnis, jedoch ist ein Trend erkennbar, bei dem Patienten mit erhöhtem OPN ein verkürztes Rezidiv-freies Überleben zeigen ( $p=0,134$ ). Hierbei spielt sicherlich die Größe des Kollektivs eine Rolle. Daher sollte zur Validierung der Daten OPN an einem deutlich größeren, unabhängigen Kollektiv getestet werden und gleichzeitig die Daten, welche Chemotherapie die Patienten erhalten, gesammelt werden.

SASH1 war im Stadium III deutlich niedriger exprimiert als im Stadium II. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Literaturdaten die zeigen, dass die SASH1-Expression mit dem Tumorfortschreiten sinkt (Rimkus et al. 2006). Die Expressionslevel der Normalgewebe aus Stadium II und III befanden sich ebenfalls alle auf einem vergleichbaren Niveau. Jedoch wurden über das Statistikprogramm R wiederum verschiedene Cut-offs für die R-Censor und A-Censor Daten zwischen den Stadien II (0,96) und III (0,32) errechnet. Dass die hier berechneten Cut-off Werte sich teils deutlich voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 17) gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, dass die Risikoprädiktion basierend auf mRNA Markern und/oder die Cutt-off Bestimmung mittels automatischer Berechnung durch Statistiksoftware fehleranfällig ist und schon durch kleine Schwankungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Die Patientengruppe mit erhöhter SASH1 Expression zeigte ein signifikant erhöhtes Rezidiv-Risiko in der Kaplan-Meier Analyse, im Gegensatz zu vorhergehenden Studien, welche einen negativen prognostischen Effekt für niedrige SASH1 Expression zeigten (Rimkus et al. 2006) (Nitsche et al. 2011).

Faszinierenderweise veröffentlichte eine kürzlich durchgeführte Brustkrebsstudie eine ähnliche Beobachtung. Obgleich SASH1 allgemein auf alle Tumore gesehen runterreguliert wird und als „Tumorsuppressor“ beschrieben wird, zeigten einige Subgruppen wie Östrogen-Rezeptor positive Tumore ein signifikant reduziertes Überleben für Fälle in denen SASH1 stark exprimiert wurde (Burgess et al. 2016). Demzufolge tragen der molekulare Kontext und das Tumorstadium signifikant zur Tumorbilogie von SASH1 bei, was über die einfache Betrachtung als „einfacher“ Tumorsuppressor hinausgeht (Franke et al. 2019, Jaufmann et al. 2021).

MACC1 wird in der Literatur beschrieben als „Metastasis associated in colon cancer 1“ und wird in Kolonkarzinomen oft hochreguliert (Galimi et al. 2011). In den Daten aus der Vorstudie im Stadium II zeigte sich MACC1 als einzigster prognostischer Faktor für eine Metastasierung (Nitsche et al. 2012). Die biologische Rolle in der Metastasierung, besonders im Sinne der Tumorzell-Streuung durch seine Schlüsselrolle als Transkriptionskofaktor im Prometastasierungs-Signalweg HGF/cMet, ist gut beschrieben (Stein et al. 2010). Interessanterweise war der Metastasierungsmarker MACC1 signifikant herabreguliert im Stadium III im Vergleich zu Stadium II. MACC1 sollte ein Marker für das fortgeschrittene Kolorektalkarzinom sein, insbesondere für Fernmetastasen, daher könnte diese Runterregulierung daran liegen, dass in diesem Kollektiv nur Patienten mit Lymphknotenmetastasen untersucht wurden und nicht mit Fernmetastasen (Shirahata et al. 2010). Nichtsdestotrotz zeigten Patienten mit erhöhter MACC1 Expression ein klar reduziertes Rezidiv-freies Überleben, selbst wenn dieser Effekt keine Signifikanz erreichte ( $p=0,0711$ ). Im Stage II Kollektiv wurden die MACC1 Daten in Berlin (Prof. Stein) erhoben wohingegen die MACC1 Daten in dieser Arbeit am Klinikum Rechts der Isar erhoben wurden mit einer möglicherweise weniger sensitiven Methode. Der Tumorsuppressor SASH1 hat einen negativen Effekt auf die Transkription von MACC1 (Nitsche et al. 2011). Des Weiteren zeigten MACC1 und SASH1 eine inverse Korrelation ihrer Expressionshöhen im Patientenkollektiv. Mikroarrayergebnisse, die aus Vorarbeiten unseres Labors stammen, zeigen ähnliche Ergebnisse in SW 480 Zellen (Martini et al. 2011).

## **5.4 Biomarker auf somatischer DNA- Basis**

Die Onkogene KRAS und BRAF sind Teile des MAP-Kinase Signalkaskadewegs und werden fast immer durch somatische Punktmutationen auf einem Allel aktiviert. In klinischer Hinsicht stellt der Mutationsstatus des Onkogens KRAS den einzigen

tatsächlich aktuell genutzten prädiktiven molekularen Faktor im Kolonkarzinom dar (Di Nicolantonio et al. 2008, Bardelli and Siena 2010). Die prognostische Bedeutung von KRAS wurde lediglich auf das Ansprechen auf die Behandlung mit EGFR-hemmenden Antikörpern bezogen (Walther et al. 2009). Die Effektivität des EGFR Inhibitors Cetuximab ist signifikant mit dem KRAS Mutationsstatus assoziiert. In Patienten mit KRAS Wildtyp Tumoren führte die Behandlung mit Cetuximab im Vergleich zur „unterstützenden Behandlung“ allein zu einem signifikant verbesserten allgemeinen Überleben (Karapetis et al. 2008). Patienten die eine KRAS Mutation aufwiesen zeigten kein Ansprechen auf Cetuximab. Daher ist der KRAS Status von größter klinischer Relevanz und muss mittlerweile vor jeder Anti-EGFR Antikörpertherapie festgestellt werden, um Patienten, die mutiertes KRAS aufweisen, eine unnötige Therapie mit ihren Nebenwirkungen zu ersparen. Auf Basis von HRMA Analysen („High-resolution melting analysis“) wurde der somatische Mutationsstatus der Gene KRAS Exon2 und BRAF Exon 15 im Patientenkollektiv untersucht. Des Weiteren wurden Rückschlüsse bezüglich des Rezidivrisikos, sowie des Gesamtüberlebens der Patienten gezogen, indem die erhobenen Daten in univariaten und multivariaten Analysen mit klinischen Parametern korreliert wurden. Klinisch erfolgt der Nachweis vor einer Cetuximab-Therapie mittels direkter Sequenzierung, was zwar sensitiver, jedoch auch zeitaufwändiger und teurer ist.

In der Analyse konnten bei 83 Fällen insgesamt 30 KRAS und 8 BRAF Mutationen detektiert werden, wobei sich die Mutationen gegenseitig ausschlossen. Dies entspricht mit einem Prozentsatz von 37,0 % im Falle von KRAS und 10 % bei BRAF den Literaturwerten, welche eine Mutationsrate von 30-50 % für KRAS (Kahlenberg et al. 2003) und eine Mutationswahrscheinlichkeit von 5-15 % für BRAF (Di Nicolantonio et al. 2008, Lievre et al. 2010) allgemein im Kolonkarzinom beschreibt. Zudem stimmen unsere Daten bezüglich KRAS, BRAF gut mit anderen Berichten überein und zeigen die Vergleichbarkeit des Kollektivs mit der allgemeinen Patientenpopulation (Nitsche et al. 2012) (Guinney et al. 2015). Die multivariate Analyse des KRAS-Status ergab für das Rezidiv-Risiko im Stadium III eine hohe Prognostische Relevanz. Der Einfluss von KRAS auf das Überleben zeigte sich im Vergleich zum Stadium II signifikant ( $p=0,005$ ). Die bereits erwähnte laboreigene Studie zeigte dagegen keinen prognostischen Effekt für KRAS im Stadium II (Nitsche et al. 2012). Ein möglicher Grund hierfür wäre auf der einen Seite die relativ kleine Fallzahl im untersuchten Kollektiv, auf der anderen Seite ist es möglich, dass die Mutationen in bereits lokal fortgeschrittenen Karzinomen einen

Selektionsvorteil haben. Dafür würde sprechen, dass der Anteil an Mutationen im Stadium III gegenüber Stadium II erhöht war (36 % vs. 30 %), jedoch wird in der Adenom-Karzinom Sequenz von Vogelstein ein früher Zeitpunkt der KRAS Punktmutation beschrieben. Der KRAS-Status könnte in Zukunft bei der Prognosestellung im Stadium UICC III eine wichtigere Rolle spielen und ggf. die TNM Klassifikation ergänzen und damit ergäbe sich die Möglichkeit die Patienten individueller behandeln zu können (Gangadhar and Schilsky 2010). In Korrelationsanalysen zeigte sich eine negative Korrelation von Mutationen in KRAS mit Mutationen in BRAF, was bedeutet, dass die Mutationen exklusiv sind. Auch dies entspricht den bisherigen Forschungsergebnissen (Cisowski et al. 2016).

Das Vorhandensein einer BRAF-Mutation in Stadium IV Kolorektal-Tumoren ist mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (Deschoolmeester et al. 2010). Andere retrospektive Studien haben ebenfalls eine Assoziation zwischen einer BRAF-Mutation und schlechterer Prognose in allen Stadien (I-IV) gezeigt (Tejpar et al. 2010). Eine BRAF Mutation wurde in der vorliegenden Arbeit im Stadium III in 8 Patienten detektiert, was 10 % entspricht. Im Tumorstadium II wurde in Vorstudien eine Mutationsrate von 15 % festgestellt. Jedoch konnte in den Analysen keine prognostische Bedeutung bezüglich des Rezidivrisikos ( $p=0,541$ ) zugewiesen werden. Das tumorspezifische Überleben war in unserem Kollektiv für Patienten mit mutiertem oder Wildtyp-Allel von BRAF annähernd gleich. Dieses Ergebnis entspricht gut der vorhergehenden Analyse für Patienten des Stadiums II (Nitsche et al. 2012). BRAF scheint somit weder in lokal begrenzten, noch in nodal-fortgeschrittenen Kolonkarzinomen eine Rolle als eigenständiger Prognosefaktor zu spielen. Während BRAF bei Karzinomen des Stadiums II sowohl mit dem Geschlecht, als auch mit dem Alter korreliert, konnte in unserem Kollektiv lediglich ein Zusammenhang mit weiblichen Patienten hergestellt werden (Nitsche et al. 2012), was unter anderem an der relativ geringen Fallzahl liegen könnte. Die Literatur beschreibt eine starke positive Korrelation des mutierten BRAF-Status mit Mikrosatelliten instabilen Tumoren, in welchen das MMR System inaktiviert ist (Ogino et al. 2009). Dies konnte in unserem Kollektiv des Stadium III ebenfalls nachgewiesen werden. Andererseits sollen BRAF-Mutationen die generell verbesserte Prognose bei Mikrosatelliten instabilen Tumoren aufheben können (Ogino et al. 2009). Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass eine BRAF-Mutation mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben in MSS-Tumoren verbunden ist, während die Mutation in Mikrosatelliten instabilen Tumoren



keinen prognostischen Effekt hat (Samowitz et al. 2005). Daher scheint nicht der BRAF-Status selbst eine prognoseentscheidende Rolle zu spielen, sondern die molekulare Gesamtsituation, in der die Mutation auftritt (Deschoolmeester et al. 2010). BRAF sollte somit als prognostischer Marker nicht alleine, sondern im Kontext mit anderen Markern, wie dem Mikrosatelliten-Status, betrachtet werden.

Zahlreiche molekulare Marker wurden im Hinblick auf ihre prognostische bzw. prädiktive Relevanz beim Kolonkarzinom bislang untersucht. Zwei von ihnen repräsentieren genetische Instabilität, die sich entweder als chromosomale Instabilität (CIN), oder als die oben bereits angesprochene Mikrosatelliteninstabilität (MSI) äußert. Eine Vielzahl der sporadischen Fälle (85 %) des Kolonkarzinoms weist chromosomale Instabilität auf, die sich als strukturelle und numerische Aberrationen auf Ebene der Chromosomen äußert. Im Vergleich zu chromosomal instabilen Tumoren, scheinen Patienten mit MSI, die ein annähernd diploides Tumor-Genom aufweisen, eine bessere Prognose im Hinblick auf den Verlauf und die Gesamtüberlebenszeit zu haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Mikrosatellitenstatus eine prädiktive Aussage hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, - einem etablierten Chemotherapeutikum für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms, erlaubt (Arnold and Blum 2005). Bei Patienten mit MSI-Tumoren konnte eine längere Überlebensdauer gezeigt werden und bei einer 5-FU Chemotherapie ein ungünstiger Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden (Ribic et al. 2003). Etwa 12-17 % aller sporadischen Kolorektaltumore, die die überwiegende Mehrzahl aller Krankheitsfälle ausmachen, weisen MSI auf (Boland and Goel 2010). Veränderungen in den MMR-Genen wurden bisher häufig in Kombination mit dem Mutationsstatus von BRAF als prädiktiver Parameter für die klinische Therapieentscheidung untersucht. Dabei konnte ein signifikant besseres Überleben bei Patienten mit Mikrosatelliten instabilen Tumoren detektiert werden (Boland and Goel 2010). Es können so Patienten identifiziert werden, bei denen im Stadium III vermutlich eine operative R0 Resektion ausreicht und eine Chemotherapie mutmaßlich nicht notwendig ist. Jedoch zeigt sich, dass das es sich hierbei nur einen geringen Anteil an Patienten handelt, die MSI in sporadischen Kolonkarzinomen aufweisen (Graziano and Cascinu 2003). In dem hier untersuchten Kollektiv wurden 11 von 83 Patienten als Mikrosatelliten instabil eingestuft (14 %), wobei der MSI-Status mittels eines diagnostischen Standardverfahrens (Multiplex-PCR für 5 definierte Mikrosatelliten Marker) durch das Institut für Pathologie der TUM ermittelt wurde.

Mittels Log-Rank Test wurde kein signifikanter prognostischer Effekt auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben ( $p=0,4232$ ) ermittelt. Übereinstimmend mit anderen Veröffentlichungen (Popat et al. 2005) kam es im Stadium III verglichen mit Stadium II seltener zur Mikrosatelliten Instabilität. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich Mikrosatelliteninstabile Tumore seltener bis ins Stadium III weiterentwickeln bis zur Diagnosestellung. Wie auch in der Literatur beschrieben, zeigte sich eine erhöhte Mikrosatelliten-Instabilität mit dem BRAF-Status ( $p=0,001$ ) sowie ein gehäuftes Vorkommen im rechten Kolonrahmen ( $p=0,002$ ) und im weiblichen Geschlecht ( $p=0,042$ ). In Stadium II konnte zudem eine Korrelation mit dem Histologischen Grading beobachtet werden (Nitsche et al. 2012). Daher ist es möglich, dass der Mikrosatelliten-Status zwar in lokal begrenzten Tumoren eine große Aussagekraft hat, jedoch in lokal fortgeschrittenen Karzinomen keinen prognostischen Stellenwert darstellt.

## **5.5 Risikobeurteilung mit der Cox- Regressionsanalyse im Stadium III**

Die Multivariable Analyse wurde mit Hilfe der Cox Regressionsanalyse berechnet und identifizierte KRAS als einzigen unabhängigen prognostischen Faktor bezüglich des metachronen Metastasen-freien Überleben in Stadium III beim Kolonkarzinom, bei Einbeziehung aller molekularen, histopathologischen und klinischen Faktoren. Die schrittweise Einbeziehung sämtlicher klinischer und histopathologischer Faktoren führte dazu, dass KRAS seine Signifikanz als prognostischer Faktor verlor, vermutlich auf Grund der Tatsache, dass es bei Einschluss von vielen zu testenden Faktoren in der multivariaten Analyse auch genug statistische Ereignisse geben muss. Dabei konnte der molekulare Faktor OPN die größte Signifikanz erreichen ( $p=0,054$ ). Zudem stellten sich die klinischen Faktoren Tumorstadium (T2) ( $p=0,057$ ) und der Lymphnotenstatus (N2) ( $p=0,001$ ) als beste Prognosefaktoren dar. Als Anhaltspunkt werden für ein Multivariables Modell etwa 10 „Ereignisse“ (Patient mit Rezidiv) pro eingeschlossenem Faktor benötigt, damit eine Aussagekraft gewährleistet ist. Bei 37 Rezidiven sollten somit nicht mehr als vier Faktoren eingeschlossen werden, um die statistische Aussagekraft zu erhalten. Daher ist davon auszugehen, dass das multivariate Modell mit Einbeziehung der klinischen und molekularen Daten eine ungenauere Aussagekraft trifft. Jedoch ist interessant, dass sich die diesem Modell der Lymphknotenstatus und Osteopontin als signifikant oder knapp nicht signifikant

hervortun. Daher kann man hier argumentieren, dass Lymphknotenstatus und OPN im Stadium III als Prognosefaktor Beachtung finden sollten. Es ist jedoch notwendig die Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv zu überprüfen.

## **5.6 Risikovorhersage im Stadium III („2-Step-Cluster“-Verfahren)**

Die Charakterisierung von Patienten anhand ihres somatischen genetischen und epigenetischen tumorspezifischen Unterschied mit Hilfe der bereits etablierten klinischen Faktoren kann prognostische Modelle verbessern und hin zu einer individuellen Therapie führen. Die „Two-step Cluster“ Analyse erlaubt die Einbeziehung von sowohl kategorialen (z.B. „mutiert“, „wildtyp“) als auch von kontinuierlichen Daten (etwa aus Expressionanalysen). Der Algorithmus gibt automatisch die optimale Anzahl an Cluster aus. In dieser Arbeit wird eine robuste und fortschrittliche Methode zur Stratifizierung von Kolonkarzinompatienten im Stadium III beschrieben, die mit Hilfe von molekulargenetischen Daten in drei verschiedene Risikogruppen eingeteilt wurden und eine signifikant unterschiedliche Prognose aufweisen. Die Methode zur Stratifizierung wurde von der bereits vorher im Zusammenhang meiner Masterarbeit (Balmert 2011) durchgeführten Studie, bei der Patienten im Stadium II in Risikogruppen eingeteilt wurden, übernommen (Nitsche et al. 2011). In Übereinstimmung zum Clusteralgorithmus für Stadium II Patienten, basierte die Stratifizierung des Rezidivrisikos im Stadium III auf einer integrativen und zudem praktikablen Markerzusammensetzung, bei der somatische Mutationen wie im onkogenen KRAS und BRAF, sowie der MSI Status eine höhere prognostische Relevanz aufzeigten als die Expressionsunterschiede des WNT-Signalwegmarker Osteopontin und der möglichen metastasen-assoziierten Biomarker SASH1 und MACC1. Andererseits zeigten sich auch einige Unterschiede zum Stadium II. Für das Kollektiv im Stadium III definierte der Algorithmus drei Cluster wohingegen im Stadium II der Algorithmus 4 Cluster vorgab (Nitsche et al. 2012). Cluster 1 besteht aus KRAS mutiert, BRAF mutiert, MSI, hoher OPN Expression und hoher SASH Expression. Das Rezidivrisiko liegt bei 31 %. Hier könnte erwogen werden, dass den Patienten dieser Gruppe die Nebenwirkungen einer Chemotherapie erspart bleiben, jedoch muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass das Rezidivrisiko klinisch noch signifikant erhöht ist (Pahlman et al. 2016). Cluster 2 Patienten haben weder eine KRAS noch eine BRAF Mutation und sind MSS jeweils mit niedrigen Expressionswerten von OPN, MACC1

und SASH1. In diesem Cluster wurden durch den Algorithmus die meisten Patienten eingeordnet (n=39, 49 %). Die Hochrisikogruppe (n=28, 35 %) in dieser Arbeit waren Patienten, die in Cluster 3 eingeordnet wurden. Dieses definierte sich mit KRAS mut, MSS, BRAF wt, sowie eine mittlere Expression von OPN und MACC1. Das Rezidivrisiko betrug 57 %. Im klinischen Alltag würde das bedeuten, dass Patienten die in diesem Cluster eingeteilt werden, mögliche Kandidaten für eine aggressivere multimodale Therapie darstellen (wenn auch das Therapieansprechen je nach Cluster noch zu evaluieren wäre). Jedoch muss ein möglicher Vorteil durch eine intensiviertere Therapie für Hochrisiko-Patienten oder ein Verzicht auf eine Chemotherapie bei Niedrig-Risiko Patienten in unabhängigen prospektiven Studien gezeigt werden.

## **5.7 Osteopontin als Prädiktor auf Therapieansprechen**

Im Stadium III wird den Patienten aktuell eine adjuvante Chemotherapie nach Tumorresektion empfohlen, wobei diese in Abhängigkeit vom Alter und Komorbiditäten des Patienten 5-FU basiert als Monotherapie oder als Kombinationstherapie (FOLFOX) erfolgen sollte. Es ist jedoch bekannt, dass nicht alle Patienten von einer Chemotherapie profitieren, da es einerseits trotz adjuvanter Chemotherapie zu einem Rezidiv kommt, andererseits die Patienten die adjuvante Therapie auf Grund ihrer Toxizität und/ oder mangelndem Ansprechen abbrechen müssen. Daher wäre es für die weitere Therapie in diesem Stadium wichtig, eine Prädiktion auf das Therapieansprechen geben zu können, um Patienten, die vermutlich nicht auf diese Therapie ansprechen, die Toxizität einer Chemotherapie zu ersparen oder um auf ein anderes Regime zu wechseln. Daher wurde in dieser Arbeit die prädiktive Kapazität von molekularen Biomarkern in Bezug auf das Ansprechen auf Chemotherapie untersucht. Die Gruppe von Patienten, die eine 5-FU Monotherapie erhalten haben, hatten eine signifikant bessere Prognose wenn diese niedrige Osteopontin Expressionswerte aufwiesen, hinweisend für eine reduzierte kanonische WNT-Aktivierung ihrer Tumore. Tatsächlich können kolorektale Tumorzellen den WNT-Signalweg hochregulieren als Ausweich- oder Resistenzmechanismus nach einer 5-FU Behandlung (Deng et al. 2010, Grasso et al. 2018) . Zudem zeigte sich, dass kolorektale Karzinome MSS und MSI-High eine niedrigere T-Zell Infiltration aufweisen, wenn es zu einer Hochregulierung des WNT Signalwegs kommt (Breakstone 2021). Tumore, die nicht auf diese Weise auf 5-FU reagieren können, also nicht in der Lage sind, den WNT Signalweg zu aktivieren, könnten also sensitiver sein. Dies wiederum

würde zu einem besseren Überleben führen, da die Tumorzellen zugrunde gehen, das Tumolvolumen also deutlich reduziert wird. Demnach erleichtert dies nicht nur die Abschätzung der Prognose, sondern erlaubt sogar die Prädiktion des Ansprechens auf eine adjuvante 5-FU basierte Chemotherapie. Allerdings sollten die Ergebnisse dieser Arbeit an einem weitaus größeren Kollektiv überprüft werden da insgesamt nur 20 Patienten in diese Untersuchung eingeschlossen werden konnten, da entweder keine Daten über die erhaltene Chemotherapie vorhanden waren oder die Patienten eine nicht 5-FU basierte Therapie erhielten. Osteopontin wurde bereits vorher in laboreigenen Arbeiten als negativer prognostischer Marker identifiziert und als Marker für die kanonische WNT Aktivierung (Rohde et al. 2007, Buchert et al. 2015). Die Hochrisiko Gruppe (Cluster 1) (unsupervisiert 3 Cluster) erfasst die Patienten mit hoher Osteopontin Expression. Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend müssten Patienten im Cluster 3 mit einem alternativen Schema behandelt werden, da sie auf Grund der erhöhten Osteopontin Expression vermutlich kein gutes Therapieansprechen auf eine 5-FU Therapie zeigen würden, man Ihnen diesen Ergebnissen folgend sogar postulieren muss , dass man Ihnen eher geschadet hat. Dies gilt ebenso für das Cluster 1 in dem die Patienten mit der höchsten Osteopontin Expression geführt werden. Biomarkeranalysen haben die Möglichkeit die Therapie zu individualisieren, besonders nachdem neueste Daten Hinweise dafür geben, dass MSI-high Patienten im Stadium III von einer Oxaliplatin Therapie profitieren im Gegensatz zu einer 5-FU Therapie (Tougeron et al. 2016). Allerdings sind hierzu noch prospektive Studien nötig um zu etablieren, ob Patienten in einer Hochrisikogruppe von einer intensivierten Chemotherapie profitieren.

## **5.8 Signalwege des Kolonkarzinoms**

Die Anwendung der Two-step Cluster Analyse auf Stadium III Kolonkarzinom Patienten von zwei Kliniken kann als Validierung bzw. Erweiterung der zuvor erhobenen Daten im Stadium II verstanden werden mit teilweiser Überlappung der verschiedenen Cluster mit Hilfe einer molekularen Tumorklassifikation (Nitsche et al. 2012). Die hier identifizierten „Cluster“ spiegeln die veröffentlichte Konsensus-Klassifizierung eines internationalen Konsortiums in groben Zügen wider (Guinney et al. 2015). Cluster 1 repräsentiert den molekularen Subtyp (CMS1, „MSI immune“) mit MSI-high und BRAF mutiert mit einer Prävalenz von 14 % bis 16 % und und einer 2-Jahres Überlebensrate von 30 % sowie schlechtem Ansprechen auf eine 5-FU

Therapie (Osteopontin high). Cluster 2 hingegen repräsentiert den kanonischen CMS2 mit der größten Untergruppe (49 % der Patienten) und einer 2-Jahres Überlebensrate von 61 %, welcher charakterisiert ist durch somatische chromosomale Instabilität, entsprechend ohne KRAS, BRAF Mutation oder Mikrosatelliten Instabilität. 37 % bis 49 % aller Patienten sind dieser Gruppe zugeordnet. Cluster 3 beinhaltet zwei der Subtypen des molekularen Konsensus, auf der einen Seite die „metabolische“ Gruppe CMS3, charakterisiert durch eine KRAS-Mutation oder BRAF-Mutation und dereguliertem zellulärem Metabolismus und auf der anderen Seite den mesenchymalen CMS4 Typ, charakterisiert durch starke stromale Infiltration und Angiogenese und durch schlechtes Rezidiv-freies Überleben. Dieser Gruppe sind 34 % bis 36 % der Patienten zugeordnet, allerdings differenziert die Two-step Cluster Analyse in diesem Fall vermutlich nicht weiter in die Subtypen CMS3 und CMS4 auf Grund zu geringer Patientenzahlen.

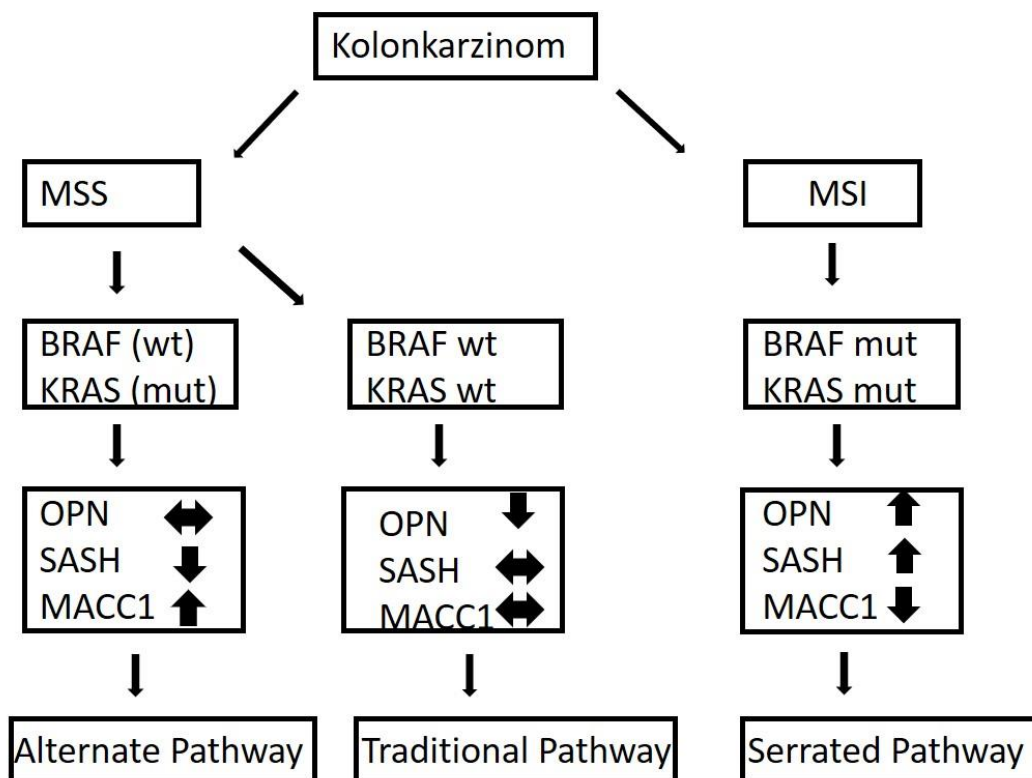


Abbildung 24: Die 2-Step Cluster Analyse ergab 3 Gruppen, die dem Modell der Karzinogenese im Kolonkarzinom zugeordnet werden können.

## 6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Beurteilung aller Kolonkarzinom Patienten mit Hilfe von somatischen Mutationen in KRAS, BRAF, dem MSI- Status, sowie den Expressionsdaten von Osteopontin, SASH1 und MACC1 eine technisch robuste, fortschrittliche und schnelle Methode ist und eine mögliche Prädiktion auf Therapieansprechen sowie eine Prognose bezüglich des Rezidivrisikos erlaubt, was tatsächlich den aktuellen kliniko-pathologischen Parametern weitestgehend entgeht. Daher sollte eine integrative Biomarker Analyse in Zukunft erwogen werden, um einerseits die personalisierte Therapie zu erleichtern und andererseits die Tumor-Rezidivrate und unerwünschte Nebenwirkungen einer Chemotherapie zu senken. Die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms sollte die komplette mesokolische Exzision beinhalten mit Ziel der R0 Resektion (Pox and Schmiegel 2019). Additiv zur Chemotherapie können monoklonale Antikörper gegen VEGF oder EGFR mit den etablierten Chemotherapeutika kombiniert werden. Die Anti-EGFR Therapie kann jedoch nur angewendet werden bei Vorliegen von KRAS-wildtyp, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit zytotoxischen Substanzen (Marmol et al. 2017). Die neueste Therapieform sind die „Immun Checkpoint Inhibitoren“. Die Therapeutika mit der größten klinischen Relevanz sind die Inhibitoren von PD-1 (Programmed-cell-death) und das CTLA-4 (zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen) (Ahmed 2020). Nivolumab wurde zugelassen speziell für kolorektale Karzinome mit unstabilen Mikrosatelliten (MSI-H) oder mit fehlerhaftem Mismatch-Reparatursystem (dMMR) kolorektale Karzinome die bereits eine Fluoropyrimidin-Behandlung erhalten haben (Breakstone 2021).

## 7 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit molekulargenetischen Signalwegen, die beim kolorektalen Karzinom möglicherweise relevant für das Entstehen von Fernmetastasen sind. Auf Grund eines erhöhten Rezidivrisikos wird für Patienten im UICC Stadium III nach einer den Tumor entfernenden Operation eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Der individuelle Nutzen einer zytotoxischen Therapie ist jedoch von Tumor-assoziierten Faktoren abhängig, die bislang noch Gegenstand der Forschung sind. So entwickeln etwa 20 % der Patienten im Stadium III trotz Chemotherapie ein Rezidiv. Ziel dieser Arbeit war, durch die Etablierung und Überprüfung molekularer Marker neue Strategien aufzuzeigen, um Patienten mit Kolonkarzinom des Stadiums UICC III künftig eine optimale Therapie zu ermöglichen. Es wurde hier in Form einer retrospektiven Analyse an einem spezifischen Patientenkollektiv (UICC III, n=84) der Mutationsstatus der Onkogene KRAS und BRAF, des Weiteren die relativen Expressionswerte der Gene OPN, MACC1 und SASH1, sowie die Instabilität von DNA-Mikrosatelliten erhoben. Hohe Expressionswerte des WNT Surrogatmarkers OPN und des „Metastasierungsgens“ MACC1, aber auch überraschenderweise auch hohe Expressionswerte des Tumorsuppressorgens SASH1 zeigten sich als prognostisch ungünstig. KRAS war im UICC Stadium III der einzige unabhängige Prognosefaktor für die postoperative Entwicklung von Fernmetastasen ( $p=0,005$ ). Im Rahmen einer integrativen Markeranalyse gelang es, individuelle Kolonkarzinome in postulierte molekular definierte Gruppen einzuordnen, welche weitgehend auch den in der Literatur beschriebenen Signalwegen und molekularen Konsensus-Subtypen entsprechen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die molekulargenetisch basierte Stratifizierung mit unterschiedlichen Risikoprofilen verbunden war. Die identifizierten Cluster spiegeln die veröffentlichte internationale Konsensus-Klassifikation in groben Zügen wider. Die retrospektiv analysierte Gruppe von Patienten, die eine 5-FU-Monotherapie erhalten haben, hatte eine signifikant bessere Prognose, wenn ihre Tumorgewebe niedrige Osteopontin Expressionswerte aufwiesen. Eine integrative Biomarker Analyse kann möglicherweise in Zukunft die personalisierte Therapie erleichtern und nicht nur die Tumor-Rezidivrate senken, sondern unerwünschte Nebenwirkungen einer Chemotherapie senken, indem diese nur bei definierten Gruppen von Patienten eingesetzt wird.



## 8 Summary

This thesis focuses on molecular genetic pathways that are putatively relevant for the development of distant metastases in locally advanced colorectal cancer. Due to an inherently increased recurrence risk, adjuvant chemotherapy is recommended for patients in UICC stage III after a tumor removal surgery. However, the individual benefits of cytotoxic therapy depend on tumor-associated factors that are still the subject of research. Moreover, about 20% of stage III patients develop recurrence despite chemotherapy. The aim of this work was to identify new strategies by establishing and reviewing molecular markers in order to enable patients with UICC III stage colon cancer to receive optimal therapy in the future. The mutation status of the oncogenes KRAS and BRAF, the relative expression values of the genes OPN, MACC1 and SASH1, as well as the instability of DNA- microsatellites, was collected here in the form of a retrospective analysis on a specific patient collective (UICC III, n=84). High expression values of WNT surrogate marker OPN and the „distant metastasis gene“ MACC1, but surprisingly also increased expression of the tumor suppressor gene SASH1 were found to be prognostically unfavorable. In UICC Stage III, KRAS was the only independent predictive factor for the postoperative development of distant metastases ( $p=0.005$ ). Within the scope of an integrative marker analysis, it was possible to classify individual colon cancers into postulated molecularly defined groups, which largely also correspond to the signalling pathways described in the literature. It was demonstrated that molecular genetic stratification was associated with different risk profiles. The identified clusters largely reflect the recently published International Consortium Consensus Classification. The retrospective group of patients who received 5-FU monotherapy had a significantly better prognosis if their tumor tissues had low osteopontin expression levels. Integrative biomarker analysis may facilitate personalized therapy in the future and holds the promise to not only reduce tumor recurrence rates, but also to minimize possible side effects of chemotherapy by restricting the use of multimodal therapies to subgroups of patients.

## 9 Publikationsnachweise

- **Genetic and immunological biomarkers predict metastatic disease recurrence in stage III colon cancer**

Sperlich A, [Balmert A](#), Doll D, Bauer S, Franke F, Keller G, Wilhelm D, Mur A, Respondek M, Friess H, Nitsche U, Janssen KP.

BMC Cancer. 2018 Oct 19;18(1):998. doi: 10.1186/s12885-018-4940-2. PMID: 30340556; PMCID: PMC6194664.

- **Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer**

Nitsche U, Rosenberg R, [Balmert A](#), Schuster T, Slotta-Huspenina J, Herrmann P, Bader FG, Friess H, Schlag PM, Stein U, Janssen KP

Accepted for publication in the Annals of Surgery (November Issue 2012), subsequent to presentation at the 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Surgical Association (ESA) on May 5<sup>th</sup> 2012 in Hamburg.

- **Should every patient with pancreatic cancer receive perioperative/neoadjuvant therapy?**

Nitsche U, Kong B, [Balmert A](#), Friess H, Kleeff J

Indian J Med Paediatr Oncol. 2016 Oct-Dec;37(4):211-213. doi: 10.4103/0971-5851.195731. PMID: 28144084; PMCID: PMC5234154.

## 10 Literaturverzeichnis

- Ades, S. (2009). "Adjuvant chemotherapy for colon cancer in the elderly: moving from evidence to practice." Oncology (Williston Park) **23**(2): 162-167.
- Ahmed, M. (2020). "Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019." Gastroenterology Res **13**(1): 1-10.
- Al-Sohaily, S., A. Biankin, R. Leong, M. Kohonen-Corish and J. Warusavitarne (2012). "Molecular pathways in colorectal cancer." J Gastroenterol Hepatol **27**(9): 1423-1431.
- André, T., C. Boni, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, A. Bonetti, P. Clingan, J. Bridgewater, F. Rivera and A. de Gramont (2009). "Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial." J Clin Oncol **27**(19): 3109-3116
- Andreyev, H. J., A. R. Norman, D. Cunningham, J. Oates, B. R. Dix, B. J. Iacopetta, J. Young, T. Walsh, R. Ward, N. Hawkins, M. Beranek, P. Jandik, R. Benamouzig, E. Jullian, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, O. Muller, I. Hoffmann, H. M. Rabes, C. Zietz, C. Troungos, C. Valavanis, S. T. Yuen, J. W. Ho, C. T. Croke, D. P. O'Donoghue, W. Giaretti, A. Rapallo, A. Russo, V. Bazan, M. Tanaka, K. Omura, T. Azuma, T. Ohkusa, T. Fujimori, Y. Ono, M. Pauly, C. Faber, R. Glaesener, A. F. de Goeij, J. W. Arends, S. N. Andersen, T. Lovig, J. Breivik, G. Gaudernack, O. P. Clausen, P. D. De Angelis, G. I. Meling, T. O. Rognum, R. Smith, H. S. Goh, A. Font, R. Rosell, X. F. Sun, H. Zhang, J. Benhattar, L. Losi, J. Q. Lee, S. T. Wang, P. A. Clarke, S. Bell, P. Quirke, V. J. Bubb, J. Piris, N. R. Cruickshank, D. Morton, J. C. Fox, F. Al-Mulla, N. Lees, C. N. Hall, D. Snary, K. Wilkinson, D. Dillon, J. Costa, V. E. Pricolo, S. D. Finkelstein, J. S. Thebo, A. J. Senagore, S. A. Halter, S. Wadler, S. Malik, K. Krtolica and N. Urosevic (2001). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." Br J Cancer **85**(5): 692-696.
- Aparicio, T., O. Schischmanoff, C. Poupardin, F. Mary, N. Soufir, C. Barrat, G. Bellaiche, M. Boubaya, L. Choudat, J. Cucherousset, G. DesGuetz, P. Wind and R. Benamouzig (2014). "High prevalence of deficient mismatch repair phenotype and the V600E BRAF mutation in elderly patients with colorectal cancer." J Geriatr Oncol **5**(4): 384-388.
- Arlt, F. and U. Stein (2009). "Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers." Int J Biochem Cell Biol **41**(12): 2356-2359.
- Arnold, C. N. and H. E. Blum (2005). "[Colon cancer: molecular pathogenesis and clinical relevance]." Dtsch Med Wochenschr **130**(13): 809-811.
- Balmert, A. (2011). "Molekulargenetische Faktoren zur Prognose und Prädiktion des Krankheitsverlaufes beim Kolorektalkarzinom " Master's Thesis, Technische Universität München.

- Bardelli, A. and S. Siena (2010). "Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer." J Clin Oncol **28**(7): 1254-1261.
- Beer, S., A. B. Simins, A. Schuster and B. Holzmann (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells." Biochim Biophys Acta **1520**(1): 89-93.
- Behrens, J. (2005). "The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 672-675.
- Benson, A. B., 3rd, D. Schrag, M. R. Somerfield, A. M. Cohen, A. T. Figueredo, P. J. Flynn, M. K. Krzyzanowska, J. Maroun, P. McAllister, E. Van Cutsem, M. Brouwers, M. Charette and D. G. Haller (2004). "American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer." J Clin Oncol **22**(16): 3408-3419.
- Boardman, L. A. (2009). "Overexpression of MACC1 leads to downstream activation of HGF/MET and potentiates metastasis and recurrence of colorectal cancer." Genome Med **1**(4): 36.
- Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Gastroenterology **138**(6): 2073-2087 e2073.
- Boland, P. M., M. B. Yurgelun and C. R. Boland (2018). "Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes." CA Cancer J Clin **68**(3): 217-231.
- Boutin, A. T., W. T. Liao, M. Wang, S. S. Hwang, T. V. Karpinets, H. Cheung, G. C. Chu, S. Jiang, J. Hu, K. Chang, E. Vilar, X. Song, J. Zhang, S. Kopetz, A. Futreal, Y. A. Wang, L. N. Kwong and R. A. DePinho (2017). "Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer." Genes Dev **31**(4): 370-382.
- Breakstone, R. (2021). "Colon cancer and immunotherapy-can we go beyond microsatellite instability?" Transl Gastroenterol Hepatol **6**: 12.
- Brenner, H., M. Kloor and C. P. Pox (2014). "Colorectal cancer." Lancet **383**(9927): 1490-1502.
- Buchert, M., F. Rohde, M. Eissmann, N. Tebbutt, B. Williams, C. W. Tan, A. Owen, Y. Hirokawa, A. Gnann, G. Orend, G. Orner, R. H. Dashwood, J. K. Heath, M. Ernst and K. P. Janssen (2015). "A hypermorphic epithelial beta-catenin mutation facilitates intestinal tumorigenesis in mice in response to compounding WNT-pathway mutations." Dis Model Mech **8**(11): 1361-1373.
- Burgess, J. T., E. Bolderson, J. M. Saunus, S. D. Zhang, L. E. Reid, A. M. McNicol, S. R. Lakhani, K. Cuff, K. Richard, D. J. Richard and K. J. O'Byrne (2016). "SASH1 mediates sensitivity of breast cancer cells to chloropyramine and is associated with prognosis in breast cancer." Oncotarget **7**(45): 72807-72818.

- Caputo, F., C. Santini, C. Bardasi, K. Cerma, A. Casadei-Gardini, A. Spallanzani, K. Andrikou, S. Cascinu and F. Gelsomino (2019). "BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights." Int J Mol Sci **20**(21).
- Carethers, J. M., D. P. Chauhan, D. Fink, S. Nebel, R. S. Bresalier, S. B. Howell and C. R. Boland (1999). "Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil." Gastroenterology **117**(1): 123-131.
- Cisowski, J., V. I. Sayin, M. Liu, C. Karlsson and M. O. Bergo (2016). "Oncogene-induced senescence underlies the mutual exclusive nature of oncogenic KRAS and BRAF." Oncogene **35**(10): 1328-1333.
- Cunningham, D., W. Atkin, H. J. Lenz, H. T. Lynch, B. Minsky, B. Nordlinger and N. Starling (2010). "Colorectal cancer." Lancet **375**(9719): 1030-1047.
- de Gramont, A., C. Tournigand, T. Andre, A. K. Larsen and C. Louvet (2007). "Adjuvant therapy for stage II and III colorectal cancer." Semin Oncol **34**(2 Suppl 1): S37-40.
- De Palma, F. D. E., V. D'Argenio, J. Pol, G. Kroemer, M. C. Maiuri and F. Salvatore (2019). "The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer." Cancers (Basel) **11**(7).
- Deng, Y. H., X. X. Pu, M. J. Huang, J. Xiao, J. M. Zhou, T. Y. Lin and E. H. Lin (2010). "5-Fluorouracil upregulates the activity of Wnt signaling pathway in CD133-positive colon cancer stem-like cells." Chin J Cancer **29**(9): 810-815.
- des Guetz, G., P. Mariani, J. Cucherousset, M. Benamoun, C. Lagorce, X. Sastre, P. Le Toumelin, B. Uzzan, G. Y. Perret, J. F. Morere, J. L. Breau, R. Fagard and P. O. Schischmanoff (2007). "Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer." Anticancer Res **27**(4C): 2715-2719.
- Deschoolmeester, V., M. Baay, P. Specenier, F. Lardon and J. B. Vermorken (2010). "A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy." Oncologist **15**(7): 699-731.
- Deschoolmeester, V., C. Boeckx, M. Baay, J. Weyler, W. Wuyts, E. Van Marck, M. Peeters, F. Lardon and J. B. Vermorken (2010). "KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis." Br J Cancer **103**(10): 1627-1636.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath and W. Kolch (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." Oncogene **26**(22): 3279-3290.
- Di Nicolantonio, F., M. Martini, F. Molinari, A. Sartore-Bianchi, S. Arena, P. Saletti, S. De Dosso, L. Mazzucchelli, M. Frattini, S. Siena and A. Bardelli (2008). "Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(35): 5705-5712.

- Erstad, D. J., G. Tumusiime and J. C. Cusack, Jr. (2015). "Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer: Implications for the Clinical Surgeon." Ann Surg Oncol **22**(11): 3433-3450.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Feng, D., B. Qin, K. Pal, L. Sun, S. Dutta, H. Dong, X. Liu, D. Mukhopadhyay, S. Huang and F. A. Sinicrope (2019). "BRAF(V600E)-induced, tumor intrinsic PD-L1 can regulate chemotherapy-induced apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts." Oncogene **38**(41): 6752-6766.
- Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, D. M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor and F. Bray (2021). "Cancer statistics for the year 2020: An overview." Int J Cancer.
- Forrester, K., C. Almoguera, K. Han, W. E. Grizzle and M. Perucho (1987). "Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis." Nature **327**(6120): 298-303.
- Fram, R. J., P. S. Cusick, J. M. Wilson and M. G. Marinus (1985). "Mismatch repair of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA damage." Mol Pharmacol **28**(1): 51-55.
- Franke, F. C., J. Muller, M. Abal, E. D. Medina, U. Nitsche, H. Weidmann, S. Chardonnet, E. Ninio and K. P. Janssen (2019). "The Tumor Suppressor SASH1 Interacts With the Signal Adaptor CRKL to Inhibit Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer." Cell Mol Gastroenterol Hepatol **7**(1): 33-53.
- Friederichs, J., R. Rosenberg, J. Mages, K. P. Janssen, C. Maeckl, H. Nekarda, B. Holzmann and J. R. Siewert (2005). "Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression." Int J Colorectal Dis **20**(5): 391-402.
- Galimi, F., D. Torti, F. Sassi, C. Isella, D. Cora, S. Gastaldi, D. Ribero, A. Muratore, P. Massucco, D. Siatis, G. Paraluppi, F. Gonella, F. Maione, A. Pisacane, E. David, B. Torchio, M. Risio, M. Salizzoni, L. Capussotti, T. Perera, E. Medico, M. F. Di Renzo, P. M. Comoglio, L. Trusolino and A. Bertotti (2011). "Genetic and expression analysis of MET, MACC1, and HGF in metastatic colorectal cancer: response to met inhibition in patient xenografts and pathologic correlations." Clin Cancer Res **17**(10): 3146-3156.
- Galon, J., B. Mlecnik, G. Bindea, H. K. Angell, A. Berger, C. Lagorce, A. Lugli, I. Zlobec, A. Hartmann, C. Bifulco, I. D. Nagtegaal, R. Palmqvist, G. V. Masucci, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, M. Asslaber, C. D'Arrigo, F. Vidal-Vanaclocha, E. Zavadova, L. Chouchane, P. S. Ohashi, S. Hafezi-Bakhtiari, B. G. Wouters, M. Roehrl, L. Nguyen, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P. S. Patel, S. N. Shukla, Y. Wang, S. Kopetz, F. A. Sinicrope, V. Scripcariu, P. A. Ascierto, F. M. Marincola, B. A. Fox and F. Pages (2014). "Towards the

introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours." J Pathol **232**(2): 199-209.

- Ganesh, K., Z. K. Stadler, A. Cercek, R. B. Mendelsohn, J. Shia, N. H. Segal and L. A. Diaz, Jr. (2019). "Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **16**(6): 361-375.
- Gangadhar, T. and R. L. Schilsky (2010). "Molecular markers to individualize adjuvant therapy for colon cancer." Nat Rev Clin Oncol **7**(6): 318-325.
- Garcia-Foncillas, J., Y. Sunakawa, D. Aderka, Z. Wainberg, P. Ronga, P. Witzler and S. Stintzing (2019). "Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors." Front Oncol **9**: 849.
- Gertler, R., R. Rosenberg, T. Schuster and H. Friess (2009). "Defining a high-risk subgroup with colon cancer stages I and II for possible adjuvant therapy." Eur J Cancer **45**(17): 2992-2999.
- Gill, S., C. L. Loprinzi, D. J. Sargent, S. D. Thome, S. R. Alberts, D. G. Haller, J. Benedetti, G. Francini, L. E. Shepherd, J. Francois Seitz, R. Labianca, W. Chen, S. S. Cha, M. P. Heldebrant and R. M. Goldberg (2004). "Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?" J Clin Oncol **22**(10): 1797-1806.
- Grady, W. M. and J. M. Carethers (2008). "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis." Gastroenterology **135**(4): 1079-1099.
- Grasso, C. S., M. Giannakis, D. K. Wells, T. Hamada, X. J. Mu, M. Quist, J. A. Nowak, R. Nishihara, Z. R. Qian, K. Inamura, T. Morikawa, K. Nosho, G. Abril-Rodriguez, C. Connolly, H. Escuin-Ordinas, M. S. Geybels, W. M. Grady, L. Hsu, S. Hu-Lieskovan, J. R. Huyghe, Y. J. Kim, P. Krystofinski, M. D. M. Leiserson, D. J. Montoya, B. B. Nadel, M. Pellegrini, C. C. Pritchard, C. Puig-Saus, E. H. Quist, B. J. Raphael, S. J. Salipante, D. S. Shin, E. Shinbrot, B. Shirts, S. Shukla, J. L. Stanford, W. Sun, J. Tsoi, A. Upfill-Brown, D. A. Wheeler, C. J. Wu, M. Yu, S. H. Zaidi, J. M. Zaretsky, S. B. Gabriel, E. S. Lander, L. A. Garraway, T. J. Hudson, C. S. Fuchs, A. Ribas, S. Ogino and U. Peters (2018). "Genetic Mechanisms of Immune Evasion in Colorectal Cancer." Cancer Discov **8**(6): 730-749.
- Graziano, F. and S. Cascinu (2003). "Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough?" Ann Oncol **14**(7): 1026-1038.
- Guinney, J., R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B. M. Bot, J. S. Morris, I. M. Simon, S. Gerster, E. Fessler, E. M. F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G. C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J. W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S. H. Friend, P. Laurent-Puig, J. P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen and S. Tejpar (2015). "The

consensus molecular subtypes of colorectal cancer." Nat Med **21**(11): 1350-1356.

- Gunderson, L. L., J. M. Jessup, D. J. Sargent, F. L. Greene and A. K. Stewart (2010). "Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data." J Clin Oncol **28**(2): 264-271.
- Half, E., D. Bercovich and P. Rozen (2009). "Familial adenomatous polyposis." Orphanet J Rare Dis **4**: 22.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Harshman, L. C. and T. K. Choueiri (2013). "Targeting the hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway in renal cell carcinoma." Cancer J **19**(4): 316-323.
- Heinemann, V., S. Stintzing, T. Kirchner, S. Boeck and A. Jung (2009). "Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR." Cancer Treat Rev **35**(3): 262-271.
- Houshdaran, S., V. K. Cortessis, K. Siegmund, A. Yang, P. W. Laird and R. Z. Sokol (2007). "Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm." PLoS One **2**(12): e1289.
- Hutchins, G., K. Southward, K. Handley, L. Magill, C. Beaumont, J. Stahlschmidt, S. Richman, P. Chambers, M. Seymour, D. Kerr, R. Gray and P. Quirke (2011). "Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer." J Clin Oncol **29**(10): 1261-1270.
- Janssen, K. P., P. Alberici, H. Fsihi, C. Gaspar, C. Breukel, P. Franken, C. Rosty, M. Abal, F. El Marjou, R. Smits, D. Louvard, R. Fodde and S. Robine (2006). "APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression." Gastroenterology **131**(4): 1096-1109.
- Janssen, K. P., F. el-Marjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Rouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard and S. Robine (2002). "Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice." Gastroenterology **123**(2): 492-504.
- Jass, J. R., V. L. Whitehall, J. Young and B. A. Leggett (2002). "Emerging concepts in colorectal neoplasia." Gastroenterology **123**(3): 862-876.
- Jaufmann, J., F. C. Franke, A. Sperlich, C. Blumendeller, I. Kloos, B. Schneider, D. Sasaki, K. P. Janssen and S. Beer-Hammer (2021). "The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease-Overview of three multifunctional proteins." FASEB J **35**(4): e21470.



- Jin, Z. and F. A. Sinicrope (2019). "Advances in the therapy of BRAF(V600E) metastatic colorectal cancer." Expert Rev Anticancer Ther **19**(9): 823-829.
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A and W. A (2016). "Krebs in Deutschland." Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019.
- Kahlenberg, M. S., J. M. Sullivan, D. D. Witmer and N. J. Petrelli (2003). "Molecular prognostics in colorectal cancer." Surg Oncol **12**(3): 173-186.
- Kanth, P., J. Grimmett, M. Champine, R. Burt and N. J. Samadder (2017). "Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management." Am J Gastroenterol **112**(10): 1509-1525.
- Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, D. Tu, N. C. Tebbutt, R. J. Simes, H. Chalchal, J. D. Shapiro, S. Robitaille, T. J. Price, L. Shepherd, H. J. Au, C. Langer, M. J. Moore and J. R. Zalcberg (2008). "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." N Engl J Med **359**(17): 1757-1765.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.
- Kirchner, T. and A. Jung (2010). "[Pathological diagnosis for individualized therapy of colorectal cancer]." Pathologe **31**(1): 16-21.
- Krypuy, M., G. M. Newnham, D. M. Thomas, M. Conron and A. Dobrovic (2006). "High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer." BMC Cancer **6**: 295.
- Lievre, A., H. Blons and P. Laurent-Puig (2010). "Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer." Oncogene **29**(21): 3033-3043.
- Lievre, A., E. Rouleau, B. Buecher and E. Mitry (2010). "[Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]." Bull Cancer **97**(12): 1441-1452.
- Lynch, J. P. and T. C. Hoops (2002). "The genetic pathogenesis of colorectal cancer." Hematol Oncol Clin North Am **16**(4): 775-810.
- Ma, J., M. C. DeFrances, C. Zou, C. Johnson, R. Ferrell and R. Zarnegar (2009). "Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer." J Clin Invest **119**(3): 478-491.
- Maak, M., I. Simon, U. Nitsche, P. Roepman, M. Snel, A. M. Glas, T. Schuster, G. Keller, E. Zeestraten, I. Goossens, K. P. Janssen, H. Friess and R. Rosenberg (2013). "Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer." Ann Surg **257**(6): 1053-1058.

- Malinowsky, K., U. Nitsche, K. P. Janssen, F. G. Bader, C. Spath, E. Drecoll, G. Keller, H. Hofler, J. Slotta-Huspenina and K. F. Becker (2014). "Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer." Br J Cancer **110**(8): 2081-2089.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med **361**(25): 2449-2460.
- Marmol, I., C. Sanchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada and M. J. Rodriguez Yoldi (2017). "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer." Int J Mol Sci **18**(1).
- Martini, Gnann A, Scheikl D, Holzmann B and J. KP. (2011). "The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion." Int J Biochem Cell Biol. 2011 **Nov**;43(11):1630-40. doi: 10.1016/j.biocel.2011.07.012. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21820526.
- Maulik, G., A. Shrikhande, T. Kijima, P. C. Ma, P. T. Morrison and R. Salgia (2002). "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." Cytokine Growth Factor Rev **13**(1): 41-59.
- Meyerhardt, J. A. and R. J. Mayer (2005). "Systemic therapy for colorectal cancer." N Engl J Med **352**(5): 476-487.
- Millikan, K. W., E. D. Staren and A. Doolas (1997). "Invasive therapy of metastatic colorectal cancer to the liver." Surg Clin North Am **77**(1): 27-48.
- Nitsche, Maak M, Kuenzli B, Schuster T, Friess H and R. R. (2012). "Prognostic factors and survival improvements in stage IV colorectal cancer." Eur Surg **44**/1: 47-53
- Nitsche, U., M. Maak, T. Schuster, B. Kunzli, R. Langer, J. Slotta-Huspenina, K. P. Janssen, H. Friess and R. Rosenberg (2011). "Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective." Ann Surg **254**(5): 793-800; discussion 800-791.
- Nitsche, U., R. Rosenberg, A. Balmert, T. Schuster, J. Slotta-Huspenina, P. Herrmann, F. G. Bader, H. Friess, P. M. Schlag, U. Stein and K. P. Janssen (2012). "Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer." Ann Surg **256**(5): 763-771; discussion 771.
- O'Connell J, B., M. A. Maggard, J. H. Liu, D. A. Etzioni and C. Y. Ko (2004). "A report card on outcomes for surgically treated gastrointestinal cancers: are we improving?" J Surg Res **121**(2): 214-221.
- O'Neil, B. H., J. M. Wallmark, D. Lorente, E. Elez, J. Raimbourg, C. Gomez-Roca, S. Ejadi, S. A. Piha-Paul, M. N. Stein, A. R. Abdul Razak, K. Dotti, A. Santoro, R. B. Cohen, M. Gould, S. Saraf, K. Stein and S. W. Han (2017).

- "Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma." PLoS One **12**(12): e0189848.
- Ogino, S., K. Nosho, G. J. Kirkner, T. Kawasaki, J. A. Meyerhardt, M. Loda, E. L. Giovannucci and C. S. Fuchs (2009). "CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer." Gut **58**(1): 90-96.
  - Pahlman, L. A., W. M. Hohenberger, K. Matzel, K. Sugihara, P. Quirke and B. Glimelius (2016). "Should the Benefit of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer Be Re-Evaluated?" J Clin Oncol **34**(12): 1297-1299.
  - Papamichael, D., R. A. Audisio, B. Glimelius, A. de Gramont, R. Glynne-Jones, D. Haller, C. H. Kohne, S. Rostoft, V. Lemmens, E. Mitry, H. Rutten, D. Sargent, J. Sastre, M. Seymour, N. Starling, E. Van Cutsem and M. Aapro (2015). "Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013." Ann Oncol **26**(3): 463-476.
  - Pellat, A., J. Netter, G. Perkins, R. Cohen, F. Coulet, Y. Parc, M. Svrcek, A. Duval and T. Andre (2019). "[Lynch syndrome: What is new?]." Bull Cancer **106**(7-8): 647-655.
  - Pino, M. S. and D. C. Chung (2010). "The chromosomal instability pathway in colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2059-2072.
  - Pino, M. S. and D. C. Chung (2011). "Microsatellite instability in the management of colorectal cancer." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **5**(3): 385-399.
  - Popat, S., R. Hubner and R. S. Houlston (2005). "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis." J Clin Oncol **23**(3): 609-618.
  - Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-237.
  - Pox, C. P. and W. Schmiegel (2013). "[German S3-guideline colorectal carcinoma]." Dtsch Med Wochenschr **138**(49): 2545.
  - Pox, C. P. and W. Schmiegel (2019). "[German S3-guideline colorectal carcinoma]." Dtsch Med Wochenschr(49): 2545.
  - Radhakrishnan, H., W. Walther, F. Zincke, D. Kobelt, F. Imbastari, M. Erdem, B. Kortum, M. Dahlmann and U. Stein (2018). "MACC1-the first decade of a key metastasis molecule from gene discovery to clinical translation." Cancer Metastasis Rev **37**(4): 805-820.
  - Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu (2002). "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." Nature **418**(6901): 934.

- Ribic, C. M., D. J. Sargent, M. J. Moore, S. N. Thibodeau, A. J. French, R. M. Goldberg, S. R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L. E. Shepherd, D. Tu, M. Redston and S. Gallinger (2003). "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer." N Engl J Med **349**(3): 247-257.
- Rimkus, C., M. Martini, J. Friederichs, R. Rosenberg, D. Doll, J. R. Siewert, B. Holzmann and K. P. Janssen (2006). "Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer." Br J Cancer **95**(10): 1419-1423.
- Rizzo, S., G. Bronte, D. Fanale, L. Corsini, N. Silvestris, D. Santini, G. Gulotta, V. Bazan, N. Gebbia, F. Fulfaro and A. Russo (2010). "Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?" Cancer Treat Rev **36 Suppl 3**: S56-61.
- Rohde, F., C. Rimkus, J. Friederichs, R. Rosenberg, C. Marthen, D. Doll, B. Holzmann, J. R. Siewert and K. P. Janssen (2007). "Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer." Int J Cancer **121**(8): 1717-1723.
- Romanus, D., M. R. Weiser, J. M. Skibber, A. Ter Veer, J. C. Niland, J. L. Wilson, A. Rajput, Y. N. Wong, A. B. Benson, 3rd, S. Shibata and D. Schrag (2009). "Concordance with NCCN Colorectal Cancer Guidelines and ASCO/NCCN Quality Measures: an NCCN institutional analysis." J Natl Compr Canc Netw **7**(8): 895-904.
- Samowitz, W. S., C. Sweeney, J. Herrick, H. Albertsen, T. R. Levin, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff and M. L. Slattery (2005). "Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers." Cancer Res **65**(14): 6063-6069.
- Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, Nothacker M, Porschen R, Rödel C, Rösch T, Schmitt W, Wesselmann S and P. C. (2017). "S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom." Z Gastroenterol. **55**(12): 1344-1498
- Segditsas, S. and I. Tomlinson (2006). "Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway." Oncogene **25**(57): 7531-7537.
- Seth, R., S. Crook, S. Ibrahim, W. Fadhil, D. Jackson and M. Ilyas (2009). "Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer." Gut **58**(9): 1234-1241.
- Shirahata, A., K. Shinmura, Y. Kitamura, K. Sakuraba, K. Yokomizo, T. Goto, H. Mizukami, M. Saito, K. Ishibashi, G. Kigawa, H. Nemoto and K. Hibi (2010). "MACC1 as a marker for advanced colorectal carcinoma." Anticancer Res **30**(7): 2689-2692.

- Siddiqui, A. D. and B. Piperdi (2010). "KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy." Ann Surg Oncol **17**(4): 1168-1176.
- Siegel, R., C. Desantis and A. Jemal (2014). "Colorectal cancer statistics, 2014." CA Cancer J Clin **64**(2): 104-117.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2018). "Cancer statistics, 2018." CA Cancer J Clin **68**(1): 7-30.
- Sinicrope, F. A., F.-S. Ou, Q. Shi, A. B. Nixon, K. Mody, A. Levasseur, A. C. Dueck, A. R. Dhanarajan, C. H. Lieu, D. J. Cohen, F. Innocenti, R. J. Behrens, W. Peters, D. J. Sargent, N. Sommer, E. M. O'Reilly and J. Meyerhardt (2017). "Randomized trial of FOLFOX alone or combined with atezolizumab as adjuvant therapy for patients with stage III colon cancer and deficient DNA mismatch repair or microsatellite instability (ATOMIC, Alliance A021502)." Journal of Clinical Oncology **35**(15\_suppl): TPS3630-TPS3630.
- Sobin, L. H. and I. D. Fleming (1997). "TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer." Cancer **80**(9): 1803-1804.
- Sodek, J., B. Ganss and M. D. McKee (2000). "Osteopontin." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 279-303.
- Steele, C. W., T. Whittle and J. J. Smith (2019). "Review: KRAS mutations are influential in driving hepatic metastases and predicting outcome in colorectal cancer." Chin Clin Oncol **8**(5): 53.
- Stein, U., M. Dahlmann and W. Walther (2010). "MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene." J Mol Med (Berl) **88**(1): 11-18.
- Stein, U. and P. M. Schlag (2007). "Clinical, biological, and molecular aspects of metastasis in colorectal cancer." Recent Results Cancer Res **176**: 61-80.
- Stein, U., W. Walther, F. Arlt, H. Schwabe, J. Smith, I. Fichtner, W. Birchmeier and P. M. Schlag (2009). "MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis." Nat Med **15**(1): 59-67.
- Taghizadeh, H. and G. W. Prager (2020). "Personalized Adjuvant Treatment of Colon Cancer." Visc Med **36**(5): 397-406.
- Taieb, J. and C. Gallois (2020). "Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer." Cancers (Basel) **12**(9).
- Tejpar, S., M. Bertagnolli, F. Bosman, H. J. Lenz, L. Garraway, F. Waldman, R. Warren, A. Bild, D. Collins-Brennan, H. Hahn, D. P. Harkin, R. Kennedy, M. Ilyas, H. Morreau, V. Proutski, C. Swanton, I. Tomlinson, M. Delorenzi, R. Fiocca, E. Van Cutsem and A. Roth (2010). "Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery." Oncologist **15**(4): 390-404.

- Tougeron, D., G. Mouillet, I. Trouilloud, T. Lecomte, R. Coriat, T. Aparicio, G. Des Guetz, C. Lecaille, P. Artru, G. Sickersen, E. Cauchin, D. Sefrioui, T. Boussaha, A. Ferru, T. Matysiak-Budnik, C. Silvain, L. Karayan-Tapon, J. C. Pages, D. Vernerey, F. Bonnetain, P. Michel, J. Taieb and A. Zaanani (2016). "Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study." J Natl Cancer Inst **108**(7).
- Tran, B., S. Kopetz, J. Tie, P. Gibbs, Z. Q. Jiang, C. H. Lieu, A. Agarwal, D. M. Maru, O. Sieber and J. Desai (2011). "Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer." Cancer **117**(20): 4623-4632.
- Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Ruschoff, R. Fishel, N. M. Lindor, L. J. Burgart, R. Hamelin, S. R. Hamilton, R. A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H. T. Lynch, P. Peltomaki, S. D. Ramsey, M. A. Rodriguez-Bigas, H. F. Vasen, E. T. Hawk, J. C. Barrett, A. N. Freedman and S. Srivastava (2004). "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability." J Natl Cancer Inst **96**(4): 261-268.
- van Krieken, J. H., A. Jung, T. Kirchner, F. Carneiro, R. Seruca, F. T. Bosman, P. Quirke, J. F. Flejou, T. Plato Hansen, G. de Hertogh, P. Jares, C. Langner, G. Hoefler, M. Ligtenberg, D. Tiniakos, S. Tejpar, G. Bevilacqua and A. Ensari (2008). "KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program." Virchows Arch **453**(5): 417-431.
- Vasen, H. F. (2007). "Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)." Aliment Pharmacol Ther **26 Suppl 2**: 113-126.
- Vasen, H. F., P. Watson, J. P. Mecklin and H. T. Lynch (1999). "New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC." Gastroenterology **116**(6): 1453-1456.
- Vogelstein, B. (1990). "Cancer. A deadly inheritance." Nature **348**(6303): 681-682.
- Walther, A., E. Johnstone, C. Swanton, R. Midgley, I. Tomlinson and D. Kerr (2009). "Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **9**(7): 489-499.
- Webber, C., M. Gospodarowicz, L. H. Sobin, C. Wittekind, F. L. Greene, M. D. Mason, C. Compton, J. Brierley and P. A. Groome (2014). "Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review." Int J Cancer **135**(2): 371-378.

- Weidle, U. H., F. Birzele and A. Kruger (2015). "Molecular targets and pathways involved in liver metastasis of colorectal cancer." Clin Exp Metastasis **32**(6): 623-635.
- Wittekind, C. (2017). "TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage." Wiley-VCH **8**.
- Wortzel, I. and R. Seger (2011). "The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles." Genes Cancer **2**(3): 195-209.
- Xu, W., Y. He, Y. Wang, X. Li, J. Young, J. P. A. Ioannidis, M. G. Dunlop and E. Theodoratou (2020). "Risk factors and risk prediction models for colorectal cancer metastasis and recurrence: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies." BMC Med **18**(1): 172.
- Yu, I. S. and W. Y. Cheung (2018). "Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy." Can J Gastroenterol Hepatol **2018**: 9450754.
- Zarkavelis, G., S. Boussios, A. Papadaki, K. H. Katsanos, D. K. Christodoulou and G. Pentheroudakis (2017). "Current and future biomarkers in colorectal cancer." Ann Gastroenterol **30**(6): 613-621.
- Zeestraten, E. C., M. Maak, M. Shibayama, T. Schuster, U. Nitsche, T. Matsushima, S. Nakayama, K. Gohda, H. Friess, C. J. van de Velde, H. Ishihara, R. Rosenberg, P. J. Kuppen and K. P. Janssen (2012). "Specific activity of cyclin-dependent kinase I is a new potential predictor of tumour recurrence in stage II colon cancer." Br J Cancer **106**(1): 133-140.
- Zeller, C., B. Hinzmann, S. Seitz, H. Prokoph, E. Burkhard-Goettges, J. Fischer, B. Jandrig, L. E. Schwarz, A. Rosenthal and S. Scherneck (2003). "SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer." Oncogene **22**(19): 2972-2983.
- Zhao, M., F. Liang, B. Zhang, W. Yan and J. Zhang (2015). "The impact of osteopontin on prognosis and clinicopathology of colorectal cancer patients: a systematic meta-analysis." Sci Rep **5**: 12713.

# 11 Anhang

## 11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abgesehen von in deutscher Schriftsprache üblichen Abkürzungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ACF</b>	Aberrant Crypt Foci
<b>APC</b>	adenomatous polyposis coli
<b>AJCC</b>	The American Joint Committee on Cancer's Cancer Staging
<b>BES</b>	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Ethylaminsulfonsäure
<b>B-RAF</b>	rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CIN</b>	Chromosomale Instabilität
<b>CIMP</b>	CpG island methylator phenotype
<b>c-myc</b>	celluläre- Myelocytomatose
<b>CRC</b>	<i>colorectal carcinoma</i> (kolorektales Karzinom)
<b>crkl</b>	CRK like proto-oncogene
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>dNTP</b>	Mischung aller vier Desoxynukleosid-Triphosphate
<b>DCC</b>	<i>deleted in colon cancer</i>
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure



<b>EGF</b>	<i>epidermal growthfactor</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growthfactor receptor</i>
<b>ERK</b>	Extracellular-signal Regulated Kinases
<b>FAP</b>	Familiäre adenomatöse Polyposis
<b>FOBT</b>	Fecal Occult Blood Test
<b>5-FU</b>	5-Fluoruracil
<b>GIST</b>	Gastrointestinale Stromatumoren
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HNPCC</b>	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
<b>LOH</b>	Loss of Heterozygosity
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>μ</b>	mikro
<b>M</b>	molar
<b>MACC1</b>	Metastasis-Associated in Colon Cancer
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MEK</b>	Mitogen-aktivierte protein kinase kinase
<b>MMR</b>	Mismatch Repair
<b>mRNA</b>	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
<b>MSI</b>	Mirkosatelliteninstabilität
<b>n</b>	nano
<b>n-Sh</b>	Normalgewebe
<b>o.a.</b>	Ohne alles
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<b>PD-1</b>	programmed cell death Protein 1
<b>qRT-PCR</b>	<i>quantitative real time</i> Polymerase Kettenreaktion

<b>(k)-ras</b>	(kirsten) <i>rat sarcome viral oncogene homolog</i>
<b>(h)-ras</b>	(harvey) <i>rat sarcome viral oncogene homolog</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institut Medium
<b>RT-PCR</b>	<i>real time</i> Polymerase Kettenreaktion
<b>SASH-1</b>	<b>SAM and SH3 domain-containing protein 1</b>
<b>sec</b>	Sekunde
<b>TNM</b>	<b>Tumor, LymphNode, Metastasis</b>
<b>UICC</b>	Union internationale contre le cancer
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>üN</b>	über Nacht
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>Wt</b>	Wildtyp

## 11.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Hallmarks of Cancer .....	10
Abbildung 2: Modell der Adenom-Karzinom Sequenz für chromosomale Instabilität in Kolonkarzinomen (Pino and Chung 2011) .....	12
Abbildung 3: EGFR vermittelte Signaltransduktion in kolrektalen Zellen.....	16
Abbildung 4 Die Signalwege der serratierten Kolonkarzinome aus (De Palma et al. 2019).....	20
Abbildung 5 WNT Signalweg aus „The role of the Wnt signalling pathway in.....	22
Abbildung 6: MACC1 Rolle in der Adenom-Karzinom Sequenz in Kolonkarzinomen. ....	25
Abbildung 7: Work-Flow Diagramm.....	40
Abbildung 8: Denaturierendes RNA-Gel zur RNA-Qualitätskontrolle. ....	41
Abbildung 9: Relative Osteopontin-Expression in Normal Kolongewebe und Tumoren der Stadien 2 und 3.....	45
Abbildung 10: Relative MACC1-Expression in Normal Kolongewebe und Tumorem der Stadien 2 und 3 .....	47
Abbildung 11: Relative SASH1-Expression in Normal-Kolongewebe .....	48
Abbildung 12: Relative SASH1-Expression in Normal-Kolongewebe und Tumoren der Stadien 2 und 3.....	49
Abbildung 13: Rate der Patienten die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen .....	50
Abbildung 14: „Difference Plot“ Normalgewebe mit HCT116 Verdünnungen. ....	52
Abbildung 15: Rate der Patienten die eine KRAS Mutation aufweisen .....	53
Abbildung 16: Rate der Patienten, die eine BRAF Mutation aufweisen .....	54
Abbildung 17: Cut off Wert Berechnung für OPN; SASH1, MACC1.....	57
Abbildung 18: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von KRAS Mutationen, BRAF Mutationen und dem Mikrosatelliten-Status, MAAC1, OPN und SASH1 Expression (Daten veröffentlicht in BMC Cancer).....	58
Abbildung 19: 5-FU Behandlung korreliert mit der Expression von OPN .....	62
Abbildung 20: 2-Step Cluster Analyse .....	64
Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve mit den Gruppen aus der 2-step Cluster Analyse .....	64
Abbildung 22: 2-Step Cluster Analyse .....	65
Abbildung 23: Kaplan-Meier Kurve mit den Gruppen aus der 2-step Cluster Analyse mit 4 Gruppen .....	65
Abbildung 24: Die 2-Step Cluster Analyse ergab 3 Gruppen, die dem Modell der Karzinogenese im Kolonkarzinom zugeordnet werden können.....	78

## 11.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: 8. Version der TNM Klassifikation.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 2: Chemikalien .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 3: Verbrauchsmaterial .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 4: Geräte.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 5: Enzyme.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 6: Stammlösungen .....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 7: Oligonukleotide.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 8: Reagenzienkits.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 9: Zelllinien.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 10: HRMA- Programme .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 11: Zyklus für qRT-PCR.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 12: Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 13: Zelllinien mit ihrer jeweiligen Mutation.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 14: Univariate Analyse der klinischen Faktoren.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 15: Spearman Rho Korrelation der molekularen Marker.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 16: Multivariable Analyse einschließlich Molekularer Faktoren.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 17: Multivariate Analyse einschließlich klinischer und molekularer Faktoren.....</i>	<i>61</i>

## 12 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Janßen. Sein herausragendes Wissen gepaart mit viel Geduld und Freundlichkeit haben mir viel Geholfen diese Arbeit zu vollenden. Du hast immer die richtigen Worte gefunden und bist mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Selbst nach einer Zeit wo ich mich mal weniger gemeldet habe, hast du mich stets freundlich empfangen. Es freut mich nach meiner Masterarbeit in Biologie nun auch meine Doktorarbeit unter deiner Obhut vollendet zu haben.

Als nächstes möchte ich meinem Mentor Dr.med. Dr.med.univ. Ulrich Nitsche, Ph.D. für seine Freundschaft und ebenfalls für seine mehr als ausgezeichnete Betreuung während der Doktorarbeit bedanken und die Möglichkeit auch alle anderen Fragen des Lebens mit ihm zu erörtern. Uli, vielen vielen Dank. Du hast auch einen großen Anteil daran, dass ich noch Medizin studiert habe und heute Arzt bin. An die gemeinsamen Tage und Nächte im Labor muss ich immer mit einem Schmunzeln denken.

Als nächstes möchte der gesamten kolorektalen Forschungsgruppe am Klinikum rechts der Isar danken. Ihr seid mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und habt mir immer geholfen, wenn es mal schwierig wurde.

Prof. Dr. Friess, Chefarzt der Chirurgischen Klinik und Poliklinik rechts der Isar, möchte ich danken für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an dieser Abteilung durchzuführen.

Von tiefsten Herzen möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken, dass sie mir ermöglicht haben nach meinem Biologiestudium noch Medizin zu studieren und mich während dieser Arbeit unermüdlich begleitet, an mich geglaubt und mich immer wieder daran erinnert haben die Arbeit auch zu vollenden.

Meiner Frau und großen Liebe Marleen, die alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat und mich auch ermutigt hat nach meinem Biologiestudium noch Medizin zu studieren und mich in dieser Zeit maximal unterstützt hat und während der Doktorarbeit auch immer wieder daran erinnert hat diese fertig zu schreiben.

Darüber hinaus allen Freunden und Kommilitonen, die mich auf dem Weg zu dieser Doktorarbeit unterstützt haben.