

Aus dem Experimental and Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prädiktion der Therapie-Response im Patienten-abgeleiteten
Maus-Xenograft-Modell bei peritoneal metastasiertem
kolorektalem Karzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Maria Pachmayr

aus München

Datum der Promotion: 13. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Zusammenfassung	3
Abstract	4
1. Einleitung	6
1.1. Kolorektales Karzinom.....	6
1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren	6
1.1.2. Molekulare Mechanismen des KRK	7
1.1.3. Staging und Grading des KRK	9
1.2. Metastasierung des KRK.....	10
1.2.1. Peritoneale Metastasierung des KRK	11
1.2.1.1. Aufbau und Funktion des Peritoneums.....	11
1.2.1.2. Häufigkeit peritonealer Metastasen	11
1.2.1.3. Molekulare Mechanismen der peritonealen Metastasierung	12
1.2.2. Appendixkarzinom und seine peritoneale Dissemination	15
1.2.3. Therapieoptionen des pmKRK	16
1.2.3.1. Zytoreduktive Chirurgie und HIPEC.....	17
1.2.3.2. Systemische Chemotherapie	18
1.2.3.2.1. Klassische Chemotherapie.....	19
1.2.3.2.2. Zielgerichtete Therapie.....	20
1.2.3.2.3. Outcome verschiedener systemischer Therapieregime	22
1.3. Prädiktive Biomarker	23
1.3.1. S100A4 in der Metastasierung und als Biomarker	23
1.3.2. PDX-Modelle zur Evaluierung prädiktiver Marker	25
1.4. Fragestellung und Zielsetzungen	26
2. Methodik	27
2.1. Materialien	27
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Gewinnung des Probenmaterials	29
2.2.1.1. Tumorproben	29
2.2.1.2. Blutproben	30
2.2.2. Klinische Daten	30
2.2.3. Generierung der PDX-Modelle	32

2.2.4.	Testung der Chemosensitivität	33
2.2.5.	RNA-Isolation aus Tumorgewebe und qRT-PCR	34
2.2.6.	Histologie	36
2.2.6.1.	Anfertigung von Kryoschnitten	36
2.2.6.2.	Hämatoxylin-Eosin	36
2.2.6.3.	Immunhistochemie	36
2.2.6.4.	Immunfluoreszenz.....	37
2.2.7.	RNA-Isolation aus Plasma und ddPCR	37
2.2.8.	Statistische Analyse.....	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Etablierung der PDX-Modelle von pmKRK	40
3.1.1.	Einflussfaktoren auf das Engraftment der PDX-Modelle	41
3.1.2.	Charakteristika der etablierten PDX-Modelle.....	42
3.1.3.	Vergleich der Histologie der Patiententumore und etablierten PDX-Modelle	43
3.1.4.	Tumorwachstum im PDX	45
3.1.5.	Orthotope Transplantation von pmKRK.....	45
3.2.	Therapieansprechen der PDX-Modelle.....	46
3.2.1.	Therapieansprechen auf klassische und zielgerichtete Chemotherapeutika	46
3.2.2.	Einfluss der Tumorlokalisierung auf das Therapieansprechen	50
3.2.3.	Intra-individuelle Heterogenität im Therapieansprechen	51
3.2.4.	Einfluss von Vorbehandlung auf das Therapieansprechen	52
3.3.	Analyse der S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe	54
3.3.1.	Vergleich der S100A4-Expression im Patienten- und PDX-Tumorgewebe	55
3.3.2.	Einflussfaktoren auf die S100A4-Expression.....	56
3.3.3.	Einfluss der S100A4-Expression auf das Wachstum von pmKRK	56
3.4.	S100A4-Expression als prädiktiver Marker des Therapieansprechens	57
3.4.1.	Oxaliplatin	58
3.4.2.	Cetuximab.....	59
3.4.3.	Bevacizumab	60
3.4.4.	Einfluss der Behandlung mit Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab auf die S100A4-Expression im Tumorgewebe	62
3.4.5.	5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib, Selumetinib.....	62
3.4.6.	Einfluss der Behandlung mit 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib auf die S100A4-Expression im Tumorgewebe.....	64
3.5.	Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Patientenplasma.....	65

4. Diskussion	69
4.1. Etablierung präklinischer PDX-Modelle.....	69
4.1.1. Stand der Forschung zu präklinischen Modellen des pmKRK	69
4.1.2. Ergebnisse der Arbeit unter Berücksichtigung des Forschungsstands	73
4.2. Therapieansprechen auf klassische und zielgerichtete Chemotherapeutika.....	73
4.2.1. Stand der Forschung zum Therapieansprechen in präklinischen Modellen.....	73
4.2.2. Ergebnisse der Arbeit unter Berücksichtigung des Forschungsstands	75
4.2.2.1. Unterschiede in der Beurteilung des Therapieansprechens	75
4.2.2.2. Klassische Chemotherapeutika	76
4.2.2.3. Zielgerichtete Therapeutika	77
4.2.2.4. Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen.....	78
4.2.2.5. Intraindividuelle Unterschiede des Therapieansprechens	78
4.2.3. PDX als präklinisches Modell zur Evaluierung von Therapieansprechen	79
4.3. S100A4-Expression als prädiktiver Marker des Therapieansprechens	80
4.3.1. Analyse der S100A4-Expression im pmKRK-Gewebe	80
4.3.2. S100A4 als prädiktiver Biomarker	81
4.3.3. Erklärungsansätze für den prädiktiven Wert von S100A4	82
4.3.3.1. Oxaliplatin	82
4.3.3.2. Cetuximab.....	83
4.3.3.3. Bevacizumab	84
4.3.4. Einfluss von Therapie auf die S100A4-Expression	85
4.3.5. Translationale Bedeutung von S100A4 für die Therapie von pmKRK	86
4.4. Analyse der S100A4-mRNA im Patientenplasma	87
4.5. Zusammenfassung und Ausblick.....	89
5. Literaturverzeichnis	90
6. Abkürzungsverzeichnis	99
Eidesstattliche Versicherung	101
Lebenslauf	102
Publikationsliste	103
Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Peritoneale Metastasierungskaskade.....	12
Abbildung 2:	Bestimmung des Peritonealen Cancer Index nach Sugarbaker.....	16
Abbildung 3:	Schema zur Generierung von PDX-Modellen	32
Abbildung 4:	Anzahl der engrafteten und nicht-engrafteten Modelle.....	41
Abbildung 5:	Einfluss von Tumorentität und Grading auf das Engraftment.....	41
Abbildung 6:	Überblick über die auf ihre Chemosensitivität getesteten PDX-Modelle	42
Abbildung 7:	HE-Färbung und immunhistochemische Färbung von Zytokeratin-19 des Patienten- und PDX-Tumorgewebes im Vergleich	44
Abbildung 8:	Färbung humaner Zellkerne mittels Immunfluoreszenz	45
Abbildung 9:	Zeit zur Verdoppelung des Tumolvolumens.....	45
Abbildung 10:	HE-Färbung des orthotop implantierten PDX-Tumormaterials und seiner Infiltration in Niere, Ovar und Diaphragma	46
Abbildung 11:	Therapieansprechen der PDX-Modelle je nach Tumorlokalisation	50
Abbildung 12:	Therapieansprechen der PDX-Modelle je nach Tumorlokalisation für 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Docetaxel, Erlotinib, Bevacizumab, Cetuximab, Regorafenib und Selumetinib	51
Abbildung 13:	Intra-individuelle Unterschiede im Ansprechen auf die jeweiligen Therapeutika.....	52
Abbildung 14:	Therapieansprechen der PDX-Modelle von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patiententumoren	53
Abbildung 15:	S100A4-Expression im Tumorgewebe der PDX-Modelle.....	54
Abbildung 16:	Immunhistochemischer Nachweis von S100A4 in den unbehandelten Kontrolltumoren der jeweiligen PDX-Modelle	55
Abbildung 17:	Korrelation der S100A4-Expression im Patienten-Tumorgewebe und dem Gewebe des entsprechenden PDX-Modells.....	55
Abbildung 18:	Mögliche Einflussfaktoren auf die S100A4-Expression im PDX-Modell	56
Abbildung 19:	a) Korrelation von S100A4-Expression im PDX-Modell und der Zeitspanne, welche die unbehandelten Kontrolltumore benötigten, um ihr Tumolvolumen zu verdoppeln. b) Zeit zur Verdopplung des Tumolvolumens niedrig und hoch S100A4 exprimierender Modelle	57
Abbildung 20:	Therapieansprechen auf Oxaliplatin.....	58
Abbildung 21:	Therapieansprechen für S100A4 niedrig und S100A4 hoch exprimierende PDX-Modelle im Behandlungsverlauf mit Oxaliplatin	59
Abbildung 22:	Therapieansprechen auf Cetuximab	59
Abbildung 23:	Therapieansprechen für S100A4 niedrig und S100A4 hoch exprimierende Modelle im Verlauf der Behandlung mit Cetuximab	60
Abbildung 24:	Therapieansprechen auf Bevacizumab	61
Abbildung 25:	Therapieansprechen für S100A4 niedrig und S100A4 hoch exprimierende Modelle im Verlauf der Behandlung mit Bevacizumab	61
Abbildung 26:	Veränderung der S100A4-Expression in den mit a) Oxaliplatin, b) Cetuximab und c) Bevacizumab behandelten Tumoren gegenüber der S100A4-Expression in der unbehandelten Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 27:	Vergleich des Ansprechens S100A4 niedrig und hoch exprimierender PDX-Modelle auf die Behandlung mit 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib	63

Abbildung 28:	Vergleich der S100A4-Expression von Modellen mit und ohne Therapieansprechen auf die Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib, Selumetinib.....	64
Abbildung 29:	Veränderung der S100A4-Expression im Tumorgewebe nach Behandlung mit den Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib.....	65
Abbildung 30:	Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Plasma von Patienten mit pmKRK verglichen mit der S100A4-mRNA-Expression einer gesunden Kontrollgruppe.....	66
Abbildung 31:	Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Patientenplasma in Abhängigkeit von Tumorentität, Metastasierung, Ausmaß des Tumorbefalls, Tumorgrading, KRAS-Mutationsstatus, Geschlecht.....	67
Abbildung 32:	S100A4-mRNA-Expression im Plasma von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten	68
Abbildung 33:	Möglicher Mechanismus für die Assoziation von hoher S100A4-Expression und schlechtem Therapieansprechen auf Oxaliplatin	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des KRK	9
Tabelle 2:	Mausmodelle.....	27
Tabelle 3:	Geräte	27
Tabelle 4:	Chemikalien	28
Tabelle 5:	Klinische Daten der pmKRK-Patienten	31
Tabelle 6:	Behandlungsplan für die Sensitivitätstestung der PDX-Modelle	33
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für die reverse Transkription der RNA aus Gewebeproben.....	35
Tabelle 8:	Sequenzen der S100A4-Primer und Sonden.....	35
Tabelle 9:	Reaktionsansatz der qPCR.....	36
Tabelle 10:	Reaktionsansatz für die reverse Transkription der RNA aus Patienten-Plasmaproben	38
Tabelle 11:	Reaktionsansatz der droplet digital PCR für Patienten-Plasmaproben.....	38
Tabelle 12:	Charakteristika der Patienten mit etablierten PDX-Modellen	43
Tabelle 13:	Einstufung der Behandlungsgruppen anhand ihrer Therapieresponse mittels T/C-Werts	47
Tabelle 14:	Therapieansprechen der PDX-Modelle.....	47
Tabelle 15:	Einteilung des Therapieansprechens der PDX-Modelle anhand ihrer T/C-Werte.....	47
Tabelle 16:	Klassifikation der Therapieresponse anhand des RTV	48
Tabelle 17:	Therapieansprechen (RTV) der PDX-Modelle für die einzelnen Therapeutika	48
Tabelle 18:	Einteilung des Therapieansprechens der Modelle mittels RTV	49
Tabelle 19:	Zusammenfassende Übersicht der mittleren T/C-Werte und mittleren RTV ...	50
Tabelle 20:	Chemotherapeutische Behandlung der Patienten vor Operation.....	53

Zusammenfassung

Das *kolorektale Karzinom* (KRK) ist die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit. KRK-Patienten entwickeln zu 8 - 13% peritoneale Metastasen. Diese sind mit einer stark reduzierten Lebenserwartung assoziiert. Das mediane Überleben beträgt bei „Best Supportive Care“ wenige Monate. Ein Großteil der Patienten wird mit einer systemischen Chemotherapie behandelt. Hier werden je nach Therapeutika mediane Überlebensraten von 8 - 30 Monaten erreicht. Ein geringer Teil der Patienten kann mit der Kombination aus Zytoreduktion und *hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie* (HIPEC) therapiert werden. Hier wird ein medianes Überleben von 16 - 51 Monaten berichtet.

Ziel der Promotionsarbeit war es, neue, spezifische prädiktive Biomarker zur Optimierung der Therapie zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden *Patienten-abgeleitete Xenograftmodelle* (PDX-Modelle) aus dem Gewebe *peritoneal metastasierter KRK* (pmKRK) etabliert. Metastasen von 48 Patienten wurden für die PDX-Etablierung subkutan in immunsupprimierte Mäuse transplantiert. Mögliche Einflussfaktoren auf das Engraftment sowie wesentliche Charakteristika der Modelle, wie Histologie und Tumorwachstum, wurden untersucht. Die etablierten PDX-Modelle wurden mit den Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Docetaxel, Bevacizumab, Cetuximab, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib behandelt und anschließend bezüglich ihres Therapieansprechens evaluiert. Die Expression des Biomarkers S100A4 im Tumorgewebe von PDX und Patient wurde mittels qRT-PCR und Immunhistochemie ermittelt. Mögliche Einflussfaktoren wurden evaluiert. Um den prädiktiven Wert der S100A4-Expression zu analysieren, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der S100A4-Expression und dem Ansprechen auf die jeweiligen Therapeutika untersucht. Abschließend wurden die S100A4-Expression im Plasma der pmKRK-Patienten sowie mögliche Einflussfaktoren auf diese ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnten 19 PDX-Modelle etabliert werden. Hiervon wurden 13 Modelle bezüglich ihres Therapieansprechens und ihrer S100A4-Expression untersucht. Die Modelle zeigten den Erhalt der histologischen Morphologie und ein Ersetzen des Stroma-Kompartiments durch murines Gewebe. Die Evaluierung der 9 Therapeutika ergab sowohl inter- als auch intraindividuelle Unterschiede im Therapieansprechen. Insgesamt erzielten Irinotecan das beste und Cetuximab das schlechteste Therapieansprechen im PDX-Modell. Eine S100A4-Expression im pmKRK-Gewebe konnte sowohl für PDX-Tumore als auch für Patiententumore nachgewiesen werden.

Interessanterweise war eine hohe S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe mit einem schlechteren Ansprechen auf Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab assoziiert. Auch im Plasma von Patienten mit pmKRC war der Biomarker S100A4 nachweisbar. Dabei war die S100A4-Expression im Patientenplasma signifikant höher als die Expression im Plasma gesunder Kontrollpersonen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PDX-Modelle für das pmKRC eine geeignete Plattform zur Evaluierung von Therapieansprechen und prädiktiven Biomarkern darstellen. Eine hohe S100A4-Expression im pmKRC-Gewebe ist mit einem schlechten Ansprechen auf Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab assoziiert und somit hierfür ein vielversprechender prädiktiver Biomarker und möglicher Therapieansatz.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide. About 8 - 13% of CRC-patients develop peritoneal metastases, which are associated with limited prognosis. The median survival of the patients treated with best supportive care is only a few months, whereas systemic chemotherapy regimens reach a median survival of 8 - 30 months. The majority of patients with *peritoneally metastasized CRC* (pmCRC) is treated with systemic chemotherapy. Some patients benefit from the combination of cytoreductive surgery and *hyperthermic intraperitoneal chemotherapy* (HIPEC). Here, a median survival of 16 - 51 months can be achieved.

To improve therapy of pmCRC-patients, this study aimed to evaluate novel predictive biomarkers. For this purpose, *patient derived xenograft* (PDX) models of pmCRC were generated to test chemotherapy response and to analyze predictive biomarkers such as the Wnt signaling target S100A4. Metastases of 48 patients were transplanted subcutaneously onto immunodeficient mice. Factors influencing the engraftment and histopathologic characteristics of the PDX-tumors were evaluated. To assess tumor response to therapy, PDX were treated with 5-FU, irinotecan, oxaliplatin, docetaxel, bevacizumab, cetuximab, erlotinib, regorafenib and selumetinib. Tumor tissues of PDX and patients were analyzed for their S100A4 expression by immunohistochemistry and qRT-PCR. The influence of different clinical characteristics was examined. To analyze if S100A4 is an appropriate predictive biomarker for therapy of pmCRC, a correlation

between the S100A4 expression in the PDX and the therapy response was examined. Additionally, S100A4 transcripts in the plasma of patients with pmCRC were evaluated. In total, 19 specimens have engrafted in immunodeficient mice, of which 13 PDX models were characterized and tested for chemosensitivity. The results show that the xenografted tumors retained the histopathologic characteristics of the original samples and that human stroma was replaced by mouse stroma. Therapy response between and within the groups was heterogeneous. Best response was observed for irinotecan and worst response for cetuximab. Tumor tissue of both PDX and patients showed an expression of S100A4. Interestingly, pmCRC with high S100A4 expression showed limited response to oxaliplatin, cetuximab and bevacizumab. S100A4 was detected in plasma samples of patients with pmCRC. The S100A4 transcripts were increased in patients' plasma compared to tumor-free individuals.

In conclusion, the results of this study show that PDX models offer a beneficial platform for the evaluation of chemosensitivity and predictive biomarkers. For pmCRC, high S100A4 expression is predictive for limited therapy response to oxaliplatin, cetuximab and bevacizumab and shows promise as a predictive biomarker.

1. Einleitung

Krebserkrankungen sind trotz des medizinischen Fortschritts der letzten Jahrzehnte weiterhin die zweithäufigste Todesursache weltweit und verursachten allein im Jahr 2015 fast neun Millionen Sterbefälle. Jährlich erkranken etwa 14 Millionen Menschen an Krebs [1]. Die *World Health Organisation* (WHO) und das *National Cancer Institute* (NCI) definieren Krebs als eine Sammelbezeichnung für eine Vielzahl von Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass entartete Zellen sich zunächst unkontrolliert vermehren und in der Lage sind, umliegendes Gewebe zu infiltrieren [1,2]. Gleichwohl sind wesentliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Krebsentitäten, wie auch innerhalb einer Entität, in Bezug auf Pathogenese, molekulare Mechanismen, Therapie und Prognose feststellbar. Um der Komplexität von Krebsentstehung und -progression gerecht zu werden, ist es Ziel aktueller Forschung, molekulare Unterschiede zwischen Patientensubgruppen zu identifizieren. Dadurch soll eine zielgerichtete und individualisierte Behandlung für den einzelnen Patienten ermöglicht werden. Biomarker spielen dabei als Prädiktoren und Zielmoleküle der Therapie eine wesentliche Rolle.

Diese Dissertation behandelt das *kolorektale Karzinom* (KRK) (1.1) in Hinblick auf seine *peritoneale Metastasierung* (pmKRK) (1.2), um hier neue, spezifische prädiktive Biomarker (1.3) zur Optimierung der Therapie auf der Basis neu etablierter *Patienten-abgeleiteter Xenograftmodelle* (PDX) zu identifizieren.

1.1. Kolorektales Karzinom

1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Das *kolorektale Karzinom* (KRK) stellt die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit dar. In Deutschland verzeichnet das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2013 etwa 62.400 Neuerkrankungen, davon rund 45% Frauen und 55% Männer. Frauen mit der Diagnose KRK waren im Mittel 73 Jahre alt, Männer waren im Mittel 70 Jahre alt. Knapp 25.700 Patienten starben im selben Jahr infolge ihres KRK. In den letzten Jahren ist ein positiver Trend zu beobachten. Seit 2004 sinken die Inzidenzraten für Patienten über 55 Jahre. Auch das Überleben hat sich verbessert, denn während die 5-Jahresüberlebensrate in den 1980er Jahren noch 50% betrug, lag sie im Jahr 2012 bei rund 63% [3,4].

Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung eines KRK sind Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung sowie der häufige Konsum von rotem Fleisch und Alkohol [4]. Auch eine Vielzahl genetischer Faktoren beeinflusst

die Entstehung von KRK. Personen mit KRK oder kolorektalen Adenomen in der Familienanamnese zeigen ein signifikant erhöhtes Risiko, selbst ein KRK zu entwickeln. Das höchste Risiko haben Individuen mit mehreren oder jung erkrankten Verwandten [5].

1.1.2. Molekulare Mechanismen des KRK

Die Mehrheit der KRK gehen in einem mehrstufigen Prozess genetischer Veränderungen aus Adenomen hervor (Adenom-Karzinom-Sequenz). Fearon und Vogelstein beschrieben 1990 die genetischen Schritte, welche von der Transformierung normalen Epithels über hyperproliferatives Epithel sowie frühe, intermediäre und späte Adenome zur Entstehung eines KRK führen [6]. Seitdem hat sich das Verständnis der molekularen Pathogenese des KRK erheblich weiterentwickelt. Heute geht man davon aus, dass verschiedene molekulare Mechanismen existieren, welche über genetische und epigenetische Veränderungen zur Entstehung des KRK führen. Neben epigenetischen Veränderungen, wie DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Umstrukturierung des Chromatins, trägt die genomische Instabilität maßgeblich zur Pathogenese bei. Je nach Art der genomischen Instabilität können KRK in Tumore mit *Chromosomaler Instabilität* (CIN) und Tumore mit *Mikrosatelliteninstabilität* (MSI) unterteilt werden. CIN ist die häufigste Form der genomischen Instabilität und betrifft tubuläre Adenome. Sie wird in etwa 85% der KRK gefunden und ist durch Aneuploidie und Chromosomenbrüchen mit Zugewinnen oder Verlusten an chromosomalem Material charakterisiert. Beinahe alle CIN-Tumore weisen Mutationen im APC-Gen auf. Häufig sind Mutationen von KRAS und p53 sowie ein 18q-Allelverlust vorhanden. Dagegen sind serratierte Adenome mit MSI und aberranter DNA Methylierung assoziiert. MSI-Tumore machen ca. 15% der KRK aus und sind charakterisiert durch einen Funktionsverlust des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems. Die Tumore zeigen häufig eine BRAF-Mutation. Mutationen im KRAS-Gen sind selten. Die Tumore haben verglichen mit CIN-Tumoren eine bessere Prognose [7,8].

Als Ergebnis eines internationalen Konsortiums von 2015, mit dem Ziel für das KRK eine einheitliche Klassifikation zu etablieren, unterteilten Guinney et al. das KRK in 4 Subtypen, die *Consensus Molecular Subtypes* (CMS). CMS1-Tumore machen dabei 14% der KRK aus und sind charakterisiert durch MSI, Hypermethylierung und eine ausgeprägte Immunsystemaktivierung. Hier wird das schlechteste Überleben nach einem Rezidiv beobachtet. Mit 37% ist der CMS2-Subtyp am häufigsten. Die Tumore zeigen eine epitheliale Differenzierung und eine Aktivierung des Wnt und MYC Signalwegs. Der CMS3-Subtyp (13%) weist eine epitheliale Differenzierung und insbesondere eine

metabolische Dysregulation auf. Etwa 23% der KRK werden als CMS4 klassifiziert. Die Tumore sind durch *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) Aktivierung, Strominfiltration und Angiogenese gekennzeichnet. Die Patienten zeigen das schlechteste rezidivfreie und Gesamtüberleben [9].

Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des KRK spielen der RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR und Wnt/ β -Catenin Signalweg.

Der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg ist sowohl in die Pathogenese als auch in die Progression des KRK involviert und bietet Angriffspunkte für die Anti-Krebstherapie. Die Aktivierung von *Rat Sarcoma Oncogene Homolog* (RAS) durch Oberflächenrezeptoren, wie den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), führt zur Bindung an und Aktivierung von *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase* (RAF). Infolge aktiviert RAF wiederum *MAPK Kinase* (MEK), was im Ergebnis zur Aktivierung von *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) 1 und 2 führt. Als Folge der Aktivierung fördert der Signalweg insbesondere Zellproliferation sowie Migration, *epithelial-mesenchymale Transition* (EMT) und Überleben von Krebszellen. KRAS ist ein Mitglied der RAS-Familie und ein wichtiges Onkogen für die KRK-Entstehung. Aktivierende Mutationen werden in 35 - 45% der KRK gefunden. Weitere Mutationen des Signalwegs betreffen RAF, insbesondere die Isoform BRAF. Hier finden sich bei 10 - 15% der KRK-Patienten Mutationen [7,10,11].

Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg ist an verschiedenen zellulären Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, Proliferation, Migration und Überleben, beteiligt. *Phosphatidylinositid-3-Kinase* (PI3K) wird durch Tyrosinkinasen, wie EGFR, oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie RAS, aktiviert. Aktiviertes PI3K phosphoryliert *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat* (PIP₂) zu *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat* (PIP₃). Hierbei dient der Tumorsuppressor *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) als negativer Regulator. PIP₃ aktiviert wiederum *Proteinkinase B* (Akt). Neben der Aktivierung von *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) aktiviert und inhibiert Akt zahlreiche Substrate. Mutationen im PI3K/Akt/mTOR Signalweg werden bei etwa 40% der KRK-Patienten beobachtet. Häufig betroffen sind PI3K und PTEN. Ein Drittel der KRK-Patienten weisen aktivierende Mutationen im PIK3CA-Gen auf, welches die katalytische Untereinheit von PI3K kodiert. Daneben zeigen 10 - 15% der Patienten mit KRK eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs infolge einer inaktivierenden Mutation im PTEN-Gen [7,10,11].

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg spielt bei der Embryogenese eine Schlüsselrolle. Daneben ist er in die Pathogenese verschiedener Krebsentitäten involviert. Die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs für die Krebsentstehung ist insbesondere für das KRK belegt.

Intrazelluläres β -Catenin wird in Abwesenheit von Wnt durch einen Destruktionskomplex reguliert. Der Komplex bestehend aus Axin, *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), *Glycogen Synthase Kinase-3 β* (GSK3 β) und *Casein Kinase 1* (CK1) bindet an β -Catenin, wodurch dieses abgebaut wird. Bindet Wnt an den Frizzled Rezeptor und seinen Ko-Rezeptor *Lipoprotein Receptor-related Proteins* (LRP), wird der Destruktionskomplex inhibiert. In der Folge kommt es zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin. Durch Translokation von β -Catenin in den Zellkern und Bindung an die Transkriptionsfaktoren *T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor* (TCF/LEF) kommt es zur Genexpression. Die Inaktivierung von APC wird bei 85% der KRK beobachtet. APC-Mutationen werden bereits in frühen Tumorstadien gefunden und sind mit klassischen tubulären Adenomen sowie CIN-Tumoren assoziiert [7,10,11].

1.1.3. Staging und Grading des KRK

Entscheidend für die Prognose des KRK sind Staging und Grading der Tumore. Das Grading beschreibt die histologische Differenzierung des Tumors anhand des Anteils vorhandener Drüsenstrukturen. Dabei werden gut differenzierte (G1: >95%), moderat differenzierte (G2: 50 - 95%), schlecht differenzierte (G3: 5 - 50%) und undifferenzierte (G4: <5%) Tumore unterschieden. Das Staging wird anhand der TNM-Klassifikation durchgeführt und beurteilt die Ausdehnung des Primärtumors (T-Kategorie), Lymphknoten- (N-Kategorie) und Fernmetastasen (M-Kategorie) (Tabelle 1) [12,13].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des KRK.

T-Kategorie	
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Infiltration anderer Organen oder Strukturen und / oder Perforation des viszeralen Peritoneums
N-Kategorie	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 - 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in ≥ 4 regionären Lymphknoten
M-Kategorie	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.2. Metastasierung des KRK

Metastasen sind Hauptursache für Therapieversagen und Mortalität beim KRK. Zum Zeitpunkt der Diagnose befindet sich rund ein Viertel der Patienten mit KRK in einem metastasierten Krankheitsstadium [14]. Dabei ist die Leber das am häufigsten von Metastasen betroffene Organ. Etwa 21,4 - 29,3% der KRK-Patienten entwickeln Lebermetastasen. Ein synchroner Befall zeigt sich bei 14,5 - 18,8% der Patienten, weitere 8,1 - 12,8% entwickeln einen metachronen Befall. Das mediane Überleben nach der Diagnose hepatischer Metastasen beträgt etwa 10,7 Monate [15,16].

Die Inzidenz synchroner pulmonaler KRK-Metastasen beträgt je nach Studie etwa 6,5 - 11,0% [17-19]. Rektumkarzinome metastasieren häufiger pulmonal als Kolonkarzinome. Bei Diagnose weisen etwa 10 - 18% der Patienten mit Rektumkarzinom und rund 5 - 6% der Patienten mit Kolonkarzinom Lungenmetastasen auf [20]. Das kumulative Risiko, nach kurativer Resektion metachrone Metastasen in der Lunge zu entwickeln, beträgt nach 1 Jahr 0,9% und nach 5 Jahren 5,8%. Der Zeitraum von Diagnose des Primärtumors bis zur Diagnose pulmonaler Metastasen beträgt im Median 24,6 Monate [17].

Seltenere Lokalisationen kolorektaler Metastasen sind Knochen und Gehirn. Knochenmetastasen finden sich bei 1,1 - 2,8% der Patienten mit KRK. Davon zeigen rund die Hälfte eine synchrone, die andere Hälfte eine metachrone Metastasierung [21,22]. Bei 10,4% aller Patienten mit metastasiertem KRK sind Knochen befallen. Rektumkarzinome metastasieren doppelt so häufig in Knochen (16,1%) wie Kolonkarzinome (8,6%). Ab Zeitpunkt der Diagnose beträgt das mediane Überleben 17,8 - 21 Monate [21,23]. Metastasen im Gehirn entwickeln 0,6 - 3,2% der Patienten mit KRK [24]. Das mediane Überleben ab Diagnose der Metastasen beträgt 19 Monate [23].

Während die Entstehung des KRK zu großen Teilen verstanden wird, verbleiben die zugrundeliegenden Mechanismen seiner Metastasierung noch weitgehend ungeklärt. Das Metastasierungsmodell nach Fidler und Valastyan beschreibt verschiedene Schritte, die eine Krebszelle für die Bildung distanter Metastasen durchlaufen muss: 1) Lokale Invasion, 2) Intravasation, 3) Überleben in der Zirkulation, 4) Arrest in distanten Organen und Extravasation, 5) Bildung von Mikrometastasen und 6) Kolonisierung [25]. Wichtige Signalwege hierbei sind insbesondere der EGF/RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, HGF/Met, Wnt/ β -Catenin und VEGF Signalweg [11].

1.2.1. Peritoneale Metastasierung des KRK

Peritoneale Metastasen nehmen unter den KRK-Metastasen eine Sonderstellung ein. Sie unterscheiden sich in Hinblick auf Pathogenese, Prognose und Therapie von den bereits genannten Metastasen.

1.2.1.1. Aufbau und Funktion des Peritoneums

Das Peritoneum kleidet als seröse Haut die Bauchhöhle (Cavitas peritonealis) aus. Es besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel, dem Mesothel, welches einer dünnen Bindegewebsschicht aufsitzt, der Lamina propria. Es werden das viszerale und das parietale Peritoneum unterschieden. Während das viszerale Peritoneum die Organe der Bauchhöhle umhüllt, kleidet das parietale Peritoneum die Bauchwand von innen aus. Der Übergang vom parietalen ins viszerale Peritoneum befindet sich an den Mesenterien der jeweiligen Organe. Die gesamte Oberfläche des Bauchfells beträgt annähernd 2m².

Eine wichtige Funktion der Mesothelzellen ist die Sekretion peritonealer Flüssigkeit, welche die Reibung zwischen den sich bewegenden, viszeralen Organen reduziert. Bei Gesunden befindet sich 50 - 100ml Flüssigkeit in der Bauchhöhle. Sie enthält neben Wasser Elektrolyte, Proteine, Phospholipide und Zellen. Im Rahmen von malignen Geschehen kann die Menge der peritonealen Flüssigkeit erheblich gesteigert sein und wird dann als Aszites definiert. Der Raum zwischen Mesothel und den submesothelialen Kapillaren wird als Blut-Peritoneum-Schranke bezeichnet. Sie verhindert die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffe in die Bauchhöhle.

Lymphatische Stomata sind schmale Öffnungen lymphatischer Kapillare und dienen der Immunregulation und der aktiven Absorption von Flüssigkeit und Zellen. Sie sind im Peritoneum, insbesondere im Omentum majus, in der Appendix epiploica, in der peritonealen Seite des Zwerchfells, im Ligamentum falciforme, im Douglas-Raum und im Dünndarmmesenterium lokalisiert. Um diese lymphatischen Stomata können sogenannte „Milky Spots“ gefunden werden. Diese Aggregationen immunkompetenter Zellen resorbieren peritoneale Flüssigkeit durch deren Stomata und dienen als Zugang für und Versorger von Makrophagen für die Bauchhöhle [26].

1.2.1.2. Häufigkeit peritonealer Metastasen

Nach Leber und Lunge ist das Peritoneum die dritthäufigste Lokalisation kolorektaler Metastasen. Etwa 8,3 - 12,7% der Patienten mit KRK entwickeln ein *peritoneal metastasiertes KRK* (pmKRK). Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 4,3 - 7,8% einen

Befall des Bauchfells auf. Bei rund 58,4% dieser Patienten beschränken sich die Metastasen dabei ausschließlich auf das Peritoneum. Etwa 41,6% zeigen daneben auch Metastasen in weiteren Organen. Neben der synchronen peritonealen Metastasierung entwickeln rund 3,5 - 4,9% der KRK-Patienten ein metachrones pmKRK. Die mediane Dauer von initialer Diagnose bis zum Nachweis metachroner peritonealer Metastasen beträgt rund 16 Monate [27-29]. Insgesamt metastasieren Kolonkarzinome häufiger als Rektumkarzinome in das Peritoneum (10,5% versus 4,2%) [27].

Folgende weitere Faktoren gehen mit einem erhöhten Risiko peritonealer Metastasierung einher: Rechtsseitig lokalisierter Primärtumor, Tumorausbreitung (T3/T4), befallene Lymphknoten (N1/N2), venöse und perineurale Invasion, schlecht differenzierter und undifferenzierter Primärtumor (G3/G4), muzinöse Adenokarzinome, junges Alter bei Diagnose (<60 Jahre) sowie unvollständige Resektion des Primärtumors und Lebermetastasen bei Primärdiagnose [14,27,28].

1.2.1.3. Molekulare Mechanismen der peritonealen Metastasierung

Um peritoneale Metastasen zu entwickeln, müssen Tumorzellen mehrere Schritte der Metastasierung durchlaufen: Dissemination vom Primärtumor, peritonealer Transport, Adhäsion an das distale Peritoneum, Invasion in den subperitonealen Raum und schließlich Proliferation am Zielort und Angiogenese (Abbildung 1) [30].

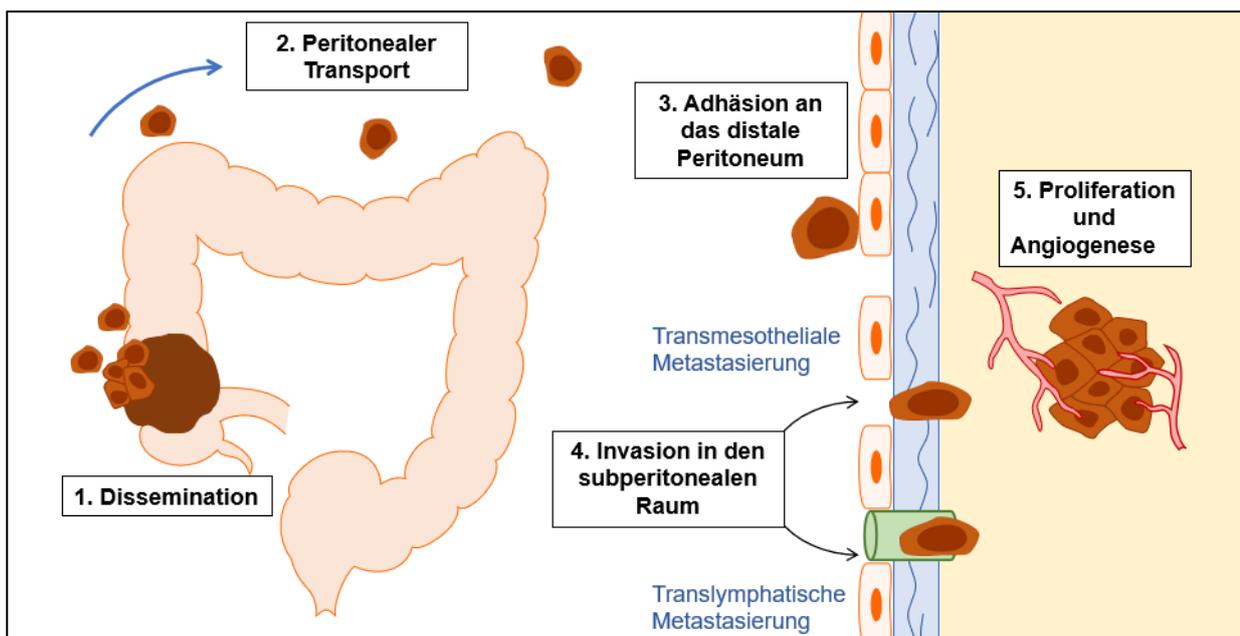


Abbildung 1: Peritoneale Metastasierungskaskade. Weg kolorektaler Tumorzellen beginnend mit der Tumorzell-dissemination vom Primärtumor und dem peritonealen Transport, über die Adhäsion der Tumorzellen an das distale Peritoneum und die Invasion in den subperitonealen Raum bis zur Proliferation und Angiogenese der peritonealen Metastase.

Dissemination

Am Anfang der peritonealen Metastasierungskaskade steht das Lösen von Tumorzellen oder Tumorzellaggregationen aus dem Primärtumor. Dies kann ohne äußere Einwirkung (spontan) und im Rahmen eines operativen Eingriffs (iatrogen) geschehen.

Voraussetzung für das spontane Loslösen von Tumorzellen ist die Invasion der Serosa. Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten spielt hierbei eine zentrale Rolle. Die EMT beschreibt einen reversiblen Prozess, in dem epitheliale Zellen Zellkontakte auflösen, ihre typische apiko-basale Polarität verlieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose entwickeln und einen mesenchymalen Phänotyp mit migratorischen und invasiven Eigenschaften aufzeigen [31]. Shelygin et al. wiesen bei 95% der pmKRC EMT nach und zeigten, dass peritoneale Metastasen mit einem mesenchymalen Phänotyp assoziiert sind [32]. Herunterregulieren von E-cadherin sowie Hochregulieren des mesenchymalen N-cadherins führen zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und sind Kennzeichen der EMT. Für das KRC, wie für weitere epitheliale Tumore, ist herunterreguliertes E-cadherin mit der Entwicklung von Metastasen assoziiert [33,34]. Ferner wurde gezeigt, dass ein erhöhter intestinaler Flüssigkeitsdruck das spontane Tumorzellablösen begünstigt. Intestinaler Druck wird unter anderem gesteigert durch hohen osmotischen Druck, gesteigerte Gefäßpermeabilität und Perfusion, schnelles Zellwachstum, ineffiziente Lymphdrainage und gesteigerte Produktion *extrazellulärer Matrix* (EZM) [30,35,36].

Neben dem spontanen Herauslösen ist eine iatrogene Aussaat von Tumorzellen möglich. Eine unbeabsichtigte Ruptur oder Öffnen des Primärtumors sowie die Verschleppung von Tumorzellen durch durchtrennte Lymph- und Blutgefäße im Rahmen eines operativen Eingriffs ermöglichen Tumorzellen Zugang zur peritonealen Höhle [37,38].

Peritonealer Transport

In der Cavitas peritonealis angekommen, werden die Tumorzellen vom vorherrschenden Fluss peritonealer Flüssigkeit erfasst. Änderungen des intra-abdominellen Drucks während der Respiration, Schwerkraft und Darmperistaltik bedingen diesen Fluss. Dadurch erhöht sich das Risiko für peritoneale Metastasen in folgenden anatomischen Lokalisationen: subdiaphragmale Region, Bursa omentalis, Mesenterium, Zwerchfell und parakolische Rinne [30]. Erleichtert wird die intraperitoneale Verteilung von Krebszellen durch muzinösen Aszites. In diesem Fall wird eine abweichende Verteilung peritonealer Metastasen beschrieben [30,39,40].

Adhäsion an das distale Peritoneum

Die Lokalisation peritonealen Befalls hängt neben dem peritonealen Transport von molekularen Eigenschaften sowohl zirkulierender Tumorzellen als auch des Zielgewebes ab. Zwei Wege peritonealer Metastasierung werden unterschieden: die transmesotheliale und die translymphatische Metastasierung.

Bei der transmesothelialen Metastasierung haften Tumorzellen direkt am Mesothel an. Dabei spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle. Tumorzellen sind in der Lage, mit von Mesothelzellen exprimierten Adhäsionsmolekülen zu interagieren: *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) und *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1). Diese spielen insbesondere für Entzündungen des Bauchraums eine Schlüsselrolle. Ziprin et al. zeigten in einer in vitro Studie die Interaktion zwischen mesotheliale ICAM-1 und dem vom Tumor exprimierten *Cluster of Differentiation 43* (CD43) und die dadurch vermittelte Tumor-Mesothel-Adhäsion [41]. Proinflammatorische Zytokine, wie der *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α), *Interleukin-1 β* (IL-1 β), IL-6 und Interferon- γ verstärken die Adhäsion kolorektaler Tumorzellen an das Mesothel durch die Hochregulierung von ICAM-1, VCAM-1 und CD44 [42-44]. Die Zytokine werden als Reaktion auf einen operativen Eingriff freigesetzt oder von zirkulierenden Tumorzellen sezerniert. Das Glykosaminoglykan Hyaluron wird von Mesothelzellen sezerniert und dient als Schutzschild gegen Infektionen. Das häufig auf Tumorzellen exprimierte Adhäsionsmolekül CD44 ist in der Lage, extrazelluläres Hyaluron zu binden. Die Bedeutung dieser Interaktion für die peritoneale Metastasierung wurde bereits für das KRK, das Magen- und das Ovarialkarzinom gezeigt [30,45-47].

Während der translymphatischen Dissemination gelangen freie Tumorzellen über lymphatische Stomata zu submesothelial gelegenen Lymphgefäßen. „Milky Spots“ dienen durch ihre hoch vaskularisierte Mikroumgebung und die Produktion von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) als Nährboden für Tumorwachstum [30,48,49].

Invasion in den subperitonealen Raum

Um in den subperitonealen Raum zu gelangen, müssen die Tumorzellen das Mesothel durchdringen. Bereiche, an denen die Kontinuität des Bauchfells geschädigt ist, erleichtern den Tumorzellen die Invasion in den subperitonealen Raum. Verschiedene proinflammatorische Zytokine (IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , *Epidermal Growth Factor* (EGF)) induzieren das Abrunden von Mesothelzellen, wodurch die Basalmembran freigelegt wird [50]. Infolge können Tumorzellen mittels Integrin-Untereinheiten mit der Basalmembran

interagieren [51]. Der Verlust von Zellkontakten durch die veränderte Zellmorphologie wird durch malignen Aszites begünstigt. Außerdem kann das Mesothel durch Tumorzell-induzierte Apoptose abgebaut werden. Hierbei zeigten Heath et al. eine Beteiligung des Fas-Ligand/Fas-Rezeptor-Systems [30,52]. Proteasen wie die *Matrix Metalloproteinasen* (MMPs) und das Urokinase-Plasminogen-aktivierende-System ermöglichen den Tumorzellen, die Blut-Peritoneum-Schranke zu durchdringen. Die Produktion von MMPs durch Mesothelzellen wird infolge der Interaktion mit den Tumorzellen gesteigert [30,53].

Proliferation und Angiogenese

Damit aus einzelnen Tumorzellen eine makroskopische peritoneale Metastase entsteht, benötigen Tumorzellen die Fähigkeit zur Proliferation. Die Produktion von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren durch Tumor- und Stromazellen ermöglichen Zellteilung und somit Tumorwachstum. Wichtige Faktoren in diesem Prozess sind der EGFR und der *Insulin-like-Growth-Factor-1* (IGF-1) [54]. Mit zunehmender Tumormasse steigt der Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Ab einer Distanz von 150µm von den submesothelialen Kapillaren gelangen Sauerstoff und Nährstoffe nicht mehr ausreichend an die Tumorzellen. Daraus resultiert Hypoxie. Durch die Produktion pro-angiogener Faktoren, wie VEGF und *Hypoxia Inducible Factor-1α* (HIF-1α), induzieren Tumorzellen Angiogenese und decken somit ihre Blutversorgung [30,54-56].

1.2.2. Appendixkarzinom und seine peritoneale Dissemination

Eine besondere und seltene Form bösartiger Neubildungen des Kolons ist das Appendixkarzinom. Adenokarzinome stellen mit 58% die häufigste maligne Neoplasie des Appendix dar. Sie werden bei 0,1 - 0,2% aller Appendektomien beobachtet [57].

Die geltende WHO-Klassifikation differenziert Appendixkarzinome in Adenokarzinome und undifferenzierte Karzinome. Adenokarzinome werden wiederum in muzinöse Adenokarzinome, niedriggradige muzinöse Neoplasien der Appendix (*Low-grade Appendiceal Mucinous Neoplasia* (LAMN)) und Siegelringzellkarzinome unterteilt [57]. Die Zuordnung des LAMN als Unterform des Adenokarzinoms ist jedoch umstritten [58]. Es ist nur schwer vom Adenom abzugrenzen. Die Architektur des schleimbildenden Epithels wird als villös, serratiert oder undulierend (wellenförmig) beschrieben. Die Zellen sind muzinreich und weisen nur minimale bis geringe Atypien auf. Mitosen sind selten. Im Gegensatz zum muzinösen Adenokarzinom fehlen beim LAMN die typischen Merkmale einer infiltrativen Invasion, wie Invasion einzelner Zellen, desmoplastische

Stromareaktion und Tumor Budding [59,60]. LAMN zeigen ein langsames Wachstum und manifestieren sich häufig im klinischen Bild eines *Pseudomyxoma peritonei* (PMP).

Als typische Manifestation perforierter, muzinöser Appendixtumore beschreibt das PMP eine intraperitoneale Muzinansammlung, welche häufig Begleiterscheinungen wie malignen Aszites, peritoneale Implantationen, ein durchmetastasiertes Omentum („omental cake“) oder Beteiligung der Ovarien aufweist [58]. Etwa 20% aller Patienten mit muzinösen Tumoren des Appendix entwickeln ein PMP [61].

1.2.3. Therapieoptionen des pmKRK

Das pmKRK ist mit einer schlechten Prognose von nur wenigen Monaten assoziiert. Das mediane Überleben bei „Best Supportive Care“ beträgt lediglich 5 Monate [62]. Lange Zeit wurden peritoneale Metastasen als therapierefraktäres Endstadium angesehen. Als Behandlungsoption blieben allenfalls palliative Maßnahmen. Inzwischen hat sich dieses Bild durch die Einführung lokoregionärer Behandlungsmaßnahmen, neuer Therapeutika und multimodaler Therapieansätze gewandelt.

Das Ausmaß des peritonealen Befalls spielt für Prognose und Therapie des pmKRK eine entscheidende Rolle. Zur Quantifizierung stehen verschiedene Scoring-Systeme zur Verfügung. Am häufigsten findet der *Peritoneal Cancer Index* (PCI) Anwendung (siehe Abbildung 2) [63].

	Region	Lesion Size Score	Lesion Size Score	
	0. Zentrum	_____	LS0	kein Tumor
	1. Rechts oben	_____	LS1	Tumor bis 0,5cm
	2. Epigastrium	_____	LS2	Tumor von 0,5 bis 5,0cm
	3. Links oben	_____	LS3	Tumor größer 5,0cm oder Konfluenz
	4. Linke Flanke	_____		
	5. Links unten	_____		
	6. Becken	_____		
	7. Rechts unten	_____		
	8. Rechte Flanke	_____		
	9. Oberes Jejunum	_____		
	10. Unteres Jejunum	_____		
	11. Oberes Ileum	_____		
12. Unteres Ileum	_____			
PCI	_____			

Abbildung 2: Bestimmung des Peritonealen Cancer Index (PCI) nach Sugarbaker [63]. Zur Beurteilung des Ausmaßes peritonealen Befalls wird der Bauchraum in 13 Kompartimente unterteilt. In jedem Kompartiment wird die Größe vorhandener Tumore mithilfe des Lesion Size Scores (LS0 bis LS3) beurteilt. Der maximal mögliche PCI beträgt 39.

1.2.3.1. Zytoreduktive Chirurgie und HIPEC

Weder die operative Entfernung peritonealer Metastasen noch die intraperitoneale Gabe von Chemotherapeutika bringen, isoliert angewandt, den erwünschten Therapieerfolg. Erst ihre Kombination kann das Überleben von pmKRK-Patienten verlängern.

Die Vorgehensweise der zytoreduktiven Chirurgie wurde 1995 von Paul Sugarbaker formuliert. Ziel der Zytoreduktion ist die operative Entfernung aller sichtbaren Tumore [64]. Tumorbefallenes Bauchfell wird im Sinne einer Peritonektomie reseziert. Häufig sind weitere Organresektionen nötig: Cholezystektomie, Splenektomie, Magenteilresektion, Dünndarmresektion, Sigmoidektomie, Appendektomie, rechtsseitige oder totale Kolektomie, Hysterektomie und Salpingo-Oophorektomie [65]. Falls vorhanden, wird der Primärtumor mit entfernt. Entscheidend für den Erfolg der nachfolgenden, intraperitonealen Chemotherapie ist die Vollständigkeit der Zytoreduktion. Lokal applizierte Chemotherapeutika zeigen eine Gewebepenetrationstiefe von lediglich 0,2 - 3mm. Somit ist die Entfernung aller Tumore >2,5mm Voraussetzung für eine effiziente intraperitoneale Chemotherapie [66]. Die Vollständigkeit der Zytoreduktion wird mithilfe des *Completeness of Cytoreduction*-(CC)-Scores klassifiziert. Dabei gelten CC-0 (keine sichtbaren Tumorreste) und CC-1 (Tumorreste <2,5mm) als komplette Zytoreduktion, CC-2 (Tumorreste 2,5mm - 2,5cm) und CC-3 (Tumorreste >2,5 cm) als unvollständig [63]. Ziel der intraperitonealen Chemotherapie ist die Entfernung verbliebener mikroskopischer Tumorreste nach der makroskopischen Tumorresektion. Die peritoneale Applikation von Chemotherapeutika erfolgt meist als *hypertherme intraoperative* (HIPEC) oder als *normotherme früh-postoperative intraperitoneale Chemotherapie* (EPIC). Die intraperitoneale Gabe ermöglicht hohe lokale Konzentrationen bei geringer systemischer Toxizität. Die HIPEC nutzt zusätzlich den zytotoxischen Effekt der Hyperthermie auf Krebszellen [67,68]. Für einige Chemotherapeutika wird eine Steigerung von Zytotoxizität und Tumorgewebepenetration beobachtet. Dazu zählen unter anderen Mitomycin C, Doxorubicin und Platinverbindungen [68,69]. Der Synergismus zwischen Hyperthermie und Wirkstoff wird ab einer Temperatur von 39°C berichtet [66,70]. Für die HIPEC ideale Chemotherapeutika sollten ein hohes Molekulargewicht, welches die Passage durch die Blut-Peritoneum-Schranke reduziert, eine hohe Clearance und eine Wirkverstärkung durch Hyperthermie aufweisen. Zellzyklus unspezifische Wirkstoffe sind aufgrund der einmaligen Anwendung geeignet [65,66]. Für die HIPEC-Behandlung des pmKRK häufig angewandte Chemotherapeutika sind Mitomycin C, 5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin und

Cisplatin. Die Dauer der HIPEC beträgt 30 - 120min, die Temperatur liegt bei 40 - 44°C [71,72].

Je nach Studie beträgt das mediane Überleben bei pmKRK etwa 16 - 51 Monate und das 5-Jahresüberleben rund 22 - 40% nach Zytoreduktion und HIPEC [65]. Das Ausmaß des peritonealen Befalls und die Vollständigkeit der Zytoreduktion beeinflussen dabei den Therapieerfolg maßgeblich: Elias et al. zeigten ein medianes Überleben von 40 Monaten für pmKRK-Patienten mit einem PCI 1-6, von 29 Monaten bei PCI 7 - 12, von 25 Monaten bei PCI 13 - 19 und lediglich von 18 Monaten für PCI >19. Ein medianes Überleben von 33 Monaten wurde bei CC-0-Resektionen erreicht, während es bei CC-1-Resektionen 20 Monate und lediglich 7 Monate bei inkompletter Zytoreduktion ($CC \geq 2$) betrug [71]. Auch für das peritoneal disseminierte Appendixkarzinom konnte in zahlreichen Studien ein verbessertes Überleben nach Zytoreduktion und HIPEC gezeigt werden. Hier wird ein medianes Gesamtüberleben von 69 - 144 Monaten und ein 10-Jahresüberleben von 70% berichtet [73-76].

Die Therapiedauer von Zytoreduktion und HIPEC beträgt im Schnitt 6 - 8,5 Stunden [72,77,78]. Häufig werden großflächige Peritonektomien und Multiorganresektionen durchgeführt. Ein erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko im Rahmen des Eingriffs ist die Konsequenz. Schwere Komplikationen ereignen sich bei 18 - 39% der Patienten. Häufige Komplikationen sind Leukopenie, gastrointestinale Fisteln, Abszesse, Blutungen, Pneumonie, Sepsis und Pankreatitis [71,72,77]. Die Mortalität beträgt je nach Studie 0 - 6% [65]. Daher sollten Risiko und Nutzen des Eingriffs individuell abgewogen werden. Folgende Auswahlkriterien werden in der Literatur für das pmKRK vorgeschlagen: ein *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)-Performance Status ≥ 2 , kein Nachweis extraabdomineller Metastasen, maximal 3 kleine, resektable Lebermetastasen, ein fehlender Nachweis biliärer oder urethraler Obstruktion, intestinale Obstruktion an maximal einer Stelle und geringer Dünndarmbefall ohne großflächigen Befall der Mesenterien sowie kein großvolumig betroffenes Ligamentum hepatogastricum [79].

1.2.3.2. Systemische Chemotherapie

Während in den USA lediglich rund 5% aller Patienten mit pmKRK mittels Zytoreduktion und HIPEC behandelt werden, werden über 90% mit palliativer Chemotherapie behandelt, gegebenenfalls in Kombination mit biologischen Wirkstoffen, wie Bevacizumab und Cetuximab [80]. Für die systemische Behandlung des metastasierten

KRK sind sowohl klassische Chemotherapeutika (5-FU, Capecitabin, Irinotecan, Oxaliplatin), als auch zielgerichtete Therapeutika (Bevacizumab, Cetuximab) zugelassen.

1.2.3.2.1. Klassische Chemotherapie

Zytotoxische Chemotherapeutika entfalten ihre Wirkung durch die Hemmung von Zellteilung. Die Gruppe der klassischen Chemotherapeutika beinhaltet unter anderen Alkylantien, Platinanaloga, Interkalantien, Antibiotika, Mitosehemmer, Taxane, Topoisomerasehemmer und Antimetabolite.

5-Fluorouracil (5-FU)

Der in den 1950er Jahren entwickelte Antimetabolit *5-Fluorouracil* (5-FU) findet weite Anwendung in der Krebstherapie, zeigt jedoch die größte Wirkung bei der Behandlung des KRK. 5-FU ist ein Uracil-Analogon. Intrazellulär wird es in seine aktiven Metabolite umgewandelt. Die zytotoxische Wirkung von 5-FU wird durch den Fehleinbau dieser Fluoronukleotiden in RNA und DNA sowie durch die Inhibition der *Thymidylat-Synthase* (TS) vermittelt. Die TS ist als einzige de novo Quelle von Thymidylaten essentiell für DNA-Replikation und -Reparatur.

Die Chemotherapie mit 5-FU wird in der Regel in Kombination mit Folinsäure (Leucovorin) durchgeführt. Leucovorin verstärkt die Inhibition der TS. Capecitabine ist ein Prodrug von 5-FU und wird mittels Thymidinphosphorylase und Uridinphosphorylase in 5-FU umgewandelt. Beide Enzyme zeigen höhere Aktivität in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe. Durch die Umwandlung im Tumor wird Capecitabine besser vertragen und verursacht seltener schwere Nebenwirkungen als 5-FU [81].

Oxaliplatin

Oxaliplatin gehört zur Klasse der Platinkomplexe. Durch Bildung von Querverbindungen stört Oxaliplatin die Zellreplikation und Transkription und führt zu Apoptose. Diese Querverbindungen kommen innerhalb eines DNA-Strangs, zwischen benachbarten DNA-Strängen und zwischen DNA und Proteinen vor [82]. Dabei erhöht der *1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand* (DACH-Ligand) die Toleranz der Zelle gegenüber DNA-Platin-Addukten. Darüber hinaus hemmen aus Oxaliplatin gebildete DACH-Platin-Addukte die DNA-Synthese. Oxaliplatin wurde initial 1996 in Frankreich und kurz darauf 1999 in ganz Europa für die Behandlung des fortgeschrittenen KRK eingeführt. In den USA wurde es 2002 zugelassen [83]. Heute ist Oxaliplatin Teil der First-Line-Therapie für die Behandlung des metastasierten KRK.

Irinotecan

Irinotecan (CPT-11) gehört zur Klasse der Topoisomerase-I-Inhibitoren. Irinotecan wird mittels des Carboxylesterase-Converting-Enzyms in sein biologisch aktives Metabolit *7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin* (SN-38) gewandelt. SN-38 zeigt im Vergleich zu seiner Prodrug eine tausendfach stärkere Potenz, den Komplex aus Topoisomerase-I und DNA zu stabilisieren, um somit die Aktivität der Topoisomerase-I zu hemmen. Die Inhibition resultiert in Doppelstrangbrüchen der DNA, welche zu Abbruch der DNA-Replikation und Apoptose führen. Da der zytotoxische Effekt von Irinotecan an der DNA-Synthese ansetzt, wird dieses als S-Phase-spezifisches-Therapeutikum klassifiziert [84]. Initial wurde Irinotecan 1998 in den USA als Second-Line-Behandlung des metastasierten KHK zugelassen. Inzwischen ist eine Kombinationstherapie aus Irinotecan, 5-FU und Leucovorin Mittel der ersten Wahl für diese Patientengruppe.

1.2.3.2.2. Zielgerichtete Therapie

Klassische Chemotherapeutika richten sich gegen schnell proliferierende Zellen und attackieren somit neben Krebszellen körpereigene Zellen mit physiologisch hoher Zellteilung. Dagegen greifen zielgerichtete Therapeutika an spezifischen Schlüsselmolekülen der Krebsentstehung und -progression an. Indem derartige Moleküle (z.B. VEGF, EGFR, RAF, MEK, mTOR) blockiert werden, sollen gesunde Zellen geschont und Nebenwirkungen reduziert werden. Monoklonale Antikörper und „Small Molecules“ sind die beiden Hauptgruppen der zielgerichteten Krebstherapie.

VEGF-Inhibitor (Bevacizumab)

VEGF ist ein wichtiges Signalmolekül, welches physiologische wie auch pathologische Angiogenese induziert. Die Familie der VEGFs beinhaltet VEGF-A, -B, -C und -D, welche an drei *VEGF-Rezeptor* Tyrosinkinasen (VEGFR-1, -2, -3) und Neuropiline binden. Die Bindung von VEGF an VEGFR führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung verschiedener Signalwege. Neben den Endothelzellen exprimieren auch Tumorzellen VEGFR und reagieren auf autokrines wie auf parakrines VEGF. Der Hauptstimulus für die VEGF-Produktion in Tumorzellen ist die Hypoxie. Als Antwort auf Hypoxie binden *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) und HIF-1 α an den VEGF-Promotor und induzieren die Transkription von VEGF [85,86]. Der auf Endothelzellen exprimierte VEGFR-2 ist der entscheidende Mediator für die VEGF induzierte Angiogenese. Durch VEGF-A aktiviert, induziert VEGFR-2 die Proliferation und

Migration der Endothelzellen und erhöht die vaskuläre Permeabilität über verschiedene Signalwege, wie FAK/Paxillin, p38/MAPK und PI3K [85,87-89]. VEGFR-1 scheint für die Angiogenese weniger bedeutsam, fördert dagegen in Tumorzellen durch die Aktivierung von ERK1/2 und *c-Jun NH2-terminal Kinase* (JNK), Wachstum, Migration und Invasion. Die Interaktion von VEGF-C/D und VEGFR-3 ist für die Lymphangiogenese in Tumoren entscheidend [90-92]. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A, welches bevorzugt an VEGFR-1/-2 bindet. 2004 wurde Bevacizumab als First-Line-Behandlung des metastasierten KRK in Kombination mit 5-FU basierter Chemotherapie zugelassen [93].

EGFR-Inhibitoren (Cetuximab, Erlotinib)

Die Familie der EGFR besteht aus vier transmembranösen Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3) und HER4 (erbB-4). Die Rezeptoren werden durch die Bindung von Liganden (z.B. EGF, TGF- α) aktiviert, was wiederum in der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege resultiert. EGFR aktiviert unter anderem den PI3K/Akt/mTOR und den RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg, STAT, Proteinkinase-C und Phospholipase-D Signalweg. Eine Überexpression von EGFR wird in 27 - 77% aller KRK-Zellen vorgefunden [94].

Cetuximab ist ein chimärer Immunglobulin-G1 monoklonaler Antikörper, welcher gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet ist. Er hat eine hohe Spezifität und Affinität und inhibiert kompetitiv die Bindung endogener Liganden. Die Bindung von Cetuximab an EGFR inhibiert die Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor assoziierten Kinasen. Die Reduzierung von Zellwachstum und VEGF-Produktion, die Induktion von Apoptose sowie die Hemmung von Invasion und Metastasierung sind die Folge [95,96]. Cetuximab wurde 2004 von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) in Kombination mit Irinotecan für die Behandlung des EGFR-exprimierenden, metastasierten KRK bei Patienten mit Resistenz gegenüber Irinotecan-basierter Chemotherapie zugelassen. Neben dem metastasierten KRK ist Cetuximab auch für die Behandlung inoperabler Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Hals-Bereichs zugelassen.

Neben monoklonalen Antikörpern, wie Cetuximab und Panitumumab, hemmen auch Small Molecules, wie Erlotinib und Gefitinib, den EGFR. Erlotinib und Gefitinib sind selektive Inhibitoren des EGFR. Indem sie an die ATP-Bindungsstellen binden, inhibieren sie die Autophosphorylierung von EGFR und somit die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Beide sind für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

zugelassen. Erlotinib wird zusätzlich bei der First-Line-Behandlung von lokal fortgeschrittenem, unresektablem oder metastasiertem Pankreaskarzinom eingesetzt. Derzeit sind weder Gefitinib noch Erlotinib für die Behandlung des KRK zugelassen. Allerdings konnte durch zusätzliche Gabe von Erlotinib zu Capecitabin in einer Phase-II-Studie das progressionsfreie Überleben für KRAS-Wildtyp KRK-Patienten um 3,2 Monate verlängert werden [97]. KRAS-Mutationen sind in der Entwicklung von Resistenzen gegen Cetuximab involviert. KRAS mutierte KRK zeigen gegenüber EGFR-Inhibitoren ein vermindertes Therapieansprechen [98,99]. Rund 46% der pmKRK zeigen Mutationen im KRAS-Gen [100].

1.2.3.2.3. Outcome verschiedener systemischer Therapieregime

Derzeit existieren nur wenige randomisierte Studien, welche das Outcome verschiedener systemischer Therapeutika bei der Behandlung des pmKRK vergleichen. Insbesondere die schlechte Beurteilung kleiner Tumorknoten durch Schnittbildgebung erschwert die Evaluierung der Therapieresponse [101]. Im folgenden Abschnitt sind Überlebensdaten systemischer Therapieregime für pmKRK aus der Literatur zusammengetragen:

Für die Behandlung mit 5-FU und Leucovorin wird ein medianes Überleben von 8,9 - 12,6 Monaten festgestellt [62,102,103]. Das progressionsfreie Überleben beträgt 7,7 Monate [103]. Systemische Chemotherapieregime aus *Oxaliplatin, 5-FU und Leucovorin* (FOLFOX) erreichen ein medianes Gesamtüberleben von 16 - 18 Monaten und ein progressionsfreies Überleben von 11 Monaten bei der Behandlung von pmKRK-Patienten [104,105]. Die systemische First-Line Therapie mit FOLFOX zeigt sich in der Behandlung des pmKRK gegenüber der Behandlung mit *Irinotecan, 5-FU und Leucovorin* (FOLFIRI) oder mit Irinotecan und Oxaliplatin überlegen [104]. Die CAIRO- und CAIRO2-Studien von Klaver et al. ergaben ein medianes Gesamtüberleben von 10,4 Monaten für die sequenzielle Behandlung verschiedener Chemotherapeutika (First-Line: Capecitabine; Second-Line: Irinotecan; Third-Line: Oxaliplatin plus Capecitabine), 7,8 Monate für die kombinierte Therapie (First-Line: Irinotecan plus Capecitabine; Second-Line: Oxaliplatin plus Capecitabine), 15,2 Monate für Capecitabine plus Oxaliplatin plus Bevacizumab und 13,9 Monate für Capecitabine plus Oxaliplatin plus Bevacizumab plus Cetuximab [106].

Insgesamt zeigen zielgerichtete Therapeutika einen Überlebensvorteil gegenüber klassischer Chemotherapie. Während bei Franko et al. das mediane Überleben für Patienten mit zielgerichteten Therapeutika 30,3 Monate betrug, waren es bei klassischen

Chemotherapeutika lediglich 19,7 Monate [107]. Durch die Zugabe von Bevacizumab zur palliativen Chemotherapie konnten Razenberg et al. eine Verbesserung des medianen Überlebens von 7,5 auf 11 Monate zeigen [108]. Auch van Oudheusden et al. erreichten ein verbessertes Überleben durch die Gabe von Bevacizumab. Für metachrone pmKrk betrug das mediane Überleben 3,4 Monate ohne Therapie, bei Behandlung mit systemischer Chemotherapie 13 Monate und bei systemischer Chemotherapie plus Bevacizumab 20,3 Monate [109].

1.3. Prädiktive Biomarker

Hohe Kosten im Kontext der Behandlung von Krebspatienten stellen eine große volkswirtschaftliche Belastung dar. Im Jahr 2009 kosteten Krebserkrankungen die Europäische Union rund 126 Milliarden Euro. 10% der Krankheitskosten entfielen dabei auf das KKR, das damit an dritter Stelle steht. Die Onkologie verbraucht allein knapp ein Drittel der gesamten Krankenhausaussgaben; mit stets steigender Tendenz [110,111]. Die hohen Kosten neuer Therapeutika tragen maßgeblich dazu bei [112].

Neben der Entwicklung weiterer, hoch spezialisierter Krebstherapeutika ist es notwendig, die bestehenden therapeutischen Mittel optimal zu nutzen. Somit ist es erforderlich, ihren Nutzen für spezifische Patientensubgruppen und Krebsentitäten zu untersuchen. Prädiktive Biomarker können bei der Auswahl eines auf den jeweiligen Patienten zugeschnittenen Therapieregimes eine tragende Rolle spielen. Behandlungen mit unwirksamen Chemotherapeutika und damit verbundene Nebenwirkungen können so reduziert werden. Mit Blick auf die Intervention der KKR-Metastasierung können derartige Marker von Bedeutung sein, um neue Therapiekonzepte umzusetzen.

1.3.1. S100A4 in der Metastasierung und als Biomarker

Ein vielversprechender prädiktiver Marker ist das zur S100-Familie der Kalziumbindenden Proteine gehörende S100A4. Für das KKR und weitere Tumorentitäten wurde eine erhöhte S100A4-Expression in Tumorgewebe und Blut betroffener Patienten nachgewiesen. Hier zeigt S100A4 einen stark prognostischen Effekt. Für Krebspatienten sind hohe mRNA- und Protein-Level mit einem verkürzten Gesamt- und krankheitsfreien Überleben assoziiert. Außerdem wird für Patienten mit hoher S100A4-Expression ein aggressives Tumorstadium und die Bildung von Metastasen beobachtet [113-119].

S100A4 ist ein transkriptionales Zielgen von β -Catenin und ist im Zytoplasma, Zellkern und Extrazellularraum lokalisiert [119]. Es spielt in der Metastasierungskaskade durch Interaktion mit verschiedenen Signalwegen und Molekülen eine bedeutende Rolle.

S100A4 fördert die Expression von *Serum Amyloid A* (SAA)-1/-3 über *Toll-like Receptor 4* (TLR4) /NF- κ B. SAA-Proteine wiederum induzieren die Expression von *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Presumably Secreted* (RANTES), *Granulocyte-Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) und MMP-2, -3, -9, und -13. Ektopes SAA-Expression ist mit der Bildung von Metastasen assoziiert. Diese werden von einer starken Immunzell-Infiltration begleitet [114]. Durch die Interaktion von S100A4 mit *Receptor of Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) werden der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg aktiviert und das HIF-1 α Proteinniveau erhöht. In der Folge werden Migration und Invasion gefördert. Darüber hinaus wird die Motilität von Tumorzellen durch die direkte Interaktion von S100A4 mit Myosin-II gefördert [120-122]. Die S100A4-Expression korreliert mit Angiogenese und einer hohen Gefäßdichte in malignen Läsionen [123,124]. In Schilddrüsenkrebszellen unterdrückt das Silencing von S100A4 über Herunterregulieren von MMP-9 Zellinvasion und Metastasierung und durch Reduzierung der VEGF-Expression Angiogenese [123]. Semov et al. konnten zeigen, dass die Interaktion von extrazellulärem S100A4 mit Annexin-II, einem endothelialen Ko-Rezeptor von Plasminogen, die Konversion von Plasminogen zu Plasmin beschleunigt. Aktives Plasmin ist wiederum in der Lage MMPs zu aktivieren, welche gemeinsam mit Plasmin die EZM umgestalten und somit Angiogenese fördern [125]. Wang et al. vermuten, dass S100A4 mittels Hochregulation von MMP-13 Invasion und Angiogenese fördert [124]. Mehrere Studien stellten eine protektive Wirkung von S100A4 gegenüber proapoptotischen Stimuli fest [126-128]. Orre et al. zeigten, dass S100A4 im Zellkern mit dem Tumorsuppressor p53 interagiert und seine Degradation fördert [129].

Während der prognostische Wert von S100A4 für viele Krebsentitäten gezeigt werden konnte, existieren bislang nur wenige Studien, welche den prädiktiven Wert von S100A4 für das Therapieansprechen von Krebspatienten untersuchen. Johansson et al. zeigten für das Östrogen-positive Mammakarzinom, dass Rezidive unter Tamoxifen mit einer hohen S100A4-Expression assoziiert sind [130]. Für Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom lässt eine hohe S100A4-Expression auf eine höhere Rezidivrate nach adjuvanter Chemotherapie mit 5-FU und Cisplatin schließen [131]. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von S100A4 die p53-anhängige Apoptose unter Cisplatin-

Therapie steigert [129]. Für maligne Gliome stellten Liang et al. eine verbesserte Wirkung von Bevacizumab nach S100A4-Inhibition fest [132].

Zusammenfassend spielt S100A4 eine wichtige Rolle in verschiedenen Schritten der Metastasierung. Daher scheint es ein vielversprechender prädiktiver Marker für das Ansprechen diverser Therapeutika zu sein, auch mit Bedeutung für das pmKrk.

1.3.2. PDX-Modelle zur Evaluierung prädiktiver Marker

Für die Entwicklung und Evaluierung von Therapeutika und prädiktiven Markern stehen verschiedene präklinische Modelle zur Verfügung, wie etablierte Zelllinien, Organoide, karzinogeninduzierte, *genetisch manipulierte Mausmodelle* (GEMM) oder humanisierte Mausmodelle, aus *Zelllinien abgeleitete Xenograftmodelle* (CDX) sowie *Patienten-abgeleitete Xenograftmodelle* (PDX) und Metastasierungsmodelle. Alle Modelle bringen spezielle Vor- und Nachteile mit sich.

PDX-Modelle bieten die Möglichkeit, Tumorgewebe direkt aus Patienten in immundefiziente Mäuse zu transferieren, um somit stabil wachsende PDX-Tumore zu etablieren. Die Transplantation des Gewebes wird in der Regel subkutan durchgeführt, ist aber auch orthotop möglich. Wiederholtes Passagieren ermöglicht die Expansion der Tumormasse ohne *in vitro* Manipulation. Daneben erlauben PDX-Modelle Tumorwachstum in einem der humanen Tumormikroumgebung vergleichbaren Milieu. Sie erhalten die zelluläre Komplexität und Architektur. In den PDX-Tumoren bleibt ein Stroma-Kompartiment bestehen. Ferner sind die Tumore in der Lage, eigene Blutgefäße zu bilden. Dadurch können Therapeutika evaluiert werden, welche am Stroma, an der Stroma-Tumor-Interaktion oder der Angiogenese ansetzen. Genetische Vergleiche von Patiententumoren und den ihnen entsprechenden PDX-Tumoren, konnten den Erhalt der Mutationsprofile und der chromosomalen Architektur nachweisen.

Problematisch ist, dass nicht alle Tumore ein stabiles Wachstum im PDX aufweisen. Engraftmentraten von 20 - 100% werden für PDX-Modelle berichtet. Allerdings ist für PDX-Modelle des Kkrk die Engraftmentrate mit 43 - 100% verhältnismäßig hoch. Das gilt sowohl für Primärtumore als auch für Kkrk-Metastasen [133]. Auch konnte für PDX-Modelle des Kkrk in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass histologische, genetische und funktionelle Charakteristika der ihnen entsprechenden Patiententumore beibehalten werden [133]. Ferner konnten für das Kkrk bei der Testung verschiedener Therapeutika, wie 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan und Cetuximab, Übereinstimmungen im Therapieansprechen von PDX und Patient demonstriert werden [134]. Daher scheinen

PDX-Modelle, eine geeignete Plattform für die Evaluierung von Therapieansprechen und prädiktiven Biomarkern gerade auch des pmKRR zu sein.

1.4. Fragestellung und Zielsetzungen

Ziel der Promotionsarbeit ist es, anhand von PDX-Modellen das Therapieansprechen verschiedener Chemotherapeutika bei pmKRR vorherzusagen und den prädiktiven Wert des Biomarkers S100A4 zu evaluieren.

Zu diesem Zweck wurden PDX-Modelle etabliert (3.1) und Einflussfaktoren auf das Engraftment sowie wesentliche Charakteristika der Modelle untersucht. In einem zweiten Schritt wurde das Therapieansprechen der etablierten PDX-Modelle auf die Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Docetaxel, Bevacizumab, Cetuximab, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib evaluiert (3.2). Unterschiedliche Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen wurden analysiert. Die Expression des Biomarkers S100A4 im Tumorgewebe der PDX-Modelle wurde untersucht (3.3), um den prädiktiven Wert der Expression des Metastasierungsgens für das Therapieansprechen der verschiedenen Therapeutika zu analysieren (3.4). Abschließend wurden die S100A4-Expression im Plasma von Patienten mit pmKRR und mögliche Einflussfaktoren auf die Expression im Patienten-Plasma untersucht (3.5).

2. Methodik

2.1. Materialien

Alle im Rahmen der Dissertation verwendeten Materialien und Mausmodelle sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt. Tabelle 2 listet alle für die Etablierung der PDX-Modelle verwendeten Tiere auf, Tabelle 3 verzeichnet alle Geräte und Tabelle 4 alle Chemikalien.

Tabelle 2: Mausmodelle.

Nomenklatur	Kurzbezeichnung
NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Sug} /JicTac	NOG
Crl:NMRI-Foxn1 ^{nu}	NMRI:nu/nu

Tabelle 3: Geräte.

Gerät	Hersteller
AxioPlan 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioCam HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CryoStar NX50 Cryostat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Microm HMS 740 Robot-Stainer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NanoDrop TM2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PX1 Heat Sealer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
SomoPlus HD60	Labo-Moderne, Paris, Frankreich
T100 Thermal Cyclers	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
QX100 Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
QX100 Droplet Reader	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortex Mixer VM-3000	NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien.

Produkt	Hersteller
RNA-Isolation aus Tumorgewebe und qRT-PCR	
β-Mercaptoethanol	Ferak Berlin, Berlin, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTPs	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
GeneMatrix RNA Purification Kit	Roboklon, Berlin, Deutschland
GeneAmp 10x PCR Buffer II & MgCl ₂	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Primer für qRT-PCR	BioTeZ, Berlin, Deutschland
Random Hexamers	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Sonden für qRT-PCR	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Histologie	
Anti-Cytokeratin 19 Rabbit clonal antibody	DB Biotech, Kosice, Slowakei
Anti-Rabbit IgG HRP-konjugiert	Promega, Madison, USA
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Bovines Serumalbumin, pH7	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Caseinhydrolysat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI-haltiges Medium	DB Biosciences, San Jose, USA
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DPBS (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierungslösung	4,8ml NKH Puffer 50l HEPES 1M pH 8 8µl Glutaraldehyd (25%) 125µl Glukose (40%)
Glutaraldehyd	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
Hämalaunlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Histo-Clear	National Diagnostics, Atlanta, USA
Milchblocklösung	30ml PBS 1,5g Caseinhydrolysat 1,5g Trockenmilchpulver, fettfrei
Paraformaldehyd (16%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

PBS	10% (v/v) DPBS (10x) in dH ₂ O
Permeabilisierungslösung	0,5ml TritonX-100 2,5g BSA 99,5ml PBS
Rabbit polyclonal anti-S100A4	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Roti-Histokitt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBST	950ml dH ₂ O 50ml TrisHCL (pH 7,6) 200µl Tween 20
TrisHCL (pH 7,6)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TritonX-100	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Trockenmilchpulver, fettfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNA-Isolation aus Plasma und ddPCR	
ddPCR Supermixes for Probes (No dUTP)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
dNTPs	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Droplet Generation Oil for Probes	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Droplet Reader Oil	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
GeneAmp 10x PCR Buffer II & MgCl ₂	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Poly-A Carrier RNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Random Hexamers	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Sonden ddPCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Viral RNA Kit	Zymo Research, Irvine, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung des Probenmaterials

Für die Durchführung des Forschungsvorhabens wurden Tumorproben (2.2.1.1.) und Blutproben (2.2.1.2.) gewonnen.

2.2.1.1. Tumorproben

Das Probenmaterial für die Etablierung der PDX-Modelle wurde zwischen 2015 und 2016 an der Chirurgischen Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von Frau Professorin Dr. Beate Rau gewonnen. Tumorgewebe von 48 Patienten mit pmKRK wurde im Rahmen operativer Eingriffe entnommen. Dabei handelte es sich um 23 Karzinome

des Kolons, 1 Rektumkarzinom und 24 Appendixkarzinome. Die Appendixkarzinome unterteilten sich wiederum in LAMN und Adenokarzinome. Die Eingriffe erfolgten mit dem Ziel einer Zytoreduktion. Sofern diese vollständig war (CC-0 und CC-1), folgte eine HIPEC (siehe Abschnitt 1.2.5.1). Das Gewebe peritonealer Metastasen unterschiedlicher Lokalisation (Omentum / Peritoneum) wurde für die Etablierung der PDX-Modelle gesammelt. Das Einverständnis zur Nutzung des entnommenen Gewebes für Forschungszwecke wurde vor dem operativen Eingriff von allen Patienten schriftlich eingeholt. Die Zustimmung der lokalen Ethikkommission wurde erteilt (Antragsnummer: EA1/273/14).

Die gewonnenen Tumorproben wurden in einem sterilen Transportmedium zur *Experimentellen Pharmakologie & Onkologie Berlin-Buch GmbH* (EPO GmbH) gebracht. Hier wurden die PDX-Modelle etabliert und deren Testung auf Chemosensitivität durchgeführt. Die erforderlichen Tierexperimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzrecht und den "Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia" ausgeführt. Das für die Herstellung der PDX-Modelle bereitgestellte Tumormaterial wurde hierfür vollständig benötigt. Um das Tumorgewebe der PDX-Modelle mit dem jeweils entsprechenden Patiententumorgewebe vergleichen zu können, wurde daher weiteres Patiententumormaterial erforderlich. Da das im Rahmen des operativen Eingriffs entnommene Tumormaterial zusätzlich in der *Tumor- und Biobank des Charité Comprehensive Cancer Center* (CCCC-TBN) gelagert worden war, konnte hier für 11 Patienten zusätzliches Gewebe peritonealer Metastasen unterschiedlicher Lokalisation bereitgestellt werden.

2.2.1.2. Blutproben

Für die Untersuchung der S100A4-Expression im Patientenblut wurde den Patienten EDTA-Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgt jeweils zeitlich vor dem operativen Eingriff. Als Referenz diente das EDTA-Blut gesunder Kontrollpersonen. Die schriftlichen Einverständniserklärungen zur Gewinnung und weiteren Nutzung des Bluts für Forschungszwecke wurde vor der Entnahme eingeholt.

2.2.2. Klinische Daten

Die klinischen Daten der Patienten wurden durch Datenrecherche mithilfe des SAP-Systems der Charité Universitätsmedizin Berlin erhoben. Ausgewählte klinische Patientendaten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Klinische Daten der pmKRK-Patienten. LAMN = low-grade appendiceal mucinous neoplasia; Adeno-Ca = Adenokarzinom; n.a. = nicht verfügbar (not available); PCI = Peritoneal Cancer Index.

	Anzahl	Prozent (%)	Mittelwert	Median
Total	48	100,0		
Alter (Jahre)			57,3	59
30-40 Jahre	4	8,3		
41-50 Jahre	10	20,8		
51-60 Jahre	15	31,3		
61-70 Jahre	13	27,1		
71-80 Jahre	6	12,5		
Geschlecht				
weiblich	20	41,7		
männlich	28	58,3		
Primärtumor – Entität / Histologie				
Appendix	24	50,0		
LAMN	13	54,2		
Adeno-Ca	11	45,8		
Kolon / Rektum	24	50,0		
Adeno-Ca	24	100,0		
Metastasierung				
synchron	32	71,1		
metachron	13	28,9		
n.a.	3			
Ausmaß des peritonealen Befalls (PCI)			21,3	18,5
1-10	4	9,5		
11-20	10	23,8		
21-30	15	35,7		
31-39	13	31,0		
n.a.	6			
Grading				
G1	20	48,8		
G2	12	29,3		
G3	8	19,5		
G4	1	2,4		
n.a.	7			
Vorausgegangene Chemotherapie				
ja	32	66,7		
nein	16	33,3		

2.2.3. Generierung der PDX-Modelle

In der EPO GmbH wurde das Patiententumorgewebe in ca. 3mm³ großen Fragmenten unter Narkose subkutan in die linke Flanke immunsupprimierter NOG-Mäuse transplantiert. Die Mäuse wurden unter sterilen und kontrollierten Bedingungen (22°C, 50% relative Luftfeuchtigkeit, 12h helldunkel-Zyklus, autoklaviertes Futter und Einstreu sowie gesäuertes Trinkwasser) für maximal 120 Tage zur PDX-Etablierung gehalten. Das Tumorstadium wurde mittels elektronischem Messschieber in zwei Dimensionen gemessen. Das Tumorstadium (TV) wurde wie folgt berechnet:

$$TV = (Breite^2 \times Länge) \times 0,5$$

Bei einem TV des Transplantats von ca. 1 cm³ wurden die Tumore weiter passagiert. Ab der ersten Passage wurden NMRI:nu/nu-Mäuse verwendet, welche eine geringere Immunsuppression aufweisen und ein stabiles Wachstum der PDX erlauben. Der Ablauf der PDX-Generierung und nachfolgenden Charakterisierung wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

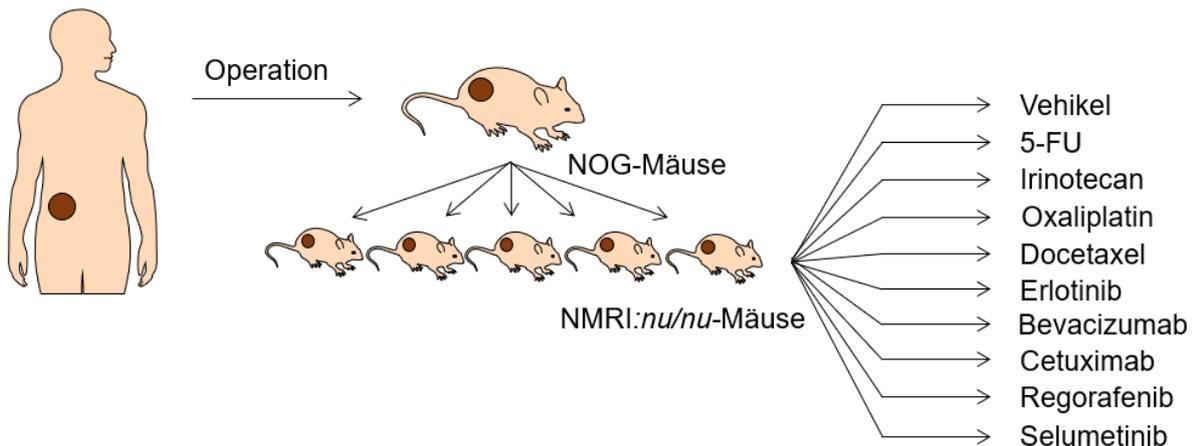


Abbildung 3: Schema zur Generierung von PDX-Modellen: Das im Rahmen der chirurgischen Resektion gewonnene Gewebe von pmKRK wurde subkutan in NOG-Mäuse transplantiert. Weitere Passagen erfolgten in NMRI:nu/nu-Mäusen. Die Behandlung mit neun ausgewählten Chemotherapeutika wurde mit den PDX-Passagen 3-4 durchgeführt. Jede Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe bestand aus 2-5 Mäusen.

Um die Beibehaltung invasiven Wachstums von pmKRK im PDX-Modell beurteilen zu können, wurde das Tumorgewebe zweier Patienten neben der subkutanen Transplantation im Rahmen der Chemosensitivitätstestung zusätzlich orthotop in die Bauchhöhle jeweils einer PDX-Maus transplantiert.

2.2.4. Testung der Chemosensitivität

Neun verschiedene Chemotherapeutika wurden mithilfe der PDX-Modelle für die Behandlung des pmKRK getestet. Die Sensitivität der Modelle gegenüber den Therapeutika wurde evaluiert. Hierfür wurden die vier klassischen Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Docetaxel, sowie die fünf zielgerichteten Therapeutika Erlotinib, Bevacizumab, Cetuximab, Regorafenib und Selumetinib ausgewählt.

Der Behandlungsbeginn erfolgte bei einem TV von etwa 3 - 4mm³. Die Mäuse eines PDX-Modells wurden ihrem TV entsprechend randomisiert und in neun Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Tabelle 6 beschreibt die Dosierungen und Behandlungsabfolge der jeweiligen Gruppen.

Tabelle 6: Behandlungsplan für die Sensitivitätstestung der PDX-Modelle. Aufgeführt sind Art der Applikation, zeitlicher Ablauf und Dosierung. Art der Applikation: i.p. = intraperitoneal; p.o. = per os; i.v. = intravenös. Zeitlicher Ablauf: qAd x B – alle A Tage, für B Zyklen; BIW = zweimal in der Woche; qd = einmal täglich; BID = zweimal täglich.

Therapeutikum	Art der Applikation	Zeitlicher Ablauf	Dosierung mg/kg/Injektion
Vehikel, NaCl	i.p.	q7d x 4	
5-FU	i.p.	q7d x 4	100 mg/kg
Irinotecan	i.p.	qd x 5	15 mg/kg
Oxaliplatin	i.p.	qd x 5	5 mg/kg
Docetaxel	i.v.	q7d x 4	12 mg/kg
Erlotinib	p.o.	qd x 5 x 4	50 mg/kg
Bevacizumab	i.p.	BIW	5 mg/kg
Cetuximab	i.p.	q7d x 2	50 mg/kg
Regorafenib	p.o.	qd	10 mg/kg
Selumetinib	i.p.	BID	50 mg/kg

Tumorgröße und Körpergewicht wurden während der Behandlungsdauer zweimal pro Woche gemessen. Veränderungen des Körpergewichts wurden in Prozent angegeben und als Indikator einer möglichen Toxizität der jeweiligen Substanzen gewertet. Die Behandlung wurde entweder nach Abschluss der letzten 5-FU Behandlung (4-wöchige Behandlung; siehe Tabelle 6) beendet oder sobald das TV der Kontrollgruppe eine Größe von ca. 1,5cm³ erreicht hat (ethischer Endpunkt).

Zur Beurteilung des Therapieansprechens wurden der T/C-Wert und das *relative Tumolvolumen* (RTV) bestimmt. Der T/C-Wert gibt das Verhältnis von *mittlerem TV der Behandlungsgruppe* (T) und *mittlerem TV der Kontrollgruppe* (C) in Prozent an. Das

Therapieansprechen wurde wie folgt klassifiziert: o = T/C >50%; + = T/C 35 - 50%; ++ = T/C 20 - 35%; +++ = T/C 5 - 20%; ++++ = T/C ≤5%. Das RTV setzt das mittlere TV während, bzw. nach Behandlung zum mittleren TV des ersten Behandlungstags innerhalb der Behandlungsgruppe ins Verhältnis. Somit entspricht beispielsweise ein Tumorwachstum um 50% einem RTV von 1,5. Auf der Grundlage der *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) wurden RTV >1,2 als *Progressive Disease* (PD), RTV = 0,7-1,2 als *Stable Disease* (SD), RTV <0,7 als *Partial Response* (PR) und ein kompletter Rückgang des Tumors als *Complete Response* (CR) klassifiziert [135].

Nach der Behandlung wurden die Tiere unter Anästhesie getötet. Die Tumore wurden entnommen, für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5. RNA-Isolation aus Tumorgewebe und qRT-PCR

Um aus dem Gewebe der pmKrk RNA für die *quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion* (qRT-PCR) zu gewinnen, wurden mittels Kryostat 12µm-Gewebeschnitte angefertigt. Die weitere Lyse des Gewebes erfolgte in der Pufferlösung des GeneMatrix Universal RNA Purification Kits mittels SomoPlus HD60. Die RNA-Isolation aus PDX- und Patientengewebe wurde mithilfe desselben Kits mit einem zusätzlichen Phenol-Chloroform-Schritt gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung der Genexpression in der qRT-PCR erfolgte unter Anwendung einer Standardkurve und eines Kalibrators. Für deren Herstellung wurde RNA aus SW620 humanen Kolonkarzinom-Zellen verwendet. Die RNA-Isolation aus den kultivierten Zellen erfolgte ebenfalls mithilfe des GeneMatrix RNA Purification Kits gemäß den Herstellerangaben. Hierbei wurde auf den zusätzlichen Phenol-Chloroform-Schritt verzichtet. Die photometrische Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop-Messgeräts mit einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt.

Die Umschreibung von RNA in die komplementäre cDNA erfolgte mittels *reverser Transkription* (RT) im Thermocycler. Für die RT von Proben und Kalibrator wurden jeweils 50ng RNA in 3µl RNase-freiem *destilliertes H₂O* (dH₂O) verdünnt. Für den Ansatz zur Herstellung der Standardkurve wurden 200ng RNA in 3µl RNase-freiem dH₂O verdünnt. Den 3µl wurden jeweils 17µl Reaktionsansatz beigefügt. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 7 beschrieben. Das Programm des T3000 Thermocyclers für die RT zur Generierung der cDNA bestand aus einer 15-minütigen Phase bei 23°C, einer 45-minütigen Phase bei 42°C und einer 5-minütigen Phase bei 95°C.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die reverse Transkription (RT) der RNA aus Gewebeproben.

Reagenz	Menge (in µl)
MgCl ₂	4,0
10x RT Buffer	2,0
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	8,0
Random Hexamere	1,0
MuLV reverse Transkriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0

Alle cDNA-Proben wurden 1:2 mit RNase-freiem dH₂O verdünnt. Die mRNA-Expression wurde mithilfe des LightCycler 480 quantifiziert. Hierfür wurde der DNA HybProbe Master-Mix von Roche verwendet. Als Housekeeping Gen diente die *Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase* (G6PDH). Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurden neben Primern auch Sonden eingesetzt. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die qPCR wurden in einer 96-Well-Platte jeweils 2µl cDNA und 8µl Reaktionsansatz eingesetzt (siehe Tabelle 9). Das Programm der qPCR beinhaltete 10min bei 95°C, anschließend 45 Zyklen mit jeweils 10s bei 95°C, 10s bei 62°C, 4s bei 72°C und eine 30-minütige Schmelzkurve von 40°C bis 95°C. Die Schmelzkurvenanalyse diente der qualitativen Untersuchung des PCR-Produkts.

Die Standardkurve beinhaltete 6 Verdünnungen des Standard-Ansatzes (50,00ng, 25,00ng, 12,50ng, 6,25ng, 3,13ng und 1,56ng). In jeder 96-Well-Platte wurden zusätzlich RNase-freies dH₂O als Negativkontrolle sowie ein Kalibrator als Positivkontrolle mitgeführt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und der Mittelwert bestimmt. Zur Analyse der Genexpression von S100A4 wurde die S100A4-mRNA-Expression des Kalibrators auf 100% festgelegt. Die S100A4-mRNA-Expression der Proben wurde in Prozent der S100A4-mRNA-Expression des Kalibrators angegeben.

Tabelle 8: Sequenzen der S100A4-Primer und Sonden.

Primer und Sonden	Sequenzen (5'-3')
S100A4 Forward Primer	GAGCTGCCAGCTTCTTG
S100A4 Reversed Primer	TGCAGGACAGGAAGACACAG
S100A4 FITC Sonde	TGATGAGCAACTTGGACAGCAACA
S100A4 LCRed Sonde	GACAACGAGGTGGACTTCCAAGAGT

Tabelle 9: Reaktionsansatz der qPCR.

Reagenz	Menge (in µl)
RNase-freies dH ₂ O	4,6
10mM Forward Primer	0,5
10mM Reversed Primer	0,5
10mM FTC Sonde	0,3
10mM LCRed Sonde	0,3
25mM MgCl ₂	0,8
Hybr Master Mix	1,0

Für jedes einzelne PDX-Modell wurden die S100A4-Expression der behandelten Tumore sowie der unbehandelten Kontrolltumore gemessen. Für jede Behandlungs- und die Kontrollgruppe wurde der Mittelwert der S100A4-Expression bestimmt. Um Unterschiede in der Handhabung und damit verbundene Abweichungen zu vermeiden, wurden aus den RNAs aller Kontrollgruppen jeweils RT und qPCR am selben Tag und mit einheitlichen Reaktionsansätzen ausgeführt.

2.2.6. Histologie

2.2.6.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Für die Färbung von Patienten- und PDX-Tumorgewebe wurden aus schockgefrorenem Gewebe im Kryostat 5µm-Schnitte angefertigt und auf Objektträgern bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.6.2. Hämatoxylin-Eosin

Zur Beurteilung der Histomorphologie wurden *Hämatoxylin-Eosin-Färbungen* (HE-Färbungen) von Patienten- und PDX-Tumorgeweben durchgeführt. Die Färbungen erfolgten mithilfe des Microm HMS 740 Robot-Stainers. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mittels Roti-Histokitt konserviert. HE-Färbungen der orthotop transplantierten Tumore (siehe 3.1.5) wurde von der EPO-GmbH durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

2.2.6.3. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung für den Nachweis des S100A4-Proteins und *Zytokeratin-19* (CK-19) erfolgte gemäß nachfolgendem Protokoll: Die gefrorenen Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 15min in

Glutaraldehydlösung fixiert. Nach einem 5-minütigen Waschen in *Phosphatgepufferter Salzlösung* (PBS) folgte für 20min die Blockierung der endogenen Peroxidase in 1%-igem H_2O_2 . Danach folgte erneut 5min Waschen in PBS. Die Permeabilisierung der Schnitte wurde für 10min in Permeabilisierungslösung durchgeführt. Anschließend wurde mit PBS gespült. Die Blockierung erfolgte für 45min in Milchblocklösung. Hierauf wurde erneut mit PBS gespült. Die Schnitte wurden jeweils mit anti-S100A4- oder anti-CK19-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 für 90min bei Raumtemperatur inkubiert und hierauf für 15min in *Tris-buffered Saline Tween20* (TBST) Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit anti-Rabbit IgG HRP-konjugiertem Antikörper (1:1000 verdünnt) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgte ein 30-minütiges Waschen in TBST.

Das Färben mithilfe des DAB Substrat Kits wurde nach Herstellerangaben für wenige Sekunden durchgeführt. Hierauf folgte ein Waschen für 5min mit dH_2O . Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hämalaun für 3min durchgeführt. Nach erneutem Waschen unter Leitungswasser wurden die Objektträger zunächst in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 96%) und dann in Histo-Clear gegeben. Die Konservierung erfolgte mit dem Roti-Histokitt.

2.2.6.4. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Gewebeschnitte für 15min in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach einer 15-minütigen Permeabilisierung in 0,2% Triton X100 wurde erneut für 10min in PBS gewaschen.

Die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primär-Antikörper (anti-human Nuclei) erfolgte mit einer Verdünnung von 1:100 für 2h bei Raumtemperatur. Einer 30-minütigen Waschung in *PBS Tween-20* (PBS-T) folgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten Sekundärantikörper (Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse) für 1h. Nach erneutem Waschen für 30min in PBS wurden die Objektträger mit DAPI-haltigem Medium konserviert.

2.2.7. RNA-Isolation aus Plasma und ddPCR

Aus dem EDTA-Blut von Patienten und Kontrollpersonen wurde mittels Zentrifugation Plasma gewonnen. Die Blutproben wurden 10min bei $12^\circ C$ und 1300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum für 15min bei $4^\circ C$ und 2500rpm zentrifugiert, um alle verbliebenen Zellreste zu entfernen. Das Plasma wurde aliquotiert und bei $-80^\circ C$ für weitere Analysen gelagert.

Die RNA-Gewinnung aus je 200µl Plasma wurde mithilfe des Viral RNA Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Verbesserung der RNA-Ausbeute wurden pro Probe 9µg Poly-A Carrier RNA zugefügt. Eluiert wurde mit 15µl RNase-freiem dH₂O. Für die RT wurden jeweils 5µl Eluat mit 15µl Reaktionsansatz (siehe Tabelle 10) gemischt. Das Programm des T3000 Thermocyclers für die RT zur Generierung der cDNA bestand aus einer 15-minütigen Phase bei 23°C, einer 45-minütigen Phase bei 42°C und einer 5-minütigen Phase bei 95°C.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die reverse Transkription (RT) der RNA aus Patienten-Plasmaproben.

Reagenz	Menge (in µl)
MgCl ₂	3,6
10x RT Buffer	1,8
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	7,2
Random Hexamere	1,0
MuLV reverse Transkriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0

Die Quantifizierung der S100A4-Expression im Plasma wurde mittels *droplet digital PCR* (ddPCR) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 4,2µl der mittels RT in cDNA umgeschriebenen Probe mit 16,8µl Reaktionsansatz (siehe Tabelle 11) vermischt und hiervon 20µl mit 70µl Droplet Generation Oil in den QX Droplet Generator gegeben. Je 40µl der so entstandenen Droplets wurden in eine 96-Well-Platte transferiert. Diese wurde mittels PCR Plate Sealer versiegelt und für die Durchführung der PCR in den T100Thermal Cycler gegeben. Das Programm bestand aus einer 10-minütigen Phase bei 95°C, jeweils 40 Zyklen, bestehend aus 30s bei 94°C und 60s bei 60°C, und abschließend 10s bei 98°C. Die Quantifizierung der Kopienzahl in den Proben erfolgte im Droplet Reader. Die Kopienzahl der Probe wurde als Kopienzahl pro 1ml Plasma angegeben.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der droplet digital PCR (ddPCR) für Patienten-Plasmaproben.

Reagenz	Menge (in µl)
Supermix	10,0
Target Sonde	1,0
Referenz Sonde	1,0
H ₂ O	4,0

2.2.8. Statistische Analyse

Alle statischen Analysen und die Erstellung der Graphiken wurden mithilfe von Graph Pad Prism 6, IBM SPSS Statistics 21 und Excel durchgeführt.

Das Anwachsen der PDX-Modelle wurde untersucht und mögliche Einflussfaktoren mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. Das Therapieansprechen der Chemotherapeutika wurde als T/C-Wert und RTV (siehe Abschnitt 2.2.4) angegeben. Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen wurden mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Die Chemotherapeutika wurden untereinander in Bezug auf ihre Effizienz verglichen. Hierfür wurden die mittleren T/C-Werte und RTV aller Modelle herangezogen. Modelle mit einem T/C-Wert $\leq 50\%$ wurden als Responder, Modelle mit einem T/C-Wert $> 50\%$ als Non-Responder gewertet.

Die mittels qRT-PCR ermittelte S100A4-Expression der unbehandelten Kontrollmäuse wurde für die Prädiktion der Therapiereponse evaluiert. Eine Korrelation zwischen S100A4-Expression in PDX- und Patiententumorgewebe sowie zwischen S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe und Tumorwachstum wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht.

Der Median der gemessenen S100A4-Expression diente als Cut-off-Wert für die Einteilung der Modelle in S100A4 hoch- und niedrig-exprimierend. Zur Untersuchung einer Assoziation zwischen S100A4-Expression und Therapieansprechen wurde die S100A4-Expression von Respondern und Non-Respondern verglichen. Ebenso wurde das Therapieansprechen von S100A4 hoch- und niedrig-exprimierenden Modellen verglichen. Hierbei fand der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Um eine Veränderungen der S100A4-Expression durch die jeweiligen Therapeutika zu untersuchen, wurde die S100A4-Expression der unbehandelten PDX-Kontrollgruppen mit der S100A4-Expression der behandelten PDX-Tumore verglichen. Hierfür wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet.

Unterschiede der S100A4-Expression in Plasma von Normalpersonen und Patienten wurden ebenfalls mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Auch der Einfluss verschiedener Faktoren auf die S100A4-Expression im Patientenplasma wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit konnte Daten zur in vivo Etablierung und Charakterisierung (siehe 3.1) sowie zum Therapieansprechen (siehe 3.2) neuartiger PDX-Modelle von pmKRK generieren. Damit wurde eine wichtige Erweiterung bereits in der Forschung etablierter PDX-Modelle des KRK erreicht. Die neuen Modelle sind essentielle Voraussetzung, um die S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe (siehe 3.3) und deren prädiktiven Wert für die Therapieresponse im Detail zu untersuchen (siehe 3.4). Die mittels der PDX-Modelle generierten Daten wurden anschließend durch die Analyse der S100A4-Expression im Plasma der pmKRK-Patienten ergänzt (siehe 3.5), um für diesen Biomarker den Bezug zur klinischen Praxis zu gewährleisten.

3.1. Etablierung der PDX-Modelle von pmKRK

Im Rahmen der Etablierung der PDX-Modelle wurde pmKRK-Gewebe von 48 Patienten subkutan in NOG-Mäuse transplantiert und nach dem Anwachsen in den NOG-Mäusen weiter in NMRI:nu/nu Mäusen passagiert (siehe Abschnitt 2.2.3). Das Tumorgewebe von 15 der 48 Patienten wuchs sowohl in NOG- als auch NMRI:nu/nu Mäusen an (engraftet) und stand für die nachfolgenden Analysen zur Verfügung.

Von den 13 pmKRK mit histologischen Merkmalen eines LAMN zeigte kein Tumor ein Engraftment. Aufgrund des Nicht-Engraftments und der gegenüber Adenokarzinomen abweichenden Morphologie, Histologie und Metastasierung der LAMN (siehe Abschnitt 1.2.3.), wurden die 13 Patienten mit einem LAMN aus der weiteren Wertung ausgeschlossen. Von den in die Wertung eingeschlossenen 35 Patienten zeigten somit 42,9% ein Engraftment.

Von 17 der 35 Patienten wurde pmKRK-Gewebe unterschiedlicher peritonealer Lokalisation (Omentum und parietales Peritoneum) zur PDX-Herstellung transplantiert. Insgesamt wurde das Gewebe von 54 Metastasen transplantiert. Für 4 der 15 Patienten mit engraftetem Modell konnten 2 Modelle mit unterschiedlicher peritonealer Lokalisation etabliert werden. Im Ergebnis standen 19 PDX-Modelle zur weiteren Charakterisierung und Testung der Chemosensitivität zur Verfügung. In Abbildung 4 wird die Verteilung des Engraftments für (a) Patienten und (b) Modelle skizziert. Von den 15 Patienten mit Tumor-Engraftment entsprach der Primärtumor bei 11 Patienten einem Kolonkarzinom und bei 4 Patienten einem Appendixkarzinom.

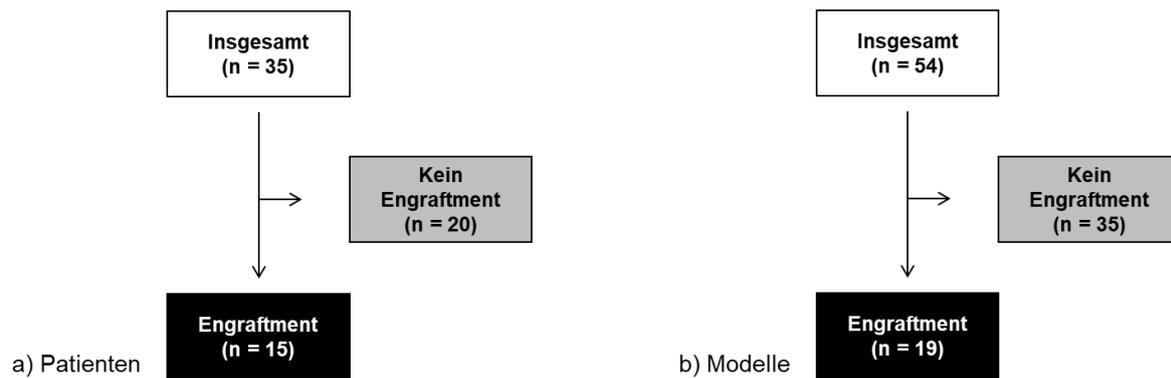


Abbildung 4: Anzahl der engrafteten und nicht-engrafteten Modelle. a) Anzahl der Patienten, von denen Tumorgewebe in PDX-Mäuse transplantiert wurde, sowie die Anzahl der Patienten mit engraftetem und ohne engraftetes Modell. b) Anzahl der transplantierten Tumore, sowie die Anzahl der daraus hervorgehenden engrafteten und nicht engrafteten Modelle.

3.1.1. Einflussfaktoren auf das Engraftment der PDX-Modelle

Ein entscheidender Faktor zur Etablierung von PDX-Modellen ist das Engraftment des Tumormaterials. In dieser Arbeit wurde zunächst ein möglicher Einfluss der Tumorentität und des Tumorgradings auf das Engraftment im PDX untersucht. Dies wird in Abbildung 5 dargestellt.

Peritoneal metastasierte Kolonkarzinome und peritoneale Appendix-Metastasen zeigten keine Unterschiede bezüglich des Engraftments ($p = 0,84$). Dagegen unterschieden sich die transplantierten Tumore je nach Tumorgrading in ihrem Engraftment. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,06$). Während gut differenzierte Tumore (G1) in immunsupprimierten Mäusen kein Engraftment zeigten, wurde bei 63% aller Tumore mit schlechter Differenzierung (G3) ein Engraftment beobachtet.

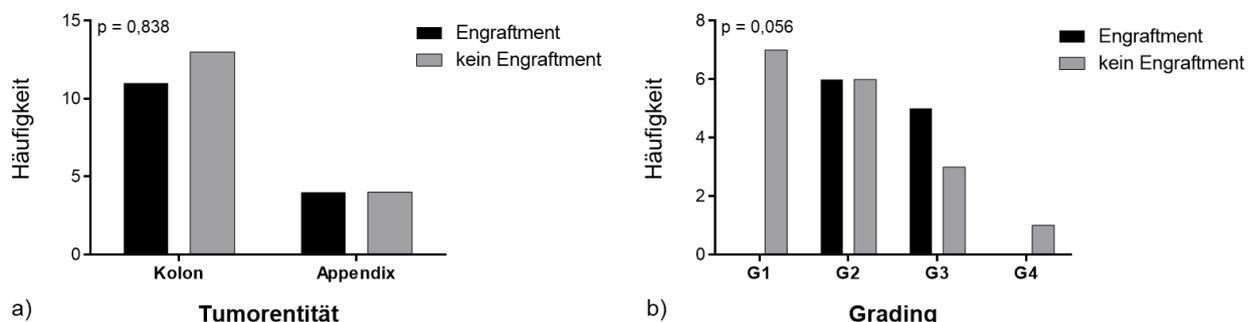


Abbildung 5: Einfluss von Tumorentität und Grading auf das Engraftment zur Etablierung der PDX-Modelle. Dargestellt ist die Anzahl der Patienten, deren Tumorgewebe in NOG- und NMRI:nu/nu-Mäusen angewachsen ist (Engraftment, schwarz) und die Anzahl der Patienten, deren Tumor kein Anwachsen in den Mäusen aufweist (kein Engraftment, grau). a) Abhängigkeit des Engraftments von der Tumorentität (Kolon- versus Appendixkarzinom); b) Einfluss des Tumorgradings auf das Engraftment. Die statistische Analyse der Verteilung engrafteter und nicht engrafteter Tumore wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.1.2. Charakteristika der etablierten PDX-Modelle

Von 10 der 15 Patienten mit engraftetem PDX-Modell wurde das Tumorgewebe charakterisiert und auf seine Sensitivität gegenüber den Therapeutika getestet. Für 3 Patienten wurden 2 Modelle unterschiedlich lokalisierten Tumorberfalls etabliert. Somit wurden 13 Modelle in die nachfolgenden Wertungen eingeschlossen. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die etablierten PDX-Modelle. Die Tumorentität entsprach bei 8 Patienten einem Kolonkarzinom und bei 2 Patienten einem Appendixkarzinom. Bei 5 der 13 PDX-Modelle war der peritoneale Befall im Omentum lokalisiert. Bei den übrigen 7 PDX-Modellen handelte es sich um Metastasen des parietalen Peritoneums.

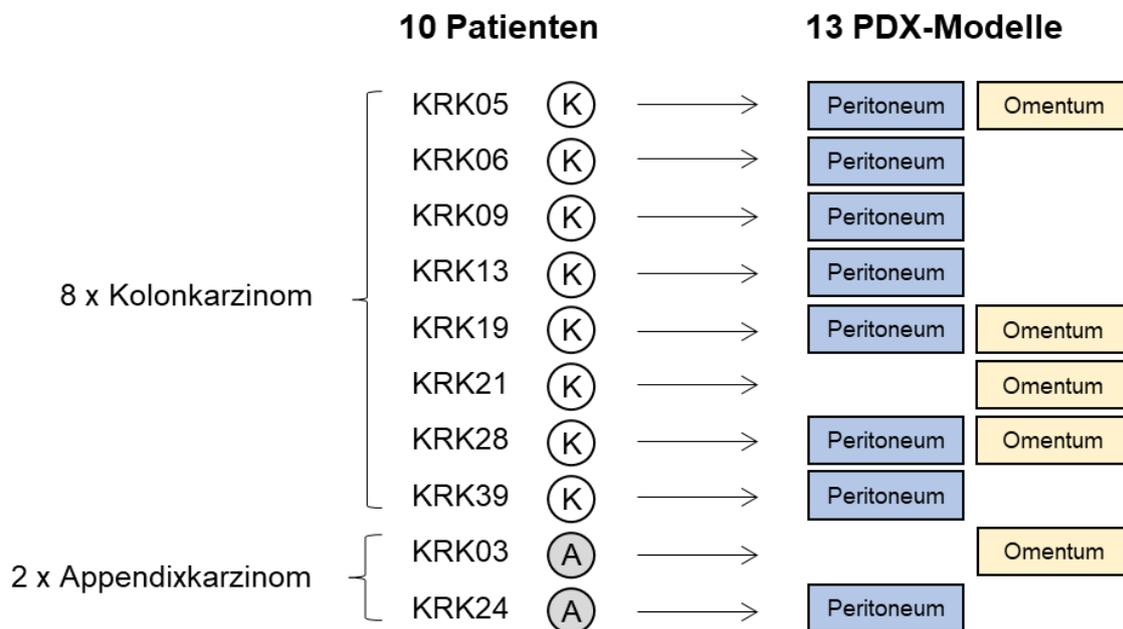


Abbildung 6: Überblick über die auf ihre Chemosensitivität getesteten PDX-Modelle. Dargestellt sind Tumorentitäten (Kolon- (K) und Appendixkarzinom (A)) für die jeweiligen Patienten (KRK03, -05, -06, -09, -13, -19, -21, -24, -28, -39) und die dazugehörigen Modelle mit der Lokalisation der entnommenen peritonealen Metastasen (parietales Peritoneum (Peritoneum) und Omentum).

Wesentliche klinische und molekularbiologische Charakteristika der etablierten PDX-Modelle sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die pathologische Begutachtung des Patiententumorgewebes ergab für alle Patienten die Diagnose eines Adenokarzinoms mäßiger (G2) oder schlechter (G3) Differenzierung. Das Ausmaß des peritonealen Befalls zeigte innerhalb der Patientengruppe eine große Varianz und reichte von lokalisierten Metastasen (PCI = 2) bis zum großflächigen Befall des Bauchfells (PCI = 39). Während 7 Patienten ein synchrones pmKRK aufwiesen, zeigten sich 3 Patienten mit einem metachronen pmKRK. Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose wurden bei 6 Patienten befallene Lymphknoten nachgewiesen, 3 Patienten zeigten keine

Lymphknotenmetastasen. Nach TNM-Klassifikation wurden die Primärtumore als $\geq T2$ eingeteilt. Von 8 Patienten wurde durch das Institut für Pathologie der Charité der KRAS-Mutationsstatus der peritonealen Metastasen bestimmt. Von ihnen wiesen 6 Patienten Mutationen im KRAS-Gen auf.

Tabelle 12: Charakteristika der Patienten mit etablierten PDX-Modellen. w = weiblich; m = männlich; Kolon re = rechtsseitiges Kolon; Kolon li = linksseitiges Kolon; Adeno-Ca = Adenokarzinom; muz. Adeno-Ca = muzinöses Adenokarzinom; w.t. = KRAS-Wildtyp; mut = KRAS-Mutation (sofern bekannt, ist die Art der KRAS-Mutation in Klammern aufgeführt); PCI = Peritoneal Cancer Index; syn = synchrone Metastasierung; meta = metachrone Metastasierung; pTNM = pathologisches Tumorstaging zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des KRK; n. a. = nicht verfügbar (not available).

Patient	Alter	Geschlecht	Primärtumor Lokalisation	Histologie	Grading	KRAS-Mutationsstatus	PCI	Metastasierung	pTNM
KRK03	48	w	Appendix	muz. Adeno-Ca	n.a.	mut	n.a.	meta	n.a.
KRK05	76	w	Kolon re	muz. Adeno-Ca	G2	w.t.	15	syn	T4N2M1
KRK06	59	m	Kolon re	Adeno-Ca	G3	mut (A146T)	9	syn	T4N2M1
KRK09	44	w	Kolon li	muz. Adeno-Ca	G2	mut	16	syn	T2N2M1
KRK13	69	m	Kolon re	muz. Adeno-Ca	G2	mut (G12C)	39	syn	T2N0M1
KRK19	47	w	Kolon li	Adeno-Ca	G2	n. a.	13	syn	T4N1M1
KRK21	53	m	Kolon li	Adeno-Ca	G3	w.t.	14	meta	T4N1M0
KRK24	64	m	Appendix	muz. Adeno-Ca	G3	n. a.	35	syn	T4N0M1
KRK28	53	m	Kolon re	Adeno-Ca	G2	mut (G12D)	21	syn	T4N2M1
KRK39	49	m	Kolon li	Adeno-Ca	n. a.	mut (G12S)	2	meta	T3N0M0

3.1.3. Vergleich der Histologie der Patiententumore und etablierten PDX-Modelle

Für die klinische Relevanz der PDX und um die Ergebnisse von PDX-Modellen auf Patienten übertragen zu können, ist es notwendig sicherzustellen, dass wesentliche Charakteristika der Patiententumore im PDX erhalten bleiben. Ein wichtiges Charakteristikum ist dabei die Tumorarchitektur und der Erhalt bestimmter Marker.

Für diese Analyse wurde mittels HE-Färbung ein Vergleich von Patiententumorgewebe und PDX-Tumorgewebe der unbehandelten Kontrollgruppen vorgenommen. Abbildung 7 zeigt, dass die ursprüngliche Tumorarchitektur des Patiententumorgewebes auch im PDX erhalten blieb. Die Histomorphologie der Patiententumore und der PDX-Tumore entsprach jeweils der eines Adenokarzinoms kolorektalen Ursprungs.

Die immunhistochemische Färbung von humanem CK-19 erlaubt die Beurteilung humaner Epithelzellen sowie ihres Verhältnisses zum sie umgebenden Stromagewebe. Hierbei war ebenfalls eine Ähnlichkeit der Architektur und der Erhalt der CK-19

Expression zwischen Patienten- und PDX-Gewebe feststellbar. Im Vergleich zum Patientengewebe zeigte sich im PDX eine leichte Verschiebung des Tumor-/Stroma-Verhältnisses zugunsten epithelialer Tumorzellen.

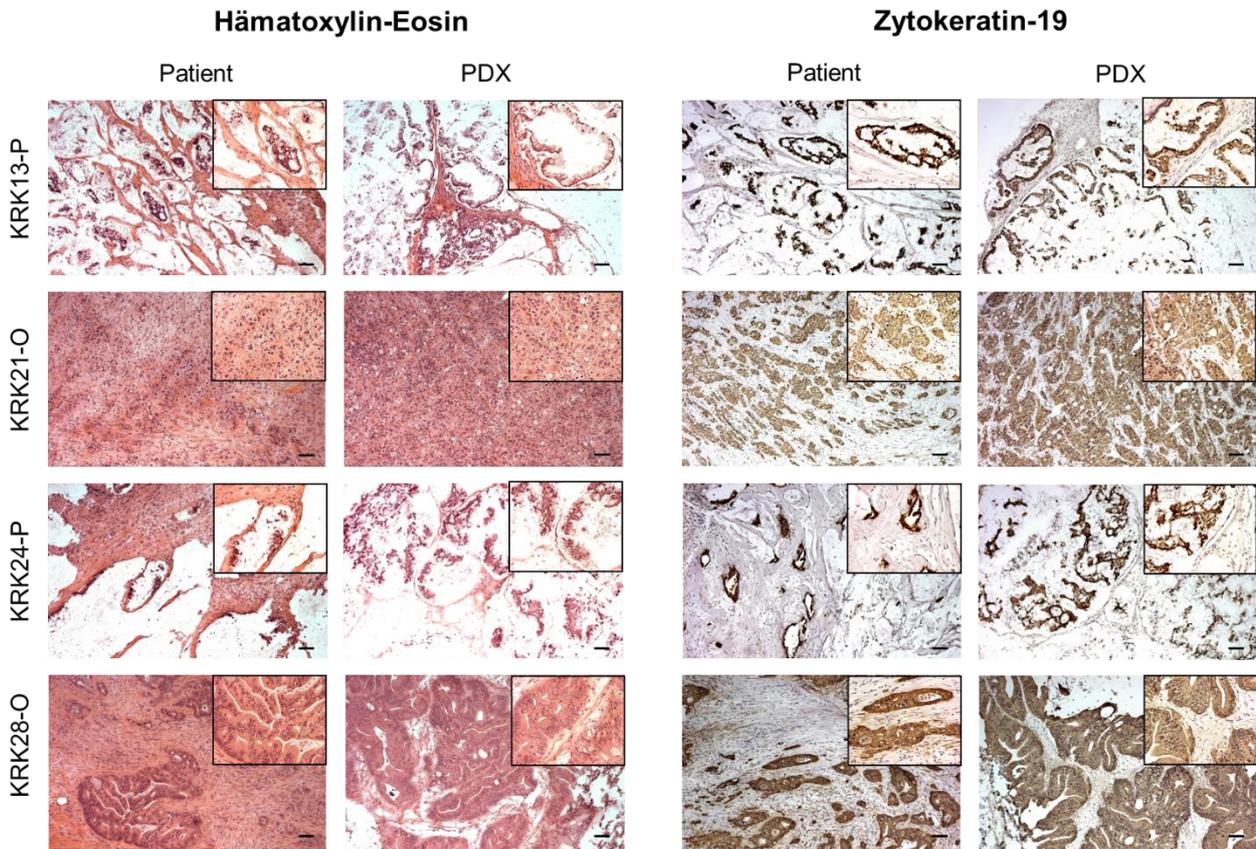


Abbildung 7: HE-Färbung und immunhistochemische Färbung von Zytokeratin-19 (CK-19) des Patienten- und PDX-Tumorgewebes im Vergleich. Für die PDX-Modelle wurde das Gewebe engrafteter pmKRK der Passagen 3 und 4 verwendet. Das Patientengewebe entstammt der gleichen Tumorlokalisation (parietales Peritoneum, Omentum). Alle Gewebe zeigen die charakteristische Morphologie eines Adenokarzinoms. Die CK-19 Färbung (braun gefärbte Areale) zeigt das Zytoplasma humaner Epithelzellen. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100µm.

Zur Beurteilung von humanem und murinem Anteil des pmKRK-Gewebes im PDX-Modell erfolgte die Färbung humaner Zellkerne mithilfe von Immunfluoreszenz. Die Immunfluoreszenz ergab dabei ein spezifisches Anfärben des humanen Tumorgewebes und keine Färbung des umgebenden murinen Stromagewebes. Die Immunfluoreszenz wird in Abbildung 8 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Tumorzellen humanen Ursprungs waren und, dass in den Passagen 3 und 4 das Stromagewebe im PDX vollständig durch murines Gewebe ersetzt wurde.

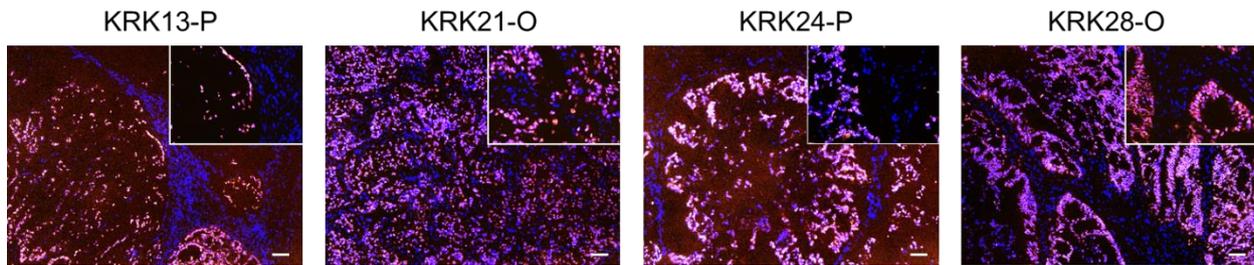


Abbildung 8: Färbung humaner Zellkerne mittels Immunfluoreszenz. Das PDX-Gewebe stammt von PDX-Tumorgewebe der 3. und 4. Passage. Die Kernfärbung differenziert klar zwischen humanen Tumoranteilen und dem murinen Stromakompartiment innerhalb des PDX-Tumors. DAPI = blau; humane Zellkerne = orange (Cy3). Der Maßstabsbalken repräsentiert 100µm.

3.1.4. Tumorwachstum im PDX

Ein weiteres biologisches Charakteristikum der etablierten PDX-Modelle ist die Wachstumsgeschwindigkeit der engrafteten Tumore. Die benötigte Zeit zur Verdoppelung des Tumorumfanges wurde je Modell für die unbehandelte Kontrollgruppe bestimmt und wird in Abbildung 9 dargestellt.

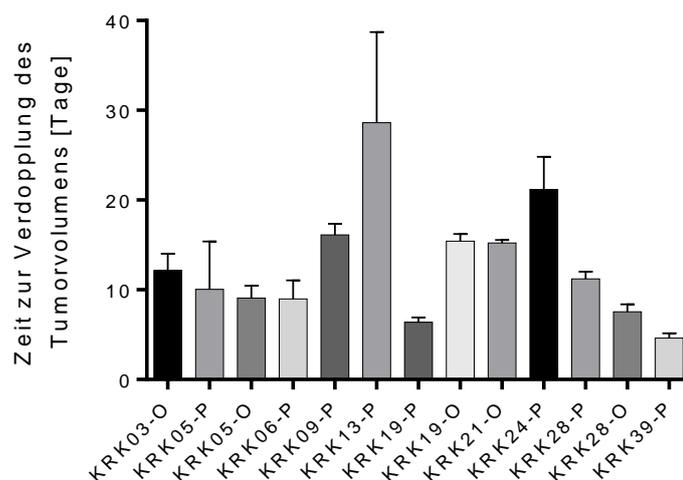


Abbildung 9: Zeit zur Verdoppelung des Tumorumfanges. Dargestellt wird für jedes PDX-Modell die Zeit in Tagen, welche die unbehandelten Kontrolltumore benötigten, um ihr Tumorumfang zu verdoppeln. Angegeben werden die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

In der klinischen Praxis zeigen pmKRC eine starke Varianz im Tumorwachstum zwischen den einzelnen Patienten. Diese Varianz konnte auch für die untersuchten PDX-Modelle beobachtet werden. Hier rangierte die benötigte Zeit zur Verdoppelung des Tumorumfanges zwischen 4,6 und 28,6 Tagen.

3.1.5. Orthotope Transplantation von pmKRC

Ferner wurde das Verhalten der pmKRC nach orthotoper Transplantation untersucht, um zu prüfen, ob das pmKRC sein invasives Wachstum im PDX-Modell erhält. Hierfür wurde

das Gewebe der Metastasen von 2 Patienten neben der subkutanen Transplantation, orthotop in die Bauchhöhle immunsupprimierter Mäuse transplantiert. Das Gewebe der pmKRK zeigte dabei ein invasives Wachstum in umgebende Strukturen und Organe der Tiere. Abbildung 10 stellt die Histologie eines orthotop transplantierten pmKRK dar. Neben dem implantierten Tumor, wird die Infiltration von Niere, Ovar und Diaphragma durch den Tumor gezeigt. Im Ergebnis zeigt sich, dass humane pmKRK in PDX-Mäusen ihr invasives und infiltrierendes Wachstum beibehalten.

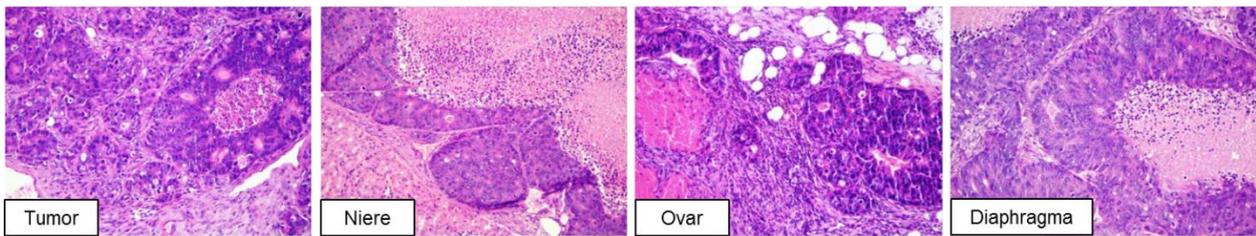


Abbildung 10: HE-Färbung des orthotop implantierten PDX-Tumormaterials und seiner Infiltration in Niere, Ovar und Diaphragma.

Zusammenfassend konnten erste PDX-Modelle von pmKRK etabliert werden. Die Modelle wiesen den Erhalt der histologischen Morphologie, ein Ersetzen des Stroma-Kompartiments durch murines Gewebe, ein heterogenes Wachstum und das Beibehalten invasiven und infiltrierenden Wachstums auf. PDX-Modelle stellen somit eine geeignete Plattform zur Evaluation von Therapieansprechen und prädiktiven Biomarkern wie S100A4 bei pmKRK dar.

3.2. Therapieansprechen der PDX-Modelle

Der folgende Abschnitt behandelt das Ansprechen der PDX-Modelle auf verschiedene konventionelle und auf zielgerichtete (targeted) Chemotherapeutika. Daneben wurden mögliche Einflussfaktoren auf das Ansprechen der Modelle im Detail untersucht.

3.2.1. Therapieansprechen auf klassische und zielgerichtete Chemotherapeutika

Um das Therapieansprechen der PDX-Modelle auf die Chemotherapeutika evaluieren zu können, wurde für jede Behandlungsgruppe der mittlere T/C-Wert und RTV bestimmt. Tabelle 13 zeigt die Einstufung der Therapieresponse anhand der mittleren T/C-Werte in „+++“, „++“, „+“ und „o“. Dabei gelten Modelle mit „+++“, „++“ oder „+“ als Responder (grün) und Modelle mit „o“ als Non-Responder (grau). Als Cut-off diente der T/C-Wert = 50%.

Tabelle 13: Einstufung der Behandlungsgruppen anhand ihrer Therapieresponse mittels T/C-Werts.

T/C-Wert (in %)	Einstufung	Bezeichnung
0 - 10	+++	Responder
11 - 25	++	
26 - 50	+	
>50	o	Non-Responder

Tabelle 14: Therapieansprechen der PDX-Modelle (T/C-Werte in Prozent).

	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Docetaxel	Bevacizumab	Cetuximab	Erlotinib	Regorafenib	Selumetinib
KRK03-O	49,5	19,4	56,9	15,1	62,2	89,2	57,1	48,8	55,6
KRK05-P	103,8	16,7	5,0	32,5	34,3	76,2	66,9	57,3	62,2
KRK05-O	27,6	10,0	37,6	32,0	19,5	18,7	24,0	18,7	16,0
KRK06-P	53,1	25,5	66,2	47,8	28,7	44,7	54,0	40,0	31,1
KRK09-P	11,5	35,8	47,9	30,7	38,8	56,8	55,3	33,6	33,8
KRK13-P	22,0	19,0	35,1	29,1	29,0	27,3	22,2	32,1	34,1
KRK19-P	47,4	11,4	43,6	16,9	22,1	13,3	36,3	16,4	12,7
KRK19-O	57,2	82,5	109,9	65,4	97,0	82,5	59,8	55,6	57,4
KRK21-O	7,5	17,8	18,2	36,3	43,8	41,0	41,0	38,8	21,7
KRK24-P	20,2	51,1	55,3	42,1	60,6	35,3	28,8	49,4	36,8
KRK28-P	42,8	23,6	104,5	75,3	82,3	165,6	45,2	55,8	54,1
KRK28-O	95,9	36,3	68,1	35,7	107,2	102,9	109,2	42,8	46,3
KRK39-P	23,3	15,9	33,5	25,3	13,5	18,2	25,7	13,6	16,9

Tabelle 15: Einteilung des Therapieansprechens der PDX-Modelle anhand ihrer T/C-Werte: T/C >50% = o; T/C 26 - 50% = +; T/C 11 - 25% = ++; T/C 0 - 10% = +++. Modelle mit T/C-Werten >50% gelten für dieses Therapeutikum als Non-Responder (grau), Modelle mit T/C-Werten ≤50% als Responder (grün).

	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Docetaxel	Bevacizumab	Cetuximab	Erlotinib	Regorafenib	Selumetinib
KRK03-O	+	++	o	++	o	o	o	+	o
KRK05-P	o	++	+++	+	+	o	o	o	o
KRK05-O	+	+++	+	+	++	++	++	++	++
KRK06-P	o	+	o	+	+	+	o	+	+
KRK09-P	++	+	+	+	+	o	o	+	+
KRK13-P	++	++	+	+	+	+	++	+	+
KRK19-P	+	++	+	++	++	++	+	++	++
KRK19-O	o	o	o	o	o	o	o	o	o
KRK21-O	+++	++	++	+	+	+	+	+	++
KRK24-P	++	o	o	+	o	+	+	+	+
KRK28-P	+	++	o	o	o	o	+	o	o
KRK28-O	o	+	o	+	o	o	o	+	+
KRK39-P	++	++	+	+	++	++	+	++	++

Tabelle 14 erfasst das Therapieansprechen der 13 getesteten PDX-Modelle auf die 9 Chemotherapeutika. Die gemessenen T/C-Werte aller Behandlungsgruppen rangierten

zwischen 5,0% und 165,6%. Tabelle 15 zeigt die Einteilung der Modelle in Responder und Non-Responder. Dabei unterschieden sich die einzelnen Modelle erheblich bezüglich des Therapieansprechens. Während für ein Modell (KRK19-O) kein Therapeutikum eine Response erreichte, wiesen 5 Modelle für alle 9 Therapeutika T/C-Werte $\leq 50\%$ auf.

Die Chemotherapeutika, welche bei den meisten Modellen eine Therapiereponse mit T/C-Werten $\leq 50\%$ erreichten, waren die klassischen Chemotherapeutika Irinotecan und Docetaxel. Hier wurden jeweils 84,6% der Modelle als Responder eingestuft. Von den zielgerichteten Therapeutika konnte Regorafenib das beste Resultat erzielen. Eine Response wurde bei 76,9% der Modelle erreicht. Therapeutika mit einem limitierten Therapieansprechen waren hingegen das klassische Chemotherapeutikum Oxaliplatin und die zielgerichteten Therapeutika Cetuximab und Erlotinib. Nach Abschluss der Behandlung wurden jeweils lediglich 53,8% der Modelle als Responder eingestuft.

Eine weitere Darstellungsform des Therapieansprechens neben dem T/C-Wert ist das RTV. Tabelle 16 führt die Einteilung des Therapieansprechens unter Verwendung des RTV in „Complete Response“, „Partial Response“, „Stable Disease“ und „Progressive Disease“ auf.

Tabelle 16: Klassifikation der Therapiereponse anhand des RTV.

RTV	Einteilung	Abkürzung
0 – 0,1	Complete Response	CR
0,1 - 0,7	Partial Response	PR
0,7 - 1,3	Stable Disease	SD
> 1,3	Progressive Disease	PD

Tabelle 17: Therapieansprechen (RTV) der PDX-Modelle für die einzelnen Therapeutika.

	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Docetaxel	Bevacizumab	Cetuximab	Erlotinib	Regorafenib	Selumetinib
KRK03-O	3,3	1,3	4,1	1,0	4,4	6,1	3,9	3,3	3,8
KRK05-P	12,8	1,8	0,8	3,7	4,1	8,6	8,1	6,8	11,1
KRK05-O	4,1	1,5	5,6	4,9	2,9	2,9	3,6	2,9	2,4
KRK06-P	9,9	4,2	11,4	8,0	5,0	7,8	8,8	7,1	5,9
KRK09-P	0,4	0,9	1,6	0,8	1,2	1,8	1,6	1,1	0,9
KRK13-P	0,6	0,5	1,0	0,9	0,8	0,8	0,7	0,9	1,0
KRK19-P	5,3	1,1	4,4	1,7	2,3	1,3	3,7	1,8	1,4
KRK19-O	2,8	4,1	5,5	3,0	3,4	3,1	2,9	2,0	2,7
KRK21-O	0,1	0,2	0,2	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,2
KRK24-P	1,1	2,5	2,8	2,0	3,0	2,1	1,5	2,6	2,0
KRK28-P	2,7	1,7	6,5	4,9	5,4	10,4	2,9	3,6	3,4
KRK28-O	16,3	5,6	9,7	5,8	19,2	16,6	16,3	6,6	6,6
KRK39-P	3,6	2,6	4,1	3,9	2,0	2,3	3,1	2,1	2,6

Tabelle 18: Einteilung des Therapieansprechens der Modelle mittels RTV in „Complete Response“ (CR): RTV = 0 - 0,1; „Partial Response“ (PR): RTV = 0,1 - 0,7; „Stable Disease“ (SD): RTV = 0,7 - 1,3 und „Progressive Disease“ (PD): RTV >1,3.

	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Docetaxel	Bevacizumab	Cetuximab	Erlotinib	Regorafenib	Selumetinib
KRK03-O	PD	SD	PD	SD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK05-P	PD	PD	SD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK05-O	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK06-P	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK09-P	PR	SD	PD	SD	SD	PD	PD	SD	SD
KRK13-P	PR	PR	SD	SD	SD	SD	PR	SD	SD
KRK19-P	PD	SD	PD	PD	PD	SD	PD	PD	PD
KRK19-O	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK21-O	CR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR
KRK24-P	SD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK28-P	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK28-O	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD
KRK39-P	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD

Tabelle 17 listet das Therapieansprechen der Modelle, gemessen als RTV. Das RTV variierte zwischen den Modellen und Therapiegruppen von 0,1 bis 19,2. Lediglich eine Behandlungsgruppe wies mit einem RTV $\leq 0,1$ eine „Complete Response“ auf (KRK21-O nach Behandlung mit 5-FU). Für die übrigen Gruppen war das RTV $> 0,1$. Tabelle 18 klassifiziert das Therapieansprechen der Modelle gemäß Tabelle 16 in „Complete Response“, „Partial Response“, „Stable Disease“ und „Progressive Disease“. Die Modelle wurden für jedes Chemotherapeutikum in die Gruppen „progressive disease“ (grau) und mindestens „Stable Disease“ (grün) klassifiziert. Als Cut-off diente ein RTV = 1,3. Das entspricht einer Zunahme des Tumolvolumens $> 30\%$ unter Behandlung.

Allgemein zeigte ein Großteil der Behandlungsgruppen (74,4%) eine „Progressive Disease“. 6 Modelle wiesen ein allgemein reduziertes Therapieansprechen auf. Hier zeigte sich ein Fortschreiten des Tumorwachstums („Progressive Disease“) in allen 9 Behandlungsgruppen. Dagegen bestand für 2 Modelle ein stabiles Krankheitsbild oder eine Reduktion des Tumolvolumens in allen 9 Behandlungsgruppen („Stable Disease“, „Partial Response“ oder Complete Response“). Das Therapeutikum, welches für die meisten Modelle ein mindestens stabiles Tumorwachstum (RTV $\leq 1,3$) erreichte, war Irinotecan. Hier zeigten 3 Modelle eine „Stable Disease“ und 2 Modelle eine „Partial Response“.

Abschließend führt Tabelle 19 die Mittelwerte der RTV und T/C-Werte der 9 Chemotherapeutika unter Einbeziehung aller PDX-Modelle auf. Insgesamt zeigt sich für

Ergebnisse

Irinotecan mit einem mittleren T/C-Wert von 28,1% und einem mittleren RTV von 2,2 das beste Therapieansprechen und für Cetuximab mit einem T/C-Wert von 59,4% und einem RTV von 5,0 das schlechteste Therapieansprechen.

Tabelle 19: Zusammenfassende Übersicht der mittleren T/C-Werte (%) und mittleren RTV der Behandlungsgruppen aller PDX-Modelle. Das Therapeutikum mit dem jeweils besten mittleren T/C- und RTV-Wert (Irinotecan) ist grün markiert. Rot markiert ist das Therapeutikum mit dem jeweils schlechtesten mittleren T/C- und RTV-Wert (Cetuximab).

Mittelwert	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Docetaxel	Bevacizumab	Cetuximab	Erlotinib	Regorafenib	Selumetinib
T/C-Wert [%]	43,2	28,1	52,5	37,3	49,2	59,4	48,1	38,7	36,8
RTV	4,9	2,2	4,4	3,1	4,2	5,0	4,4	3,2	3,4

3.2.2. Einfluss der Tumorlokalisierung auf das Therapieansprechen

Um den Einfluss der Tumorlokalisierung auf das Therapieansprechen zu prüfen, wurden alle PDX-Modelle aus Metastasen des Omentums mit allen Modellen aus Metastasen des parietalen Peritoneums in Bezug auf ihr Therapieansprechen verglichen. Hierbei ließ sich feststellen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Metastasen unterschiedlicher Lokalisationen bestanden, weder im allgemeinen Therapieansprechen (Abbildung 11), noch im Therapieansprechen auf die jeweils einzelnen 9 Chemotherapeutika (Abbildung 12).

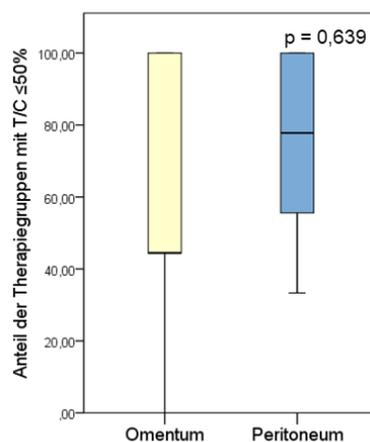


Abbildung 11: Therapieansprechen der PDX-Modelle je nach Tumorlokalisierung. Vergleich zwischen PDX-Modellen aus Metastasen des Omentums versus Metastasen des parietalen Peritoneums. Dargestellt wird der jeweilige Anteil der Modelle mit einem T/C-Wert $\leq 50\%$ in Prozent. Die Evaluation von Unterschieden im Therapieansprechen wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

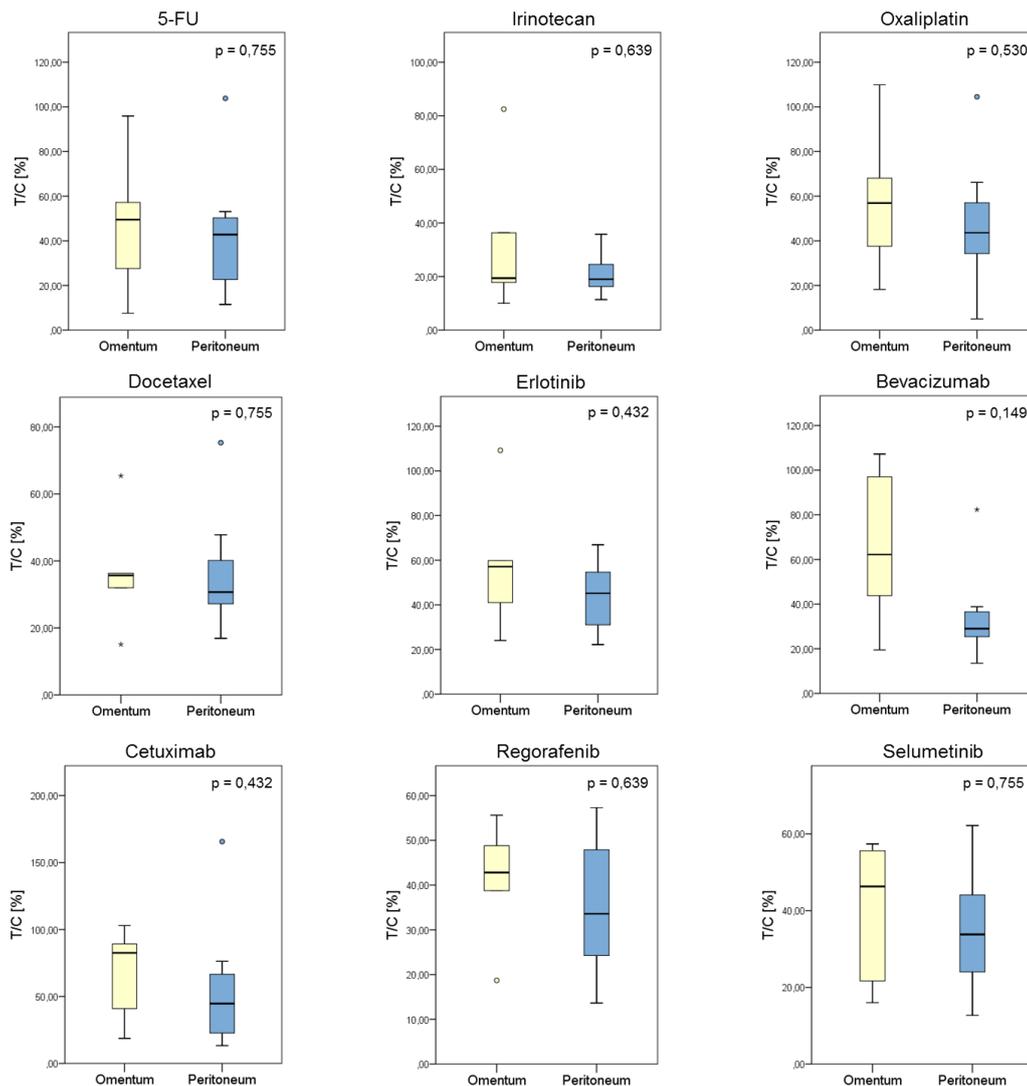


Abbildung 12: Therapieansprechen der PDX-Modelle je nach Tumorlokalisation für 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Docetaxel, Erlotinib, Bevacizumab, Cetuximab, Regorafenib und Selumetinib. Dargestellt wird jeweils das Therapieansprechen (T/C-Wert) für PDX-Modelle aus Metastasen des Omentums und des parietalen Peritoneums im Vergleich. Die Evaluation von Unterschieden im Therapieansprechen wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.2.3. Intra-individuelle Heterogenität im Therapieansprechen

Die Testung der Chemosensitivität der PDX-Modelle desselben Patienten, welche sich in der Lokalisation des peritonealen Befalls (Omentum versus parietales Peritoneum) unterschieden, ermöglicht einen direkten intra-individuellen Vergleich des Therapieansprechens dieser Modelle. In Abbildung 13 wird das Ansprechen von jeweils beiden PDX-Modellen der Patienten KRK05, KRK19 und KRK28 dargestellt.

Hierbei zeigten sich jeweils für denselben Patienten zwischen den Modellen unterschiedlicher Lokalisationen (Omentum und parietales Peritoneum) deutliche Unterschiede im Therapieansprechen. Beispielsweise ließ das Modell aus einer Metastase des parietalen Peritoneums von Patient KRK05 ein heterogenes

Ergebnisse

Tumoransprechen auf die jeweiligen Therapeutika erkennen, während das Modell aus einer Metastase des Omentums eine deutliche Response für alle Therapeutika aufwies. Auch für Patient KRK19 ließen sich Unterschiede im Therapieansprechen zwischen den Modellen erkennen. Das Modell aus einer Metastase des parietalen Peritoneums zeigte allgemein ein gutes Ansprechen auf alle 9 Therapeutika, während das Modell aus einer Metastase des Omentums auf keines der Therapeutika ansprach. Beide Modelle von Patient KRK28 wiesen ein heterogenes Therapieansprechen auf, jedoch zeigten sich auch hier deutliche Abweichungen im Ansprechen der einzelnen Therapeutika.

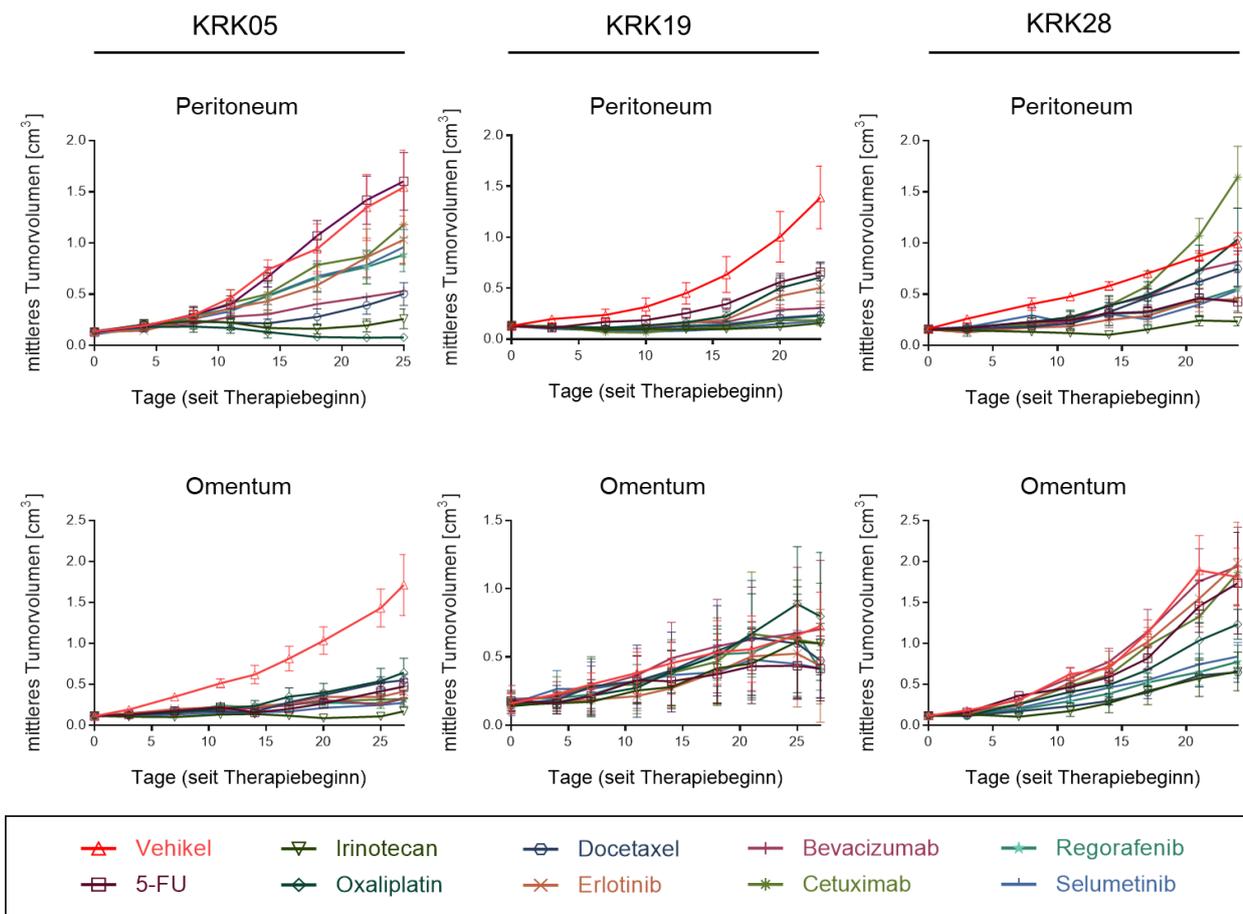


Abbildung 13: Intra-individuelle Unterschiede im Ansprechen auf die jeweiligen Therapeutika für die Peritoneum- oder Omentum-abgeleitete PDX-Modelle der Patienten KRK05, -19 und -28. In der oberen Reihe ist das Ansprechen der Modelle aus Metastasen des parietalen Peritoneums dargestellt. In der unteren Reihe ist das Ansprechen der PDX-Modelle aus Metastasen des Omentums dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

3.2.4. Einfluss von Vorbehandlung auf das Therapieansprechen

Ein großer Teil der Patienten (88,6%) wurde vor der Operation, in der das pmKRK-Gewebe entnommen wurde, chemotherapeutisch vorbehandelt. Häufig angewandte Chemotherapeutika waren hierbei 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin. Von den 35 Patienten

wurden 82,9% mit 5-FU, 48,6% mit Irinotecan, 68,6% mit Oxaliplatin und 37,1% mit Bevacizumab behandelt. Tabelle 20 zeigt die chemotherapeutische Vorbehandlung der 10 Patienten mit etabliertem PDX. Ein Vergleich der Therapieresponse vorbehandelter und nicht vorbehandelter Modelle ergab für die Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Bevacizumab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 14). Die Vorbehandlung mit diesen Therapeutika hat keinen sichtbaren Einfluss auf das Therapieansprechen. Eine signifikante Resistenzbildung gegenüber Therapeutika, mit welchen eine Vorbehandlung erfolgte, ist nicht erkennbar. Eine Vergleichbarkeit vorbehandelter und nicht vorbehandelter Modelle für die weiteren Analysen, ist somit anzunehmen.

Tabelle 20: Chemotherapeutische Behandlung der Patienten vor Operation. + = vorbehandelt; - = nicht vorbehandelt.

Patienten	Vorbehandlung	Therapeutika				
		5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Bevacizumab	Weitere
KRK03	+	+	-	+	+	Capecitabin
KRK05	+	+	-	+	+	-
KRK06	+	+	-	+	-	Panitumumab
KRK09	+	+	+	-	-	Capecitabin
KRK13	+	+	-	+	+	-
KRK19	+	+	-	+	+	-
KRK21	+	+	+	+	-	Panitumumab
KRK24	-	-	-	-	-	-
KRK28	+	+	-	+	-	-
KRK39	+	+	+	-	-	-

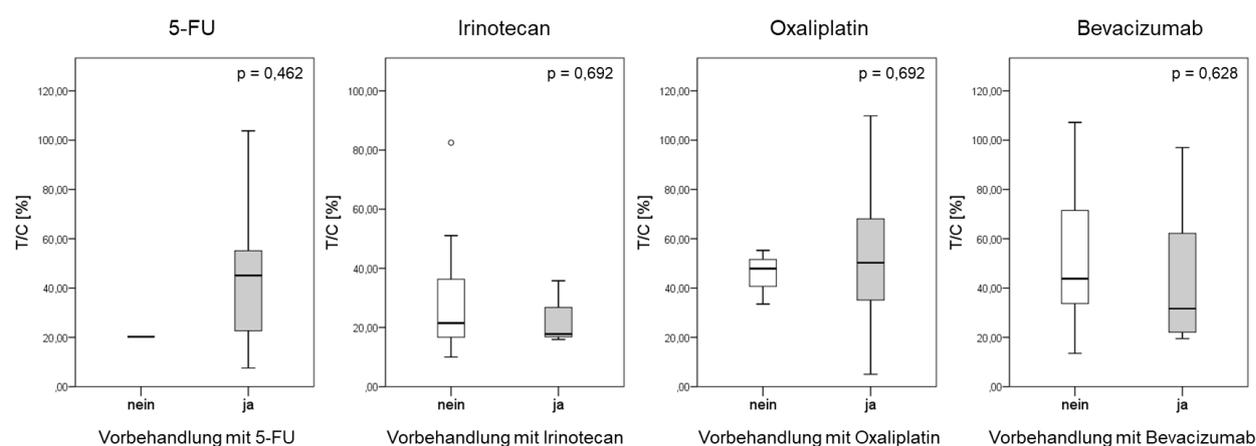


Abbildung 14: Therapieansprechen (T/C-Wert) der PDX-Modelle von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patiententumoren. Die Evaluation von Unterschieden im Therapieansprechen auf 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Bevacizumab zwischen mit dem jeweiligen Therapeutikum vor- und nicht vorbehandelten Modellen wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass das Therapieansprechen zwischen den einzelnen Therapeutika und PDX-Modellen eine starke Varianz aufweist. Die Varianz lässt sich sogar bei verschiedenen Modellen desselben Patienten feststellen. Im Ergebnis zeigen Irinotecan das beste und Cetuximab das schlechteste Therapieansprechen. Tumorlokalisation und vorangegangene chemotherapeutische Behandlung der Patienten zeigen keine signifikanten Auswirkungen auf das Therapieansprechen der PDX-Modelle.

3.3. Analyse der S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe

Um die Bedeutung von S100A4 für das pmKRK zu evaluieren, wurde zunächst seine Expression im Tumorgewebe der PDX-Modelle bestimmt. Die mittels qRT-PCR ermittelte S100A4-Expression im Tumorgewebe der unbehandelten Kontrollgruppen wird in Abbildung 15 dargestellt. Anhand der errechneten medianen S100A4-Expression (25,7% Kalibrator) wurden die Modelle in niedrig (blau) und hoch (rot) S100A4 exprimierend eingeteilt. Die S100A4-Expression reichte von 3,1% bis 982,4% Kalibrator.

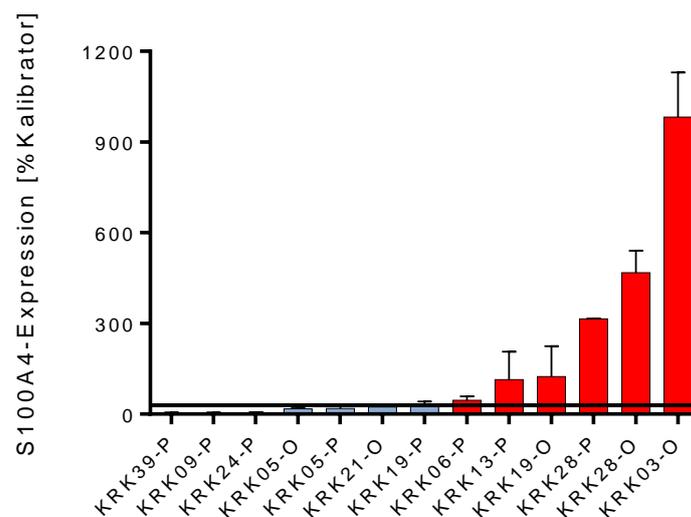


Abbildung 15: S100A4-Expression im Tumorgewebe der PDX-Modelle bestimmt mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollgruppen und die entsprechenden Standardabweichungen. Der errechnete Median (25,7% Kalibrator, schwarze Linie) teilt die Modelle in niedrig (blau) und hoch (rot) S100A4 exprimierend ein.

Neben der Bestimmung der S100A4-Expression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR wurde der Nachweis des Biomarkers S100A4 auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie durchgeführt. Dabei zeigte der immunhistochemische Nachweis von S100A4 (Abbildung 16) in Modellen, die zuvor auch mittels qRT-PCR als S100A4 hoch exprimierend eingeteilt wurden, eine deutlich stärkere Färbung verglichen mit Modellen, die zuvor mittels qRT-PCR als S100A4 niedrig exprimierend eingeteilt worden waren.

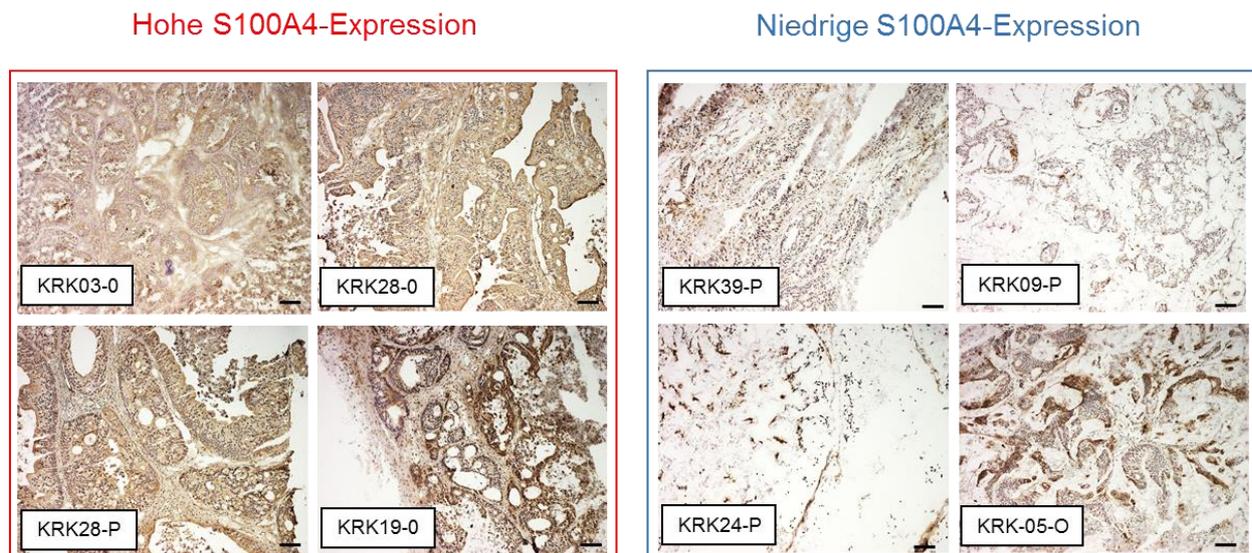


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von S100A4 in den unbehandelten Kontrolltumoren der jeweiligen PDX-Modelle. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μ m.

3.3.1. Vergleich der S100A4-Expression im Patienten- und PDX-Tumorgewebe

Ferner wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe und der S100A4-Expression im Patienten-Tumorgewebe bestand. Die Korrelation von mittels qRT-PCR gemessener S100A4-Expression in den unbehandelten PDX-Tumoren und dem Patienten-Tumorgewebe wird in Abbildung 17 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der S100A4-Expression im PDX-Tumor und dem korrespondierenden Patiententumor mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,80.

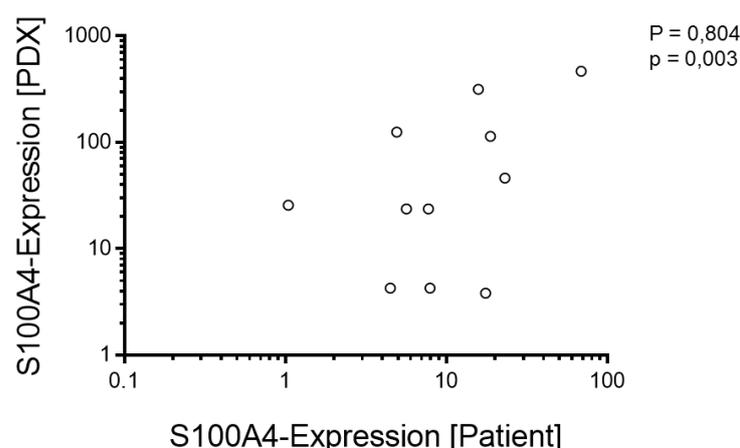


Abbildung 17: Korrelation der S100A4-Expression [% Kalibrator] im Patienten-Tumorgewebe und dem Gewebe des entsprechenden PDX-Modells. Die Evaluierung des Zusammenhangs zwischen der S100A4-Expression in PDX- und Patiententumorgewebe wurde mithilfe der Pearson-Korrelation durchgeführt. P = Pearson-Korrelationskoeffizient; p = p -Wert. Ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.3.2. Einflussfaktoren auf die S100A4-Expression

Der potenzielle Effekt verschiedener Einflussfaktoren auf die S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe wurde analysiert. Abbildung 18 zeigt die S100A4-Expression abhängig von Tumorentität, Tumorlokalisierung, Geschlecht, Ausmaß des Tumorbefalls (PCI), Histologie, Grading, KRAS-Mutationsstatus und Art der Metastasierung. Keiner der genannten Faktoren ergab einen signifikanten Einfluss auf die S100A4-Expression.

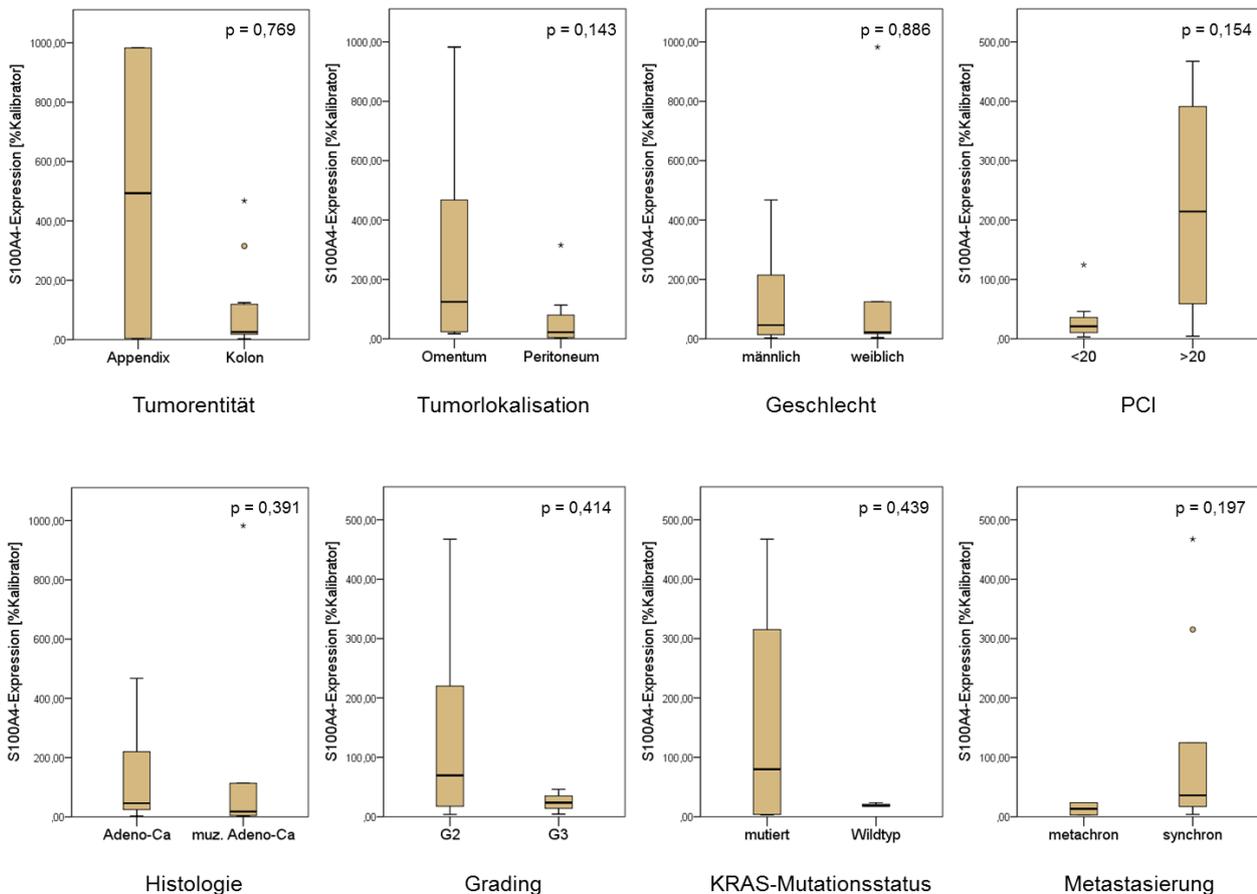


Abbildung 18: Mögliche Einflussfaktoren auf die S100A4-Expression im PDX-Modell: Entität des Primärtumors (Kolon- vs. Appendixkarzinom), Lokalisation der Metastase (Omentum vs. parietales Peritoneum), Geschlecht (männlich vs. weiblich), Ausmaß des Tumorbefalls (PCI < 20 vs. PCI > 20), Tumorhistologie (Adeno-Ca = Adenokarzinom vs. muz. Adeno-Ca = muzinöses Adenokarzinom), Tumorgrading (mäßig differenziert (G2) vs. schlecht differenziert (G3)), KRAS-Mutationsstatus (KRAS mutiert vs. KRAS Wildtyp) und Art der Metastasierung (metachron vs. synchron). Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.3.3. Einfluss der S100A4-Expression auf das Wachstum von pmKRK

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen S100A4-Expression und Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore bestand. Eine Korrelation zwischen der benötigten Zeit zur Verdopplung des Tumolvolumens und der gemessenen S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe ergab keinen signifikanten Zusammenhang

(Abbildung 19). Auch bestanden zwischen S100A4 hoch und niedrig exprimierenden Modellen kein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum. Ein Einfluss der S100A4-Expression auf das Tumorwachstum ist somit nicht erkennbar.

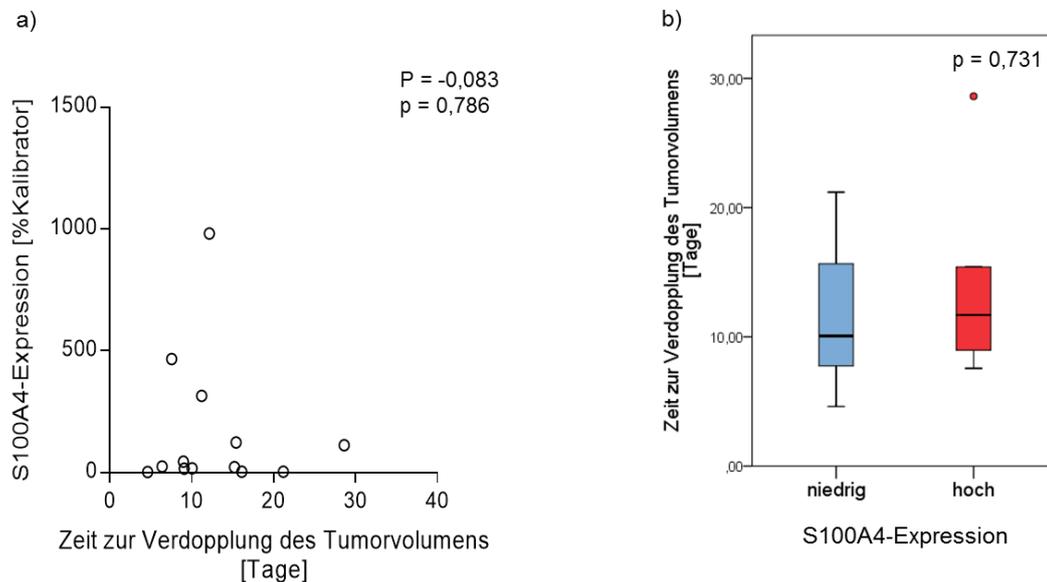


Abbildung 19: a) Korrelation von S100A4-Expression [% Kalibrator] im PDX-Modell und der Zeitspanne, welche die unbehandelten Kontrolltumore benötigten, um ihr Tumolvolumen zu verdoppeln. Die Evaluierung des Zusammenhangs wurde mithilfe der Pearson-Korrelation durchgeführt. P = Pearson-Korrelationskoeffizient; p = p -Wert. Ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. b) Zeit zur Verdopplung des Tumolvolumens niedrig und hoch S100A4 exprimierender Modelle. Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator. Die Evaluation von Unterschieden wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P -Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Im Ergebnis ist S100A4 im PDX-Tumorgewebe von pmKRK exprimiert. Die ermittelte Expression zeigt zwischen den Modellen eine deutliche Varianz und korreliert signifikant mit der S100A4-Expression der entsprechenden Patiententumore. Tumorentität, Tumorlokalisierung, Geschlecht, Ausmaß des Tumorbefalls (PCI), Histologie, Grading, KRAS-Mutationsstatus und Art der Metastasierung zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe. Ein Zusammenhang zwischen der S100A4-Expression und dem Tumorwachstum ist nicht feststellbar.

3.4. S100A4-Expression als prädiktiver Marker des Therapieansprechens

Im Folgenden wird der prädiktive Wert der S100A4-Expression im Tumorgewebe für das Therapieansprechen der 9 getesteten Chemotherapeutika vorgestellt. Hierbei wird insbesondere auf die Prädiktion des Therapieansprechens von Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab eingegangen, da für diese 3 Therapeutika ein Zusammenhang zwischen S100A4-Expression und Ansprechen festgestellt werden konnte.

3.4.1. Oxaliplatin

Für das Therapieansprechen auf Oxaliplatin wurde ein Vergleich von S100A4 niedrig und hoch exprimierenden PDX-Modellen durchgeführt. Für S100A4 niedrig exprimierende Modelle ergab sich ein mittlerer T/C-Wert von 34,4%, während er für S100A4 hoch exprimierende Modelle bei 73,5% lag. Der Unterschied in der Therapieresponse zwischen den beiden Gruppen war dabei signifikant (Abbildung 20). Modelle, welche ein Therapieansprechen (T/C $\leq 50\%$) aufwiesen, zeigten eine signifikant geringere S100A4-Expression. Während die mittlere S100A4-Expression für Modelle mit T/C $>50\%$ 323,3% Kalibrator betrug, lag sie für Modelle mit T/C $\leq 50\%$ bei 29,3% Kalibrator.

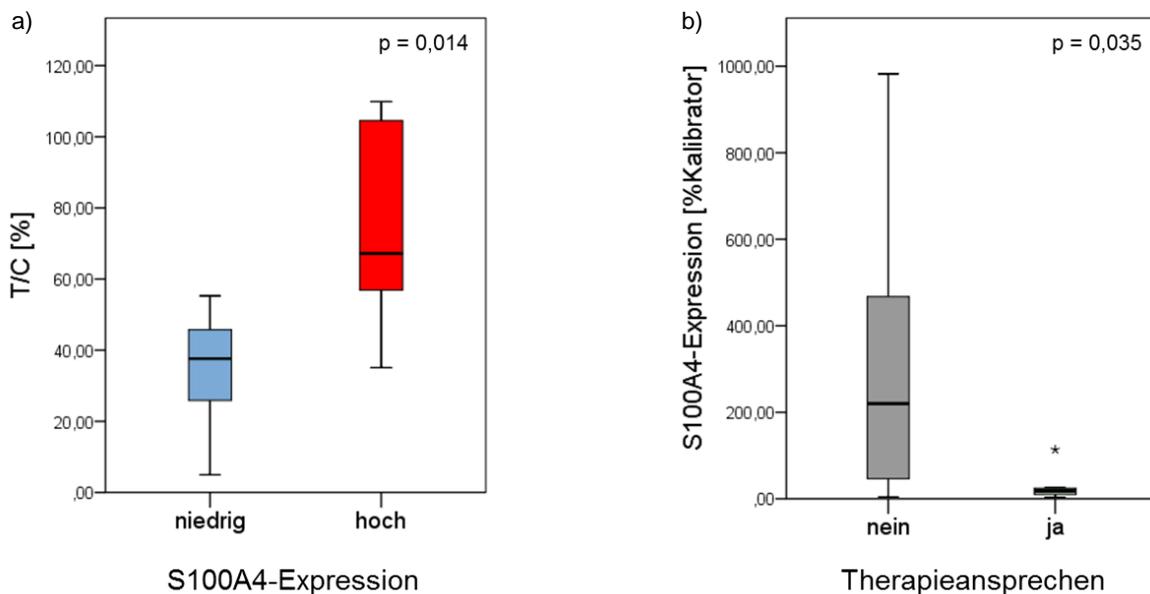


Abbildung 20: Therapieansprechen auf Oxaliplatin. Dargestellt wird a) die Therapieresponse S100A4 niedrig und hoch exprimierender Modelle anhand der T/C-Werte, b) die S100A4-Expression von Modellen mit Therapieansprechen (T/C-Wert $\leq 50\%$) und Modellen ohne Therapieansprechen auf Oxaliplatin (T/C-Wert $>50\%$). Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression bzw. im Therapieansprechen (T/C-Werte) wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Abbildung 21 zeigt die Therapieresponse der niedrig und hoch S100A4 exprimierenden PDX-Modelle im Verlauf der Behandlung mit Oxaliplatin. Hier zeigten alle 7 Modelle mit niedriger S100A4-Expression einen Rückgang der T/C-Werte unter der Behandlung. Mit einer Ausnahme erreichten alle Modelle nach Abschluss der Behandlung einen T/C-Wert $\leq 50\%$. Für die 6 Modelle mit hoher S100A4-Expression war dieser Trend hingegen nicht feststellbar. Bei Beendigung der Therapie erreichten hiervon lediglich 2 Modelle einen T/C-Wert $\leq 50\%$.

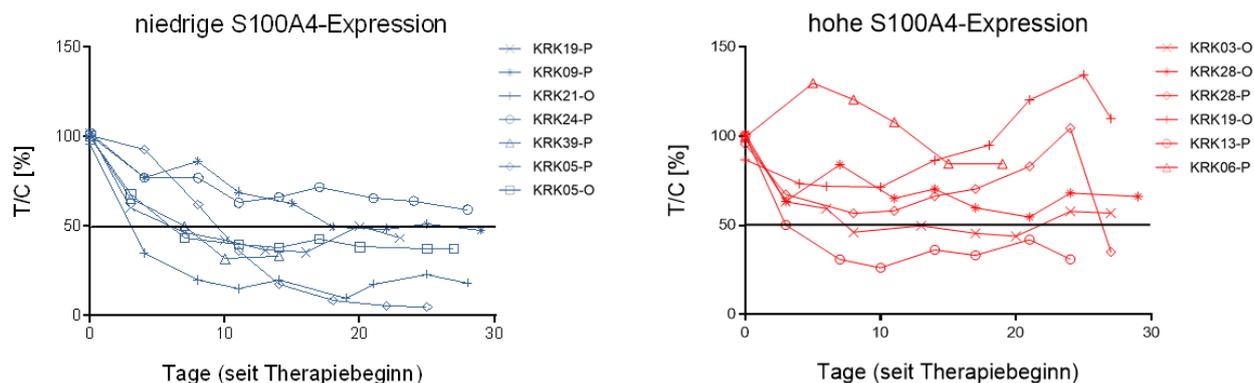


Abbildung 21: Therapieansprechen (T/C-Werte) für S100A4 niedrig (blau) und S100A4 hoch (rot) exprimierende PDX-Modelle im Behandlungsverlauf mit Oxaliplatin. Die Einteilung der Modelle in niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des Medians von 25,7% Kalibrator.

3.4.2. Cetuximab

Die Behandlung mit Cetuximab ließ für S100A4 niedrig exprimierende Modelle einen mittleren T/C-Wert von 37,1% erkennen, während er für S100A4 hoch exprimierende Modelle bei 85,4% lag. Der Unterschied war signifikant (Abbildung 22). Modelle mit einem Ansprechen auf die Behandlung mit Cetuximab (T/C-Wert $\leq 50\%$) zeigten eine geringere S100A4-Expression. Während die mittlere S100A4-Expression für Modelle mit T/C $> 50\%$ 318,6% Kalibrator betrug, lag sie für Modelle mit T/C $\leq 50\%$ bei 33,4% Kalibrator.

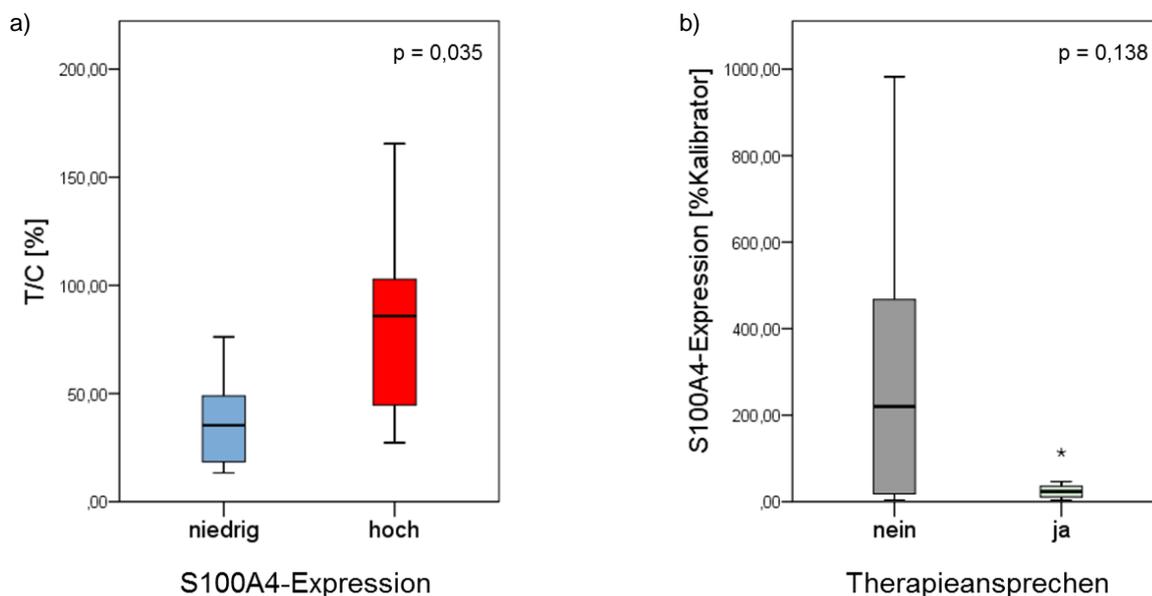


Abbildung 22: Therapieansprechen auf Cetuximab. Dargestellt wird a) die Therapiereponse S100A4 niedrig und hoch exprimierender Modelle (T/C-Werte) sowie b) die S100A4-Expression von Modellen mit Therapieansprechen (T/C-Wert $\leq 50\%$) und ohne Therapieansprechen (T/C-Wert $> 50\%$). Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression bzw. im Therapieansprechen (T/C-Werte) wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Abbildung 23 zeigt das Therapieansprechen auf Cetuximab der niedrig und hoch S100A4 exprimierenden PDX-Modelle im Behandlungsverlauf. Alle 7 Modelle mit niedriger S100A4-Expression verzeichneten eine Reduktion ihrer T/C-Werte unter der Behandlung mit Cetuximab. 5 Modelle erreichten nach Abschluss der Behandlung einen T/C-Wert $\leq 50\%$. Von den 6 Modelle mit hoher S100A4-Expression wiesen 4 Modelle keine Therapieresponse auf. Ihre T/C-Werte nach Abschluss der Therapie betrugen $>50\%$.

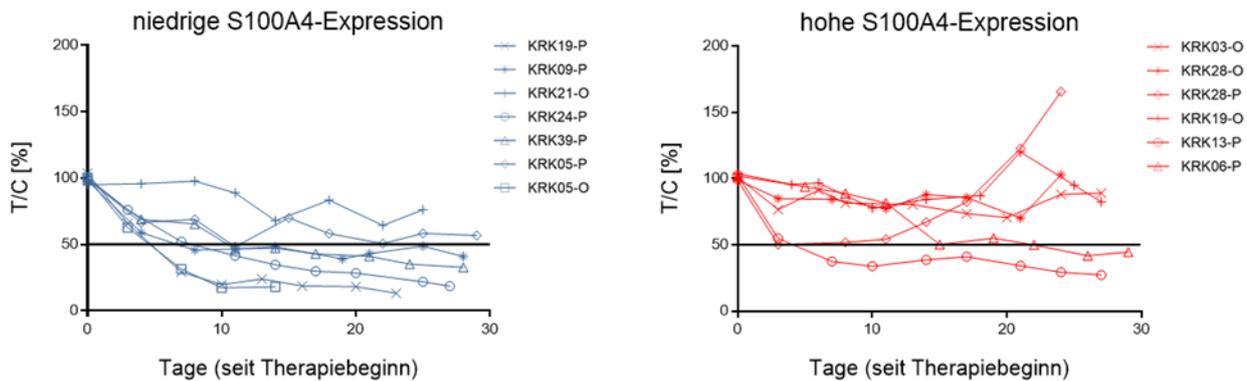


Abbildung 23: Therapieansprechen (T/C-Werte) für S100A4 niedrig (blau) und S100A4 hoch (rot) exprimierende Modelle im Verlauf der Behandlung mit Cetuximab. Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator.

3.4.3. Bevacizumab

Auch für das Ansprechen der PDX-Modelle auf Bevacizumab wurde ein Vergleich von S100A4 niedrig und hoch exprimierenden PDX-Modellen durchgeführt. Dieser Vergleich wird in Abbildung 24 dargestellt. S100A4 hoch exprimierende Modelle zeigten ein schlechteres Therapieansprechen als S100A4 niedrig exprimierende Modelle. Im Mittel wiesen S100A4 niedrig exprimierende Modelle einen T/C-Wert von 33,2%, S100A4 hoch exprimierende Modelle einen T/C-Wert von 67,7% auf. Dieser Unterschied war dabei allerdings nicht signifikant.

Modelle mit einem Therapieansprechen auf Bevacizumab (T/C $\leq 50\%$) zeigten eine geringere S100A4-Expression. Die mittlere S100A4-Expression betrug für Modelle ohne Therapieansprechen auf Bevacizumab (T/C-Wert $>50\%$) 378,8% Kalibrator. Für Modelle mit einem Therapieansprechen (T/C $\leq 50\%$) lag sie bei 31,4% Kalibrator. Der Unterschied in der Therapieresponse zwischen den beiden Gruppen war signifikant.

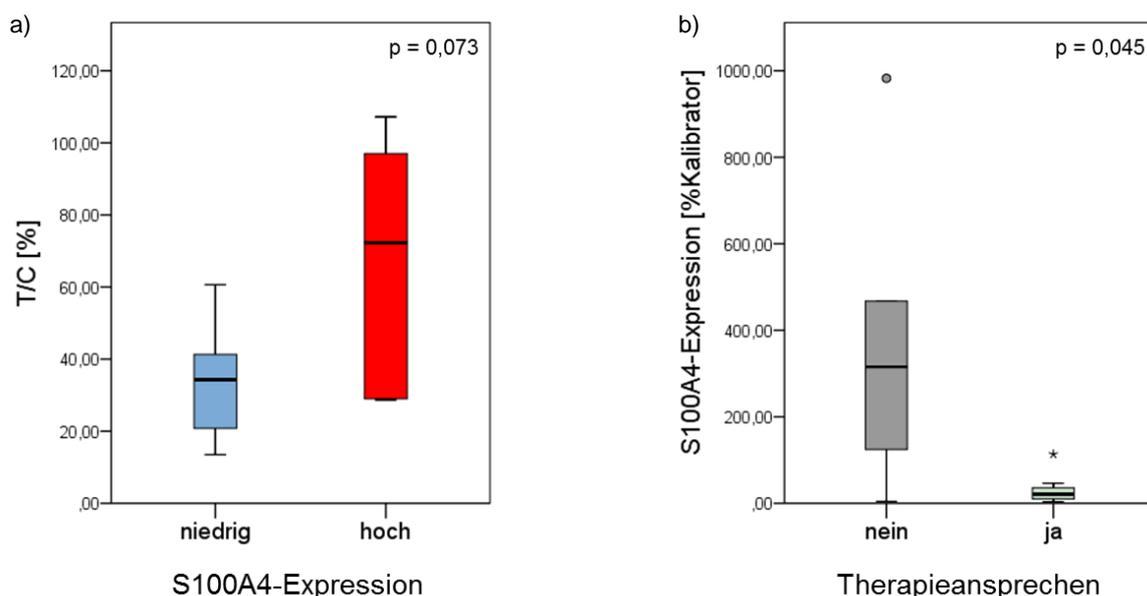


Abbildung 24: Therapieansprechen auf Bevacizumab. Dargestellt wird a) die Therapiereponse S100A4 niedrig und hoch exprimierender Modelle anhand der T/C-Werte, b) die S100A4-Expression von Modellen mit Therapieansprechen (T/C-Wert $\leq 50\%$) und Modellen ohne Therapieansprechen auf Bevacizumab (T/C-Wert $> 50\%$). Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression bzw. im Therapieansprechen (T/C-Werte) wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Das Therapieansprechen der niedrig und hoch S100A4 exprimierenden PDX-Modelle wird in Abbildung 25 dargestellt. Wie bereits für Oxaliplatin und Cetuximab gezeigt wurde, verzeichneten die 7 Modelle mit niedriger S100A4-Expression auch unter Behandlung mit Bevacizumab einen Rückgang ihrer T/C-Werte. Mit einer Ausnahme erreichten alle Modelle nach Abschluss der Behandlung einen T/C-Wert $\leq 50\%$. Für die 6 Modelle mit hoher S100A4-Expression war dieser Trend nicht feststellbar. Hier konnte lediglich bei 2 Modellen eine Reduktion des T/C-Werts $\leq 50\%$ ermittelt werden.

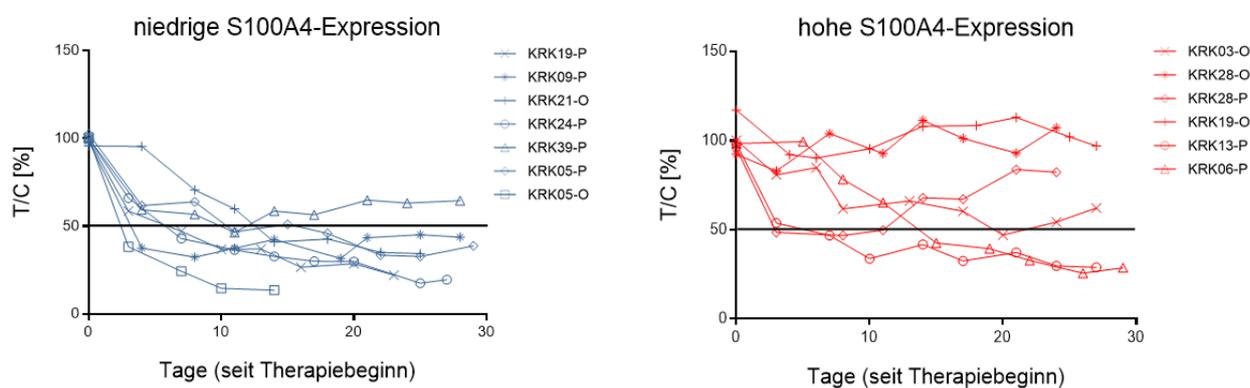


Abbildung 25: Therapieansprechen (T/C-Werte) für S100A4 niedrig (blau) und S100A4 hoch (rot) exprimierende Modelle im Verlauf der Behandlung mit Bevacizumab. Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 ausgeführt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator.

3.4.4. Einfluss der Behandlung mit Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab auf die S100A4-Expression im Tumorgewebe

Um die Auswirkung der Behandlungen mit Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab auf die S100A4-Expression im Tumorgewebe der PDX-Modelle zu untersuchen, wurde die Expression in der Kontrollgruppe mit der Expression der behandelten Tumore verglichen. Der Vergleich der Expression wurde mittels qRT-PCR und Immunhistochemie durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 26 dargestellt. Nach der Behandlung mit Cetuximab zeigte sich eine signifikant geringere S100A4-Expression verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dagegen zeigten die PDX-Tumore nach Behandlung mit Oxaliplatin und nach Behandlung mit Bevacizumab keine signifikanten Unterschiede in der S100A4-Expression, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe.

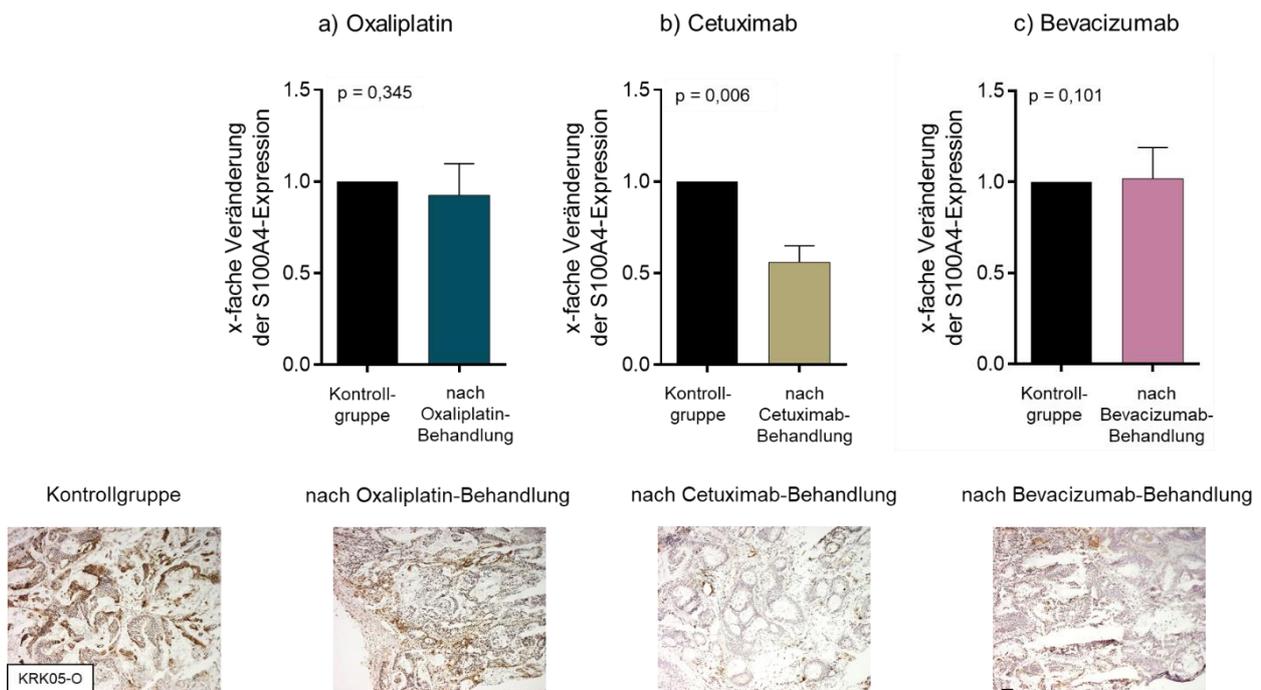


Abbildung 26: Veränderung der S100A4-Expression in den mit a) Oxaliplatin, b) Cetuximab und c) Bevacizumab behandelten Tumoren gegenüber der S100A4-Expression in der unbehandelten Kontrollgruppe. Oben: x-fache Veränderung der S100A4-mRNA-Expression nach Behandlung, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression von Kontroll- und Behandlungsgruppen wurde mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Unten: mittels Immunhistochemie dargestellte S100A4-Protein-Expression in der Kontrollgruppe und nach der jeweiligen Behandlung beispielhaft für das PDX-Modell KRK05-O.

3.4.5. 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib, Selumetinib

Für die Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib konnte ein Vergleich von niedrig und hoch S100A4 exprimierenden PDX-Modellen keinen

signifikanten Unterschied im Therapieansprechen ermitteln (Abbildung 27). Jedoch ist für alle 6 Chemotherapeutika festzustellen, dass Modelle mit niedriger S100A4-Expression ein tendenziell verbessertes Therapieansprechen aufweisen.

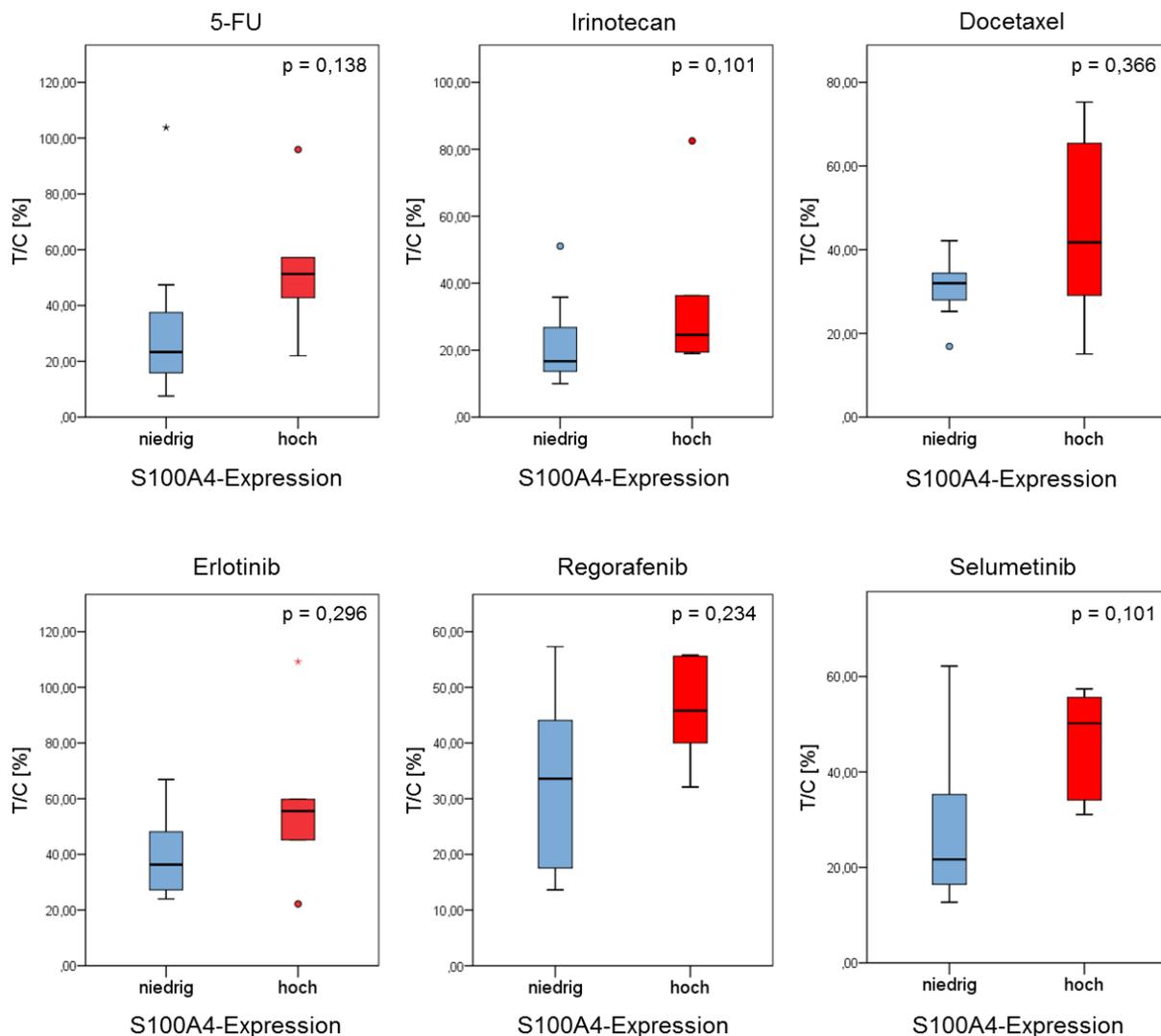


Abbildung 27: Vergleich des Ansprechens S100A4 niedrig und hoch exprimierender PDX-Modelle auf die Behandlung mit 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib unter Verwendung der T/C-Werte. Dargestellt ist die S100A4-Expression im Tumorgewebe der unbehandelten Kontrollgruppen. Die Einteilung der PDX-Modelle in S100A4 niedrig und hoch exprimierend erfolgte, wie in Abbildung 15 dargestellt, anhand des errechneten Medians von 25,7% Kalibrator. Die Evaluation von Unterschieden im Therapieansprechen (T/C-Werte) wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Ein Vergleich von S100A4-Expression zwischen Modellen mit Therapieansprechen und Modellen ohne Therapieansprechen für 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib wird in Abbildung 28 dargestellt. Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der jeweiligen S100A4-Expression zwischen Modellen mit und ohne Therapieansprechen feststellen.

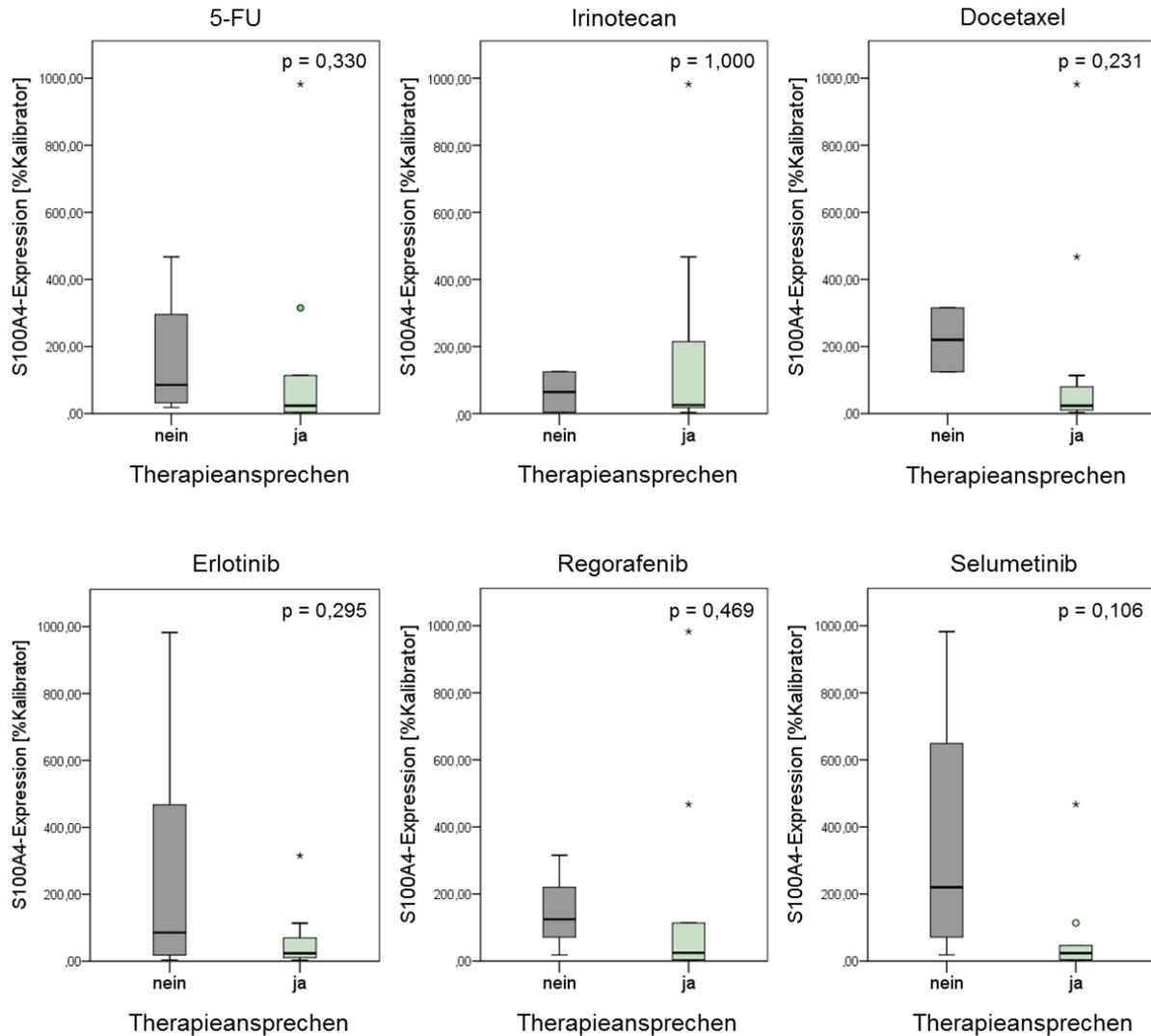


Abbildung 28: Vergleich der S100A4-Expression von Modellen mit ($T/C \leq 50\%$) und ohne ($T/C > 50\%$) Therapieansprechen auf die Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib, Selumetinib. Dargestellt ist die S100A4-Expression im Tumorgewebe der unbehandelten Kontrollgruppe. Als Cut-off für die Einteilung in Therapieansprechen und Nicht-Ansprechen dient ein T/C-Wert = 50%. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.4.6. Einfluss der Behandlung mit 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib auf die S100A4-Expression im Tumorgewebe

Auch für die Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib wurde die Auswirkung der Behandlung auf die S100A4-Expression im PDX-Tumorgewebe untersucht. Abbildung 29 illustriert die Veränderung der S100A4-Expression nach Behandlung mit den einzelnen Therapeutika. Dabei zeigte sich sowohl nach Behandlung mit Irinotecan als auch nach Behandlung mit Selumetinib eine signifikant reduzierte Expression. Die Behandlung mit 5-FU, Docetaxel, Erlotinib und Regorafenib ergab keine signifikante Veränderung der S100A4-Expression.

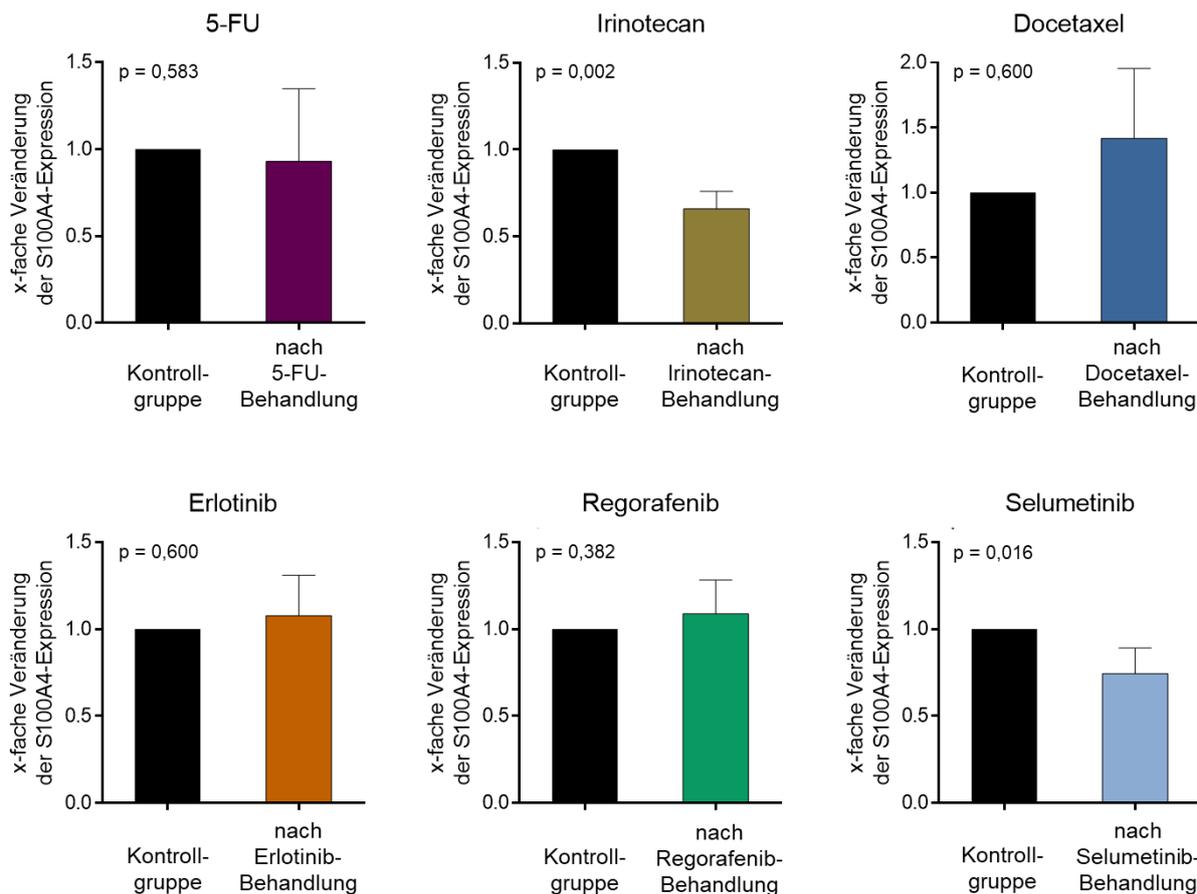


Abbildung 29: Veränderung der S100A4-Expression im Tumorgewebe nach Behandlung mit den Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib. Dargestellt wird die x-fache Veränderung der S100A4-Expression nach Behandlung mit dem jeweiligen Therapeutikum verglichen mit der S100A4-Expression der Kontrollgruppe. Zu sehen sind Mittelwerte und Standardfehler. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression wurde mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Zusammenfassend zeigt sich die S100A4-Expression als signifikant prädiktiv für das Therapieansprechen bei Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab. Eine hohe S100A4-Expression im Tumorgewebe geht dabei mit einem verminderten Therapieansprechen auf diese Therapeutika einher. Für die übrigen 6 Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib lässt sich kein signifikanter Zusammenhang belegen. Nach Behandlung mit Cetuximab, Irinotecan und Selumetinib zeigt sich eine signifikante Reduktion der S100A4-Expression im Tumorgewebe.

3.5. Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Patientenplasma

In den vorausgegangenen Abschnitten (3.1 bis 3.4) wurde ein prädiktiver Wert des Biomarkers S100A4 im pmKRC-Gewebe der PDX-Modelle gezeigt. Im folgenden Abschnitt werden die S100A4-mRNA-Expression im Plasma von Patienten mit pmKRC sowie mögliche Einflussfaktoren evaluiert.

Plasma von 24 der insgesamt 35 Patienten mit pmKRK stand für die Testung zur Verfügung. Das Patientenplasma wurde mit dem Plasma einer gesunden Kontrollgruppe (n = 10) verglichen. Hierbei zeigte das Plasma der Patienten ein deutlich höheres Niveau der S100A4-mRNA gegenüber dem S100A4-mRNA-Niveau im Plasma der gesunden Kontrollpersonen. Die ermittelte Differenz war signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 30). Während die mittlere S100A4-mRNA Kopienzahl pro 1ml Plasma in der Kontrollgruppe 1467,8 Kopien betrug, lag sie für pmKRK-Patienten bei 5055,0 Kopien.

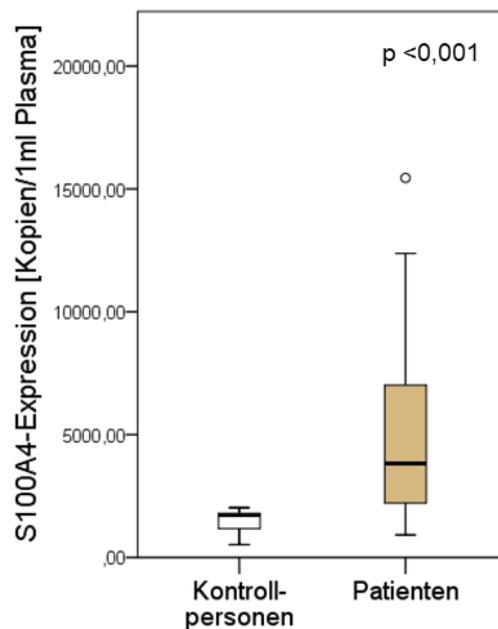


Abbildung 30: Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Plasma von Patienten mit pmKRK (n=24) verglichen mit der S100A4-mRNA-Expression einer gesunden Kontrollgruppe (n=10). Die Analyse des S100A4-mRNA-Niveaus im Plasma wurde mittels ddPCR durchgeführt. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression zwischen Kontrollpersonen und Patienten wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Um einen möglichen Einfluss der Tumorentität auf das S100A4-mRNA-Niveau zu untersuchen, wurde die S100A4-Expression im Plasma von Patienten mit peritoneal metastasiertem Appendixkarzinom und Patienten mit peritoneal metastasiertem Kolonkarzinom gegenübergestellt (Abbildung 31). Die S100A4-mRNA in den beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,36$). Neben der Tumorentität wurde der Einfluss weiterer Merkmale auf die S100A4-mRNA-Expression im Patientenplasma untersucht, wie die Art der Metastasierung, das Ausmaß des Tumorbefalls, das Tumorigradung, der KRAS-Mutationsstatus und das Geschlecht der Patienten. Dabei zeigte lediglich der KRAS-Mutationsstatus einen signifikanten Einfluss auf die S100A4-mRNA-Expression im Plasma. Patienten mit mutiertem KRAS zeigten höhere S100A4-mRNA-Level im Plasma.

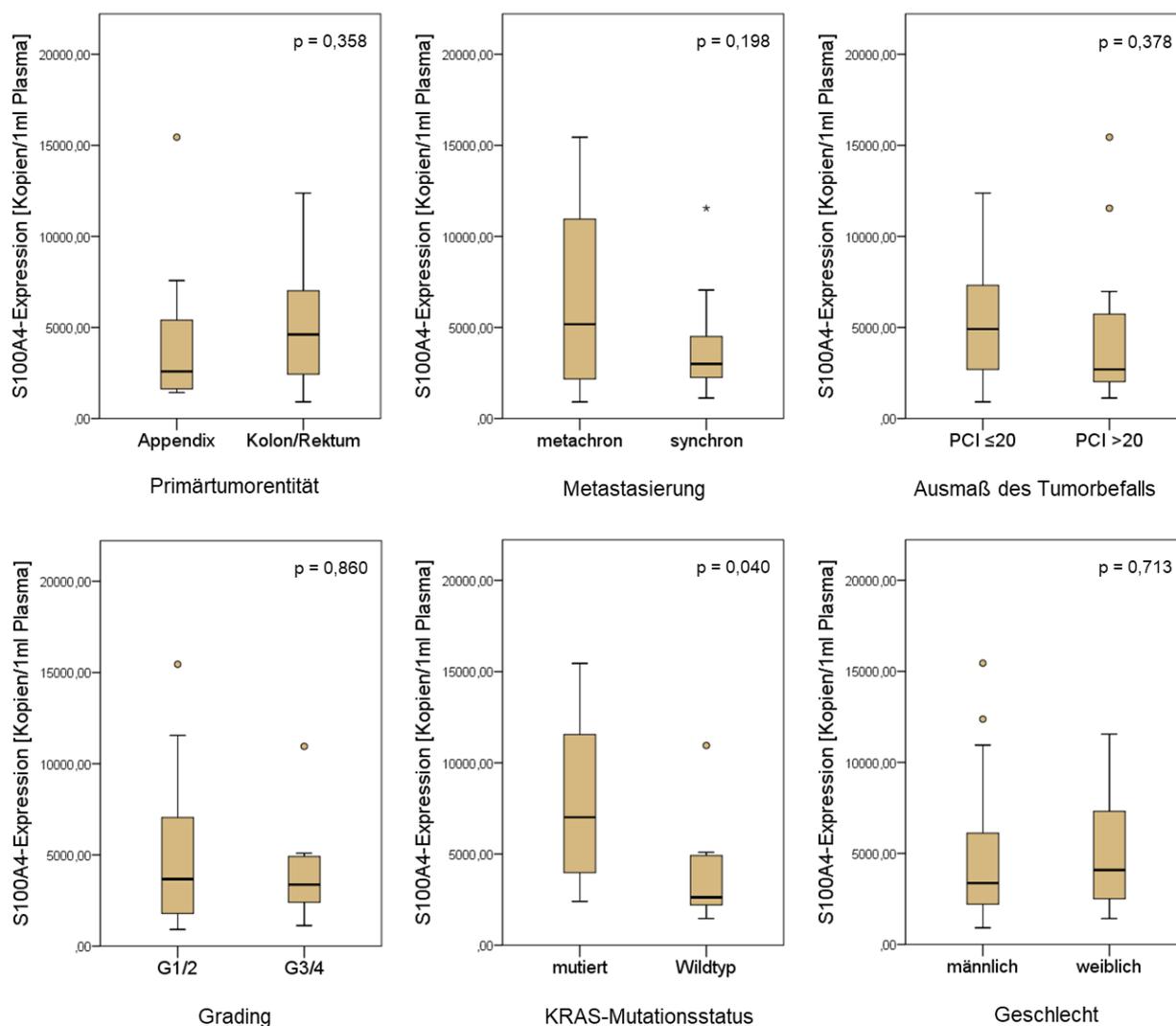


Abbildung 31: Analyse der S100A4-mRNA-Expression im Patientenplasma in Abhängigkeit von Tumorentität (Appendixkarzinom vs. Kolon-/Rektumkarzinom), Metastasierung (metachron vs. synchron), Ausmaß des Tumorbefalls (PCI ≤20 vs. PCI >20), Tumorigradung (G1/2 vs. G3/4), KRAS-Mutationsstatus (mutiert vs. Wildtyp), Geschlecht (männlich vs. weiblich). Die Analyse der S100A4-Expression im Plasma wurde mittels ddPCR durchgeführt. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Um ferner den möglichen Einfluss von chemotherapeutischer Vorbehandlung auf das S100A4-mRNA-Level im Plasma zu untersuchen, wurde das S100A4-mRNA Niveau von Patienten mit und ohne Chemotherapie in der Krankengeschichte verglichen (Abbildung 32). Dabei zeigte chemotherapeutische Vorbehandlung keinen signifikanten Einfluss auf die S100A4-mRNA Menge im Plasma.

Bei Betrachtung der einzelnen Therapeutika ließ sich für 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Cetuximab kein signifikanter Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten bezüglich der S100A4-mRNA-Expression feststellen. Interessanterweise wiesen mit Bevacizumab vorbehandelte Patienten ein signifikant erhöhtes S100A4-mRNA-Niveau im Plasma auf.

Ergebnisse

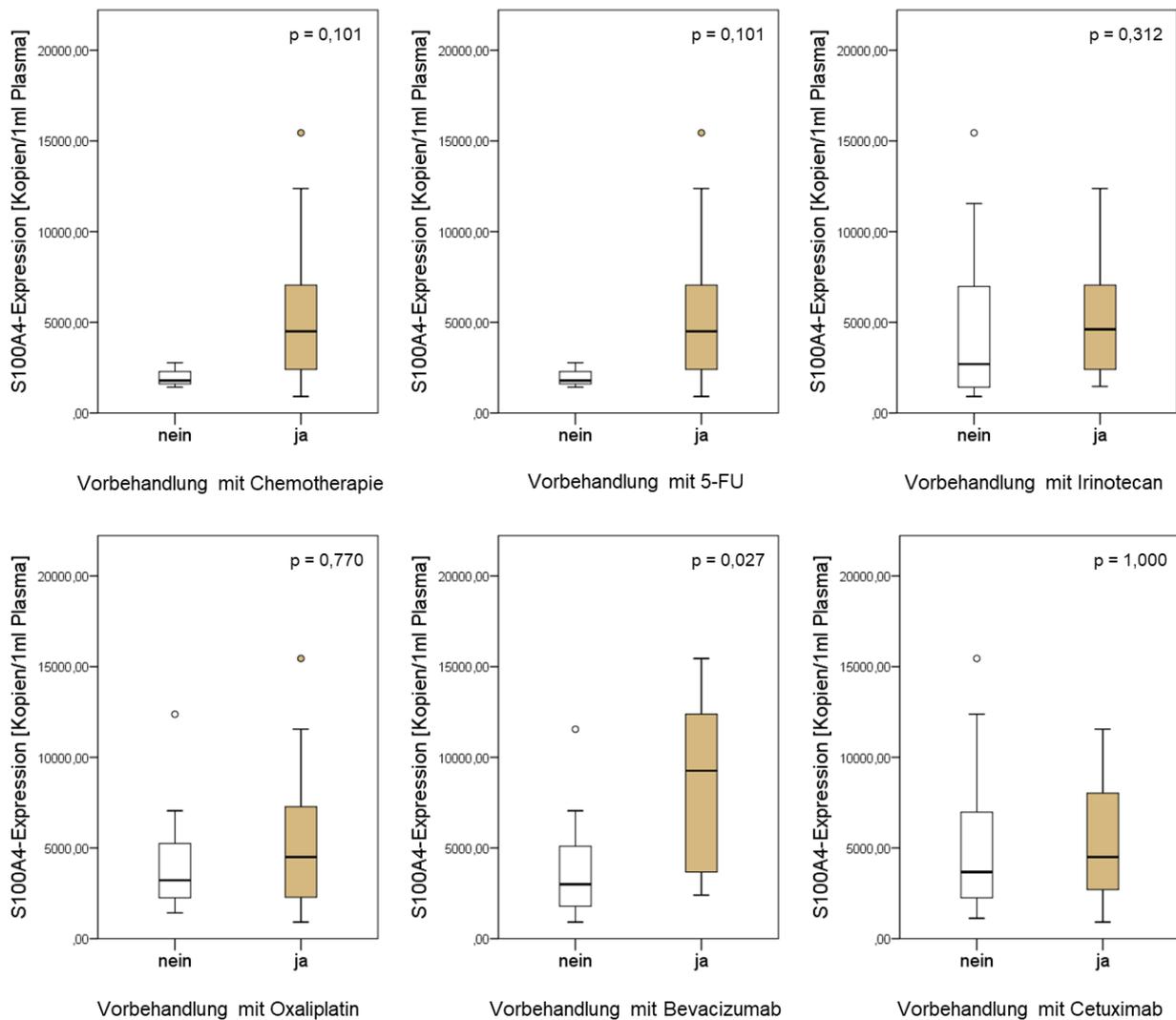


Abbildung 32: S100A4-mRNA-Expression im Plasma von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten. Dargestellt sind der Einfluss chemotherapeutischer Vorbehandlung allgemein und für die jeweiligen Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Bevacizumab und Cetuximab. Die Analyse der S100A4-Expression im Plasma wurde mittels ddPCR durchgeführt. Die Evaluation von Unterschieden in der S100A4-Expression wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass S100A4-Transkripte im Blut von Patienten mit pmKRC vorhanden sind. Verglichen mit gesunden Kontrollpersonen ist die Expression im Patientenplasma signifikant erhöht. Tumorentität, Ausmaß des Tumorbefalls, Art der Metastasierung und chemotherapeutische Vorbehandlung – ausgenommen Vorbehandlung mit Bevacizumab – zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Expression. Zusammenfassend scheint die S100A4-Expression im Plasma, neben der S100A4-Expression im Tumorgewebe, ein vielversprechender Biomarker für die Prädiktion von Therapieansprechen bei pmKRC zu sein.

4. Diskussion

Jede siebte Krebserkrankung in Deutschland betrifft den Darm. Von den betroffenen Patienten entwickeln etwa 10% peritoneale Metastasen, welche mit einer schlechten Prognose und limitierten Therapieoptionen assoziiert sind. Um die Therapie für pmKRK-Patienten zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit PDX-Modelle als präklinische Modelle etabliert und charakterisiert. Mithilfe dieser PDX-Modelle wurde einerseits das Therapieansprechen von 9 Therapeutika (klassisch und zielgerichtet) untersucht und verglichen. Andererseits wurde die Expression des Metastasierungsgens S100A4 im PDX-Tumorgewebe analysiert sowie Assoziationen zwischen der S100A4-Expression und der Therapiereponse evaluiert. Darüber hinaus wurde die S100A4-Expression im Plasma der Patienten untersucht, um das Potenzial der nicht-invasiven Prädiktion der Therapiereponse mithilfe der S100A4-Transkripte im Patienten-Plasma zu evaluieren.

4.1. Etablierung präklinischer PDX-Modelle von pmKRK

Präklinische Modelle sind für Erforschung und Evaluierung neuer Behandlungsansätze, Therapeutika sowie prädiktiver Biomarker von essentieller Bedeutung und finden für das KRK Anwendung. Am weitesten verbreitet sind in vitro Modelle (Zelllinien und 3D-Kulturen). Sie sind verhältnismäßig einfach in der Handhabung und insbesondere für die Identifizierung von Zielgenen und Signalwegen als Angriffspunkt neuer Therapeutika von hoher Bedeutung. Die größte Limitation von in vitro Modellen besteht darin, dass sie nicht in der Lage sind, Tumormikroumgebung, Immunsystem und Angiogenese sowie deren Bedeutung für die Tumorentstehung, -progression und für das Therapieansprechen wiederzugeben. Darin liegt jedoch der große Vorteil von in vivo Modellen. Hierzu zählen CDX, PDX sowie Karzinogen induzierte Mausmodelle, GEMM und Metastasierungsmodelle. Die verschiedenen in vitro Modelle spiegeln die histologischen und physiologischen Charakteristika des KRK in unterschiedlichem Ausmaß wider und bringen jeweils spezifische Vorteile und Limitationen mit sich [136]. Letztere sind je nach Fragestellung bei der Auswahl geeigneter präklinischer Modelle sorgfältig abzuwägen.

4.1.1. Stand der Forschung zu präklinischen Modellen des pmKRK

Während für das KRK bereits zahlreiche präklinische Modelle etabliert und in einer Vielzahl von Studien angewandt wurden, existieren deutlich weniger präklinische Studien, welche sich ausschließlich mit dem pmKRK befassen [136,137]. Diese Studien

werden darüber hinaus häufig nur mit geringen Modellzahlen durchgeführt. Die meisten präklinischen Modelle sind somit für das pmKRK unzureichend oder gar nicht etabliert. Folgende präklinische Modelle wurden bereits für das pmKRK verwendet: in vitro kultivierte Tumorzellen, Organoide, peritoneale Metastasierungs-Mausmodelle und PDX-Modelle [138-147]. Da PDX-Modelle bereits für das KRK erfolgreich eingesetzt wurden und hierbei eine gute Engraftmentrate, der Erhalt von histologischen Charakteristika, Mutationsprofilen und chromosomaler Architektur sowie eine Übereinstimmung im Therapieansprechen zwischen PDX und Patienten gezeigt werden konnte, wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit als präklinische Modelle zur Evaluierung von Therapieansprechen und prädiktiven Biomarkern für das pmKRK untersucht.

Eine weitere Möglichkeit das Therapieansprechen von pmKRK zu untersuchen, ist die Behandlung von aus Tumorgewebe gewonnenen und in vitro kultivierten Tumorzellen. In einer Studie von Arienti et al. wurden von 28 Patienten mit pmKRK Proben genommen und die Expressionen verschiedener Gene als mögliche prädiktive Biomarker bestimmt [138]. Daneben erfolgte die in vitro Testung verschiedener Chemotherapeutika mithilfe von Tumorzellen, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden. Ein Vergleich mit dem in der Klinik beobachteten Therapieansprechen der Patienten ergab, dass in vitro Testungen in der Lage sind, das Therapieansprechen für pmKRK vorherzusagen. Die Evaluierung verschiedener Gene der DNA-Reparatur und des 5-FU-Metabolismus konnte jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Expression und Therapieansprechen bzw. Therapieresistenz finden [138]. Ein Problem der konventionellen Behandlung von Tumorzellen ist, dass unter zweidimensionalen Bedingungen die Tumorarchitektur sowie die Interaktion mit der Tumormikroumgebung nicht repräsentiert werden. Verglichen mit dreidimensional organisierten Tumorzellen, weisen einschichtig organisierte Tumorzellen deutliche Unterschiede im Therapieansprechen auf [148].

Organoide bieten gegenüber konventionellen Zelllinien die Möglichkeit, Tumorzellen in dreidimensionalen Mikrostrukturen anzuordnen, um somit genauer Tumorarchitektur sowie Therapieresponse abzubilden. Außerdem ermöglichen Organoide als präklinische Modelle eine relativ einfache Manipulation und mithilfe von Hochdurchsatz-Screening die Identifikation neuer, wirksamer Therapeutika. Als präklinische Modelle für die Behandlung des pmKRK wurden Organoide in zwei Studien untersucht. Hierbei etablierten Bozzi et al. zwei Organoid-Modelle aus dem Gewebe von pmKRK, mit dem Ziel Energie liefernde Signalwege, als Angriffspunkte neuer Behandlungsansätze zu evaluieren. Sie konnten zeigen, dass die Modulation der *AMP-aktivierten Proteinkinase*

(AMPK) den Metabolismus von pmKrk beeinflusst. Im Rahmen derselben Studie wurden die Organoide mit dem korrespondierenden Patiententumorgewebe verglichen. Es konnte dabei der Erhalt der 3D-Struktur, des immunhistochemischen Profils und der Expression von Tumorstammzellmarkern in den Organoiden gezeigt werden [139]. In einer anderen Studie verwendeten Roy et al. zur Herstellung der Organoide Tumorgewebe von 4 Patienten mit pmKrk, welches im Rahmen einer PDX-Etablierung subkutan in immundefiziente Mäuse transplantiert wurde. Die Organoide wurden dann aus den Zellen der PDX-Tumore generiert und mit verschiedenen Therapieregimen behandelt [140]. Ein Nachteil der Organoide als in vitro-Modell ist jedoch, dass sie nicht in der Lage sind, Interaktionen zwischen Krebszellen und der Tumormikroumgebung zu beurteilen. Auch wird eine mögliche dosislimitierende Organ-Toxizität der Therapeutika durch diese Modelle nicht erfasst.

Alternativ wird die Evaluierung intraperitonealer Chemotherapie in der Forschung häufig mithilfe peritonealer Metastasierungs-Mausmodelle durchgeführt, die jedoch originär meist von Krk und nicht von pmKrk abgeleitet werden. Krk-Zellen werden hierfür intraperitoneal in Mäuse injiziert und nach ihrem Anwachsen mit unterschiedlichen Therapeutika behandelt. Anwendung finden hierbei sowohl etablierte murine Zelllinien für die Injektion in immunkompetente Mäuse, als auch humane Zelllinien und aus humanen pmKrk gewonnene Zellen für die Injektion in immunsupprimierte Mäuse [141,142]. Neben Mausmodellen werden auch Rattenmodelle als peritoneale Metastasierungs-Modelle verwendet [143]. Vorteile der peritonealen Metastasierungs-Modelle liegen in der Ähnlichkeit zum klinischen Bild der Patienten mit peritonealem Tumorbefall sowie in der Möglichkeit, mit einer peritonealen Therapie das klinische Setting beispielsweise einer HIPEC zu simulieren. Werden für das peritoneale Metastasierungsmodell etablierte murine oder humane Zelllinien verwendet, besteht ein wesentlicher Nachteil darin, dass diese Zellen nicht in der Lage sind, die Heterogenität des Tumors widerzuspiegeln. Unterschiede der murinen zur humanen Anatomie und Physiologie bilden Limitationen in der Abbildung des Krankheitsbildes und seiner Behandlung.

In mehreren Studien wurden bereits PDX-Modelle aus Tumorgewebe des Krk etabliert. In den meisten Fällen wurden hierfür bisher ausschließlich Primärtumore verwendet. Wenige Studien hingegen etablierten auch PDX-Modelle aus Krk-Metastasen. Julien et al. konnten PDX-Modelle aus 54 Krk-Tumoren etablieren. Neben 35 Primärtumoren und 14 Metastasen aus Leber, mesenterialen Lymphknoten und Milz wurden 5 Modelle aus dem Gewebe peritonealer Metastasen etabliert. Die Studie zeigte, dass PDX-Tumore

histopathologische Charakteristika der Patiententumore beibehalten und Mutationsraten aufweisen, wie sie für das KRK beschrieben werden. PDX-Modelle, etabliert aus Primärtumor und Metastasen desselben Patienten, wiesen identische Mutationsprofile auf. Mithilfe der PDX-Modelle wurde das Therapieansprechen der KRK-Tumore auf verschiedene Therapeutika untersucht. Allerdings erfolgte in der Auswertung keine stringente Trennung zwischen Primärtumor und peritonealen Metastasen, sodass durch die Studie nicht geklärt wird, ob PDX-Modelle für das pmKRK eine geeignete Plattform zur Evaluierung von Therapieansprechen und Biomarkern darstellen [144].

Betrachtet man peritoneale Metastasen, die von den seltenen Karzinomen der Appendix ausgehen, finden sich nur wenige Studien, in denen die Etablierung von PDX-Modellen gelang. Mavanur et al. transplantierten 17 Tumore von Patienten mit peritoneal metastasierten, muzinösen Appendixneoplasien im Rahmen der PDX-Modell-Etablierung orthotop in die Peritonealhöhle immuninkompetenter Mäuse. Davon zeigten 2 Tumore ein initiales Engraftment, wiederum nur ein Tumor konnte weiter passagiert werden [145]. Flatmark et al. generierten PDX-Modelle von 2 Patienten mit dem klinischen Bild eines PMP. Dabei wurden die Gewebe des peritonealen Befalls sowohl subkutan als auch orthotop in immuninkompetente Mäuse transplantiert. Die orthotope Transplantation war bei beiden Modellen, die subkutane Transplantation nur bei einem Modell erfolgreich [146]. In einer anderen Studie konnten Flatmark et al. 3 weitere orthotope PDX-Modelle von Patienten mit einem PMP etablieren. Die peritonealen Metastasen entsprachen histologisch muzinösen Adenokarzinomen und einem muzinösen Siegelringzellkarzinom [147]. Die Tumore der etablierten PDX-Modelle glichen den Patiententumoren in Bezug auf Morphologie und histologische Charakteristika. Die immunhistochemisch ermittelte Expression von p53 sowie von Markern für intestinale Differenzierung, für Proliferation und Metastasierung, für Muzin und für Adhäsionsmoleküle war für PDX-Tumore und Patiententumore größtenteils identisch [145-147].

Zusammenfassend sind in vitro kultivierte Tumorzellen und peritoneale Metastasierungs-Mausmodelle bereits in diversen Studien und mit teilweise hoher Modellzahl eingesetzt worden. Demgegenüber existieren nur vereinzelt Studien mit geringer Modellzahl, welche auf die neueren präklinischen Modelle wie PDX und Organoide zurückgreifen. PDX-Modelle wurden dabei bislang vornehmlich zur Untersuchung muzinöser Appendixneoplasien genutzt, wobei nur einzelne Modelle etabliert werden konnten. Von Julien et al. wurden 5 PDX-Modelle des pmKRK etabliert [144]. Die Studie differenziert jedoch unzureichend zwischen KRK und pmKRK.

4.1.2. Ergebnisse der Arbeit unter Berücksichtigung des Forschungsstands

Erstmals wurden im Rahmen dieser Arbeit PDX-Modelle ausschließlich von pmKRK-Metastasen mit einer größeren Fallzahl etabliert. Hierbei wurden Kolon- Rektum und Appendixkarzinome von 35 Patienten in die Studie eingeschlossen. Von den 54 Gewebeproben peritonealer Metastasen, welche zur Etablierung der PDX-Modelle in immuninkompetente Mäuse transplantiert wurden, zeigten 19 Tumore ein Engraftment, was einer Engraftmentrate von 35,2% entspricht. In der Literatur werden für das KRK und das metastasierte KRK Engraftmentraten von 43 - 100% berichtet [133].

In der vorliegenden Arbeit hatte das Grading der pmKRK einen nicht signifikanten Einfluss auf das Engraftment. Engraftete Tumore zeigten häufiger eine geringere Differenzierung verglichen mit nicht-engrafteten Tumoren. In dieser und auch anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die histopathologischen Charakteristika der Tumore im PDX erhalten bleiben [133]. Ferner zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine Verschiebung des Tumor-/Stroma-Verhältnisses zugunsten von Tumorgewebe und das Ersetzen des humanen Tumorstromas durch murines Stroma. Dies wurde bereits in anderen Studien für das KRK und seine Metastasen berichtet [133,144]. Ferner wurde in der vorliegenden Studie zwischen den 13 etablierten PDX-Modellen ein heterogenes Tumorstromawachstum beobachtet. Orthotop transplantiertes Gewebe der pmKRK zeigte ein invasives Wachstum in umgebende Strukturen.

Zusammenfassend sind PDX-Modelle eine geeignete Plattform für die Evaluierung von Therapieansprechen und Biomarkern für das pmKRK. Sie sind in der Lage, die histologischen Charakteristika der Tumore widerzuspiegeln.

4.2. Therapieansprechen auf klassische und zielgerichtete Chemotherapeutika

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Therapieansprechen 9 verschiedener Therapeutika für die PDX-Modelle des pmKRK untersucht.

4.2.1. Stand der Forschung zum Therapieansprechen in präklinischen Modellen

In der klinischen Praxis wird für die systemische Therapie des pmKRK häufig eine Kombination aus verschiedenen Therapeutika angewendet. Infolge dessen existieren keine randomisierten klinischen Studien, welche die Therapeutika als Monotherapie für die Behandlung des pmKRK vergleichen. Aussagen über die Effektivität der verschiedenen Therapeutika als Monotherapie bei der Behandlung des pmKRK sind somit nur bedingt möglich. Ein direkter Vergleich der Therapeutika kann lediglich aus

solchen Studien gezogen werden, welche verschiedene Chemotherapie-Schemata miteinander vergleichen. So zeigt sich unter anderem Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU und Leucovorin gegenüber Irinotecan in Kombination mit 5-FU und Leucovorin überlegen [104]. Allgemein wird ein Überlebensvorteil durch die zusätzliche Gabe zielgerichteter Therapeutika wie Cetuximab und Bevacizumab festgestellt [106,107]. Dennoch ist es schwierig, aus den vorhandenen Daten eine Empfehlung für die konkrete systemische Behandlung des pmKRK abzuleiten. Die aktuelle Leitlinie sieht für die Erstlinientherapie des metastasierten KRK Monotherapien und 5-FU-basierte Kombinationstherapien mit Oxaliplatin und/oder Irinotecan vor. Bei der Auswahl des Therapieregimes ist das jeweilige Therapieziel, die spezifischen Nebenwirkungsprofile der einzelnen Chemotherapeutika, mögliche Komorbiditäten, sowie die Lebenssituation des Patienten zu berücksichtigen. Als Kombinationschemotherapie werden in der Erstlinientherapie insbesondere FOLFOX und FOLFIRI eingesetzt. Neben den klassischen Chemotherapeutika sind EGFR-Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab bei Wildtyp RAS-exprimierenden Tumoren und Bevacizumab für die Erstlinientherapie zugelassen.

Der direkte Vergleich unterschiedlicher Therapeutika und Therapieschemata bei der Behandlung des pmKRK wurde in verschiedenen Studien mithilfe unterschiedlicher präklinischer Modelle durchgeführt. Arienti et al. verglichen die Sensitivität von 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan und Mitomycin C mithilfe von aus pmKRK gewonnenen Tumorzellen. Diese wiesen unter Behandlung mit 5-FU und Irinotecan die höchsten Resistenzraten auf. Die getesteten Tumorzellen von 82% der Patienten zeigten eine Resistenz gegenüber 5-FU und von 70% der Patienten eine Resistenz gegenüber Irinotecan. Gegenüber Oxaliplatin wurden bei 62%, gegenüber Mitomycin-C bei 50% der Patienten Resistenzen beobachtet [138]. In der Studie von Cohen et al. wurden verschiedene Therapeutika als Monotherapie oder als Kombination verglichen. Dafür wurden immuninkompetente Mäuse nach Anwachsen intraperitoneal injizierter KRK-Zellen mit den Therapeutika Panitumumab, Erlotinib, Cetuximab, Mitomycin C und Oxaliplatin behandelt. Die Behandlung erfolgte intraperitoneal und wurde mit der intraperitonealen und intravenösen Gabe von Kochsalz sowie der intravenösen Gabe von FOLFIRI verglichen. Als Monotherapie erreichten Mitomycin C und Irinotecan das vergleichsweise längste Überleben der Mäuse. Beide Therapeutika erreichten sowohl gegenüber der mit Kochsalz als auch gegenüber der mit FOLFIRI behandelten Kontrollgruppe eine signifikante Verlängerung des medianen Überlebens. In Kombination

zeigten die Therapeutika eine weitere Steigerung ihrer Effektivität, wobei die Kombinationstherapie aus Panitumumab, Irinotecan und Mitomycin C die beste Wirkung erreichte. Ein medianes Überleben von 213 Tagen wurde durch diese Therapie erreicht, während das mediane Überleben bei intravenöser FOLIRI-Therapie lediglich 57 Tage betrug [141]. Roy et al. verglichen die Zytostatika 5-FU, Oxaliplatin, Mitomycin C, Irinotecan, Doxorubicin und Paclitaxel als Monotherapie, in Kombination, in verschiedenen Konzentrationen, mit verschiedener Expositionsdauer und -frequenz sowie mit oder ohne Hyperthermie mithilfe von Organoiden aus pmKRK-Gewebe. Dabei erreichte das Therapeutikum Oxaliplatin die effizienteste Zytotoxizität [140].

Julien et al. untersuchten das Therapieansprechen von PDX-Modellen aus KRK-Gewebe, darunter von 5 Modellen aus Gewebe von pmKRK. Getestet wurden 5-FU, Oxaliplatin, Cetuximab und Irinotecan. Eine antitumorale Wirkung konnte bei 2 der 5 Modelle gegenüber 5-FU gezeigt werden, bei keinem Modell für Oxaliplatin, bei allen Modellen für Irinotecan und bei 3 der 5 Modelle gegenüber Cetuximab [144].

Insgesamt ergibt sich aus den hier genannten Studien keine einheitliche Aussage über die Effektivität der einzelnen Chemotherapeutika bei der Behandlung der Patientensubgruppe mit pmKRK. Dies könnte unter anderem an den unterschiedlichen und nicht vergleichbaren präklinischen Modellen liegen. Je nach Studie zeigten entweder Oxaliplatin oder Irinotecan (und Mitomycin C) die effizienteste Wirkung.

4.2.2. Ergebnisse der Arbeit unter Berücksichtigung des Forschungsstands

In dieser Arbeit wurden erstmals in größerer Fallzahl PDX-Modelle ausschließlich von pmKRK etabliert und auf ihre Chemosensitivität getestet. Anders als in der Studie von Julien et al. wurden neben peritonealen Metastasen keine KRK-Primärtumore und Metastasen anderer Lokalisationen eingeschlossen. Somit bietet diese Arbeit die Gelegenheit, mithilfe von PDX-Modellen für diese Patientensubgruppe eine spezifische Aussage über die Sensitivität verschiedener Therapeutika zu treffen. Es wurden häufig in der klinischen Praxis angewendete Therapeutika und für das KRK nicht zugelassene, potentielle Therapeutika sowie klassische und zielgerichtete Therapeutika verglichen.

4.2.2.1. Unterschiede in der Beurteilung des Therapieansprechens

Bei der Beurteilung des Therapieansprechens kamen im Rahmen dieser Arbeit sowohl der T/C-Wert, als auch der RTV zur Anwendung. Dabei ergaben sich Unterschiede in der Einteilung von Respondern und Nicht-Respondern. Während mithilfe des T/C-Werts

67,5% der Behandlungsgruppen als Responder eingeteilt wurden, waren es mithilfe des RTV lediglich 25,6% (mindestens „Stable Disease“). Diese Diskrepanz ergibt sich aus der unterschiedlichen Bewertung des Therapieansprechens. Während der T/C-Wert das Tumolvolumen nach Behandlung stets im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe betrachtet, gibt das RTV Auskunft über die individuelle Veränderung des Tumolvolumens im Rahmen der Therapie. Die Einteilung der Therapieresponse mithilfe des RTV spiegelt eher die klinische Einteilung mithilfe RECIST wider. Dagegen ermöglicht der T/C-Wert durch die Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Aussage über den tatsächlichen Einfluss der Therapie auf die Tumorgöße.

4.2.2.2. Klassische Chemotherapeutika

In der vorliegenden Arbeit ergab der Vergleich der 9 getesteten Therapeutika deutliche Unterschiede im Therapieansprechen. Insgesamt erreichte Irinotecan in den meisten PDX-Modellen ein Therapieansprechen. Dagegen wiesen 5-FU und Oxaliplatin ein deutlich schlechteres Ansprechen auf.

Betrachtet man die Ergebnisse bestehender präklinischer Studien, fällt auf, dass die Therapie mit Oxaliplatin bei in vitro Modellen (Zelllinien und Organoide) der Therapie mit Irinotecan überlegen ist [138,140]. Dagegen erreicht Irinotecan in Mausmodellen eine bessere Effizienz [141,144]. Ein Grund für das besonders gute Ansprechen von Irinotecan im Maus-, bzw. PDX-Modell könnten Unterschiede zwischen dem humanen und dem murinen Metabolismus des Therapeutikums sein. Irinotecan wird mittels Carboxylesterase in sein aktives Metabolit SN-38 umgewandelt. Der direkte Vergleich von Carboxylesterase-Isoenzymen verschiedener Tierarten mit dem humanen Enzym zeigte eine deutlich geringere Aktivität der humanen Carboxylesterase. Die murine Carboxylesterase weist eine 9,8-fach höhere spezifische Aktivität auf [149,150]. Wie in dieser Arbeit erzielte Irinotecan in den Studien von Julien et al. und Cohen et al. das beste Therapieansprechen für pmKRK im Mausmodell [141,144]. Dagegen wiesen die in vitro-Studien von Arienti et al. und Roy et al. nur ein geringes Therapieansprechen für Irinotecan auf [138,140]. Irinotecan scheint somit in Mausmodellen eine verbesserte Therapieresponse aufzuweisen. PDX-Modelle ermöglichen es, das Therapieansprechen verschiedener pmKRK auf Irinotecan zu vergleichen und somit prädiktive Marker für das Therapieansprechen zu evaluieren. Jedoch ist die Beurteilung der Therapieresponse von Irinotecan im Vergleich zu anderen Therapeutika mithilfe von PDX-Modellen nicht direkt auf die klinische Praxis bei der Behandlung des pmKRK übertragbar.

Die klassischen Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin sind für die Behandlung des KRK zugelassen und werden in der klinischen Praxis in verschiedenen Therapieschemata eingesetzt. Dagegen ist das Taxan Docetaxel von der *Europäischen Arzneimittelagentur* (EMA) für die Tumorentitäten Brustkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Prostatakarzinom, Magenkarzinom und Kopf- und Halskrebs, aber nicht für die Behandlung des KRK zugelassen. Klinische Studien zeigten für Docetaxel bisher keine oder eine lediglich minimale Aktivität bei der Behandlung des fortgeschrittenen KRK [151,152]. Dennoch zeigt Docetaxel in dieser Studie gegenüber 5-FU und Oxaliplatin ein besseres Therapieansprechen. Ob die Patientensubgruppe mit pmKRK von einer Behandlung mit Docetaxel profitiert, müsste in weiteren klinischen Studien geprüft werden.

4.2.2.3. Zielgerichtete Therapeutika

Betrachtete man die zielgerichteten Therapeutika, erzielten in dieser Arbeit der Multi-Kinase-Inhibitor Regorafenib und der MEK-Inhibitor Selumetinib das beste Therapieansprechen, während der VEGF-Inhibitor Bevacizumab und die EGFR-Inhibitoren Cetuximab und Erlotinib ein deutlich geringeres Therapieansprechen aufwiesen.

Cetuximab, Bevacizumab und Regorafenib sind von der EMA für die Behandlung des metastasierten KRK zugelassen. Während Cetuximab und Bevacizumab regelmäßig für die Behandlung metastasierter KRK eingesetzt werden, wird der klinische Einsatz von Regorafenib kontrovers diskutiert. Derzeit steht Regorafenib für KRK-Patienten in Deutschland nicht mehr zur Verfügung. Erlotinib und Selumetinib sind nicht für die Behandlung des KRK zugelassen. Interessanterweise erreichten hier Regorafenib und Selumetinib gegenüber den häufig angewandten Therapeutika Cetuximab und Bevacizumab ein besseres Therapieansprechen im PDX-Modell.

Bevacizumab bindet direkt an VEGF-A und inhibiert somit dessen Interaktion mit VEGFR. Bei der Beurteilung des Therapieansprechens im PDX ist zu berücksichtigen, dass VEGF sowohl von Endothelzellen, als auch von Tumorzellen exprimiert werden kann und im PDX-Modell humanes Stroma und Endothelzellen durch murines Gewebe ersetzt werden. Dabei beträgt der Anteil muriner Zellen im PDX aus KRK-Gewebe etwa 10,6% [153]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bevacizumab kaum mit murinem VEGF-A interagiert [154]. Bieche et al. untersuchten Tumolvaskularisation, sowie die Expression von VEGFR und VEGF-A von murinen Stroma- und humanen Tumorzellen in PDX-

Modellen unterschiedlicher Entitäten. Für das KRK konnte gezeigt werden, dass im PDX der Anteil der Endothelzellen innerhalb des Tumorstroma-Kompartiments konstant war, unabhängig von dessen Dichte. Daneben konnte gezeigt werden, dass im PDX-Tumorgewebe VEGFR-2 zu annähernd 100% und VEGFR-1 zu 94,1% murinen Ursprungs war, während der Anteil des humanen VEGF-A am gesamten VEGF-A 94,3% betrug [153]. Somit wird im PDX-Modell VEGF-A zum großen Teil von humanen Tumorzellen exprimiert. Insgesamt ist daraus zu schließen, dass die Interaktion von VEGF-A-VEGFR-1/2 im PDX-Modell größtenteils zwischen humanem VEGF-A und murinem VEGFR stattfindet. Als Antikörper gegen humanes VEGF-A ist Bevacizumab in der Lage diese Interaktion zu inhibieren. Folglich scheinen PDX-Modelle für die Evaluierung von Bevacizumab geeignet zu sein. Dennoch muss bei der Bewertung auch der geringe Anteil des murinen VEGF-A berücksichtigt werden. Dieser wird nicht durch Bevacizumab inhibiert und ist eine mögliche Ursache für das relativ schlechte Therapieansprechen im PDX.

4.2.2.4. Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen

Als mögliche Einflussfaktoren auf das Therapieansprechen der pmKRK im PDX-Modell wurden in der vorliegenden Arbeit die Tumorlokalisation (Omentum versus parietales Peritoneum) und eine vorausgegangene Chemotherapie der Patienten untersucht. Beide Faktoren zeigten keinen Einfluss auf das Therapieansprechen.

4.2.2.5. Intraindividuelle Unterschiede des Therapieansprechens

Indem für 3 Patienten PDX-Modelle unterschiedlich lokalisierter peritonealer Metastasen (Omentum und parietales Peritoneum) etabliert wurden, konnten diese Modelle zusätzlich auf mögliche Unterschiede in ihrem Therapieansprechen untersucht werden. Interessanterweise bestanden deutliche Unterschiede in der Therapieresponse zwischen verschiedenen Modellen desselben Patienten. Eine mögliche Erklärung dafür, dass unterschiedliche peritoneale Metastasen eines Patienten verschieden auf die Therapeutika ansprechen, könnte in dem unterschiedlichen Zielgewebe der Metastasen (Omentum und parietales Peritoneum) liegen. Beispielsweise könnten die besonderen, immunologischen Eigenschaften des Omentum Einfluss auf Therapieansprechen der Tumore nehmen. Wie gezeigt, ergeben sich jedoch insgesamt und für die einzelnen Therapeutika keine signifikanten Unterschiede im Therapieansprechen zwischen Metastasen des Omentums und Metastasen des parietalen Peritoneums. Eine weitere

mögliche Erklärung für die intraindividuellen Unterschiede des Therapieansprechens liegt in der genetischen Heterogenität der Metastasen. Peritoneale Metastasen können aus verschiedenen Tumorzellen bzw. Tumorzellsubpopulationen des Primärtumors entstehen. Darüber hinaus sind die jeweiligen Tumorzellen in der Lage, im Verlauf der Metastasierung verschiedene neue Mutationen zu erwerben, welche zu der Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Therapeutika beitragen [155].

Voraussetzung und Grund für den Nutzen prädiktiver Biomarker sind interindividuelle Unterschiede im Therapieansprechen. Biomarker haben das Ziel, genau diese Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten vor der jeweiligen Behandlung vorherzusagen, um jedem Patienten die optimale Therapie zu ermöglichen. Intraindividuelle Unterschiede im Therapieansprechen erschweren dagegen die Evaluation prädiktiver Biomarker. Zeigt ein Therapeutikum bei einem Patienten in verschiedenen Metastasen ein abweichendes Therapieansprechen, müsste auch die Expression eines geeigneten prädiktiven Biomarkers in den verschiedenen Metastasen voneinander abweichen. Betrachtet man lediglich die Expression des Biomarkers einer einzelnen Metastase, ist diese womöglich nicht repräsentativ für die gesamte Situation des Patienten. Die Messung prädiktiver Marker in mehreren peritonealen Metastasen eines Patienten ermöglicht ein exakteres Abbild der Sensitivität der Patienten gegenüber den jeweiligen Therapeutika.

4.2.3. PDX als präklinisches Modell zur Evaluierung von Therapieansprechen

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass PDX-Modelle in der Lage sind, das Therapieansprechen verschiedener Therapeutika zu evaluieren und eventuell auch vorherzusagen. Von den klassischen Chemotherapeutika zeigte insbesondere Irinotecan ein gutes Therapieansprechen in den PDX-Modellen. Bei den zielgerichteten Therapeutika sind Selumetinib und Regorafenib den häufig angewendeten und zugelassenen Therapeutika Cetuximab und Bevacizumab überlegen. Um die bisherigen Ergebnisse weiter zu festigen, sind umfangreichere Testungen in weiteren PDX-Modellen erforderlich. Eine größere Anzahl von Modellen ermöglicht eine noch exaktere Aussage über das Therapieansprechen der Therapeutika im PDX sowie die Generierung und Untersuchung von möglichen Subgruppen. Unter anderem könnte untersucht werden, ob die von Guinney et al. klassifizierten Subgruppen des KRK (CMS1-4) mit einer unterschiedlichen Therapieresponse in den PDX-Modellen assoziiert sind [9]. Indem für weitere Patienten verschiedene PDX-Modelle aus unterschiedlich lokalisierten

peritonealen Metastasen generiert werden, kann eine genauere Aussage über den Einfluss der Metastasen-Lokalisation auf die Therapiesensitivität getroffen werden. Auf diese Weise kann genauer untersucht werden, inwiefern sich Metastasen des Omentums gegenüber Metastasen des parietalen Peritoneums bezüglich ihrer Chemosensitivität unterscheiden und ob dabei bestimmte Muster zu erkennen sind. Darüber hinaus ist es von Interesse, ob sich verschiedene Metastasen des Omentums und verschiedene Metastasen des parietalen Peritoneums desselben Patienten jeweils untereinander bezüglich ihres Therapieansprechens unterscheiden.

Um die klinische Situation bei der Behandlung von pmKRK widerzuspiegeln, wären neben der Testung von verschiedenen Monotherapien auch die Testung verschiedener Therapieschemata und Kombinationen durch PDX-Modelle interessant. Dadurch könnten sowohl häufig angewandte Schemata wie FOLFIRI und FOLFOX als auch neue Therapeutika-Kombinationen auf ihre Effektivität verglichen werden. Auch für solche kombinierten Therapien könnten spezifische prädiktive Biomarker bzw. Biomarker-Kombinationen evaluiert werden.

4.3. S100A4-Expression als prädiktiver Marker des Therapieansprechens

Ein zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die S100A4-Expression in PDX-Tumoren zu analysieren, um S100A4 als einen prädiktiven Biomarker für die Evaluierung des Therapieansprechens von pmKRK zu untersuchen. Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass KRK-Tumorgewebe verglichen mit gesundem Kontrollgewebe eine signifikant höhere S100A4-Expression aufweist [119,156-158]. Außerdem wurde gezeigt, dass KRK-Metastasen verglichen mit dem Primärtumor eine höhere S100A4-Expression aufweisen [158]. Bisher existierte jedoch keine Studie, welche sich ausschließlich auf die S100A4-Expression von pmKRK konzentriert und diese als möglichen Biomarker evaluiert.

4.3.1. Analyse der S100A4-Expression im pmKRK-Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl in den Tumoren der PDX-Modelle, als auch in den dazugehörigen Patiententumoren eine S100A4-Expression nachgewiesen werden. Nachweis und Quantifizierung der Expression erfolgte sowohl auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR als auch auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie. Zwischen den einzelnen Modellen und den einzelnen Patienten bestand eine erhebliche Varianz

bezüglich ihrer S100A4-Expression. Jedoch konnte eine Korrelation von S100A4-Expression in PDX-Tumorgewebe und Patiententumorgewebe nachgewiesen werden.

4.3.2. S100A4 als prädiktiver Biomarker

Der Biomarker S100A4 ist in verschiedenen Schritten der Metastasierung involviert und interagiert mit zahlreichen Signalwegen und Molekülen, welche für die Tumorentstehung, und -progression eine entscheidende Rolle spielen (siehe Abschnitt 1.3.1.) Der prognostische Wert von S100A4 für das KRK wurde bereits in mehreren Studien belegt. Eine hohe S100A4-Expression im Tumorgewebe ist mit einem reduzierten Gesamt- und krankheitsfreien Überleben assoziiert [118]. Dagegen existieren kaum Studien, welche S100A4 als prädiktiven Marker für das KRK untersuchen. Boye et al. untersuchten den Einfluss von S100A4-Expression auf die Sensitivität gegenüber der adjuvanten 5-FU-Behandlung des KRK. Die S100A4-Expression zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Sensitivität [159]. Mencia et al. zeigten, dass S100A4 in Methotrexat resistenten Tumorzellen verschiedener Entität überexprimiert ist. Eine ektope Überexpression von S100A4 reduzierte für KRK-Zellen die Sensitivität. Die Inhibition der S100A4-Expression führte zu einer verstärkten Sensitivität der Zellen gegenüber Methotrexat [160].

Prädiktive Biomarker, welche das Therapieansprechen des jeweiligen Patienten auf bestimmte Therapeutika vorhersagen, können einen wichtigen Beitrag dazu leisten, das therapeutische Vorgehen zu verbessern. Bezogen auf das pmKRK könnten prädiktive Marker bei der Auswahl geeigneter Therapeutika sowohl für eine systemische Chemotherapie, als auch für eine HIPEC von Nutzen sein.

Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss der S100A4-Expression auf das Therapieansprechen der Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Docetaxel, Bevacizumab, Cetuximab, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib untersucht. Es konnte für Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab eine Assoziation von S100A4-Expression und Therapieansprechen gezeigt werden. Tumore mit hoher S100A4-Expression zeigten ein vermindertes Therapieansprechen auf diese Therapeutika, verglichen mit Tumoren niedriger S100A4-Expression. Darüber hinaus wurde für die 3 Therapeutika gezeigt, dass PDX-Modelle mit schlechter Therapiereponse eine höhere S100A4-Expression aufwiesen, verglichen mit PDX-Modellen mit guter Therapiereponse. Für die übrigen Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Docetaxel, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der S100A4-Expression und dem Therapieansprechen feststellbar.

4.3.3. Erklärungsansätze für den prädiktiven Wert von S100A4

Eine allgemeine Erklärung für den prädiktiven Wert hoher S100A4-Expression im Tumorgewebe von pmKRK liegt in der bedeutenden Rolle von S100A4 für Tumorprogression und -metastasierung:

1. S100A4 interagiert mit verschiedenen Signalwegen (z.B. Wnt/ β -Catenin und RAS/RAF/MEK/ERK) und mit unterschiedlichen Molekülen der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung (TLR4, NF- κ B, RAGE, MMPs, G-CSF, HIF-1 α , Myosin-II, p53, E-Cadherin, VEGF) [114,119-124,129]. Eine Erklärung für die Entstehung von Resistenzen hoch S100A4 exprimierender pmKRK gegenüber zielgerichteten Therapeutika, welche spezifische Schlüsselmoleküle inhibieren, liegt in der Aktivierung paralleler Signalwege und nachgeschalteter Effektorproteine durch den Biomarker S100A4.
2. Zytotoxische Chemotherapeutika entfalten ihre Wirkung durch die Hemmung der Zellteilung und greifen somit vor allem schnell proliferierende Zellen, also auch Tumorzellen an. S100A4 reguliert verschiedene biologische Funktionen, welche die Krebsprogression und -metastasierung fördern, wie Angiogenese, Zellüberleben, Motilität und Invasion [120]. Dagegen scheint S100A4 für die Tumorzellproliferation eine untergeordnete Rolle zu spielen. Egeland et al. untersuchten die Rolle von S100A4 für die Zellzyklusprogression von KRK-Zellen. Sie konnten jedoch keine Assoziation zwischen nukleärer S100A4-Expression und Zellproliferation finden [161]. In der vorliegenden Arbeit wiesen PDX-Modelle mit hoher S100A4-Expression eine etwas höhere Tumorverdopplungszeit und somit ein langsames Tumorwachstum als Modelle mit niedriger S100A4-Expression auf. Sie bieten damit klassischen Chemotherapeutika eine geringe Angriffsfläche.

4.3.3.1. Oxaliplatin

S100A4 hoch exprimierende Tumore wiesen eine geringere Sensitivität gegenüber Oxaliplatin auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass S100A4 über die Inhibition von p53 die Wirkung von Oxaliplatin blockiert. Oxaliplatin bewirkt die Bildung von Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen. Infolge dessen wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert. Über die p53-Aktivierung führt die Behandlung mit Oxaliplatin zu einem Arrest des Zellwachstums, einer Hemmung der TS und zu einem Herunterregulieren des PGE2- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [162,163]. Yang et al. konnten durch die

Behandlung mit Oxaliplatin in Mäusen mit Wildtyp p53 Tumoren eine signifikante Reduktion des Tumorumens erreichen, während Oxaliplatin für p53 ^{-/-} Tumore keine Wirkung zeigte [162].

Orre et al. konnten eine Interaktion zwischen S100A4 und p53 im Zellkern nachweisen und zeigten, dass S100A4 die Degradation von p53 fördert. Sie konnten darüber hinaus für Lungen- und Zervixkarzinomzellen zeigen, dass der Knockdown von S100A4 zu einem p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest, sowie einem Anstieg der Cisplatin-induzierten Apoptose führte [129]. Für das KRK konnte eine Interaktion zwischen den Proteinen p53 und S100A4 festgestellt werden. S100A4 ist in der Lage, die transkriptionelle Aktivität von Wildtyp p53 zu hemmen [157]. Verglichen mit KRK ohne peritonealer Metastasierung weisen pmKRK häufiger Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 (41% versus 57%) auf [164]. Zusammenfassend scheint S100A4 das Überleben von KRK-Zellen p53-abhängig zu regulieren. Somit deutet viel darauf hin, dass S100A4 in pmKRK über die Inhibition von p53 die Wirkung von Oxaliplatin inhibiert (Abbildung 33).



Abbildung 33: Möglicher Mechanismus für die Assoziation von hoher S100A4-Expression und schlechtem Therapieansprechen auf Oxaliplatin. Durch die Behandlung mit Oxaliplatin entstehen DNA-Schäden und der Tumorsuppressor p53 wird aktiviert. Das führt wiederum zu einem Zellzyklusarrest und Verminderung der Tumorzellproliferation. Durch Inhibition von p53 inhibiert S100A4 die Wirkung von Oxaliplatin.

Daneben konnte gezeigt werden, dass Oxaliplatin resistente KRK-Zellen eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges aufweisen. Li et al. untersuchten die Expressionsprofile von 21 KRK-Zelllinien mithilfe RNA-seq und korrelierten diese anschließend mit dem Therapieansprechen gegenüber Oxaliplatin. Oxaliplatin resistente Zelllinien wiesen eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf [165]. S100A4 könnte als transkriptionelles Zielgen von β -Catenin infolge der Wnt/ β -Catenin-Aktivierung in Oxaliplatin resistenten Zellen überexprimiert sein.

4.3.3.2. Cetuximab

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verglichen mit

niedrig S100A4 exprimierenden Metastasen, pmKRK mit hoher S100A4-Expression ein signifikant schlechteres Ansprechen auf Cetuximab aufwiesen.

Bereits bekannte Ursachen für ein schlechtes Ansprechen von Tumoren auf anti-EGFR-Therapie sind Mutationen in den nachgeschalteten Effektorproteinen RAS und RAF. Daneben konnte eine Bedeutung von HER2 bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber anti-EGFR Therapeutika gezeigt werden. Amplifikationen von HER2 können in etwa 5% der RAS und BRAF Wildtyp KRK gefunden werden. Diese Tumore weisen, verglichen mit RAS und BRAF Wildtyp KRK ohne HER2 Amplifikation, unter anti-EGFR Therapie ein signifikant reduziertes progressionsfreies Überleben auf [166]. Klingelhöfer et al. konnten nachweisen, dass S100A4 mit verschiedenen EGFR Liganden, wie EGF und Amphiregulin, interagiert. Interessanterweise ist S100A4 darüber hinaus in der Lage, die Phosphorylierung von EGFR, HER2 und ERK1/2 zu aktivieren. Daneben konnten Dahlmann et al. für KRK-Zellen zeigen, dass die Interaktion von S100A4 und RAGE zu einer Hyperaktivität des MAPK/ERK-Signalweges führt [167,168]. Für das Medulloblastom konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass HER2 wiederum die Expression von S100A4 via ERK1/2 und PI3K hochreguliert [169]. Eine mögliche Erklärung für die schlechte Therapieresponse von pmKRK mit hoher S100A4-Expression könnte in der Aktivierung von HER2 und dessen nachgeschalteten Effektorproteinen liegen. Durch einen möglichen, positiven Feedback-Mechanismus zwischen HER2 und S100A4 könnten die Tumore in der Lage sein, eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren zu entwickeln. Interessanterweise zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch die EGFR-Inhibition durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib keine signifikante Beeinflussung durch die S100A4-Expression. Obgleich auch hier S100A4 niedrig exprimierende Modelle ein besseres Therapieansprechen als S100A4 hoch exprimierende Modelle aufwiesen, war dieser Unterschied nicht signifikant und deutlich geringer als für den EGFR-Antikörper Cetuximab.

4.3.3.3. Bevacizumab

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass für das pmKRK eine hohe S100A4-Expression im Tumorgewebe mit einem verminderten Ansprechen auf Bevacizumab assoziiert ist.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die Bedeutung von S100A4 als potenter Stimulator der Angiogenese. S100A4 wird sowohl von Tumorzellen, als auch von Endothelzellen exprimiert. Exogenes S100A4 zeigte eine Stimulation der Endothelzell-

Motilität und die Induktion von kornealer Neovaskularisation. Transgene Mäuse mit einer ubiquitären S100A4-Expression entwickelten im Laufe ihres Lebens Hämangiome mit einer hohen Inzidenz [125,170,171]. Die Inhibition der S100A4-Expression resultiert in einer reduzierten Tumovaskularisation und der Inhibition des Tumorwachstums [172]. Für Brustkrebspatienten konnte eine signifikante Assoziation zwischen S100A4-Expression und Blutgefäßdichte im Tumorgewebe festgestellt werden [173]. Die Mechanismen, über welche S100A4 die Angiogenese fördert, sind jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass S100A4 die Expression von VEGF hochreguliert [123,174]. Neben VEGF konnten eine Vielzahl weiterer pro-angiogenetischer Faktoren identifiziert werden, welche durch S100A4 reguliert werden. S100A4 ist in der Lage, die Expression von EZM degradierenden Enzymen, wie MMP-9, -11, -13, -14 und *Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator* (uPA) zu steigern [123,175]. Diese ermöglichen die Invasion von Endothelzellen in umgebendes Gewebe. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von S100A4 und RAGE die Expression von HIF1- α steigert [168]. Ochiya et al. untersuchten den Einfluss von S100A4 auf Endothelzellen und konnten zeigen, dass das Ausschalten von S100A4 durch Small interfering RNA die Bildung kapillarähnlicher Formationen hemmt und in Endothelzellen zu einem Herunterregulieren mehrerer Angiogenese-fördernder Gene und einem Hochregulieren verschiedener Angiogenese-hemmender Gene führt [172]. Die Ursache für das schlechte Ansprechen von Bevacizumab bei S100A4 hoch exprimierendem pmKRC könnte in der VEGF-A unabhängigen Induktion von Angiogenese durch S100A4 liegen.

Ein Zusammenhang zwischen S100A4 und dem Ansprechen auf anti-VEGF-Therapie wurde bereits für das maligne Gliom beobachtet. Liang et al. konnten nachweisen, dass eine vermehrte Tumordinfiltration mit neutrophilen Granulozyten mit einer Resistenz gegenüber Bevacizumab korrelierte. Interessanterweise erreichte Herunterregulieren von S100A4 sowohl eine Reduktion der Tumorprogression, als auch eine gesteigerte Effektivität von Bevacizumab für die Gliome [132]. Ob die Ursache für das verminderte Therapieansprechen S100A4 hoch exprimierender pmKRC durch eine vermehrte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten bedingt ist, muss noch weiter geklärt werden.

4.3.4. Einfluss von Therapie auf die S100A4-Expression

Neben dem Einfluss der S100A4-Expression auf die Therapieresponse, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss der Therapeutika auf die S100A4-Expression im

Tumorgewebe untersucht. Interessanterweise zeigte sich nach der Behandlung mit Cetuximab, Irinotecan und Selumetinib eine signifikant geringere S100A4-Expression im Tumorgewebe, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe.

Dabei ist die Reduktion der S100A4-Expression im Tumorgewebe am wahrscheinlichsten darauf zurückzuführen, dass S100A4 hoch exprimierende Tumorzellen resistenter gegenüber der jeweiligen Therapie sind. Somit wären S100A4 gering exprimierende Zellen früher von Zelltod infolge der Therapie betroffen und im Verhältnis würden somit mehr Zellen mit hoher S100A4-Expression verbleiben. Eine weitere Erklärung für die reduzierte S100A4-Expression nach Behandlung wäre eine aktive Reduktion der S100A4-Expression durch die Therapeutika. Durch welchen Mechanismus die Therapeutika die S100A4-Expression im Tumorgewebe beeinflussen, müsste noch weiter untersucht werden.

4.3.5. Translationale Bedeutung von S100A4 für die Therapie von pmKRK

Um die Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen, sind Analysen in weiteren PDX-Modellen nötig. Eine größere Anzahl der Modelle könnte die statistische Signifikanz weiter verbessern. Darüber hinaus sind Subgruppenanalysen innerhalb der S100A4 hoch und niedrig exprimierenden Gruppen erst ab einer größeren Fallzahl sinnvoll. So könnte eine Differenzierung von RAS-Mutationsstatus und S100A4-Expression beispielsweise die Prädiktion der Cetuximab-Response weiter verbessern. Auch eine Assoziation zwischen S100A4-Expression und den von Guinney et al. identifizierten molekularen Subtypen des KRK könnte untersucht werden. Tumore mit hoher S100A4-Expression könnten einerseits unter den CMS2-Subtyp gefasst werden, welcher sich durch eine erhöhte Wnt- und MYC-Signalwegaktivierung auszeichnet [9]. Andererseits könnte die S100A4-Expression unabhängig vom CMS-Subtyp für die Prädiktion des Therapieansprechens von pmKRK bedeutend sein. Mittels weiterer in vivo sowie in vitro-Testungen könnte näher überprüft werden, ob eine Reduktion der S100A4-Expression eine Verbesserung der Therapieresponse gegenüber Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab bedingt. Dadurch könnten die bisherigen Ergebnisse weiter bestätigt werden.

Dass eine hohe S100A4-Expression im Tumorgewebe mit einem schlechten Ansprechen auf Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab einhergeht, könnte für die Behandlung des pmKRK folgende Konsequenzen haben: Patienten mit einer hohen S100A4-Expression könnten demnach von einem Therapieschema ohne die Medikamente Oxaliplatin,

Cetuximab und Bevacizumab profitieren. Problematisch ist jedoch, dass diese drei Therapeutika wichtige Bestandteile der Behandlung des pmKRC sind.

Ein weiterer Therapieansatz wäre es, Patienten mit hoher S100A4-Expression durch eine zusätzliche Behandlung mit S100A4-Inhibitoren für die Therapie mit Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab zu sensitivieren. Für die Inhibition von S100A4 stehen mehrere bereits zugelassene Medikamente zur Verfügung. Mittels Hochdurchsatz-Screening konnten zwei Medikamente identifiziert werden, welche die S100A4-Expression mit einer hohen Effizienz inhibieren: das Antibiotikum Calcimycin und das Antihelminthikum Niclosamid. Beide Medikamente reduzieren neben der S100A4-Expression auch die durch S100A4 induzierten intrazellulären Prozesse, wie Migration und Invasion. Durch die Gabe der Medikamente konnte in CDX-Modellen humaner Kolonkarzinome eine verminderte Metastasierung beobachtet werden [176,177]. Als weiteres potentiell Therapeutikum für die Inhibition von S100A4 kommt das Neuroleptikum Trifluoperazin in Frage. Es stört die Interaktion von S100A4 und Myosin IIA und inhibiert somit die Funktion von S100A4 [178]. Im Ergebnis könnte die Inhibition von S100A4 ein vielversprechendes Mittel zur Verbesserung der Therapie bei pmKRC bieten. Derartige neue Ansätze zur Therapie des pmKRC belegen den Wert von PDX-Modellen für die Entwicklung neuer Therapie-Strategien.

4.4. Analyse der S100A4-mRNA im Patientenplasma

Für die Prädiktion des Therapieansprechens von KRC-Patienten sind insbesondere Biomarker im Patientenblut als sog. "Liquid Biopsy" von Interesse. Gegenüber aus Tumorgewebe gewonnenen Biomarkern bieten sie die Möglichkeit einer nicht-invasiven Bestimmung zur Prädiktion der Therapieresponse sowie einer Überwachung im nachfolgenden Krankheitsverlauf.

Bisher existieren lediglich 3 Studien, welche sich mit S100A4 im Blut von KRC-Patienten beschäftigten. Flatmark et al. untersuchten das Protein S100A4 in Plasma und Serum der Patienten mithilfe einer immunofluorimetrischen Analyse. Die Studien von Stein et al. befassten sich mit der S100A4 mRNA-Expression im Plasma. Flatmark et al. untersuchten die S100A4-Konzentration im Serum und im aus Knochenmarkaspiration gewonnenen Plasma von Patienten mit KRC und gesunden Kontrollpersonen. Während zwischen dem Plasma von Patienten und Kontrollpersonen kein signifikanter Unterschied in der S100A4-Konzentration erkennbar war, zeigten sich für das Serum signifikante Unterschiede. Die Arbeitsgruppe wies jedoch nach, dass S100A4 sowohl in Erythrozyten

sowie in mononukleären Zellen enthalten ist und dass die gemessene S100A4-Konzentration durch Hämolyse der Proben beeinflusst wurde. Flatmark et al. schlossen daraus, dass S100A4 kein geeigneter Plasma- oder Serum-Marker für das KRK sei [179]. In der Studie von Stein et al. wurde dagegen ein diagnostischer und prognostischer Wert von S100A4-mRNA-Transkripten im Patientenblut belegt. Hierfür wurde die S100A4-Expression in 375 Plasmaproben von KRK-Patienten mit Plasmaproben gesunder Kontrollpersonen verglichen. Das Plasma stammte dabei von Patienten mit neu diagnostiziertem KRK ohne Metastasen, von Patienten mit neu diagnostiziertem, synchron metastasiertem KRK und von Patienten mit neu diagnostizierten, metachronen KRK-Metastasen nach R0-Resektion. Das Plasma von Kolon- und Rektumkarzinom-Patienten zeigte verglichen mit der Kontrollgruppe jeweils signifikant erhöhte S100A4-mRNA-Level. Darüber hinaus zeigte sich eine hohe S100A4-Expression als prognostisch für das krankheitsfreie Überleben der Patienten und die Entwicklung von Metastasen [113]. In einer weiteren Studie von Stein et al. wurde die Expression von *Metastasis-Associated in Colon Cancer 1* (MACC1) einem Regulator des HGF/Met Signalwegs im Plasma von KRK-Patienten untersucht. Hohe MACC1-Level im Plasma korrelierten mit einem reduzierten Überleben der Patienten. Der prognostische Wert wurde durch die Kombination der Biomarker MACC1 und S100A4 weiter verbessert [180].

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die S100A4-Expression ausschließlich im Blut von Patienten mit pmKRK. Hierfür wurde die Kopienzahl von S100A4 mittels ddPCR aus dem Patientenplasma ermittelt. Patienten mit pmKRK wiesen, verglichen mit gesunden Kontrollpersonen, eine signifikant höhere S100A4-Expression im Plasma auf. Klinische Daten, wie Tumorentität, Art der Metastasierung (synchron versus metachron), Ausmaß des Tumorbefalls, Grading und Geschlecht, zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression. Auch eine chemotherapeutische Behandlung in der Krankheitsvorgeschichte beeinflusste die S100A4-Expression nicht signifikant. Hiervon ausgenommen ist die Behandlung mit Bevacizumab. Hier zeigten vorbehandelte Patienten ein signifikant erhöhtes S100A4-mRNA-Niveau. Außerdem zeigte der KRAS-Mutationsstatus einen signifikanten Einfluss auf die S100A4-Expression im Plasma.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass S100A4-Transkripte im Blut als vielversprechender Biomarker für die Prädiktion des Therapieansprechens von pmKRK dienen könnten. Intraindividuelle Unterschiede in der S100A4-Expression von Tumorgewebe unterschiedlicher peritonealer Metastasen könnten durch die Evaluierung von S100A4 im Patientenblut umgangen werden.

Inwieweit die Höhe der S100A4-Expression im Plasma mit dem Therapieansprechen verschiedener Chemotherapeutika korreliert, sollte daher weiterführend in einer prospektiven klinischen Studie untersucht werden.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals PDX-Modelle etabliert werden, die ausschließlich von peritonealen Metastasen des KRK abgeleitet wurden. Die Modelle wiesen dabei den Erhalt histologischer Charakteristika, ein heterogenes Wachstum der engrafteten Tumore und ein invasives Wachstum bei orthotoper Transplantation auf. Bei der Evaluierung der Therapieresponse der klassischen Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin und Docetaxel sowie der zielgerichteten Therapeutika Bevacizumab, Cetuximab, Erlotinib, Regorafenib und Selumetinib konnten sowohl inter- als auch intraindividuelle Unterschiede im Therapieansprechen festgestellt werden. Insgesamt zeigten von den klassischen Chemotherapeutika Irinotecan und Docetaxel die beste Therapieresponse. Bei den zielgerichteten Therapeutika waren die Tyrosinkinaseinhibitoren Selumetinib und Regorafenib den häufig bei der Behandlung des metastasierten KRK angewandten Therapeutika Cetuximab und Bevacizumab überlegen. Es konnte gezeigt werden, dass S100A4 im pmKRK-Gewebe exprimiert wird. Interessanterweise ist eine hohe S100A4-Expression mit einem schlechteren Therapieansprechen für Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab assoziiert. Auch im Plasma von Patienten mit pmKRK ist der Biomarker S100A4 nachweisbar. Dabei ist die S100A4-Expression im Patientenplasma signifikant höher als die Expression im Plasma gesunder Kontrollpersonen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass PDX-Modelle geeignet sind, das Ansprechen verschiedener Therapeutika und prädiktive Biomarker für die Behandlung des pmKRK zu evaluieren. Hohe S100A4-Expression im Tumorgewebe ist mit einer schlechten Therapieresponse von Oxaliplatin, Cetuximab und Bevacizumab assoziiert und somit hierfür ein vielversprechender prädiktiver Biomarker und möglicher Therapieansatz. Neben der S100A4-Expression im Tumorgewebe könnte auch die S100A4-Expression im Plasma einen vielversprechenden prädiktiven Biomarker für die Therapie von pmKRK bieten.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Cancer. Key Facts. Lyon, France: World Health Organisation, 2017. (Accessed January 28, 2018, at [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/))
- 2 NCI Dictionary of Cancer Terms. Bethesda: National Cancer Institute, 2017. (Accessed April 29, 2017, at [https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45333.](https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45333))
- 3 Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Berlin, Germany: Robert-Koch-Institut, 2010. (Accessed May 5, 2017, at [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownload/sB/KID2010.pdf?__blob=publicationFile.](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownload/sB/KID2010.pdf?__blob=publicationFile))
- 4 Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin, Germany: Robert-Koch-Institut, 2016. (Accessed January 28, 2018, at [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile.](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile))
- 5 Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2992-3003.
- 6 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- 7 Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011;60:116-29.
- 8 Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012;3:153-73.
- 9 Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Song S, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homiczko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350-6.
- 10 Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2449-60.
- 11 Pachmayr E, Treese C, Stein U. Underlying mechanisms for distant metastasis - molecular biology. *Visc Med* 2017;33:11-20.
- 12 Wittekind C. Kolon und Rektum. In: Wittekind C eds. *TNM Klassifikation maligner Tumore*. 8th ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2017:97-102.
- 13 Bruckner HW, Pitrelli JM. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RT eds. *WHO classification of tumors of the digestive System*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2010:138-9.
- 14 Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JW, de Hingh IH. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. *Int J Cancer* 2011;128:2717-25.
- 15 Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 2006;244:254-9.
- 16 Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:465-74.
- 17 Mitry E, Guiu B, Coscinea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut* 2010;59:1383-8.
- 18 Nordholm-Carstensen A. Pulmonary nodules and metastases in colorectal cancer. *Dan Med J* 2016;63:B5190.
- 19 Grossmann I, Avenarius JK, Mastboom WJ, Klaase JM. Preoperative staging with chest CT in patients with colorectal carcinoma: not as a routine procedure. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2045-50.
- 20 Parnaby CN, Bailey W, Balasingam A, Beckert L, Eglinton T, Fife J, Frizelle FA, Jeffery M, Watson AJ. Pulmonary staging in colorectal cancer: a review. *Colorectal Dis* 2012;14:660-70.

- 21 Baek SJ, Hur H, Min BS, Baik SH, Lee KY, Kim NK. The characteristics of bone metastasis in patients with colorectal cancer: a long-term report from a single institution. *World J Surg* 2016;40:982-6.
- 22 Riihimaki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep* 2016;6:29765.
- 23 Sundermeyer ML, Meropol NJ, Rogatko A, Wang H, Cohen SJ. Changing patterns of bone and brain metastases in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005;5:108-13.
- 24 Christensen TD, Spindler KL, Palshof JA, Nielsen DL. Systematic review: brain metastases from colorectal cancer. Incidence and patient characteristics. *BMC Cancer* 2016;16:260.
- 25 Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011;147:275-92.
- 26 Wang ZB, Li M, Li JC. Recent advances in the research of lymphatic stomata. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293:754-61.
- 27 Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2012;99:699-705.
- 28 Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2002;89:1545-50.
- 29 van Gestel YR, Thomassen I, Lemmens VE, Pruijt JF, van Herk-Sukel MP, Rutten HJ, Creemers GJ, de Hingh IH. Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2014;40:963-9.
- 30 Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol* 2016;22:7692-707.
- 31 Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:178-96.
- 32 Shelygin YA, Pospekhova NI, Shubin VP, Kashnikov VN, Frolov SA, Sushkov OI, Achkasov SI, Tsukanov AS. Epithelial-mesenchymal transition and somatic alteration in colorectal cancer with and without peritoneal carcinomatosis. *Biomed Res Int* 2014;2014:629496.
- 33 Pocard M, Debruyne P, Bras-Goncalves R, Mareel M, Dutrillaux B, Poupon MF. Single alteration of p53 or E-cadherin genes can alter the surgical resection benefit in an experimental model of colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1106-12.
- 34 Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1993;142:981-6.
- 35 Hayashi K, Jiang P, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Bouvet M, Hoffman RM. Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels. *Cancer Res* 2007;67:8223-8.
- 36 Khawar IA, Kim JH, Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release* 2015;201:78-89.
- 37 Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Archives of Surgery* 1995;130:387-93.
- 38 Hase K, Ueno H, Kuranaga N, Utsunomiya K, Kanabe S, Mochizuki H. Intraperitoneal exfoliated cancer cells in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:1134-40.
- 39 Carmignani CP, Sugarbaker TA, Bromley CM, Sugarbaker PH. Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:465-72.
- 40 Jimi S, Hotokezaka M, Ikeda T, Uchiyama S, Hidaka H, Maehara N, Ishizaki H, Chijiwa K. Clinicopathological features, postoperative survival and prognostic variables for cancer-related survival in patients with mucinous colorectal carcinoma. *Surg Today* 2015;45:329-34.
- 41 Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion. *Biol Chem* 2004;385:755-61.
- 42 van Grevenstein WM, Hofland LJ, van Rossen ME, van Koetsveld PM, Jeekel J, van Eijck CH. Inflammatory cytokines stimulate the adhesion of colon carcinoma cells to mesothelial monolayers. *Dig Dis Sci* 2007;52:2775-83.
- 43 Klein CL, Bittinger F, Skarke CC, Wagner M, Kohler H, Walgenbach S, Kirkpatrick CJ. Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology* 1995;63:204-12.

- 44 Jonjic N, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P, Lanfrancone L, Mantovani A. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med* 1992;176:1165-74.
- 45 Harada N, Mizoi T, Kinouchi M, Hoshi K, Ishii S, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S. Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2001;91:67-75.
- 46 Sacks JD, Barbolina MV. Expression and function of CD44 in epithelial ovarian carcinoma. *Biomolecules* 2015;5:3051-66.
- 47 Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. CD44H plays an important role in peritoneal dissemination of scirrhus gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1235-44.
- 48 Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, Lord EM. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol* 2006;169:1739-52.
- 49 Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S, et al. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 1993;53:687-92.
- 50 Yonemura Y, Endou Y, Nojima M, Kawamura T, Fujita H, Kaji M, Ajisaka H, Bandou E, Sasaki T, Yamaguchi T, Harada S, Yamamoto H. A possible role of cytokines in the formation of peritoneal dissemination. *Int J Oncol* 1997;11:349-58.
- 51 Schlaeppi M, Rugg C, Tran-Thang C, Chapuis G, Tevæearai H, Lahm H, Sordat B. Role of integrins and evidence for two distinct mechanisms mediating human colorectal carcinoma cell interaction with peritoneal mesothelial cells and extracellular matrix. *Cell Adhes Commun* 1997;4:439-55.
- 52 Heath RM, Jayne DG, O'Leary R, Morrison EE, Guillou PJ. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br J Cancer* 2004;90:1437-42.
- 53 Alkhamesi NA, Roberts G, Ziprin P, Peck DH. Induction of proteases in peritoneal carcinomatosis, the role of ICAM-1/CD43 interaction. *Biomark Insights* 2007;2:377-84.
- 54 Varghese S, Burness M, Xu H, Beresnev T, Pingpank J, Alexander HR. Site-specific gene expression profiles and novel molecular prognostic factors in patients with lower gastrointestinal adenocarcinoma diffusely metastatic to liver or peritoneum. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3460-71.
- 55 Miyoshi C, Ohshima N. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression regulates angiogenesis accompanying tumor growth in a peritoneal disseminated tumor model. *In Vivo* 2001;15:233-8.
- 56 Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Jung YD, Tseng WW, Drazan KE, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* 2001;85:584-9.
- 57 Carr NJ, Sobin LH. Adenocarcinoma of the appendix. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RT eds. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2010:120-5.
- 58 Carr NJ, Cecil TD, Mohamed F, Sobin LH, Sugarbaker PH, Gonzalez-Moreno S, Taflampas P, Chapman S, Moran BJ. A consensus for classification and pathologic reporting of pseudomyxoma peritonei and associated appendiceal neoplasia: the results of the peritoneal surface oncology group international (PSOGI) modified delphi process. *Am J Surg Pathol* 2016;40:14-26.
- 59 Misdraji J. Mucinous epithelial neoplasms of the appendix and pseudomyxoma peritonei. *Mod Pathol* 2015;28sup:67-79.
- 60 Reu S, Neumann J, Kirchner T. Muzinöse Neoplasien der Appendix vermiformis, Pseudomyxoma peritonei und die neue WHO-Klassifikation. *Pathologe* 2012;33:24-30.
- 61 Smeenk RM, van Velthuysen ML, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Appendiceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei: a population based study. *Eur J Surg Oncol* 2008;34:196-201.
- 62 Pelz JO, Chua TC, Esquivel J, Stojadinovic A, Doerfer J, Morris DL, Maeder U, Germer CT, Kerscher AG. Evaluation of best supportive care and systemic chemotherapy as treatment stratified according to the retrospective peritoneal surface disease severity score (PSDSS) for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *BMC Cancer* 2010;10:689.
- 63 Sugarbaker PH. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:576-87.
- 64 Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg* 1995;221:29-42.

- 65 Baratti D, Kusamura S, Pietrantonio F, Guaglio M, Nigam M, Deraco M. Progress in treatments for colorectal cancer peritoneal metastases during the years 2010-2015. a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;100:209-22.
- 66 Kusamura S, Dominique E, Baratti D, Younan R, Deraco M. Drugs, carrier solutions and temperature in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Surg Oncol* 2008;98:247-52.
- 67 Rubino MS, Abdel-Misih RZ, Bennett JJ, Petrelli NJ. Peritoneal surface malignancies and regional treatment: a review of the literature. *Surg Oncol* 2012;21:87-94.
- 68 Sugarbaker PH, Van der Speeten K. Surgical technology and pharmacology of hyperthermic perioperative chemotherapy. *J Gastrointest Oncol* 2016;7:29-44.
- 69 Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;43:33-56.
- 70 Shimizu T, Maeta M, Koga S. Influence of local hyperthermia on the healing of small intestinal anastomoses in the rat. *Br J Surg* 1991;78:57-9.
- 71 Elias D, Gilly F, Boutitie F, Quenet F, Bereder JM, Mansvelt B, Lorimier G, Dube P, Glehen O. Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol* 2010;28:63-8.
- 72 Cavaliere F, De Simone M, Virzi S, Deraco M, Rossi CR, Garofalo A, Di Filippo F, Giannarelli D, Vaira M, Valle M, Pilati P, Perri P, La Pinta M, Monsellato I, Guadagni F. Prognostic factors and oncologic outcome in 146 patients with colorectal peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Italian multicenter study S.I.T.I.L.O. *Eur J Surg Oncol* 2011;37:148-54.
- 73 Robella M, Vaira M, Marsanic P, Mellano A, Cinquegrana A, Sottile A, De Simone M. Treatment of pseudomyxoma peritonei with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): a single center experience. *Minerva Chir* 2013;68:569-77.
- 74 Tan GH, Novo CA, Dayal S, Chandrakumaran K, Mohamed F, Cecil T, Moran BJ. The modified Glasgow prognosis score predicts for overall and disease-free survival following cytoreductive surgery and HIPEC in patients with pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin. *Eur J Surg Oncol* 2017;43:388-94.
- 75 Arjona-Sanchez A, Munoz-Casares FC, Rufian-Pena S, Diaz-Nieto R, Casado-Adam A, Rubio-Perez MJ, Ortega-Salas R. Pseudomyxoma peritonei treated by cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: results from a single centre. *Clin Transl Oncol* 2011;13:261-7.
- 76 Ansari N, Chandrakumaran K, Dayal S, Mohamed F, Cecil TD, Moran BJ. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in 1000 patients with perforated appendiceal epithelial tumours. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:1035-41.
- 77 Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3737-43.
- 78 Hompes D, D'Hoore A, Wolthuis A, Fieuws S, Mirck B, Bruin S, Verwaal V. The use of Oxaliplatin or Mitomycin C in HIPEC treatment for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a comparative study. *J Surg Oncol* 2014;109:527-32.
- 79 Esquivel J, Elias D, Baratti D, Kusamura S, Deraco M. Consensus statement on the loco regional treatment of colorectal cancer with peritoneal dissemination. *J Surg Oncol* 2008;98:263-7.
- 80 Esquivel J. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer: survival outcomes and patient selection. *J Gastrointest Oncol* 2016;7:72-8.
- 81 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-8.
- 82 Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002;1:227-35.
- 83 Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:11-12.
- 84 Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol* 2002;13:1841-51.
- 85 Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 2011;4:51.
- 86 Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013;13:871-82.

- 87 Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E, Lim ST, Tomar A, Tancioni I, Uryu S, Guan JL, Acevedo LM, Weis SM, Cheresh DA, Schlaepfer DD. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell* 2012;22:146-57.
- 88 Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 1997;15:2169-77.
- 89 Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:743-6.
- 90 Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7:186-91.
- 91 Zhao YC, Ni XJ, Li Y, Dai M, Yuan ZX, Zhu YY, Luo CY. Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World J Surg Oncol* 2012;10:165.
- 92 Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1131:225-34.
- 93 Muhsin M, Graham J, Kirkpatrick P. Bevacizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:995-6.
- 94 Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26:3291-310.
- 95 Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 1995;95:1897-905.
- 96 Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:257-65.
- 97 Vincent MD, Breadner D, Soulieres D, Kerr IG, Sanatani M, Kocha W, Klimo P, MacKenzie MJ, O'Connell A, Whiston F, Malpage AS, Stitt L, Welch SA. Phase II trial of capecitabine plus erlotinib versus capecitabine alone in patients with advanced colorectal cancer. *Future Oncol* 2017;13:777-86.
- 98 Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:519-27.
- 99 Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486:532-6.
- 100 Sasaki Y, Hamaguchi T, Yamada Y, Takahashi N, Shoji H, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Nagai Y, Taniguchi H, Boku N, Ushijima T, Shimada Y. Value of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations and survival benefit from systemic chemotherapy in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17:539-43.
- 101 Pachmayr E, Brandl A, Feist M, Rau B. Indikationen für Peritonektomie und HIPEC beim Magenkarzinom. *Chirurgische Praxis* 2016;81:559-71.
- 102 Zani S, Papalezova K, Stinnett S, Tyler D, Hsu D, Blazer DG, 3rd. Modest advances in survival for patients with colorectal-associated peritoneal carcinomatosis in the era of modern chemotherapy. *J Surg Oncol* 2013;107:307-11.
- 103 Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, van Slooten G, van Tinteren H. 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2426-32.
- 104 Franko J, Shi Q, Goldman CD, Pockaj BA, Nelson GD, Goldberg RM, Pitot HC, Grothey A, Alberts SR, Sargent DJ. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol* 2012;30:263-7.
- 105 Cashin PH, Mahteme H, Spang N, Syk I, Frodin JE, Torkzad M, Glimelius B, Graf W. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy for colorectal peritoneal metastases: a randomised trial. *Eur J Cancer* 2016;53:155-62.

- 106 Klaver YL, Simkens LH, Lemmens VE, Koopman M, Teerenstra S, Bleichrodt RP, de Hingh IH, Punt CJ. Outcomes of colorectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated with chemotherapy with and without targeted therapy. *Eur J Surg Oncol* 2012;38:617-23.
- 107 Franko J, Ibrahim Z, Gusani NJ, Holtzman MP, Bartlett DL, Zeh HJ, 3rd. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion versus systemic chemotherapy alone for colorectal peritoneal carcinomatosis. *Cancer* 2010;116:3756-62.
- 108 Razenberg LG, van Gestel YR, Lemmens VE, de Hingh IH, Creemers GJ. Bevacizumab in addition to palliative chemotherapy for patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a nationwide population-based study. *Clin Colorectal Cancer* 2016;15:41-6.
- 109 van Oudheusden TR, Razenberg LG, van Gestel YR, Creemers GJ, Lemmens VE, de Hingh IH. Systemic treatment of patients with metachronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Sci Rep* 2015;5:18632.
- 110 Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol* 2013;14:1165-74.
- 111 van Harten WH, Wind A, de Paoli P, Saghatchian M, Oberst S. Actual costs of cancer drugs in 15 European countries. *Lancet Oncol* 2016;17:18-20.
- 112 Vogler S, Vitry A, Babar ZU. Cancer drugs in 16 European countries, Australia, and New Zealand: a cross-country price comparison study. *Lancet Oncol* 2016;17:39-47.
- 113 Stein U, Burock S, Herrmann P, Wendler I, Niederstrasser M, Wernecke KD, Schlag PM. Diagnostic and prognostic value of metastasis inducer S100A4 transcripts in plasma of colon, rectal, and gastric cancer patients. *J Mol Diagn* 2011;13:189-98.
- 114 Hansen MT, Forst B, Cremers N, Quagliata L, Ambartsumian N, Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Abdul-AI A, Herrmann P, Osterland M, Stein U, Nielsen GH, Scherer PE, Lukanidin E, Sleeman JP, Grigorian M. A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. *Oncogene* 2015;34:424-35.
- 115 El-Abd E, El-Tahan R, Fahmy L, Zaki S, Faid W, Sobhi A, Kandil K, El-Kwisky F. Serum metastasin mRNA is an important survival predictor in breast cancer. *Br J Biomed Sci* 2008;65:90-4.
- 116 Bai H, Qian JL, Han BH. S100A4 is an independent prognostic factor for patients with lung cancer: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014;18:371-4.
- 117 Ling Z, Li R. Clinicopathological and prognostic value of S100A4 expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers* 2014;29:99-111.
- 118 Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Qin X, Li S. Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagn Pathol* 2013;8:181.
- 119 Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 2006;131:1486-500.
- 120 Boye K, Maelandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol* 2010;176:528-35.
- 121 Li Z-H, Bresnick AR. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* 2006;66:5173-80.
- 122 Ramagopal UA, Dulyaninova NG, Varney KM, Wilder PT, Nallamsetty S, Brenowitz M, Weber DJ, Almo SC, Bresnick AR. Structure of the S100A4/myosin-IIA complex. *BMC Struct Biol* 2013;13:31.
- 123 Jia W, Gao XJ, Zhang ZD, Yang ZX, Zhang G. S100A4 silencing suppresses proliferation, angiogenesis and invasion of thyroid cancer cells through downregulation of MMP-9 and VEGF. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:1495-508.
- 124 Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol* 2012;59:593-8.
- 125 Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005;280:20833-41.
- 126 Che P, Yang Y, Han X, Hu M, Sellers JC, Londono-Joshi AI, Cai GQ, Buchsbaum DJ, Christein JD, Tang Q, Chen D, Li Q, Grizzle WE, Lu YY, Ding Q. S100A4 promotes pancreatic cancer progression through a dual signaling pathway mediated by Src and focal adhesion kinase. *Sci Rep* 2015;5:8453.
- 127 Chen X, Luther G, Zhang W, Nan G, Wagner ER, Liao Z, Wu N, Zhang H, Wang N, Wen S, He Y, Deng F, Zhang J, Wu D, Zhang B, Haydon RC, Zhou L, Lu HH, He TC. The E-F hand calcium-

- binding protein S100A4 regulates the proliferation, survival and differentiation potential of human osteosarcoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2013;32:1083-96.
- 128 Hua J, Chen D, Fu H, Zhang R, Shen W, Liu S, Sun K, Sun X. Short hairpin RNA-mediated inhibition of S100A4 promotes apoptosis and suppresses proliferation of BGC823 gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2010;292:41-7.
- 129 Orre LM, Panizza E, Kaminsky VO, Vernet E, Graslund T, Zhivotovsky B, Lehtio J. S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene* 2013;32:5531-40.
- 130 Johansson HJ, Sanchez BC, Forshed J, Stal O, Fohlin H, Lewensohn R, Hall P, Bergh J, Lehtio J, Linderholm BK. Proteomics profiling identify CAPS as a potential predictive marker of tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Proteomics* 2015;12:8.
- 131 Kim YJ, Kim MA, Im SA, Kim TM, Kim DW, Yang HK, Heo DS, Lee KU, Choe KJ, Kim NK, Kim TY, Kim WH, Bang YJ. Metastasis-associated protein S100A4 and p53 predict relapse in curatively resected stage III and IV (M0) gastric cancer. *Cancer Invest* 2008;26:152-8.
- 132 Liang J, Piao Y, Holmes L, Fuller GN, Henry V, Tiao N, de Groot JF. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res* 2014;20:187-98.
- 133 Brown KM, Xue A, Mittal A, Samra JS, Smith R, Hugh TJ. Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in pre-clinical research: a systematic review. *Oncotarget* 2016;7:66212-25.
- 134 Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:338-50.
- 135 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
- 136 Golovko D, Kedrin D, Yilmaz OH, Roper J. Colorectal cancer models for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015;10:1217-29.
- 137 Evans JP, Sutton PA, Winiarski BK, Fenwick SW, Malik HZ, Vimalachandran D, Tweedle EM, Costello E, Palmer DH, Park BK, Kitteringham NR. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;98:94-105.
- 138 Arienti C, Tesei A, Verdecchia GM, Framarini M, Virzi S, Grassi A, Scarpi E, Turci L, Silvestrini R, Amadori D, Zoli W. Role of conventional chemosensitivity test and tissue biomarker expression in predicting response to treatment of peritoneal carcinomatosis from colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2013;12:122-7.
- 139 Bozzi F, Mogavero A, Varinelli L, Belfiore A, Manenti G, Caccia C, Volpi CC, Beznoussenko GV, Milione M, Leoni V, Gloghini A, Mironov AA, Leo E, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I, Gariboldi M. MIF/CD74 axis is a target for novel therapies in colon carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:16.
- 140 Roy P, Canet-Jourdan C, Annereau M, Zajac O, Gelli M, Broutin S, Mercier L, Paci A, Lemare F, Ducreux M, Elias D, Malka D, Boige V, Goere D, Jaulin F. Organoids as preclinical models to improve intraperitoneal chemotherapy effectiveness for colorectal cancer patients with peritoneal metastases: Preclinical models to improve HIPEC. *Int J Pharm* 2017;531:143-52.
- 141 Cohen MS, Al-Kasspoles MF, Williamson SK, Henry D, Broward M, Roby KF. Combination intraperitoneal chemotherapy is superior to mitomycin C or oxaliplatin for colorectal carcinomatosis in vivo. *Ann Surg Oncol* 2010;17:296-303.
- 142 Jouvin I, Najah H, Pimpie C, Canet Jourdan C, Kaci R, Mirshahi M, Eveno C, Pocard M. Reduction of carcinomatosis risk using icodextrin as a carrier solution of intraperitoneal oxaliplatin chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2017;43:1088-94.
- 143 Hribaschek A, Pross M, Kuhn R, Kruger S, Ridwelski K, Halangk W, Boltze C, Lippert H. Prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis in experimental investigations with CPT-11 and oxaliplatin. *Anticancer Drugs* 2002;13:605-14.
- 144 Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goere D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P, Weiswald LB, Lantuas D, Morgand L, Pham E, Gonin P, Dangles-Marie V, Job B, Dessen P, Bruno A, Pierre A, De The H, Soliman H, Nunes M, Lardier G, Calvet L, Demers B, Prevost G, Vrignaud P, Roman-Roman S, Duchamp O, Berthet C. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:5314-28.

- 145 Mavanur AA, Parimi V, O'Malley M, Nikiforova M, Bartlett DL, Davison JM. Establishment and characterization of a murine xenograft model of appendiceal mucinous adenocarcinoma. *Int J Exp Pathol* 2010;91:357-67.
- 146 Flatmark K, Reed W, Halvorsen T, Sorensen O, Wiig JN, Larsen SG, Fodstad O, Giercksky KE. Pseudomyxoma peritonei. Two novel orthotopic mouse models portray the PMCA-I histopathologic subtype. *BMC Cancer* 2007;7:116.
- 147 Flatmark K, Davidson B, Kristian A, Stavnes HT, Forsund M, Reed W. Exploring the peritoneal surface malignancy phenotype. A pilot immunohistochemical study of human pseudomyxoma peritonei and derived animal models. *Hum Pathol* 2010;41:1109-19.
- 148 Jabs J, Zickgraf FM, Park J, Wagner S, Jiang X, Jechow K, Kleinheinz K, Toprak UH, Schneider MA, Meister M, Spaich S, Sutterlin M, Schlesner M, Trumpp A, Sprick M, Eils R, Conrad C. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Mol Syst Biol* 2017;13:955.
- 149 Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hokusui H, Nagai E. Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biol Pharm Bull* 1994;17:662-4.
- 150 Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001;7:2182-94.
- 151 Clark TB, Kemeny NE, Conti JA, Huang Y, Andre AM, Stockman J. Phase II trial of docetaxel (Taxotere) for untreated advanced colorectal carcinoma. *Cancer Invest* 1998;16:314-8.
- 152 Sternberg CN, ten Bokkel Huinink WW, Smyth JF, Brunsch V, Dirix LY, Pavlidis NA, Franklin H, Wanders S, Le Bail N, Kaye SB. Docetaxel (Taxotere), a novel taxoid, in the treatment of advanced colorectal carcinoma: an EORTC early clinical trials group study. *Br J Cancer* 1994;70:376-9.
- 153 Bieche I, Vacher S, Vallerand D, Richon S, Hatem R, De Plater L, Dahmani A, Nemati F, Angevin E, Marangoni E, Roman-Roman S, Decaudin D, Dangles-Marie V. Vasculature analysis of patient derived tumor xenografts using species-specific PCR assays: evidence of tumor endothelial cells and atypical VEGFA-VEGFR1/2 signalings. *BMC Cancer* 2014;14:178.
- 154 Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, LeCouter J, Campa C, Fuh G, Lowman H, Ferrara N. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:522-7.
- 155 Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2015;21:1258-66.
- 156 Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H. Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 1997;3:2309-16.
- 157 Kim JH, Kim CN, Kim SY, Lee JS, Cho D, Kim JW, Yoon SY. Enhanced S100A4 protein expression is clinicopathologically significant to metastatic potential and p53 dysfunction in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009;22:41-7.
- 158 Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer* 2002;86:409-16.
- 159 Boye K, Jacob H, Friestad KA, Nesland JM, Maelandsmo GM, Dahl O, Nesbakken A, Flatmark K. Prognostic significance of S100A4 expression in stage II and III colorectal cancer: results from a population-based series and a randomized phase III study on adjuvant chemotherapy. *Cancer Med* 2016;5:1840-9.
- 160 Mencia N, Selga E, Rico I, de Almagro MC, Villalobos X, Ramirez S, Adan J, Hernandez JL, Noe V, Ciudad CJ. Overexpression of S100A4 in human cancer cell lines resistant to methotrexate. *BMC Cancer* 2010;10:250.
- 161 Egeland EV, Boye K, Pettersen SJ, Haugen MH, Oyjord T, Malerod L, Flatmark K, Maelandsmo GM. Enrichment of nuclear S100A4 during G2/M in colorectal cancer cells: possible association with cyclin B1 and centrosomes. *Clin Exp Metastasis* 2015;32:755-67.
- 162 Yang C, Zhou Q, Li M, Tong X, Sun J, Qing Y, Sun L, Yang X, Hu X, Jiang J, Yan X, He L, Wan C. Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines. *Sci Rep* 2016;6:33078.
- 163 Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H. The 1,2-Diaminocyclohexane

- Carrier Ligand in Oxaliplatin Induces p53-Dependent Transcriptional Repression of Factors Involved in Thymidylate Biosynthesis. *Mol Cancer Ther* 2015;14:2332-42.
- 164 Sjo OH, Berg M, Merok MA, Kolberg M, Svindland A, Lothe RA, Nesbakken A. Peritoneal carcinomatosis of colon cancer origin: highest incidence in women and in patients with right-sided tumors. *J Surg Oncol* 2011;104:792-7.
- 165 Li XX, Peng JJ, Liang L, Huang LY, Li DW, Shi DB, Zheng HT, Cai SJ. RNA-seq identifies determinants of oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer cell lines. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:3763-70.
- 166 Jeong JH, Kim J, Hong YS, Kim D, Kim JE, Kim SY, Kim KP, Yoon YK, Kim D, Chun SM, Park Y, Jang SJ, Kim TW. HER2 Amplification and Cetuximab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Harboring Wild-type RAS and BRAF. *Clin Colorectal Cancer* 2017;16:147-52.
- 167 Klingelhofer J, Moller HD, Sumer EU, Berg CH, Poulsen M, Kiryushko D, Soroka V, Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin EM. Epidermal growth factor receptor ligands as new extracellular targets for the metastasis-promoting S100A4 protein. *Febs j* 2009;276:5936-48.
- 168 Dahlmann M, Okhrimenko A, Marcinkowski P, Osterland M, Herrmann P, Smith J, Heizmann CW, Schlag PM, Stein U. RAGE mediates S100A4-induced cell motility via MAPK/ERK and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2014;5:3220-33.
- 169 Hernan R, Fasheh R, Calabrese C, Frank AJ, Maclean KH, Allard D, Barraclough R, Gilbertson RJ. ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res* 2003;63:140-8.
- 170 Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001;20:4685-95.
- 171 Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, Klingelhofer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23:5487-95.
- 172 Ochiya T, Takenaga K, Endo H. Silencing of S100A4, a metastasis-associated protein, in endothelial cells inhibits tumor angiogenesis and growth. *Angiogenesis* 2014;17:17-26.
- 173 de Silva Rudland S, Martin L, Roshanlall C, Winstanley J, Leinster S, Platt-Higgins A, Carroll J, West C, Barraclough R, Rudland P. Association of S100A4 and osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1192-200.
- 174 Wang H, Duan L, Zou Z, Li H, Yuan S, Chen X, Zhang Y, Li X, Sun H, Zha H, Zhang Y, Zhou L. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells. *Int J Med Sci* 2014;11:841-9.
- 175 Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, Hansen T, Ambartsumian N, Lukanidin E, Grigorian M. Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 2004;279:24498-504.
- 176 Dahlmann M, Kobelt D, Walther W, Mudduluru G, Stein U. S100A4 in cancer metastasis: Wnt signaling-driven interventions for metastasis restriction. *Cancers (Basel)* 2016;8:59.
- 177 Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Aumann J, Lemos C, Fichtner I, Schlag PM, Shoemaker RH, Stein U. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell* 2011;22:3344-54.
- 178 Malashkevich VN, Dulyaninova NG, Ramagopal UA, Liriano MA, Varney KM, Knight D, Brenowitz M, Weber DJ, Almo SC, Bresnick AR. Phenothiazines inhibit S100A4 function by inducing protein oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8605-10.
- 179 Flatmark K, Maelandsmo GM, Mikalsen SO, Nustad K, Varaas T, Rasmussen H, Meling GI, Fodstad O, Paus E. Immunofluorometric assay for the metastasis-related protein S100A4: release of S100A4 from normal blood cells prohibits the use of S100A4 as a tumor marker in plasma and serum. *Tumour Biol* 2004;25:31-40.
- 180 Stein U, Burock S, Herrmann P, Wendler I, Niederstrasser M, Wernecke KD, Schlag PM. Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis. *PLoS One* 2012;7:49249.

6. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Akt	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Adenomatous Polyposis Coli
CCCC-TBN	Tumor- und Biobank des Charité Comprehensive Cancer Center
CC-Score	Completeness of Cytoreduction-Scores
CD	Cluster of Differentiation
CDX	Zelllinien abgeleitetes Xenograftmodell
CIN	Chromosomale Instabilität
CK1	Casein Kinase 1
CK-19	Zytokeratin-19
CMS	Consensus Molecular Subtypes
CR	Complete Response
DACH-Ligand	1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand
ddPCR	Droplet digital PCR
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPIC	Früh-postoperative intraperitoneale Chemotherapie
EPO GmbH	Experimentelle Pharmakologie & Onkologie Berlin-Buch GmbH
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FOLFIRI	Systemische Chemotherapieregime aus Irinotecan, 5-FU und Leucovorin
FOLFOX	Systemische Chemotherapieregime aus Oxaliplatin, 5-FU und Leucovorin
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GEMM	Genetisch manipulierte Mausmodelle
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HIPEC	Hypertherme intraoperative intraperitoneale Chemotherapie
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IGF-1	Insulin-like-Growth-Factor-1
IL	Interleukin
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
KRK	Kolorektales Karzinom
LAMN	Low-grade Appendiceal Mucinous Neoplasia
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LRP	Lipoprotein Receptor-related Proteins
MACC1	Metastasis-Associated in Colon Cancer 1

Abkürzungsverzeichnis

MEK	MAPK Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NCI	National Cancer Institute
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
PBS-T	PBS Tween-20
PCI	Peritoneal Cancer Index
PD	Progressive Disease
PDX	Patienten-abgeleitetes Xenograftmodell
PECAM-1	Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
pmKrk	Peritoneal metastasiertes KRK
PMP	Pseudomyxoma peritonei
PR	Partial Response
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase
RAGE	Receptor of Advanced Glycation Endproducts
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Presumably Secreted
RAS	Sarcoma Oncogene Homolog
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RT	Reverse Transkription
RTV	Relatives Tumolvolumen
SAA	Serum Amyloid A
SD	Stable Disease
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
T/C-Wert	Mittleres Tumolvolumen der Behandlungsgruppe (T) / mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe (C)
TBST	Tris-buffered Saline Tween20
TCF	T-Cell Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TLR4	Toll-like Receptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TS	Thymidylat-Synthase
TV	Tumolvolumen
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
WHO	World Health Organisation

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eva Pachmayr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prädiktion der Therapie-Response im Patienten-abgeleiteten Maus-Xenograft-Modell bei peritoneal metastasiertem kolorektalem Karzinom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Beiträge in Zeitschriften

Pachmayr E, Treese C, Stein U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis. *Visceral Medicine* 33/1 (2017): 11-20.

Brandl A, Pachmayr E, Klos D, Thuss-Patience P, Rau B. Stellenwert der Peritonektomie und intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie (HIPEC) beim Magenkarzinom. *Journal Onkologie* 17/2 (2017): 130-138.

Pachmayr E, Brandl A, Feist M, Rau B. Indikationen für Peritonektomie und HIPEC beim Magenkarzinom. *Chirurgische Praxis* 81/4 (2016): 559-571.

Rau B, Feist M, Brandl A, Pachmayr E, Raue W. Treatment of peritoneal surface malignancies. *Hospital Healthcare Europe* (2016).

Beiträge in Sammelbänden

Rau B, Pachmayr E, Brandl A, Raue W. Chirurgische Therapieoptionen bei peritonealer Metastasierung. In: *Moderne Chirurgie des Magen- und Kardiakarzinoms*; Springer Berlin Heidelberg (2017): 163-170.

Rau B, Pachmayr E, Raue W, Weiss S. Primäre und sekundäre maligne Erkrankungen des Peritoneums bei alten Patienten. In: *Onkologische Chirurgie bei alten Patienten*; Springer Berlin Heidelberg (2016): 223-238.

Poster

Pachmayr E, Walther W, Brzezicha B, Büttner B, Castañós-Vélez E, Rau B, Stein U. First patient-derived xenografts (PDX) of peritoneally metastasized colorectal cancer for identification of novel predictive biomarkers to improve therapy. 19th International AEK Cancer Congress (2017).

Walther W, Pachmayr E, Brzezicha B, Büttner B, Rau B, Stein U. Patient-derived xenograft models from peritoneal metastasis of colorectal carcinoma as novel platform for biomarker analysis and drug testing. *AACR Proceedings* (2017): Abstract #3853.

Walther W, Pachmayr E, Brzezicha B, Büttner B, Rau B, Stein U. Novel patient-derived xenograft (PDX) models from peritoneal metastasis of colorectal carcinoma for drug testing and biomarker analysis. *AACR Advances in Modeling Cancer in Mice* (2017).

Rau B, Pachmayr E, Brandl A, Brzezicha B, Walther W, Stein U. Novel patient-derived xenograft (PDX) models as platform for chemosensitivity testing. 10th International Congress on Peritoneal Surface Malignancies (2016).

Walther W, Pachmayr E, Brzezicha B, Büttner B, Rau B, Stein U. Establishment and characterization of patient-derived xenograft (PDX) models from peritoneal metastasis of colorectal carcinoma as novel platform for drug testing and biomarker evaluation. *European Journal of Cancer* 69/Sup1 (2016): 112-113; Abstract #341.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Ulrike Stein für die einzigartige Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und ihre außerordentliche Unterstützung als meine Erstbetreuerin. Mein besonderer Dank gilt ebenso meiner Zweitbetreuerin Frau Professor Dr. Beate Rau, ohne deren freundliche Unterstützung und Fürsprache diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Stein möchte ich mich für die vielfältigen Hilfestellungen bedanken. Dies gilt in besonderem Maße für Professor Dr. Wolfgang Walther, der mit seinen Anregungen und Korrekturen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Hervorheben möchte ich außerdem ausdrücklich Pia Herrmann, die mich gewissenhaft, stets hilfsbereit und freundlich in alle Labortätigkeiten und -verfahren eingearbeitet hat. Dr. Katharina Ilm, Dr. Jessica Pahle und Dr. Christoph Treese gilt ferner meine Dankbarkeit für ihre bemerkenswerte Hilfsbereitschaft, unzählige Anregungen, Ratschläge und Hilfestellungen. Auch bei allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für ihre fachliche Unterstützung und kollegiale Art bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit und Etablierung der PDX-Modelle bin ich außerdem der Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch zu Dank verpflichtet. Neben Professor Dr. Wolfgang Walther möchte ich hier namentlich Bernadette Brezezicha und Britta Büttner hervorheben. Mein Dank gilt ebenso dem Charité Comprehensive Cancer Center für die Bereitstellung von Tumorproben, insbesondere Dr. Esmeralda Castaños-Vélez und Dr. Alexandra Stege für die Organisation seitens der Tumorbank. Herrn Dr. Marc Rudl danke ich für die Überprüfung der pathologischen Befunde. Herrn Dr. Andreas Brandl und Frau Dr. Safak Gül-Klein danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Bereitstellung der Patientendaten.

Ein besonderer Dank gilt außerdem der Berliner Krebsgesellschaft e.V. für ihre großzügige Förderung meiner Doktorarbeit durch ihr Promotionsstipendium.

Von Herzen möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets auf meinem Weg unterstützt haben und immer für mich da sind. Meinen Geschwistern, Großeltern und Freunden danke für ihre für mich unverzichtbare Unterstützung. Bei meiner Schwägerin Hanna möchte ich mich ganz besonders für Ihre Korrekturen und Anmerkungen bedanken.

Danke Moritz für Deine unendliche Geduld, Deine außerordentliche Unterstützung in großen wie in kleinen Krisen und die schöne gemeinsame Zeit.