

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**Detektion von hypermethylierter
HPP1 und *HLTF* DNA im Blut
als Biomarker des
metastasierten kolorektalen Karzinoms**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Nikolay Vdovin
aus Ischewsk, Russland**

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Kolligs

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dorit Di Gioia
Priv. Doz. Dr. Jens Neumann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Andreas Herbst

Dekan: Prof. Dr. med. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Danksagung	6
Zusammenfassung	7
Eigene Publikation.....	8
1 Einleitung	9
1.1 Das kolorektale Karzinom	9
1.2 Tumormarker des KKK	11
1.2.1 Definition.....	11
1.2.2 Gewebsbasierte Tumormarker.....	11
1.2.3 Tumormarker im Blut.....	15
1.2.4 <i>HPP1</i>	18
1.2.5 <i>HLTF</i>	20
1.2.6 Einsatz in der Klinik.....	21
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Patientenkollektiv	23
3.2 Bearbeitung der Blutproben	28
3.3 DNA-Isolierung	29
3.4 Bisulfitkonvertierung.....	30
3.5 Analyse der DNA-Methylierung	33
3.6 CEA-Messung	36
3.7 Statistische Auswertung	36

4	Ergebnisse	38
4.1	Testkollektiv	38
4.1.1	<i>HPP1</i> und <i>HLTF</i> im Testkollektiv	38
4.1.2	Univariate Cox-Regressionsanalyse	43
4.1.3	Multivariate Analyse	45
4.1.4	<i>HPP1</i> und <i>HLTF</i> im Vergleich.....	47
4.2	Analyse am Gesamtkollektiv.....	50
4.2.1	Radiologisches Staging und sein prognostischer Wert	50
4.2.2	Einfluss von <i>HPP1</i> -Methylierungsstatus und CEA auf das Gesamtüberleben ...	52
4.2.3	<i>HPP1</i> mfcDNA als Marker des Therapieansprechens	63
5	Diskussion.....	67
	Literaturverzeichnis	74
	Anhang.....	86
	Abkürzungsverzeichnis.....	86
	Abbildungsverzeichnis.....	88
	Tabellenverzeichnis	89
	Eidesstattliche Versicherung	90

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Frank Kolligs für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Doktorarbeit, die hervorragenden Forschungsbedingungen und die kompetente Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Herbst für die ausgezeichnete Betreuung, konstruktive Kritik, viele wertvolle Ideen und stetige Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Frau Sanja Gacesa für die Unterstützung in der Durchführung der Experimente, bei Frau Andrea Ofner und Maximilian Marschall für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die Geräteeinweisung.

Ich bedanke mich herzlich bei dem Studienteam von AIO-KRK-0207-Studie für die Bereitstellung von Blutproben und klinischen Daten.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin, im Speziellen Frau Dr. rer. nat. Dorothea Nagel für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Lesca Holdt für die Erlaubnis zur Benutzung der Geräte.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Maria für ihre stetige Unterstützung bedanken.

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt die dritthäufigste Tumorerkrankung in Deutschland dar. Ca. 50% der Patienten entwickeln im weiteren Verlauf dieser Erkrankung Metastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Fall liegt bei unter 15%. Dringend werden für die Wahl der richtigen Behandlung, sowie die Beurteilung des Therapieansprechens bei metastasiertem KRK (mKRK) neue verlässliche Biomarker benötigt. In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte in retrospektiven Studien gezeigt werden, dass methylierte frei im Blut zirkulierende DNA (mfcDNA) der Gene *HPPI* und *HLTF* einen prognostischen Marker des KRK darstellt. Nun wurde im Rahmen einer prospektiven Studie ihr Nutzen als prognostischer, prädiktiver und response-Marker des mKRK in einem großen Patientenkollektiv getestet.

Die untersuchten Proben der 467 Patienten stammten aus der prospektiven, multizentrischen, randomisierten, dreiarmigen Phase-III-Studie AIO-KRK-0207. Hier wurden mKRK-Patienten mit Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab als Induktionschemotherapie behandelt. Direkt vor Therapiebeginn und vor dem zweiten Behandlungszyklus wurde je eine Blutprobe entnommen und analysiert (BE1 und BE2). Die fcDNA wurde aus dem Blutplasma isoliert, mit Bisulfit behandelt und anschließend durch methylierungsspezifische qPCR quantifiziert. Zusätzlich erfolgte die Messung von carcinoembryonic antigen (CEA). 12 und 24 Wochen nach dem Therapiestart erfolgten radiologische Staging-Untersuchungen.

Bei 337 der 467 Patienten (72%) ließ sich vor der Behandlung *HPPI* nachweisen. Dies korrelierte mit einem schlechteren Gesamtüberleben (OS) (HR=1,86; 95% CI: 1,37 - 2,53). Nach dem ersten Therapiezyklus kam es bei 167 der 337 prätherapeutisch *HPPI*-positiven Patienten zur Reduktion von *HPPI* unter die Nachweisgrenze. Patienten mit negativem *HPPI*-Status in der BE2 hatten ein signifikant längeres OS im Vergleich zu Patienten mit weiterhin nachweisbarer *HPPI* mfcDNA ([neg,pos/pos] vs. [neg/neg] HR=2,60; 95% CI: 1,86 - 3,64; [pos/neg] vs. [neg/neg] HR=1,41; 95% CI: 1,00 - 2,01). Die ROC-Analyse zeigte, dass *HPPI* mfcDNA in der BE2 eine frühe Vorhersage des Ansprechens (und Nichtansprechens) auf die Therapie ermöglichte (AUC=0,77 für 12- und 0,71 für 24-Wo.-Staging). *HLTF* mfcDNA wurde in einer Subgruppe von 143 Patienten bestimmt und stellte in der BE2 neben *HPPI* mfcDNA einen unabhängigen Prognosefaktor des OS dar (HR=1,97; 95% CI: 1,07 - 3,65).

Die Detektion von methylierter *HPPI* fcDNA kann als ein prognostischer sowie früher Therapie-Response-Marker in der Kombinationschemotherapie mit Bevacizumab bei mKRK fungieren. Dies ist bereits nach 2 - 3 Wochen nach Therapiebeginn und somit deutlich vor dem radiologischem Staging (12. bzw. 24. Woche) möglich.

Eigene Publikation

Herbst A., **Vdovin N.**, Gacesa S., Philipp A., Nagel D., Holdt L.M., Op den Winkel M., Heinemann V., Stieber P., Graeven U., Reinacher-Schick A., Arnold D., Ricard I., Mansmann U., Hegewisch-Becker S., Kolligs F.T.

Methylated free-circulating HPPI DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer.

International Journal of Cancer, 2017 May 1; 140(9):2134-2144. doi: 10.1002/ijc.30625

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt die dritthäufigste Tumorerkrankung in Deutschland dar. Die Inzidenz nimmt mit dem Alter des Patienten stetig zu, das mittlere Erkrankungsalter beträgt 72 Jahre bei Männern und 75 Jahre bei Frauen, wobei ca. 90% der Erkrankten älter sind als 55 Jahre. In Anbetracht der immer älter werdenden Gesellschaft steigen somit die Anforderungen an das Gesundheitswesen des Landes. Laut der Prognose des Robert-Koch-Instituts werden im Jahr 2016 hier über 60.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Das macht im Schnitt über 150 neu gestellte Diagnosen täglich, wobei konsequenterweise jeder von diesen Patienten einer weiteren intensiven Diagnostik, Therapie und gegebenenfalls auch einer jahrelangen Nachsorge bedarf. Mehr als 25.000 Menschen versterben jährlich in der Bundesrepublik an den Folgen der Erkrankung [Robert-Koch-Institut, 2015]. Dies macht das kolorektale Karzinom zu einer der großen medizinischen, ökonomischen und gesellschaftlichen Herausforderungen unserer Zeit.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von KRK-Patienten hängt von dem Stadium der Erkrankung ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Frühstadium I bis zu 90% und im lokal fortgeschrittenen Stadium II und III bis zu 70%. Etwa 40% der Erkrankten werden im Frühstadium und 20-25% bereits im metastasierten Stadium diagnostiziert. Insgesamt ca. 50% aller Patienten entwickeln im Verlauf Metastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate des metastasierten KRK (mKRK) konnte in den letzten Jahrzehnten im Vergleich zu den 70-er Jahren des letzten Jahrhunderts zwar mehr als verdoppelt werden, bleibt aber weiterhin sehr niedrig und liegt unter 15% [Siegel et al., 2014, Van Cutsem et al., 2014]. Zwei Schlussfolgerungen können aus diesen Daten gezogen werden: Erstens, die Diagnose eines KRK sollte möglichst früh erfolgen, da dadurch die Prognose der Patienten drastisch verbessert werden kann. Zweitens, die Therapie vor allem des

metastasierten Stadiums bedarf dringend einer weiteren Erforschung und Optimierung. Biomarker könnten einen entscheidenden Beitrag zum Erreichen dieser beiden Ziele leisten, da sie sowohl in der Diagnostik, als auch in der Prädiktion und Beurteilung des Therapieansprechens ihren Einsatz finden könnten. Der aktuelle Stand, die Anwendung und der Nutzen von Biomarkern des KRK werden hier im Folgenden beleuchtet. Zunächst muss jedoch der molekulargenetische Hintergrund der Karzinogenese kurz erläutert werden, weil die Biomarker auf Basis von genetischen und epigenetischen Faktoren, wie Genmutationen oder DNA-Methylierung zunehmend an Bedeutung gewinnen.

In der Regel entwickelt sich der Darmkrebs über gutartige Vorstufen, die Adenome. Die Akkumulation genetischer Veränderungen, die Jahre bis Jahrzehnte in Anspruch nimmt, ist hierfür notwendig. Dieses Modell nennt man Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein [Fearon and Vogelstein, 1990]. In ca. 70% der Fälle folgt die Entwicklung des KRK dem Weg der chromosomalen Instabilität (CIN). Die Anzahl und die Reihenfolge der Mutationen können hier variieren. Man geht davon aus, dass das APC (*adenomatous polyposis coli*) Gen bereits sehr früh durch eine Mutation inaktiviert wird, deshalb wird es auch als Gatekeeper bezeichnet. Danach folgen häufig aktivierende Mutationen der Protoonkogene KRAS und BRAF, die im EGFR (*epidermal growth factor receptor*) -Signalweg eine wichtige Rolle spielen, gefolgt von Inaktivierung von DCC (*deleted in colorectal cancer*) und dem Tumorsuppressorgen p53 [Fearon and Vogelstein, 1990, Kinzler and Vogelstein, 1996]. Die anderen Fälle folgen überwiegend dem Weg der Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Hierbei kommt es zur Inaktivierung von DNA-Reparaturgenen, die zu einer Vielfalt nicht reparierter DNA-Veränderungen führt. MSI fungiert hier als Zeichen dieser Mutation und kann als Biomarker verwendet werden (s.u.). Als Gegensatz wird der Terminus „MSS“ – Mikrosatellitenstabilität verwendet. Die restlichen Fälle folgen dem dritten, seltenerem Weg - *CpG island methylator phenotype* (CIMP). DNA-Methylierung ist eine epigenetische Veränderung, die in die Steuerung der Genaktivität eingreift und somit unter anderem in der Karzinogenese eine Rolle spielt (s.u.) [Nazemalhosseini Mojarad et al., 2013].

Die im Prozess der Karzinogenese entstandenen genetischen und epigenetischen Veränderungen spielen zum einen selbst eine entscheidende Rolle in der malignen Entartung der Zelle, zum anderen kann ihre Detektion als Hinweis auf diesen Prozess fungieren und somit wichtige Informationen liefern. Solche Veränderungen können in Form von Biomarkern erfasst werden. Ihre wichtigsten Vertreter des KRK werden nun systematisch vorgestellt.

1.2 Tumormarker des KRK

1.2.1 Definition

Es existiert eine stetig wachsende heterogene Gruppe biologischer Moleküle, die im Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen und zu diagnostischen Zwecken verwendet werden. Diese werden im Allgemeinen als Biomarker oder in Verbindung bei Tumorerkrankungen als Tumormarker bezeichnet. Man verwendet hierbei je nach Zweck folgende Zusatzbezeichnungen:

- Diagnostische Marker dienen der Risikostratifizierung und Früherkennung
- Prognostische Marker ermöglichen die Einschätzung von Prognosen und beurteilen die Progression der Erkrankung
- Prädiktive Marker treffen eine Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens
- Response-Marker beurteilen das Therapieansprechen im Behandlungsverlauf
- Surveillance-Marker erlauben das Monitoring des Erkrankungsrezidivs

1.2.2 Gewebsbasierte Tumormarker

1.2.2.1 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mikrosatelliten sind repetitive nichtkodierende DNA-Sequenzen, die typischerweise aus 1 – 6 sich etwa 10 – 60 -mal wiederholenden Basenpaaren bestehen. Kommt es in einem solchen Segment zu einer Spontanmutation mit daraus folgender Basenfehlpaarung

zwischen den komplementären DNA-Strängen (engl. *mismatch*), so kann dies aufgrund des repetitiven Charakters der Mikrosatelliten-DNA zu einem Verrutschen eines der beiden DNA-Stränge während eines Replikationsvorganges führen (engl. *slippage*). Im gesunden Gewebe wird dies dadurch vermieden, dass die Basenfehlpaarung durch den Mismatch-Reparaturmechanismus erkannt und repariert wird. Kommt es zum Funktionsverlust der Mismatch-Reparatur-Gene (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2), führt *slippage* zur Bildung einer zufällig langen DNA-Schleife. Diese wird in der Regel herausgeschnitten und geht dabei verloren. Auf diese Weise entsteht eine willkürliche Vielfalt der Mikrosatellitenlängen, genannt auch Mikrosatelliteninstabilität (MSI) [Lin et al., 2015]. Als Gegensatz dazu verwendet man den Begriff Mikrosatellitenstabilität (MSS). MSI kann als das typische Kennzeichen des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC, Lynch-Syndrom) in etwa 90% der damit assoziierten Tumore nachgewiesen werden und stellt einen diagnostischen Marker dieser Erkrankung dar. Im sporadischen KKR sind etwa 15% aller Tumore MSI positiv, wobei in den meisten Fällen die Inaktivierung des Gens MLH1 durch Methylierung des Genpromoters dafür verantwortlich ist [Hampel et al., 2005]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die MSI-positiven Tumore eine 100 - bis 1000-fach höhere Mutationsrate aufweisen, als die MSI – negativen Tumore [Lin et al., 2015].

Es entsteht immer stärkere Evidenz bezüglich der prognostischen und der prädiktiven Rolle der MSI bei KKR. Eine große Metaanalyse mit insgesamt über 7600 Patienten zeigte die Assoziation der Mikrosatelliteninstabilität mit einem längeren Gesamtüberleben [Popat et al., 2005]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MSI mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Metastasen einhergeht [Gryfe et al., 2000]. Allerdings gibt es auch Hinweise für einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf: So besteht der Verdacht, dass MSI auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der metachronen kolorektalen Karzinome deuten könnte [Shitoh et al., 2002]. Aktuell ist der MSI-Nachweis noch nicht als prognostischer Marker in die klinische Routine integriert. Bei der Therapie des KKR scheint MSI einen prädiktiven Wert bezüglich des Chemotherapeutikums 5-FU (5-Fluorouracil) zu besitzen. Einigen Studien zufolge sprechen die Patienten mit MSS-KKR stärker auf die Therapie

mit diesem Medikament an als die mit MSI-KRK [Jover et al., 2009, Guastadisegni et al., 2010]. 5-FU ist ein Bestandteil mehrerer Therapieprotokolle, wie zum Beispiel FOLFOX oder FOLFIRI. Aktuell ist die prädiktive Rolle des MSI für die Kombinationstherapie nicht genau belegt und muss weiter untersucht werden [Neumann et al., 2015].

1.2.2.2 KRAS-Mutationsstatus

Das Gen KRAS (*V-Ki-ras2*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) kodiert das gleichnamige G-Protein (GTPase), welches für die Wachstumssignalweiterleitung von dem EGF-Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) zuständig ist. EGFR ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, der beim Menschen in allen Zellarten vorkommt und bei seiner Aktivierung von außen eine Stimulation des Zellwachstums bewirkt. Mutationen des KRAS-Gens können trotz Abwesenheit der auslösenden Wachstumsfaktoren zu einer Daueraktivierung des Signalweges führen und auf diese Weise zur malignen Entartung der Zelle beitragen [Jancik et al., 2010]. Neuere Antikörper-basierte Medikamente, wie die EGFR-Inhibitoren Cetuximab und Panitumumab setzen genau an dem beschriebenen Signalweg an, wobei es im Falle einer rezeptorunabhängigen, stromabwärts liegenden Daueraktivierung zu einer Wirkminderung dieser Wirkstoffe zu kommen scheint. Dies konnte durch multiple Studien bestätigt werden: Die KRK-Patienten mit KRAS-Wildtyp (physiologische Variante im Gesunden) profitierten deutlich von der Behandlung sowohl mit Cetuximab, als auch mit Panitumumab, während deren Einsatz bei den Tumoren mit Mutation im Exon 2 des KRAS-Gens zu keiner Verbesserung des Patientenüberlebens führte [Amado et al., 2008, Karapetis et al., 2008]. Später konnte nachgewiesen werden, dass auch andere Mutationen im KRAS-Gen (Exone 3 und 4) diese prädiktiven Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund wurden die beiden Medikamente von der europäischen Zulassungsbehörde (EMA - European Medicines Agency) nur für die Anwendung bei KRK-Patienten mit KRAS-Wildtyp zugelassen. Mutationen im KRAS-Protoonkogen finden sich bei etwa 45% aller KRK. Somit stellt der KRAS-Mutationsstatus einen prädiktiven Biomarker für die Therapie des KRK dar [Stintzing, 2014, Neumann et al., 2015].

1.2.2.3 BRAF

Die Serin/Threonin-Proteinkinase BRAF stellt eines der wichtigsten Effektorproteine von KRAS dar und wird durch dieses über eine Phosphorylierung aktiviert. Dies führt wiederum zur Zelldifferenzierung und Stimulation des Zellwachstums [Fukushima and Takenoshita, 2005]. Mutationen im BRAF-Gen können in ca. 15 % der KRK nachgewiesen werden, wobei es sich bei über 95% um die aktivierende V600E-Mutation handelt (Aminosäure Valin (V) an Position 600 wird in Glutaminsäure (E) umgewandelt) [De Roock et al., 2011]. Obwohl es zunächst vermutet wurde, dass es ähnlich wie der KRAS-Mutationsstatus eine prädiktive Funktion in der Therapie des KRK spielen könnte, ist dies aktuell noch nicht vollständig geklärt. Es scheint, dass der BRAF-Mutationsstatus eher einen prognostischen, als einen prädiktiven Marker darstellt [De Stefano and Carlomagno, 2014, Neumann et al., 2015]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Mutation des BRAF-Gens mit einer negativen Prognose einhergeht. Aber im Gegensatz zum BRAF-Wildtyp war diese von keiner prädiktiven Relevanz für die Therapie mit Cetuximab und Panitumumab [Bokemeyer et al., 2012, Douillard et al., 2013].

1.2.2.4 CIMP (CpG island Methylator Phenotype)

Als CIMP-positiv werden solche kolorektalen Tumore bezeichnet, die eine hohe Frequenz methylierter Gene aufweisen. CIMP steht für *CpG island Methylator Phenotype*. Es scheint ein wichtiges Ereignis der Tumorgenese zu sein, da es über die Methylierung des Genpromoters zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt [Toyota and Issa, 1999]. Insgesamt ist der positive CIMP-Status häufiger mit schlechter Differenzierung, fortgeschrittenem Stadium, Lage im proximalen Kolon und weiblichem Geschlecht assoziiert. Genetisch gesehen geht er mit MSI, BRAF-Mutation und seltenerer mit Mutation des Gens p53 einher [van Rijnsoever et al., 2002, Issa, 2008, Gonzalez-Pons and Cruz-Correa, 2015]. Bezüglich der prognostischen und der prädiktiven Aussagen des CIMP besteht eine widersprüchliche Datenlage, die möglicherweise auch durch das Fehlen der standardisierten CIMP definierenden Marker mitverursacht sein könnte. In Anbetracht der Tendenz zu einer individuelleren chemotherapeutischen Behandlung von

KRK könnte dieser Marker dennoch in Zukunft eine Rolle spielen. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet [Nazemalhosseini Mojarad et al., 2013, Gonzalez-Pons and Cruz-Correa, 2015].

1.2.3 Tumormarker im Blut

Der Nachweis von Biomarkern im Blut stellt eine minimalinvasive, diagnostische Methode dar, mit der man sich unter anderem über frei zirkulierende DNA oder frei zirkulierenden Zellen auf die genetische Information des Tumors zugreifen kann. Diese Diagnosemethode ist im Vergleich zu einer Biopsie mit so gut wie keinen Nebenwirkungen oder Risiken für den Patienten verbunden. Die Blutentnahme kann routinemäßig in einem ambulanten Setting praktisch beliebig häufig durchgeführt werden und die entnommenen Proben können in ein spezialisiertes Zentrum für die weiteren Analysen verschickt werden. Hingegen erfordern gewebsbasierte Tumormarker eine Biopsieentnahme, die mit gewissen Einschränkungen einhergeht: Dazu zählen zum einen das Komplikationsrisiko für Verletzungen von lebenswichtigen Strukturen bei komplexen anatomischen Verhältnissen und die Infektionsgefahr, zum anderen die Limitationen des Verfahrens bei mikroskopischen nicht punktierbaren Tumorresten nach Therapie, bei multiplen Tumorlokalisationen, sowie bei Tumorheterogenität innerhalb eines Herdes. All diese Einschränkungen gelten nicht für blutbasierte Tumormarker [Schlange and Pantel, 2016]. Dies macht diese Methode zu einer Informationsquelle mit großem Potential.

Eine Auswahl der wichtigsten blutbasierten Biomarker des KRK wird in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

1.2.3.1 CEA

Bei CEA (*carcinoembryonic antigen*) handelt es sich um ein komplexes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 - 200 kDa [Duffy, 2001]. Durch einen GPI-Anker ist

es in der Zellmembran befestigt und beteiligt sich unter anderem an der Zelladhäsion [Beauchemin and Arabzadeh, 2013]. Es gehört zur CEA-Genfamilie mit 29 Genen, welche wiederum der Immunglobulin-Superfamilie zugeschrieben wird [Duffy, 2001].

CEA wurde erstmals 1965 von Gold und Freedman beschrieben. Ursprünglich konnte es im fetalen Kolon und in Kolonadenokarzinomen, aber nicht im gesunden Kolongewebe des Erwachsenen nachgewiesen werden. Daher stammt auch seine Bezeichnung „*carcinoembryonic*“ [Gold and Freedman, 1965]. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass es auch im gesunden Gewebe gefunden werden kann, obgleich durchschnittlich in um den Faktor 60 niedrigeren Konzentrationen [Boucher et al., 1989]. Als nächster wichtiger Schritt in der Etablierung des CEA als Tumormarker gilt sein Nachweis im Serum. So berichtete Thomson et al. als einer der ersten über die erhöhte Konzentration von CEA im Serum der an kolorektalem Karzinom erkrankten Patienten und komplett fehlende Erhöhung des Markers bei Gesunden [Thomson et al., 1969].

Heutzutage, über 50 Jahre nach seiner Entdeckung, bleibt CEA nach wie vor der am meisten eingesetzte Tumormarker im Therapiemonitoring des kolorektalen Karzinoms. Es ist aktuell der einzige Tumormarker, dessen Verwendung von der European Group of Tumor Markers (EGTM) beim kolorektalen Karzinom empfohlen wird. Insbesondere gilt hierbei die Empfehlung für die postoperative Überwachung nach kurativer Resektion, aber auch, mit niedrigerer Evidenz, für Therapiemonitoring und Prognoseabschätzung [Duffy et al., 2014]. Eine ähnliche Empfehlung wird durch die deutsche S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ vom Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) ausgesprochen, wobei wiederum insbesondere seine Rolle für die Tumornachsorge betont wird [Leitlinienprogramm-Onkologie, 2014]. In Übereinstimmung stehen damit auch die Leitlinien von Organisationen wie der American Society of Clinical Oncology (ASCO), der National Comprehensive Cancer Network (NCCN) und der European Society for Medical Oncology (ESMO) [Lech et al., 2016].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der etablierte Tumormarker CEA bei allen Patientenproben mitbestimmt um einen Vergleich mit den hier vorgestellten Biomarkern *HLTF* und *HPP1* zu ermöglichen.

1.2.3.2 Weitere proteinbasierte Biomarker

Ein weiterer bekannter Tumormarker ist Cancer Antigen 19-9 (CA 19-9). Es handelt sich wie bei CEA um ein Glykoprotein. Seine Rolle in der Diagnostik des KRK wird noch diskutiert, allerdings besteht weitgehender Konsens, dass es dem CEA unterlegen ist [Carpelan-Holmstrom et al., 2004, Nicolini et al., 2010, Lumachi et al., 2012]. Dennoch ist CA 19-9 im Blut ein prognostischer Marker des KRK, wobei die Erhöhung mit einem schlechten Patienten-Outcome assoziiert ist [Lech et al., 2016].

Es existiert eine Reihe weiterer proteinbasierter (Cancer-)Antigene wie CA 195, CA 50, CA 72-4, CA 242, sowie CYFRA 21-1 (Cytokeratinfragment 21-1), die alle dem CEA unterlegen sind [Lech et al., 2016]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Analyse der Biomarker CEA, CA 19-9, CA 72-4, CA 242, CYFRA 21-1 im Blut eine etwas verbesserte diagnostische Treffsicherheit bei der Detektion des KRK mit sich bringt, als CEA allein [Lumachi et al., 2012].

Des Weiteren zeigte TIMP-1 (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*) vielversprechende Ergebnisse für die KRK-Detektion, er wies eine Sensitivität von 42-65% und eine Spezifität von 95% auf. Sein Stellenwert als Tumormarker muss jedoch noch in größeren prospektiven Studien geklärt werden [Holten-Andersen et al., 2002, Gonzalez-Pons and Cruz-Correa, 2015].

1.2.3.3 Frei im Blut zirkulierende DNA (fcDNA)

Die im Blutplasma oder -Serum nachweisbare DNA entsteht überwiegend beim Zelluntergang – der Apoptose und der Nekrose. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf eine aktive DNA-Freisetzung aus lebenden Zellen [Jahr et al., 2001]. Der Nachweis von frei zirkulierender DNA ist nicht spezifisch für eine maligne Erkrankung, auch bei entzündlichen oder autoimmunen Vorgängen können erhöhte Werte gemessen werden

[Swaminathan and Butt, 2006]. Für das kolorektale Karzinom konnte gezeigt werden, dass erkrankte Patienten eine erhöhte Konzentration von Plasma-DNA im Vergleich zu Gesunden aufwiesen, wobei diese nach Resektion des Tumors signifikant sank und im Falle eines Krankheitsrezidivs wieder anstieg [Frattini et al., 2006]. Doch nicht nur der bloße Nachweis der DNA im Blut, sondern auch die darin kodierte Information sind von besonderem Interesse – es existiert ein ganzes Spektrum an Analysen, die sich damit beschäftigen. So kann zum Beispiel die DNA-Integrität getestet werden, indem man die Längen der fcDNA-Fragmente untersucht. Man vermutet, dass bei malignen Prozessen insgesamt längere Sequenzen entstehen, die stärker in ihrer Länge variieren. Die Marker der oben beschriebenen Mikrosatelliteninstabilität können ebenso in der fcDNA nachgewiesen werden. Darüber hinaus lassen sich Punktmutationen bestimmter Gene detektieren, wobei hier der KRAS-Mutationsstatus aufgrund seines prädiktiven Wertes hinsichtlich der Therapieansprechen einen besonderen Stellenwert einnehmen könnte [Yörüker et al., 2016].

Ein weiterer interessanter Aspekt in der fcDNA-Analyse ist der Nachweis epigenetischer Veränderungen, wie zum Beispiel der Hypermethylierung. Es gibt eine ganze Reihe von Genen, deren Methylierungsstatus im Blut untersucht werden kann, wie *hMLH1* [Leung et al., 2005], *ALX4* [Tanzer et al., 2010], *SEPT9* [deVos et al., 2009], *NEUROG1* [Herbst et al., 2011], *HLTF* oder *HPP1* [Herbst and Kolligs, 2012]. Für den Biomarker *SEPT9* gibt es bereits ein kommerziell erhältliches Kit zum Nachweis von methylierter DNA dieses Genes (Epigenomics AG, Berlin). In den Vorarbeiten zu dieser Dissertation ergaben sich *HPP1* und *HLTF* mfcDNA als prognostisch relevant und konnten bei Patienten im UICC IV Stadium am häufigsten nachgewiesen werden. [Wallner et al., 2006, Herbst et al., 2009, Philipp et al., 2012, Philipp et al., 2014]. Diese zwei Marker werden nun ausführlich dargestellt.

1.2.4 HPP1

HPP1 (*hyperplastic polyposis 1*) wird auch als TMEFF2 (*transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2*) oder TPEF (*transmembrane protein*

containing epidermal growth factor and follistatin domain) bezeichnet. Die Expression dieses Gens kann regelhaft in gesunder Kolonmukosa nachgewiesen werden [Young et al., 2001]. Seine exakte Funktion ist bis jetzt nicht geklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es über die Aktivierung des STAT1 mitunter die Rolle eines Tumorsuppressors spielt [Elahi et al., 2008]. STAT1 ist Teil des Janus-Kinase/Stat1-Signalwegs und hat eine komplexe Funktion in der Tumorgenese: Einerseits besteht die Assoziation mit einer besseren Prognose bei seiner Expression in Zellen mancher Tumorarten, wie zum Beispiel dem kolorektalen, dem hepatozellulären und dem ösophagealen Karzinom. Andererseits ist bei einer hohen Expression die Prognoseverschlechterung beim Mammakarzinom beschrieben [Meissl et al., 2015].

Bei *HPPI*-Knock-Out-Mäusen konnte kein häufigeres Auftreten von Tumoren beobachtet werden [Chen et al., 2012]. Es konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung des Gens mit einer Verminderung der Expression einhergeht [Shibata et al., 2002]. Diese konnte wiederum sowohl in kolorektalen [Young et al., 2001, Ebert et al., 2005], als auch bei Magen-, Lungen- und Blasen-Karzinomen gehäuft nachgewiesen werden [Hellwinkel et al., 2008, Ivanauskas et al., 2008, Lee et al., 2012]. Insgesamt kann somit angenommen werden, dass sich das Gen *HPPI* über seinen Methylierungsstatus im Prozess der Karzinogenese indirekt beteiligen oder im Rahmen dieser einen Indikator der malignen Entartung darstellen könnte.

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte bereits gezeigt werden, dass der Nachweis hypermethylierter frei zirkulierender DNA des Gens *HPPI* im Blut einen prognostischen Faktor für Patienten mit kolorektalen Karzinomen darstellt [Wallner et al., 2006, Philipp et al., 2012, Philipp et al., 2014]. In dieser Arbeit wird die prognostische und die prädiktive Rolle der *HPPI* mfcDNA in einem großen Kollektiv von mKRK-Patienten in einem prospektiven Therapiesetting getestet, wobei hier zusätzlich auch die Veränderung dieses Markers im Therapieverlauf beurteilt wird.

1.2.5 *HLTF*

HLTF (*Helicase-like transcription factor*) stellt ein humanes Homolog von Rad5 von *Saccharomyces cerevisiae* dar und gehört zur SWI/SNF-Familie (*switch/sucrose nonfermentable*) der Chromatin-Remodeling-Faktoren. Das Gen ist 56.4 kb lang und befindet sich auf dem Chromosom 3q25.1-q26.1 [Debauve et al., 2008]. Das Protein *HLTF* zeigt eine ATP-abhängige, doppelsträngige DNA-Translokase-Aktivität. Kommt es während der Replikation zu Blockierung der Replikationsgabel, was aufgrund einer Läsion des Elternstranges auf der Leitstrangseite passieren kann, kann das Protein *HLTF* die Gabelbildung wieder rückgängig machen. Dann wird die notwendige Sequenz der beschädigten Eltern-DNA aus dem bereits synthetisierten Strang der komplementären Seite abgelesen und kopiert. Sobald die beschädigte Sequenz auf diese elegante Weise „übersprungen“ werden konnte, kommt es zur erneuten Replikationsgabelbildung und die DNA-Replikation kann wieder fortschreiten [Blastyak et al., 2010]. Darüber hinaus fungiert *HLTF* als Ubiquitin-Ligase und beteiligt sich an der Polyubiquitinierung von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem essentiellen Bestandteil des Replikationsvorganges, und spielt somit eine Rolle für die DNA-Schadenstoleranz der Zelle [Motegi et al., 2008, Unk et al., 2008, Krijger et al., 2011]. Ferner, basierend auf die Fähigkeit des Proteins spezifisch DNA zu binden, fungiert *HLTF* spezieübergreifend als Transkriptionsfaktor für eine ganze Reihe diverser Produkte [Dhont et al., 2015].

Es wird angenommen, dass *HLTF* der Entstehung von fehlerhaften DNA-Kopien und somit auch der Muto- und Kanzerogene entgegenwirkt und deshalb potentiell die Rolle eines Tumorsuppressors spielen könnte. Ähnlich wie bei *HPPI* führt die Methylierung des Genpromoters von *HLTF* zum loss-of-function-Zustand, was die Zellentartung begünstigen kann [Moinova et al., 2002]. Die Hypermethylierung des Gens konnte sowohl bei kolorektalem [Moinova et al., 2002, Bai et al., 2004, Kim et al., 2006], als auch bei Magen-, Ösophagus-, Lungen- und anderen Karzinomen detektiert werden [Hibi et al., 2003, Castro et al., 2010, Guo et al., 2011].

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte frei zirkulierende hypermethylierte *HLTF* DNA im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinomen nachgewiesen und als

prognostischer Faktor [Wallner et al., 2006, Philipp et al., 2012, Philipp et al., 2014] und Prädiktor für das Krankheitsrezidiv beschrieben werden [Herbst et al., 2009]. In dieser Arbeit wird die prognostische und die prädiktive Rolle der *HLTF* mfcDNA in einem großen Kollektiv von mKRK-Patienten, die mit einer Kombinationschemotherapie behandelt werden, getestet. Auch die Veränderung dieses Markers im Therapieverlauf soll beurteilt werden.

1.2.6 Einsatz in der Klinik

An dieser Stelle muss nun zunächst die UICC-TNM-Klassifikation erwähnt werden, auch wenn diese nicht zu den Tumormarkern gehört. Sie bildet die Basis für die Therapieentscheidung beim KRK und ist in der Klinik unentbehrlich. Diese Einteilung klassifiziert die Erkrankung hinsichtlich der Ausdehnung (Größe, Infiltrationstiefe) des Primärtumors (Tis-T4), des Lymphknotenbefalls (N0-N2) und des Vorhandenseins von Metastasen (M0-M1). Aus dieser Einteilung wird das UICC-Stadium ermittelt, welches für das therapeutische Vorgehen und die Abschätzung der Prognose herangezogen wird (UICC - *Union internationale contre le cancer*). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Patienten befanden sich alle im Stadium UICC IV – bei allen waren bereits Fernmetastasen nachweisbar (M1).

Ergänzend zur TNM-Klassifikation werden lediglich CEA und CA 19-9 als diagnostische, prognostische und Surveillance-Marker in der klinischen Routine eingesetzt. Als prädiktiver Marker findet der RAS-Mutationsstatus Verwendung. Der Vorhersagewert dieser Marker ist jedoch eingeschränkt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, in diesem Bereich weitere Biomarker zu erforschen und zu etablieren.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das kolorektale Karzinom ist mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Vor allem im metastasierten Stadium geht es mit einer ausgesprochen schlechten Prognose einher. Die Entwicklung neuerer Chemotherapeutika mit diversen molekularen Angriffspunkten führt zur Notwendigkeit der Therapiepersonalisierung. Jeder Tumor soll idealerweise an den Zellstrukturen oder über die biochemischen Vorgänge so spezifisch und effektiv wie möglich bekämpft werden. Die Biomarker könnten in Zukunft bei der Wahl sowie der Entwicklung von Therapiestrategien eine sehr wichtige Rolle spielen. Hier bietet sich unter anderem der Einsatz von blutbasierten Markern an, die eine minimalinvasive Methode zur Gewinnung von aus dem Tumor stammenden Biomolekülen darstellt. Obwohl seit seiner Entdeckung bereits über 50 Jahren vergangen sind, fand bisher nur CEA - als einziger blutbasierter etablierter Biomarker - Einzug in die klinische Routine.

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation hatten sich *HLTF* und *HPPI* mfcDNA als unabhängige prognostische Tumormarker des KRK erwiesen. Die Untersuchungen waren an kleineren Kollektiven, die alle Tumorstadien (UICC I bis IV) abdeckten, durchgeführt worden. Nun sollten diese beiden Tumormarker an einem großen Kollektiv bestehend aus 467 Patienten im UICC-Stadium IV in einer prospektiven Studie getestet werden. Bestimmt wurden die Werte vor Therapiebeginn, sowie vor dem zweiten Therapiezyklus (2–3 Wochen nach Therapiebeginn). Damit konnten sowohl die Ausgangswerte als auch die Veränderung der Marker im Therapieverlauf auf eine Aussage bezüglich Prognose und Therapieansprechen bzw. Nichtansprechen beurteilt werden. Zur besseren Einordnung der *HLTF* - und *HPPI* - Ergebnisse wurde in diesem Kollektiv außerdem CEA untersucht.

Somit erfolgte eine Evaluation von *HLTF* und *HPPI* mfcDNA, sowie deren Veränderung im Therapieverlauf als Marker der Prognose, der Prädiktion und der Response.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Den Ausgangspunkt dieser Dissertation bildet die klinische Studie AIO-KRK-0207. Es handelt sich hierbei um eine multizentrische, randomisierte, dreiarmlige Phase-III-Studie zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms im fortgeschrittenen Stadium UICC IV. Im Rahmen der Studie unterliefen die Patienten einer Induktionstherapie bestehend aus Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab nach den Protokollen FOLFOX und XELOX. Anschließend wurden die Patienten je nach Erkrankungsverlauf in mehrere Therapiearme randomisiert, um unterschiedliche Behandlungskonzepte zu vergleichen. (Näheres zum Studiendesign, wie Einschlusskriterien, genaue Chemotherapieschemata, etc., siehe [Hegewisch-Becker et al., 2015], sowie <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00973609>, Stand 01/2018). Für diese Dissertation ist der erste Teil der Studie, die Induktionstherapie, ausschlaggebend. Aus diesem Abschnitt stammen alle Patientenproben und Untersuchungsergebnisse (eine Übersicht ist in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt).

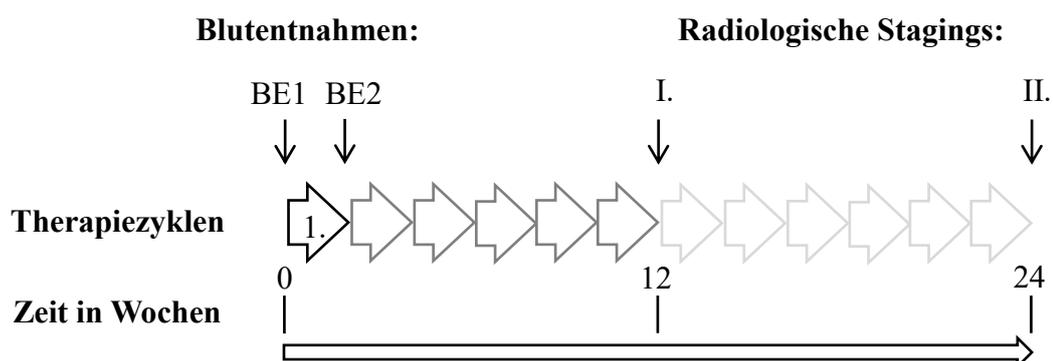


Abbildung 3.1: Zeitlicher Ablauf der Induktionstherapie und der relevanten Untersuchungen

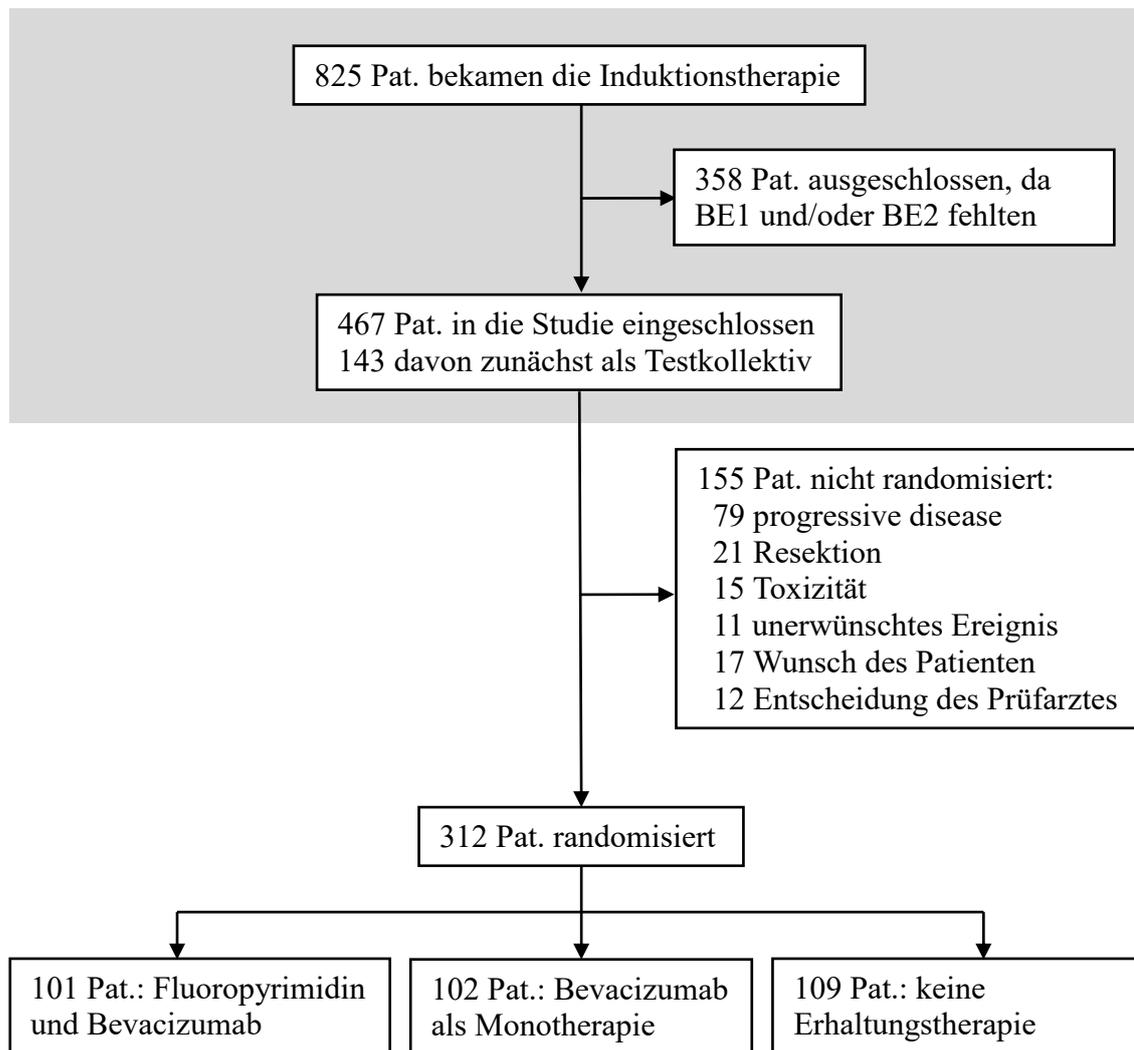


Abbildung 3.2: Übersicht Studienteilnehmer

Insgesamt 825 Patienten bekamen die Induktionstherapie, 467 davon hatten zwei Blutentnahmen BE1 und BE2, die im Rahmen dieser Dissertation von Interesse waren. Nur diese Patienten sind in die hier beschriebene Studie eingeschlossen worden. Nach der Induktionstherapie wurden in der Hauptstudie AIO-KRK-0207 unterschiedliche Typen von Erhaltungstherapie verglichen. Diese spätere Aufteilung hatte keinerlei Auswirkungen auf die hier vorgestellten Ergebnisse. Die Subgruppenanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede im Biomarkerverlauf bzw. in ihrer prognostischen Aussagekraft. Demzufolge wird hier auf den genaueren Ablauf nach der Induktionstherapie nicht weiter eingegangen.

Die Patientenkollektivcharakteristika sind zusammenfassend in Tabelle 3.1 dargestellt. Im unteren Drittel der Tabelle befindet sich eine RECIST-Einteilung der Patienten nach den zwei radiologischen Staging-Untersuchungen, die 12 beziehungsweise 24 Wochen nach Beginn der Induktionstherapie durchgeführt wurden. RECIST steht für Response Evaluation Criteria in Solid Tumors und beinhaltet Kriterien für die Bewertung des Therapieansprechens bei der Behandlung von soliden Tumoren. Es beinhaltet bestimmte Regeln, die die Bewertung des Behandlungserfolgs von Krebserkrankungen objektivieren sollen. Im Rahmen der Studie wurde die Version RECIST 1.0 verwendet [Therasse et al., 2000]. Nach dieser sind folgende Varianten des Therapieansprechens definiert:

- CR – *complete remission*: komplette Remission
- PR – *partial remission*: partielle Remission
- SD – *stable disease*: stabile Erkrankung
- PD – *progressive disease*: Progression der Erkrankung

Der Vorhersagewert dieses radiologisch gemessenen Therapieansprechens auf das Überleben der Patienten wird hier mitbeurteilt und mit dem der gemessenen Tumormarker verglichen. Der Kernpunkt dieser Arbeit liegt jedoch in der Messung und Analyse der potentiellen Tumormarker *HLTF* und *HPPI*, die im Blut bestimmt werden. Zu diesem Zweck dienten die zwei Blutproben, die bei jedem Patienten des hier beschriebenen Kollektivs direkt vor Therapiebeginn (BE1; Tag 1), sowie vor dem zweiten Therapiezyklus (BE2; je nach Chemotherapieschema: Tag 15 bei FOLFOX und Tag 22 bei XELOX) entnommen wurden. Somit konnten sowohl die Ausgangswerte der Tumormarker, als auch ihre Werte im Verlauf der Therapie erfasst und beurteilt werden. Insgesamt wurden 934 Blutproben von 467 Patienten analysiert.

Im Rahmen der Hauptstudie AIO-KRK-0207 wurde zudem der Mutationsstatus von *KRAS* und *BRAF* bestimmt. Die Gewebeproben wurden in den jeweiligen Zentren entnommen und anschließend im zentralen Labor analysiert (Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum).

Tabelle 3.1: Charakteristika Gesamtkollektiv

Alle Patienten	467 (100%)
Mittl. Alter (Min.-Max.)	63,6 Jahre (23-83)
Geschlecht	
männlich	299 (64,0%)
weiblich	168 (36,0%)
ECOG	
0	261 (55,9%)
1	168 (36,0%)
2	21 (4,5%)
unbekannt	17 (3,6%)
Primäre Lokalisation	
Kolon	296 (63,4%)
Rektum	169 (36,2%)
unbekannt	2 (0,4%)
Anzahl der Metastasierungsorte	
1	209 (44,8%)
2	161 (34,5%)
>2	94 (20,1%)
unbekannt	3 (0,6%)
Induktionstherapie*	
FOLFOX4	145 (31,0%)
FOLFOX4MOD	107 (22,9%)
FOLFOX4SIMPLE	46 (9,9%)
FOLFOX6	84 (18,0%)
FOLFOX7MOD	5 (1,1%)
XELOX	78 (16,7%)
unbekannt	2 (0,4%)
Radiologisches Staging (12 Wochen)	
CR	3 (0,6%)
PR	210 (45,0%)
SD	175 (37,5%)
PD	32 (6,9%)
NB**	47 (10,1%)
Radiologisches Staging (24 Wochen)	
CR	10 (2,1%)
PR	222 (47,5%)
SD	140 (30,0%)
PD***	79 (16,9%)
NB**	16 (3,4%)

* Alle Patienten erhielten zusätzlich Bevacizumab

** NB: nicht bestimmt

*** Für die Erstellung der ROC-Kurven wurden nur 49 der 79 PD-Patienten eingeschlossen, da nur diese explizit nach RECIST-1.0-Kriterien als solche eingestuft worden waren.

Tabelle 3.2: Charakteristika Testkollektiv

Alle Patienten	143 (100%)
Mittl. Alter (Min.-Max.)	64,6 Jahre (39-81)
Geschlecht	
männlich	93 (65,0%)
weiblich	50 (35,0%)
ECOG	
0	78 (54,5%)
1	53 (37,1%)
2	7 (4,9%)
Primäre Lokalisation	
Kolon	88 (61,5%)
Rektum	55 (38,5%)
unbekannt	2 (0,4%)
Anzahl der Metastasierungsorte	
1	60 (42,0%)
2	49 (34,2%)
>2	33 (23,1%)
unbekannt	1 (0,7%)
Radiologisches Staging (12 Wochen)	
CR	3 (2,1%)
PR	54 (37,8%)
SD	48 (33,6%)
PD	26 (18,2%)
NB	12 (8,4%)
Radiologisches Staging (24 Wochen)	
CR	8 (5,6%)
PR	42 (29,4%)
SD	45 (31,5%)
PD	47 (32,9%)
NB	1 (0,7%)

Zur Validierung der vorbeschriebenen Ergebnisse der Arbeitsgruppe [Wallner et al., 2006, Herbst et al., 2009, Philipp et al., 2012] erfolgte zunächst eine Analyse am Testkollektiv. Es wurde dabei eine informative Gruppe von 143 zufälligen Patienten aus dem hier vorgestellten Gesamtkollektiv so ausgewählt, dass sie zu diesem hinsichtlich des Alters, des Geschlechts, des ECOG-Wertes, der Anzahl der Metastasierungsorte und der Primärlokalisierung des Tumors homogen war. Patienten mit kompletter Remission, sowie mit Progression der Erkrankung wurden bevorzugt, um die möglichen Unterschiede im Biomarkerverlauf hervorheben zu können. Die Auswahl erfolgte verblindet zum Endpunkt Gesamtmortalität. Gemessen wurden die Biomarker CEA, *HPP1* und *HLTF*. Um Ressourcen zu sparen fiel aufgrund der Unterlegenheit von *HLTF* bezüglich des prognostischen Wertes im Vergleich zu *HPP1* die Entscheidung, sich bei den Messungen im Gesamtkollektiv auf *HPP1* und CEA zu beschränken. Die Charakteristika des Testkollektivs sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

3.2 Bearbeitung der Blutproben

Die oben beschriebenen Blutproben unterliefen einem Standardablauf: Die Blutentnahme erfolgte mittels Serum-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) beziehungsweise mittels EDTA-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Anschließend wurden diese ins zentrale Labor zur Weiterverarbeitung per Post verschickt. Dort wurden die Proben 10 Minuten bei 2000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. In Voruntersuchungen konnte die Stabilität der Proben für mfcDNA und CEA bei solchem Vorgehen sichergestellt werden. Die Seren wurden zur Bestimmung von CEA und die Plasmen zur Messung von mfcDNA verwendet.

3.3 DNA-Isolierung

Bevor die Analyse der freizirkulierenden DNA durchgeführt werden kann, muss diese zunächst aus den Proben isoliert werden. Hierzu diente das High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Eingefrorene Plasmaproben wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und mit leichtem Schnippen homogenisiert. Für die Isolierung benötigte man jeweils 200 μl einer Probe, diese konnte anschließend gemäß Protokoll des Herstellers bearbeitet werden. Der entscheidende Schritt dabei spielte sich ab an der Glasfasermatrix, die in einer speziellen Zentrifugationssäule angebracht ist (*Abbildung 3.3*). Nach einer weiteren Vorbereitung des Patientenplasmas wurde dieses in der Säule zentrifugiert, so dass die gesamte flüssige Probe die Matrix durchlief. Die darin enthaltene DNA band dabei selektiv an die Matrix und sonstige Plasmabestandteile konnten ungehindert passieren. Nach mehreren Waschschritten wurde die auf solche Weise aufgereinigte DNA schließlich mittels Elutionspuffer von der Matrix wieder gelöst und durch eine erneute Zentrifugation in einen frischen Behälter umgefüllt. Die Menge des Elutionspuffers betrug 50 μl .

Aufgrund der Größe des einzelnen Reaktionsansatzes und der praktischen Handhabung des Kits gelang die Bearbeitung von bis zu 24 Proben gleichzeitig. Anschließend konnten diese 50 μl DNA-Lösungen unmittelbar dem nächsten Verarbeitungsschritt - der Bisulfitkonvertierung - weitergeleitet werden.

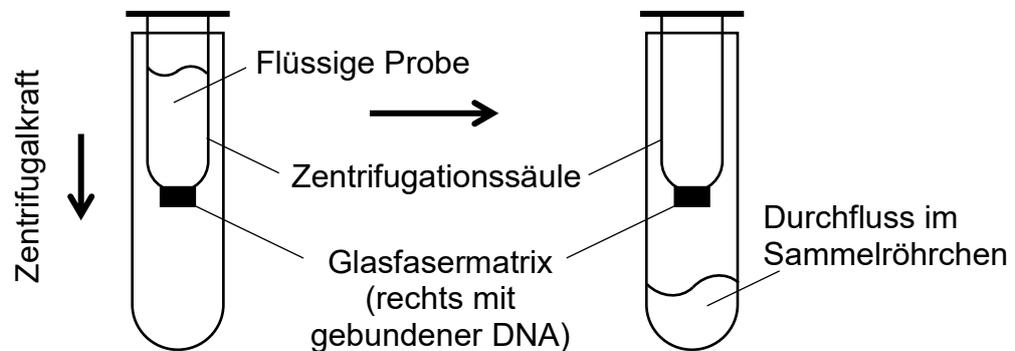


Abbildung 3.3: Funktionsprinzip der Zentrifugationssäule

3.4 Bisulfitkonvertierung

Menschliche DNA setzt sich aus Bausteinen, den Nukleotiden, zusammen. Jedes Nukleotid besteht aus einem Phosphat-Rest, Desoxyribose und einer der vier organischen Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, abgekürzt auch A, T, G und C). Um durch die Cytosin-Methylierung kodierte Information erfassen zu können, wird die DNA mittels eines speziellen Vorgangs – der Bisulfitkonvertierung – modifiziert. Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) bleiben hierbei komplett unverändert. Ebenso unverändert bleibt das methylierte Cytosin, da es durch die Methyl-Gruppe „geschützt“ wird und sich somit nicht an der chemischen Reaktion beteiligt. Das unmethylierte Cytosin (C) wird hingegen zu Uracil (U) umgewandelt [Frommer et al., 1992, Clark et al., 1994] (Abbildung 3.4).

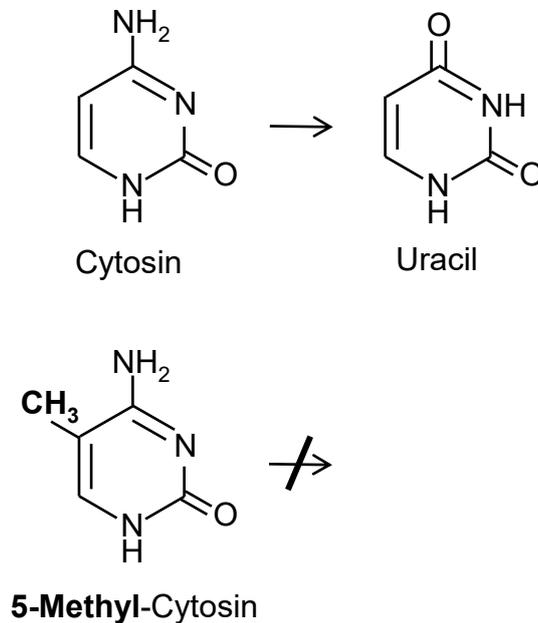


Abbildung 3.4: Umwandlung von Cytosin bei der Bisulfitkonvertierung

Während dieser Reaktion bindet Natriumbisulfit an eine Doppelbindung des unmethylierten Cytosins und es entsteht Cytosin-Sulfonat, welches über eine hydrolytische Desaminierung zu Uracil-Sulfonat wird. Anschließend wird die Sulfonat-Gruppe mit einer alkalischen Behandlung entfernt, es entsteht Uracil [Clark et al., 1994]. Während der als nächstes durchgeführten QPCR-Reaktion wird Uracil durch Thymin ersetzt. Diese Umwandlungen ist an einer Beispielsequenz in Abbildung 3.5 dargestellt. Die methylierten Cytosine (in der Abbildung unterstrichen) bleiben im gesamten Verlauf unverändert, bei den unmethylierten (grau dargestellt) kommt es jedoch während der Bisulfitbehandlung und PCR-Reaktion zur Entstehung mehrerer neuer Sequenzkombinationen. In der nachfolgenden QPCR-Analyse wurden auf diese Weise nur die methylierten DNA-Sequenzen nachgewiesen, da sie sich während der Verarbeitung nicht veränderten. Die genspezifischen Primer und Sonden konnten somit selektiv binden.

Die Bisulfitkonvertierung wurde mit dem EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Durchführung basiert hier auf dem Prinzip der Zentrifugationssäule, ähnlich wie bei der DNA-Isolierung. Man konnte die am Ende des vorherigen Schrittes entstandene aufgereinigte DNA unmittelbar zu dieser Behandlung weiterleiten und bis zu 24 Proben gleichzeitig bearbeiten.

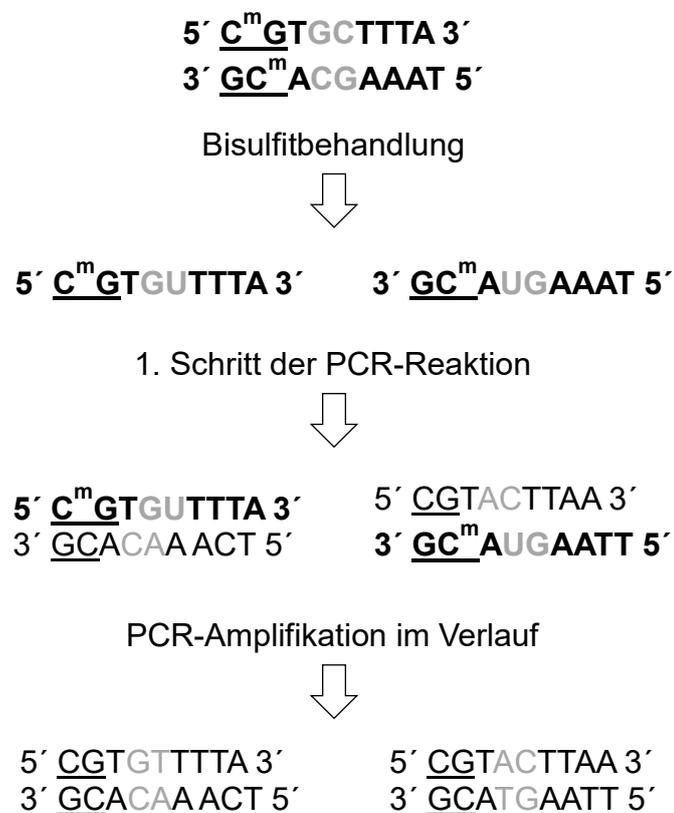


Abbildung 3.5: Umwandlung der DNA

3.5 Analyse der DNA-Methylierung

Nach der Bisulfitbehandlung wurde die DNA mittels fluoreszenzbasierter real-time PCR analysiert. Das zugrunde liegende Verfahren wurde erstmals von Eads et al als MethyLight [Eads et al., 2000] beschrieben. Das Prinzip beruht auf fluoreszenz-basierter quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mit dem Nachweis der Methylierung durch methylierungsspezifische Primer und Sonden der Zielgene *HLTF* und *HPPI* [Eads et al., 2000].

Die chemische Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3.3 beschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug dabei 20 μ l inklusive 2 μ l der zu analysierender DNA-Lösung.

Tabelle 3.3: Konzentration der Reagenzien für die qPCR (20 μ l - Ansatz)

Reagenz	Konzentration
PCR-Puffer ***	1x
MgCl ₂	4mM **
dNTPs	0,25 mM
Taq-Polymerase ***	0.05 units/ μ L

* PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)

** PCR-Puffer enthält bereits 1,5 mM MgCl₂

*** HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Die reaktionsspezifische Sonden und Primer und deren Konzentrationen können Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Reaktionsspezifische Sonden und Primer

Gen-ID	Primer/Sonde	Länge [bp]	Sequenz: Primer (5'-3') und Sonden (5' 6-FAM / 3' BHQ-1M'; 5'-3')	Konzentration [nmol/l]
<i>Alu</i>	Vorwärts-Primer	98	GGTTAGGTATAGTGGTTT ATATTTGTAATTTTAGTA	600
	Rückwärts-Primer		ATTA ACTAACTAATCTT AAACTCCTAACCTCA	600
	Sonde		CCTACCTTAACCTCCC	300
<i>HLTF</i>	Vorwärts-Primer	95	CGGCGTTCGGAATTTGTT	455
	Rückwärts-Primer		AAACGCCTCGACTCCCCT AA	455
	Sonde		AGGAGGCGTATCGAGGCG GTTCG	180
<i>HPP1</i>	Vorwärts-Primer	87	GTTATCGTCGTCGTTTTTG TTGTC	455
	Rückwärts-Primer		GACTTCCGAAAAACACAA AATCG	455
	Sonde		CCGAACAACGGACTACTA AACATC-CCGCG	250

Als Kontrolle für die DNA-Amplifikation wurde die Messung von methylierungsunabhängigen *Alu*-Sequenzen verwendet [Weisenberger et al., 2005]. *Alu*-Sequenzen gehören zu den short interspersed nucleotide elements (SINEs) und machen mit über 1 Million Kopien mehr als 10 % des menschlichen Genoms aus [Lander and al., 2001, Batzer and Deininger, 2002]. Die Menge an nachgewiesenen *Alu*-Sequenzen diente außerdem der Normalisierung auf die Menge der eingesetzten DNA [Weisenberger et al., 2005]. Für die Gene *HLTF* und *HPP1* wurde bei jeder Probe ein sogenannter PMR-Wert ermittelt. PMR steht für *percentage of fully methylated reference* und wird wie folgt berechnet: Gen-*Alu*-Verhältnis der Probe dividiert durch das Gen-*Alu*-Verhältnis der Positivkontrolle, multipliziert mit dem Faktor 100 [Eads et al., 2000, Philipp et al., 2012, Philipp et al., 2014]. Als Positivkontrolle diente hierbei bisulfitkonvertierte vollmethylierte DNA (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Millipore, Billerica, MA, USA). Diese bleibt während der Bisulfitbehandlung unverändert, da die Cytosin-Basen durch die Methyl-Gruppen vor Sulfonierung geschützt sind (s. S. 30). Die Proben mit PMR-Wert > 0 wurden als positiv und Proben mit PMR-Wert = 0 als negativ definiert.

Die Messungen wurden am Eppendorf Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach dem in Tabelle 3.5 aufgeführten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3.5: Protokoll der qPCR (20 µl-Ansatz)

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Aktivierung	95°C	900 s	1x
Denaturierung	95°C	30 s	} 50x
Amplifikation	60°C	120 s	
Messung der Fluoreszenz	84°C	20 s	
Abkühlung	25°C	60 s	1x

3.6 CEA-Messung

Die CEA-Messung erfolgte aus Serumproben mittels Mikropartikel-Enzymimmunoassay (AxSYM, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Um einen qualitativen Vergleich mit den Tumormarkern *HLTF* und *HPP1* zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse ebenfalls zusätzlich in zwei Qualitäten – „CEA hoch“ und „CEA niedrig“ (CEA-Konzentration größer oder kleiner als der Medianwert) – aufgeteilt.

3.7 Statistische Auswertung

Folgende Methoden wurden für die statistische Auswertungen verwendet: Kaplan-Meier-Überlebenskurven, Log-Rank Test, t-Test und Cox-Regressionsanalyse. Als Startpunkt für die Überlebensdauer wurde das Datum der ersten Blutprobenentnahme (BE1) definiert. Die statistischen Auswertungen im Gesamtkollektiv wurden ebenfalls für die unterschiedlichen Therapiearm-Subgruppen durchgeführt, wobei in diesem Fall sich keinerlei nennenswerte Unterschiede ergaben. Die berechneten multivariaten Cox-Regressionsmodelle wurden dabei mittels Akaikes Informationskriterium (engl. *Akaike information criterion*, AIC) verglichen. Ein Modell gilt als ein besseres im Vergleich zum anderen, wenn es einen kleineren AIC-Wert erreicht.

ROC-Kurven fanden Einsatz für die Analyse der Tumormarker und ihrer Änderung im Verlauf als Parameter für das radiologisch messbare Therapieansprechen. ROC steht für Receiver-Operating-Characteristic: diese Methode dient der graphischen Darstellung der Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) zur Falsch-Positiv-Rate ($1 - \text{Spezifität}$) für jeden möglichen Cut-Off-Wert eines Parameters. In der Regel führt eine Veränderung des Cut-Off-Wertes in Richtung der Verbesserung der Sensitivität zur Verschlechterung der Spezifität und umgekehrt. Die ROC-Kurve kann hierbei helfen, einen optimalen Wert für eine bestimmte Fragestellung zu finden. Im Allgemeinen kann der Nutzen eines solchen Parameters durch die Fläche unter der Kurve - AUC (engl. *area under the curve*) abgeschätzt werden. Diese kann alle Größen zwischen 0 und 1 einnehmen, wobei 0,5 den

schlechtesten Wert darstellt und je weiter der Wert von 0,5 entfernt ist, desto besser die Diskriminierungsfähigkeit des Parameters [Hajian-Tilaki, 2013].

Die statistischen Analysen wurden mittels folgender Software durchgeführt:

R: A language and environment for statistical computing [Version 2.13.2, 2011] mit den Paketen survival [Version 2.36-9, Terry Therneau, 2011] und ROCR [Version 1.0-4, Tobias Sing, Oliver Sander, Niko Beerenwinkel, Thomas Lengauer, 2009]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.r-project.org>.

SAS software for Windows [Version 9.4, 2013], SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, <http://www.sas.com>.

IBM SPSS Statistics, IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp., <https://www-01.ibm.com/software/de/analytics/spss/>

GraphPad Prism for Windows [Version 6.01, 21.09.2012], GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

4 Ergebnisse

4.1 Testkollektiv

In die AIO-KRK0207 Studie wurden 825 Patienten eingeschlossen, die man initial mit einer Induktionschemotherapie behandelte. Davon gab es 467 Patienten mit beiden benötigten Blutproben BE1 und BE2; Sie stellten das Gesamtkollektiv dar.

Aus den 467 Patienten erfolgte zur Hypothesenüberprüfung zunächst eine Auswahl von 143 zufälligen informativen Patienten - das Testkollektiv (Tabellen 3.1 und 3.2). Dieses wurde so ausgewählt, dass es keinen Unterschied hinsichtlich klinischer und demographischer Charakteristika zum Gesamtkollektiv bestand (Näheres s. Kap. 3.1 und Abbildung 3.2). Das Ziel dieser Untersuchung war die Bestätigung der bereits von der Arbeitsgruppe publizierten Forschungsergebnisse über die prognostische Aussagekraft der Biomarker *HPP1* und *HLTF* bei KRK. Im direkten Vergleich schnitt *HPP1* bezüglich der Häufigkeit des Nachweises, sowie des prognostischen Wertes deutlich besser ab als *HLTF*. Um Ressourcen zu sparen, fiel hiernach der Entschluss nur noch den Marker *HPP1* im Gesamtkollektiv zu untersuchen. Zunächst werden im Folgenden die Ergebnisse des Testkollektivs präsentiert.

4.1.1 *HPP1* und *HLTF* im Testkollektiv

Zunächst wurden die Messergebnisse für *HPP1* und *HLTF* der einzelnen Proben nach dem bereits vorbeschriebenen Prinzip (s. S. 33) in positive (Gen-Methylierung nachweisbar) und negative (Gen-Methylierung nicht nachweisbar) eingeteilt. Die Kaplan-Meier-Kurven der prätherapeutischen Blutproben (BE1) zeigten, dass der Nachweis der hypermethylierten freizirkulierenden DNA der Gene *HPP1* und *HLTF* mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert war (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2).

Abbildung 4.1 zeigt, dass Patienten mit prätherapeutisch nicht nachweisbarer *HPP1* mfcDNA im Schnitt deutlich länger lebten als Patienten mit nachweisbarer *HPP1* mfcDNA. Die mediane Überlebensdauer betrug 35,3 Monate für die BE1-neg.-Gruppe und 19,1 Monate für BE1-pos.-Gruppe ($p=0,0036$; $HR=2,43$ [95% CI: 1,31 - 4,51]).

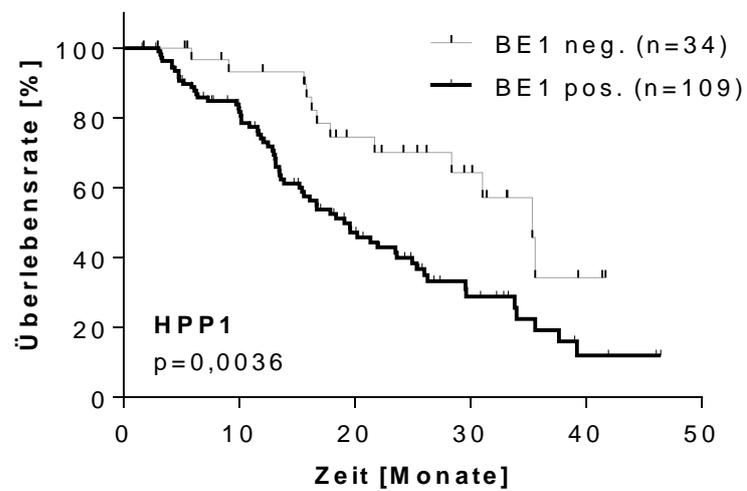


Abbildung 4.1: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HPP1-Methylierungsstatus in der Blutprobe BE1 im Testkollektiv

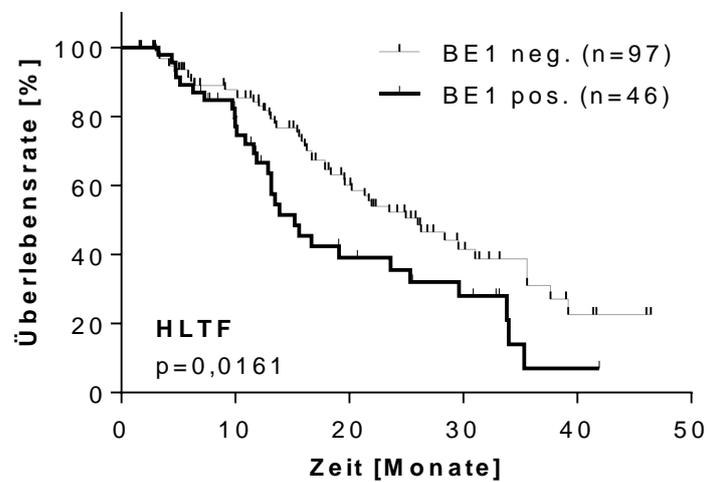


Abbildung 4.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HLTF-Methylierungsstatus in der Blutprobe BE1 im Testkollektiv

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei *HLTF* mfcDNA (Abbildung 4.2). Die mediane Überlebensdauer betrug bei den *HLTF*-negativen 26,0 Monate und bei den *HLTF*-positiven 15,2 Monate ($p=0,0161$; $HR=1,76$ [95% CI: 1,10 - 2,81]).

Kombiniert man nun zusätzlich zur BE1 die Daten der Blutentnahme BE2, so konnten die Patienten für den jeweiligen Marker in vier Verlaufsgruppen eingeteilt werden:

Tabelle 4.1: Aufteilung des Testkollektivs nach dem jeweiligen Markerverlauf

HPPI n (%)	BE2 neg.	BE2 pos.	HLTF n (%)	BE2 neg.	BE2 pos.
143 (100%)	75 (52%)	68 (48%)	143 (100%)	112 (78%)	31 (22%)
BE1 neg.	neg./neg.	neg./pos.	BE1 neg.	neg./neg.	neg./pos.
34 (24%)	34 (24%)	0 (0%)	97 (68%)	94 (66%)	3 (2%)
BE1 pos.	pos./neg.	pos./pos.	BE1 pos.	pos./neg.	pos./pos.
109 (76%)	41 (29%)	68 (47%)	46 (32%)	18 (12%)	28 (20%)



Die Gruppe *HLTF* neg./pos. mit drei Patienten und die Gruppe *HLTF* pos./pos. wurden jeweils zu einer Gruppe pos.neg./pos. zusammengefügt (*HPPI* neg./pos. beinhaltete keine Patienten). Somit ergaben sich folgende Gruppen zur Auswertung:

- **neg./neg.** (BE1 negativ, BE2 negativ): Marker blieb im Verlauf unterhalb der Nachweisgrenze
- **pos./neg.** (BE1 positiv, BE2 negativ): Marker war zunächst nachweisbar, sank aber im Verlauf unter die Nachweisgrenze
- **pos.neg./pos.** (BE1 positiv oder negativ, BE2 positiv): Marker bleibt oder wird positiv

Die Kaplan-Meier-Kurven dieser Gruppen für die beiden Marker *HPPI* und *HLTF* verändern sich im Vergleich zur BE1-Kurven wie folgt: die grau gedruckte Kurve, die für Patienten mit negativem Marker in der BE1 steht (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2) bleibt bei *HPPI* komplett und bei *HLTF* so gut wie unverändert (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Die schwarz gedruckte Kurve der Patienten mit positivem Marker in der BE1 teilt sich in zwei Kurven auf - die des sinkenden Markers (pos./neg.) und die des posttherapeutisch positiven Markers (neg.pos./pos.). Die Patienten mit im Verlauf der Therapie unter die Nachweisschwelle gesunkener *HPPI* mfcDNA zeigten ein deutlich längeres Gesamtüberleben, als die mit weiterhin nachweisbarer *HPPI* mfcDNA. So betrug die mediane Überlebensdauer der Patienten der Gruppe *HPPI* pos./neg. 29,6 Monate und war nicht signifikant unterschiedlich von der Gruppe *HPPI* neg./neg. mit 35,3 Monaten (Log-Rank: $p=0,603$). Die Gruppe *HPPI* pos./pos. war sowohl von der Gruppe *HPPI* neg./neg. als auch von der Gruppe *HPPI* pos./neg. signifikant unterschiedlich (Log-Rank: $p=0,000057$ und $p=0,00016$), ihre mediane Überlebensdauer betrug lediglich 13,4 Monate (HR=3,67 [95% CI: 1,93 - 6,96]).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch für *HLTF* mfcDNA. Mediane Überlebensdauer betrug 26,3 Monate für die Gruppe neg./neg. und 23,6 Monate für die Gruppe pos./neg. Diese Gruppen waren wie bei *HPPI* nicht signifikant unterschiedlich (Log-Rank $p=0,95$). Gruppe pos./pos. war signifikant unterschiedlich von den Gruppen neg./neg. und pos./neg. (Log-Rank: $p=0,000028$ und $p=0,0015$) und ihr medianes Überleben betrug 12,9 Monate (HR=3,17 [95% CI: 1,85 - 5,45]).

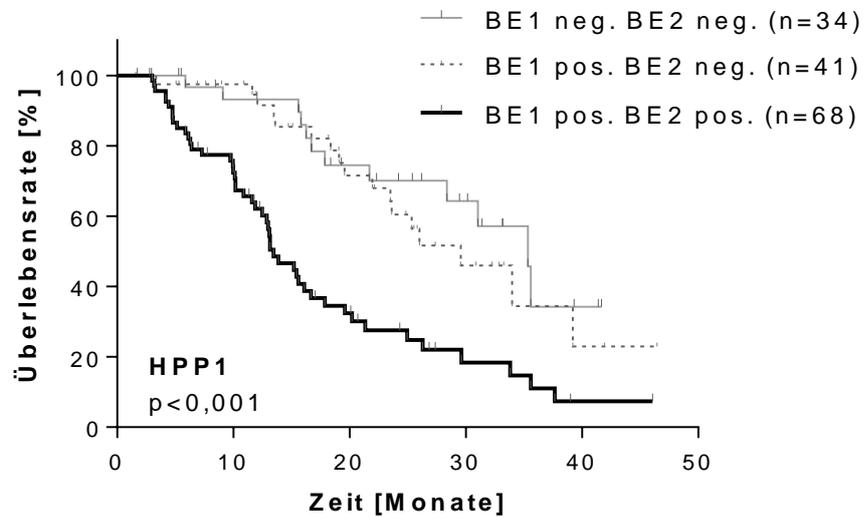


Abbildung 4.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HPP1-Methylierungsstatus und seinem Verlauf im Testkollektiv

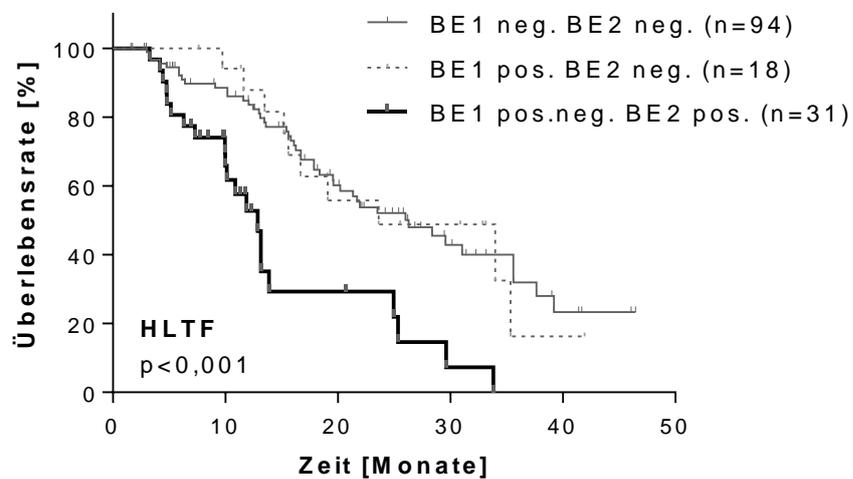


Abbildung 4.4: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HLTF-Methylierungsstatus und seinem Verlauf im Testkollektiv

4.1.2 Univariate Cox-Regressionsanalyse

Die Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse sind in Tabelle 4.2 dargestellt:

Tabelle 4.2: Univariate Analyse, Übersicht für medianes Gesamtüberleben (Med. OS mit CI - 95%-Konfidenzintervall) und Hazard Ratio (HR mit HRCI 95%-Konfidenzintervall), sowie die p-Werte im Testkollektiv

Parameter	Wert	Ereignisse/ Fälle	Med. OS [Monate]	CI	P	HR	HRCI
Geschlecht	Weibl.	30/50	19,1	9,2 - 29	0,2554		
	Männl.	46/93	23,5	14,7 - 32,3		0,76	0,48 - 1,21
Alter	<70	46/86	25	15,5 - 34,4	0,4931		
	>=70	30/57	19,6	15,9 - 23,3		1,18	0,74 - 1,87
ECOG	0	37/78	26	20,7 - 31,3	0,079		
	1+2	36/60	16,7	11,3 - 22,1		1,51	0,95 - 2,41
Primäre Lok.	Kolon	47/88	18,4	13,8 - 22,9	0,118		
	Rektum	29/55	29,6	24,4 - 34,7		0,689	0,43 - 1,10
Differenzierungsgrad	1+2	43/95	28,4	21,9 - 34,9	0,003		
	3+4	31/45	16,1	13 - 19,2		2,03	1,27 - 3,23
Anzahl der Metastasierungsorte	1	26/60	33,8	21,8 - 45,9	0,0296		
	>1	50/83	18,4	14,9 - 21,9		1,7	1,05 - 2,74
CEA BE1	ndr.	32/71	34	24,2 - 43,8	0,0011		
	hoch	44/72	17,9	13,6 - 22,2		2,21	1,37 - 3,56
CEA BE2	ndr.	35/77	31	22,2 - 39,9	<0,0001		
	hoch	41/66	16,7	11,3 - 22		2,398	1,50 - 3,84
HLTF BE1	neg.	47/97	26	19,1 - 32,9	0,0177		
	pos.	29/46	15,2	11,4 - 19		1,76	1,10 - 2,81
HLTF BE2	neg.	55/112	26	18,5 - 33,5	<0,0001		
	pos.	21/31	12,9	10,8 - 14,9		3,166	1,87 - 5,36

Parameter	Wert	Ereignisse/ Fälle	Med. OS [Monate]	CI	P	HR	HRCI
<i>HPP1</i> BE1	neg.	12/34	35,3	30 - 40,6	0,005		
	pos.	64/109	19,1	14,5 - 23,7		2,43	1,31 - 4,51
<i>HPP1</i> BE2	neg.	29/75	34	27,4 - 40,6	<0,0001		
	pos.	47/68	13,5	11 - 15,9		3,178	1,97 - 5,09
Rad. Staging 12 Wo.	CR+PR+SD	51/105	26,3	20,8 - 31,8	<0,0001		
	PD	21/26	10,1	3,8 - 16,5		6,08	3,47 - 10,64
Rad. Staging 24 Wo.	CR+PR+SD	43/95	29,6	22,3 - 36,9	<0,0001		
	PD	33/47	12,5	9,6 - 15,4		3,6	2,26 - 5,75
Mutation	wild type	22/44	26,3	19,5 - 33,1			
	NRAS/KRAS	35/63	19,1	10,5 - 27,7	0,442	0,73	0,32 - 1,64
	BRAF	8/15	22	4,9 - 39,1	0,737	0,88	0,32 - 1,90
CEA Verlauf	ndr/ndr	31/69	34,0	24,2 - 43,7			
	hoch/ndr	4/8	31,0	19,5 - 42,5	0,9026	1,07	0,37 - 3,05
	ndr.hoch/hoch	41/66	16,7	11,3 - 22	0,0004	2,42	1,48 - 3,94
<i>HLTF</i> Verlauf	neg/neg	45/94	26,3	18,8 - 33,8			
	pos/neg	10/18	23,6	7,6 - 39,7	0,9806	1,01	0,51 - 2
	pos.neg/pos	21/31	12,9	10,8 - 14,9	0,0001	3,17	1,85 - 5,45
<i>HPP1</i> Verlauf	neg/neg	12/34	35,3	30 - 40,6			
	pos/neg	17/41	29,6	21,7 - 37,4	0,4976	1,29	0,62 - 2,71
	pos. neg./pos.	47/68	13,5	11 - 15,9	0,0001	3,67	1,93 - 6,96

CEA-Werte wurden für die Analyse in zwei Qualitäten – „CEA hoch“ und „CEA niedrig“ (CEA-Konzentration größer oder kleiner als der Medianwert 43,3 ng/ml) – aufgeteilt. Ausführlich wird die prognostische Bedeutung dieses Markers im nächsten Kapitel „Analyse am Gesamtkollektiv“ besprochen.

Neben den klinischen Parametern wie dem Differenzierungsgrad und der Anzahl der Metastasierungsorte waren die Marker CEA, *HLTF* und *HPPI* sowie in der BE1 als auch in BE2 signifikante Prognosefaktoren in der univariaten Analyse (Tabelle 4.2). Beim Verlauf dieser drei Marker besaß jeweils nur die Gruppe pos.neg./pos. (ndr.hoch/hoch bei CEA) eine prognostische Signifikanz: Wie bereits bei den Kaplan-Meier-Kurven besprochen, hatten die Patienten mit gesunkenem Marker ein ähnlich langes Gesamtüberleben wie die Patienten mit seit Anfang an negativem Marker; die Patienten mit positiv gebliebenem bzw. gestiegenem Marker hatten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben als die anderen zwei Verlaufsgruppen. Die höchsten Hazard-Ratio-Werte hatten die beiden Staging-Untersuchungen: 6,08 (CI-95%: 3,47 - 10,64) für 12 Wochen und 3,60 (CI-95%: 2,26 - 5,75) für 24 Wochen. Die in der Bildgebung festgestellte Progression der Erkrankung (PD – „progressive disease“) hatte somit univariat den stärksten negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

4.1.3 Multivariate Analyse

Die Multivariate Analyse wurde an zwei separaten Modellen durchgeführt. In beide Modelle wurden die klinischen Parameter der univariaten Analyse eingeschlossen mit einem p kleiner gleich 0,10: Differenzierungsgrad, ECOG und die Anzahl der Metastasierungsorte. Da beim Markerverlauf nur jeweils die Gruppe pos. neg/neg (ndr/hoch/hoch) eine statistische Signifikanz in der univariaten Analyse besaß, wurden für die multivariate Analyse die Gruppen pos./neg. und neg./neg. zusammengelegt. Es entstanden somit die Gruppen pos. neg/pos und pos. neg/neg., die eigentlich den Gruppen BE2 neg und BE2 pos entsprechen. Es fiel die Entscheidung, die multivariate Analyse an zwei separaten Modellen durchzuführen: Modell T I – Zeitpunkt der ersten Blutabnahme und Modell T II – Zeitpunkt der zweiten Blutabnahme. Die Staging-Untersuchungen wurden bewusst nicht in diese Modelle aufgenommen, da diese erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurden und hier eine frühe prognostische Aussage der Marker getestet werden soll. Die Berechnungen beider Modelle wurden für Alter und Geschlecht adjustiert.

Modell T I:

Die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse des Modells I sind in Tabelle 4.3 dargestellt:

Tabelle 4.3: Multivariate Analyse für Gesamtmortalität im Testkollektiv (Modell T I)

Parameter	HR	95% HRCI	P-Wert
Differenzierungsgrad	2,64	1,59 - 4,37	0,0002
ECOG	1,90	1,16 - 3,1	0,0107
Anzahl der Metastasierungsorte	1,83	1,09 - 3,07	0,0213
CEA BE1 (Status)	2,24	1,28 - 3,93	0,0047
<i>HLTF</i> BE1 (Status)	1,23	0,73 - 2,05	0,4379
<i>HPPI</i> BE1 (Status)	2,01	1,01 - 4,01	0,0470

Zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme BE1 waren, neben den klinischen Parametern Differenzierungsgrad, ECOG und Anzahl der Metastasierungsorte, die Marker CEA und *HPPI* signifikante unabhängige Prognosefaktoren des Gesamtüberlebens ($p=0,0047$ und $p=0,0470$).

Modell T II

Die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse des Modells II sind in Tabelle 4.4 dargestellt:

Tabelle 4.4: Multivariate Analyse für Gesamtmortalität im Testkollektiv (Modell T II)

Parameter	HR	95% HRCI	P-Wert
Differenzierungsgrad	2,49	1,48 - 4,18	0,0006
ECOG	1,53	0,93 - 2,49	0,0926
Anzahl der Metastasierungsorte	2,57	1,5 - 4,42	0,0006
CEA BE2 (Status)	1,89	1,06 - 3,35	0,0299
<i>HLTF</i> BE2 (Status)	1,97	1,07 - 3,65	0,0307
<i>HPP1</i> BE2 (Status)	2,74	1,53 - 4,9	0,0007

Zum Zeitpunkt der Zweiten Blutabnahme BE2 waren, neben den klinischen Parametern, Differenzierungsgrad und Anzahl der Metastasierungsorte, die Marker CEA, *HPP1* und *HLTF* signifikante unabhängige Prognosefaktoren des Gesamtüberlebens (CEA: $p=0,0299$, *HLTF*: $p=0,0307$ und *HPP1*: $p=0,0007$).

4.1.4 *HPP1* und *HLTF* im Vergleich

Die Übersicht über den Methylierungsstatus aller analysierten Blutproben des Testkollektivs ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Es fällt hier auf, dass insgesamt wesentlich weniger Proben für *HLTF* mfcDNA positiv waren als für *HPP1* mfcDNA. Zudem erwiesen sich fast alle *HLTF* mfcDNA positiven Proben zusätzlich positiv für *HPP1* mfcDNA:

Tabelle 4.5: *HPP1*- vs. *HLTF* - Status im Vergleich

BE1 n (%)	<i>HLTF</i> pos.	<i>HLTF</i> neg.	BE2 n (%)	<i>HLTF</i> pos.	<i>HLTF</i> neg.
143 (100%)	46 (32%)	97 (68%)	143 (100%)	31 (22%)	121 (78%)
<i>HPP1</i> pos. 109 (76%)	43 (30%) (schraffiert)	66 (46%)	<i>HPP1</i> pos. 68 (48%)	28 (20%) (schraffiert)	40 (28%)
<i>HPP1</i> neg. 34 (24%)	3 (2%)	31 (22%)	<i>HPP1</i> neg. 75 (52%)	3 (2%)	72 (50%)

The figure consists of two horizontal stacked bar charts. The left chart represents the BE1 group. The total length of the bar is 143. The HPP1+ segment is 109 (76%), and the HPP1- segment is 34 (24%). Within the HPP1+ segment, the HLTF+ sub-segment is 43 (30%) and the HLTF- sub-segment is 66 (46%). Within the HPP1- segment, the HLTF+ sub-segment is 3 (2%) and the HLTF- sub-segment is 31 (22%). The right chart represents the BE2 group. The total length of the bar is 143. The HPP1+ segment is 68 (48%), and the HPP1- segment is 75 (52%). Within the HPP1+ segment, the HLTF+ sub-segment is 28 (20%) and the HLTF- sub-segment is 40 (28%). Within the HPP1- segment, the HLTF+ sub-segment is 3 (2%) and the HLTF- sub-segment is 72 (50%).

In der multivariaten Analyse des Modell T II stellten sich sowohl *HPP1* als auch *HLTF* als unabhängige Prognosefaktoren dar (Tabelle 4.4). Berechnet man nun Kaplan-Meier-Kurven für die 68 Patienten, die in der BE2 positiv für *HPP1* waren getrennt nach *HLTF*-Methylierungsstatus (Abbildung 4.5), so zeigt dies einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben: 16,1 Monate für *HLTF* neg. vs. 11,9 Monate für *HLTF* pos. (Log-Rank: $p=0,047$; HR=1,92 zu *HPP1* pos. *HLTF* neg.; CI-95%: 1,01-3,65). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit den Parametern aus dem Modell T II (Differenzierungsgrad, ECOG, Anzahl der Metastasierungsorte, CEA BE2 (Status) und [*HLTF* BE2pos und *HPP1* BE2pos]) errechnete sich für die 28 doppelpositiven Patienten im Testkollektiv das höchste Hazard Ratio von 3,45 (95% CI: 1,77-6,72; $p<0,0003$).

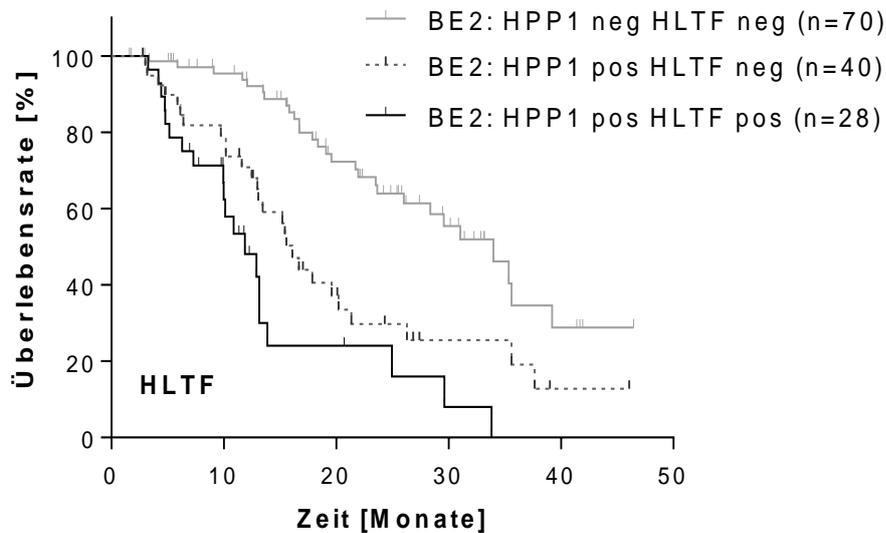


Abbildung 4.5: Kaplan-Meier-Analyse zum Gesamtüberleben bei *HPP1* positiven Patienten in der BE2 für *HLTF*-Status

Für BE1 lieferte die gleiche Kaplan-Meier-Analyse ein nicht signifikantes Ergebnis: $p=0,085$ nach Log-Rank.

Obgleich *HLTF* noch eine weitere Aufteilung im Gesamtüberleben zusätzlich zu *HPP1* ermöglicht, scheint *HPP1* dem Marker *HLTF* deutlich überlegen zu sein. Sowohl für BE1 als auch für BE2 war *HPP1* ein unabhängiger Prognosefaktor in der multivariaten Analyse. Zudem waren im Vergleich zu *HPP1* insgesamt deutlich weniger Patienten *HLTF*-positiv (BE1: 32% vs. 72%; BE2: 22% vs. 48%) und sie waren fast vollständig zusätzlich *HPP1*-positiv (BE1: 93%; BE2: 90%). Alles in Allem verdient *HLTF* eine weitere Untersuchung im Rahmen einer anderen Arbeit. Für diese Dissertation fiel die Entscheidung sich auf den mehr versprechenden Marker *HPP1* zu konzentrieren. Deshalb erfolgten im Gesamtkollektiv nur noch die Messungen dieses Markers.

4.2 Analyse am Gesamtkollektiv

Die zur Hypothesenüberprüfung durchgeführten Analysen am kleineren Testkollektiv aus 143 informativen Patienten dienten der Orientierung und führten zur Fokussierung der Arbeit auf *HPP1* mfcDNA. Nun wurden die Messungen auf das Gesamtkollektiv (n=467) erweitert.

4.2.1 Radiologisches Staging und sein prognostischer Wert

Im Laufe der Induktionstherapie wurden 12 bzw. 24 Wochen nach ihrem Beginn zwei radiologische Staging-Untersuchungen durchgeführt. Je nach Therapieansprechen erfolgte hier die Einteilung aller Patienten in vier Gruppen: Komplette Remission (CR), Partielle Remission (PR), Stabile Erkrankung (SD) und Progression (PD) (RECIST 1.0, siehe Material und Methoden). Wenn in der Staging-Untersuchung keine Zunahme des Tumolvolumens zu verzeichnen ist, kann dies als Therapieerfolg gedeutet werden. Solche Patienten wurden in die Gruppen CR, PR und SD eingeteilt. Ein Vergleich der Überlebenszeiten dieser Patienten mit der PD-Gruppe legte einen sehr hohen prognostischen Wert der radiologischen Staging-Untersuchung nahe. Die Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7 dargestellt. Im 12-Wochen-Staging lag das mediane Gesamtüberleben der CR/PR/SD-Patienten bei 28,3 Monaten versus lediglich 10,1 Monate bei der PD-Gruppe (Log-Rank: $p < 0,0001$; HR=6,91; 95%-CI 4,52-10,6). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei dem 24-Wochen-Staging: medianes Gesamtüberleben 30,1 versus 11,5 Monate (Log-Rank: $p < 0,0001$; HR=4,57; 95%-CI 3,38-6,18). Wegen der hohen prognostischen Bedeutung beim Patientenüberleben wurde eine solche Aufteilung in Therapie-Ansprecher und -Nichtansprecher für die Herstellung der ROC-Kurven verwendet.

Im zweiten radiologischen Staging ist im Vergleich zum ersten die Anzahl der PD-Patienten um mehr als das Doppelte angestiegen (79 vs. 32 Patienten). Somit stellte das spätere Staging scheinbar eine bessere Methode dar, um die Therapie-Nichtansprecher zu identifizieren als die frühere Untersuchung (Tabelle 3.1).

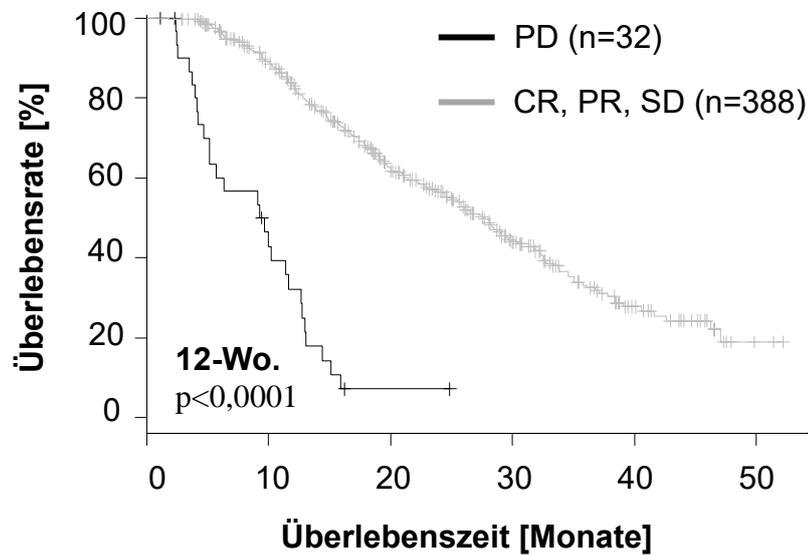


Abbildung 4.6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das 12-Wochen-Staging

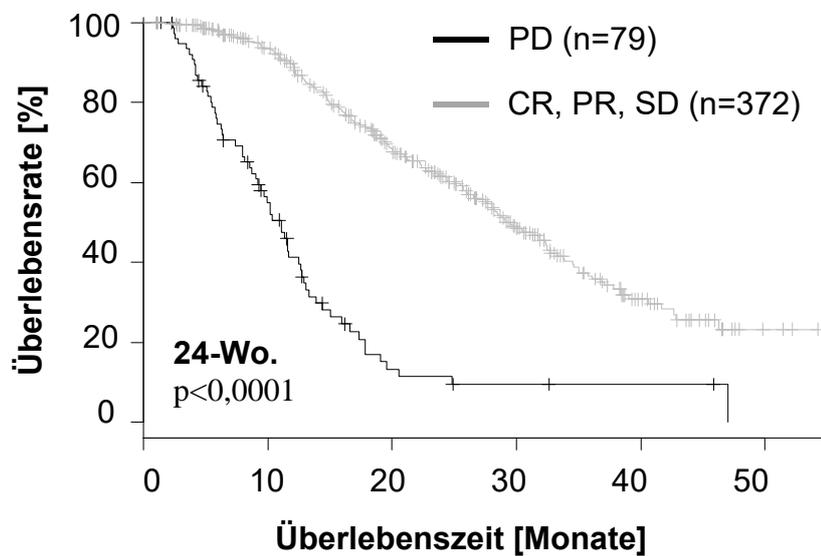


Abbildung 4.7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das 24-Wochen-Staging

4.2.2 Einfluss von *HPPI*-Methylierungsstatus und CEA auf das Gesamtüberleben

4.2.2.1 Übersicht und die univariate Analyse

Die Übersicht über den *HPPI*-Methylierungsstatus des Gesamtkollektivs ist in Tabelle 4.6 dargestellt. Zusammengefasst hatte ca. ein Drittel der Patienten einen durchgehend negativen *HPPI*-Methylierungsstatus, ein weiteres Drittel einen durchgehend positiven und ein Drittel wechselte den Methylierungsstatus von positiv auf negativ. Das Gesamtüberleben von den Patienten dieser Gruppen wird in diesem Abschnitt besprochen.

Tabelle 4.6: Übersicht *HPPI*-Methylierungsstatus und CEA-Einteilung

<i>HPPI</i> n (%)	BE2 neg.	BE2 pos.	CEA n (%)	BE2 niedrig	BE2 hoch
467 (100%)	291 (62%)	176 (38%)	467 (100%)	260 (56%)	207 (44%)
BE1 neg.	neg./neg.	neg./pos.	BE1 niedrig	ndr./ndr.	ndr./hoch
130 (28%)	124 (27%)	6 (1%)	233 (50%)	226 (48,5%)	7 (1,5%)
BE1 pos.	pos./neg.	pos./pos.	BE1 hoch	hoch/ndr.	hoch/hoch
337 (72%)	167 (36%)	170 (36%)	234 (50%)	34 (7%)	200 (43%)



337 von 467 Patienten (72%) hatten nachweisbare *HPPI* mfcDNA in der ersten Blutprobe BE1 vor dem Therapiebeginn. Das Gesamtüberleben dieser Patienten war signifikant kürzer im Vergleich zu den Patienten mit nicht nachweisbarer *HPPI* mfcDNA und betrug 21,9 Monate versus 35,2 Monate bei negativem Status (HR=1,86; 95%-CI 1,37-2,53) (Abbildung 4.8 A, Tabelle 4.7).

CEA ist ein etablierter und der wohl am meisten verwendete Tumormarker in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms. Aus diesem Grund erfolgte ebenso die Messung dieses Wertes bei allen Patientenproben, um einen Vergleich mit *HPP1* zu ermöglichen.

Ähnlich wie die Einteilung des *HPP1* in zwei Qualitäten (positiv und negativ) wurden für CEA die Patientenproben ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt. Als Cut-Off-Wert für die Aufteilung diente der Median von BE1, der 56,4 ng/ml betrug. Die Proben mit kleineren CEA-Konzentrationen als dieser Wert wurden als „CEA niedrig“ (abgekürzt ndr.), die mit gleichen oder größeren als „CEA hoch“ klassifiziert. In Tabelle 4.6 ist diese Aufteilung dargestellt.

Betrachten wir nun die prätherapeutischen CEA-Konzentrationen. Das Gesamtüberleben der 234 Patienten mit BE1 CEA hoch war signifikant kürzer im Vergleich zu den 233 Patienten mit BE1 CEA ndr. und betrug 33,4 Monate versus 19,7 Monate bei CEA ndr. (HR=1,82; 95%-CI 1,41-2,35). (Abbildung 4.8 B, Tabelle 4.7).

Als nächstes wurde die zweite Blutentnahme BE2 analysiert. Hier zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der BE1, jedoch lag das Hazard Ratio für *HPP1* höher als das von CEA. Medianes Gesamtüberleben für *HPP1* BE2 neg. lag bei 30,2 Monaten versus 16,6 Monate für *HPP1* BE2 pos. (HR=2,13; 95%-CI 1,65-2,74) (Abbildung 4.8 C, Tabelle 4.7). Medianes Gesamtüberleben für CEA BE2 ndr. lag bei 31,3 Monaten versus 19,5 Monate für CEA BE2 hoch (HR=1,75; 95%-CI 1,36-2,25) (Abbildung 4.8 D, Tabelle 4.7).

Die Aufteilung nach dem Typ des Markerverlaufs von *HPP1* mfcDNA stellte ähnliche Gruppen auf, wie bereits für das Testkollektiv beschrieben (S. Tabelle 4.6), wobei die Gruppe neg./pos. erneut für eine statistische Aussage zu klein ausfiel (n=6). Deshalb wird diese mit der Gruppe pos./pos. zusammengefasst. Gleiches gilt für CEA - hier fiel die Gruppe ndr./hoch sehr klein aus und wird entsprechend mit der Gruppe hoch/hoch zusammengefügt.

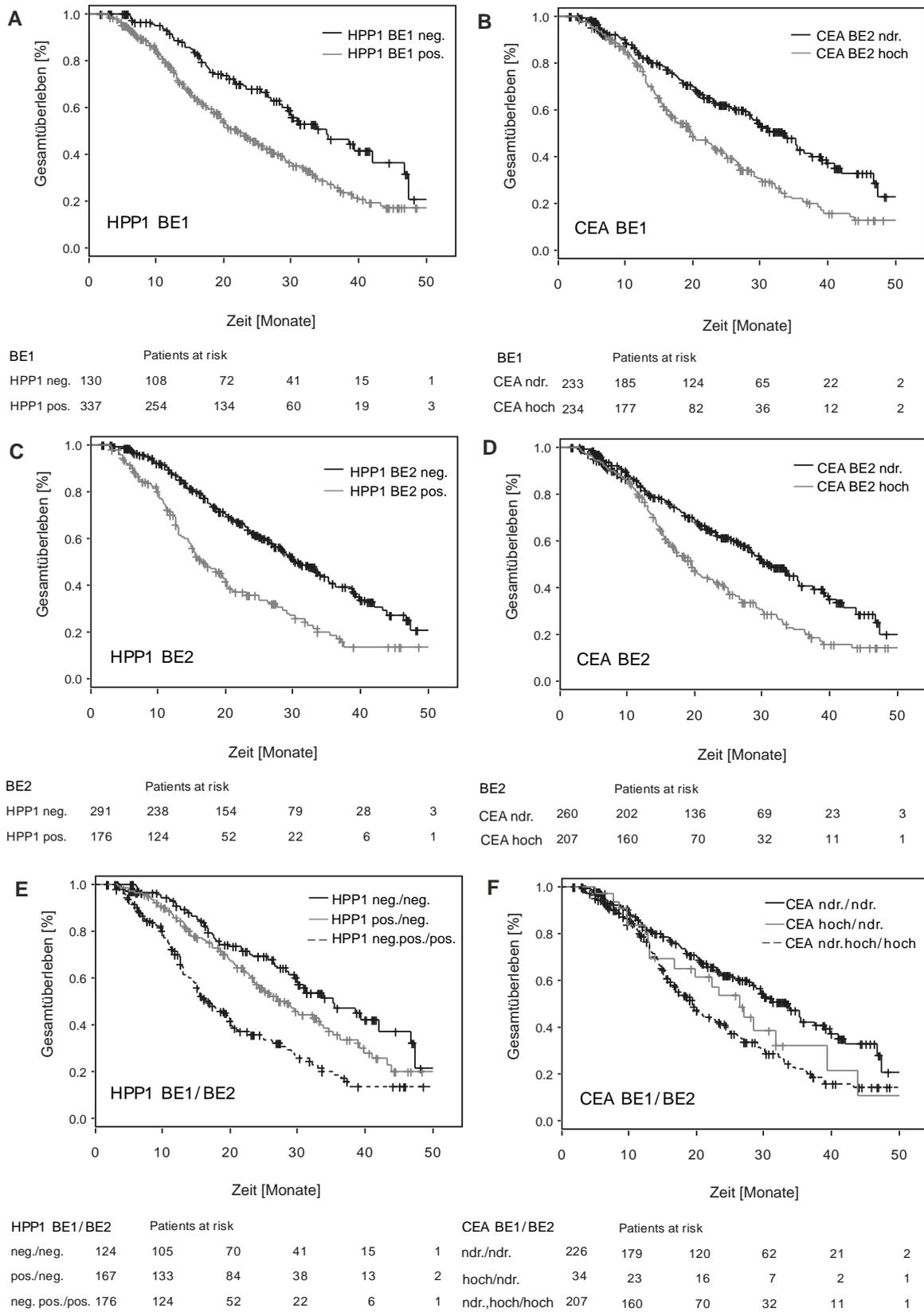


Abbildung 4.8: Gesamtüberleben HPP1 vs. CEA

Für *HPPI* ergaben sich folgende Überlebensdaten: Medianes Gesamtüberleben für die 123 Patienten der Gruppe neg./neg. 35,2 Monate, 167 Patienten der Gruppe pos./neg. 28,2 Monate (HR=1,41; 95%-CI 1,00-2,01, P=0,0507) und 176 Patienten der Gruppe neg.pos./pos. 16,6 Monate (HR=2,60; 95%-CI 1,86-3,64) (Abbildung 4.8 E, Tabelle 4.7). Zusammengefasst, die Patienten mit durchgehend negativem *HPPI*-Methylierungsstatus lebten im Durchschnitt signifikant länger als die mit prätherapeutisch positivem Status. Wechselte der Methylierungsstatus während der Induktionstherapie von positiv zu negativ, verbesserte sich die Lebenserwartung deutlich und war knapp nicht signifikant unterschiedlich von den neg./neg.-Patienten (95%-CI beinhaltete 1,00; P=0,0507). Die Patienten mit durchgehend positivem *HPPI*-Methylierungsstatus hatten im Schnitt signifikant das kürzeste Gesamtüberleben.

Betrachtet man nun den qualitativen Verlauf von CEA so fällt auf, dass es im Vergleich mit *HPPI* ein deutlich geringerer Wechsel zwischen den zwei Qualitäten „hoch“ und „niedrig“ stattfand; es gab nur 34 Patienten (7%) in der Gruppe hoch/ndr und 7 (1,5%) in der Gruppe ndr./hoch. Der CEA-Status der restlichen 91% Patienten blieb jedoch unverändert. Im Gegensatz dazu blieben bei *HPPI* nur 63% unverändert. Für CEA ergaben sich folgende Überlebensdaten: bei der Gruppe ndr./ndr. mit 226 Patienten betrug die mediane Überlebensdauer 33,4 Monate, bei der Gruppe hoch./ndr. mit 34 Patienten lag sie bei 26,5 Monaten (HR=1,44; 95%-CI 0,89-2,39) und bei der die Gruppe ndr.hoch./hoch. mit 207 Patienten betrug sie 19,5 Monate (HR=1,84; 95%-CI 1,41-2,40) (Abbildung 4.8 F, Tabelle 4.7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *HPPI* mfcDNA und CEA der BE1 und BE2 jeweils einen prognostischen Marker des Gesamtüberlebens darstellen. Der Statuswechsel von *HPPI* mfcDNA von BE1 zu BE2 kann zusätzlich auf ein Therapieansprechen hinweisen. Die Analysen wurden ebenso für die unterschiedlichen Subgruppen der jeweiligen Therapiearme der AIO-KRK-0207-Studie erweitert und wiesen dabei keinerlei signifikante Unterschiede auf. Die auf diese Gruppen stratifizierten Ergebnisse zeigten schließlich minimale, nicht nennenswerte Unterschiede zu den hier angegebenen HR-Werten.

Tabelle 4.7: Univariate Analyse: Übersicht medianes Gesamtüberleben (Med. OS mit CI - 95%-Konfidenzintervall) und Hazard Ratio (HR mit HRCI 95%-Konfidenzintervall), sowie die p-Werte im Gesamtkollektiv

Parameter	Wert	Ereignisse/ Fälle	Med. OS [Monate]	CI	P	HR	HRCI
Geschlecht	Weibl.	93/168	21.9	(17.9-28.3)	0.0657	.	
	Männl.	153/299	28.2	(23.4-32.9)		0.79	(0.61-1.02)
Alter	<70	166/310	27.0	(22.8-30.2)	0.9143	.	
	>=70	80/157	24.9	(20.5-30.3)		0.99	(0.75-1.29)
ECOG	0	127/258	29.5	(25.3-34.6)	0.0002	.	
	1+2	118/193	19.7	(16.7-26.7)		1.61	(1.25-2.07)
Primäre Lok.	Kolon	164/298	23.4	(20.7-27.0)	0.0564	.	
	Rektum	82/169	30.0	(26.5-35.2)		0.77	(0.59-1.01)
Differenzierungsgrad	1+2	141/312	30.2	(27.0-34.6)	<0.0001	.	
	3+4	81/124	16.7	(14.9-22.3)		2.02	(1.53-2.65)
Anzahl der Metastasierungsorte	1	90/198	29.5	(24.9-36.2)	0.0086	1.41	(1.09-1.84)
	>1	155/267	23.4	(19.5-28.2)		.	
Mutation	wild type	75/160	30.1	(26.2-38.5)	0.0001	.	
	NRAS/KRAS	115/205	24.2	(20.0-29.5)		1.33	(0.99-1.78)
	BRAF	20/ 33	10.7	(9.8- .)		2.84	(1.72-4.66)
HPP1 BE1	neg.	53/130	35.2	(29.5- .)	<0.0001	.	
	pos.	193/337	21.9	(19.5-25.9)		1.86	(1.37-2.53)
HPP1 BE2	neg.	134/291	30.2	(28.2-35.2)	<0.0001	.	
	pos.	112/176	16.6	(14.9-20.2)		2.13	(1.65-2.74)
HPP1 Verlauf	neg./neg.	51/124	35.2	(30.0- .)	<0.0001	.	
	pos./neg.	83/167	28.2	(23.9-33.9)		1.41	(1.00-2.01)
	neg.pos./pos.	112/176	16.6	(14.9-20.2)		2.60	(1.86-3.64)

Parameter	Wert	Ereignisse/ Fälle	Med. OS [Monate]	CI	P	HR	HRCI
CEA BE1	ndr.	102/233	33.4	(28.7-37.5)	<0.0001	.	
	hoch	144/234	19.7	(17.3-24.4)		1.82	(1.41-2.35)
CEA BE2	ndr.	117/260	31.3	(28.3-35.5)	<0.0001	.	
	hoch	129/207	19.5	(17.1-23.6)		1.75	(1.36-2.25)
CEA Verlauf	ndr./ndr.	98/226	33.4	(28.8-39.1)	<0.0001	.	
	hoch/ndr.	19/ 34	26.5	(19.7- .)		1.46	(0.89-2.39)
	ndr.hoch/hoch	129/207	19.5	(17.1-23.6)		1.84	(1.41-2.40)
Rad. Staging 12 Wo.	CR+PR+SD	199/388	28.3	(25.3-31.3)	<0.0001	.	
	PD	27/ 32	10.1	(6.1-13.4)		6.91	(4.52-10.6)
Rad. Staging 24 Wo.	CR+PR+SD	174/372	30.1	(28.2-33.7)	<0.0001	.	
	PD	61/ 79	11.5	(10.0-13.4)		4.57	(3.38-6.18)

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse waren *HPP1* BE1 pos., CEA BE1 hoch, *HPP1* BE2 pos. und CEA BE2 hoch sowie die Verlaufsgruppen *HPP1* neg.pos./pos. und CEA ndr.hoch/hoch signifikante negative Prognosefaktoren. Ebenso, wie bereits geschrieben, war es die PD-Gruppe in 12- bzw. 24-Monats-Staginguntersuchung. Hinzu kommen ECOG 1-2, Differenzierungsgrad G3-G4 Anzahl der Metastasierungsorte >1, sowie die BRAF-Mutation. NRAS/KRAS-Mutation, Geschlecht und die primäre Lokalisation sind knapp nicht statistisch signifikant für $p < 0,05$.

4.2.2.2 Multivariate Analyse

Für die Durchführung der multivariaten Analyse musste zuerst geklärt werden, welches Modell sich dafür am besten eignet. Zunächst wurden mehrere Modelle erstellt und mittels Akaike-Informationskriterium (Akaike information criterion – AIC) bewertet. AIC dient der Beurteilung der Güte eines statistischen Modells für einen gegebenen Datensatz. Über die Aufnahme folgender Faktoren musste entschieden werden:

- Der Mutationsstatus (NRAS/KRAS, BRAF), da er nur bei ca. 85% der Patienten (362 von 467) vorlag
- Klinische Parameter, die in der univariaten Analyse statistische Signifikanz aufwiesen, wie Differenzierungsgrad, ECOG und Anzahl der Metastasierungsorte
- Tumormarker welcher Blutproben und in welcher Kombination (BE1 und BE2 oder als Verlauf)

Tabelle 4.8: Berechnung von Akaike information criterion (AIC) für unterschiedliche Cox-Modelle (Mut.=Mutationsstatus NRAS/KRAS, BRAF)

Parameter	AIC mit Mut. (n = 362)	AIC ohne Mut. (n = 419)
Nur klinische Parameter („Klinik“)	1913	2246
Klinik + <i>HPP1</i> BE1 + CEA BE1 [<i>Modell G I</i>]	1902	2226
Klinik + <i>HPP1</i> BE1	1904	2233
Klinik + CEA BE1	1905	2232
Klinik + <i>HPP1</i> BE2 + CEA BE2 [<i>Modell G II</i>]	1891	2219
Klinik + <i>HPP1</i> BE2 [<i>Modell G III</i>]	1892	2223
Klinik + CEA BE2	1904	2234
Klinik + <i>HPP1</i> BE1-BE2 + CEA BE1-BE2	1891	2218
Klinik + <i>HPP1</i> BE1-BE2	1892	2220
Klinik + CEA BE1-BE2	1903	2232

Die entsprechenden AIC-Werte sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Kleinere AIC-Werte weisen auf ein besseres Modell hin. Den niedrigsten AIC-Wert – jeweils 1891 - weisen die Modelle „Klinik + *HPPI* BE2 + CEA BE2 + Mut.“ und „Klinik + *HPPI* BE1-BE2 + CEA BE1-BE2 + Mut.“ auf. Bedenkt man, dass nur die Patienten mit positivem (hohem) Tumormarker eine signifikante Verschlechterung des Gesamtüberlebens zeigten (pos./neg. vs. neg./neg. waren nicht signifikant unterschiedlich), liegt es nahe, die nicht signifikant unterschiedlichen Gruppen zusammenzulegen, was aber dazu führt, dass daraus die Gruppen zu BE2 pos. und BE2 neg. resultieren. Entsprechend gilt dies auch für CEA. Da die oben genannten Modelle gleiche AIC-Werte aufwiesen, fiel die Entscheidung zugunsten des weniger komplexen Modells „Klinik + *HPPI* BE2 + CEA BE2 + Mut.“, nachfolgend als Modell G II bezeichnet.

Obwohl das Modell „Klinik + *HPPI* BE1 + CEA BE1 + Mut.“ nicht den niedrigsten AIC-Wert insgesamt besetzte (1902), war ihr Wert aber der niedrigste für den Zeitpunkt der Blutentnahme BE1, also vor Beginn der Therapie. Deshalb soll dieses Modell, nachfolgend als Modell G I bezeichnet, hier ebenfalls vorgestellt werden.

Multivariates Modell G I:

In der multivariaten Analyse des Modells G I stellt *HPPI* mfcDNA neben CEA einen unabhängigen Prognosefaktor des Gesamtüberlebens dar, was erneut seinen Nutzen als prognostischer Tumormarker des metastasierten kolorektalen Karzinoms unterstreicht.

Die Hazard Ratio von *HPPI* mfcDNA beträgt 1,548 (CI-95%: 1,069 - 2,241; p=0,0207) und liegt höher als die von CEA – 1,376 (CI-95%: 1,011 - 1,873; p=0,0421). Darüber hinaus sind BRAF-Mutation, Differenzierungsgrad und ECOG unabhängige Prognosefaktoren des Modells G I (s. Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G I)

Parameter	HR	95% HRCI	P-Wert
Mutation: BRAF	2,620	1,573 - 4,363	0,0002
NRAS/KRAS	1,292	0,943 - 1,770	0,1106
Differenzierungsgrad	1,971	1,455 - 2,670	<,0001
ECOG	1,683	1,262 - 2,244	0,0004
Anzahl der Metastasierungsorte	1,282	0,947 - 1,736	0,1077
CEA BE1 (Status)	1,376	1,011 - 1,873	0,0421
<i>HPPI</i> BE1 (Status)	1,548	1,069 - 2,241	0,0207

Multivariates Modell G II:

Das multivariate Modell G II bezieht sich auf den Zeitpunkt der Blutentnahme BE2. *HPP1* mfcDNA stellt erneut einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Die Hazard Ratio liegt bei 1,892 (95%-CI: 1,382 - 2,592; $p < 0,0001$) und ist somit etwas höher als *HPP1* BE1 aus dem Modell G I. In Kontrast dazu ist CEA BE2 (knapp) statistisch nicht signifikant ($p = 0,0551$). Darüber hinaus sind BRAF, Differenzierungsgrad, ECOG, Anzahl der Metastasierungsorte unabhängige Prognosefaktoren des Gesamtüberlebens (s. Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G II)

Parameter	HR	95% HRCI	P-Wert
Mutation: BRAF	2,546	1,525 - 4,252	0,0004
NRAS/KRAS	1,305	0,954 - 1,786	0,0963
Differenzierungsgrad	1,893	1,393 - 2,571	<0,0001
ECOG	1,526	1,141 - 2,041	0,0044
Anzahl der Metastasierungsorte	1,420	1,051 - 1,919	0,0224
CEA BE2 (Status)	1,347	0,994 - 1,826	0,0551
<i>HPP1</i> BE2 (Status)	1,892	1,382 - 2,592	<0,0001

Multivariates Modell G III:

Da im Modell G II der CEA-Wert keine statistische Signifikanz hat, kann das dritte Modell ohne diesen Markers berechnet werden. Der AIC-Wert dieses Modells liegt bei 1892, also nur ein Punkt mehr als das Modell G II und ist somit als nahezu gleich gut zu werten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgelistet.

Tabelle 4.11: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G III)

Parameter	HR	95% HRCI	P-Wert
Mutation: BRAF	2,627	1,575 - 4,382	0,0002
NRAS/KRAS	1,312	0,959 - 1,795	0,0889
Differenzierungsgrad	1,851	1,364 - 2,512	<0,0001
ECOG	1,531	1,145 - 2,046	0,0041
Anzahl der Metastasierungsorte	1,424	1,054 - 1,922	0,0211
<i>HPPI</i> BE2 (Status)	2,079	1,542 - 2,803	<0,0001

Somit beträgt die Hazard Ratio von *HPPI* BE2 2,079 (95%-CI: 1,542 – 2,803, p<0,0001). Dieses Ergebnis wurde anschließend mittels Bootstrap-Analyse ausgewertet: die mittlere Hazard Ratio in 200 Bootstrap-Proben liegt für *HPPI* BE2 bei 2,16 (1.36 - 3.58, P<0,05 für 199/200 Proben).

4.2.3 *HPP1* mfcDNA als Marker des Therapieansprechens

Als nächster Schritt soll die quantitative Menge an *HPP1* mfcDNA – der PMR-Wert einzelner Proben als Marker des Therapieansprechens getestet werden. Zunächst werden die gemessenen *HPP1*-PMR-Werte und ihr Verlauf betrachtet. In Abbildung 4.9 ist eine Dotplot-Darstellung dieser Werte zu sehen; die einzelnen gemessenen PMR-Werte (logarithmisch) sind auf zwei Wolken entsprechend den zwei Blutentnahmen aufgeteilt. Es fällt hier auf, dass die Induktionschemotherapie insgesamt zu einem Abfall der *HPP1*-PMR-Werte führte: Sowohl die durchschnittliche Höhe des PMR-Wertes als auch der mediane Wert sanken beim Übergang von BE1 zu BE2.

Betrachtet man die Dot plot-Darstellung der CEA-Werte aufgeteilt nach den beiden Blutentnahmen, so fällt auf, dass die zwei Punktwolken eine sehr ähnliche Form besitzen. Die Änderung des Mittel- und des Medianwertes fällt deutlich kleiner aus als bei *HPP1* (Abbildung 4.10).

Der Abfall von *HPP1*-PMR während der Therapie kann möglicherweise als Hinweis auf deren Wirkung gegen die Erkrankung gedeutet werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Änderung des PMR-Wertes von *HPP1* mfcDNA nach dem ersten Therapiezyklus als Therapie-Response gedeutet werden kann. Diese Annahme wird bei der ROC-Analyse nochmals untermauert.

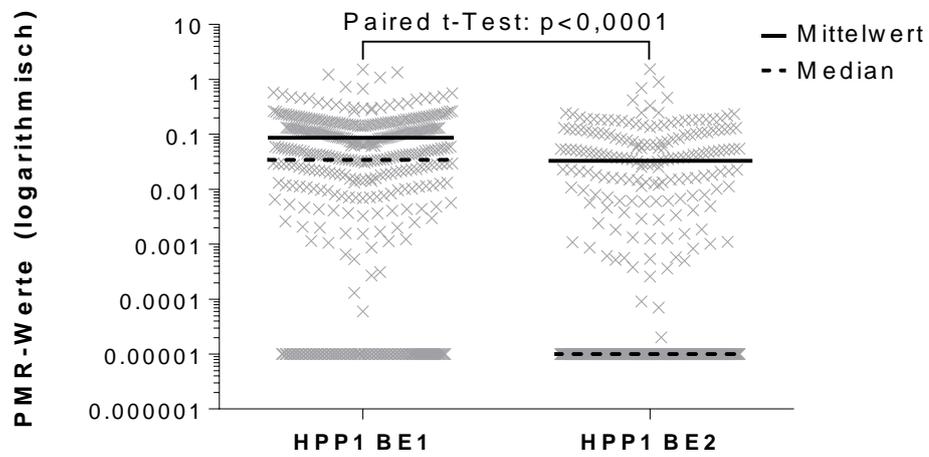


Abbildung 4.9: Dotplot der HPP1-PMR-Werte für die Blutproben BE1 und BE2

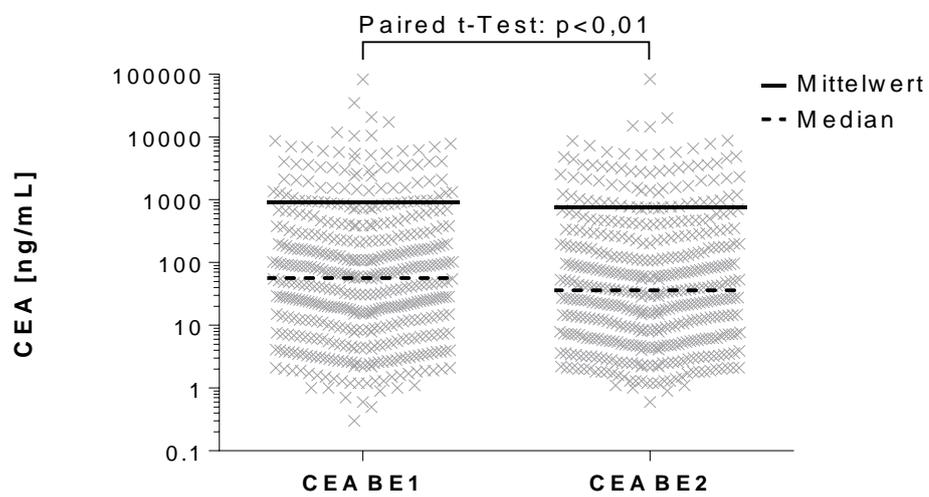


Abbildung 4.10: Dotplot der CEA -Werte für die Blutproben BE1 und BE2

Zur Erstellung von ROC-Kurven wurden die PMR-Werte von *HPPI* mfcDNA und die CEA-Konzentrationen sowie die Ergebnisse der radiologischen Staging-Untersuchungen verwendet. Solche Staging-Untersuchungen fanden 12 und 24 Wochen nach dem Beginn der Induktionschemotherapie statt, wobei die spätere der beiden Untersuchungen wesentlich mehr Patienten mit Progression der Erkrankung (progressive disease) identifizieren konnte. Wie bereits gezeigt (S. 50), führte die Progression zu einem drastischen Abfall des Gesamtüberlebens im Vergleich zu den restlichen Patienten. Die durchgeführte ROC-Analyse beschäftigte sich mit der Frage, ob dieser ungünstige Verlauf der Erkrankung durch die bereits nach einem Therapiezyklus, also am Tag 15 oder 22 (BE2), gemessenen Blutmarker *HPPI* und CEA vorhergesagt hätte werden können.

Die Abbildungen Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12 zeigen solche ROC-Kurven für die beiden Biomarker und jeweils beide Stagings. Die AUC (area under the curve) für *HPPI* liegt bei dem 12-Wochen-Staging bei 0,774 und bei dem 24-Wochen-Staging bei 0,713. Der negative prädiktive Wert beträgt bei dem 12-Wochen-Staging 97,7 (95.1-99.2) und 94.4 (90.9-96.8) bei dem 24-wöchigem. Damit stellt sich *HPPI* als ein durchaus brauchbarer Vorhersagefaktor des schlechten radiologischen Therapieansprechens dar. Im Gegensatz dazu liegen die beiden AUC-Werte des CEA entsprechend bei 0,492 und 0,522, weshalb sich CEA für solche Vorhersagen als nutzlos erweist.

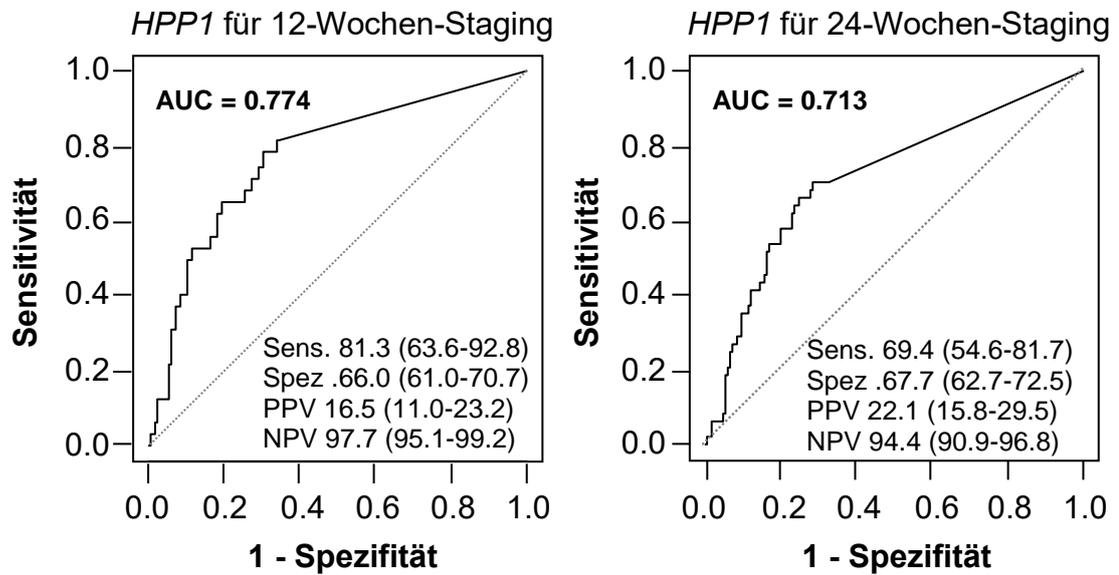


Abbildung 4.11: ROC-Kurven HPP1

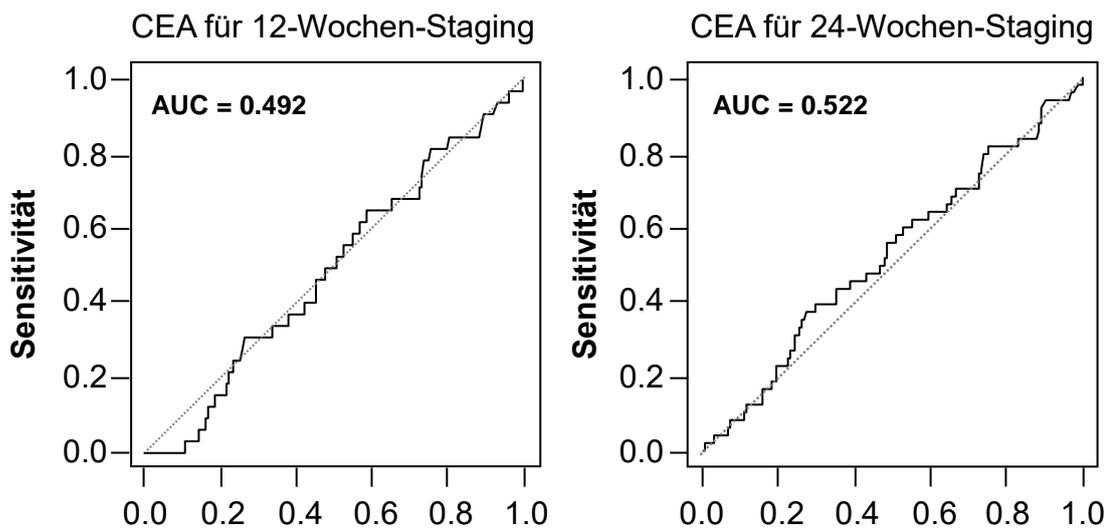


Abbildung 4.12: ROC-Kurven CEA

5 Diskussion

Tumormarker sind Informationsträger einer malignen Krebserkrankung und können nicht nur direkt am Ort der Organmanifestation, sondern auch in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die verschiedenen Markerklassen unterscheiden sich bezüglich Informationsgehalt und Aussagekraft. Aktuell sind auf Nukleinsäuren basierte Biomarker von großem Interesse. Sie enthalten genetische Information des Tumors und könnten zukünftig eine Schlüsselrolle in der Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapiesteuerung von malignen Tumoren einnehmen.

Die Detektion von frei zirkulierender DNA im Blut ist eine elegante Methode zur genetischen Darstellung des Tumors, die aufgrund ihres minimalinvasiven Charakters im Vergleich zu einer Biopsie komplikationslos und nahezu beliebig häufig während der Behandlung durchgeführt werden kann. Das fortgeschrittene Stadium einer Tumorerkrankung geht mit einer eingeschränkten Prognose einher, die im Falle des kolorektalen Karzinoms auch noch heutzutage ausgesprochen schlecht ist. Neue verlässliche Biomarker für die Beurteilung und Vorhersage des Therapieansprechens werden deshalb dringend benötigt. Die DNA-basierten Marker bieten sich für diese Rolle an: Im fortgeschrittenen Tumorstadium, wie zum Beispiel beim metastasierten kolorektalen Karzinom, liegt definitionsgemäß insgesamt eine höhere Tumormasse und somit auch höhere Mengen an malignen Zellen im menschlichen Organismus vor, als im Frühstadium. Zudem kommt es bei Tumorwachstum zu einer Vaskularisation des neu gebildeten Gewebes und damit erst zu einem Anschluss an das körpereigene Blutgefäßsystem. Dies könnte begründen, warum die Analyse der fcDNA im Patientenblut besonders im fortgeschrittenen Stadium einer malignen Erkrankung besonders wertvolle Information über den Tumor liefern kann. So konnte auch in Vorarbeiten zu dieser Dissertation gezeigt werden, dass *HPPI* und *HLTF* mfcDNA häufiger bei diesen Patienten detektiert wird, als bei Patienten in früheren Erkrankungsstadien [Wallner et al., 2006, Herbst et al., 2011]. Dies gilt jedoch nicht für

jeden DNA-basierten Marker: Die Detektion von *NEUROG1* korrelierte nicht mit dem Erkrankungsstadium und stellte einen potentiellen Screening-Marker des KRK dar [Herbst et al., 2011, Philipp et al., 2014]. Dies suggeriert einen anderen Weg seiner Freisetzung als der Zellzerfall, der im fortgeschrittenen Stadium zunimmt. Im Allgemeinen ist der genaue Mechanismus, durch den Tumor-DNA ins Blut gelangt, noch nicht vollständig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass die Freisetzung überwiegend infolge des Zelluntergangs, wie Apoptose und Nekrose stattfindet [Jahr et al., 2001]. Ferner können als eine weitere DNA-Quelle die im Serum nachweisbaren Exosomen (50-150 nm große Vesikel, die an der Zellkommunikation beteiligt sind) dienen und bei ihrer Freisetzung aus Tumorzellen wichtige Informationen liefern [Kahlert et al., 2014]. Darüber hinaus können im Blut auch zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden, die wichtige Informationen liefern und als Quelle für verschiedene Biomarker, wie eben die Tumor-DNA, fungieren [Barbazan et al., 2014].

Für gynäkologische maligne Tumorerkrankungen existieren Nachweise, dass frei zirkulierende DNA für die Beurteilung des Therapieansprechens während der Behandlung herangezogen werden kann [Dawson et al., 2013, Murtaza et al., 2013]. Auch für methylierte fcDNA gibt es mehrere Studien, die ihren potenziellen Nutzen als Biomarker für die Chemotherapie belegen, allerdings nicht für das kolorektale Karzinom. So konnte zum Beispiel für das metastasierte Prostatakarzinom gezeigt werden, dass methylierte DNA des Gens Glutathione S-transferase 1 (*mGSTP1* DNA) als potentieller prognostischer und response-Marker in der chemotherapeutischen Behandlung dient [Mahon et al., 2014].

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde in retrospektiven Studien gezeigt, dass die Detektion von frei zirkulierender *HPPI* und *HLTF* mfcDNA einen prognostischen Marker für Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium IV darstellt [Wallner et al., 2006, Herbst et al., 2009, Philipp et al., 2012, Philipp et al., 2014]. Die Ergebnisse der hier beschriebenen prospektiven Studie, die an einem deutlich größeren Patientenkollektiv mit mKRK durchgeführt wurde, konnten dies bestätigen: Die

Detektion von *HPPI* mfcDNA war ein unabhängiger prognostischer Marker für ein kürzeres Gesamtüberleben. Darüber hinaus korrelierte die Reduktion der *HPPI* mfcDNA unter die Nachweisgrenze während der Induktionstherapie mit einem besseren Outcome im Gegensatz zu den Patienten mit weiterhin nachweisbarer *HPPI* mfcDNA. Des Weiteren konnte man anhand der quantitativen Menge der mfcDNA zwei beziehungsweise drei Wochen nach Therapiebeginn eine Vorhersage bezüglich des Erkrankungsverlaufs treffen. Hiermit war eine Differenzierung zwischen progressivem Krankheitsverlauf auf der einen und Therapieansprechen, beziehungsweise stabilem Verlauf, auf der anderen Seite möglich.

In Übereinstimmung mit Vorarbeiten gab es im Vergleich zu *HPPI* mfcDNA deutlich weniger Patientenproben mit detektierbarer *HLTF* mfcDNA [Wallner et al., 2006, Philipp et al., 2012]. Im kleineren Testkollektiv korrelierte der Nachweis von *HLTF* mfcDNA in der zweiten Blutprobe mit einem schlechteren Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse, was in Verbindung mit *HPPI* mfcDNA eine Identifizierung von Patienten mit besonders schlechter Prognose ermöglichte. Aufgrund der Überlegenheit von *HPPI* fiel jedoch die Entscheidung, sich im Rahmen dieser Arbeit auf diesen deutlich mehr versprechenden Marker zu konzentrieren. So wurde *HLTF* mfcDNA im Gesamtkollektiv nicht mehr mitgemessen. Nichtsdestotrotz stellt *HLTF* mfcDNA einen interessanten Biomarker des kolorektalen Karzinoms dar und bedarf weiterer Erforschung.

CEA ist ein etablierter prognostischer Tumormarker des KRK und wird in der klinischen Routine eingesetzt. In dieser Studie konnte der prognostische Wert dieses Markers bestätigt werden. Allerdings stellte sich *HPPI* mfcDNA, im Gegensatz zu CEA, zusätzlich als ein response-Marker in der Therapie des KRK heraus. Während CEA keine Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens treffen konnte, bot *HPPI* die Möglichkeit Patienten, die von der Chemotherapie profitieren, zu identifizieren. Zudem konnten auch die Patienten ermittelt werden, die nicht auf die Therapie ansprechen. Dies könnte dafür genutzt werden bei jenen Patienten das Therapiekonzept zu überdenken: In Frage kämen hierbei zum Beispiel ein Wechsel beziehungsweise eine Intensivierung des

Chemotherapieschemas oder eine erneute Evaluation eines symptomorientierten, palliativen Ansatzes mit maximaler Lebensqualität und verringerten Nebenwirkungen. Diese mögliche klinische Konsequenz in der Therapie von metastasiertem kolorektalem Karzinom ist der entscheidende Vorteil von HPP1 gegenüber CEA.

Als Standarddiagnostikverfahren führte man im Rahmen dieser Studie 12 und 24 Wochen nach Beginn der Induktionstherapie radiologische Staging-Untersuchungen durch, um die Wirksamkeit der Behandlung zu beurteilen. Betrachtet man die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen, fällt auf, dass die Anzahl der PD-Patienten im zweiten Staging im Vergleich zum ersten ansteigt und die der SD-Patienten abfällt. Dies deutet daraufhin, dass die radiologische Staging-Untersuchung nach 12 Wochen noch nicht alle Patienten mit Progression der Erkrankung aus dem 24-Wochen-Staging erfasst. Im deutlichen Unterschied zu diesen Staging-Untersuchungen erlaubt *HPP1* mfcDNA bereits nach zwei beziehungsweise drei Wochen eine Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens. Somit könnte dies als frühe Entscheidungshilfe zur Therapieoptimierung der Patienten ohne Ansprechen genutzt werden.

Nach bestem Wissen ist dies die erste große und prospektiv angelegte Studie, die in einem homogenem Patientenkollektiv belegt, dass der Nachweis von methylierter, frei zirkulierender DNA als response-Marker bei metastasiertem kolorektalem Karzinom Verwendung finden kann. Andere Forschungsgruppen haben bereits auf Nukleinsäuren basierte Tumormarker zur Beurteilung des Therapieansprechens analysiert: In einer prospektiven Studie mit 53 mKRK-Patienten, die mit first-line-Therapie behandelt wurden, untersuchten Tie et al. frei zirkulierende Tumor-DNA im Patientenblut. Ähnlich wie bei dieser Dissertation wurden zwei Blutproben am Anfang der Therapie analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Tumor-DNA im Verlauf der Therapie mit dem radiologisch gemessenen Ansprechen korrelierte und somit einen frühen response-Marker darstellte. Bei den gemessenen CEA-Spiegeln wurde bei diesen Patienten keine signifikante Änderung beobachtet [Tie et al., 2015]. Hansen et al. untersuchten in einer anderen Studie mit 68 mKRK-Patienten, die in der first-line-

Therapie kombiniert mit Bevacizumab behandelt wurden, microRNA-126: Die Änderung des Blutspiegels von microRNA-126 im Therapieverlauf korrelierte mit dem Therapieansprechen [Hansen et al., 2015]. Eine weitere Studie an 50 mKRRK-Patienten beschäftigte sich mit dem Nachweis von frei im Blut zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells* - CTC) und mit dafür geeigneten Markern: Barbazan et al. entwickelten hier ein Multi-Marker-Panel bestehend aus 6 Genen und konnten mit dessen Hilfe Patienten, die von der Chemotherapie (nicht) profitierten, identifizieren. [Barbazan et al., 2014]. Die drei hier beschriebenen Studien wurden mit relativ niedrigen Patientenzahlen durchgeführt. Im Vergleich dazu fanden die Messungen und Analysen dieser Dissertation an einem wesentlich größeren Patientenkollektiv statt, bestehend aus 467 mKRRK-Patienten, die mit Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab im Rahmen einer prospektiven, klinischen Studie behandelt wurden. Basierend auf den Ergebnissen fungierte *HPPI* DNA als prognostischer Biomarker und als früher response-Marker für mKRRK-Patienten und könnte potentiell einen Einsatz in der first-line-Therapie des mKRRK finden. Jedoch bedarf *HPPI* DNA einer Evaluation im Rahmen weiterer prospektiver Studien, in welchen die Therapie in Abhängigkeit von diesem Biomarker durchgeführt und gegebenenfalls, bei fehlendem Ansprechen im Verlauf, angepasst oder verändert wird. Darüber hinaus sollten in einer weiteren Untersuchung die oben beschriebenen, sowie andere potentielle Biomarker des mKRRK und *HPPI* bestimmt und alle direkt miteinander verglichen werden. Der etablierte Tumormarker des kolorektalen Karzinoms - CEA - konnte nach den hier dargestellten Daten, sowie nach den Daten der von Tie et al. beschriebenen Studie nicht als Therapie-response-Marker eingestuft werden [Tie et al., 2015].

Unterschiedliche Klassen von Tumormarkern haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile. So können die etablierten proteinbasierten Marker, wie beispielsweise CEA, in der klinischen Routine einfach bestimmt werden und haben bereits gut erforschte Trennwerte für spezifische Fragestellungen. Da ihre Aussagekraft bei metastasiertem kolorektalem Karzinom bezüglich Therapiewahl und Ansprechen eingeschränkt ist, sind aktuell die deutlich aufwändig zu messenden, auf Nukleinsäuren basierten Tumormarker

von großem Interesse. Als Träger der genetischen Information fungieren frei im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC) oder DNA- und RNA-Fragmente. Die Analyse von CTC bietet einen Gesamteinblick in die maligne Zelle: Hier können neben der DNA auch mRNA und Proteine, sowie die funktionellen Aspekte gleichzeitig untersucht werden. Diese Methode birgt dennoch Limitationen: Die niedrige Konzentration von 1-10 Zellen pro 10 ml Blut stellt eine große Herausforderung für die analytischen Methoden dar. Zudem ist die Aussage bei einem Nachweis von einzelnen Tumorzellen aufgrund von Tumorerheterogenität hinsichtlich der gesamten Tumorlast eingeschränkt. Diese Faktoren erschweren die Etablierung von CTC als Biomarker in der klinischen Routine, zudem fehlt es in diesem Gebiet an standardisierten Nachweismethoden [Alix-Panabieres and Pantel, 2014]. Die Detektion von frei im Blut zirkulierender (methylierter) DNA gelingt durch weniger komplexe Methoden und erfordert niedrigere Probenvolumina (in dieser Studie 200 µl). Darüber hinaus erlaubt diese Methode vermutlich die Analyse der Gesamtheit der DNA, die durch das heterogene Tumorgewebe freigesetzt wird. In Zusammenschau stellt die Detektion von fcDNA und mfcDNA ein elegantes und vielversprechendes Verfahren dar, das sich gut für die klinische Routine etablieren lässt.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Studie profitierte von der großen Anzahl an Patienten und dem prospektivem Design, sowie der zum Patienten-Outcome verblindeten Durchführung der Messungen. Trotzdem gab es einige Limitationen: So beinhaltete das Behandlungsprotokoll nur Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab und keine weiteren Chemotherapeutika oder Biologicals, wie Irinotecan oder anti-EGFR-Antikörper. Des Weiteren wurden aufgrund des Studiendesigns jeweils zwei Patientenproben auf ihren Gehalt an mfcDNA analysiert. Dabei blieb es unklar, ob dieser einer zeit- und patientenzustandsabhängigen Variabilität unterliegt oder an welchem Zeitpunkt der Therapie die zweite Blutentnahme die maximale Aussagekraft bezüglich des Therapieansprechens besitzen könnte. Hierzu wären wiederholte Messungen mit kürzeren Abständen nötig. Darüber hinaus wurden außer CEA keine weiteren relevanten Tumormarker, wie die Mikrosatelliteninstabilität, oder Blutwerte wie beispielsweise die Laktatdehydrogenase mitbestimmt und mit *HPPI* verglichen. In

Vorarbeiten wurde hingegen ein direkter Vergleich von *HPPI* mfcDNA, CEA und LDH als prognostischer Marker durchgeführt [Philipp et al., 2014]. Ebenso erfolgte nur in der vorangegangenen Studie eine Korrelation zwischen *HPPI* Methylierungsstatus im Blut und Tumorgewebe [Philipp et al., 2012]. Ein weiterer limitierender Aspekt der Studie war die Einschränkung der Patientenprobe auf 200 µl. Ein deutlich größeres Volumen von zum Beispiel 20 ml könnte möglicherweise einen Teil der Proben mit vermeintlich nicht nachweisbarer mfcDNA als Proben mit sehr niedriger Konzentration aufdecken und somit eine bessere Differenzierung solcher Patienten mit sich bringen. Auch in Bezug auf *HLTF* hätte diese Volumenvergrößerung eventuell eine Verbesserung des prognostischen Wertes zur Folge. Dafür wäre jedoch eine Etablierung von großvolumigen Zentrifugationssäulen unter Beachtung der Maximalkapazität der Glasfasermembranen notwendig.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei dringendem Bedarf an verlässlichen Biomarkern in der Therapie des kolorektalen Karzinoms die Detektion von frei im Blut zirkulierender *HPPI* DNA sehr großes Potential für diese Rolle besitzt. Hier aufgeführte Studienergebnisse zeigen, dass für Patienten im metastasierten Stadium der Erkrankung *HPPI* DNA einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt. In der Chemotherapie mit Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab fungiert *HPPI* außerdem als unabhängiger response-Marker. Er erlaubt die sehr frühe Identifikation von sowohl Patienten, die von der Therapie profitieren, als auch jener, die nicht ansprechen. Dies könnte im klinischen Alltag für solche Patienten zur erneuten Evaluation des Behandlungsschemas führen und einen frühen Therapiewechsel einleiten. Für die Verwendung in der klinischen Routine muss *HPPI* mfcDNA allerdings durch weitere klinische Studien validiert werden.

Literaturverzeichnis

Alix-Panabieres, C. and K. Pantel (2014). "Challenges in circulating tumour cell research." Nat Rev Cancer **14**(9): 623-631.

Amado, R. G., M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, T. Juan, R. Sikorski, S. Suggs, R. Radinsky, S. D. Patterson and D. D. Chang (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(10): 1626-1634.

Bai, A. H., J. H. Tong, K. F. To, M. W. Chan, E. P. Man, K. W. Lo, J. F. Lee, J. J. Sung and W. K. Leung (2004). "Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia." Int J Cancer **112**(5): 846-853.

Barbazan, J., L. Muinelo-Romay, M. Vieito, S. Candamio, A. Diaz-Lopez, A. Cano, A. Gomez-Tato, L. Casares de Cal Mde, M. Abal and R. Lopez-Lopez (2014). "A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer." Int J Cancer **135**(11): 2633-2643.

Batzer, M. A. and P. L. Deininger (2002). "Alu repeats and human genomic diversity." Nat Rev Genet **3**(5): 370-379.

Beauchemin, N. and A. Arabzadeh (2013). "Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis." Cancer and Metastasis Reviews **32**(3): 643-671.

Blastyak, A., I. Hajdu, I. Unk and L. Haracska (2010). "Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA." Mol Cell Biol **30**(3): 684-693.

Bokemeyer, C., E. Van Cutsem, P. Rougier, F. Ciardiello, S. Heeger, M. Schlichting, I. Celik and C. H. Kohne (2012). "Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line

treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials." Eur J Cancer **48**(10): 1466-1475.

Boucher, D., D. Cournoyer, C. P. Stanners and A. Fuks (1989). "Studies on the Control of Gene Expression of the Carcinoembryonic Antigen Family in Human Tissue." Cancer Research **49**(4): 847-852.

Carpelan-Holmstrom, M., J. Louhimo, U. H. Stenman, H. Alfthan, H. Jarvinen and C. Haglund (2004). "CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer." Tumour Biol **25**(5-6): 228-234.

Castro, M., L. Grau, P. Puerta, L. Gimenez, J. Venditti, S. Quadrelli and M. Sanchez-Carbayo (2010). "Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer." J Transl Med **8**: 86.

Chen, T. R., P. Wang, L. K. Carroll, Y. J. Zhang, B. X. Han and F. Wang (2012). "Generation and characterization of Tmeff2 mutant mice." Biochem Biophys Res Commun **425**(2): 189-194.

Clark, S. J., J. Harrison, C. L. Paul and M. Frommer (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic Acids Res **22**(15): 2990-2997.

Dawson, S. J., D. W. Tsui, M. Murtaza, H. Biggs, O. M. Rueda, S. F. Chin, M. J. Dunning, D. Gale, T. Forshew, B. Mahler-Araujo, S. Rajan, S. Humphray, J. Becq, D. Halsall, M. Wallis, D. Bentley, C. Caldas and N. Rosenfeld (2013). "Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer." N Engl J Med **368**(13): 1199-1209.

De Roock, W., V. De Vriendt, N. Normanno, F. Ciardiello and S. Tejpar (2011). "KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer." Lancet Oncol **12**(6): 594-603.

De Stefano, A. and C. Carlomagno (2014). "Beyond KRAS: Predictive factors of the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer." World J Gastroenterol **20**(29): 9732-9743.

Debauve, G., A. Capouillez, A. Belayew and S. Saussez (2008). "The helicase-like transcription factor and its implication in cancer progression." Cell Mol Life Sci **65**(4): 591-604.

deVos, T., R. Tetzner, F. Model, G. Weiss, M. Schuster, J. Distler, K. V. Steiger, R. Grutzmann, C. Pilarsky, J. K. Habermann, P. R. Fleshner, B. M. Oubre, R. Day, A. Z. Sledziewski and C. Lofton-Day (2009). "Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer." Clin Chem **55**(7): 1337-1346.

Dhont, L., C. Mascaux and A. Belayew (2015). "The helicase-like transcription factor (HLTF) in cancer: loss of function or oncomorphic conversion of a tumor suppressor?" Cell Mol Life Sci **73**: 129–145.

Douillard, J. Y., K. S. Oliner, S. Siena, J. Tabernero, R. Burkes, M. Barugel, Y. Humblet, G. Bodoky, D. Cunningham, J. Jassem, F. Rivera, I. Kocakova, P. Ruff, M. Blasinska-Morawiec, M. Smakal, J. L. Canon, M. Rother, R. Williams, A. Rong, J. Wizek, R. Sidhu and S. D. Patterson (2013). "Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer." N Engl J Med **369**(11): 1023-1034.

Duffy, M. J. (2001). "Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?" Clin Chem **47**(4): 624-630.

Duffy, M. J., R. Lamerz, C. Haglund, A. Nicolini, M. Kalousova, L. Holubec and C. Sturgeon (2014). "Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update." Int J Cancer **134**(11): 2513-2522.

Eads, C. A., K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg and P. W. Laird (2000). "MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation." Nucleic Acids Res **28**(8): E32.

Ebert, M. P., S. H. Mooney, L. Tonnes-Priddy, J. Lograsso, J. Hoffmann, J. Chen, C. Rocken, H. U. Schulz, P. Malfertheiner and C. Lofton-Day (2005). "Hypermethylation of

the TPEF/HPP1 gene in primary and metastatic colorectal cancers." Neoplasia **7**(8): 771-778.

Elahi, A., L. Zhang, T. J. Yeatman, S. Gery, S. Sebti and D. Shibata (2008). "HPP1-mediated tumor suppression requires activation of STAT1 pathways." Int J Cancer **122**(7): 1567-1572.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Frattini, M., G. Gallino, S. Signoroni, D. Balestra, L. Battaglia, G. Sozzi, E. Leo, S. Pilotti and M. A. Pierotti (2006). "Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool." Ann N Y Acad Sci **1075**: 185-190.

Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy and C. L. Paul (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-1831.

Fukushima, T. and S. Takenoshita (2005). "Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis." Fukushima J Med Sci **51**(2): 67-75.

Gold, P. and S. O. Freedman (1965). "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system." J Exp Med **122**(3): 467-481.

Gonzalez-Pons, M. and M. Cruz-Correa (2015). "Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now?" Biomed Res Int **2015**: 149014.

Gryfe, R., H. Kim, E. T. Hsieh, M. D. Aronson, E. J. Holowaty, S. B. Bull, M. Redston and S. Gallinger (2000). "Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer." N Engl J Med **342**(2): 69-77.

Guastadisegni, C., M. Colafranceschi, L. Ottini and E. Dogliotti (2010). "Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data." Eur J Cancer **46**(15): 2788-2798.

Guo, W., Z. Dong, Y. Guo, Z. Chen, G. Kuang and Z. Yang (2011). "Aberrant methylation of the CpG island of HLTF gene in gastric cardia adenocarcinoma and dysplasia." Clinical Biochemistry **44**(10-11): 784-788.

Hajian-Tilaki, K. (2013). "Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation." Caspian J Intern Med **4**(2): 627-635.

Hampel, H., W. L. Frankel, E. Martin, M. Arnold, K. Khanduja, P. Kuebler, H. Nakagawa, K. Sotamaa, T. W. Prior, J. Westman, J. Panescu, D. Fix, J. Lockman, I. Comeras and A. de la Chapelle (2005). "Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)." N Engl J Med **352**(18): 1851-1860.

Hansen, T. F., A. L. Carlsen, N. H. Heegaard, F. B. Sorensen and A. Jakobsen (2015). "Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer." Br J Cancer **112**(4): 624-629.

Hegewisch-Becker, S., U. Graeven, C. A. Lerchenmuller, B. Killing, R. Depenbusch, C. C. Steffens, S. E. Al-Batran, T. Lange, G. Dietrich, J. Stoehlmacher, A. Tannapfel, A. Reinacher-Schick, J. Quidde, T. Trarbach, A. Hinke, H. J. Schmoll and D. Arnold (2015). "Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial." Lancet Oncol **16**(13): 1355-1369.

Hellwinkel, O. J., M. Kedia, H. Isbarn, L. Budaus and M. G. Friedrich (2008). "Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours." BJU Int **101**(6): 753-757.

Herbst, A. and F. T. Kolligs (2012). "Detection of DNA hypermethylation in remote media of patients with colorectal cancer: new biomarkers for colorectal carcinoma." Tumour Biol **33**(2): 297-305.

Herbst, A., K. Rahmig, P. Stieber, A. Philipp, A. Jung, A. Ofner, A. Crispin, J. Neumann, R. Lamerz and F. T. Kolligs (2011). "Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer." Am J Gastroenterol **106**(6): 1110-1118.

Herbst, A., M. Wallner, K. Rahmig, P. Stieber, A. Crispin, R. Lamerz and F. T. Kolligs (2009). "Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence." Eur J Gastroenterol Hepatol **21**(5): 565-569.

Hibi, K., H. Nakayama, Y. Kanyama, Y. Kodera, K. Ito, S. Akiyama and A. Nakao (2003). "Methylation pattern of HLTF gene in digestive tract cancers." Int J Cancer **104**(4): 433-436.

Holten-Andersen, M. N., I. J. Christensen, H. J. Nielsen, R. W. Stephens, V. Jensen, O. H. Nielsen, S. Sorensen, J. Overgaard, H. Lilja, A. Harris, G. Murphy and N. Brunner (2002). "Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer." Clin Cancer Res **8**(1): 156-164.

Issa, J. P. (2008). "Colon cancer: it's CIN or CIMP." Clin Cancer Res **14**(19): 5939-5940.

Ivanauskas, A., J. Hoffmann, L. V. Jonaitis, R. Markelis, E. Juozaityte, L. Kupcinskas, C. Lofton-Day, C. Rocken and P. Malfertheiner (2008). "Distinct TPEF/HPP1 gene methylation patterns in gastric cancer indicate a field effect in gastric carcinogenesis." Dig Liver Dis **40**(12): 920-926.

Jahr, S., H. Hentze, S. Englisch, D. Hardt, F. O. Fackelmayer, R. D. Hesch and R. Knippers (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations

and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." Cancer Res **61**(4): 1659-1665.

Jancik, S., J. Drabek, D. Radzioch and M. Hajduch (2010). "Clinical relevance of KRAS in human cancers." J Biomed Biotechnol **2010**: 150960.

Jover, R., P. Zapater, A. Castells, X. Llor, M. Andreu, J. Cubiella, F. Balaguer, L. Sempere, R. M. Xicola, L. Bujanda, J. M. Rene, J. Clofent, X. Bessa, J. D. Morillas, D. Nicolas-Perez, E. Pons, A. Paya and C. Alenda (2009). "The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status." Eur J Cancer **45**(3): 365-373.

Kahlert, C., S. A. Melo, A. Protopopov, J. Tang, S. Seth, M. Koch, J. Zhang, J. Weitz, L. Chin, A. Futreal and R. Kalluri (2014). "Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer." J Biol Chem **289**(7): 3869-3875.

Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, D. Tu, N. C. Tebbutt, R. J. Simes, H. Chalchal, J. D. Shapiro, S. Robitaille, T. J. Price, L. Shepherd, H. J. Au, C. Langer, M. J. Moore and J. R. Zalcborg (2008). "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." N Engl J Med **359**(17): 1757-1765.

Kim, Y. H., Z. Petko, S. Dzieciatkowski, L. Lin, M. Ghiassi, S. Stain, W. C. Chapman, M. K. Washington, J. Willis, S. D. Markowitz and W. M. Grady (2006). "CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer." Genes Chromosomes Cancer **45**(8): 781-789.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

Krijger, P. H. L., K.-Y. Lee, N. Wit, P. C. M. van den Berk, X. Wu, H. P. Roest, A. Maas, H. Ding, J. H. J. Hoeijmakers, K. Myung and H. Jacobs (2011). "HLTF and SHPRH are

not essential for PCNA polyubiquitination, survival and somatic hypermutation: Existence of an alternative E3 ligase." DNA Repair **10**(4): 438-444.

Lander, E. S. and e. al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.

Lech, G., R. Slotwinski, M. Slodkowski and I. W. Krasnodebski (2016). "Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances." World J Gastroenterol **22**(5): 1745-1755.

Lee, S. M., J. Y. Park and D. S. Kim (2012). "Methylation of TMEFF2 gene in tissue and serum DNA from patients with non-small cell lung cancer." Mol Cells **34**(2): 171-176.

Leitlinienprogramm-Onkologie (2014). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, url:<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 08.2014]. et al.

Leung, W. K., K. F. To, E. P. Man, M. W. Chan, A. H. Bai, A. J. Hui, F. K. Chan and J. J. Sung (2005). "Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer." Am J Gastroenterol **100**(10): 2274-2279.

Lin, E. I., L. H. Tseng, C. D. Gocke, S. Reil, D. T. Le, N. S. Azad and J. R. Eshleman (2015). "Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability." Oncotarget **6**(39): 42334-42344.

Lumachi, F., F. Marino, R. Orlando, G. B. Chiara and S. M. Basso (2012). "Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer." Anticancer Res **32**(3): 985-988.

Mahon, K. L., W. Qu, J. Devaney, C. Paul, L. Castillo, R. J. Wykes, M. D. Chatfield, M. J. Boyer, M. R. Stockler, G. Marx, H. Gurney, G. Mallesara, P. L. Molloy, L. G. Horvath and S. J. Clark (2014). "Methylated Glutathione S-transferase 1 (mGSTP1) is a potential

plasma free DNA epigenetic marker of prognosis and response to chemotherapy in castrate-resistant prostate cancer." Br J Cancer **111**(9): 1802-1809.

Meissl, K., S. Macho-Maschler, M. Muller and B. Strobl (2015). "The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours." Cytokine.

Moinova, H. R., W. D. Chen, L. Shen, D. Smiraglia, J. Olechnowicz, L. Ravi, L. Kasturi, L. Myeroff, C. Plass, R. Parsons, J. Minna, J. K. Willson, S. B. Green, J. P. Issa and S. D. Markowitz (2002). "HLTF gene silencing in human colon cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4562-4567.

Motegi, A., H. J. Liaw, K. Y. Lee, H. P. Roest, A. Maas, X. Wu, H. Moinova, S. D. Markowitz, H. Ding, J. H. Hoeijmakers and K. Myung (2008). "Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12411-12416.

Murtaza, M., S. J. Dawson, D. W. Tsui, D. Gale, T. Forshew, A. M. Piskorz, C. Parkinson, S. F. Chin, Z. Kingsbury, A. S. Wong, F. Marass, S. Humphray, J. Hadfield, D. Bentley, T. M. Chin, J. D. Brenton, C. Caldas and N. Rosenfeld (2013). "Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA." Nature **497**(7447): 108-112.

Nazemalhosseini Mojarad, E., P. J. Kuppen, H. A. Aghdaei and M. R. Zali (2013). "The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer." Gastroenterol Hepatol Bed Bench **6**(3): 120-128.

Neumann, J. H., A. Jung and T. Kirchner (2015). "[Molecular pathology of colorectal cancer]." Pathologe **36**(2): 137-144.

Nicolini, A., P. Ferrari, M. J. Duffy, A. Antonelli, G. Rossi, M. R. Metelli, F. Fulceri, L. Anselmi, M. Conte, P. Berti and P. Miccoli (2010). "Intensive risk-adjusted follow-up with the CEA, TPA, CA19.9, and CA72.4 tumor marker panel and abdominal

ultrasonography to diagnose operable colorectal cancer recurrences: effect on survival." Arch Surg **145**(12): 1177-1183.

Philipp, A. B., D. Nagel, P. Stieber, R. Lamerz, I. Thalhammer, A. Herbst and F. T. Kolligs (2014). "Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer." BMC Cancer **14**: 245.

Philipp, A. B., P. Stieber, D. Nagel, J. Neumann, F. Spelsberg, A. Jung, R. Lamerz, A. Herbst and F. T. Kolligs (2012). "Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer." Int J Cancer **131**(10): 2308-2319.

Popat, S., R. Hubner and R. S. Houlston (2005). "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis." J Clin Oncol **23**(3): 609-618.

Pox, C. (2014). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, url:<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 08.2014], et al.

Robert-Koch-Institut (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015.

Schlange, T. and K. Pantel (2016). "Potential of circulating tumor cells as blood-based biomarkers in cancer liquid biopsy." Pharmacogenomics **17**(3): 183-186.

Shibata, D. M., F. Sato, Y. Mori, K. Perry, J. Yin, S. Wang, Y. Xu, A. Olaru, F. Selaru, K. Spring, J. Young, J. M. Abraham and S. J. Meltzer (2002). "Hypermethylation of HPP1 is associated with hMLH1 hypermethylation in gastric adenocarcinomas." Cancer Res **62**(20): 5637-5640.

Shitoh, K., F. Konishi, Y. Miyakura, K. Togashi, T. Okamoto and H. Nagai (2002). "Microsatellite instability as a marker in predicting metachronous multiple colorectal carcinomas after surgery: a cohort-like study." Dis Colon Rectum **45**(3): 329-333.

Siegel, R., C. Desantis and A. Jemal (2014). "Colorectal cancer statistics, 2014." CA Cancer J Clin **64**(2): 104-117.

Stintzing, S. (2014). "Management of colorectal cancer." F1000Prime Rep **6**: 108.

Swaminathan, R. and A. N. Butt (2006). "Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments." Ann N Y Acad Sci **1075**: 1-9.

Tanzer, M., B. Balluff, J. Distler, K. Hale, A. Leodolter, C. Rocken, B. Molnar, R. Schmid, C. Lofton-Day, T. Schuster and M. P. Ebert (2010). "Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions." PLoS One **5**(2): e9061.

Therasse, P., S. G. Arbuck, E. A. Eisenhauer, J. Wanders, R. S. Kaplan, L. Rubinstein, J. Verweij, M. Van Glabbeke, A. T. van Oosterom, M. C. Christian and S. G. Gwyther (2000). "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 **92**(3): 205-216.

Thomson, D. M., J. Krupey, S. O. Freedman and P. Gold (1969). "The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(1): 161-167.

Tie, J., I. Kinde, Y. Wang, H. L. Wong, J. Roebert, M. Christie, M. Tacey, R. Wong, M. Singh, C. S. Karapetis, J. Desai, B. Tran, R. L. Strausberg, L. A. Diaz, Jr., N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and P. Gibbs (2015). "Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer." Ann Oncol **26**(8): 1715-1722.

Toyota, M. and J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotypes in aging and cancer." Semin Cancer Biol **9**(5): 349-357.

Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, J. Hurwitz, J. H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash and L. Haracska (2008). "Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3768-3773.

Van Cutsem, E., A. Cervantes, B. Nordlinger and D. Arnold (2014). "Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **25 Suppl 3**: iii1-9.

van Rijnsoever, M., F. Grieu, H. Elsaleh, D. Joseph and B. Iacopetta (2002). "Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands." Gut **51**(6): 797-802.

Wallner, M., A. Herbst, A. Behrens, A. Crispin, P. Stieber, B. Goke, R. Lamerz and F. T. Kolligs (2006). "Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer." Clin Cancer Res **12**(24): 7347-7352.

Weisenberger, D. J., M. Campan, T. I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich and P. W. Laird (2005). "Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight." Nucleic Acids Res **33**(21): 6823-6836.

Yörüker, E. E., S. Holdenrieder and U. Gezer (2016). "Blood-based biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer." Clinica Chimica Acta **455**: 26-32.

Young, J., K. G. Biden, L. A. Simms, P. Huggard, R. Karamatic, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, N. Herath, M. Barker, G. J. Anderson, D. R. Fitzpatrick, G. A. Ramm, J. R. Jass and B. A. Leggett (2001). "HPP1: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 265-270.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
95%-CI	95% - confidence interval (Konfidenzintervall)
A	Adenin
BE 1/2	Erste/zweite Blutentnahme
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CEA	Carcinoembryonic antigen
CR	Complete remission
DNA / DNS	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECOG	Eastern cooperative oncology group
G	Guanin
HLTF	Helicase-like transcription factor
HPP1	Hyperplastic polyposis protein 1
HR	Hazard ratio
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
MethyLight	Methylierungsspezifische PCR mit Taqman Sonden
mfcDNA	Methylierte frei zirkulierende DNA
mKRK	Metastasiertes kolorektales Karzinom

mRNA	Boten-RNA
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
neg.	Negativ
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PFS	Progress free survival
PMR-Wert	Percentage of fully methylated reference
pos.	Positiv
PR	Partial remission
qPCR	Quantitative PCR
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
s.	Siehe
SD	Stable disease
T	Thymin
U	Uracil
UICC	Union internationale contre le cancer
vs.	Versus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Zeitlicher Ablauf der Induktionstherapie und der relevanten Untersuchungen	23
Abbildung 3.2: Übersicht Studienteilnehmer	24
Abbildung 3.3: Funktionsprinzip der Zentrifugationssäule	30
Abbildung 3.4: Umwandlung von Cytosin bei der Bisulfitkonvertierung.....	31
Abbildung 3.5: Umwandlung der DNA.....	32
Abbildung 4.1: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HPP1-Methylierungsstatus in der Blutprobe BE1 im Testkollektiv.....	39
Abbildung 4.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HLTF-Methylierungsstatus in der Blutprobe BE1 im Testkollektiv.....	39
Abbildung 4.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HPP1-Methylierungsstatus und seinem Verlauf im Testkollektiv	42
Abbildung 4.4: Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von dem HLTF-Methylierungsstatus und seinem Verlauf im Testkollektiv	42
Abbildung 4.5: Kaplan-Meier-Analyse zum Gesamtüberleben bei HPP1 positiven Patienten in der BE2 für HLTF-Status.....	49
Abbildung 4.6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das 12-Wochen-Staging.....	51
Abbildung 4.7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das 24-Wochen-Staging.....	51
Abbildung 4.8: Gesamtüberleben HPP1 vs. CEA	54
Abbildung 4.9: Dotplot der HPP1-PMR-Werte für die Blutproben BE1 und BE2.....	64
Abbildung 4.10: Dotplot der CEA -Werte für die Blutproben BE1 und BE2.....	64
Abbildung 4.11: ROC-Kurven HPP1	66
Abbildung 4.12: ROC-Kurven CEA.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Charakteristika Gesamtkollektiv	26
Tabelle 3.2: Charakteristika Testkollektiv	27
Tabelle 3.3: Konzentration der Reagenzien für die qPCR (20 µl - Ansatz).....	33
Tabelle 3.4: Reaktionsspezifische Sonden und Primer.....	34
Tabelle 3.5: Protokoll der qPCR (20 µl-Ansatz)	35
Tabelle 4.1: Aufteilung des Testkollektivs nach dem jeweiligen Markerverlauf.....	40
Tabelle 4.2: Univariate Analyse, Übersicht für medianes Gesamtüberleben (Med. OS mit CI - 95%-Konfidenzintervall) und Hazard Ratio (HR mit HRCI 95%-Konfidenzintervall), sowie die p-Werte im Testkollektiv.....	43
Tabelle 4.3: Multivariate Analyse für Gesamtmortalität im Testkollektiv (Mod. TI)....	46
Tabelle 4.4: Multivariate Analyse für Gesamtmortalität im Testkollektiv (Mod. TII) ..	47
Tabelle 4.5: HPP1- vs. HLTF - Status im Vergleich	48
Tabelle 4.6: Übersicht HPP1-Methylierungsstatus und CEA-Einteilung.....	52
Tabelle 4.7: Univariate Analyse: Übersicht medianes Gesamtüberleben (Med. OS mit CI - 95%-Konfidenzintervall) und Hazard Ratio (HR mit HRCI 95%-Konfidenzintervall), sowie die p-Werte im Gesamtkollektiv	56
Tabelle 4.8: Berechnung von Akaike information criterion (AIC) für unterschiedliche Cox-Modelle (Mut.=Mutationsstatus NRAS/KRAS, BRAF).....	58
Tabelle 4.9: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G I).....	60
Tabelle 4.10: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G II)	61
Tabelle 4.11: Multivariate Analyse für OS im Gesamtkollektiv (Modell G III)	62

Eidesstattliche Versicherung

Vdovin, Nikolay

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Detektion von hypermethylierter *HPP1* und *HLTF* DNA im Blut als
Biomarker des metastasierten kolorektalen Karzinoms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.12.2018

Ort, Datum

Nikolay Vdovin

Unterschrift Doktorand