

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

**Prognostische und therapeutische Rolle von HPP1  
als molekularer Biomarker im Plasma von Patienten mit  
metastasiertem kolorektalem Karzinom**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Katharina Klein**  
aus Schongau

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Kolligs

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Falk Roeder

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung

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

Dekan: Prof. Dr. med. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

**Meiner lieben Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Das kolorektale Karzinom</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms .....	1
1.2. Pathogenese des kolorektalen Karzinoms .....	3
1.2.1. Adenom-Karzinom-Sequenz .....	3
1.2.2. Chromosomale Instabilität .....	4
1.2.3. Mikrosatelliteninstabilität .....	5
1.2.4. Epigenetische Veränderungen .....	7
1.2.4.1. CIMP-Panel .....	10
1.3. Lokalisation und Stadieneinteilung des KRK .....	12
1.4. Therapie des kolorektalen Karzinoms .....	13
1.4.1. Kurative chirurgische Therapie .....	13
1.4.2. Adjuvante Chemotherapie .....	14
1.4.3. Therapiekonzepte bei Metastasierung und palliativer Situation .....	15
1.5. Prognose des kolorektalen Karzinoms .....	17
<b>2. Biomarker beim kolorektalen Karzinom</b> .....	<b>18</b>
2.1. Allgemeines zum Nachweis von Biomarkern im Bluttest .....	18
2.2. Wichtige Tumormarker im Blut beim kolorektalen Karzinom .....	20
2.2.1. CEA als etablierter Tumormarker des kolorektalen Karzinoms .....	20
2.2.2. Ca-19-9 .....	21
2.2.3. LDH .....	21
2.2.4. Septin 9 .....	22
2.2.5. HPP1 .....	23
2.2.6. HLTF .....	24
2.2.7. NEUROG-1 .....	25
<b>3. Die Multicenterstudie AIO KRK-0207</b> .....	<b>26</b>
3.1. Gesamtaufbau und Ziele der Studie .....	26
3.2. Zielsetzungen der Dissertation .....	30
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
4.1. Verwendete Chemikalien und Geräte .....	31
4.2. Patientenkollektiv für diese Dissertation .....	32
4.3. Versuchsablauf .....	34
4.4. Patientenproben .....	34

4.4.1. Probengewinnung und Aufbereitung.....	34
4.4.2. Isolation frei- zirkulierender DNA im Plasma.....	35
4.4.3. Bisulfit Behandlung .....	36
4.4.4. CEA-Quantifizierung im Serum.....	38
4.5. Echtzeit quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR).....	38
4.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip .....	38
4.5.2. Verwendete Primer und Sonden .....	39
4.5.3. Reaktionsansatz und PCR-Programm .....	40
4.5.4. Threshold Cycle (CT) und Standardkurven.....	42
4.5.5. Normalisierungsberechnungen mittels Referenzgen ALU .....	44
4.5.6. Berechnung des Anteils methylierter DNA.....	45
4.6. Statistische Analyse .....	45
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
5.1. Übersicht klinisch-pathologischer Patientendaten.....	47
5.2. HPP1 mfcDNA als prognostischer Marker .....	49
5.2.1. Kaplan-Meier-Kurven HPP1 mfcDNA und CEA bezüglich Gesamtüberleben (OS) .....	49
5.2.2. Kaplan-Meier-Kurven einzelner Therapiearme bezüglich Gesamtüberleben (OS) .....	55
5.2.2.1. Arm I: Standardschema aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab..	56
5.2.2.2. Arm II: Bevacizumab-Monotherapie.....	58
5.2.2.3. Arm III: keine medikamentöse Erhaltungstherapie.....	60
5.2.3. Kaplan-Meier-Kurven der Biomarker bezüglich des progressionsfreien Überlebens (PFS).....	62
5.2.4. Kaplan-Meier-Kurven der Biomarker einzelner Therapiearme bezüglich des progressionsfreien Überlebens (PFS).....	66
5.3. Multivariate Analysen .....	71
5.4. HPP1 mfcDNA als Prognosemarker im Gesamtverlauf der Studie .....	73
5.5. HPP1 mfcDNA als Marker für das Therapieansprechen .....	78
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>81</b>
6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der AIO KRK 0207-Studie.....	81
6.2. HPP1 mfcDNA als Prognosemarker .....	83
6.3. HPP1 mfcDNA als Marker für das Therapieansprechen .....	88

6.4. Biomarker beim KRK im Literaturvergleich.....	89
6.5. Stärken und Limitationen der Studie .....	95
6.6. Klinische Bedeutung und Ausblick .....	99
Zusammenfassung .....	102
Anhang.....	103
Abkürzungsverzeichnis.....	104
Abbildungsverzeichnis.....	105
Tabellenverzeichnis.....	106
Literaturverzeichnis .....	107
Danksagung .....	130
Lebenslauf.....	131
Publikationen.....	133
Eidesstattliche Versicherung .....	134

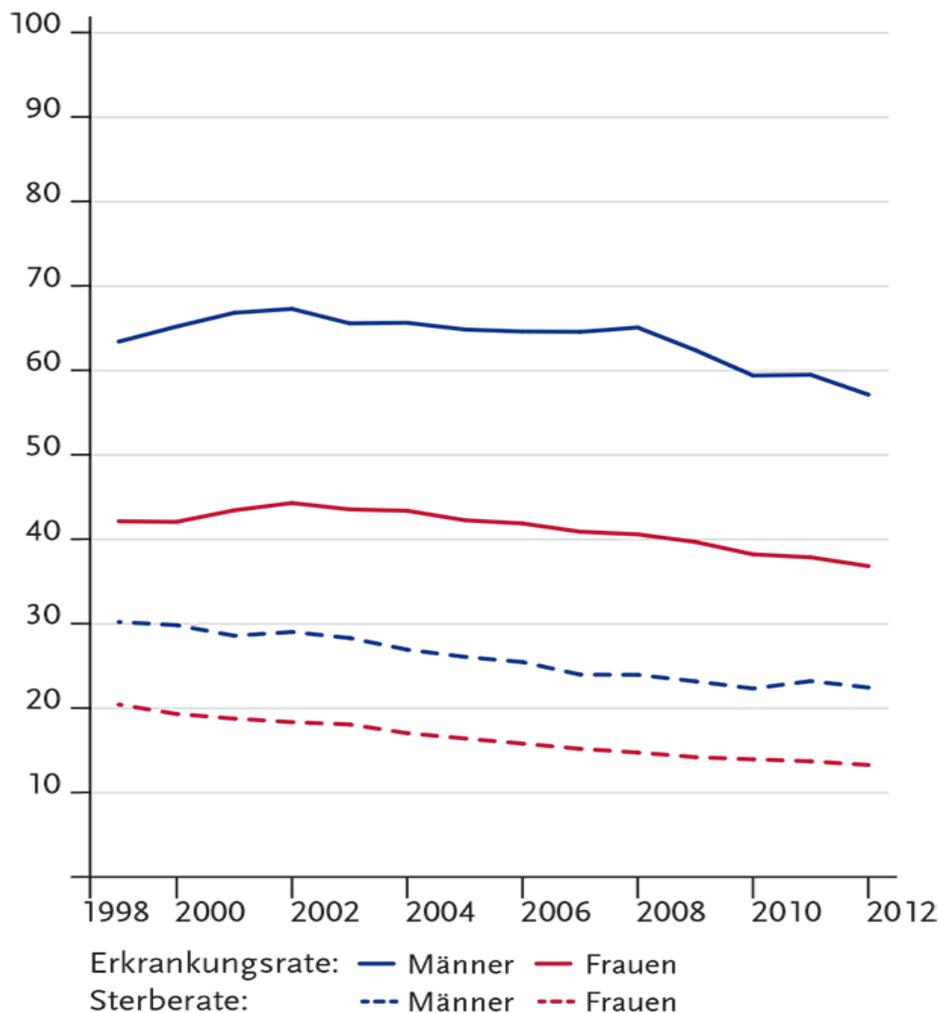
## **1. Das kolorektale Karzinom**

Krebserkrankungen sind trotz des medizinischen Fortschritts nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die Diagnose eines Krebsleidens stellt für Betroffenen eine enorme psychische und körperliche Belastungssituation dar, besonders dann, wenn bei bereits fortgeschrittenem Krankheitsverlauf eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist. Daher setzt sich die wissenschaftliche Forschung in zahlreichen Studien zum Ziel, neue Erkenntnisse über Ursprung und Fortschreiten der Krebserkrankungen zu gewinnen, um dahingehend spezifische Diagnostik- und Therapieoptionen zu entwerfen. Auch die vorliegende Arbeit reiht sich in diese Bestrebungen ein und möchte einen Beitrag zum Verständnis epigenetischer Veränderungen beim kolorektalen Karzinom leisten und auf deren Bedeutung als diagnostische und prognostische Marker im Blut bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom eingehen.

### **1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms**

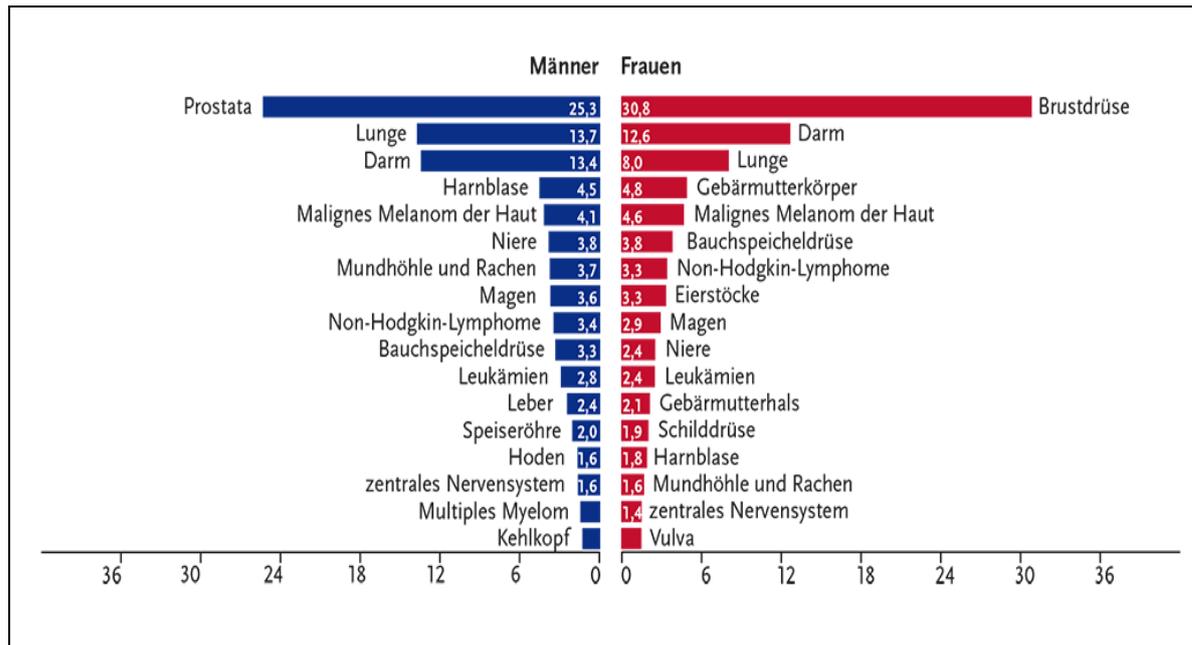
Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die dritthäufigste Krebsart mit ca. 1,4 Millionen Erkrankungsfällen weltweit im Jahr 2012 (Ferlay et al. 2015). Die Inzidenz ist starken geographischen Schwankungen unterworfen und zeigt ein gehäuftes Auftreten in entwickelten Ländern. In Deutschland betrug die altersstandardisierte Inzidenz im Jahr 2013 56,4 pro 100.000 Männer bzw. 35,4 pro 100.000 Frauen. Dabei handelt es sich bei den Männern mit 33.776 Neuerkrankungen nach dem Prostata- und Lungenkrebs um die dritthäufigste und bei den Frauen mit 27.476 Neuerkrankungen nach dem Brustkrebs um die zweithäufigste Krebsart (GEKID-Atlas - Tabellenabfrage; Krebs - Darmkrebs 2017; Krebs - Darmkrebs 2017). Das Erkrankungsrisiko erhöht sich mit zunehmendem Alter und weist ein mittleres Erkrankungsalter zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr auf. Nur etwa 10 Prozent aller Erkrankten sind jünger als 55 Jahre, davon machen den Großteil Patienten mit genetischer Belastung aus. Während die altersstandardisierte Darmkrebsmortalität in den Industrienationen bereits seit Jahrzehnten aufgrund verbesserter Diagnostik- und Therapieoptionen tendenziell rückläufig ist, ist ein leichter Rückgang der altersstandardisierten Inzidenz in der Altersgruppe ab 55 Jahren erst innerhalb der letzten 10 Jahre zu beobachten: Zwischen 2003 und 2012 sank die altersstandardisierte Darmkrebsinzidenz in Deutschland um 13,8 % bei

Männern und um 14,3 % bei Frauen (Brenner et al. 2016, 2016). Umso interessanter ist der abnehmende Trend im Hinblick auf die zunehmende demographische Alterung der Gesellschaft, die Zunahme von Adipositas in den westlichen Industrieländern und dem rückläufigen Einsatz einer Hormonersatztherapie. Dabei handelt es sich um Faktoren, die allesamt die Entstehung von Darmkrebs begünstigen und tendenziell eine Zunahme der Inzidenz vermuten ließen. Der stattdessen aufgetretene Rückgang ist am ehesten multifaktorieller Genese und kann unter anderem auf die 2002 eingeführte Vorsorgekoloskopie zurückgeführt werden.



**Abbildung 1.1:** Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, nach Geschlecht, Deutschland 1999-2012, je 100.000 (Europastandard)

**Quelle:** [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html)



**Abbildung 1.2:** Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) - Angaben in Prozent

**Quelle:** [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html)

## 1.2. Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

### 1.2.1. Adenom-Karzinom-Sequenz

Kolorektale Karzinome entstehen in mehr als 90% der Fälle sporadisch aufgrund erworbener Genmutationen in den Zellen der Darmschleimhaut. Mutationen führen zunächst zu einer unkontrollierten Proliferation der Darmepithelzellen und zur Ausbildung intraepithelialer Neoplasien (IEN) in Form von Adenomen (Jass 2007). Dabei können tubuläre, tubulo-villöse und villöse Adenome unterschieden werden, von denen die villösen Adenome die höchste Entartungstendenz aufweisen. Neben dem histologischen Typ kommt auch der Adenomgröße und dem Dysplasiegrad eine hohe Bedeutung zu. Vom klassischen Adenom ist das sessil serratierte Adenom sowie das traditionell serratierte Adenom zu unterscheiden. Beim sessil serratierten Adenom handelt es sich um einen vorwiegend im rechtsseitigen Colon lokalisierten Polypen, der selten eine Dysplasie aufweist, jedoch generell als Vorläuferläsion eine maligne Entartungstendenz besitzt. Demgegenüber ist das traditionell serratierte Adenom überwiegend im linksseitigen Colon und Rektum vorzufinden und macht lediglich 1% aller Adenome aus. Es stellt eine Kombination aus sägezahnartiger Morphologie und intraepithelialer

Neoplasie dar (Bettington et al. 2017; Bettington und Chetty 2015). Entscheidender Faktor für die Entartung aller Vorläuferläsionen zur Krebszelle ist die über eine Dauer von ca. 10 Jahren entstehende Vielzahl an Mutationen, durch die die Tumorzelle ein unkontrolliertes Wachstum entwickelt.

In weniger als 10% der Karzinomfälle ist eine hereditäre Genese nachzuweisen (Jasperson et al. 2010). Wesentlicher Unterscheid zur sporadischen Form mit Nachweis einer genetischen Veränderung in einem Zellklon ist, dass beim hereditären kolorektalen Karzinom alle somatischen Zellen Mutationen aufweisen (Knudson 1993). Dabei ist neben der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) vor allem das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) erwähnenswert, da es den größten Anteil der hereditären Kolonkarzinome ausmacht. Darüber hinaus ist bei etwa 30% aller Patienten mit KRK eine familiäre Belastung anzunehmen, die jedoch nicht eindeutig einer erblichen Variante zuzuordnen ist (Grady 2003; Lichtenstein et al. 2000).

Die sporadische kolorektale Karzinogenese ist im Wesentlichen auf 3 Pathomechanismen zurückzuführen: Chromosomale Instabilität, Mikrosatelliteninstabilität und epigenetische Veränderungen. Dabei ist die Entstehung des kolorektalen Karzinoms häufig Folge eines Zusammenspiels dieser verschiedenen Pathogenesewege, welche im Folgenden erläutert werden sollen (Issa 2008).

### 1.2.2. Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität tritt bei 80–85% aller kolorektalen Karzinome auf (Grady und Carethers 2008, 2008). Der klassischen, mehrstufigen Adenom-Karzinom-Sequenz liegt das Modell nach Vogelstein und Fearson zugrunde (Vogelstein et al. 1988). Darin wird die Tumorprogression durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen vor allem in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen beschrieben. Zytogenetisch zeigt sich die chromosomale Instabilität in Aneuploidie, wobei die veränderte Anzahl an Chromosomensätzen zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. zu einer Aktivierung von Protoonkogenen führen kann. Darüber hinaus ist in diesem Zusammenhang auch der Verlust der Heterozygotie bedeutsam (*engl.: loss of heterozygosity LOH*). Hierbei handelt es sich im Rahmen der Karzinogenese um eine spontane Mutation mit anschließender Funktionsuntüchtigkeit eines der beiden Allele eines Tumorsuppressorgens. Dies besitzt zunächst keinen Krankheitswert, erst die Inaktivierung des zweiten Allels, beispielsweise in Form einer Punktmutation, kann im Verlauf durch

fehlende Expression eines Tumorsuppressorgens eine Tumorentstehung begünstigen (Baker et al. 1989).

Initial liegt dem Vogelsteinschen Modell der kolorektalen Karzinogenese eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens zugrunde. Dies führt zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges über erhöhte Mengen des Proteins  $\beta$ -Catenin, welches für die vermehrte Transkription von Onkogenen verantwortlich ist. Darauf folgen Mutationen im KRAS-Onkogen, die zu einer verstärkten Zellproliferation über die Aktivierung der MAP-Kinase führen. Abschließend ist die Mutation des Proteins p53 für eine unkontrollierte Zellproliferation entscheidend. Bei p53 handelt es sich um einen Tumorsuppressor, der als „Wächter des Genoms“ seine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation besitzt (LANE 1992). Bei DNA-Schäden ist er in der Lage, DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, den Zellzyklus an definierten Kontrollpunkten anzuhalten oder bei irreversibler Schädigung über eine Signalkaskade die Apoptose einer Zelle herbeizuführen. Führt eine Mutation zur Inaktivierung von p53, hat dies eine unkontrollierte Proliferation geschädigter und im Rahmen der Karzinogenese potentiell maligner Zellen zur Folge.

### 1.2.3. Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist bei etwa 10-15% der sporadischen Kolonkarzinome nachzuweisen. Bei Mikrosatelliten (engl.: *short tandem repeats*) handelt es sich um kurze, repetitive DNA-Sequenzen, die aufgrund ihres Sequenzmusters besonders anfällig für Mutationen sind. Deren Längenveränderungen als Folge von Mutationen führen zum Ausfall von Reparaturgenen, sog. *missmatch repair* (MMR) Genen (Ionov et al. 1993; Weber und May 1989). Dabei sind besonders die Gene MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 und PMS2 betroffen. Diese nehmen im Zellzyklus bei der Detektion falsch in die DNA eingebauter Basenpaare und anschließender Reparatur des defekten DNA-Stranges eine Schlüsselrolle ein. Der Ausfall dieser DNA-Reparaturmechanismen führt zu Strangbrüchen defekter DNA-Abschnitte sowie zur Akkumulation von Mutationen. MSI-positive Kolonkarzinome sind mit einer proximalen Tumorlokalisation, einem erhöhten Dysplasiegrad, einer BRAF-Mutation, ebenso wie erhöhtem Alter und weiblichem Geschlecht assoziiert (Lochhead et al. 2013; Ashktorab et al. 2003; Thibodeau et al. 1993).

Beim sporadischen KRK resultiert die Mikrosatelliteninstabilität in den meisten Fällen aus einer Geninaktivierung aufgrund einer Methylierung des Genpromotors. Im Zuge

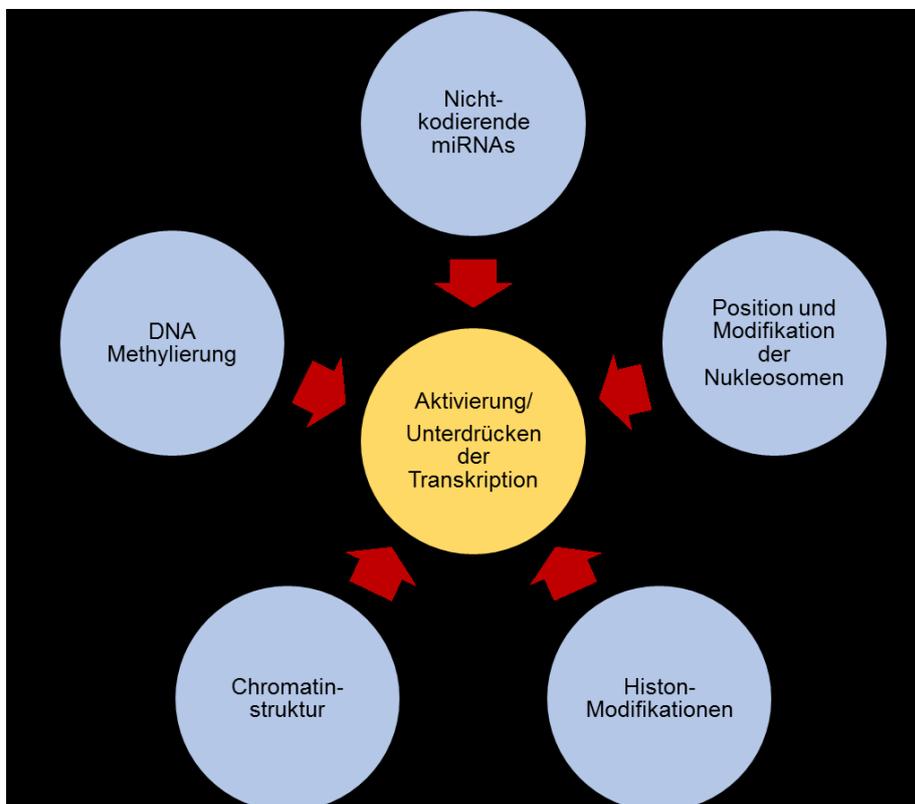
dessen sei auch der Begriff der Onkogen-induzierten Seneszenz erwähnt, als programmierte protektive Antwort des Organismus auf potentiell karzinogene Schäden. Seneszenz beschreibt dabei den dauerhaften Zellzyklusstillstand, bei dem proliferierende Zellen gegen wachstumsfördernde Stimuli resistent werden können, ausgelöst durch aktivierte Onkoproteine wie beispielsweise BRAF oder KRAS oder durch Verlust von Tumorsuppressorgenen. Dabei wird eine durch Onkogen-Aktivierung verursachte Epithelproliferation durch Induktion einer Zellzyklusblockade gegenreguliert, häufig ausgelöst durch eine DNA-Methylierung im Promotorbereich von Genen, welche im nachfolgenden Abschnitt näher beleuchtet wird. Dieser Vorgang führt zum *gene silencing*, der Hemmung der Genexpression auf Transkriptionsebene (Jass et al. 2002; Kambara et al. 2004). Häufig sind davon Zellzyklus-Kontrollgene wie p16 oder Reparaturgenen z.B. MLH1 betroffen (Carragher et al. 2010). Derartige genetische Veränderungen können in bestimmten serratierten Polypen, nicht jedoch in konventionellen Adenomen nachgewiesen werden.

Bereits in zahlreichen Studien wurde die prognostische und prädiktive Rolle der MSI beim KRK beschrieben, allerdings hat sich dieser Mechanismus bisher noch nicht in der Routinediagnostik etabliert. Beispielsweise bei einer 5-FU-basierten Chemotherapie scheint die Diagnostik auf MSI eine wichtige Rolle zu spielen: Im Falle eines negativen MSI-Nachweises kann das Überleben der Patienten durch die Chemotherapie signifikant verlängert werden, bei vorliegender MSI hingegen bringt die Therapie keinen Überlebensvorteil (Jover et al. 2009; Jo und Carethers 2006). Darüber hinaus wurde der Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab von der FDA als Therapie der letzten Wahl bei allen metastasierten soliden Krebsarten zugelassen, deren Zellen eine ausgeprägte Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) oder einen Mangel an DNA-Mismatch-Reparaturproteinen (dMMR) aufweisen (Brahmer et al. 2012; Postow et al. 2015; Boyiadzis et al. 2018). Auch speziell beim KRK gibt es Hinweise für ein erhöhtes Therapieansprechen auf Pembrolizumab bei MSI-Nachweis, hierfür werden allerdings noch größere Studien an sporadischen Formen des KRK benötigt (Le et al. 2015).

Neben sporadischen Kolonkarzinomen lässt sich die Mikrosatelliteninstabilität in 80% der Fälle beim autosomal dominant vererbten HNPCC nachweisen (Aarnio et al. 1995). Ursächlich für diese Erkrankung ist eine Keimbahnmutation eines *mismatch repair* Gens, welche das Lebenszeitrisiko eines kolorektalen Karzinoms auf ca. 80% erhöht.

#### 1.2.4. Epigenetische Veränderungen

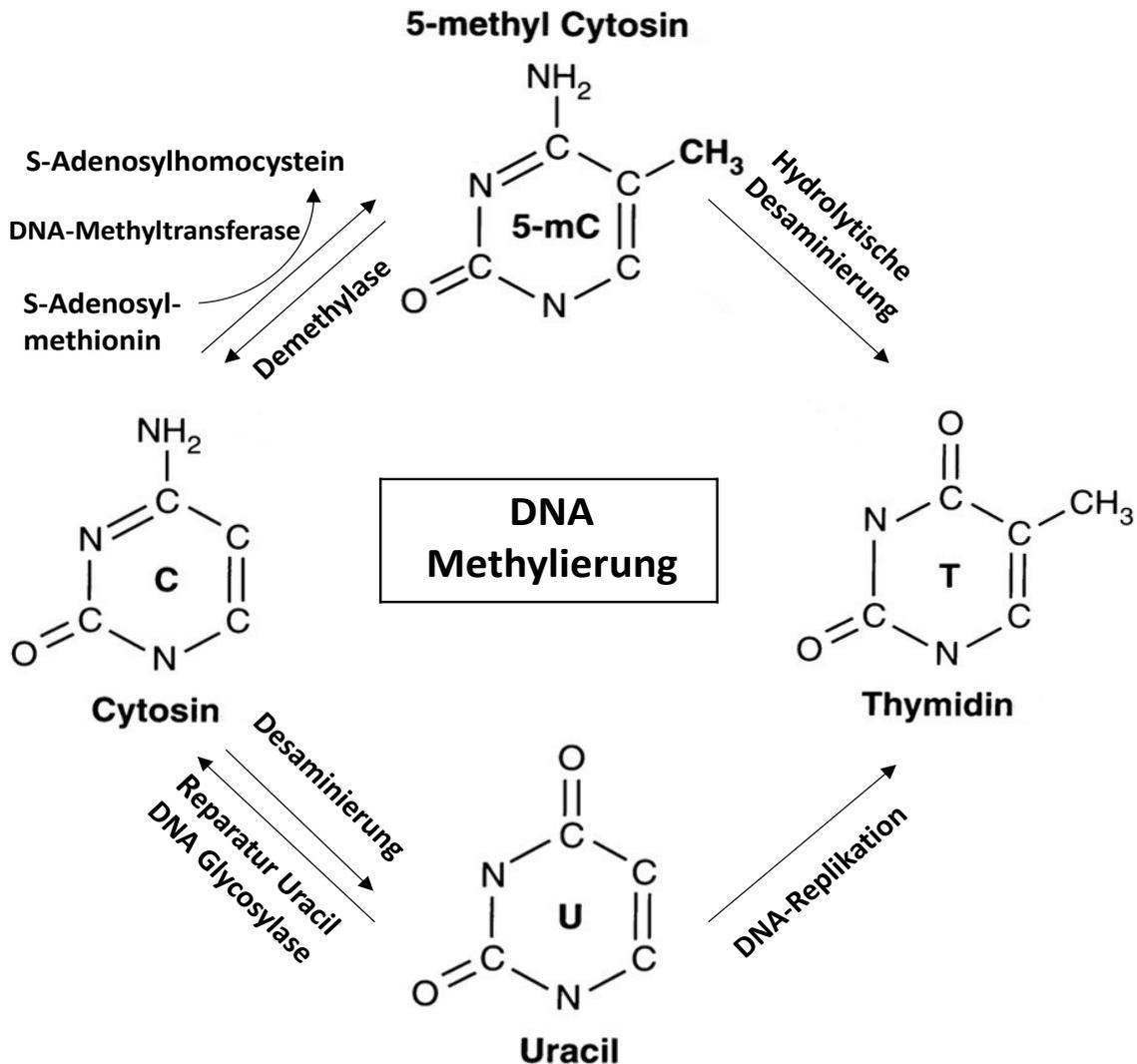
Neben der klassischen Genetik, bei der die Vererbung auf eine Veränderung im genetischen Code der DNA zurückzuführen ist, geraten epigenetische Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Die Epigenetik wurde erstmals von Conrad Hal Waddington im Jahre 1942 als „*der Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht*“ beschrieben (WADDINGTON 2015). Heutzutage ist davon auszugehen, dass es sich dabei um ein Genexpressionsmuster handelt, das vererbbar, jedoch nicht auf eine veränderte DNA-Sequenz zurückzuführen ist (Jablonka und Lamb 2002; Bird 2007). Zu den wichtigsten Regulationsmechanismen epigenetischer Modifikationen bei der Tumorentstehung zählen DNA-Hypo- und Hypermethylierungen, Histon-Modifikationen, Änderung der Chromatinstruktur, nukleosomale Veränderungen und nichtkodierende mikroRNAs (miRNAs). Diese epigenetischen Prozesse haben sowohl einzeln als auch in Kombination Einfluss auf die Transkription und können sich auch gegenseitig beeinflussen (van Engeland et al. 2011). In der nachfolgenden Abbildung 1.3 sind die verschiedenen Mechanismen dargestellt.



**Abbildung 1.3:** Mechanismen epigenetische Veränderungen beim kolorektalen Karzinom

**Quelle:** modifiziert nach: (van Engeland et al. 2011)

In dieser Arbeit sollen vor allem epigenetische Modifikationen in Form von DNA-Methylierungen vorgestellt werden. Die DNA-Methylierung ist eine chemische Modifikation, bei der aus der Base Cytosin durch Übertragung einer Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) an der 5'-Position 5-Methylcytosin entsteht. Dieser Prozess wird durch die DNA-Methyltransferase katalysiert mit S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor (Bestor 2000). Sämtliche chemischen Reaktionsschritte sind in der nachfolgenden Abbildung 1.4 zu entnehmen.



**Abbildung 1.4** Schematische Darstellung der biochemischen Prozesse der DNA-Methylierung, Demethylierung und Mutagenese von Cytosin und 5-Methylcytosin:

Aus Cytosin entsteht durch Übertragung einer Methylgruppe 5-Methylcytosin. Durch hydrolytische Desaminierung entsteht daraus ein Thymidin. Demgegenüber wird ein nicht methyliertes Cytosin zu Uracil desaminiert. Uracil wird von den DNA-Reparaturmechanismen als falsche Base erkannt und repariert. Thymidin wird demgegenüber nicht als fehlerhafte Base erkannt und die DNA eingebaut. Daraus resultiert eine Punktmutation mit möglicher Vererbung.

**Quelle:** modifiziert nach (Singal und Ginder 1999).

Die Methylierung von Cytosin findet sich ausschließlich in DNA Bereichen, bei denen der Base Cytosin ein Guanin folgt. Man spricht dann von sogenannten CpG-Dinukleotiden mit den Anteilen Desoxycytidin, Phosphorsäure und Desoxyguanosin (Bird 2002). DNA-Sequenzen mit einer Länge von 0,5-5 Kilobasen und einem GC-Gehalt von über 60% im Promotorbereich von Genen werden auch als CpG-Inseln bezeichnet (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Diese sind in normalen Zellen vor Methylierung geschützt, weisen jedoch in Tumorzellen gehäuft Methylierungsmuster auf und gehören mit zu den frühesten und häufigsten Ereignissen bei der Tumorgenese (Jones und Baylin 2002). Interessanterweise kann die DNA-Methylierung ebenso in normalen Zellen der Kolonmukosa im Sinne eines Alterungsprozesses vorgefunden werden, ein Übergang in eine Hypermethylierung im Rahmen eines Karzinoms ist möglich (Ahuja et al. 1998; Issa et al. 1994). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln führt zum bereits beschriebenen Phänomen des *gene silencing*, der Inaktivierung von Genen auf Transkriptionsebene. Ursache dafür ist eine veränderte Chromatinstruktur mit dichter gepackten Nukleosomen, die eine weitere Replikation verhindert (Bird 2002). Davon sind vor allem Tumorsuppressorgene und Gene für DNA-Reparatur, Apoptose und Zellzyklusregulation betroffen.

Des Weiteren weist die methylierte Cytosinbase selbst mutagene Eigenschaften auf, da sie chemisch instabil ist und durch spontane hydrolytische Desaminierung in Thymin umgewandelt werden kann (Coulondre et al. 1978). Außerdem greift UV-Licht bevorzugt methylierte DNA Bereiche an und Benzo(a)pyrene im Zigarettenrauch führen ebenfalls zu hydrolytischer Desaminierung.

Die Hypermethylierung beim kolorektalen Karzinom tritt bevorzugt in höherem Alter, bei weiblichem Geschlecht, Rauchern, familiärer Vorbelastung, proximaler Tumorlokalisierung und serratierten Adenomen als Vorläuferläsionen auf. Wie bereits beschrieben, beeinflussen sich Genetik und epigenetische Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese gegenseitig. So stehen DNA-Hypermethylierungen mit Mikrosatelliteninstabilitäten, BRAF- und KRAS/NRAS- Mutationen in engem Zusammenhang (van Rijnsoever et al. 2002; Frazier et al. 2003; Ogino et al. 2006c).

Neben DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich von Genen weisen viele Tumoren eine globale Hypomethylierung auf (Gama-Sosa et al., 1983; Singal and Ginder, 1999; Ehrlich, 2009). Diese ist ebenfalls mit chromosomaler Instabilität und Aktivierung von Protoonkogenen verbunden (Matsuzaki et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass epigenetische Modifikationen bei der Krebsentstehung von besonderer Bedeutung für die Wissenschaft geworden sind, da sie im Gegensatz zu genetischen Mutationen potentiell reversibel sind (Jaenisch und Bird 2003). Diese Tatsache verspricht neue Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung von Neoplasien durch spezifischen Ansatz von Medikamenten an DNA-Methylierungsmustern. Ein weiterer aktueller Forschungsaspekt ist das frühe Auftreten epigenetischer Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese, anhand derer man sich eine schnellere Diagnosesicherung und somit verbesserte Prognose für den Patienten verspricht. Die für das kolorektale Karzinom relevanten Methylierungsmarker im Blut werden in Kapitel 2.1 näher ausgeführt.

#### 1.2.4.1. CIMP-Panel

Da bei kolorektalen Adenomen und Karzinomen vermehrt gleichzeitig Methylierungen in verschiedenen CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen beobachtet werden konnten, wurden diese unter dem Namen „*CpG island methylator phenotype*“ (CIMP) zusammengefasst (Toyota et al. 1999). Dies bedeutet, dass zeitgleich verschiedene Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, die dann in ihrer Gesamtheit zu genetischer Instabilität führen. Dabei wurde als klassisches CIMP-Panel die Methylierung der Biomarker MINT1, MINT2, MINT31, CDKN2A(p16) und MLH1 beschrieben (Toyota et al. 1999). Im Laufe der Jahre wurden in der Literatur eine Vielzahl weiterer Marker beschrieben, die die geeignete Auswahl für das CIMP-Panel erschweren. Trotz dieser Diversitäten sind Charakteristika aller CIMP-positiven Tumoren, dass sie bevorzugt bei Frauen und späterem Erkrankungsalter vorkommen, eine proximale Lokalisation und ein höheres Tumorigrad, ebenso wie gemeinsame genetische Veränderungen aufweisen (Ogino et al. 2009b; Hawkins et al. 2002). Wie bereits im Kapitel 1.2.3. erläutert, konnte gezeigt werden, dass ein CIMP-positiver Status bevorzugt mit einer BRAF-Mutation und einer Hypermethylierung von MLH1 im Sinne einer Mikrosatelliteninstabilität einhergeht (Suzuki et al. 2010; Hinoue et al. 2009; Weisenberger et al. 2006). *CIMP-low*, das die Methylierung weniger Genorte beschreibt, ist hingegen mit KRAS-Mutationen assoziiert und tritt bevorzugt bei männlichen Erkrankten auf (Ogino et al. 2006b).

2006 wurde von Weisenberger et al. ein Panel aus den Biomarkern CACNA1G, IGF2, NEUROG-1, RUNX3 und SOCS1 und ebenfalls von Ogino et al. aus CACNA1G, CDKN2A (p16), CRABP1, MLH1 und NEUROG-1 beschrieben. Ein Tumor wird dabei

als CIMP-positiv bezeichnet, wenn mindestens drei bzw. vier der fünf Marker positive Messwerte aufweisen (Ogino et al. 2006a; Weisenberger et al. 2006). Das Panel von Weisenberger et al. bildete die Grundlage vieler Studien, die Untersuchungen des CIMP-Panels durchführten und diese Kombination um zusätzliche Biomarker erweiterten. Im Jahr darauf erfolgte beispielsweise ein Vergleich der beschriebenen Panels mit dem Ergebnis, dass die Kombination der vier Biomarker RUNX3, CACNA1G, IGF2 und MLH1 die höchste Testgüte aufweist (Ogino et al. 2007). Im Jahr 2010 wurden erneut Markerpanels beschrieben und eine Einteilung je nach deren Positivität in *high*-, *intermediate*- und *low*-Epigenomtypen vorgenommen (Yagi et al. 2010).

Um möglichst viele CpG-Orte des Genoms untersuchen zu können, kommen zunehmend auch genomweite quantitative Methylierungsanalysen zur Anwendung (Sandoval et al. 2011; Hinoue et al. 2012). Beispielsweise wurde von Hinoue et al. eine genomweite Untersuchung an 125 Kolontumoren und 29 gesunden Gewebeproben mithilfe des *Illumina Infinium HM27DNA methylation Assays* durchgeführt. Dadurch wird ermöglicht, größere Panels und vier Untergruppierungen der CIMP-Tumoren zu analysieren (Hinoue et al. 2012). Eine ähnliche Studie von McInnes et al. wies bei 94 Gewebeproben von Patienten mit KRK Methylierungen von 132 Genen in 100% aller Patienten der CIMP-positiven Subgruppe nach. Dabei dominierte die Methylierung der Gene EYA4, TLX1 und TFPI2 bei 90% aller Proben (McInnes et al. 2017).

Studien bezüglich des CIMP-Panels finden sich am häufigsten für das kolorektale Karzinom. Darüber hinaus ist die gleichzeitige Methylierung im CpG-Bereich von Genen auch bei zahlreichen weiteren Tumorentitäten zu finden. Sánchez-Vega et al. setzen sich zum Ziel, Übereinstimmungen in methylierten Genorten der verschiedenen Tumorarten zu detektieren. Die Analyse von 5253 soliden epithelialen Tumoren aus 15 Tumorarten und 23 Tumorzelllinien mithilfe der *Illumina Human Methylation450K*-Plattform brachte die Erkenntnis, dass die Testung auf Methylierung bei einem Panel von 89 Genorten eine Unterscheidung in CIMP-positive und CIMP-negative bei 12 Tumorarten zulässt (Sanchez-Vega et al. 2015).

Insgesamt wurde eine Vielzahl an Studien zur Analyse des CIMP-Status bei Patienten mit KRK durchgeführt. Die Einführung genomweiter Methylierungsanalysen liefert einen wichtigen Ansatz zur Identifikation eines Markerpanels für alle Tumorarten gemeinsam und den einzelnen Entitäten. Dennoch ist aufgrund der teilweise kontroversen Ergebnisse und unterschiedlichen Markerpanels bisher keine einheitliche Empfehlung bezüglich der Überlegenheit einer Markerkombination möglich. Die nach wie vor

am häufigsten untersuchten Marker sind von Weisenberger et al. vorgeschlagenen 5 Gene aus CACNA1G, NEUROG1, RUNX3, SOCS1 und IGF2 (Weisenberger et al. 2006).

### 1.3. Lokalisation und Stadieneinteilung des KRK

Kolorektale Karzinome finden sich im Dickdarm am häufigsten im Rektosigmoid (ca. 55 %), gefolgt von rechtsseitigen Kolonkarzinomen mit 13% im Zökumbereich und 9% im Colon ascendens. Karzinome im Colon transversum (11%) und descendens (9%) kommen seltener vor. Mehrfache Karzinome treten in 2-3% der Fälle auf, bei mehr als 90% der Fälle handelt es sich dabei um Adenokarzinome.

Das kolorektale Karzinom kann mithilfe des TNM-Systems in Stadien eingeteilt werden. Dabei handelt es sich um ein prognoseorientiertes Klassifikationssystem der UICC (= *Union internationale contre le cancer*), mithilfe dessen die Patienten je nach Ergebnis des prätherapeutischen (klinisches TNM = cTNM) oder postoperativen Stagings (pTNM) einem Tumorstadium zugeordnet werden.

Des Weiteren werden konventionelle Adenokarzinome anhand struktureller Atypien in drei Differenzierungsgrade (G1–G3) unterteilt. G1- und G2-Tumoren werden dabei als *low-grade*-Karzinome, G3-Tumoren und undifferenzierte Karzinome als *high-grade*-Karzinome bezeichnet (Herold, 2016).

<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
<b>T1</b>	Infiltration der Tela submucosa
<b>T2</b>	Infiltration der Tunica muscularis
<b>T3</b>	Infiltration der Subserosa
<b>T4</b>	Infiltration von Nachbarorganen oder des <u>Peritoneum viscerale</u>
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in einem bis drei regionären Lymphknoten (LK) N1a: Metastasen in 1 regionären LK N1b: Metastasen in 2 bis 3 regionären LK N1c: Tumorknötchen im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne perikolischen/-rektalen Fettgewebe ohne regionäre LK-Metastasen
<b>N2</b>	Metastasen in vier oder mehr regionären Lymphknoten N2a: Metastasen in 4 bis 6 regionären LK N2b: Metastasen in 7 oder mehr regionären LK
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

M1a: Metastasen auf ein Organ beschränkt
M 1b: Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

**Tabelle 1.1** TNM-Klassifikation (UICC, 2010)

*Quelle:* (Herold 2016)

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 – 2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIB	T3 – 4	N1	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	Jedes T	jedes N	M1b

**Tabelle 1.2:** Stadiengruppierung (UICC, 2010)

*Quelle:* (Herold 2016)

## 1.4. Therapie des kolorektalen Karzinoms

Da im Rahmen dieser Arbeit bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom nach einer einheitlichen Induktionschemotherapie die Randomisierung zu einer der drei Erhaltungskemotherapien erfolgt, sollen im Folgenden wichtige Therapiegrundzüge und Chemotherapieschemata des KRK erklärt werden.

### 1.4.1. Kurative chirurgische Therapie

Bei prämaligen Läsionen und Frühkarzinomen, d.h. Karzinomen mit Ausdehnung bis zur Tela submucosa (T1) ohne Lymphgefäß- oder Veneninvasion im Differenzierungsgrad G1-2, haben in den letzten Jahren endoskopische Verfahren wie die endoskopische Mukosaresektion (EMR) an Bedeutung gewonnen. Therapie der Wahl bei einem zuvor mittels Koloskopie histologisch gesicherten Kolonkarzinom stellt nach Möglichkeit die *En-bloc*-Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes mit zugehörigem

Lymphabflussgebiet dar. Dabei sind die Langzeitergebnisse bezüglich Krankheitsverlauf, Rezidivrate und Gesamtüberleben der Laparotomie denen des laparoskopischen Vorgehens gleichwertig (Ohtani et al. 2011; Wang et al. 2014). Bei der chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms sollte neben dem betroffenen Darmabschnitt auch das Mesenterium und mindestens 12 regionäre Lymphknoten entfernt werden. Beim Rektumkarzinom hingegen besteht die Möglichkeit einer tiefen anterioren Rektumresektion, einer abdomino-perinealen Rektumexstirpation oder der intersphinktären Rektumresektion jeweils mit Entfernung des Mesorektems. Allen Methoden liegt die *no-touch*-Technik zugrunde, um eine intraoperative Tumorzellverschleppung zu vermeiden. Falls aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes, einer fortgeschrittenen Metastasierung oder lokaler Inoperabilität eine radikale Resektion des Primärtumors nicht möglich ist, macht in einigen Fällen ebenfalls ein operatives *Debulking* Sinn, um tumorassoziierten Komplikationen wie Blutungen, Perforationen oder Darmverschlüssen vorzubeugen. Fernmetastasen in der Leber oder Lunge sollten im Falle eines dadurch möglichen kurativen Therapiekonzepts ebenfalls entfernt werden. (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 -Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021 - 007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 18.02.2017])

#### 1.4.2. Adjuvante Chemotherapie

Beim Kolonkarzinom im UICC-Stadium III sowie Stadium II mit Risikoprofil (pT4-Tumore, Tumorperforation/-einriss, Notfalloperation, <12 untersuchte Lymphknoten) verbessert eine adjuvante Chemotherapie die Prognose des Patienten und verringert das Rezidivrisiko. Voraussetzung für eine adjuvante Chemotherapie ist zum einen eine R0-Situation nach chirurgischer Resektion und zum anderen das Fehlen von Fernmetastasen. Diese sollte am besten in einem Zeitraum von 8 Wochen nach Operation begonnen werden. Bei Entscheidung für eine Chemotherapie im Stadium UICC II kommt eine Fluoropyrimidin-Monotherapie zum Einsatz, da eine Kombination mit Oxaliplatin keinen Überlebensvorteil bringt (Tournigand et al. 2012). Im Stadium UICC III gilt eine Oxaliplatin-haltige Chemotherapie als Standard. Im Rahmen von multizentrischen Studien, wie beispielsweise der MOSAIC-Studie, konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Oxaliplatin zu 5-Fluorouracil und Folinsäure als FOLFOX-Schema das Überleben der Patienten verlängern konnte (Andre et al. 2009). Diesem

Schema als gleichwertig anzusehen ist das seit 2010 zugelassene XELOX-Schema (Haller et al. 2011). Dieses besteht aus einer Kombination aus Capecitabin und Oxaliplatin und bietet den Vorteil einer oralen Gabe.

Neben der Chemotherapie nimmt beim Rektumkarzinom aufgrund seiner hohen Lokalrezidivrate die Radiotherapie einen hohen Stellenwert ein. Deshalb findet im UICC-Stadium II und III als neoadjuvantes Therapieverfahren bevorzugt eine kombinierte Radiochemotherapie Verwendung. Ziel ist bei ausgedehntem Tumorbefall eine Größenreduktion und bei weit distal gelegenem Karzinom der Sphinktererhalt. Im Vergleich zur adjuvanten Therapie konnte jedoch kein verlängertes Überleben festgestellt werden (Sauer et al. 2004; Sauer et al. 2012). Eine adjuvante Chemotherapie nach einem 5-Fluorouracil basierten Regime sowie eine postoperative Radiotherapie wird im Stadium II und III im Falle eines hohen Rezidivrisikos ebenfalls empfohlen, falls zuvor nicht bereits eine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde.

#### **1.4.3. Therapiekonzepte bei Metastasierung und palliativer Situation**

Bei Erstdiagnose ist bereits bei 35% der Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Fernmetastasierung nachweisbar (Field 2007). In diesem Fall gibt es zwei Therapieoptionen: Den einzig kurativen Ansatz ermöglicht die chirurgische Resektion der Metastasen, die neben lokalen Ablationsverfahren wie der Kryotherapie und Radiofrequenzablation Methode der Wahl ist. Sollte das Entfernen der Fernmetastasen aufgrund ihrer Größe zunächst technisch nicht machbar sein, kann eine Konversionstherapie in Form einer intensiven Chemotherapie durch *Downsizing* (=Verkleinerung) der Herde eine sekundäre Operabilität ermöglichen und damit die Prognose des Patienten verbessern (Giacchetti et al. 1999; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 -Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021 -007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 18.02.2017]). Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf mit ausgeprägter Metastasierung und Inoperabilität wird im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz ein individuelles, palliatives Therapiekonzept festgelegt. In den vergangenen Jahren konnte die Prognose der Patienten mit metastasierten KRK und palliativem Therapieplan aufgrund des Einsatzes neuer Chemotherapeutika und zielgerichteter Substanzen signifikant verbessert werden. Studien zeigen eine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens auf über 30 Monaten bei Behandlung dieser Patientengruppe mit einer Kombinationschemotherapie im Vergleich

zu einer rein nichtmedikamentösen Behandlung mit einer medianen Überlebenszeit von nur sechs Monaten (Heinemann et al. 2014). Generell ist bei Ausschluss der Resektabilität stets eine medikamentöse Polychemotherapie zu empfehlen, die gegebenenfalls um eine Antikörpertherapie erweitert wird. Die Kombination mehrerer Substanzen erlaubt eine niedrigere Dosierung der einzelnen Medikamente bei insgesamt besserer Wirksamkeit aufgrund verschiedener Angriffsorte der Therapeutika. Am häufigsten werden Kombinationschemotherapien aus Folinsäure und 5-Fluorouracil in Kombination mit Oxaliplatin als Platinderivat (FOLFOX) oder dem Topoisomerasehemmer Irinotecan (FOLFIRI) verwendet, sowie eine orale Therapie mittels CAPOX-Schema, bestehend aus Oxaliplatin und Capecitabin.

Seit 2005 ist der Angiogenesehemmer Bevacizumab in Kombination mit Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapien zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zugelassen. Dabei handelt es sich um einen Immunglobulin G1-Antikörper gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*engl.: Vascular Endothelial Growth Factor*). Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Gefäßneubildung von Tumoren durch Stimulation der Vaskulo- und Angiogenese über VEGF-Rezeptoren (Presta et al. 1997; Ferrara und Davis-Smyth 1997; Folkman 1971). Zahlreiche Phase-III-Studien konnten ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben unter Hinzunahme von Bevacizumab als *first-* und *second-line* Therapieform zeigen (Hurwitz et al. 2004; Saltz et al. 2008; Giantonio et al. 2007).

Darüber hinaus kommen Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (*engl.: epidermal growth factor receptor*) in der Therapie des KRK zur Anwendung. Als Substanzen stehen Cetuximab und Panitumumab zur Verfügung. Von einer Therapie mit einer der beiden Therapeutika profitieren allerdings nur Patienten mit RAS-Wildtyp, der Nachweis einer Mutation führte im Rahmen von Studien zu einer verkürzten Überlebenszeit. Mutationen im KRAS-Gen finden sich meist im Exon 2 und weniger häufig in den Exonen 3 oder 4, ebenso wie in den Exonen 2,3 und 4 des eng verwandten NRAS-Gens. Daher sollte eine Mutationsanalyse aller dieser Exone vor Einleitung einer anti-EGFR-Therapie durchgeführt werden. (Lievre et al. 2006; Pentheroudakis et al. 2013; Karthaus et al. 2016; Stintzing et al. 2016).

Des Weiteren sind noch der VEGF-Inhibitor Aflibercept und der orale Multikinase-Inhibitor Regorafenib als Reservemittel zugelassen.

Auf die Induktionschemotherapie folgt in der Regel eine Erhaltungstherapie. Dabei muss die potentiell verlängerte Überlebenszeit stets der Toxizität und damit einhergehenden Nebenwirkungen einer Therapie gegenübergestellt werden. An dieser Stelle setzt die in dieser Dissertation betrachtete Studie AIO KRK 0207 an.

## 1.5. Prognose des kolorektalen Karzinoms

Die Einschätzung der Prognose ist sowohl bei der Planung von Therapie und Nachsorge eines Krebspatienten, als auch in der klinischen Forschung von zentraler Bedeutung. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller an Darmkrebs erkrankter Patienten liegt im Mittel bei etwa 40 bis 60 % und ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Am entscheidendsten ist dabei das TNM-Stadium mit Infiltrationstiefe, Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung. Je nach Tumorstadium (UICC I-III) sind 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 95%, 85% und 55% beim Kolonkarzinom bzw. bis zu 95%, 85% und 65% beim Rektumkarzinom zu erwarten (Herold 2016). Die Prognose im Stadium IV ist sehr variabel und hängt von einer Vielzahl von Begleitfaktoren ab, beispielsweise dem Allgemeinzustand des Patienten, dem Nodalbefall, krankheitsfreien Intervall und der ausgewählten Therapiestrategie. Neben der Anzahl der befallenen Lymphknoten ist dabei auch die Anzahl der entfernten Lymphknotenstationen von Relevanz. Beispielsweise konnten die INTACC-Studie mit 3491 und die INT-0089 Studie mit 3411 eingeschlossenen Patienten zeigen, dass die Prognose mit der Zahl der untersuchten Lymphknoten korreliert (Prandi et al. 2002; Le Voyer et al. 2003).

Ein weiterer unabhängiger Prognosefaktor ist die R-Klassifikation, die das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors nach Therapie beschreibt (Compton et al. 2000). Ob eine R0-Situation ohne Residualtumor erreicht wird, hängt maßgeblich von der Radikalität der Operation und von der Expertise und Sorgfalt des behandelnden Chirurgen ab (Anwar et al. 2012; Panageas et al. 2003). Des Weiteren ist die Invasion venöser (V) und/oder lymphatischer (L) Gefäße und die perineurale Infiltration sowie die histologische Zuordnung des Tumors und der Differenzierungsgrad prognoserelevant. In den letzten Jahren hat sich die Wissenschaft zunehmend zum Ziel gesetzt, molekulare Marker als potentielle Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms zu detektieren. In Zusammenhang damit zeigte sich bei Patienten mit einem präoperativ erhöhten CEA-Wert (>5 ng/ml) ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko (Duffy 2001a). Auf das CEA und weitere wichtige Biomarker und deren Prognoserelevanz wird in Kapitel 2

detaillierter eingegangen. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Studien über die Expression von Onkogenen, die teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Einen vielversprechenden Ansatz bot zunächst der Heterozygotieverlust auf Chromosomarm 18q (18q LOH), dessen Prognoserelevanz sich jedoch nicht bestätigen ließ, da die Mikrosatelliteninstabilität als Confounder nicht berücksichtigt worden war (Ogino et al. 2009a). Im Rahmen einiger Studien konnte nämlich gezeigt werden, dass eine hohe Mikrosatelliteninstabilität im Rahmen der Karzinogenese mit einer besseren Prognose in Zusammenhang steht (Watanabe et al. 2001; Ogino et al. 2009a). Dies hängt vor allem mit einer geringeren Rate an Fernmetastasierungen zusammen (Roth et al. 2012; Malesci et al. 2007).

## **2. Biomarker beim kolorektalen Karzinom**

Kolorektale Karzinome geben kontinuierlich DNA, RNA und Zellen nicht nur in den Stuhl, sondern auch in die Blutbahn ab. Daher ist die Detektion von DNA in Form eines Bluttests seit längerem Gegenstand intensiver Forschungen: Der verlässliche Nachweis von DNA im Blut wäre aufgrund des risikoarmen Verfahrens und der geringen Belastung für den Patienten und dahingehend einer hohen Akzeptanz in der Bevölkerung eine optimale Screeningmethode. Im Folgenden sollen zunächst allgemeine Aspekte zur Detektion von Biomarkern im Blut erläutert und im Anschluss wichtige Biomarker vorgestellt werden.

### **2.1. Allgemeines zum Nachweis von Biomarkern im Bluttest**

Die Diagnostik eines Tumors im Kolon erfolgt primär über eine Gewebeprobe mittels Koloskopie und anschließender histologischer Aufarbeitung. Da aber eine Gewebeprobe ein eventuell unzulängliches Bild des Gesamttumors abgibt und durch das invasive Verfahren für die Patienten mit hohen Strapazen verbunden ist, erhoffen sich Forscher, durch das Verfahren der sogenannten *liquid biopsy* (dt.: flüssige Biopsie) aus Körperflüssigkeiten wie Blut molekulare Informationen über eine Krebserkrankung gewinnen zu können. Neben frei im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die aufgrund ihrer äußerst geringen Mengen nur schwer anzureichern sind, sowie mikroRNAs nimmt die frei-zirkulierende DNA (fc-DNA) eine zentrale Bedeutung bei der *liquid bi-*

*opsy* ein. Bei der frei-zirkulierenden DNA handelt es sich um zellfreie, kurze DNA-Abschnitte, die vom Tumor infolge von Apoptose- und Nekroseprozessen in die Blutbahn abgegeben werden und auf genetische und epigenetische Veränderungen untersucht werden können (Schwarzenbach et al. 2011). Darüber hinaus wird cf-DNA auch bei erhöhtem Zellumsatz im Rahmen entzündlicher oder immunologischen Prozessen freigesetzt und ist somit nicht tumorspezifisch (Swaminathan und Butt 2006). Die durchschnittlich Länge der Fragmente beträgt 160 Basenpaare (Pantel und Alix-Panabières 2019), sodass es sich insgesamt um sehr geringe Mengen an DNA handelt. Es sind bereits eine Vielzahl an Untersuchungen an der cf-DNA durchgeführt worden mit zum Teil kontroversen Ergebnissen, beispielsweise bezüglich des Zusammenhangs der Integrität der cf-DNA und der Tumorproliferation. Anhand der *liquid biopsy* sind sämtliche Genomanalysen der Tumor-DNA möglich, insbesondere der Nachweis von DNA-Aberrationen und Genmutationsdiagnostik. Allerdings erschweren die geringen DNA-Mengen, der hohe DNA-Zerfall sowie die der cf-DNA beigemischte normale DNA die Diagnostik, sodass äußerst sensible Nachweismethoden benötigt werden (Volik et al. 2016). Des Weiteren sind epigenetische Veränderungen und im Speziellen die Hypermethylierung der cf-DNA im Fokus der Wissenschaft und Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Wünschenswertes Ziel bei dieser Diagnostikmethode wäre es, die Tumorerkrankung im besten Fall in einem sehr frühen Stadium detektieren und durch komplikationslose und regelmäßige Blutentnahmen kontinuierlich den Krankheitsverlauf, das Therapieansprechen und ein Rezidiv überwachen zu können. Anforderungen an einen Biomarker sind dabei, dass er tumorspezifisch ist, quantitativ die Tumorgöße beschreibt und in ausreichenden Mengen im Blut vorzufinden ist, sodass selbst kleinste Tumoren einer Diagnostik nicht entgehen können. Bis die geeigneten Marker dann in der Routinediagnostik in der Klinik Verwendung finden, müssen zahlreiche Hürden überwunden werden. Neben der hohen Sensitivität und Spezifität muss ein möglichst kosten- und zeiteffizientes Verfahren zur Standardisierung der Probengewinnung und -aufbereitung sowie der DNA-Analysemethoden mit hoher Testwiederholbarkeit entworfen werden.

## **2.2. Wichtige Tumormarker im Blut beim kolorektalen Karzinom**

Nachfolgend sollen sowohl bereits etablierte Tumormarker als auch neue potentielle epigenetische Biomarker im Blut beim KRK vorgestellt werden. Da eine Vielzahl an verschiedenen Markern in der Literatur beschrieben sind, sind im Folgenden nur einige Wichtige aufgeführt.

### **2.2.1. CEA als etablierter Tumormarker des kolorektalen Karzinoms**

Beim carcinoembryonalen Antigen (CEA) handelt es sich um ein embryonales Zelloberflächenantigen der kolorektalen Schleimhaut und Magenschleimhaut. Es ist ein Glykoprotein aus der Familie der Immunglobuline, für das eine Gruppe von 29 Genen auf Chromosom 19q kodiert (Duffy 2001b). Das CEA wird in der Embryonal- und Fetalperiode physiologischerweise produziert und postnatal in seiner Bildung supprimiert, sodass nach Geburt nur noch sehr geringe Konzentrationen im Blut nachweisbar sind. 1965 konnte das CEA erstmals von Gold und Freedman auch bei Karzinompatienten detektiert werden. Ursächlich hierfür ist das Potential der Tumorzellen, die postnatale Suppression des CEAs aufheben zu können (Gold und Freedman 1965).

CEA ist das am häufigsten evaluierte tumorassoziierte Antigen beim kolorektalen Karzinom und findet sich in etwa 90% der Fälle in erhöhter Konzentration auf der Zelloberfläche und wird von dort in Körperflüssigkeiten abgegeben (Goldstein und Mitchell 2005a; Gold und Freedman 1965). Darüber hinaus wird es auch beim Mamma-, Bronchial-, Pankreas- und Magenkarzinom als Tumormarker eingesetzt. Leichte bis mäßige CEA-Anstiege finden sich ebenfalls bei einigen gutartigen Erkrankungen wie der Leberzirrhose, Hepatitis, Pankreatitis, Colitis ulcerosa und Magengeschwüren sowie bei Alkoholikern und Rauchern.

Aufgrund seiner niedrigen Spezifität eignet sich dieses Oberflächenantigen nicht als Screeningmarker im Rahmen der Früherkennung beim kolorektalen Karzinom. Jedoch gilt es als Indikator für ein Rezidiv im Rahmen der Tumornachsorge und hinsichtlich der Prognose als Tumormarker der ersten Wahl. So konnte im Rahmen von Studien belegt werden, dass das CEA eine sehr hohe Sensitivität für eine neu aufgetretene Lebermetastasierung besitzt (Moertel 1993). Daher empfehlen die Leitlinien der European Group on Tumor Markers (EGTM) das CEA als einzigen Tumormarker beim kolorektalen Karzinom zur postoperativen Tumornachsorge und mit etwas geringerer

Evidenz zu Prognoseabschätzung und Therapiemonitoring (Duffy et al. 2014). Zur Tumornachsorge wird das CEA daher standardmäßig über 2 Jahre alle 6 Monate bestimmt (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

Des Weiteren korrelieren erhöhte präoperative CEA-Werte mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und einer schlechteren Prognose für den Patienten (Thirunavukarasu et al. 2011; Wang et al. 2000; Park et al. 1999; Yuste et al. 2003). Daher wird von der kolorektalen Arbeitsgruppe des American Joint Committee on Cancer (AJCC) empfohlen, den CEA-Wert in der TNM-Klassifikation zu berücksichtigen (Compton et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das CEA beim kolorektalen Karzinom nach wie vor als Tumormarker Goldstandard ist, mit dem jeder neue Tumormarker hinsichtlich seiner Aussagekraft verglichen werden sollte. Daher dient das CEA auch in dieser Dissertation als Vergleichsparameter für den untersuchten Methylierungsmarker HPP1.

### **2.2.2. Ca-19-9**

Ein weiterer häufig bestimmter Tumormarker ist das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9). Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein, das eine zentrale Bedeutung als Tumormarker des Pankreaskarzinoms besitzt und dabei im Rahmen einer großen Studie mit 2282 Patienten eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 82% aufwies (Goonetilleke und Siriwardena 2007). Neben nichtmalignen Erkrankungen wie der Leberzirrhose und Pankreatitis sowie Karzinomen der Gallengänge und des Magens finden sich nur etwa bei 20-40% aller kolorektalen Karzinome erhöhte CA 19-9 Werte (Filella et al. 1994). Hinsichtlich der Vorhersagekraft eines Therapieansprechens oder eines Krankheitsrezidivs bringt dieser Tumormarker beim kolorektalen Karzinom keine Vorteile gegenüber der alleinigen Bestimmung des CEA-Wertes (Bast, JR et al. 2001).

### **2.2.3. LDH**

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die reversible Umwandlung von Pyruvat in Laktat im Rahmen der anaeroben Glykolyse und ist in den Zellen nahezu aller Lebewesen vorzufinden. Die LDH wird in der laborchemischen Routinediagnostik benutzt, um erhöhte Zellschädigung und Zellzerfall nachzuweisen. Durch Bestimmung unterschiedlicher Isoformen kann nachvollzogen werden, in welchem Organ die Zell-

schädigung aufgetreten ist. Erhöhte Werte im Blut finden sich unspezifisch bei Erkrankungen wie beispielsweise Herzinfarkten, Hämolyisen oder Tumorerkrankungen (Huijgen et al., 1997). Der Anstieg des LDHs im Rahmen von Neoplasien ist auf die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) zurückzuführen. HIF-1 führt als Reaktion auf eine Hypoxie zu einer verstärkten Angiogenese über VEGF und zur Induktion von Enzymen der anaeroben Glykolyse mit Bildung von Laktat (Firth et al., 1994; Semenza, 2012). Bei Hodentumoren und non-Hodgkin Lymphomen gelten erhöhte LDH-Werte als Prognosemarker und bei Keimzelltumoren können sie zur Verlaufs- und Therapiebeobachtung verwendet werden. Ein erhöhter LDH-Spiegel steht auch beim KRK mit einem aggressiveren Tumor und verkürzter Überlebenszeit in Verbindung. Eine Studie von Philipp et al. zeigte bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf eine positive Korrelation von erhöhten LDH-Spiegeln mit methyliertem HLTF und HPP1. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und erhöhtem Zelltod schließen (Philipp et al., 2014). Außerdem weisen Studien darauf hin, dass ein erhöhter prätherapeutischer LDH-Werte Indikator für ein besseres Therapieansprechen von Angiogenesehemmern ist (Scartozzi et al. 2012; Passardi et al. 2015).

#### **2.2.4. Septin 9**

Der Nutzen einer epigenetischen Diagnostik im Blut von Patienten mit KRK ist derzeit am besten für den Methylierungsmarker Septin 9 belegt. Seit Oktober 2009 ist eine Testung dieses Biomarkers unter dem Handelsnamen Epi proColon® verfügbar und seit April 2016 von der amerikanischen FDA als erster und einziger epigenetischer Bluttest zur Früherkennung von Darmkrebs zugelassen. Epi proColon® ist ein PCR-basierter Test zum qualitativen Nachweis von methyliertem Septin 9 (SEPT 9) in freizirkulierender DNA im Blut (Lofton-Day et al. 2008). Dieses Gen kodiert die genetische Information für das Septin 9-Protein, einem GTP-bindenden Protein mit Einfluss auf Zellzyklus und Zytokinese (Hall und Russell 2004). Mutationen in diesem Gen können zur Entstehung eines Ovarialkarzinoms oder myelomonozytären Leukämien beitragen und eine hereditäre Schulteramyotrophie bedingen (SEPT9 septin 9 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI). Im Gegensatz zu gesunden Zellen finden sich bei Darmkrebszellen epigenetische Veränderungen in Form von Methylierung des Cytosins in der v2-Region des Septin 9 Promotors (Lofton-Day et al. 2008). Eine große Multicenterstudie in 32 Kliniken in Deutschland und der USA von Church et al. befasste sich

mit den Gütekriterien dieses Testverfahrens. Dabei wurde von 6874 Patienten, davon 53 Patienten mit KRK und 3025 mit Adenomen, die Ergebnisse der Koloskopie mit denen des Methylierungsstatus von Septin 9 im Plasma mittels Epi proColon®-Test der ersten Generation verglichen (Church et al. 2014). Dabei zeigte sich eine Sensitivität für das KRK von 48,2% (95% CI: 32,4% - 63,6%) mit höchsten Werten von 77,4 bei Patienten mit KRK Stadium IV, Vorstufen des KRK in Form von Adenomen wiesen eine sehr niedrige Sensitivität von lediglich 11,2% auf. Die Spezifität für das KRK betrug 91,5%. Diese große Analyse zeigt, dass der Test mit steigender Zuverlässigkeit ein KRK im fortgeschrittenen Stadium detektieren kann, jedoch seine Schwächen in der Früherkennung aufweist. Sechs weitere Studien untersuchten die Methylierung von Septin 9 mithilfe eines PCR-Nachweises aus cf-DNA im Blut. Dabei konnte bei 60-95% aller Tumorpatienten die Methylierung von Septin 9 als epigenetische Veränderung festgestellt werden ( (Grutzmann et al. 2008; Devos et al. 2009; Lofton-Day et al. 2008; Ahlquist et al. 2012; Herbst und Kolligs 2012; Warren et al. 2011).

Laut Herstellerangaben verspricht die 2. Generation des Septin 9-Tests eine höhere Sensitivität von 80,6% und eine Spezifität von 99,3% zur Detektion des kolorektalen Karzinoms (machmabunt ® Munzinger & Jaecklin GbR), bei positivem Testergebnis ist aber weiterhin eine Koloskopie erforderlich. Derzeit ist der Septin 9-Test keine Kassenleistung, die Kosten von 100-160 € müssen vom Patienten selbst getragen werden (Toth et al. 2012).

### **2.2.5. HPP1**

Das hyperplastic polyposis 1-Gen (HPP1), unter anderem auch als TPEF (engl.: *transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domain*) oder TMEFF2 (engl.: *transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2*) bezeichnet, kodiert für ein Transmembranprotein. Dieses trägt eine für den epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Bindungsstelle und zwei Follistatin-Domänen und spielt eine Rolle als Wachstumsfaktor und Zellzyklusregulator. HPP1 zeigt im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen eine Hypermethylierung. Young et al. fanden als Erste in ihrer Studie heraus, dass HPP1 neben seiner Expression in Zellen der gesunden Darmmukosa bei Adenomen, hyperplastischen Polypen und kolorektalen Karzinomen eine Methylierung aufweist (Young et al. 2001). Ebert et al. konnten ebenfalls eine Hypermethylierung von HPP1 beim metastasierten KRK im Primärtumor und in Lebermetastasen nachweisen (Ebert et al. 2005). In der gesunden Zelle spielt HPP1

in seiner Funktion als Tumorsuppressorgen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signaltransducer and activator of transcription 1* (STAT1), der hemmenden Einfluss auf Tumorangiogenese, -wachstum und Metastasierung besitzt, eine wichtige Rolle (Elahi et al. 2008; Huang et al. 2002). Die Methylierung dieses Gens bei Tumorpatienten führt dabei zur Inaktivierung.

Mehrere Studien belegen, dass die Detektion von methyliertem HPP1 bei Patienten mit KRK ein unabhängiger prognostischer Marker ist und mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergeht (Wallner et al. 2006b; Philipp et al. 2012; Herbst et al. 2009; Elahi et al. 2008). In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit konnte HPP1 neben seiner Bedeutung als Prognosemarker zusätzlich als Marker für das Therapieansprechen im Rahmen der AIO KRK 02/07-Studie bei der Induktionstherapie identifiziert werden (Herbst et al. 2017). Diese Studie und ihre Ergebnisse werden im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert.

#### **2.2.6. HLTF**

Der *helicase like transcription-Factor* gehört zu SWI/SNF-Familie (engl.: *Swlch /Sucrose NonFermentable*). Enzyme dieser Gruppe besitzen Helikase- und ATPase-Aktivität und fungieren als Transkriptionsregulatoren, indem sie die Chromatinstruktur modulieren (Muchardt und Yaniv 1999; Pazin und Kadonaga 1997). 2002 wurde in der Arbeit von Moinova methyliertes HLTF in 43% aller kolorektalen Tumorzellreihen detektiert. Außerdem konnte HLTF als potentiell Tumorsuppressorgen identifiziert werden, da die Hypermethylierung dieses Gens zu einer unterdrückten Genexpression führte (Moinova et al. 2002). 2005 wurde erstmalig die Promotor-Hypermethylierung von HLTF im Blut bei KRK untersucht, dabei konnte eine signifikant höhere Konzentration methylierter HLTF-Gene als bei den gesunden Kontrollpatienten gefunden werden (Leung et al. 2005). Außerdem wurde in Studien von Wallner et al und Herbst et al die Methylierung von HLTF im Serum von Patienten mit KRK als unabhängiger prognostischer Marker und als Prädiktor für Krankheitsrezidive beschrieben (Herbst et al. 2009; Wallner et al. 2006b). Eine weitere Studie zeigte die Korrelation von methyliertem HLTF und HPP1 mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und fortgeschrittenem Tumorstadium (Philipp et al. 2014).

### 2.2.7. NEUROG-1

Das NEUROG-1 Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor Neurogenin-1, der im Nervensystem entscheidend an der neuronalen Differenzierung beteiligt ist (NCBI, 2017; Sun et al. 2001). Durch seinen Einfluss auf die Wirkung der Neurotransmitter GABA und Glutamat besteht auch ein Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie (Fanous et al. 2007; Ho et al. 2008; Greenwood et al. 2012). Außerdem scheint es Einfluss auf die Entstehung einer Variante des Möbius Syndroms, einer kongenitalen okulofazialen Parese zu haben (Schroder et al. 2013). Hypermethylierungen von NEUROG-1 werden auch als epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit dem KRK beschrieben (Ogino et al. 2007; Dahlin et al. 2010). In einer Arbeit von Herbst et al erwies sich NEUROG-1 bei der Testung von 10 potentiellen Markern mittels methylierungsspezifischer qPCR mit einer Sensitivität von 61% und eine Spezifität von 91% als potentiell geeigneter Biomarker im Blut (Herbst et al., 2011). Besonders hervorzuheben ist dabei, dass der Marker in allen Tumorstadien etwa die gleiche Detektionsrate aufwies und sich durch eine höhere Sensitivität für UICC Stadium I mit knapp 52% und II mit 71% im Vergleich zu anderen DNA-Methylierungsmarkern auszeichnete. NEUROG-1 ist somit ein vielversprechender Serummarker zur Diagnostik und potentiell auch Früherkennung von frühen Stadien des KRK. Eine weitere Studie von Han et al. beschäftigte sich mit der Prognoserelevanz von Tumormarkern im Blut. Die Analyse von 8 CIMP-Genen und 5 Mikrosatellitenmarkern bei 322 Patienten unter adjuvanter FOLFOX-Chemotherapie zeigte, dass die Methylierung von NEUROG-1 und CDKN2A nach 3 Jahren mit einem signifikant verkürzten krankheitsfreien Überleben assoziiert war (Han et al., 2013). NEUROG-1 ist ebenfalls Bestandteil des bereits beschriebenen CIMP-Panels.

### **3. Die Multicenterstudie AIO KRK-0207**

#### **3.1. Gesamtaufbau und Ziele der Studie**

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil der Studie AIO-KRK-0207 der Arbeitsgemeinschaft für Internistische Onkologie (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00973609?term=NCT00973609&rank=1>). Dabei handelt es sich um eine prospektive, randomisierte Phase-III-Studie mit dem Ziel, die Wirksamkeit verschiedener Erhaltungs- und Reinduktionschemotherapien für Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom nach einer einheitlichen 24-wöchigen Induktionstherapie zu vergleichen. In diese multizentrische Studie wurden zwischen 17. September 2009 und 21. Februar 2013 837 Patienten aus 55 Krankenhäusern und 51 ambulanten Praxen in Deutschland eingeschlossen (Hegewisch-Becker et al. 2015).

Folgende zusammengefasste Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie wurden vorab definiert:

- Histologisch gesichertes, inoperables metastasiertes kolorektales Karzinom im Stadium UICC IV
- Gemäß RECIST-Kriterien (=Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) eingestufte Metastasenherde in der radiologischen Bildgebung
- Keine Vorbehandlung des kolorektalen Karzinoms mittels Chemo- oder Strahlentherapie (Ausnahme: Neoadjuvante Therapie mit Therapieende mindestens 6 Monate vor Studienteilnahme)
- Normwertige laborchemische Leber-, Nieren- und Blutbildwerte
- Lebenserwartung länger als 3 Monate

Ausschlusskriterien:

- Relevante Begleit- oder Vorerkrankungen:
  - Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems: Herzinsuffizienz ab NYHA II, Herzinfarkt <12 Monate vor Studienbeginn, schwergradige Hypertonie
  - Gastrointestinale Erkrankungen: Aktive gastrointestinale Blutungen, Ulcera, intraabdominelle Abszesse, Fisteln oder Perforationen
  - Hämatologische Erkrankungen: Knochenmarkinsuffizienz, Koagulopathien Grad III oder IV, Thromboembolien, Blutungsneigungen
  - Aktive Entzündungsreaktionen

- Operation, Biopsie oder Trauma innerhalb 28 Tage vor Studienbeginn
- Schwere neurologische Vorerkrankungen
- Medikamentöse Behandlung mit Virostatika (Sorivudine, Brimivudine und Analoga), Acetylsalicylsäure, NSAR, Immunsuppressiva
- Vorbekannte allergische Reaktionen auf verwendete Chemotherapeutika und Antikörper

Vor Studienbeginn erfolgte eine ausführliche Probandenaufklärung über die Therapieformen und deren potentielle Risiken mit schriftlicher Einwilligung zur Teilnahme. Sämtliche Untersuchungen im Rahmen der Studie sind im Vorfeld von der Ethikkommission genehmigt worden.

Als Induktionstherapie wurde allen Patienten eine Kombination aus einem Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Bevacizumab verabreicht. Dabei fand entweder das bereits erörterte *first-line*-Induktionsschema mit XELOX (Capecitabin + Oxaliplatin) oder FOLFOX (= Folinsäure + Fluoruracil + Oxaliplatin), jeweils in Kombination mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab, Verwendung. Nach Ausschluss von Probanden mit entweder operablem oder progressivem Krankheitsverlauf erfolgte die Randomisierung von 472 Patienten mit stabiler Erkrankung im radiologischen Staging im Verhältnis 1:1:1 zu einem der folgenden Therapiegruppen:

- Kontrollgruppe: Standard *First Line*-Therapie mit Fluoropyrimidinen + Bevacizumab
- Versuchsgruppe 1: Bevacizumab-Monotherapie
- Versuchsgruppe 2: Keine medikamentöse Chemotherapie

Bei erneutem Progress unter der Erhaltungstherapie folgte ein Reinduktionstherapiechema unter Hinzunahme von Therapeutika der Induktionstherapie.

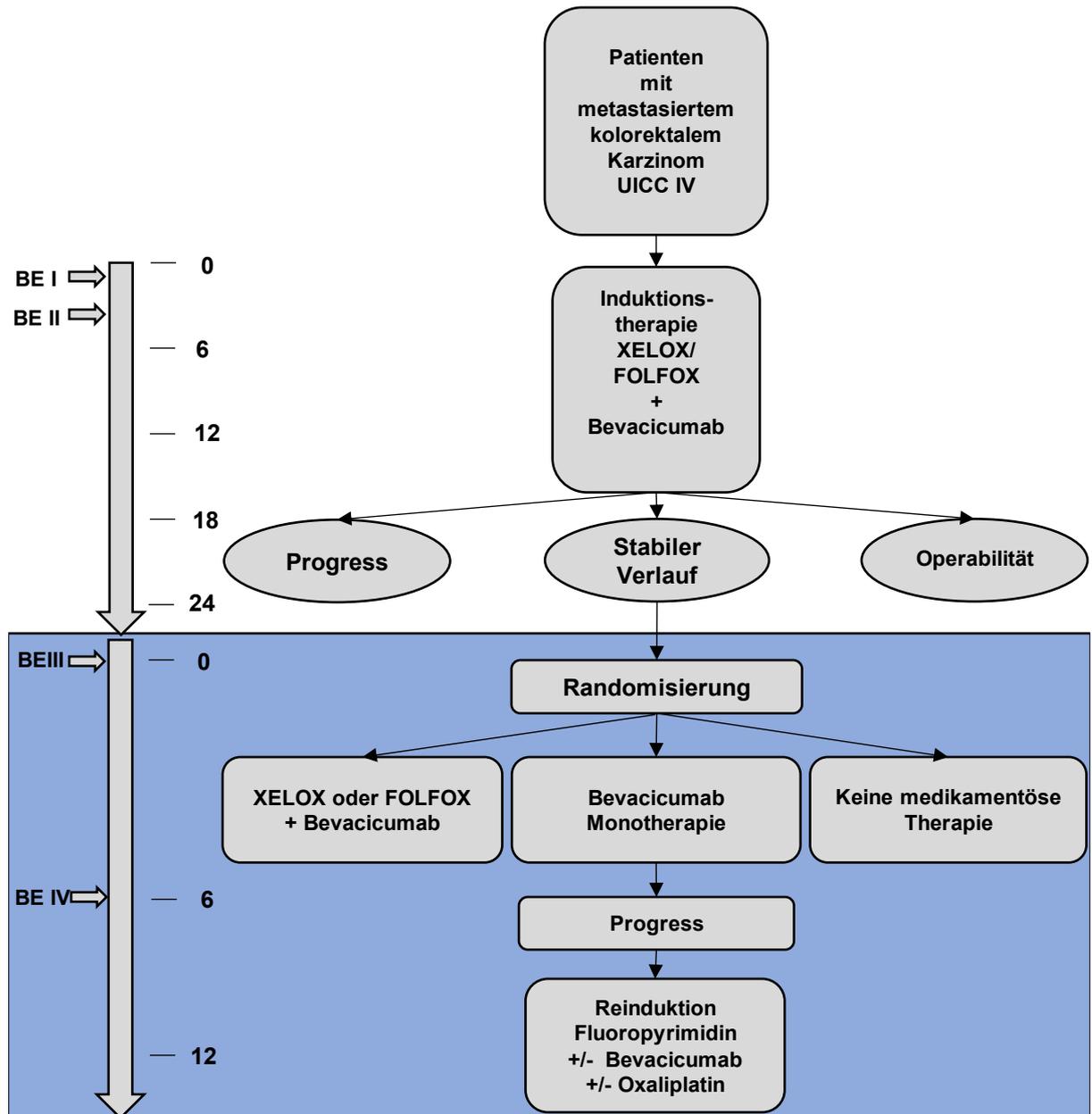
Ziel der Gesamtstudie war es, Möglichkeiten einer Therapiedeeskalation bezüglich des Überlebens, der Lebensqualität und dem klinischen Verlauf mit der Standardtherapie aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab zu vergleichen. Primären Endpunkt der Gesamtstudie bildete dabei der Zeitraum von Randomisierung bis zum Therapieversagen. Als sekundäre Endpunkte wurden die Zeitspanne von Studienbeginn bis zum Therapieversagen, das progressionsfreie Überleben, sowie das Gesamtüberleben festgesetzt.

Im Studienverlauf wurden die teilnehmenden Patienten kontinuierlich in Form zahlreicher Untersuchungen überwacht. Während der Induktionstherapie erfolgten Blutentnahmen zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn (= Blutentnahme I) und im Anschluss 15-

22 Tage nach Therapiebeginn (= Blutentnahme II), sowie eine bildgebende Diagnostik in Form einer Computer- oder Magnetresonanztomographie nach 12- und 24 Wochen. Im Laufe der Erhaltungs- und Reinduktionstherapie wurden weitere Blutentnahmen zum Zeitpunkt der Randomisierung (= Blutentnahme III), sowie ca. 6 (= Blutentnahme IV) und 12 (= Blutentnahme V) Wochen später mit kontinuierlichen Bildgebungen in gleichem Zeitintervall durchgeführt. Die Zeitspannen zwischen den einzelnen Blutentnahmen waren jedoch nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher individueller Krankheitsverläufe und der multizentrischen Studienerfassung kleinen Schwankungen unterworfen.

Um ein optimales Monitoring des Patientenbefindens zu garantieren, wurden standardisierte Fragebögen bezüglich Medikamentennebenwirkungen und Lebensqualität der Patienten entworfen und zentral ausgewertet. Ein Austritt aus der Studie auf Wunsch des Patienten oder aus ärztlicher Sicht indiziert war jederzeit möglich, darüber hinaus führte ein neu aufgetretener Krankheitsprogress zum Studienausschluss.

Die nachfolgende Grafik verbildlicht den Aufbau der AIO-Gesamtstudie mit den jeweiligen Therapiekontrollzeitpunkten (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1** Aufbau der Gesamtstudie AIO-KRK 0207 mit den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten: Der blau markierte Bereich zeigt den im Rahmen dieser Dissertation betrachteten Studienausschnitt ab Randomisierung mit den Studienarmen für die Erhaltungstherapie

### 3.2. Zielsetzungen der Dissertation

Trotz zahlreicher Präventions- und Screeningmethoden wird das kolorektale Karzinom bei vielen Patienten erst in einem bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadium diagnostiziert, sodass ein primär kurativer Behandlungsansatz nicht mehr möglich ist und die Indikation zu einer systemischen Chemotherapie gestellt wird. Hierfür steht eine große Anzahl an neuen Therapeutika und spezifischen Antikörpertherapien zur Verfügung. Dies bringt allerdings die Schwierigkeit mit sich, für den einzelnen Patienten das individuelle Therapieschema festzulegen. Zudem bedeutet eine Chemotherapie für den Patienten häufig Nebenwirkungen und hohe Strapazen und geht nicht zuletzt mit hohen Behandlungskosten für das Gesundheitssystem einher. Diese Aspekte legen nahe, dass zum einen Prädiktoren notwendig sind, die bereits vor Therapiebeginn ein Therapieansprechen vorhersagen können. Zum anderen ist es auch von entscheidender Bedeutung, Marker für ein Therapieansprechen zu detektieren, die eine Kontrolle während der Therapie ermöglichen und bei Hinweisen auf Nichtansprechen einen raschen Therapiewechsel erlauben können.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Etablierung eines Tumormarkers bei Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium, der unter Chemotherapie aufgrund rezidivierender Verlaufsmessungen Aussagen bezüglich des Therapieansprechens sowie der Prognose des Patienten treffen kann. Bereits im Rahmen mehrerer Studien wurde HPP1 bei Patienten sowohl mit frühem Tumorstadium als auch bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf als Prognosemarker charakterisiert (Philipp et al. 2014; Philipp et al. 2012; Herbst et al. 2009; Wallner et al. 2006a). Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe zusätzlich gezeigt werden, dass mithilfe der HPP1-Messung im Blut bei Patienten mit metastasiertem KRK ein Ansprechen auf die Induktionschemotherapie vorhergesagt werden kann (Herbst et al. 2017). Ziel dieser Doktorarbeit ist es nun, bei demselben Patientenkollektiv drei verschiedene Erhaltungskemotherapien nach identischer Induktionschemotherapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom im Stadium UICC IV hinsichtlich des Biomarkerverhaltens von HPP1 miteinander zu vergleichen.

Somit ergeben sich abgeleitet vom bisherigen Kenntnisstand im Hinblick auf das Konzept dieser Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Kann HPP1 als Prognosemarker im Blut zuverlässig eine Aussage bezüglich des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens treffen?
2. Inwieweit kann HPP1 ein Therapieansprechen auf die Erhaltungskemotherapie und die Überlegenheit eines Erhaltungskemotherapieschemas vorhersagen?
3. Gibt es bei Betrachtung der Gesamtstudie besondere HPP1-Muster, die mit einer schlechten oder guten Prognose assoziiert sind?

## 4. Material und Methoden

Im Folgenden sollen die zur experimentellen Durchführung benötigten Materialien und Methoden dargestellt werden, um die Reproduzierbarkeit der laborchemischen Untersuchungen zu gewährleisten. Ebenso wird der in der Einleitung aufgeführte Gesamtaufbau der Studie und das Gesamtkollektiv der Studie näher beschrieben. Sämtliche Arbeiten zu dieser Studie sind im Voraus von der Ethikkommission genehmigt worden.

### 4.1. **Verwendete Chemikalien und Geräte**

#### **Geräte und Materialien**

- Pipetten „Eppendorf Research® Plus“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipetten „Eppendorf Xplorer®“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen „Combitips® Plus“ 5ml, 10 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Tischzentrifuge „mini Spin“ Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Kühlzentrifuge „Centrifuge 5417 R“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Vortexzentrifuge „Centrifuge & VortexCM-70M.09“, ELMI Ltd., Riga, Lettland
- Vortexzentrifuge „Centrifuge & Vortex“, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Vortexer „Vortex Mixer VM-300“, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Wasserbad „Modell 1003“, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
- Heizblock „Techne DRI-Block® DB 2A“, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien
- PCR-Platten “MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate”, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien
- Plattenzentrifuge SIGMA 2-6E Compact Centrifuge, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
- qPCR-Gerät „ViiA 7 Real-Time PCR System“, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts

#### **Kits und Reagenzien**

- DNA-Isolation: “High Pure Viral Nucleic Acid Kit”, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland

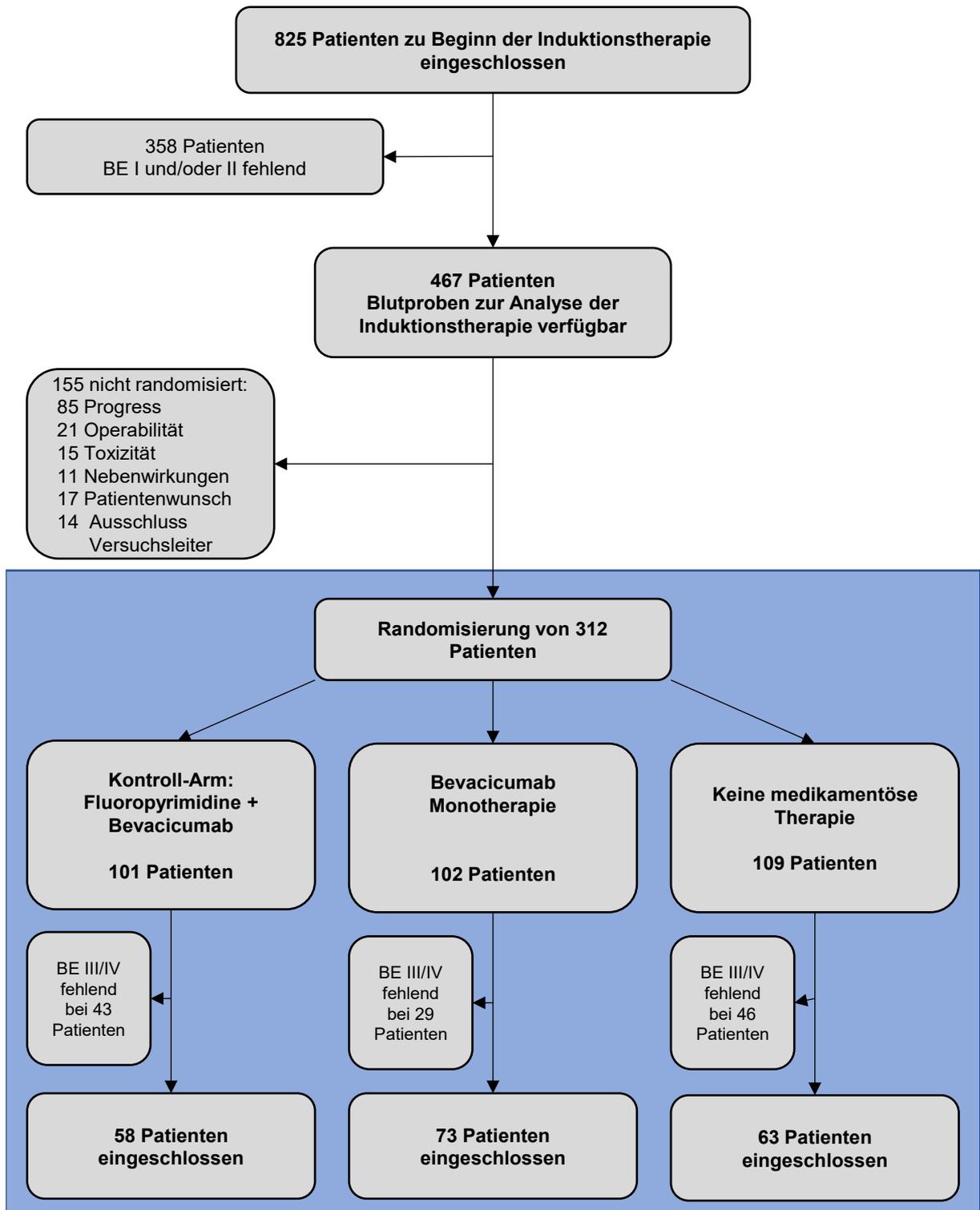
- Bisulfit Behandlung: „EZ DNA Methylation-Gold Kit“ Zymo Research, Freiburg, Deutschland
- qPCR:
  - Oligonukleotide, Metabion international AG, Planegg, Deutschland
  - dNTP Mix 10mM, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
  - „HotStarTaq® DNA Polymerase“, Qiagen, Hilden, Deutschland
  - PCR-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
  - MgCL<sub>2</sub>, Qiagen, Hilden, Deutschland
- EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Ethanol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Trisma-Base, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 4.2. Patientenkollektiv für diese Dissertation

Zur experimentellen Untersuchung molekularer Biomarker im Blut von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom wurden sowohl Plasma- als auch Serumproben der Patienten benötigt. Da besonders das Biomarkerverhalten im Rahmen der Erhaltungstherapie für diese Dissertation von Interesse war, bildeten hierfür Blutproben zum Entnahmezeitpunkt III und IV im jeweils 6-wöchigen Abstand die Grundlage für laborchemische Analysen.

Von den 837 insgesamt in die Studie eingeschlossenen Probanden waren von 467 Patienten Blutproben zu den Zeitpunkten I und II verfügbar. Diese wurden bereits im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Dissertation auf molekulare Biomarker untersucht. Daraufhin erfolgte die Randomisierung von 312 Teilnehmern mit stabilem Krankheitsverlauf im radiologischen Staging mit Zuordnung zu einem der jeweiligen Therapiearmen. Nach erneutem Ausschluss von 117 Patienten aufgrund des Fehlens von Blutproben III und/oder IV wurde 195 Patienten mit vorhanden Blutentnahmen III und IV in die Studie eingeschlossen. Bei einem der Patienten erfolgte keine Randomisierung, sodass von insgesamt 194 Teilnehmern Daten zur durchgeführten Therapie vorlagen. Die aus dieser Studie ausgeschlossenen Patienten unterschieden sich ausschließlich bezüglich der Unvollständigkeit vorhandener Blutproben von den eingeschlossenen Probanden. Da ebenso lediglich von 117 Probanden Blutproben zum Zeitpunkt BE V vorliegend waren, wurde aus Gründen der Vollständigkeit auf deren Untersuchung verzichtet.

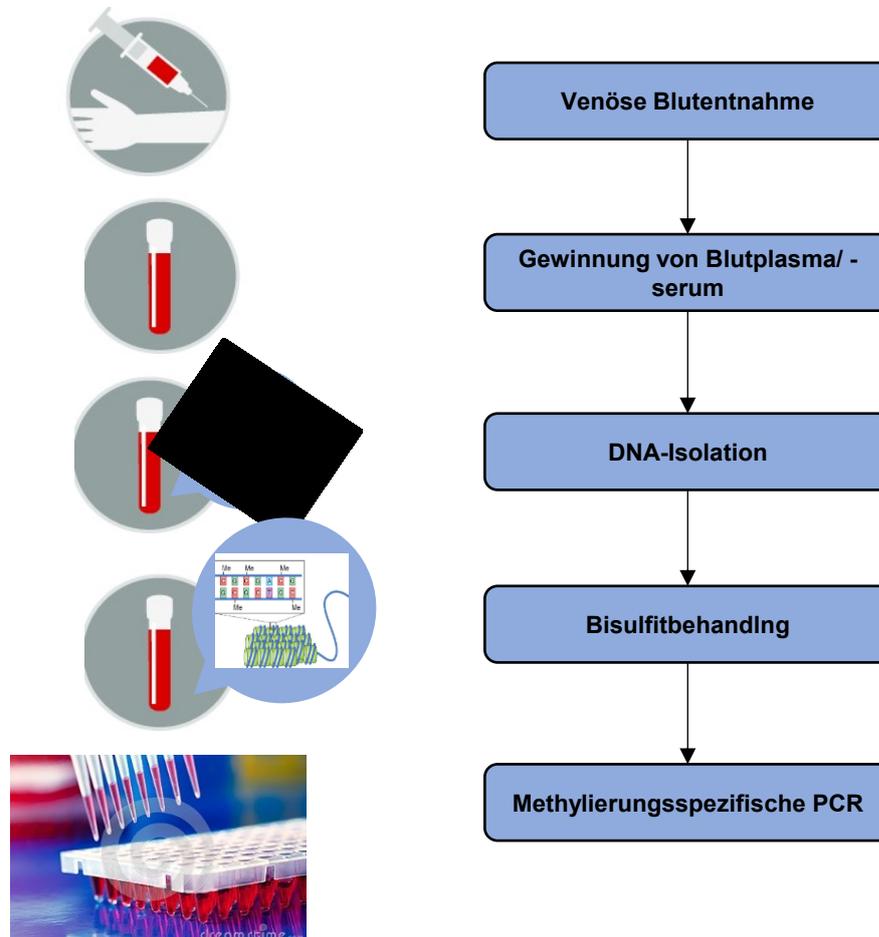
Eine detaillierte Darstellung der Patientenauswahl findet sich im nachfolgenden Flussdiagramm. (Abbildung 4.1)



**Abbildung 4.1:** Patientenkollektiv der Gesamtstudie: Nach Ausschluss von Probanden mit fehlenden Blutproben wurden im Gesamten 194 Patienten einem der Therapiearme zugeteilt und analysiert, von einem weiteren Patienten lagen keine Daten zum Chemotherapiearm vor. Der blau schraffierte Bereich entspricht den untersuchten Teilnehmern dieser Studie

### 4.3. Versuchsablauf

Die nachfolgende Abbildung 4.2 zeigt den schematischen Ablauf der Versuchsreihe, die in dargestellter Reihenfolge durchgeführt wurde. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den jeweiligen Unterkapiteln detailliert beschrieben.



**Abbildung 4.2:** Übersicht der einzelnen Versuchsschritte dieser Doktorarbeit

### 4.4. Patientenproben

#### 4.4.1. Probengewinnung und Aufbereitung

Die Blutproben wurden im Rahmen der Studie zu den bereits definierten Entnahmepunkten gewonnen und nach standardisiertem Schema aufbereitet. Hierfür erfolgte eine Abnahme in Zentren und Versand per Post zur zentralen Probenaufbereitung. Die Stabilität der Proben wurde zuvor sichergestellt.

Blutplasma wurde mittels Serummonovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen, 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten bei 2000x g zentrifugiert. Es erfolgte die Dekantierung des Überstandes mit Messung der CEA-Konzentration im Anschluss. Die Entnahme des Blutplasmas für die nachfolgenden Tumormarkermessungen wurde mittels EDTA-Monovetten (Sarstedt) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 2000 x g mit Abpipettieren des Überstand und Transfer in ein neues Gefäß. Bis zur Weiterverarbeitung war die Lagerung der Blutproben bei -80°C im Gefrierschrank erforderlich.

#### 4.4.2. Isolation frei- zirkulierender DNA im Plasma

Die bei -80°-tiefgefrorenen Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und durch vorsichtiges Fingerschnipsen homogenisiert. Um gleiche Reaktionsbedingungen zur exakten Beurteilung des Biomarkerverhaltens im Verlauf garantieren zu können, wurden stets die Blutentnahmen zum Zeitpunkt BE III und IV eines Patienten in derselben Serie bearbeitet.

Die DNA-Isolation aus jeweils 200ul Plasmaproben erfolgte mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), welches ursprünglich laut Hersteller zur Isolation viraler Nukleinsäuren aus Serum, Plasma oder Vollblut entwickelt wurde.

Zunächst erfolgte die Präparation einiger für die Aufreinigung der DNA benötigter Chemikalien. Dabei wurde zunächst ein Fläschchen der Poly(A) Carrier-RNA in 0,5 ml des mitgelieferten *Elution Buffers* gelöst und in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt. Die von Hersteller mitgelieferte Proteinase K wurde ebenfalls in 5 ml *Elution Buffer* gelöst und aliquotiert. Beide Reagenzien können bei -20° im Gefrierschrank für bis zu 12 Monate gelagert werden. Die *Working Solution*, bestehend aus Poly(A) Carrier-RNA und dem *Binding Buffer* im Mischungsverhältnis 1:50, sollte jedoch stets frisch hergestellt werden.

Nach Vorbereitung der Chemikalien wurde 200µl der *Working Solution* mit 50µg der Proteinase K und 200µl Patientenplasma vermischt und für 10 Minuten bei 72°C im vorgeheizten Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl *Binding Buffer* und das Mischen mithilfe des Vortexers. Daraufhin wurde das gesamte Probengemisch auf *Collection Tubes* mit zuvor eingesetzter Filtersäule aufgebracht. Nach Zentrifugation mit 8000 Umdrehungen/min für 60 Sekunden verblieb die DNA in

der Membran der Säule, während die gefilterte Flüssigkeit verworfen wurde. Im nächsten Arbeitsschnitt wurde 500 µl *Inhibition Removal Buffer* zugegeben und erneut für 60 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte mehrere Waschschriffe, um die isolierte DNA vollständig aufzureinigen. Dabei wurde zweimal jeweils 450 µl *Wash Buffer* hinzugegeben und erneut bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert und die gefilterte Flüssigkeit verworfen. Um letzte Rückstände auf dem Filter zu entfernen und die Membran trocken zu bekommen, war eine erneute Zentrifugation für 3 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl ohne vorherige Zugabe einer Pufferlösung nötig. Im letzten Schritt wurde die frei-zirkulierende DNA durch Zufügen von 50µl des *Elution Buffer*s auf die Filtermembran eluiert. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde erneut für 60 Sekunden bei 8000x g zentrifugiert und die im Puffer gelöste frei-zirkulierende DNA in einem steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das Eluat wurde bis zur möglichst zeitnahen Weiterbearbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.4.3. Bisulfit Behandlung

Epigenetische Veränderungen bei Tumorpationen finden sich, wie eingangs erwähnt, häufig in Form aberranter Methylierungsmuster am 5'-Kohlenstoffatom des Cytosins (5'mC) im Bereich sogenannter CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen. Da Methylcytosin die gleichen Basenpaarungseigenschaften wie Cytosin besitzt, ist eine Unterscheidung mittels Hybridisierungsmethoden nicht möglich.

An dieser Stelle setzt die Bisulfitbehandlung an. Dieser Arbeitsschritt ermöglicht es, epigenetische Informationen in spezifische DNA-Sequenzen umzusetzen, die dann im Folgenden mittels PCR oder DNA-Sequenzierung messbar sind. Chemisches Prinzip dieses Vorganges ist die Umwandlung unmethylierter Cytosinbasen in Uracil durch Bisulfit-vermittelte Desaminierung, wohingegen bereits methyliertes Cytosin refraktär gegenüber diesem chemischen Prozess ist (Frommer et al. 1992). Folglich sind methylierte von unmethylierten DNA-Bereichen im Anschluss durch jeweils spezifische Sequenzen unterscheidbar. Abbildung 4.3 veranschaulicht diesen chemischen Umwandlungsprozess.

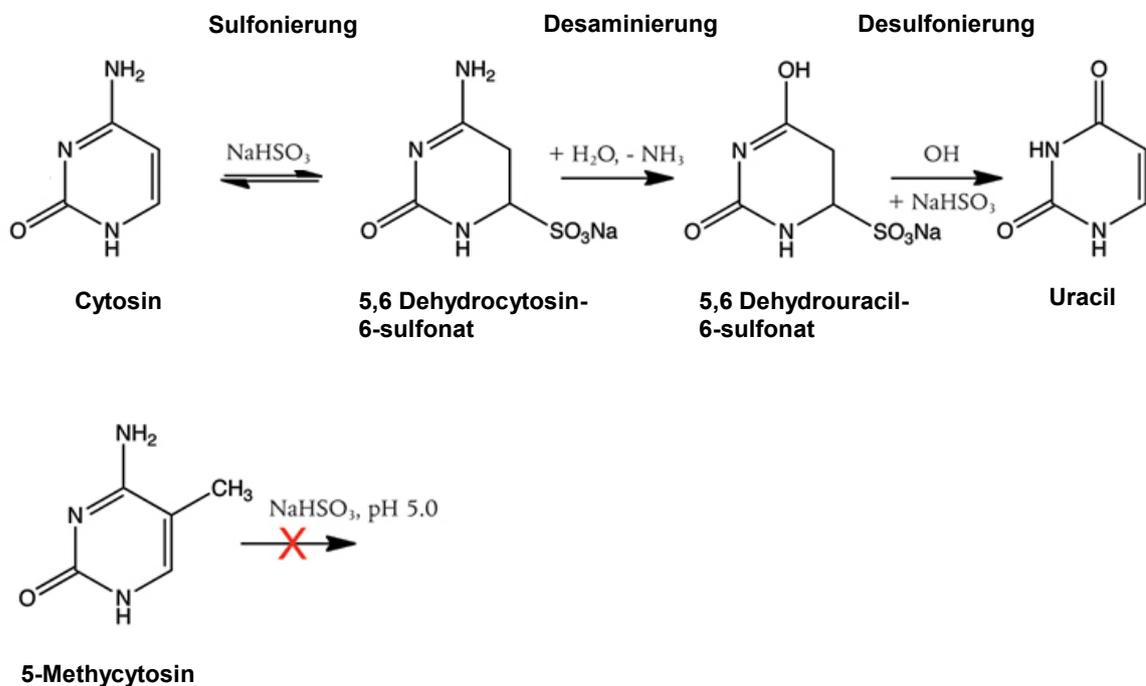
Die Bisulfitbehandlung der Patientenproben erfolgte mittels *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research, Freiburg, Deutschland).

Zunächst wurde hierfür das *CT Conversion Reagent* vorbereitet, indem 600 µl destilliertes Wasser, 50µl *M-Dissolving Buffer* und 300µl *M-Dilution Buffer* zu einem Tube des im Kit enthaltenen Reagenz gegeben und für 10 Minuten mithilfe des Vortexers

geschüttelt und gemischt wurden. Im Anschluss wurde 130  $\mu\text{l}$  des *CT Conversion Reagents* zusammen mit 50  $\mu\text{l}$  der zuvor bearbeiteten DNA-Probe in ein PCR Tube gegeben und mittels dreimaligem Fingerschnipsen homogenisiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation im Heizblock mit den nachfolgenden Temperaturschritten:

1. 98°C für 10 Minuten
2. 64° für 150 Minuten
3. 4°C Kühlung bis zu 20 Stunden

Im nächsten Schritt wurde 600  $\mu\text{l}$  des *M-Binding Buffers* zusammen mit der vorbereiteten DNA-Probe auf eine Säule mit integrierter Filtermembran aufgebracht, vermischt, und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit ( $< 10000 \times g$ ) zentrifugiert. Daraufhin wurde die gefilterte Flüssigkeit verworfen. Anschließend folgte ein erneuter Waschschritt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{g}$  des *M-Desulphonation Buffers* wurde bei Raumtemperatur (20-30°C) für 15-20 Minuten inkubiert mit erneuter Zentrifugation im Anschluss. Nachfolgend mussten die Proben noch zweimal mittels *M-Wash Buffer* gewaschen werden. Im letzten Arbeitsschritt wurde die nun angereicherte methylierte frei zirkulierende DNA in 50  $\mu\text{l}$  des *M-Elution Buffers* eluiert. Bis zur Messung der Bisulfit-behandelten Proben mittel PCR wurden diese bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.



**Abbildung 4.3:** Chemische Reaktionsschritte der Bisulfitbehandlung: Konvertierung des unmethylierten Cytosins zu Uracil; 5-Methylcytosin bleibt hingegen intakt

#### 4.4.4. CEA-Quantifizierung im Serum

Die Konzentration des carcinoembryonalen Antigens (CEA) wurde mithilfe eines immunoenzymometrischen Mikropartikel-Assays bestimmt (AxSYM, Abbott Laboratories, Chicago, IL).

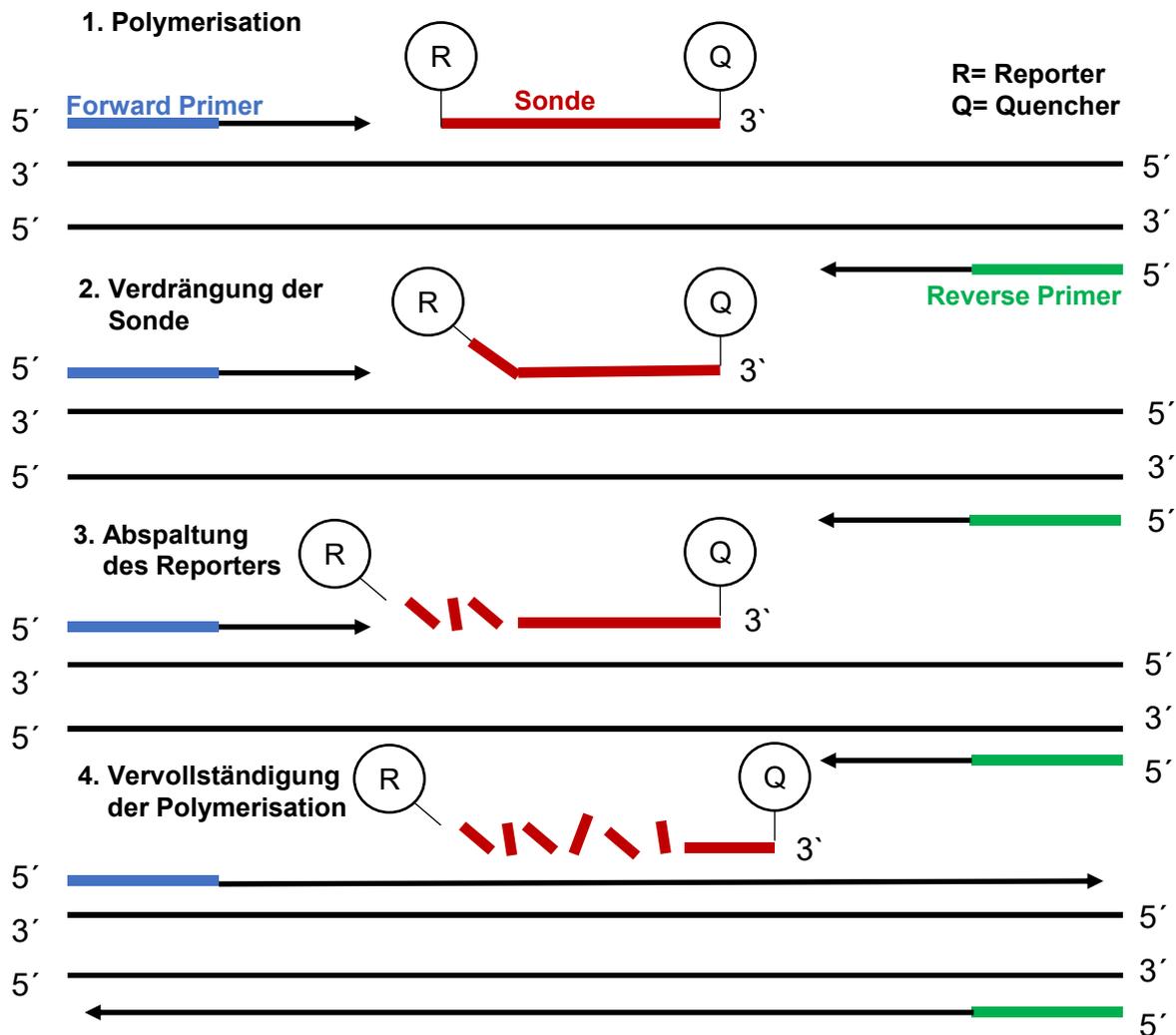
### 4.5. Echtzeit quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

#### 4.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Um Rückschlüsse auf die Expression methylierter DNA Abschnitte ziehen zu können, wurden die Bisulfit-behandelten Proben im nächsten Schritt einer quantitativen Echtzeit (*Real-Time*) Polymerase-Ketten-Reaktion zugeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die sich von der klassischen Polymerase-Ketten-Reaktion durch die Möglichkeit der quantitativen Genexpressionsanalyse unterscheidet. Bei diesem Verfahren wird die Menge gebildeter PCR-Produkte bereits während des PCR-Laufes mittels Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden in Echtzeit detektiert. Das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes nimmt dabei proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu.

In dieser Arbeit wurden zur Erzeugung der Fluoreszenz Taqman-Sonden verwendet. Dabei handelt es sich um für die Ziel-DNA sequenzspezifische Oligonukleotide, die an der 5'-Position mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (5'-FAM=5,6 Carboxy-fluorescein) und am 3'-Ende mit einem „Quenching“-Molekül beladen sind. Der Quencher ist eine Substanz, die durch Energieaufnahme und anschließende Abgabe in Form von langwelligem Licht oder Wärme eine Fluoreszenz löschen kann. Im Speziellen wurden in dieser Arbeit 3'-terminale Black Hole *Dark Quencher* (3' BHQ-1M) verwendet. Diese haben den Vorteil gegenüber herkömmlichen TAMRA Quenchern, dass sie keine zusätzlichen Fluoreszenzsignale freisetzen, die als potentielle Störfaktoren die Qualität der PCR beeinträchtigen können. Da die Oligonukleotidsequenz der Sonde relativ kurz ist, ist ein Energietransfer vom Reporter auf den Quencher mit dem Entstehen von Wärmestrahlung möglich. Dies führt dann zur Suppression des Fluoreszenzsignales. Die Sequenz der Sonde sollte dabei genau zwischen den beiden Primersequenzen liegen. Während des Ablaufes der PCR-Reaktion wird die Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase vom 5' Ende ausgehend von der Zielsequenz verdrängt. Dies hat zur Folge, dass der Reporter vom Quencher getrennt

wird, kein Energietransfer mehr stattfindet und stattdessen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Eads et al., 1999).



**Abbildung 4.4:** Funktionsweise der Taqman-Sonden bei der quantitativen real-time PCR

**Modifiziert nach:** <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>

#### 4.5.2. Verwendete Primer und Sonden

Da die methylierten DNA Abschnitte durch die Bisulfitbehandlung ein spezifisches Sequenzmuster aufweisen, sind sie Ansatzpunkt spezifisch bindender Primer und Sonden zur Amplifikation der methylierten DNA-Bereiche. Die methylierungsspezifischen Primer und Sonden wurden mithilfe des Computerprogramms „Primer 3“ bzw. „Primer Express“ (Howard Hughes Medical Institute by Steve Rozen bzw. Applied Biosystems) entworfen und im Anschluss von der Firma Betabion in Martinsried synthetisiert. Wichtiges Qualitätskriterium war hierbei ein höchstmöglicher Gehalt an Guanin und Cytosin,

um nachfolgend eine bessere Bindung und Elongation erreichen zu können. In Tabelle 4.1 sind die verwendeten Primer und Sonden mit ihren jeweiligen Sequenzen aufgelistet.

Gen	Fragmentlänge [bp]	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
		Sequenz (5'-3')	Sequenz (5'-3')	Sequenz (5'-3')
Alu	98	GGTTAGGTATAGTGTT-	AT-	Fam-CCTACCTTAAC-
		TATATTTGTAATTT-	TAACTAACTAATCTTAAA	CTCCC-BHQ-1
		TAGTA	CTCCTAACCTCA	
HPP1	87	GTTATCGTCGTCGTTTT-	GACTT-	Fam-CCGAACAACG-
		TGTTGTC	CCGAAAAACACAAAATCG	GACTACTAAACATCCCG CG-BHQ-1

**Tabelle 4.1:** DNA-Sequenzen von Primern und Sonden sowie Fragmentlängen der verwendeten Methylierungsmarker

#### 4.5.3. Reaktionsansatz und PCR-Programm

Die nach der Bisulfitbehandlung in 20µl *Elution Buffer* gelöste DNA wurde zunächst mit TE-Puffer (10mmol/l TRIS, 1mmol/l EDTA, pH: 7,4) auf ein Volumen von 100µl verdünnt, um genug Material für den gesamten Reaktionsansatz zu haben. Des Weiteren wurden die für das jeweilige Gen spezifischen Forward und Reverse Primer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mithilfe des Vortexers vermischt. Die Sondenverdünnung mit destilliertem Wasser erfolgte bei einer ursprünglichen Konzentration von 100µM nach folgendem Schema:

- Alu Sonde: 1:40
- HPP1 Sonde: 1:40

Der Mastermix für die PCR wurden mit den Reagenzien des Hot Star Taq Master Mix Kits (Qiagen) hergestellt. Der Reaktionsansatz bestand aus Volumina zu jeweils 12,5µl, 10µl Mastermix und 2,5µl DNA-Probe enthaltend (siehe Tabelle 4.2). Die quantitative PCR-Messung der Gene HPP1 und ALU erfolgte jeweils in Triplikaten. Dafür wurde zunächst die DNA-Probe und im darauffolgenden Schritt der Mastermix mit einer Pipettierhilfe (Eppendorf Xplorer®) auf eine 384-well-PCR Platte (*MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate*, Life Technologies) gegeben, die Platte mit einer Folie versiegelt und in der Plattenzentrifuge (*SIGMA 2-6E Compact Centrifuge*) zentrifugiert. Die Messung in Form von automatisierten Zyklen der Real-Time PCR wurde mit dem

Vii7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) nach nachfolgendem Protokoll durchgeführt:

Zunächst wurde die Hot Star Taq DNA-Polymerase (Qiagen) für 900 sec bei 95°C aktiviert. Daraufhin folgten 50 Zyklen mit den jeweils folgenden Schritten:

1. Denaturierungsphase mit Trennung der DNA-Stränge für 30 sec bei 94°C
2. Primerhybridisierung mit Anlagerung der spezifischen Primer an das zu vervielfältigte Amplifikationsstück der DNA bei einer Annealingtemperatur von 60° für 60 sec
3. Elongationsphase mit Verlängerung des DNA Stranges vom Primer ausgehend für 30 sec bei 60°C

Ziel der mehrmaligen Wiederholung dieser Amplifikationsschritte ist die Vervielfältigung des gewünschten DNA Abschnittes. Nach jedem Zyklus wird vom PCR Gerät automatisch eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, mithilfe derer die Anzahl der DNA-Kopien bestimmt werden kann. In der sogenannten log-Phase ist unter optimalen Reaktionsbedingungen eine exponentielle Zunahme des Fluoreszenzsignals messbar. Idealerweise erfolgt dabei eine Verdopplung des PCR-Produktes mit jedem Zyklus. Am Ende der gesamten Zyklen werden die Proben zunächst bei 25°C für 1 Minute und im Anschluss bei 4° gekühlt (siehe Tabelle 4.3).

Reagenz	Konzentration Ausgangsmenge	Finale Konzentration	ALU-Menge pro Ansatz (µl)	HPP1-Menge pro Ansatz (µl)
<b>Polymerase Puffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>)</b>	10x	0,8x	1	1
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	2 mM	1	1
<b>dNTPSs</b>	10mM	0,2 mM	0,25	0,25
<b>Primer (FW+RV)1:10 verd.</b>	10µM	0,8 µM	1	1
<b>Sonde verdünnt</b>	100µM	9,6 µM ALU 8 µM HPP1	1,2	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	5,45	5,65
<b>HotStar Taq</b>	5U/µl	0,04 U/µl	0,1	0,1
<b>Mastermix gesamt</b>	-	-	10	10
<b>DNA-Probe</b>	variabel	variabel	2,5	2,5
<b>Mastermix + DNA</b>	-	-	12,5	12,5

**Tabelle 4.2:** Reaktionsansatz der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer in Sekunden	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Hot Star Taq	95°C	900	1
Denaturierung	94°C	30	50
Hybridisierung Primer	60°C	60	
Elongation	60°C	60	
Messung	84°C	20	1
Probenkühlung	25°C	60	1

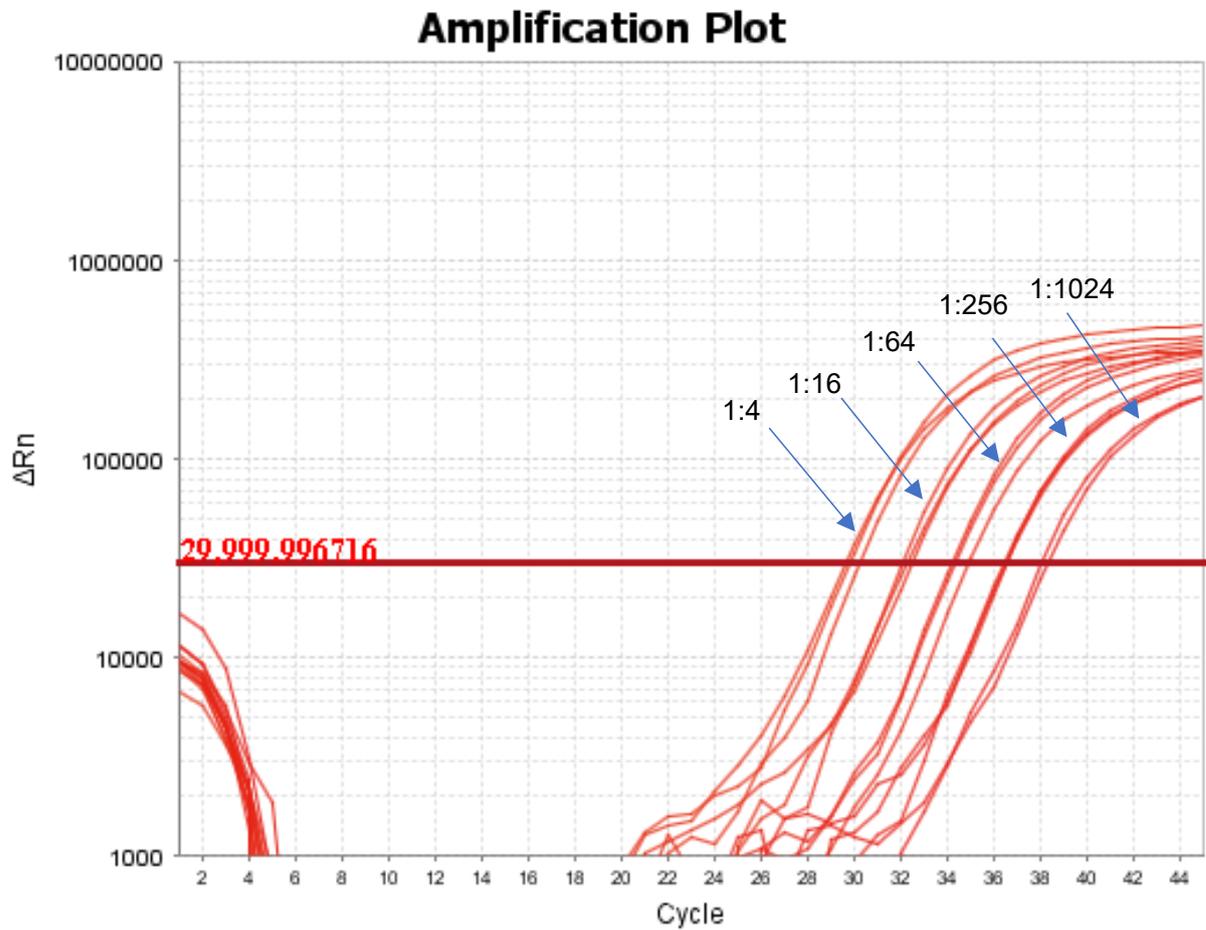
**Tabelle 4.3** Protokoll der Echtzeit-quantitativen PCR

#### 4.5.4. Threshold Cycle (CT) und Standardkurven

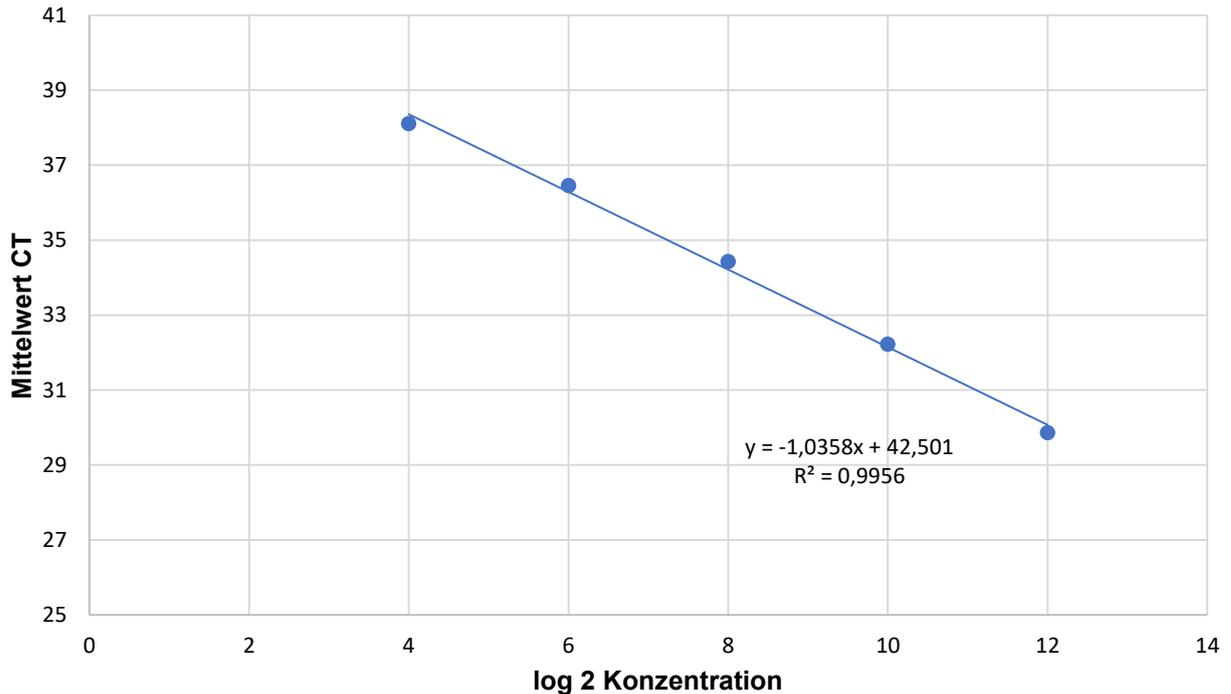
Ein Maß für die quantitative Bestimmung der vorliegenden DNA ist der sogenannte *Threshold Cycle-Wert* (CT-Wert). Diese theoretische Größe beschreibt einen PCR Zyklus (*Cycle = C*), bei dem das Real-Time PCR Fluoreszenzsignal einen vorher festgelegten Schwellenwert (= *Threshold*) erstmals überschreitet und damit erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je mehr methylierte DNA-Moleküle vor der PCR in den Plasmaproben enthalten ist, desto mehr Kopien entstehen in den Polymerisierungszyklen und umso schneller kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzsignale. Dies hat demzufolge einen niedrigeren CT-Wert zur Folge. Beim Vergleich von Messungen gilt zu beachten, dass die CT-Werte einen linearen Zusammenhang aufweisen, die daraus korrespondierenden PCR-Produktmengen sich logarithmisch vermehren.

Um nachfolgend aus dem ermittelten CT-Wert die absolute Templatemenge quantifizieren zu können, werden Standardkurven benötigt. Deshalb erfolgte auf jeder PCR-Platte neben den zu messenden DNA-Proben zusätzlich die Mitbestimmung der Standardkurven des jeweiligen Biomarkers. Als Standard-DNA wurde gekaufte, universal-methylierte DNA (Chemicon, Temecula, CA) verwendet. Diese diente zur Herstellung von Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 und 1:1024, die ebenfalls in Triplikaten gemessen wurden (Abbildung 4.5). Unter der Annahme, dass die initial eingesetzte DNA-Menge der Standard-DNA konstant in allen Proben war, wurden die gemessenen CT-Werte gemittelt. Die Standardkurve bildete nun die logarithmische Interpolation dieser 5 Wertepaare in Form einer Gerade mit linearer Funktionsgleichung. Aus der graphisch ermittelten Geradensteigung war im Anschluss die Berechnung der Templatemenge der untersuchten Patientenproben möglich. Hierfür wurde aus jedem CT-Wert der Triplikate von HPP1 bzw. ALU die absolute Templatemenge

berechnet und ergänzend daraus ein Mittelwert sowie eine Standardabweichung berechnet. Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen die einzelnen Schritte exemplarisch an der Standardkurve einer Platte.



**Abbildung 4.5:** Triplikate der Standardkurve HPP1 mit Verdünnungsreihe



**Abbildung 4.6:** Berechnung der Template-Menge mittels Standardkurve und linearer Funktionsgleichung

#### 4.5.5. Normalisierungsberechnungen mittels Referenzgen ALU

Im nächsten Schritt erfolgt die Normalisierungsberechnung in Form eines Abgleiches mit einem Referenzgen. Dieser Schritt ermöglicht es, aus der errechneten Template-Menge die relative DNA-Menge in der Probe bestimmen, d.h. die Expression der methylierten Genbereiche relativ zur Expression eines Referenzgens quantifizieren zu können. Ziel der Normalisierung ist die Minimierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Probenqualität, unterschiedliche DNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler im Rahmen des PCR-Laufers bei der zu messenden Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen.

Als Referenzgene werden generell Gene herangezogen, die grundlegende Zellfunktionen in allen Zellen und Geweben innehaben und möglichst in allen Zellen exprimiert werden. Diese werden als so genannten Haushaltsgene, oder auch *Housekeeping Genes* bezeichnet. Hierfür dienten in dieser Arbeit ALU-Sequenzen. Dabei handelt es sich um die am häufigsten vorkommenden repetitiven DNA-Sequenzen mit einem Anteil von 10% des menschlichen Genoms und einer Kopienzahl von einer Million (Weiner 2002). Mit einer Länge von ca. 300 Basenpaaren zählen sie zu den *short interspersed nucleotide elements*, kurz SINE. Vorteil im Vergleich zu anderen Kontrollgenen

wie beispielsweise MYOD1, ACTB und COL2A1 ist, dass die ALU-Sequenzen aufgrund ihrer hohen Kopienzahl und ihrer breiten Verteilung im gesamten Genom weniger anfällig gegenüber häufigen DNA-Veränderungen wie Deletionen oder Duplikationen im Rahmen von Karzinomen sind (Weisenberger et al. 2005). Daher eignen sie sich als ein konstanter Bestandteil der DNA besonders gut zur Berechnung der Normalisierung. Hierfür fand in dieser Arbeit folgende Formel Verwendung:

$$\text{normalisierte DNA Menge} = \frac{\text{absolute DNA Menge des methylierten Gens im Plasma}}{\text{DNA Menge der ALU – Repeats im Plasma}}$$

#### 4.5.6. Berechnung des Anteils methylierter DNA

Ein weiterer wichtige Kenngröße im Rahmen der methylierungsspezifischen PCR ist der so genannte PMR-Wert (engl. *Percent methylated reference*). Dabei handelt es sich um den Grad der Methylierung einer bestimmten DNA-Sequenz. Für diese Berechnung wurden nun die auf jeder Platte mitbestimmten internen Kontrollen sowohl für das Referenzgen ALU also auch für HPP1 benötigt. Damit wurde das HPP1-ALU-Verhältnis einer Probe durch jenes der voll-methylierten, bisulfitbehandelten Kontroll-DNA dividiert und anschließend mit 100 multipliziert (Eads et al. 2000).

$$PMR = \frac{\text{normalisierte DNA Menge in Patientenprobe}}{\text{normalisierte DNA Menge in Kontrolle}} \times 100 = \frac{\left(\frac{HPP1}{ALU}\right)_{\text{Probe}}}{\frac{HPP1}{ALU}_{\text{Kontrolle}}} \times 100$$

Als Ergebnis wurde ein PMR-Wert >0 als methylierungspositiv gewertet. Der PMR-Wert wurde aus dem CT-Wert eines jeden Triplikate der zu analysierenden Probe errechnet und aus diesen Ergebnissen der PMR-Mittelwerte gebildet: Dabei wurde bei einem Mittelwert >0,0001, der sich bereits bei einem der drei PMR-Werte > 0 ergibt, das Gen als positiv bewertet.

#### 4.6. Statistische Analyse

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mithilfe der Software SAS 9.4 durchgeführt (SAS Institute Inc., Cary, NC). Primäre Endpunkte der Studie für diese Dissertation bildeten das Gesamt- sowie progressionsfreie Überleben.

Das Gesamtüberleben schließt den Zeitraum ab Randomisierung zu einem der Erhaltungstherapie-schemata bis zum Zeitpunkt des Todes oder Ende eines *follow-ups* ein. Beim progressionsfreien Überleben handelt es sich um die Zeitspanne von Randomisierung bis zu einem diagnostizierten Progress im radiologischen Staging bzw. in der klinischen Untersuchung oder dem Todeszeitpunkt des Probanden. Die Analyse der Überlebensdaten erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode, dem log-rank-Test sowie dem proportionalen Hazardmodell. Ein dabei errechneter p-Werte < 0,05 sprach dabei für ein statistisch signifikantes Ergebnis. Sämtliche Auswertungen wurden für das Gesamtkollektiv, ebenso wie für die Subgruppen der einzelnen Therapiearme durchgeführt.

Darüber hinaus wurden verschiedene Cox-Regressionsmodelle mithilfe des Akaike Informationskriteriums (*engl.: Akaike information criterion = AIC*) verglichen und die bestimmten Biomarker HPP1 mfcDNA und CEA auf ihre Wertigkeit als unabhängige Prognosemarker untersucht. Bei dem AIC handelt es sich um das älteste Maß zur Beurteilung der relativen Qualität multivariater Modelle, dessen Berechnung Likelihood-Schätzungen zugrunde liegen (Akaike 1998). Die Berechnung erfolgt anhand der nachfolgenden Formel:

$$AIC = -2L(\theta) + 2k$$

mit:

-L( $\theta$ ): negative Loglikelihood-Funktion

K: Zahl der zu schätzenden Parameter

Jedoch gilt zu beachten, dass dieses Kriterium lediglich unterschiedliche Modelle mit gleichem Datensatz, identischer Fallzahl und Anzahl an Events vergleicht. Dabei stehen kleinere Werte des AIC für eine höhere Güte des jeweiligen Cox-Modells.

Um die Aussagekraft der Biomarker bezüglich eines Therapieansprechens zu testen, wurden *Receiver-Operating-Characteristic*-Kurven, kurz ROC-Kurven, und deren Fläche unterhalb der Kurve (*engl. area under the curve = AUC*) bestimmt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Übersicht klinisch-pathologischer Patientendaten

Im Folgenden soll das für diese Doktorarbeit verwendete Patientenkollektiv detaillierter bezüglich der klinisch-pathologischen Daten beschrieben werden.

Im Gesamten wurden 195 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom im Stadium UICC IV nach einer 24-wöchigen Induktionschemotherapie in diese Studie eingeschlossen. Die Analyse der klinischen Daten zeigte, dass die Patienten mehrheitlich weiblich (69,23%) und unter 70 Jahren alt waren (66,67%), eine Tumorlokalisierung im Kolon (61,54%) aufwiesen und sich gemäß Grading zu 71% in einem G1/G2 Stadium befanden. Ebenfalls Bestandteil der Studie war eine Mutationsanalyse bezüglich KRAS, NRAS und BRAF. Besonders häufig war dabei eine KRAS-Mutation (44,12%) festzustellen, demgegenüber waren NRAS und BRAF Mutationen eher Seltenheit (5,20% bzw. 4,21%), wobei nur bei 170 Patienten Daten zur Mutationsanalyse vorlagen.

Die Homogenität des Patientenkollektives beruht auf Selektion von bestimmten Patienten hinsichtlich des Erkrankungsstatus zum Zeitpunkt der Randomisierung. Alle Probanden zeigten radiologisch ein Ansprechen auf die Induktionstherapie und befanden sich vor Beginn der Erhaltungstherapie entweder in einer kompletten Remission (*complete remission*, CR), partiellen Remission (*partial remission*, PR) oder einem stabilen Krankheitsverlauf (*stable disease*, SD). Diese Tatsache ermöglichte es, verschiedene Chemotherapien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit direkt miteinander zu vergleichen, da die Patienten zunächst ähnliche Voraussetzungen für ein Therapieansprechen mitbrachten und ein bereits vor Therapiebeginn aufgetretener Progress als Confounder ausgeschlossen werden konnte.

Als Erhaltungstherapie erhielt eine Kontrollgruppe von 58 Patienten die Standardtherapie aus einem Fluoropyrimidin in Kombination mit Bevacizumab. Als Deeskalationstherapieoptionen wurde 73 Probanden eine Bevacizumab-Monotherapie verabreicht und bei weiteren 63 auf eine medikamentöse Erhaltungstherapie verzichtet. Insgesamt konnten 194 Patienten einem Behandlungsarm zugeordnet werden, bei einem ebenfalls in die Studie eingeschlossenen Patienten erfolgte laut Daten keine Randomisierung zu einem Therapiearm. Die nachfolgenden Tabelle 5.1 Tabelle 5.2

geben einen Überblick über die klinisch-pathologischen Patientendaten und die Untergruppen der jeweiligen Therapiearme.

Klinische Angaben	Variable	Anzahl [N]	Prozentsatz [%]	Kumulative Anzahl[N]	Kumulativer Prozentsatz[%]
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	135	69,23	135	69,23
	Männlich	60	30,77	195	100,00
<b>Alter</b>	<70	130	66,67	130	66,67
	>=70	65	33,33	195	100,00
<b>Lokalisation</b>	Kolon	120	61,54	120	61,54
	Rektum	75	38,46	195	100,00
<b>Grading</b>	G 1	4	2,05	4	2,05
	G 2	135	69,23	139	71,28
	G 3	46	23,59	185	94,87
	G 4	10	5,13	195	100,00
<b>Metastasen</b>	metachron	42	21,54	42	21,54
	synchron	153	78,46	195	100,00
<b>Anzahl Metastasen</b>	1	87	44,62	87	44,62
	2	79	40,51	166	85,13
	3	25	12,82	191	97,95
	4	4	2,05	195	100,00
<b>Mutationsanalyse</b>	BRAF	7	4,12	7	4,12
	KRAS	75	44,12	82	48,24
	NRAS	9	5,29	91	53,53
	Wildtyp	79	46,47	170	100,00

**Tabelle 5.1:** Überblick der klinisch-pathologischen Patientendaten des Gesamtkollektivs. Insgesamt wurden 195 Probanden in die Studie eingeschlossen. Hinsichtlich des Mutationsstatus erfolgte nur bei 170 Studienteilnehmern eine Analyse mit vorliegenden Ergebnissen

Startzeitpunkt Erhaltungstherapie					
	Untergruppe	N	%	kumulativ	
				N	%
Therapieansprechen	<b>Komplette Remission (CR)</b>	5	2,56	5	2,56
Induktionstherapie	<b>Partielle Remission (PR)</b>	120	61,54	125	64,10
	<b>Stabiler Verlauf (SD)</b>	70	35,90	195	100,00
Therapiearm	<b>Keine Therapie</b>	63	32,47	63	32,47
	<b>Bevacizumab Monotherapie</b>	73	37,63	136	70,10

Startzeitpunkt Erhaltungstherapie					
Untergruppe	N	%	N	%	
			kumulativ	kumulativ	
Fluoropyrimidine + Bevacizumab	58	29,90	194	100,00	

**Tabelle 5.2:** Zuordnung der 195 Probanden zu Therapieansprechen auf die Induktionstherapie und zu den Therapiearmen bei Randomisierung. Zu beachten ist, dass bei einem der 195 Probanden keine Randomisierung zu einem der Therapiearme erfolgte.

## 5.2. HPP1 mfcDNA als prognostischer Marker

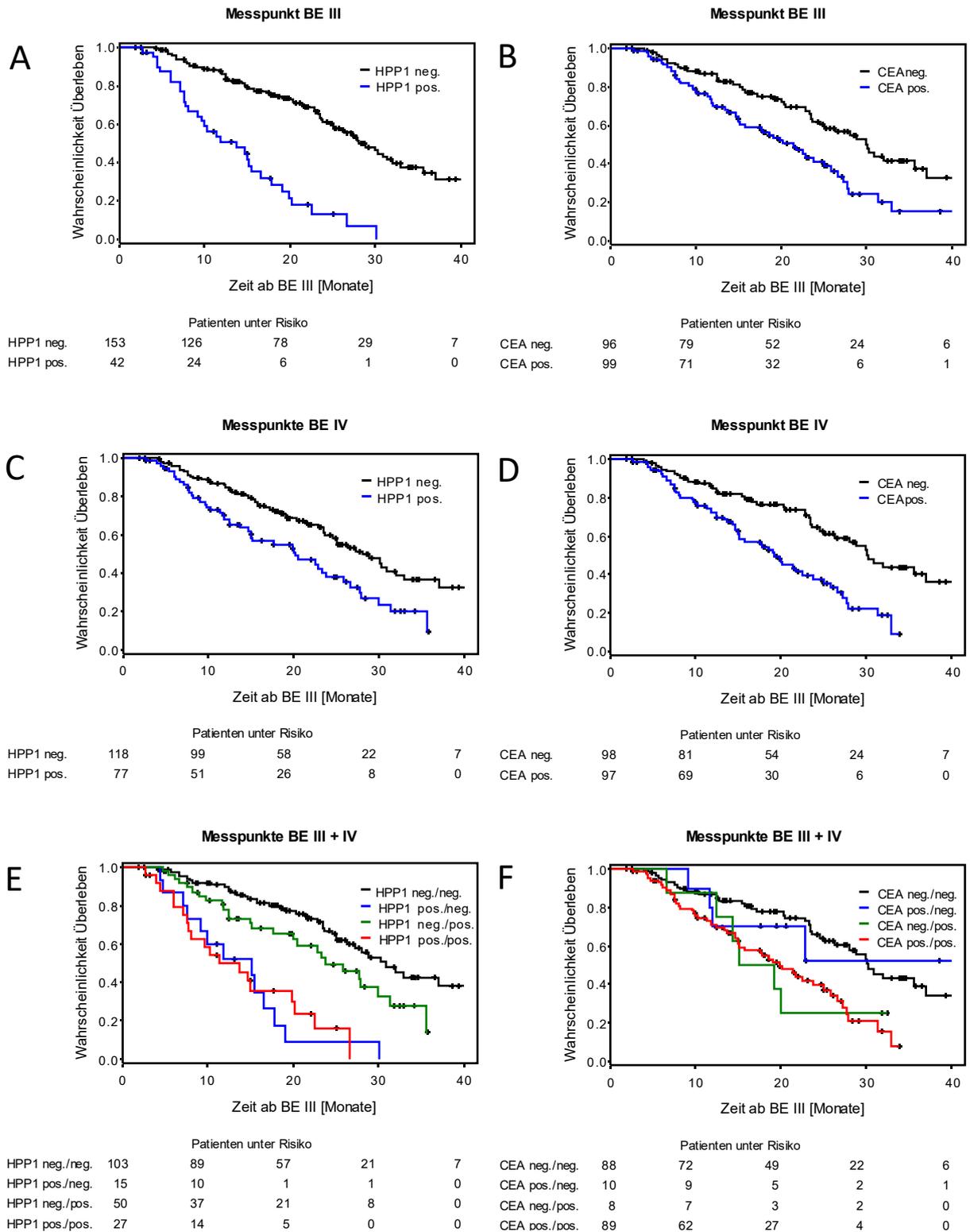
In einer dieser Dissertation vorausgehenden Arbeit konnte am gleichen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass der Nachweis methylierter, frei zirkulierender HPP1-DNA im Rahmen der Induktionschemotherapie mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben assoziiert ist (Herbst et al. 2017). Daher ist eine zentrale Frage dieser Doktorarbeit, ob sich dieses Ergebnis bei der Erhaltungstherapie ebenfalls bestätigen lässt.

### 5.2.1. Kaplan-Meier-Kurven HPP1 mfcDNA und CEA bezüglich Gesamtüberleben (OS)

Mit dem Gesamtüberleben ist die Zeitspanne von Randomisierung bis zum Todeszeitpunkt oder letztem Patientenkontakt definiert. Insgesamt konnte die Methylierung von HPP1 mfcDNA bei 42 Probanden zum Entnahmezeitpunkt BE III nachgewiesen werden. Dies entspricht bei dem Gesamtkollektiv von 195 Patienten einem Prozentsatz von 21,5%. Diese Patienten mit positivem HPP1 mfcDNA-Wert vor Start der Erhaltungstherapie zeigten ein erhöhtes Sterberisiko (HR=4,31; 95% CI: 2,75-6,74) sowie eine verkürzte mediane Überlebenszeit von 13,7 Monaten im Vergleich zu 28,1 Monaten für HPP1 mfcDNA-negative Fälle. Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens war dabei statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Auch waren CEA-Werten über dem berechneten Median von 6,5 ng/mL (CEA positiv) statistisch signifikant mit einer schlechteren Prognose als bei Werten unterhalb des Medians (CEA negativ) assoziiert (CEA pos. BE III HR=1,96; 95% CI.: 1,30-2,95). Die mediane Überlebenszeit betrug dabei 21,4 Monate für CEA-positive Probanden und 30,1 Monate bei negativen Messwerten ( $p = 0,001$ ). Sämtliche beschriebene Ergebnisse sind in Abbildung 5.1 und Tabelle 5.3. zusammengefasst.

Bereits ca. 6 Wochen nach Beginn der Erhaltungskemotherapie zum Zeitpunkt BE IV konnten Veränderungen der HPP1 mfcDNA-Methylierungsfrequenz detektiert werden. So stieg die Anzahl der HPP1 mfcDNA-positiven Patienten auf 77 an, einem Prozentsatz von 39,5% entsprechend. Positive HPP1 mfcDNA-Werte gingen dabei erneut mit einer schlechteren Gesamtüberlebensprognose einher (HPP1 BE IV: HR= 1,87; 95% CI: 1,25-2,79). Auch die mediane Überlebenszeit von 20,1 Monaten bei HPP1-Nachweis im Blut war im Vergleich zu 28,1 Monaten bei negativen Messwerten deutlich verringert ( $p=0,0019$ ). Dieser signifikante Unterschied im Gesamtüberleben ergab sich auch für die bestimmten CEA-Werte zur BE IV (30,2 vs. 19,2 Monate medianes Überleben;  $p < 0,0001$ ). Folglich waren erhöhte CEA-Werte erneut mit einer signifikant erhöhten Sterberate assoziiert (CEA pos. BE IV HR= 2,34; 95% CI: 1,55-3,55). Allerdings war die Anzahl der Patienten mit positiven bzw. negativen CEA-Werten nahezu gleichbleibend (CEA pos.: BE III: 55/99; BE IV: 57/ 97; CEA neg.: BE III 43/ 96; BE IV: 41/ 98). Dies zeigt, dass das CEA ein eher konstanter Parameter ist und weniger schnell auf Veränderungen anspricht.

Bei der Analyse des HPP1 mfcDNA-Wertes im Verlauf von BE III auf BE IV fand sich die beste Prognose für Patienten mit negativen Werten für BE III und BE IV und die kürzeste mediane Überlebenszeit für positive Messwerte zu beiden Zeitpunkten (HPP1 neg./neg. medianes Überleben 30,9 Monate vs. HPP1 pos./pos. 11,3 Monate; HR= 5,10, 95% CI: 2,88-9,03). Bei Patienten mit Änderung des HPP1-Wertes ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse: 50 Patienten mit negativem Messwert zur BE III und positivem HPP1 mfcDNA-Nachweis zur BE IV hatten ein signifikant bessere Überlebensprognose als 15 Patienten mit umgekehrtem Verlauf (HPP1 neg./pos. medianes Überleben: 23,8 Monate, HR=1,74; 95% CI=1,06-2,86; vs. HPP1 pos./neg. medianes Überleben: 15,3 Monate, HR= 5,42; 95% CI= 2,84-10,4). (Abbildung 5.1, Tabelle 5.3.).



**Abbildung 5.1:** Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs

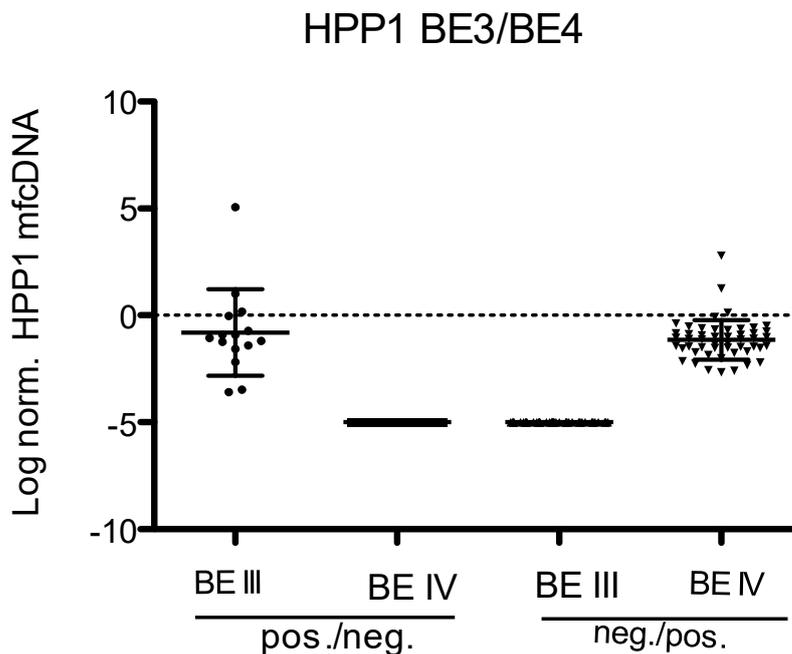
**A:** Kaplan Meier Kurven Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **B:** Kaplan Meier Kurven bezüglich CEA Werten zum Zeitpunkt BE III; **C:** Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** Überlebenskurven CEA BE IV; **E:** Kaplan Meier Kurven von HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** Kaplan Meier Kurven CEA im Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende. Zudem sind zu den Abbildungen jeweils die Patienten unter Risiko angegeben. Die zugehörigen Zahlen geben die Zahl der verbliebenen Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt an.

	Variable	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HR CI
<b>HPP1 BE III</b>	neg.	66/153	28,1	(25,1-35,6)	<0,0001	.	
	pos.	32/ 42	13,7	(9,6-17,8)		4,31	(2,75-6,74)
<b>HPP1 BE IV</b>	neg.	53/118	28,1	(24,6-37,0)	0,0019	.	
	pos.	45/ 77	20,2	(14,9-26,7)		1,87	(1,25-2,79)
<b>HPP1 BE III/IV</b>	neg./neg.	40/103	30,9	(26,3- , )	<0,0001	.	
	pos./neg.	13/ 15	15,1	(9,2-30,1)		5,42	(2,84-10,4)
	neg./pos.	26/ 50	23,8	(20,0- . )		1,74	(1,06-2,86)
	pos./pos.	19/ 27	11,3	(8,1-22,6)		5,10	(2,88-9,03)
<b>CEA BE III</b>	neg.	43/ 96	30,1	(25,1- . )	0,0010	.	
	pos.	55/ 99	21,4	(15,8-26,7)		1,96	(1,30-2,95)
<b>CEA BE IV</b>	neg.	41/ 98	30,2	(26,3- . )	<0,0001	.	
	pos.	57/ 97	19,2	(15,2-25,1)		2,34	(1,55-3,55)
<b>CEA BE III/IV</b>	neg./neg.	37/ 88	30,2	(26,3- . )	0,0007	.	
	pos./neg.	4/ 10	.	(12,0- . )		1,00	(0,36-2,82)
	neg./pos.	6/ 8	17,2	(14,3- . )		2,19	(0,92-5,21)
	pos./pos.	51/ 89	19,8	(15,1-25,8)		2,36	(1,52-3,67)

**Tabelle 5.3:** Medianes Überleben und Hazard Ratios (HR) für HPP1 mfcDNA- und CEA-Werte beim Gesamtkollektiv; Die Anzahl der Ereignisse im Verhältnis zu den Fällen ist aufgelistet (E/N). Das mediane Gesamtüberleben (OS) für alle Blutparameter ist berechnet. P-Werte geben eine mögliche statistische Signifikanz an ( $P < 0,005$ ), die HR und das 95% Konfidenzintervall (95% CI) zeigen das mit dem gegebenen Parameter assoziiertes Sterberisiko.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Überlebenszeitanalyse mit verbesserter Prognose in der Subgruppe mit Patienten, deren HPP1-mfcDNA von BE III zu BE IV positive Messwerte annahm, gab Anlass für eine weiterführende Betrachtung. Dieses Resultat war nicht derartig zu erwarten, da eigentlich bei erneuter Zunahme der HPP1 mfcDNA-Werte mit einem Progress und somit einer verschlechterten Prognose auszugehen war. Um dieses Ergebnis besser einordnen zu können, wurde ein Dotplot dieser beiden Patientengruppen angefertigt (Abbildung 5.2). Die Abbildung zeigt, dass die Datenpunkte der kleinen Gruppe von 15 Probanden mit Abfall von positive auf negative Messwerte eine stärkere Streuung aufweisen, jedoch die Mittelwerte beider Gruppen ähnlich sind. Anhand dieses Ergebnisses lassen sich keine Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Verläufe der Kaplan-Meier-Kurven ziehen. Eine falsche Zuordnung der Patientenproben konnte durch eine erneute Überprüfung der Rohdaten ebenfalls ausgeschlossen werden.

Bei den CEA-Werten im Verlauf konnten äquivalente Beobachtungen gemacht werden. Positive Werte in beiden Messungen gingen dabei mit einer signifikant schlechteren Prognose einher als zweifach negative Werte (HR= 2,36, 95% CI: 1,52-3,67). Lediglich bei 18 Patienten ergab sich eine Veränderung des CEA-Wertes, wobei bei Patienten mit positivem Wert in der BE IV ein höheres Sterberisiko als bei Probanden mit Abfall von positivem auf negativen Wert bestand (CEA neg/pos vs. neg/neg: HR= 2,19, 95% CI:1,52-3,67; CEA pos/neg vs. neg/neg: HR= 1,0, 95% CI: 0,36-2,82).



**Abbildung 5.2** Dotplot: Verteilungsmuster der Messwerte für die Gruppen pos./neg. bzw. neg./pos. für HPP1 mfcDNA und CEA: Aufgetragen wurde die auf ALU normalisierte Zahl der methylierten DNA-Moleküle für HPP1; die graphischen Linien geben den Mittelwert des normierten Logarithmus der DNA-Moleküle mit Schwankungsbreite an.

Bezüglich der klinisch-pathologischen Parameter ergaben die Berechnungen zu Alter (HR= 0,81; 95% CI: 0,52-1,24), Geschlecht (HR= 1,06, 95% CI: 0,69-1,65), Grading (HR= 1,37; 95% CI: 0,87-2,17), Tumorlokalisation (HR= 0,68; 95% CI: 0,45-1,03) und Anzahl an Metastasen (HR= 1,65; 95% CI: 1,00-2,72) keine statistisch signifikanten Ergebnisse (Tabelle 5.4). Es zeigte sich eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose bei Patienten mit synchroner im Gegensatz zu metachroner Metastasierung (HR= 1,65; 95% CI: 1,00-2,72), ebenso bei einer nachgewiesenen NRAS/KRAS Mutation im Vergleich zum Wildtyp (HR=1,44, 95% CI: 0,92-2,24). Jedoch waren diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Lediglich der bei 7 Probanden detektierte BRAF-Mutationsstatus war mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert (HR= 5,21, 95% CI:

2,01-13,5). Ein ebenso erhöhtes Sterberisiko konnte für das Ergebnis eines stabilen Krankheitsverlaufes im radiologischen Staging nach Induktionstherapie im Vergleich zu kompletter bzw. partieller Remission nachgewiesen werden (HR= 1,68; 95% CI: 1,12-2,51).

Darüber hinaus wurden die 195 Studienteilnehmer zu Beginn der Erhaltungstherapie gemäß radiologischem Staging hinsichtlich des Therapieansprechens eingruppiert. Dabei war bei 5 Patienten eine komplette Remission, bei 120 Patienten eine partielle Remission und bei 70 Patienten ein stabiler Krankheitsverlauf festzustellen. Die Kaplan-Meier-Analyse lieferten hier hinsichtlich des Gesamtüberlebens keine signifikanten Ergebnisse.

Von Interesse ist auch die erneute Analyse 6 Wochen später zum Zeitpunkt BE IV. Dabei lagen für 190 Patienten Resultate des radiologischen Stagings vor. Davon bestand bei 158 Probanden eine komplette/ partielle Remission oder ein stabiler Krankheitsverlauf, jedoch konnte bei 32 Patienten bereits ein Progress (PD=*progressive disease*) festgestellt werden. Die Kaplan Meier Berechnungen zeigten für diese Patientengruppe ebenfalls eine signifikant schlechtere Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 11,3 Monaten im Vergleich zu 28,8 Monaten bei Patienten ohne Progress (CR+PR+SD vs. PD: HR= 4,37; 95% CI:2,78-6,86).

Die Überlebenszeitanalyse der verschiedenen Therapiearme ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Standardtherapie und den Deeskalationsformen (Beva Mono vs. Fluoro + Beva: HR= 1,07; 95% CI: 0,67-1,71; keine med. Therapie vs. Fluoro+ Beva: HR= 0,78; 95% CI: 0,46-1,31). Dabei betragen die medianen Gesamtüberlebenszeiten 23,3 Monate bei der Kontrollgruppe mit Fluoropyrimidinen+Bevacizumab, 25,8 Monate bei der Bevacizumab Monotherapie und 27,8 Monate bei fehlender medikamentöser Therapie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich HPP1 in der univariaten Analyse als ein prognostischer Marker für das Gesamtüberleben sowohl zur BE III als auch 6 Wochen danach zum Zeitpunkt BE IV im Rahmen der Erhaltungstherapie erwies. Dabei haben besonders positive HPP1-Werte zur BE III mit einer Hazard Ratio von 4,31 den entscheidendsten Prognosewert. Die CEA-Messung liefert vergleichbare Ergebnisse, jedoch mit weniger starken Veränderungen im zeitlichen Verlauf.

Klinische Angabe	Variable	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HR CI
<b>Alter</b>	<70	69/130	23,80	(21,4-28,8)	0,3282	.	
	>=70	29/ 65	27,80	(20,0- .)		0,81	(0,52-1,24)
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	28/ 60	25,10	(19,8- .)	0,7786	.	
	Männlich	70/135	25,10	(21,7-30,1)		1,06	(0,69-1,65)
<b>Lokalisation</b>	Kolon	64/120	22,90	(18,6-27,9)	0,0661	.	
	Rektum	34/ 75	30,00	(24,6- .)		0,68	(0,45-1,03)
<b>Grading</b>	1+2	64/139	26,70	(23,5-32,0)	0,1710	.	
	3	26/ 46	20,20	(15,4- .)		1,37	(0,87-2,17)
<b>Metastasen</b>	metachron	19/ 42	26,70	(24,6- .)	0,0487	.	
	synchron	79/153	22,90	(20,0-30,0)		1,65	(1,00-2,72)
<b>Anzahl Metastasen</b>	1	41/ 87	27,90	(21,4-37,0)	0,3579	.	
	>1	57/108	24,60	(20,2-28,1)		1,21	(0,81-1,80)
<b>Genmutation</b>	Wildtyp	35/ 79	30,00	(22,8- .)	0,0009	.	
	NRAS/KRAS	46/ 84	25,10	(18,6-28,8)		1,44	(0,93-2,24)
	BRAF	5/ 7	7,80	( 5,4-22,9)		5,21	(2,01-13,5)
<b>Therapie-ansprechen</b>	CR	3/ 5	17,05	(12,5-20,4)	0,0104	.	
	PR	53/120	27,20	(23,4- .)		0,36	(0,11-1,16)
<b>Induktions-therapie</b>	SD	42/ 70	25,10	(15,2-30,1)		0,62	(0,19-2,03)
	CR+PR	56/125	25,80	(22,9-37,0)	0,0107	.	
	SD	42/ 70	25,10	(15,2-30,1)		1,68	(1,12-2,51)
<b>Therapie-ansprechen Zeitpunkt BE IV</b>	CR+PR+SD	65/158	28,8	(25,8-37,0)	<0,0001	.	
	PD	28/ 32	11,3	( 7,6-17,8)		4,37	(2,78-6,86)
	CR+PR	29/ 76	31,3	(25,8- .)	<0,0001	.	
	SD	24/ 57	28,8	(23,7- )		1,50	(0,87-2,59)
	PD	28/ 32	11,3	( 7,6-17,8)		5,81	(3,40-9,91)
<b>Therapiearm</b>	Fluoro+Beva	30/ 58	23,3	(18,6-37,0)	0,4245	.	
	Beva Mono	42/ 73	25,8	(17,8-30,2)		1,07	(0,67-1,71)
	keine Therapie	26/ 63	27,8	(22,8- .)		0,78	(0,46-1,31)

**Tabelle 5.4:** Analyse der Überlebensdaten verschiedener klinischer Parameter: aufgelistet sind Anzahl der aufgetretenen Events, Medianes Gesamtüberleben, P-Werte und HR mit 95% CI.

### 5.2.2. Kaplan-Meier-Kurven einzelner Therapiearme bezüglich Gesamtüberleben (OS)

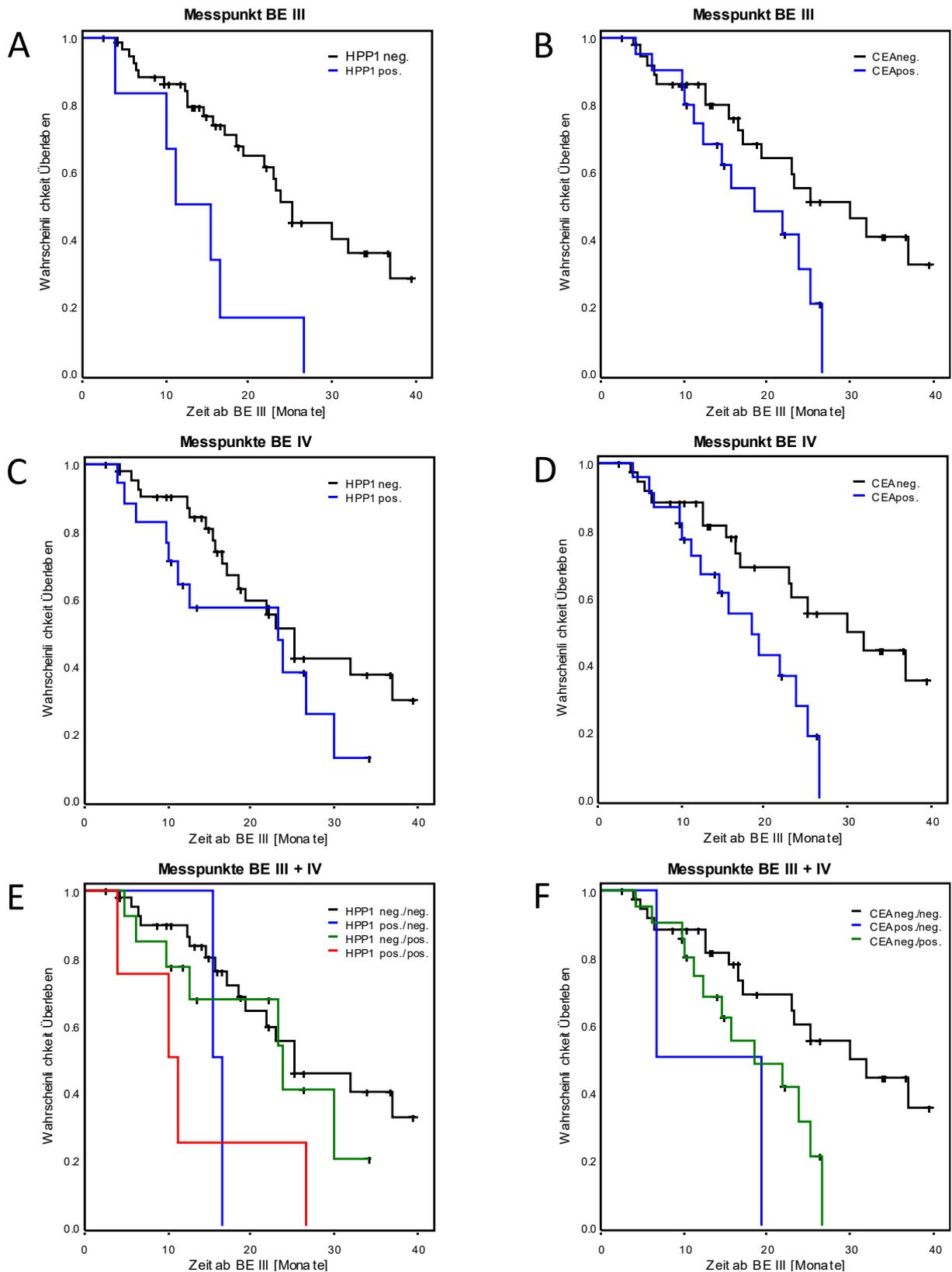
Die Analyse hinsichtlich des Gesamtüberlebens und Sterberisikos der einzelnen Therapiearme zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen. Jedoch erscheint es durchaus relevant, die jeweiligen Therapieformen bezüglich der HPP1 mfcDNA-Spiegel zu vergleichen. Wünschenswert wäre es dabei, einzelne Patienten des jeweiligen Therapiearms aufgrund hoher HPP1-Messwerte herauszufiltern, um möglichst

frühzeitige Aussagen bezüglich Therapieansprechen und Prognose unter Erhaltungstherapie treffen und ggf. eine Therapieumstellung vornehmen zu können. Daher werden nachfolgend die Kaplan-Meier-Kurven mit den zugehörigen Tabellen der einzelnen Erhaltungstherapiearme erläutert. Kritisch zu betrachten ist bei sämtlichen Analysen, dass die Kollektive der einzelnen Subgruppen zum Teil eine sehr geringe Probandenzahl aufweisen, die eine Auswertung erschweren.

#### **5.2.2.1. Arm I: Standardschema aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab**

58 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Randomisierung einem Erhaltungstherapieschema bestehend aus Fluoropyrimidinen in Kombination mit Bevacizumab zugeteilt. Mit dieser Standardtherapie sollten die beiden Versuchsgruppen mit einer Deeskalationstherapie in Form einer Bevacizumab-Monotherapie bzw. keiner medikamentösen Therapie verglichen werden. In der Vergleichsgruppe wurden bei 7 Patienten zur BE III und bei 18 zur BE IV positive HPP1-Werte gemessen. Ein positiver HPP1 mfcDNA-Wert war erneut mit einer signifikant schlechteren Prognose als bei negativem Ergebnis assoziiert (HR= 3,42; 95% CI: 1,37-8,54). Die Ergebnisse zur BE IV lieferten dabei kein signifikantes Ergebnis (HR= 1,71; 95% CI: 0,80-3,63). Bezüglich der Analyse der HPP1mfcDNA-Werte im Verlauf erwies sich lediglich das HPP1-Muster pos./pos. (BE III/ BE IV) als ein signifikanter Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben (HR= 3,89; 95% CI: 1,28-11,8). Die Analyse der beiden kleinen Kollektive mit HPP1-Veränderung wie „pos./neg.“ bzw. „neg./pos.“ erbrachte erneut keine signifikanten Ergebnisse (HPP1 pos./neg.:HR=3,56; 95% CI: 0,78-16,2; HPP1 neg./pos.: HR= 1,43; 95% CI:0,59-3,50). Erhöhte CEA-Werte zeigten erwartungsgemäß eine prognostische Vorhersagekraft und waren mit einem höheren Sterberisiko assoziiert (CEA pos. BE III: HR= 2,19; 95%CI: 1,02-4,72; CEA pos. BE IV: HR=2,67; 95% CI: 1,23-5,80). In der Verlaufsbeobachtung der CEA-Werte trat dabei lediglich bei 2 Patienten eine Änderung der CEA-Konzentration auf, sodass der Verlauf sämtlicher Kaplan-Meier-Kurven nahezu identisch ist.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass HPP1 mit einer Hazard Ratio von 3,42 zum Zeitpunkt BE III bei Randomisierung der bedeutendste prognostische Marker in dieser Therapiegruppe ist und die erneute Bestimmung 6 Wochen nach Therapiebeginn diesbezüglich keinen zusätzlichen Wissensgewinn bringt. Gleiches gilt für die CEA-Werte, da nur geringe Konzentrationsveränderungen im Verlauf detektierbar sind.



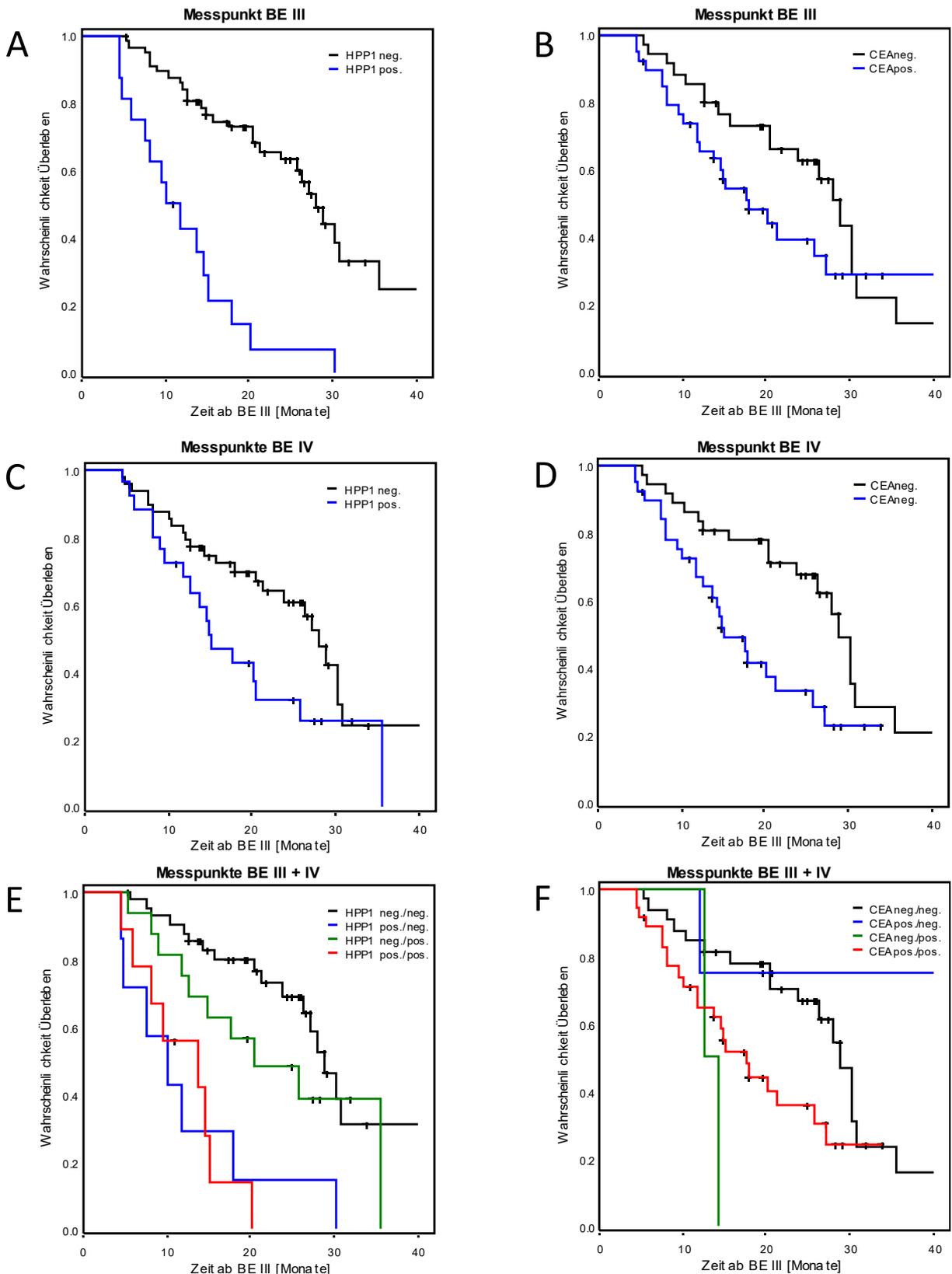
**Abbildung 5.3** Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms I: Fluoropyrimidine + Bevacizumab: **A:** Kaplan Meier Kurven Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **B:** Kaplan Meier Kurven bezüglich CEA Werten zum Zeitpunkt BE III; **C:** Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** Überlebenskurven CEA BE IV, **E:** Kaplan Meier Kurven von HPP1 mfc-DNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** Kaplan Meier Kurven CEA im Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HR CI
HPP1	neg.	24/ 51	25,10	(21,7- )	0,0050	.	
BE III	pos.	6/ 7	13,35	(10,2-26,7)		3,42	(1,37-8,54)
HPP1	neg.	19/ 40	25,10	(18,6- )	0,1595	.	
BE IV	pos.	11/ 18	23,30	(11,3- )		1,71	(0,80-3,63)
HPP1	neg./neg.	17/ 38	25,10	(19,2- )	0,0375	.	
BE III/IV	pos./neg.	2/ 2	16,00	(15,4-16,6)		3,56	(0,78-16,2)
	neg./pos.	7/ 13	23,80	(12,5- )		1,43	(0,59-3,50)
	pos./pos.	4/ 5	10,75	( 4,0-26,7)		3,89	(1,28-11,8)
CEA	neg.	17/ 37	30,00	(19,2- )	0,0400	.	
BE III	pos.	13/ 21	18,60	(14,7-26,7)		2,19	(1,02-4,72)
CEA	neg.	15/ 35	30,00	(22,9- )	0,0100	.	
BE IV	pos.	15/ 23	18,60	(12,4-26,7)		2,67	(1,23-5,80)
CEA	neg./neg.	15/ 35	30,00	(22,9- )	0,0192	.	
BE III/IV	neg./pos.	2/ 2	12,95	( 6,7-19,2)		4,93	(1,06-22,8)
	pos./pos.	13/ 21	18,60	(14,7-26,7)		2,51	(1,13-5,58)

**Tabelle 5.5** Medianes Überleben mit P und HR und 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV Therapiearm I: Fluoropyrimidine + Bevacizumab.

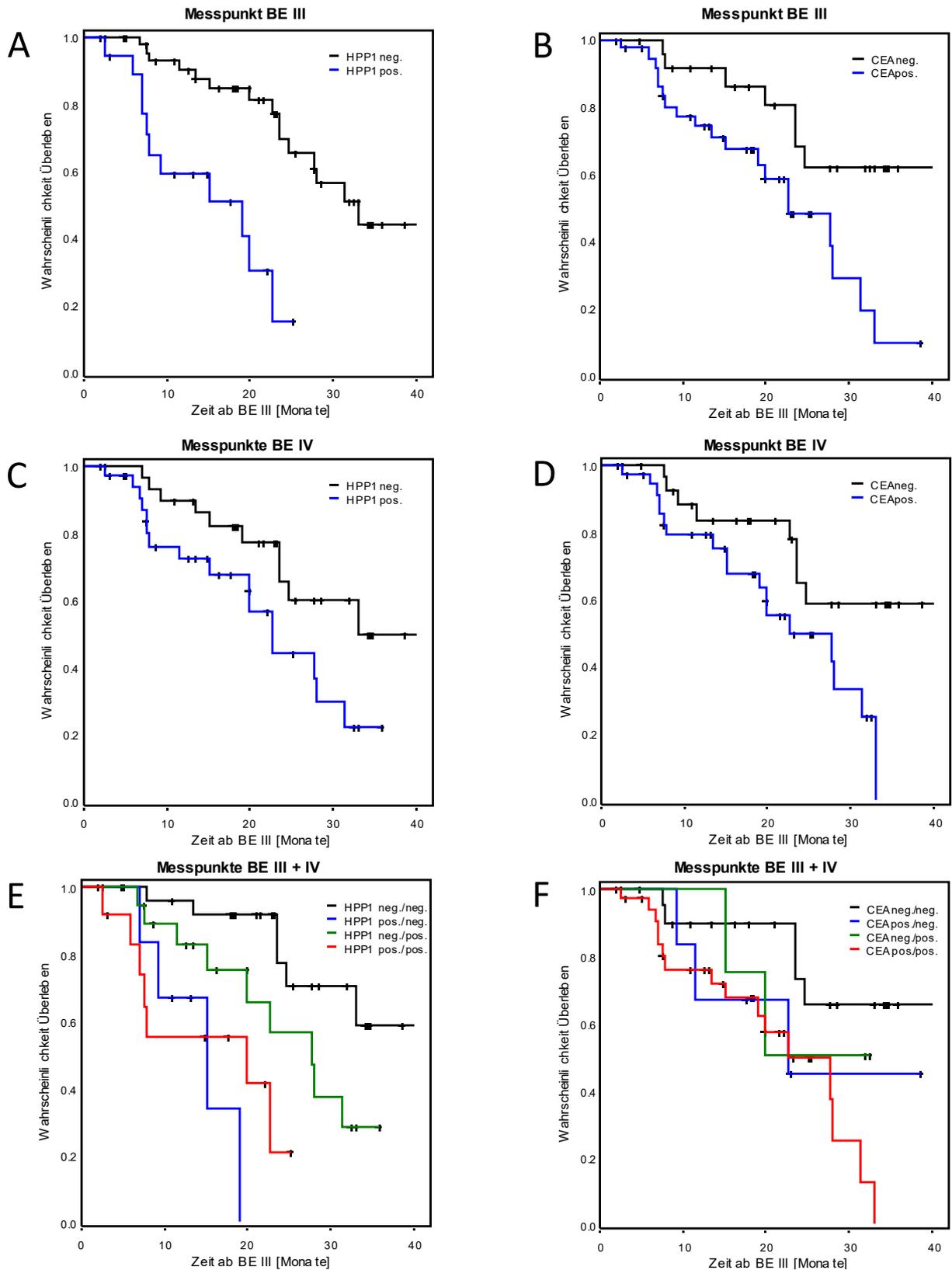
### 5.2.2.2. Arm II: Bevacizumab-Monotherapie

Das Kollektiv mit einer Deeskalationstherapie in Form einer Bevacizumab Monotherapie bestand aus einer Gruppe von 73 Patienten. Von diesen waren bei 16 Patienten zur BE III und bei 25 Patienten zur BE IV positive Messwerte für HPP1 mfcDNA detektierbar. Positive Messwerte gingen dabei erneut mit einer signifikant schlechteren Prognose für die Patienten einher (HPP1 BE III pos.: HR=5,03; 95% CI: 2,58-9,83; HPP1 BE IV pos.: HR=1,90; 95% CI: 1,02-3,51). Folglich gilt dies auch bei Patienten, die in beiden Blutproben positive Werte vorwiesen (HPP1 pos./pos.: HR:6,57; 95%CI: 2,23-13,5). Interessanterweise ging eine Entwicklung von positiven zu negativen Messwerten bei 7 Patienten mit einer Hazard-Ratio von 5,49 einher (95% CI: 2,23-13,5). Die Ergebnisse der Patienten mit dem HPP1 mfcDNA-Muster neg./pos. waren dabei nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse der CEA-Messung waren weitestgehend deckungsgleich mit dem Therapiearm I mit lediglich signifikanten Ergebnissen zur BE IV (CEA pos.: HR: 2,23, 95% CI: 1,18-4,18) und schlechtester Prognose bei Patienten mit zweizeitig erhöhten CEA-Werten (CEA pos./pos.: HR:2,00; 95%CI: 1,05-3,84).



**Abbildung 5.4:** Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms II: Bevacizumab-Monotherapie.: **A:** Kaplan Meier Kurven Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **B:** Kaplan Meier Kurven bezüglich CEA Werten zum Zeitpunkt BE III; **C:** Gesamtüberleben bezüglich HPP1 BE IV; **D:** Überlebenskurven CEA BE IV, **E:** Kaplan Meier Kurven von HPP1 mfc-DNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** Kaplan Meier Kurven CEA im Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.





**Abbildung 5.5:** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms III: Keine medikamentöse Erhaltungstherapie: **A:** Kaplan Meier Kurven Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfc-DNA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **B:** Kaplan Meier Kurven bezüglich CEA Werten zum Zeitpunkt BE III; **C:** Gesamtüberleben bezüglich HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** Überlebenskurven CEA BE IV; **E:** Kaplan Meier Kurven von HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** Kaplan Meier Kurven CEA im Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.

Biomarker	Variable	E/N	Median OAS	CI	P	HR	HR CI
HPP1	neg.	15/ 44	33,0	(24,6- .)	<0,0001	.	
BE III	pos.	11/ 19	19,0	( 7,8- .)		5,10	(2,11-12,3)
HPP1	neg.	10/ 29	33,0	(23,5- .)	0,0354	.	
BE IV	pos.	16/ 34	22,8	(19,8- .)		2,31	(1,04-5,14)
HPP1	neg./neg.	6/ 23	.	(33,0- .)	0,0003	.	
BE III/IV	pos./neg.	4/ 6	15,1	( 9,2-19,0)		11,11	(2,70-45,8)
	neg./pos.	9/ 21	27,8	(20,0- .)		2,81	(0,98-8,00)
	pos./pos.	7/ 13	19,8	( 7,5- .)		7,77	(2,41-25,1)
CEA	neg.	7/ 24	.	(23,5- .)	0,0100	.	
BE III	pos.	19/ 39	22,8	(19,0- .)		3,04	(1,26-7,36)
CEA	neg.	8/ 26	.	(23,5- .)	0,0238	.	
BE IV	pos.	18/ 37	22,6	(19,0-33,0)		2,58	(1,10-6,04)
CEA	neg./neg.	5/ 20	.	(24,6- .)	0,0588	.	
BE III/IV	pos./neg.	3/ 6	22,8	(11,6- .)		2,59	(0,61-10,9)
	neg./pos.	2/ 4	.	(15,2- .)		1,86	(0,36-9,69)
	pos./pos.	16/ 33	22,6	(19,0-33,0)		3,77	(1,35-10,5)

**Tabelle 5.7:** Medianes Gesamtüberleben mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV für Therapiearm III: Keine medikamentöse Therapie.

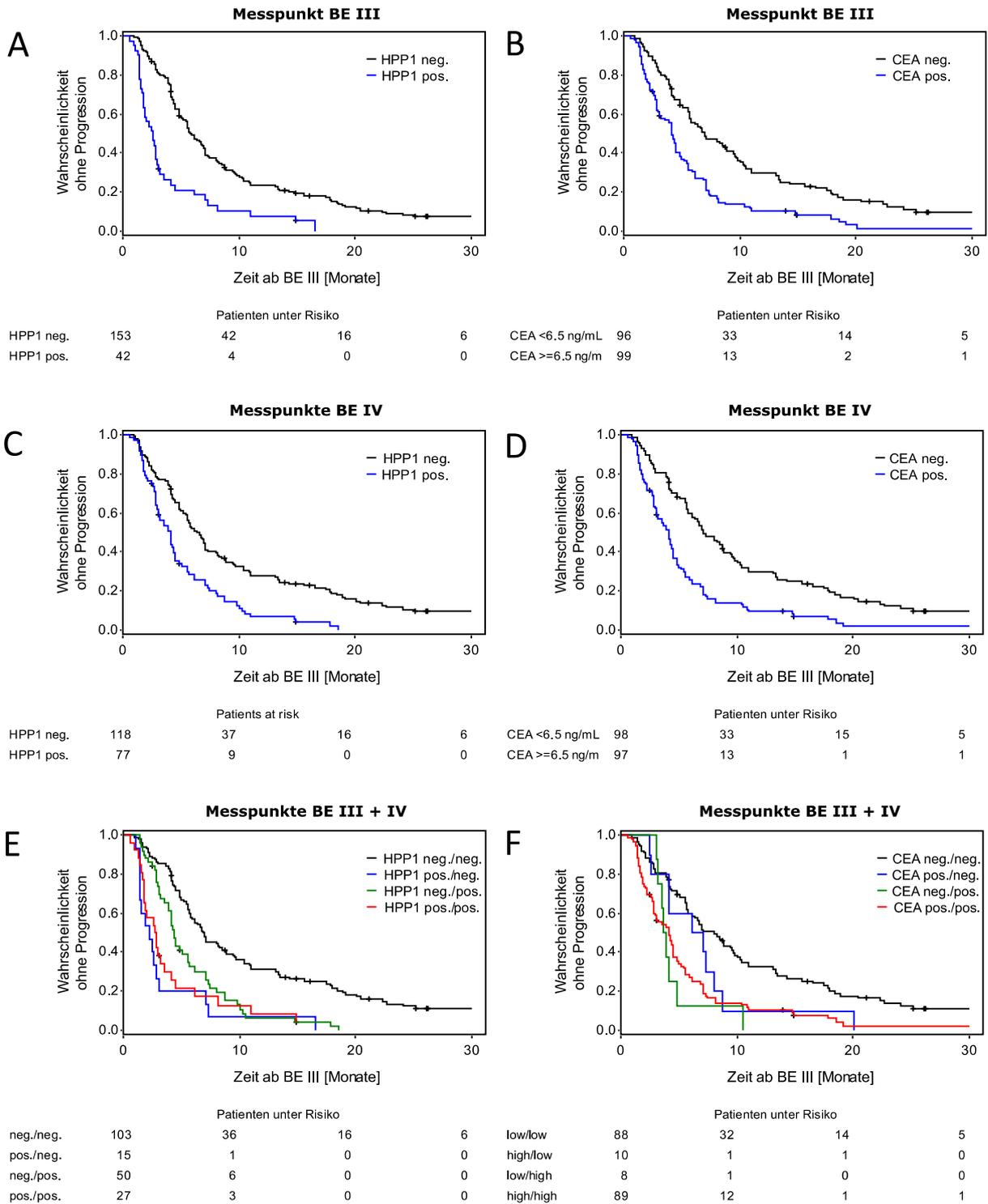
### 5.2.3. Kaplan-Meier-Kurven der Biomarker bezüglich des progressionsfreien Überlebens (PFS)

Darüber hinaus sollte das progressionsfreie Überleben (PFS) als ein weiterer Endpunkt dieser Studie bestimmt werden. Definiert ist das PFS als Zeitspanne vom Start der Erhaltungstherapie zum Zeitpunkt BE III bis zu einem diagnostizierten Krankheitsprogress oder alternativ dem Todesdatum des Patienten. Da aber das Gesamtüberleben im Fokus dieser Arbeit stehen soll, werden im Folgenden nur die wichtigsten Zusammenhänge das PFS betreffend dargestellt.

Die abgebildeten Kaplan-Meier Kurven des progressionsfreien Überlebens für die HPP1 mfcDNA und CEA-Spiegel in Abbildung 5.6 sowie die Berechnungen in den entsprechenden Tabellen 5.8 und 5.9 zeigen ein dem Gesamtüberleben ähnliches Ergebnis mit HPP1 mfcDNA als signifikanten Prognosemarker für das progressionsfreie Überleben (HPP1 BE III pos.: HR=2,62; 95% CI:1,82-3,78; HPP1 BE IV pos.: HR=2,03; 95% CI: 1,48-2,78). Auch die Kaplan Meier Kurven bezüglich des PFS sehen denen des Gesamtüberlebens ähnlich. Gleiches gilt für die CEA-Messungen.

Bei Auswertung der klinischen Angaben der Probanden ist hervorzuheben, dass Patienten ohne Erhaltungstherapie eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich

des PFS hatten als Patienten mit der Standardtherapie aus Fluoropyrimidinen in Kombination mit Bevacizumab (HR=1,66; 95% CI:1,14-2,43). Hinsichtlich der Bevacizumab Monotherapie ergab sich hierfür kein signifikant erhöhtes Risiko (HR=1,31; 95% CI: 0,91-1,88). Anders als beim OS zeigten Probanden mit synchroner im Gegensatz zu metachroner Metastasierung (HR=1,48; 95% CI:1,03-2,13) und mehr als einem Metastasenherd (HR=1,64; 95% CI:1,21-2,22) eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich des PFS. Gleiches gilt für einen stabilen Krankheitsverlauf im Vergleich zur kompletten Remission im radiologischen Staging nach der Induktionstherapie (SD vs. CR+PR: HR= 4,62; 95% CI: 1,12-18,9). Die Mutationsanalyse lieferte beim PFS keine signifikanten Ergebnisse, jedoch deutliche Tendenzen zu einer verschlechterten Prognose bei Detektion einer NRAS/KRAS oder BRAF-Mutation (NRAS/KRAS vs. Wildtyp: HR= 1,38; 95% CI: 0,99-1,91; BRAF vs. Wildtyp: HR= 2,23; 95% CI: 0,95-5,23).



**Abbildung 5.6** Kaplan-Meier-Kurven des PFS für das Gesamtkollektiv

**A:** Kaplan-Meier-Kurven PFS bezüglich HPP1 mfcDNA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **B:** Kaplan-Meier-Kurven bezüglich CEA-Werten zum Zeitpunkt BE III; **C:** PFS bezüglich HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** Überlebenskurven CEA BE IV, **E:** Kaplan-Meier-Kurven von HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** Kaplan-Meier-Kurven CEA im Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende. Zudem sind zu den Abbildungen jeweils die Patienten unter Risiko angegeben. Die zugehörigen Zahlen geben die Zahl der verbliebenen Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt an.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HR CI
HPP1	neg.	138/153	5,80	( 5,2- 7,1)	<0,0001	.	
BE III	pos.	39/ 41	2,60	( 1,9- 3,1)		2,62	(1,82-3,78)
HPP1	neg.	105/118	6,40	( 5,5- 8,0)	<0,0001	.	
BE IV	pos.	72/ 76	4,10	( 3,1- 4,5)		2,03	(1,48-2,78)
HPP1	neg./neg.	90/103	7,00	( 5,8- 8,9)	<0,0001	.	
BE III/IV	pos./neg.	15/ 15	2,30	( 1,4- 7,1)		3,87	(2,21-6,78)
	neg./pos.	48/ 50	4,40	( 3,9- 5,7)		2,09	(1,45-3,01)
	pos./pos.	24/ 26	2,75	( 1,8- 4,5)		3,05	(1,92-4,86)
CEA	neg.	85/ 96	7,00	( 5,7- 9,6)	<0,0001	.	
BE III	pos.	92/ 98	4,20	( 3,2- 4,9)		1,92	(1,42-2,60)
CEA	neg.	87/ 98	7,10	( 6,2- 9,4)	<0,0001	.	
BE IV	pos.	90/ 96	4,10	( 3,2- 4,5)		2,08	(1,53-2,82)
CEA	neg./neg.	77/ 88	8,00	( 6,2-10,1)	<0,0001	.	
BE III/IV	pos./neg.	10/ 10	6,65	( 4,1-20,1)		1,59	(0,82-3,08)
	neg./pos.	8/ 8	3,80	( 3,6-10,5)		2,69	(1,28-5,65)
	pos./pos.	82/ 88	4,20	( 3,0- 4,5)		2,14	(1,56-2,96)

**Tabelle 5.8** Medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV Gesamtkollektiv.

Klinische Angabe	An-Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HR CI
Alter	<70	119/130	4,80	( 4,2- 6,6)	0,4763	.	
	>=70	58/ 64	5,70	( 4,4- 7,1)		0,89	(0,65-1,22)
Geschlecht	weiblich	56/ 60	4,50	( 4,1- 6,2)	0,3795	.	
	männlich	121/134	5,50	( 4,5- 7,0)		0,87	(0,63-1,19)
Lokalisation	Kolon	111/120	4,80	( 4,2- 5,7)	0,1826	.	
	Rektum	66/ 74	5,90	( 4,4- 8,1)		0,81	(0,60-1,11)
Grading	1+2	127/138	5,50	( 4,5- 6,9)	0,4061	.	
	3	40/ 46	4,95	( 3,6- 7,1)		0,86	(0,60-1,23)
Metastasen	metachron	39/ 42	7,00	( 5,5-14,9)	0,0300	.	
	synchron	138/152	4,80	( 4,2- 5,7)		1,48	(1,03-2,13)
Anzahl Metastasen	1	75/ 87	6,70	( 5,5- 8,9)	0,0010	.	
	>1	102/107	4,50	( 3,9- 5,5)		1,64	(1,21-2,22)
Genmutation	Wildtyp	71/ 79	6,60	( 5,6-10,3)	0,0475	.	
	NRAS/KRAS	76/ 84	4,50	( 3,9- 6,9)		1,38	(0,99-1,91)
	BRAF	6/ 7	4,30	( 3,5- 5,2)		2,23	(0,95-5,23)
Therapieansprechen	CR	2/ 4	20,40	( 5,8- ,)	0,0298	.	
	PR	113/124	5,50	( 4,5- 6,7)		3,56	(0,88-14,4)
Induktionstherapie	SD	62/ 66	4,30	( 3,5- 6,9)		4,62	(1,12-18,9)
	CR+PR	115/128	5,50	( 4,8- 6,7)	0,0552	.	
	SD	62/ 66	4,30	( 3,5- 6,9)		1,35	(0,99-1,84)

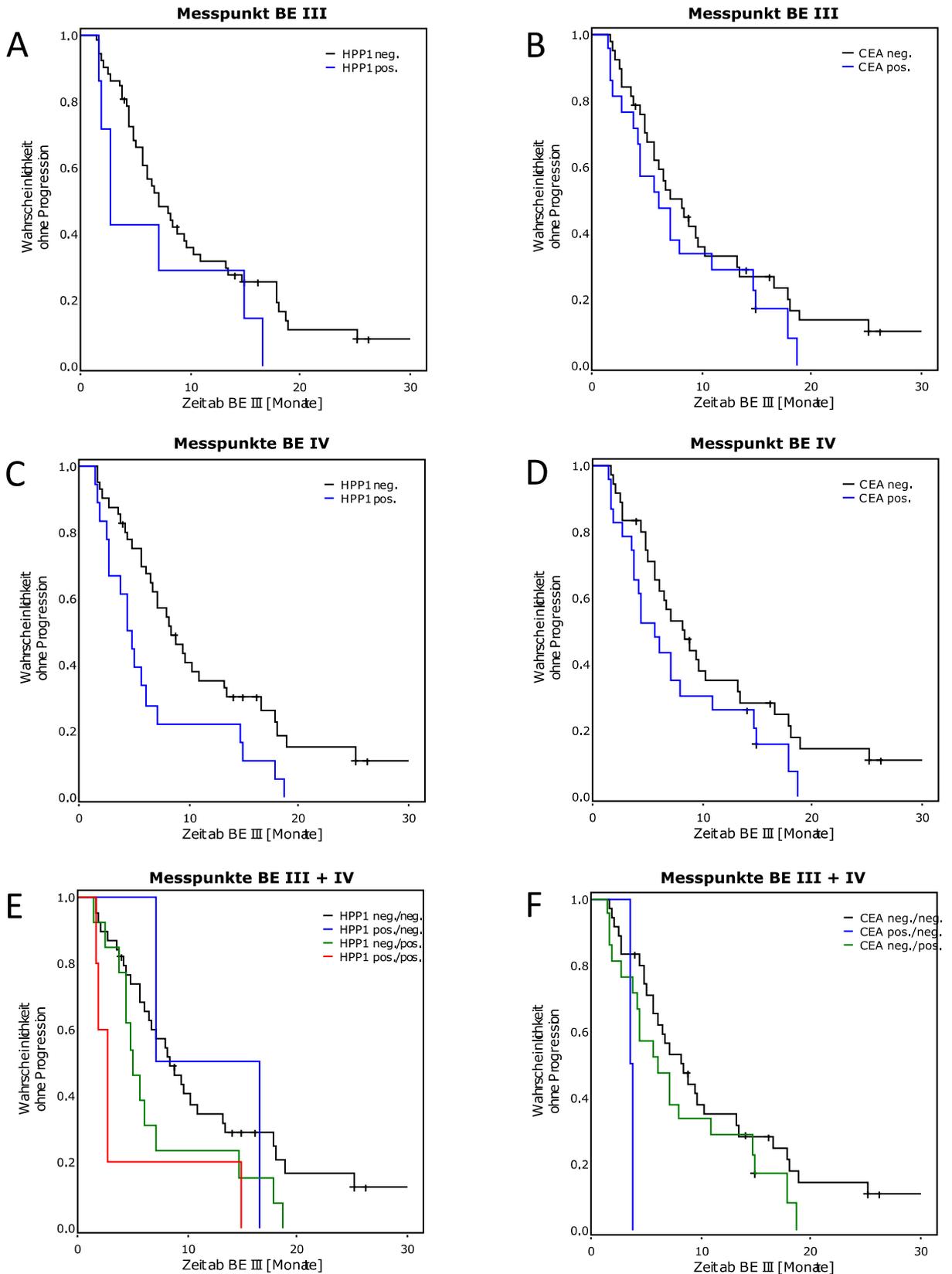
Klinische An- gabe	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HR CI
Therapiearm	Fluoro +Beva	51/ 58	7,10	( 5,7-10,4)	0,0285	.	
	Beva Mono	68/ 72	4,50	( 4,1- 5,8)		1,31	(0,91-1,88)
	Keine Therapie	58/ 63	4,20	( 3,2- 6,4)		1,66	(1,14-2,43)

**Table 5.9** Anzahl aufgetretener Ereignisse (E/N), Medianes PFS in Monaten mit CI, P-Werte und HR mit 95% CI für verschiedene klinische Parameter.

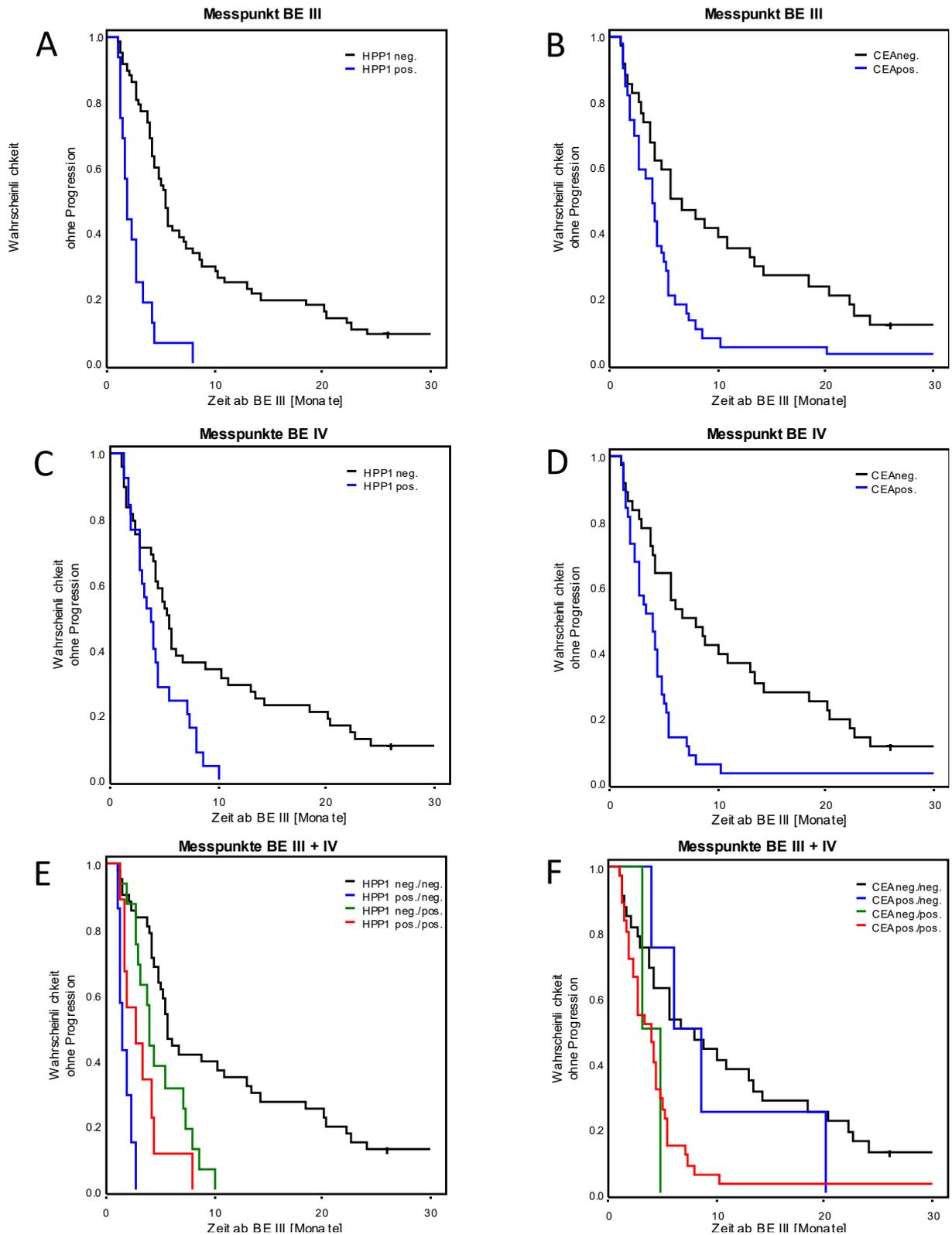
#### 5.2.4. Kaplan-Meier-Kurven der Biomarker einzelner Therapiearme bezüglich des progressionsfreien Überlebens (PFS)

Nachfolgend sind die Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen Therapiearme hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens dargestellt.

Insgesamt sind beim Vergleich der Kaplan-Meier-Kurvenverläufe keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Bezüglich der HPP1 mfcDNA-Messwerte zeigte sich bei Patienten mit der Standardtherapie aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab bei positiven Messwerten zum Zeitpunkt BE IV ein signifikant höheres Risiko für einen Progress im Verlauf (HR: 2,09; 95% CI: 1,16-3,77). Zum Zeitpunkt BE III ist diesbezüglich noch kein signifikantes Ergebnis zu finden. Dies liegt höchstwahrscheinlich an der geringen Anzahl von 7 Patienten mit HPP1 mfcDNA-Positivität. Bei Probanden mit einer Bevacizumab-Monotherapie ging hingegen ein positiver Messwert zum Zeitpunkt BE III und IV mit einem erhöhten Progressionsrisiko einher (HPP1 BE III HR: 4,26; 95% CI: 2,30-7,88; HPP1 BE IV HR: 2,12; 95% CI: 1,25-3,62). Bei fehlender medikamentöser Chemotherapie lieferte lediglich die BE III ein signifikantes Ergebnis (HPP1 BE III HR: 1,90; 95% CI: 1,07-3,39). Da die einzelnen Subgruppen mit HPP1-Veränderung sehr kleine Teilnehmerzahlen einschließen, sind deren Ergebnisse der Vollständigkeit halber tabellarisch aufgelistet, jedoch wird auf eine Interpretation verzichtet. Der Nachweis eines hohen Messwerts für CEA war, ausgenommen der Kontrollgruppe, mit einer signifikant schlechteren Prognose für das progressionsfreie Überleben verbunden. Zusammenfassend zeigt die Subgruppenanalyse von HPP1 hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens, dass eine zusätzliche Bestimmung von HPP1 zum CEA keine wesentlichen Vorteile bringt, da aufgrund starker Schwankungen im Spiegel kein optimaler Messzeitpunkt festgelegt werden kann und das einfacher zu bestimmende CEA vergleichbare Aussagekraft besitzt.

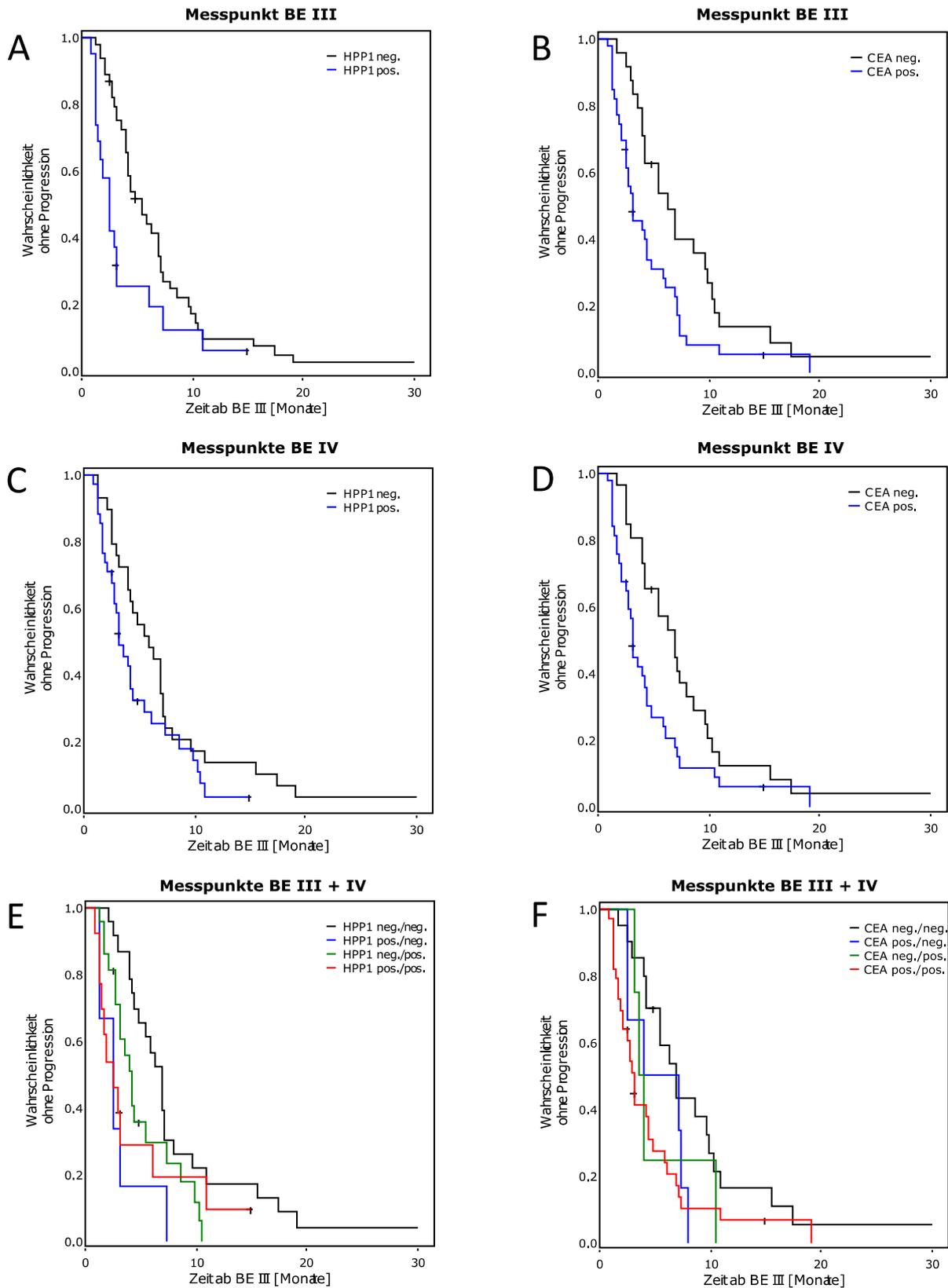


**Abbildung 5.7:** Kaplan-Meier-Kurven PFS unter Therapie von Fluoropyrimidinen+Bevacizumab  
**A:** HPP1 mfcDNA BE III; **B:** CEA BE III; **C:** HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** CEA BE IV; **E:** HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** CEA Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.



**Abbildung 5.8** Kaplan-Meier-Kurven PFS unter Bevacizumab Monotherapie

**A:** HPP1 mfcDNA BE III; **B:** CEA BE III; **C:** HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** CEA BE IV; **E:** HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** CEA Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.



**Abbildung 5.9:** Kaplan-Meier-Kurven PFS bei fehlender medikamentöser Chemotherapie: **A:** HPP1 mfcDNA BE III; **B:** CEA BE III; **C:** HPP1 mfcDNA BE IV; **D:** CEA BE IV; **E:** HPP1 mfcDNA im Verlauf BE III/BE IV; **F:** CEA Verlauf BE III/BE IV; die jeweiligen Farben der Kurven entsprechen den jeweiligen Ergebnissen der HPP1 mfcDNA-Messung in der Legende.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HRCI
HPP1 III	BE neg.	44/ 51	7,10	( 5,7-10,4)	0,1518	.	
	pos.	7/ 7	2,80	( 1,9-16,6)		1,79	(0,80-4,02)
HPP1 IV	BE neg.	33/ 40	8,50	( 6,7-13,4)	0,0121	.	
	pos.	18/ 18	4,65	( 2,8-14,8)		2,09	(1,16-3,77)
HPP1 BE III/IV	neg./neg.	31/ 38	8,50	( 6,6-13,4)	0,0405	.	
	pos./neg.	2/ 2	11,85	( 7,1-16,6)		1,11	(0,26-4,68)
	neg./pos.	13/ 13	5,10	( 4,4-18,6)		1,85	(0,95-3,59)
	pos./pos.	5/ 5	2,70	( 1,9-14,9)		3,29	(1,25-8,67)
CEA BE III	neg.	32/ 37	8,30	( 5,7-13,3)	0,2589	.	
	pos.	19/ 21	6,10	( 4,3-14,9)		1,39	(0,78-2,50)
CEA BE IV	neg.	30/ 35	8,50	( 6,2-13,4)	0,1126	.	
	pos.	21/ 23	5,60	( 3,9-14,8)		1,58	(0,89-2,81)
CEA III/IV	BE neg./neg.	30/ 35	8,50	( 6,2-13,4)	0,0413	.	
	neg./pos.	2/ 2	3,80	( 3,7- 3,9)		5,27	(1,15-24,2)
	pos./pos.	19/ 21	6,10	( 4,3-14,9)		1,48	(0,82-2,68)

**Tabelle 5.10:** Fluoropyrimidine+Bevacizumab: Anzahl aufgetretener Ereignisse der Gesamtanzahl (E/N), medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HRCI
HPP1 BE III	neg.	53/ 57	5,50	( 4,4- 7,4)	<0,0001	.	
	pos.	16/ 16	1,95	( 1,5- 4,2)		4,26	(2,30-7,88)
HPP1 BE IV	neg.	44/ 48	5,30	( 4,3- 8,9)	0,0043	.	
	pos.	25/ 25	3,90	( 2,8- 5,5)		2,12	(1,25-3,62)
HPP1 BE III/IV	neg./neg.	37/ 41	5,80	( 5,0-13,1)	<0,0001	.	
	pos./neg.	7/ 7	1,50	( 1,4- 2,8)		14,77	(5,51-39,6)
	neg./pos.	16/ 16	4,10	( 3,0- 8,0)		2,43	(1,28-4,59)
	pos./pos.	9/ 9	2,80	( 1,8- 8,1)		4,17	(1,90-9,18)
CEA BE III	neg.	31/ 34	6,25	( 4,2-13,5)	0,0026	.	
	pos.	38/ 39	4,10	( 2,8- 5,0)		2,11	(1,28-3,48)
CEA BE IV	neg.	33/ 36	7,35	( 4,2-13,5)	0,0002	.	
	pos.	36/ 37	4,10	( 2,8- 4,8)		2,51	(1,51-4,18)
CEA BE III/IV	neg./neg.	29/ 32	7,35	( 4,2-14,3)	0,0036	.	
	pos./neg.	4/ 4	7,45	( 4,1-20,1)		1,18	(0,41-3,39)
	neg./pos.	2/ 2	4,00	( 3,2- 4,8)		2,90	(0,67-12,6)
	pos./pos.	34/ 35	4,10	( 2,7- 4,8)		2,55	(1,50-4,35)

**Tabelle 5.11:** Bevacizumab Monotherapie: Anzahl aufgetretener Ereignisse der Gesamtanzahl (E/N), medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HRCI
HPP1	neg.	41/ 44	5,50	( 4,2- 7,1)	0,0248	.	
BE III	pos.	17/ 19	2,60	( 1,7- 7,3)		1,90	(1,07-3,39)
HPP1 BE IV	neg.	28/ 29	5,90	( 4,2- 7,1)	0,1084	.	
	pos.	30/ 34	3,20	( 2,8- 6,1)		1,54	(0,90-2,63)
HPP1 BE III/IV	neg./neg.	22/ 23	6,90	( 4,9- 9,7)	0,0267	.	
	pos./neg.	6/ 6	2,55	( 1,4- 7,3)		3,47	(1,36-8,87)
	neg./pos.	19/ 21	4,20	( 3,1- 8,7)		1,76	(0,92-3,36)
	pos./pos.	11/ 13	2,60	( 1,6- , )		2,09	(0,99-4,41)
CEA BE III	neg.	22/ 24	6,40	( 4,3-10,3)	0,0193	.	
	pos.	36/ 39	3,10	( 2,6- 5,9)		1,87	(1,09-3,21)
CEA BE IV	neg.	24/ 26	7,00	( 4,3- 9,7)	0,0216	.	
	pos.	34/ 37	3,10	( 2,8- 4,5)		1,83	(1,08-3,11)
CEA BE III/IV	neg./neg.	18/ 20	7,00	( 5,5-11,0)	0,0913	.	
	pos./neg.	6/ 6	5,60	( 2,6- 8,0)		1,69	(0,66-4,32)
	neg./pos.	4/ 4	3,85	( 3,1-10,5)		1,68	(0,56-5,02)
	pos./pos.	30/ 33	3,10	( 2,2- 4,9)		2,10	(1,16-3,81)

**Tabelle 5.12:** Keine medikamentöse Therapie: Anzahl aufgetretener Ereignisse der Gesamtanzahl (E/N), medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA und CEA Werte zu BE III und BE IV sowie im Verlauf BE III/IV.

### 5.3. Multivariate Analysen

Um Zusammenhänge und Abhängigkeitsstrukturen zwischen den klinischen Parametern und verschiedenen Biomarkern erklären zu können, wurden diese einer multivariaten Analyse unterzogen. Hierfür wurden verschiedene potentielle Cox-Modelle zusammengestellt und anhand des Akaike Informationskriteriums (*engl.: Akaike information criterion = AIC*) miteinander verglichen. Dabei stehen kleinere Werte des AIC für eine höhere Güte des jeweiligen Cox-Modells.

Um ein geeignetes Cox-Modell etablieren zu können, wurden zunächst die Ergebnisse einzelner klinischer Parameter aus der Analyse des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens bezüglich ihrer Signifikanz überprüft. Wie bereits erläutert, ergaben sich dabei beim Gesamtüberleben signifikante Werte für das Therapieansprechen im radiologischen Staging zur BE III sowie für die Mutationsanalyse. Beim progressionsfreien Überleben fanden sich signifikante Ergebnisse für die Zuordnung zu den Therapiearmen und ebenfalls für den Mutationsstatus. Diese Resultate wurden im Anschluss für verschiedene Kombinationsmodelle aus klinischen Parametern und dem jeweiligen Biomarker CEA bzw. HPP1 zum Zeitpunkt BE III bzw. BE IV verwendet (siehe Tabelle

5.13). Da Ergebnisse der Mutationsanalysen nur für 87% aller Probanden vorlagen, wurde die Berechnung des AIC zusätzlich ohne den Mutationsstatus durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit dem Gesamtkollektiv sicherzustellen.

Bei Betrachtung der verschiedenen AIC-Werte des OS fällt auf, dass sich diese bei Einschluss der Biomarker in einem Bereich von 715-746 befinden, hingegen der Wert ohne Biomarker 763 annimmt. Gleiches zeigen auch die Analysen beim PFS. Beim OS liefert das Cox-Modell bestehend aus klinischen Parametern und HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III mit dem niedrigsten AIC-Wert von 715 das beste Ergebnis. Dasselbe Resultat bestätigt sich ebenfalls für das PFS mit dem niedrigsten AIC-Wert von 1295 für das Cox-Modell aus Therapiearm, Mutationsstatus und HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III. Eine Auswertung ohne Mutationsstatus mit Kombination aus HPP1 BE III und CEA BE III beim PFS mit AIC-Werten von 1548 bzw. HPP1 BE III und BE IV von 1547 lieferte nahezu identische Ergebnisse mit ähnlichen AIC-Werten. Dieselben Berechnungen mit eingeschlossener Mutationsanalyse wurden aufgrund mangelnder Signifikanz nicht durchgeführt. Deshalb sind in den betreffenden Tabellenspalten keine Werte eingetragen.

	Parameter	AIC mit Mutationen (n= 170)	AIC ohne Mutationen (n= 195)
<b>OS</b>	Response nach Induktion	763	893
	Response nach Induktion + HPP1 BE III	715	858
	Response nach Induktion + HPP1 BE IV	746	881
	Response nach Induktion + CEA BE III	740	878
	Response nach Induktion + CEA BE IV	739	874
	Parameter	AIC mit Mutationen (n= 169)	AIC ohne Mutationen (n= 194)
<b>PFS</b>	Therapiearm	1315	1574
	Therapiearm + HPP1 BE III	1295	1553
	Therapiearm + HPP1 BE IV	1301	1557
	Therapiearm + CEA BE III	1300	1558
	Therapiearm + CEA BE IV	1297	1553
	Therapiearm + HPP1 BE III und CEA BE III		1548
	Therapiearm + HPP1 BE III und HPP1 BE IV		1547

**Tabelle 5.13:** Vergleich des AIC verschiedener Cox-Modelle für das OS und PFS: niedrigere AIC-Werte korrelieren dabei mit einer höheren Güte des Modells; Analyse mit und ohne Einschluss des Mutationsstatus für NRAS, KRAS und BRAF

Basierend auf den Ergebnissen der AIC-Bestimmungen sind in den nachfolgenden Tabelle 5.14 und 5.15 die für das OS und PFS besten Cox-Modelle aus Mutationsstatus, klinischen Parametern und HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III mit den zugehörigen Hazard Ratios, deren Konfidenzintervallen und Signifikanzniveaus aufgelistet. Die Berechnungen hierzu zeigen, dass sich HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III sowohl bezüglich des OS als auch des PFS als ein unabhängiger prognostischer Marker neben klinischen Parametern wie RAS-Mutationsstatus, Ansprechen auf die Induktionschemotherapie und den Therapiearm repräsentiert (OS HPP1 HR: 5,396; 95% CI: 3,211-9,067; PFS HPP1 HR: 2,543; 95% CI: 1,703-3,799).

Parameter	Variable	HR	95% CI HR	P
HPP1 BE III	positiv vs. negativ	5,396	(3,211 - 9,067)	<,0001
Mutation	NRAS/KRAS vs. Wildtyp	1,784	(1,133 - 2,809)	0,0124
	BRAF vs. Wildtyp	5,757	(2,171 - 15,269)	0,0004
Response nach Induktion	(CR+PR) vs. SD	1,800	(1,157 - 2,799)	0,0091

**Tabelle 5.14** Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens (OS) ab Randomisierung: Betrachtet wird das Cox-Modell aus HPP1 BE III und klinischen Parametern basierend auf den AIC-Werten von Tabelle 4.8; berechnet wurde die HR sowie deren 95% CI und P-Werte zum Nachweis statistischer Signifikanz.

Parameter	Variable	HR	95% CI HR	P
HPP1 BE III	positiv vs. negativ	2,543	(1,703-3,799)	<0,0001
Mutation	NRAS/KRAS vs. Wildtyp	1,526	(1,098-2,121)	0,0124
	BRAF vs. Wildtyp	2,294	(0,972 - 5,415)	0,0582
Therapiearm	Beva Mono vs. Fluoro + Beva	1,283	(0,863 - 1,908)	0,2181
	Keine Therapie vs Fluoro + Beva	1,484	(0,985 - 2,234)	0,0588

**Tabelle 5.15:** Multivariate Analyse analog Tabelle 4.9 zum progressionsfreien Überleben (PFS) ab Stark.

#### 5.4. HPP1 mfcDNA als Prognosemarker im Gesamtverlauf der Studie

Wie eingangs beschrieben wurde in Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit HPP1 mfcDNA als Biomarker im Rahmen der Induktionschemotherapie analysiert. Basis für die Untersuchungen bildeten dabei Blutentnahmen vor Therapiestart zum Entnahmezeitpunkt BE I sowie 3 Wochen nach Beginn der Medikation zur BE II (Herbst et al. 2017). Um die Entwicklung des HPP1-Spiegels im Blut von Induktions- zu Erhaltungstherapie betrachten und Überlebensvor- bzw. -nachteile für Patienten mit besonderem HPP1 mfcDNA -Verlaufsmuster bestimmen zu können, sollen HPP1-Veränderungen im Rah-

men der Gesamtstudie erläutert werden. Die nachfolgende Tabelle 5.16 zeigt die Zuordnung der Probanden zu bestimmten HPP1 mfcDNA Mustern. Am häufigsten sind dabei Patienten mit positivem HPP1 mfcDNA-Wert vor Induktionstherapie und mit im weiteren Verlauf negativem Ergebnis (N=44, 22,56%), gefolgt von Patienten mit konstant negativen Messwerten von BE I- IV (N= 41; 21,03%). Ebenfalls interessant ist die Entwicklung des HPP1-Wertes von 24 Patienten (12,31%) mit positivem Messwert zur BE I, negativen Werten zu BE II und III und erneutem HPP1 mfcDNA-Anstieg zur BE IV. Ein häufig vorkommendes Muster ist auch der konstant positive HPP1-Nachweis zu allen Blutentnahmezeitpunkten (N=22, 11,28%).

Gruppe	HPP1 BE I	HPP1 BE II	HPP1 BE III	HPP1 BE IV	N	%	N kumulativ	% kumulativ
1	neg.	neg.	neg.	neg.	41	21,03	41	21,03
2	neg.	neg.	neg.	pos.	11	5,64	52	26,67
3	neg.	neg.	pos.	neg.	4	2,05	56	28,72
4	neg.	pos.	neg.	neg.	2	1,03	58	29,74
5	pos.	neg.	neg.	neg.	44	22,56	102	52,31
6	pos.	neg.	neg.	pos.	24	12,31	126	64,62
7	pos.	neg.	pos.	neg.	2	1,03	128	65,64
8	pos.	neg.	pos.	pos.	5	2,56	133	68,21
9	pos.	pos.	neg.	neg.	16	8,21	149	76,41
10	pos.	pos.	neg.	pos.	15	7,69	164	84,10
11	pos.	pos.	pos.	neg.	9	4,62	173	88,72
12	pos.	pos.	pos.	pos.	22	11,28	195	100,00

**Tabelle 5.16:** Häufigkeitstabelle der HPP1 mfcDNA Messwerte im Verlauf der Gesamtstudie von BE I- BE IV mit Anzahl N, dem Prozentsatz sowie kumulativen Berechnungen.

Darüber hinaus sind hinsichtlich einer genaueren Verlaufsbeobachtung im Anschluss die Veränderungen von HPP1 mfcDNA im Verlauf von BE II zu BE III sowie BE II zu BE IV näher betrachtet. Auffällig ist dabei, dass sich in einer Zeitspanne von 15-22 Tagen ab Beginn der Induktionstherapie zum Zeitpunkt BE II bis 24 Wochen nach Beginn der Induktionstherapie zur BE III bei 33 Patienten (16,92%) der HPP1-Spiegel von einem positiven zu negativem Wert im Sinne einer *late response* verändert hat. Demgegenüber konnte der Großteil der Patienten (N=75; 38,46%) bereits frühzeitig 2-3 Wochen nach Therapiebeginn (BE II) negative Messwerte nach anfänglicher HPP1-Positivität aufweisen.

Ein geringer Anteil von 5,64 % zeigte positive Messwerte bei BE III bei zunächst fehlendem HPP1 mfcDNA-Nachweis zur BE II. Deutlich mehr Probanden sind dies mit

einem Anteil von 20,51% bei Betrachtung des Verlaufs von BE II nach IV. Dies lässt sich durch einen trotz Therapie mit fortgeschrittenem Zeitverlauf zunehmenden Krankheitsprogress im palliativen Stadium UICC IV sowie einer geringeren Ansprechrate auf eine Erhaltungskemotherapie erklären.

Die Überlebenszeitanalyse in der nachfolgenden Tabelle 5.17 zeigte bei Betrachtung des Verlaufs von HPP1 mfcDNA zur BE II bis BE III eine signifikant schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Patienten mit negativem Messwerten zu BE II und positivem Ergebnis zur BE IV als Patienten mit konstant negativen Messwerten (HR= 5,14; 95% CI: 2,65-9,98). Ähnliches galt für Probanden mit zweifach positiven HPP1-Ergebnissen (HR= 3,86; 95% CI: 2,27-6,57). Anders als bei Betrachtung der HPP1 mfcDNA-Werte von BE III zu BE IV im Laufe der Erhaltungskemotherapie bestand in der Gruppe mit positivem HPP1 zu BE II und negativem Ergebnis zu BE III mit einem medianen Überleben von 30 Monaten kein signifikant verändertes Sterberisiko (HR= 0,93; 95% CI: 0,51-1,67). Gleiche Tendenzen ergaben sich auch für die Auswertungen zum progressionsfreien Überleben (siehe Tabelle 5.18).

Der HPP1 mfcDNA-Verlauf von BE II zu BE IV zeigte, abgesehen von Patienten mit zweizeitig erhöhtem HPP1-Wert und schlechterer Gesamt- und progressionsfreier Überlebensprognose (HPP1 pos./pos. OS: HR= 2,23; 95% CI: 1,33-3,74; HPP1 pos./pos. PFS: 2,70; 95% CI: 1,77-4,13), lediglich eine signifikant schlechtere Prognose hinsichtlich des PFS bei Patienten mit positiven HPP1 mfcDNA-Werten zu BE IV nach anfänglicher Negativität bei BE II (HR=3,18; 95% CI:1,65-6,12). Sämtliche weiteren Untersuchungen der Untergruppen lieferten keine signifikanten Ergebnisse.

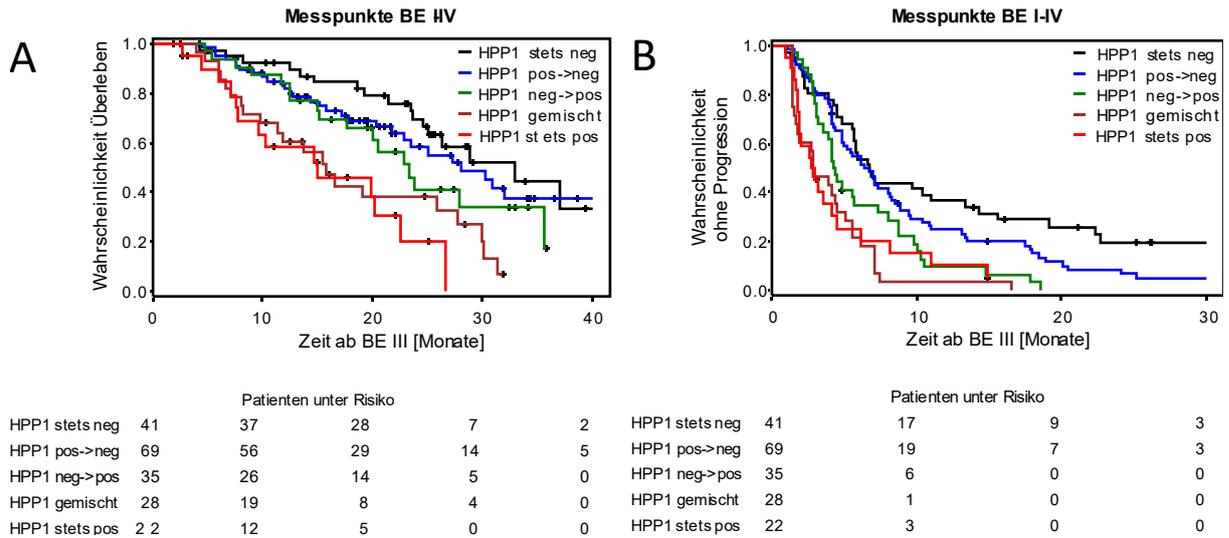
Biomarker	Variable	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HRCI		
<b>HPP1 BE II/III</b>	neg./neg.	52/120	28,1	(24,6-37,0)	<0,0001	,			
	pos./neg.	14/ 33	30,0	(25,8- , )				0,93	(0,51-1,67)
	neg./pos.	11/ 11	11,3	( 7,1-30,1)				5,14	(2,65-9,98)
	pos./pos.	21/ 31	14,6	( 9,6-22,6)				3,86	(2,27-6,57)
<b>HPP1 BE II/IV</b>	neg./neg.	41/ 91	28,8	(25,1- , )	0,0112	.			
	pos./neg.	12/ 27	23,4	(17,8- , )				1,13	(0,59-2,16)
	neg./pos.	22/ 40	20,5	(14,9- , )				1,68	(1,00-2,83)
	pos./pos.	23/ 37	19,8	(11,9-30,0)				2,23	(1,33-3,74)

**Tabelle 5.17:** Medianes OS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA im Verlauf BE II/III und BE II/IV beim Gesamtkollektiv.

Biomarker	Variable	E/N	Medianes PFS	CI	P	HR	HRCI
HPP1	neg./neg.	79/ 91	6,70	( 5,7- 9,4)	<0,0001	,	
BE II/III	pos./neg.	26/ 27	5,50	( 3,1- 8,9)		1,55	(0,99-2,43)
	neg./pos.	37/ 39	4,20	( 3,1- 7,3)		1,99	(1,33-2,98)
	pos./pos.	35/ 37	3,50	( 2,6- 5,1)		2,64	(1,74-4,01)
HPP1	neg./neg.	106/120	6,10	( 5,2- 7,3)	<0,0001	.	
BE II/IV	pos./neg.	32/ 33	5,50	( 4,3- 8,0)		1,37	(0,92-2,04)
	neg./pos.	10/ 10	1,60	( 1,4-16,6)		3,18	(1,65-6,12)
	pos./pos.	29/ 31	2,60	( 1,9- 4,2)		2,70	(1,77-4,13)

**Tabelle 5.18:** Medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA im Verlauf BE II/III und BE II/IV beim Gesamtkollektiv.

Um zusammenfassend die Veränderungen von HPP1 im Gesamtverlauf der Studie von Induktions- und Erhaltungstherapie näher betrachten zu können, wurde Gruppen mit ähnlichem HPP1-Muster aus Tabelle 5.16 in der nachfolgenden Tabelle 5.19 zu Obergruppen zusammengefasst und erneut einer Kaplan-Meier-Analyse unterzogen. Dabei wurden 5 Gruppen definiert: Patienten mit stets negativem HPP1-Wert (Gruppe 1), mit stets positivem Messwert (Gruppe 12), mit Konversion von positiv zu negativ (Gruppen 5,9,11), Konversion von negativ zu positiv (Gruppen 2,6) sowie eine gemischte Gruppe (Gruppen 3,4,7,8,10). Dabei bestätigte sich erneut, dass Patienten mit konstant negativem HPP1 mfcDNA-Wert die beste Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 33 Monaten hatten. Demgegenüber war die Lebenserwartung bei durchgehend positiven HPP1-Messwerten mit 15 Monaten deutlich reduziert (HR: 3,99; 95% CI: 1,94-8,22). Die Ergebnisse für die Gruppen mit Konversion von positiv zu negativ bzw. negativ zu positiv waren diesbezüglich nicht statistisch signifikant, lassen jedoch eine Tendenz zu einer besseren Prognose für Patienten mit zunächst HPP1 mfcDNA-Positivität mit Abfall im Verlauf erkennen (positiv->negativ: HR: 1,25; 95% CI: 0,69-2,29; negativ-> positiv: HR: 1,67; 95%CI: 0,85-3,29). Gleiches gilt für das progressionsfreie Überleben. Sämtliche Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5.19 und 5.20 sowie in der Abbildung 5.10 dargestellt.



**Abbildung 5.10:** Kaplan-Meier-Kurven der zusammengefassten Obergruppen aus Tabelle 5.16 mit ähnlichem HPP1-Muster BE I bis BE IV; **A:** Kaplan-Meier-Kurven von HPP1 mfcDNA bezüglich OS; **B:** Kaplan-Meier-Kurven von HPP1 mfcDNA bezüglich PFS. Zudem sind zu den Abbildungen jeweils die Patienten unter Risiko angegeben. Die zugehörigen Zahlen geben die Zahl der verbliebenen Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt an.

Obergruppe	Gruppen Tabelle 5.16	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HRCI
stets negativ	1	17/ 41	33,0	(25,1- .)	<0,0001	.	
positiv->negativ	5,9,11	29/ 69	28,1	(22,9- .)		1,25	(0,69-2,29)
negativ->positiv	2,6	17/ 35	23,3	(20,0- .)		1,67	(0,85-3,29)
gemischte Gruppe	3,4,7,8,10	21/ 28	15,8	(11,3-30,0)		3,00	(1,58-5,73)
stets positiv	12	14/ 22	15,0	( 9,6-26,7)		3,99	(1,94-8,22)

**Tabelle 5.19:** Zusammenfassung der Gruppen von Tabelle 5.16 zu Obergruppen mit jeweils gleichem HPP1 mfcDNA-Muster im Verlauf: Medianes OS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA beim Gesamtkollektiv.

Obergruppe	Gruppen	E/N	Medianes OS	CI	P	HR	HRCI
stets negativ	1	32/ 41	6,70	( 5,7-14,3)	<0,0001	.	
positiv->negativ	5,9,11	65/ 69	6,70	( 5,0- 8,5)		1,52	(0,99-2,33)
negativ->positiv	2,6	33/ 35	4,40	( 3,9- 8,0)		2,28	(1,38-3,78)
gemischte Gruppe	3,4,7,8,10	28/ 28	2,80	( 1,8- 5,5)		3,87	(2,28-6,58)
stets positiv	12	20/ 22	2,85	( 1,9- 6,1)		3,24	(1,82-5,76)

**Tabelle 5.20** Zusammenfassung der Gruppen von Tabelle 5.16 zu Obergruppen mit jeweils gleichem HPP1 mfcDNA-Muster im Verlauf: Medianes PFS in Monaten mit Signifikanzwert P, HR mit 95% CI für HPP1 mfcDNA beim Gesamtkollektiv.

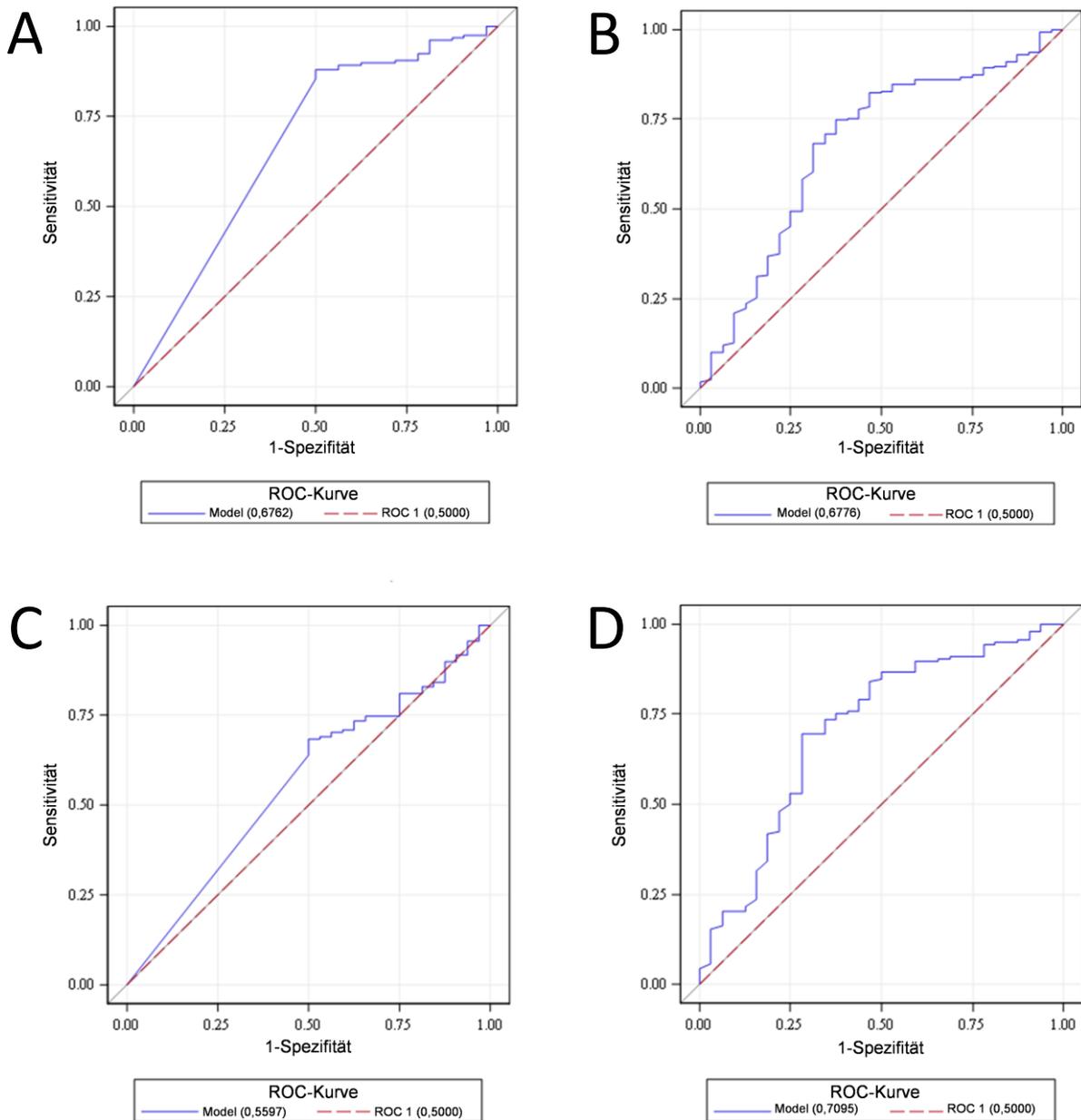
## 5.5. HPP1 mfcDNA als Marker für das Therapieansprechen

Zur kontinuierlichen Observanz eines potentiellen Krankheitsprogresses wurde bei den Patienten ab Beginn der Erhaltungstherapie im sechswöchigen Abstand ein radiologisches Staging durchgeführt und gemäß den RECIST-Kriterien (= *Response Evaluation Criteria In Solid Tumor*) bewertet. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Patienten mit kompletter und partieller Remission sowie stabilem Krankheitsverlauf als Therapieansprecher (= *responder*) eingruppiert. Im Gegensatz dazu ließ ein Progress auf das Nichtansprechen auf die gewählte Therapie schließen (= *non responder*).

Die Tatsache, dass die Blutentnahmen für die Biomarker-Messungen nahezu zeitgleich erfolgten, ermöglicht einen direkten Vergleich der HPP1 mfcDNA- und CEA-Werte mit den Ergebnissen der Bildgebung hinsichtlich eines Progresses der Tumorerkrankung. Dies ist von entscheidender klinischer Bedeutung, da im Falle der Feststellung eines Nichtansprechens auf eine medikamentöse Therapie in Form einer einfachen Blutentnahme bereits frühzeitig eine Umstellung auf eine andere Therapieform und dahingehend eine potentiell bessere Prognose des Patienten ermöglicht werden könnte.

Zum Zeitpunkt der Randomisierung wurden sämtliche Probanden mit nachgewiesenem Krankheitsprogress aus der Studie ausgeschlossen. Folglich erhielten nur Patienten mit Nachweis eines Therapieansprechens auf die Induktionstherapie eine chemotherapeutische Anschlussbehandlung. Von den 195 in die Erhaltungstherapie-studie eingeschlossenen Probanden zeigten, entsprechend den Auflistungen in Tabelle 4.2, 5 Patienten eine komplette Remission (CR), 120 eine partielle Remission (PR) und 70 einen stabilen Krankheitsverlauf (SD) in der Bildgebung. Eine Analyse der Korrelation mit den HPP1-Messungen im Blut zum Zeitpunkt BE III ist wenig sinnvoll, da diese minimalen Unterschiede im Kollektiv nicht durch HPP1-Veränderungen im Blut detektiert werden können. Anders gestaltet sich dies bereits 6 Wochen nach Therapiebeginn. Im bildgebenden Verfahren, nahezu zeitgleich mit der Blutentnahme zur Bestimmung von HPP1 BE IV, ließ sich bei 32 der insgesamt 190 Probanden mit verfügbaren Stagingergebnissen (16,8%) ein erneuter Progress feststellen. Um die Eignung von HPP1 mfcDNA als Marker für ein Therapieansprechen bzw. -versagen zu überprüfen, wurde das *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Verfahren angewendet. Mithilfe dieser statistischen Methodik wurde getestet, ob durch alleinige Bestimmung von HPP1 mfcDNA oder CEA im Plasma entweder zeitgleich zum BE IV oder

bereits früher zum Zeitpunkt BE III ein Ansprechen auf die Erhaltungstherapie oder ein Krankheitsprogress vorhergesagt werden kann. Die hierfür benötigten ROC-Kurven mit den jeweiligen AUC-Werten sowie Sensitivität und Spezifität des Markers sind in der nachfolgenden Abbildung 5.11 und Tabelle 5.21 dargestellt. Dabei betrug die AUC für HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III 0,6762 mit einer Sensitivität von 50% und Spezifität von 85,44%. HPP1 zu BE IV zeigte eine AUC 0,5597 bei gleicher Sensitivität und einer Spezifität von 63,92%. Die Analyse der CEA-Werte hinsichtlich der Korrelation mit dem Staging lieferte ähnliche Resultate (CEA BE III, AUC= 0,6776; CEA BE IV, AUC= 0,7095). Diese Ergebnisse legen nahe, dass weder HPP1 mfcDNA noch CEA in dieser Studie eine verlässliche Aussage bezüglich eines Therapieansprechens liefern können und daher nicht als therapeutische Marker bei Erhaltungstherapie geeignet sind.



**Abbildung 5.11:** ROC- Kurven mit jeweiligen AUC-Werten: **A:** HPP1 mfcDNA BE III; **C:** HPP1 mfcDNA BE IV, **B:** CEA BE III und **D:** CEA BE IV, jeweils in Korrelation mit dem radiologischen Staging zum Zeitpunkt BE IV.

	Sensitivität	95% CI	Spezifität	95% CI	AUC
HPP1 BE III	0,5000	(0,3189 - 0,6811)	0,8544	(0,7896 - 0,9054)	0,6762
HPP1 BE IV	0,5000	(0,3189 - 0,6811)	0,6392	(0,5591 - 0,7140)	0,5597
CEA BE III	0,7188	(0,5325 - 0,8625)	0,5443	(0,4633 - 0,6236)	0,6776
CEA BE IV	0,7188	(0,5325 - 0,8625)	0,5570	(0,4759 - 0,6358)	0,7095

**Tabelle 5.21:** Ergebnisse der ROC-Analyse: Auflistung der Sensitivität und Spezifität der Biomarker zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt mit 95% CI sowie der AUC-Werte.

## 6. Diskussion

### 6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der AIO KRK 0207-Studie

Somatische Mutationen spezieller Genabschnitte der DNA beeinflussen maßgeblich den Verlauf einer Krebserkrankung und sind aufgrund des gehäuftten Auftretens sogenannter Schlüsselmutationen innerhalb einer Tumorentität vermehrt Ansatzpunkt für spezifische zielgerichtete Therapien. In den letzten Jahren beschäftigt sich die grundlagenorientierte Krebsforschung jedoch zunehmend mit epigenetischen Veränderungen. Dabei konnte die aberrante Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden in regulatorischen Elementen, sog. „CpG-Inseln“, im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen als wichtiges Charakteristikum von Tumorzellen beschrieben werden (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Wünschenswertes Ziel wäre es, diese Form der epigenetischen Modifikation in der frei zirkulierenden DNA im Patientenblut detektieren und dabei im Rahmen der Früherkennung auf das Vorhandensein eines Tumors schließen zu können. Studien zeigten ebenfalls, dass die medikamentöse Chemotherapie zu einem Abfall der Konzentration an frei-zirkulierender DNA führt. Diese Erkenntnis legt nahe, dass die frei-zirkulierende DNA neben der Krebsfrüherkennung ebenfalls wichtige Hinweise auf die Prognose und das Ansprechen auf eine Therapie der Patienten liefert.

Ein häufig bestimmter Tumormarker beim KRK ist das CEA. Ein wesentlicher Nachteil dieses Markers ist, dass er bei zahlreichen Neoplasien im Blut detektiert werden kann und daher eine relativ niedrige Spezifität aufweist. Ebenso problematisch ist, dass das CEA, wie auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, sehr langsam auf Veränderungen reagiert. Aktuell ist die TNM-Klassifikation einziger prognostischer Parameter im klinischen Alltag und abgesehen von der Analyse des RAS-Mutationsstatus zur Vorhersage eines Ansprechens auf eine EGFR-Antikörpertherapie, gibt es bisher keine etablierten prädiktiven Marker für das kolorektale Karzinom.

Der Nachweis von methylierter, frei-zirkulierender DNA erwies sich in vorhergehenden wissenschaftlichen Arbeiten als vielversprechender potentieller Biomarker mit Prognose- und Therapierelevanz. Besonders die prognostische Komponente konnte anhand mehrerer zum Teil retrospektiver Studien an Patienten mit metastasiertem KRK im Stadium UICC IV belegt werden (Philipp et al. 2014; Philipp et al. 2012; Herbst et al. 2011; Herbst et al. 2009; Herbst et al. 2017). In Vorarbeiten zu dieser Dissertation

wurde HPP1 mfcDNA neben der Prognose zum ersten Mal auf seine Aussagekraft hinsichtlich eines Therapieansprechens untersucht (Herbst et al. 2017). Da es sich dabei um dieselbe Multicenterstudie handelt, sollen zunächst die Ergebnisse der Gesamtstudie erläutert werden und mit den Resultaten dieser Arbeit verglichen werden. Ziel der Gesamtstudie AIO-KRK-0207 war es, Methoden einer Deeskalationstherapie primär bezüglich Zeit zum Progress und sekundär hinsichtlich progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben mit der Standard-Erhaltungstherapie aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab zu vergleichen (Hegewisch-Becker et al. 2015). Dabei erfolgte nach Ausschluss von Patienten mit Krankheitsprogress die gleichmäßige Randomisierung von 472 der ursprünglich 837 Probanden zu einem der drei Therapiearme. Hinsichtlich der Zeit bis zum Progress, gleichzusetzen mit einem Therapiewechsel, waren die Ergebnisse der Bevacizumab-Monotherapie mit denen der Standardtherapie vergleichbar. Bei Patienten ohne Therapie ließ sich eine Unterlegenheit nicht mit Sicherheit ausschließen. Der Vergleich des PFS zeigte eine schlechtere Prognose für Patienten mit Bevacizumab-Monotherapie bzw. Probanden ohne Chemotherapie: Bevacizumab-Monotherapie vs. Fluoropyrimidine+Bevacizumab (HR 1,34; 95% CI: 1,06–1,70;  $p=0,015$ ); keine Therapie vs. Fluoropyrimidine+Bevacizumab (HR 2,09; 95% CI 1,64–2,67;  $p<0,0001$ ) und keine Therapie vs. Bevacizumab-Monotherapie (HR 1,45; 95% CI: 1,15–1,82;  $p=0,0018$ ). Dieses Ergebnis ließ sich für das mediane Gesamtüberleben nicht bestätigen. Dieses betrug 21,9 Monate ab Randomisierung und ergab in allen Therapiearmen keine signifikanten Unterschiede.

Als Teil dieser Studie verglich eine Arbeit bereits die HPP1 mfcDNA-Spiegel vor Start der Induktionstherapie und ca. 3 Wochen nach Therapiebeginn bei 467 Patienten (Herbst et al. 2017). Die Überlebenszeitanalyse bestätigte die Resultate früherer Studien und charakterisierte den Nachweis von HPP1 mfcDNA als unabhängigen Prognosemarker für ein kürzeres Gesamtüberleben. Von den initial 337 (72%) HPP1 mfcDNA-positiven Patienten war nach dreiwöchiger Therapiezeit bei 167 (50%) keine HPP1-mfcDNA im Plasma mehr zu detektieren. Diese Patienten zeigten eine signifikant verbesserte Prognose gegenüber Probanden mit ebenfalls positiven Werten zur BE II (HR „pos/neg“ versus „neg/neg“=1,41; 95%CI 1,00-2,01; HR „pos/pos“ versus „neg/neg“=2,60; 95% CI 1,86-3,64).

Für die Response Analyse wurde ein radiologisches Staging nach 12 bzw. 24 Wochen herangezogen. Dabei zeigte sich, dass HPP1 mfcDNA im Gegensatz zu CEA ein Ansprechen auf die Induktionstherapie vorhersagen kann. Die HPP1 mfcDNA-

Messung zum Zeitpunkt BE II ermöglichte es dabei, die Einteilung gemäß dem radiologischen Staging in Progress und nichtprogredienten Verlauf (stabiler Krankheitsverlauf, partielle Remission, komplette Remission) anhand positiver bzw. negativer HPP1-Werte vorherzusagen (AUC=0,77 bzw. 0,71). Da dieses Ergebnis in der Blutanalyse jedoch bereits nach 2-3 Wochen Auskunft über das Therapieansprechen gibt, könnte ein Progress möglicherweise frühzeitig erkannt werden und eventuell eine zeitnahe Medikationsumstellung erfolgen, sofern die Ergebnisse in weiteren Studien bestätigt werden.

## **6.2. HPP1 mfcDNA als Prognosemarker**

Basierend auf den oben aufgeführten Resultaten ergaben sich die Fragestellungen für diese Dissertation. Es sollte im Rahmen der Gesamtstudie AIO KRK untersucht werden, inwiefern sich verschiedene Arten der medikamentösen Erhaltungstherapie auf die HPP1 mfcDNA-Werte im Blut auswirken und die Eignung von HPP1 mfcDNA als prognostischen Marker und Marker für ein Therapieansprechen überprüft werden.

Nach Abschluss der Induktionschemotherapie wiesen lediglich 21% der Teilnehmer zum Zeitpunkt BE III positive HPP1 mfcDNA-Werte auf und hatten eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten mit negativen Messwerten. Nach einer 6-wöchigen Therapiephase fiel eine Zunahme des Anteils an HPP1 mfcDNA-positiven Patienten auf 39,5 % auf, dies war ebenfalls mit einem erhöhten Sterberisiko assoziiert (siehe Tabelle 5.3, Kapitel 5.2.1.). Dieser leichte Anstieg im Vergleich zu dem nahezu 50%-igen Abfall der HPP1 Werte bei der Induktionschemotherapie lässt sich dadurch erklären, dass Induktions- und Erhaltungstherapie jeweils unterschiedliche Therapiekonzepte verfolgen. Primäre Indikation für eine Induktionschemotherapie ist, in kürzester Zeit die Mehrzahl an Tumorzellen zu vernichten und eine Remission herbeizuführen. Dies spiegelt sich somit auch in den Resultaten der AIO-KRK Studie wider: Aufgrund der aggressiven Induktionschemotherapie zu Beginn fiel bei einer Vielzahl der Patienten die Tumorzelllast rasch ab mit konsekutiv nicht mehr nachweisbarer HPP1 mfcDNA bei 50% aller Probanden von BE I auf BE II in einem Zeitfenster von 3 Wochen (Herbst et al. 2017). Demgegenüber zielt die Erhaltungstherapie im besten Falle auf den Erhalt oder die Verbesserung der zuvor erzielten Therapieergebnisse und die Verhinderung eines Tumorprogresses ab. In vielen Situationen dient sie

jedoch dazu, bei fortgeschrittenem Erkrankungsstadium mit einer stark eingeschränkten Lebenserwartung und palliativem Konzept den Progress zu verlangsamen und den Patienten möglichst lange Zeit ein symptomarmes Leben zu ermöglichen. Derart verhält es sich auch bei den in diese Studie eingeschlossenen Patienten, die trotz stabiler Tumorerkrankung nach Induktionstherapie im Verlauf einen progredienten Krankheitsverlauf zeigten. Damit ist ein erneuter Progress nach ca. 30 Wochen Gesamttherapie mit damit verbundenem Anstieg von HPP1 mfcDNA zu erklären.

Bei dem Großteil der Patienten zeigten sich jedoch konstant negative HPP1 mfcDNA-Messwerte und mit einem medianen Gesamtüberleben von 30,9 Monaten ab Randomisierung hatte dieses Kollektiv die beste Prognose. Dem gegenüber ergab sich bei Patienten mit durchgehend positivem HPP1 mfcDNA-Spiegel und einem medianen Überleben von 11,3 Monaten die schlechteste Prognose. Lediglich bei 33% der Patienten war eine Veränderung des HPP1 mfcDNA-Wertes von BE III auf BE IV festzustellen. Die Analyse dieser Subgruppe ergab, dass 15 Patienten mit positivem HPP1 mfcDNA-Wert zu BE III und Abfall auf negative Werte im Verlauf eine signifikant schlechtere Prognose hatten als 50 Patienten mit anfänglich negativen Werten und Positivität im Verlauf (siehe Tabelle 5.3 und Abbildung 5.2). Eigentlich wäre bei Zunahme des HPP1-Wertes tendenziell mit einem schnelleren Progress zu rechnen gewesen. Der Dotplot dieser beiden Kollektive zeigte, dass es sich dabei um zwei relativ homogene Kollektive mit ähnlicher Streuung der Messwerte handelt. Mögliche fehlerhafte Zuordnungen der Ergebnisse konnten durch erneute Überprüfung der Rohdaten ebenfalls ausgeschlossen werden. Daher lässt sich daraus am ehesten folgern, dass die Prognose der Patienten maßgeblich von den Resultaten der BE III und damit dem Ergebnis und dem Therapieansprechen nach Ende der Induktionschemotherapie abhängt. Dies zeigt auch der Vergleich der Hazard Ratios von BE III und BE IV (BE III=4,31 vs. BE IV= 1,87). Somit spielen die Analysen im Verlauf der Erhaltungstherapie eher eine untergeordnete Rolle hinsichtlich des prognostischen Vorhersagewertes. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist allerdings kritisch zu hinterfragen, da die Gruppe mit positiver zu negativer HPP1 mfcDNA Veränderung lediglich aus 15 Patienten bestand und eine Verallgemeinerung diesbezüglich daher nur schwer möglich ist.

Ähnlich den Ergebnissen der Induktionstherapie mit 34 Patienten mit Veränderung der CEA-Werten von positiv zu negativ, zeigte sich bei der Erhaltungstherapie bei 18 Patienten ein veränderter Wert im Verlauf von BE III zu BE IV (siehe Abbildung 5.1 und

Tabelle 5.3). Die Überlebensanalyse dieser Patientengruppe erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich die Untersuchung der konstant CEA-positiven Patienten zeigte, wie zu erwarten, eine schlechte Prognose im Vergleich zu negativen Messwerten. Gleiche Tendenzen lieferte die Analyse des progressionsfreien Überlebens. Diesen Ergebnissen lassen die Schlussfolgerung zu, dass CEA eine prognostische Aussagekraft bei diesem Patientenkollektiv besitzt, aber deutlich weniger sensibel auf Veränderungen reagiert als die HPP1 mfcDNA.

Bei Vergleich der Deeskalationsformen mit der Standardtherapie aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab konnten analog den Resultaten der Gesamtstudie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden. Die mediane Überlebenszeit betrug 27,80 Monate bei einer Fluoropyrimidin- und Bevacizumab-Kombinationschemotherapie, 25,80 Monate bei Bevacizumab-Monotherapie und 23,30 Monate ohne Chemotherapie. Die geringen Unterschiede unter den Therapiegruppen waren bei hohem Einfluss der Induktionstherapie bereits zu erwarten, da sich alle Patienten nach Ansprechen auf diese primäre Behandlung in einer stabilen Erkrankungsphase befanden. Eine geringe Abweichung ergab sich für das progressionsfreie Überleben. Diesbezüglich war die Bevacizumab-Monotherapie der Standardtherapie nicht unterlegen, eine signifikant schlechtere Prognose war bei Patienten ohne Therapie zu beobachten. Dabei belief sich das PFS auf 7,1 Monate bei Therapie mit Fluoropyrimide und Bevacizumab, 4,5 Monate bei Bevacizumab-Monotherapie und auf 4,2 Monate ohne Therapie. In der Subgruppenanalyse zeigte sich bei Patienten mit positiven HPP1 Werten mit Ausnahme der BE IV in der Kontrollgruppe eine signifikant schlechtere Prognose hinsichtlich des PFS und OS im Vergleich zu negativen Messwerten. Der höchste Anteil an HPP1 mfcDNA-positiven Messwerten lag bei BE III und IV bei Patienten ohne Chemotherapie. Neben den Biomarkern scheinen beim PFS ebenso klinische Parameter, insbesondere die Metastasierung, einen entscheidenden Einfluss auf die Zeitspanne bis zum Progress zu haben. Gleiches gilt für die CEA-Messung. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die HPP1-Messung im Blut bei gleichwertigen Überlebenswahrscheinlichkeiten Patienten mit schlechterer Prognose innerhalb der jeweiligen Untergruppen herausfiltern kann. Dies ist von Bedeutung, da diese Patienten im Verlauf von einer Änderung des Therapieschemas profitieren könnten. Interessant wäre, im Rahmen weiterer prospektiver Studien den Einfluss eines aktiven Therapiewechsels auf die HPP1 mfcDNA-Konzentration zu untersuchen.

Um kausale Zusammenhänge darstellen zu können, wurden die Daten ebenfalls einer multivariaten Analyse unterzogen und die AIC-Werte für verschiedene COX-Modelle errechnet (siehe Tabelle 5.13, 5.14 und 5.15, Kapitel 5.3). Niedrigere AIC-Werte für COX-Modelle mit Einschluss der Biomarker für das OS und PFS lassen darauf schließen, dass eine zusätzliche Biomarkerbestimmung im Blut der alleinigen Untersuchung der klinischen Parameter überlegen ist. Als interessant hervorzuheben ist die exemplarische Auswertung der COX-Modelle mit Kombination aus HPP1 mfcDNA und CEA zum Zeitpunkt BE III bzw. HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III und BE IV beim PFS unter Ausschluss des Mutationsstatus mit nahezu identischen AIC-Werten (siehe Tabelle 5.13; Kapitel 5.3). Diese Ergebnisse belegen, dass die Bestimmung beider Biomarker zu keiner deutlichen Verringerung des Wertes und damit verbesserter Qualität des Modells führt. Dies kann durch die Tatsache bekräftigt werden, dass die Messung zweier Tumormarker mit höherem Zeitaufwand und Kosten verbunden ist. Zusammenfassend ist daher ein Cox-Modell aus HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III und klinischen Parametern als am besten anzusehen.

Um Veränderungen der HPP1 mfcDNA-Werte im Verlauf von Induktions- zu Erhaltungstherapie betrachten zu können, wurden die Ergebnisse der Induktionstherapie mit denen der Erhaltungstherapie kombiniert und der Gesamtverlauf der Studie analysiert. Dabei zeigte sich bei Untersuchung der HPP1 mfcDNA-Veränderungen von BE II 3 Wochen nach Beginn der Induktionstherapie auf BE III zu Beginn der Erhaltungstherapie, dass HPP1 mfcDNA bei ca. 17 % aller Patienten erst nach Ende der Induktionstherapiephase auf nicht mehr detektierbare Werte abfiel (siehe Tabelle 5.17; Kapitel 5.4.). Dies ist am ehesten auf ein langsames Ansprechen auf die Induktionstherapie im Sinne einer *late response* zurückzuführen. Patienten mit dieser Entwicklung von positiven zu negativen Resultaten hatten keine signifikant schlechtere Prognose als Patienten mit negativen Messwerten zu beiden Zeitpunkten. Dem gegenüber waren konstant positive Werte mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dadurch ist belegt, dass eine erneute Bestimmung von HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III durchaus prognostische Wertigkeit besitzt, da ansonsten Spätansprecher auf die Induktionstherapie einer Analyse entgehen würden. Bei Betrachtung des HPP1 mfcDNA-Verlaufes von BE II zu BE III und BE II zu BE IV ist erneut auffällig, dass eine Veränderung von positiven zu negativen Messwerten prognostisch günstiger ist als von negativem zu positivem HPP1-mfcDNA-Nachweis (siehe Tabelle 5.17

und 5.18; Kapitel 5.4.). Insgesamt kann durch die Bestimmung von HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III am Ende der Induktionstherapie am treffendsten die Prognose des Patienten vorhergesagt werden.

Im Anschluss wurden Patienten mit demselben HPP1 mfcDNA-Verlaufsmuster zu Gruppen zusammengefasst und einer Überlebensanalyse unterzogen. Es zeigte sich dabei erwartungsgemäß, dass Patienten mit konstant negativen HPP1 mfcDNA-Werten von BE I bis BE IV die beste Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 33 Monaten hatten. Signifikant prognostisch ungünstiger erging es Patienten mit durchgehend positiven HPP1 mfcDNA-Nachweis mit einer medianen Überlebenszeit von 15 Monaten. Probanden mit Abfall der HPP1-Konzentration auf negativen Messwerten im Laufe der Gesamtstudie hatten zudem eine bessere Überlebensprognose mit einem medianen Überleben von 28,1 Monaten im Vergleich zu Probanden mit Anstieg des HPP1-Wertes mit 23,3 Monaten. Die Ergebnisse dieser beiden Gruppen wiesen keine statistische Signifikanz auf, lassen jedoch die Annahme zu, dass negative HPP1-Werte im Verlauf eine tendenziell bessere Prognose für den Patienten bedeuten. Eine künftige Studie anhand eines größeren Patientenkollektives wäre hierzu wünschenswert, um auch in diesen Gruppen eine statistische Signifikanz der Ergebnisse erreichen zu können.

Die prognostische Rolle von HPP1 mfcDNA als Biomarker wurde bereits durch die Ergebnisse vorangehender Studien belegt. Philipp et al. konnten in 311 Patientensera und 54 Primärtumoren HPP1 und HLTF neben dem CEA-Wert als unabhängige Prognosemarker für ein schlechteres Überleben identifizieren (HLTF: HR= 1,8, p= 0,0438, HPP1: HR 1,6, p= 0,0495, CEA >27 ng/ml: HR 1,7, p= 0,0317) (Philipp et al. 2012). Gleiches zeigte sich in einer Studie desselben Autors an 259 Patienten mit verschiedenen Stadien des KHK. Dabei gingen erhöhten Spiegel an methyliertem HLTF und HPP1 mit einer Erhöhung von LDH als Surrogatmarker für den Zelltod einher. Ebenfalls waren hohe HPP1 und HLTF-Werte mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden (Philipp et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch frühere, vergleichbare Analysen (Herbst et al. 2009; Wallner et al. 2006b).

In dieser Arbeit ist hervorzuheben, dass im Rahmen einer Multicenterstudie zu definierten Zeitpunkten und über einen längeren Zeitraum HPP1 mfcDNA-Messungen erfolgten und zeitgleich standardisierte Staginguntersuchungen durchgeführt wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von HPP1 mfcDNA im Blut im Laufe der Therapie starken Veränderungen unterworfen ist. Am genauesten kann

hierbei HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III vor Beginn der Erhaltungstherapie die Prognose der teilnehmenden Probanden vorhersagen, da die Erhaltungstherapie im Anschluss in diesem homogenen Patientenkollektiv nur marginalen Einfluss auf die Gesamtprognose des Patienten hat. Zudem sind ergänzend zu den Bestimmungen zum Zeitpunkt BE I und II zu Beginn der Induktionstherapie zur BE III auch Patienten berücksichtigt, die im Sinne einer *late response* auf die Induktionstherapie angesprochen haben.

### **6.3. HPP1 mfcDNA als Marker für das Therapieansprechen**

Der momentane Goldstandard zur Bestimmung der Tumorzelllast und zum Monitoring eines Therapieansprechens ist das radiologische Staging nach *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST). Die Klassifikation erlaubt eine Unterscheidung von messbaren und nicht messbaren Läsionen und von Target- und Non-Target-Läsionen (Eisenhauer et al. 2009). Diesbezüglich problematisch ist unter anderem die vom Betrachter abhängige Reproduzierbarkeit des Ergebnisses, mangelnde Unterscheidbarkeit von Tumor- und Normalgewebe, Fälle von nicht messbaren Erkrankungsausprägungen und die fehlende Aussagekraft bezüglich Prognose und Lebensqualität des Patienten (Sharma et al. 2012). Die zusätzliche CEA-Messung bringt keinen wesentlichen Erkenntniszugewinn, da dieser Tumormarker hinsichtlich eines Therapieansprechens eine zu geringe Sensitivität und Spezifität aufweist (Goldstein und Mitchell 2005b; Sorbye und Dahl 2003).

Herbst et al. erbrachten erstmals den Nachweis, dass HPP1 mfcDNA das Potential zur Vorhersage eines Ansprechens auf die Induktionstherapie bei metastasiertem KRK besitzt (Herbst et al. 2017). Diese vielversprechenden Resultate sollten nun auch in dieser Arbeit für die Erhaltungstherapie verifiziert werden. Dabei zeigte sich jedoch, dass weder HPP1 mfcDNA noch CEA aufgrund wechselnd niedriger Sensitivitäten und Spezifitäten hinreichende Informationen im Hinblick auf den Erfolg der Erhaltungstherapie geben konnten. Einen möglichen Erklärungsansatz liefert die geringe Anzahl von 32 Probanden (16,8%) mit Progress nach 6-wöchiger Therapiephase, die für eine Testung auf Therapieansprechen ein zu kleines Kollektiv bildeten. Ebenso hat die Homogenität der Teilnehmer mit allesamt Therapieansprechen nach Induktionstherapie zur Folge, dass keine hinreichenden Unterschiede bestanden und

sich auch nicht nach 6 Wochen Therapie ergaben, die dann einer Analyse auf Biomarkerveränderungen zugänglich waren. Zudem spielt bei der Interpretation der Ergebnisse erneut die Bedeutung der Erhaltungstherapie eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zur Induktionschemotherapie mit initial stark erhöhtem Zellumsatz und -zerfall aufgrund hoher Toxizität zielt die Erhaltungstherapie primär auf die Verhinderung eines Krankheitsrezidivs ab. Daher war an diesem Patientenkollektiv in dem Analysezeitraum der Erhaltungstherapie bei zudem bestehender Homogenität nur eine geringgradige bis keine Reduktion von HPP1 mfcDNA vom Zeitpunkt BE III nach BE IV zu erwarten. Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass die Ergebnisse der AUC-Werte von HPP1 mfcDNA keinesfalls die Schlussfolgerung zulassen, dass HPP1 mfcDNA generell nicht als Marker für ein Therapieansprechen geeignet ist. Vielmehr kann als ursächlich für die Ergebnisse der HPP1 mfcDNA Messung der ähnliche Krankheitsverlauf der Patienten und die Ziele der Erhaltungstherapie angesehen werden, die ein derartiges Ergebnis erwarten ließen. Ebenfalls lässt sich dadurch erklären, weshalb sich die Ergebnisse der Induktionschemotherapie für die Erhaltungstherapie nicht reproduzieren ließen.

Zusammenfassend könnte eine Verlaufsbeobachtung zu späteren Zeitpunkten möglicherweise aufgrund eines steigenden Anteils an Patienten mit Progress und somit größeren Unterschieden im Patientenkollektiv bessere Erkenntnisse über HPP1 als Marker für ein Therapieansprechen liefern. Dafür empfehlen sich weitere prospektive Studien an größeren Kollektiven mit unterschiedlichen Therapiestrategien und kontinuierlichem *follow-up* sowie Therapieumstellungen bei nachgewiesenem Krankheitsprogress.

#### **6.4. Biomarker beim KRK im Literaturvergleich**

Kürzlich haben sich weitere Studien zum Ziel gesetzt, aus mfcDNA epigenetische Methylierungsmarker mit Aussagekraft hinsichtlich eines Therapieansprechens bei metastasiertem KRK zu untersuchen. Barault et al. konnten ein Markerpanel von 5 methylierten Genorten (EYA4, GRIA4, ITGA4, MAP3K14-AS1, MSC) identifizieren, das bei 85% aller Studienteilnehmer mit metastasiertem KRK nachgewiesen, hingegen in der gesunden Kontrollgruppe nicht isoliert werden konnte. Zudem wurde aufgrund des Vergleichs der methylierten Marker mit der Bildgebung gemäß RECIST eine Korrela-

tion mit dem Therapieansprechen angenommen. Allerdings wurden lediglich 45 Patienten in das *follow-up* eingeschlossen, davon erhielten 29 mit chemotherapieresistentem Tumorleiden versuchsweise eine Therapie mit Temozolomid, welches aktuell nicht zur Therapie des metastasierten KRK zugelassen ist. Weiteren 16 Patienten wurde eine systemische Chemotherapie bzw. Antikörpertherapie verabreicht. Es handelt sich hierbei um eine vielversprechende Studie, jedoch ist die Aussagekraft hinsichtlich eines Therapieansprechens aufgrund der geringen Teilnehmerzahl deutlich eingeschränkt (Barault et al. 2017). Darüber hinaus ist eine dieser Arbeit im Studiendesign ähnliche Studie erwähnenswert, die bei 82 Patienten die Methylierung von WIF1 und NPY in frei-zirkulierender DNA untersuchte. Zuvor wurden diese Marker bereits von einer Arbeitsgruppe detektiert und in einem *follow up* von 3 Patienten verlaufsbeobachtet (Garrigou et al. 2016). Frei-zirkulierende DNA wurde jeweils vor dem ersten, zweiten und dritten Chemotherapiezyklus aus Plasma gewonnen und entsprechend dieser Studie gemäß dem radiologischen Staging auf einen Vorhersagewert bezüglich eines Therapieansprechens untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass 58 Patienten mit cfDNA Konzentrationen konstant unterhalb des *cut off*-Wertes, auch als *responder* bezeichnet, ein besseres Therapieansprechen und PFS als Patienten mit erhöhten Messwerten aufwiesen (Garlan et al. 2017).

Hieraus wird ersichtlich, dass bereits verschiedene Ansätze zur Untersuchung von methylierter cfDNA im Blut bestehen. Problematisch ist jedoch, dass Analysen zu einer Vielzahl an Markern vorliegen und jeweils nur kleine Kollektive in die Studie eingeschlossen sind, sodass eine verallgemeinernde Aussage und Vergleiche schwierig möglich sind.

Neben frei-zirkulierender DNA konnten microRNAs (miRNAs) bei Patienten mit KRK im Tumorgewebe und im peripheren Blut nachgewiesen werden (Chen et al. 2008). MiRNAs sind kleine RNA-Abschnitte mit Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression (Ambros 2004). Erwähnenswert ist eine Studie von Hansen et al., die den prädiktiven Wert zirkulierender microRNA-126 (cir-miRNA-126) bei 68 Patienten mit metastasiertem KRK und *firstline*-Chemotherapie, bestehend aus einer Kombination aus XELOX-Schema und Bevacizumab, untersuchte (Hansen et al. 2015). Dabei konnte bei Therapieversagern ein signifikanter Anstieg der cir-miRNA-126 von 0,244 (95% CI:(0,050–0,565)) und bei Ansprechern ein Abfall um 0,374 (95% CI:(0,472-0,111)) nachgewiesen werden (P= 0,002).

Zudem konnte in einer Studie an 150 Patienten mit metastasiertem KRK die Expression dreier zirkulierender miRNAs (miR-106a, miR-484 und miR-130b) im Plasma mit einem fehlenden Therapieansprechen auf eine FOLFOX-Chemotherapie und einem reduzierten PFS in Zusammenhang gebracht werden (Kjersem et al. 2014). Demgegenüber zeigte eine Studie an 253 Probanden, dass die Detektion eines Profils von 5 zirkulierenden miRNA-Markern im Blut (miR-20a, miR-130, miR-145, miR-216 and miR-372) mit AUC-Werten von 0,841 bzw. 0,918 ein Ansprechen auf eine 5-FU-basierte Chemotherapie vorhersagen kann (Zhang et al. 2014).

Auch anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass Studien an verschiedenen miRNAs in Blut und Tumorgewebe vorliegen, jedoch große Multicenter-Studien an den vielversprechendsten miRNA-Markern noch ausstehen. Zudem gibt es bis dato kein einheitliches Protokoll zur Quantifizierung der miRNAs, sodass die Methoden einzelner Studien nur schwer miteinander vergleichbar sind.

Des Weiteren beschäftigen sich Studien mit der prognostischen und prädiktiven Rolle frei-zirkulierender Endothelzellen (CEC) im Blut von Patienten mit metastasiertem KRK (Malka et al. 2012, 2012; Matsusaka et al. 2011; Simkens et al. 2010). Die Ergebnisse hierzu sind kontrovers. Dies ist auf unterschiedliche Nachweismethoden und fehlende Vergleichbarkeit der Patientenkollektive zurückzuführen. Simkens et al. fanden bei 473 Patienten in der Phase III CAIRO-2-Studie keine Korrelation von CEC mit der Prognose von Patienten mit metastasiertem KRK und Therapie mit *first-line* Chemotherapie und Bevacizumab (Simkens et al. 2010). Eine andere Arbeit an 99 Patienten mit metastasiertem KRK und Therapie mit XELIRI oder FOLFIRI und Bevacizumab stellte einen Zusammenhang zwischen Prognose und Therapie und dem CEC-Gehalt im Blut fest (Malka et al. 2012).

In einer weiteren Studie wurde zirkulierende KRAS G13D DNA (ct-DNA) im Blut von 53 Patienten mit metastasiertem KRK auf Mutationen untersucht. Von den initial 48 ct-DNA-positiven Patienten konnte bei 41 ein Abfall des ct-DNA-Spiegels nach Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Oxaliplatin oder Irinotecan (+/- Bevacizumab) detektiert werden. Die CEA-Messung ergab demgegenüber keine signifikanten Veränderungen (Tie et al. 2015). Ähnliches zeigte eine Arbeit an 50 Patienten mit metastasiertem KRK und Therapie mit einer Fluoropyrimidin-Monotherapie oder in Kombination mit Oxaliplatin/Irinotecan und Biologicals (Bevacizumab, Cetuximab). Dabei wurde ein Markerpanel aus 6 Genen (GAPDH, VIL1, CLU, TIMP1, LOXL3, ZEB2) bezüglich seiner prognostischer und therapeutischer Aussagekraft analysiert (Barbazan et al.

2014). Das PFS und OS betrug bei hohen Markerspiegeln 6,3 bzw. 12,7 Monate und bei niedrigen Werten 12,7 bzw. 24,2 Monate. Besonders interessant war die Patientengruppe mit im radiologischen Staging diagnostiziertem Therapieansprechen und positivem Biomarkernachweis im Blut. Diese Probanden hatten eine signifikant schlechtere Prognose.

Das Vorliegen eines RAS-Wildtyps in der Mutationsanalyse des Tumorgewebes ist wichtige Voraussetzung für den Therapiebeginn mit den Anti-EGFR-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab (Di Fiore et al. 2007; Roock et al. 2008; Lievre et al. 2008; Lievre et al. 2006; van Cutsem et al. 2009; Heinemann et al. 2014; Douillard et al. 2013). Kürzlich wurden in einer Studie 90 Patienten mit metastasiertem KRK und einer Kombinationschemotherapie mit Bevacizumab hinsichtlich der prädiktiven und prognostischen Aussagekraft der Marker KRAS, PIK3CA und BRAF untersucht (Nakayama et al. 2017). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des PFS und Therapieansprechens bei Detektion einer der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Andere Studien konnten demgegenüber bei einer Therapie mit Cetuximab bei Patienten ein signifikant schlechteres Therapieansprechen bei Auftreten einer KRAS-Mutation feststellen (Bokemeyer et al. 2011; van Cutsem et al. 2009). Ein neuer diagnostischer Ansatz ist die Bestimmung des RAS-Mutationsstatus in der zellfreien, im Blut zirkulierenden DNA bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom. Anlass zu derartigen Analysen lieferte die Tatsache, dass der KRAS-Mutationsstatus aus Tumorgewebe in westeuropäischen Ländern oftmals erst nach 3 Wochen vorliegt und damit der Beginn einer Chemotherapie ggf. mit Ergänzung um eine EGFR-Antikörpertherapie verzögert oder die Antikörpertherapie bei unverzüglich notwendigem Therapiebeginn nicht zur Anwendung kommt (Lievre et al. 2015; Barone et al. 2014). In einer prospektiven Studie wurde bei 412 Patienten das Tumorgewebe und gleichzeitig Serumproben mittels *next-generation sequencing* auf eine RAS-Mutation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Übereinstimmung von Plasma und Tumorgewebe 85% und bei zusätzlicher Bestimmung von ctDNA 94,8% betrug. Bei Vorliegen einer hepatischen Metastasierung war die Übereinstimmung mit bis zu 97% am besten (Bachet et al. 2018). Ähnliche Resultate ergaben sich in zwei vorhergehenden retrospektiven Studien mit zudem Hinweis auf einen Vorhersagewert des RAS-Mutationsstatus bezüglich eines Therapieansprechens (Grasselli et al. 2017; Vidal et al. 2017).

Beim metastasierten KRK sind zudem angiogenetische Wachstumsfaktoren als potentielle Tumormarker in den Fokus der Wissenschaft geraten. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist wesentlich für die Entstehung und das Wachstum neuer Blutgefäße in Tumorzellen verantwortlich. Dabei wird der Bindung von VEGF-A an den Rezeptor VEGFR-2 die Schlüsselrolle in der Aktivierung der Angiogenese zugeschrieben (Venook et al. 2017). Im Rahmen der Phase III RAISE-Studie konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper Ramucirumab in der *second-line* zusätzlich zum FOLFIRI-Chemotherapieregime die Prognose bei metastasiertem KRK verbessern konnte. Im Zuge dessen wurde der Wachstumsfaktor VEGF-D im Plasma als potentiell prädiktiver Biomarker für die Wirksamkeit der Antikörpertherapie identifiziert (Tabernero et al. 2017). In vorhergehenden großen Phase III-Studien (AGITG MAX-Studie und CALGB Studie) ergab sich jedoch, dass hohe Konzentrationen von VEGF-D mit einer reduzierten Ansprechrate auf den vorwiegend an VEGF-A bindenden Antikörper Bevacizumab und daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren (Tebbutt et al. 2010; Venook et al. 2017). Neben diesen exemplarisch aufgeführten Studien gibt es eine Vielzahl weitere Arbeiten, die die Rolle von angiogenetischen Wachstumsfaktoren untersuchen. Problematisch ist erneut die unterschiedliche Methodik bei der Analyse, die die Studien schwer vergleichbar macht, sodass zum aktuellen Zeitpunkt kein Marker für das KRK empfohlen wird.

Ebenfalls erwähnenswert ist die Detektion von CDX2 als Tumormarker in Gewebeproben bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Dieser Transkriptionsfaktor spielt in der Embryonalzeit eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Gastrointestinaltraktes. In einer großen Studie mit Primärtumorproben kolorektaler Karzinome im Stadium UICC II und III konnte bei 2115 untersuchten Tumorproben bei ca. 4 % das CDX2-Gen nicht nachgewiesen werden. Bei diesen Patienten ergab sich ein verkürztes krankheitsfreies Überleben und eine reduzierte Gesamtüberlebenszeit. Dies ließ darauf schließen, dass es sich bei CDX2-positiven Ergebnissen um *high risk*-Tumoren handelt, bei denen eine Chemotherapie im Vergleich zu keiner Behandlung die Prognose verbessert (Dalerba et al. 2016). Eine weitere Studie untersuchte CDX2, jedoch an 145 Patienten mit metastasiertem KRK. CDX2-Negativität ließ bei verkürztem progressionsfreiem Überleben unter *first-line*-Chemotherapie auf ein reduziertes Therapieansprechen schließen. Problematisch hinsichtlich CDX2 ist, dass die Bestimmung anhand einer

histologischen Aufarbeitung des Tumorgewebes und nicht in Form eines Bluttests erfolgt. Ebenfalls handelt es sich bei diesen Studien um retrospektive Analysen, die weiterer prospektiver Untersuchungen zur Verifizierung bedürfen (Zhang et al. 2017).

Einen interessanten Ansatz zur Analyse der Wirksamkeit einer Bevacizumab-Kombinationstherapie bildet die Hypertonie als häufige Therapienebenwirkung. Ergebnisse von Studien legen nahe, dass dies Einfluss auf Prognose und Therapieansprechen der Patienten hat (Saltz et al. 2008; Cai et al. 2013; Tahover et al. 2013). Kürzlich zeigte eine Arbeit bei 79 Patienten, dass von den 52% Probanden mit Hypertonie Grad II-III 97% auf die Therapie ansprachen (CR, PR; SD) im Gegensatz zu 63% ohne Hypertonie als Nebenwirkung. Bei den Hypertonikern lag darüber hinaus ein signifikant verbessertes medianes PFS vor, die Unterschiede des OS waren nicht signifikant (Dionísio de Sousa et al. 2016). Hypertonie ist im Allgemeinen mit erhöhter Drucklast für das kardiovaskuläre System verbunden und geht daher mit der Ausschüttung vasoaktiver Substanzen einher. Diese Tatsache machten sich Studien zur Grundlage, um vasoaktiven Peptide im Blut hinsichtlich ihrer Rolle als dynamische Biomarker für Patienten unter Bevacizumab-Therapie zu überprüfen. Hagman et al. wiesen in ihrer Studie an 97 Probanden nach, dass ein Anstieg der Konzentration vasoaktiver Peptide 6 Wochen nach Therapiebeginn mit einem signifikant verbesserten Behandlungsergebnis und einer längeren Zeitspanne bis zum Progress (TTP) assoziiert ist (Hagman et al. 2017). Diese Ergebnisse legen nahe, dass klinische Parameter ebenfalls Biomarkerpotential besitzen. Nachteilig ist jedoch, dass nur die Effekte einer antiangiogenetischen Therapie getestet werden können und klinische Messwerte häufig methodische Fehlerquellen mit sich bringen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass vielfältige Ansätze zur Analyse eines Therapieansprechens beim metastasierten KRK bestehen. Eine Vielzahl dieser Studien betrachtet jedoch ein zu kleines Patientenkollektiv, um daraus allgemeine Schlüsse ziehen zu können. Ebenfalls handelt es sich zumeist um retrospektive Untersuchungen, die häufig nur ein Therapieschema betrachten. Um definitive Aussagen bezüglich der Wirksamkeit einer Chemotherapie treffen zu können, ist eine prospektive Testung von Biomarkern anhand verschiedener Therapiearme mit kontinuierlichem *follow-up* und Therapiewechsel bei Unwirksamkeit nötig. Hierzu leistet die gegenwärtige Arbeit einen wichtigen Beitrag.

## 6.5. Stärken und Limitationen der Studie

Im Vergleich zu anderen Studien an Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom profitiert diese Arbeit von der prospektiven Probengewinnung und einer hohen Anzahl an Probanden, die im Rahmen dieser Multicenterstudie zur Teilnahme rekrutiert wurden. An noch höherer Bedeutung gewinnt die Anzahl von 195 Patienten, wenn bedacht wird, dass diese trotz ihres weit fortgeschrittenen Krankheitsverlaufes im Stadium IJCC IV ein sehr homogenes Kollektiv bildeten. Alle Teilnehmer bekamen vor Randomisierung im Rahmen der Gesamtstudie AIO KRK-0207 eine einheitliche Induktionstherapie über 24 Wochen. Patienten mit Krankheitsprogress sowie sekundärer Operabilität wurden aus der Untersuchung verschiedener Erhaltungstherapien ausgeschlossen. Somit unterschieden sich die Probanden im Wesentlichen lediglich aufgrund klinischer Daten und der Zuordnung zu einem der Therapiearme.

Eine weitere Stärke dieser Studie stellt die Methodik dar. Sämtliche Proben eines Patienten wurden zeitgleich und identisch aufbereitet und mit internen Kontrollen und Standardkurven in Form einer methylierungsspezifischer PCR analysiert. Einen entscheidenden Vorteil bot die Durchführung der PCR mithilfe des ViiA-7 Real-Time PCR Systems. Dieses Gerät ermöglichte es, möglichst viele Patientenproben in demselben PCR-Lauf mithilfe von 384-well Standardplatten gleichzeitig zu vermessen und die Ergebnisse somit besser vergleichbar zu machen.

Diese positiven Aspekte bringen auch negative Gesichtspunkte mit sich. Trotz des relativ großen Gesamtkollektives waren die einzelnen Untergruppen nach Randomisierung zu einem der drei Therapiearme und anschließender Unterscheidung von positiven bzw. negativen HPP1 mfcDNA-Werten teilweise zu klein, um statistisch signifikante Ergebnisse bekommen und eine generelle Aussage treffen zu können. Ein Interpretationsproblem bereitete vor allem die bereits erläuterte Untergruppe von 15 Patienten mit zunächst positivem HPP1 mfcDNA-Wert und negativem Ergebnis im Verlauf zur BE IV mit verschlechterter Überlebensprognose. Anhand dieses Beispiels wird verdeutlicht, dass HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE IV nur begrenzte Aussage als Biomarker besitzt und die Ausweitung der Analyse auf verschiedene Zeitpunkte einen deutlichen Informationszugewinn bietet.

Der Vorteil des homogenen Kollektivs lässt ebenso keine Rückschlüsse auf den Einfluss einer möglichen Vortherapie oder anderen medikamentösen Induktionstherapien zu. Dies ist ein wichtiger Aspekt, da ein Großteil der Patienten mit fortge-

schrittenem Tumorleiden von einem multimodalen Therapiekonzept profitiert und weiteren Therapieformen daher ebenfalls in die Analysen künftiger Studien inkludiert werden sollten. Dabei muss jedoch aufgrund unterschiedlicher Therapiezentren mit erhöhtem personellem und organisatorischem Aufwand und eventuell damit verbundenen Informationsverlusten gerechnet werden.

Da nur Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf und partieller oder kompletter Remission in die Studie aufgenommen wurden, war anzunehmen, dass die Unterschiede des HPP1 mfcDNA-Wertes wesentlich geringer ausfallen würden als im Rahmen der Induktionstherapie, in die auch Patienten mit Progress und damit raschem Fortschreiten der Tumorerkrankung eingeschlossen waren. Im Rahmen zukünftiger Studien wäre daher ein Vergleich von Patientengruppen mit *stable disease* mit Patienten unter Progress interessant. Die Nachteile des homogenen Kollektivs mit allesamt Ansprechen auf die Induktionstherapie bestätigte sich auch in den Responseanalysen. Wie zu erwarten konnten anhand der HPP1 mfcDNA im Blut keine Aussagen bezüglich eines Therapieansprechens getroffen werden. Um HPP1 mfcDNA als Marker für ein Therapieansprechen validieren zu können, empfehlen sich künftig Studien mit Patienten, die sich in ihrer Prognose signifikanter voneinander unterscheiden bzw. ein Vergleich verschieden aggressiver Chemotherapien.

Eine weitere Limitation der Aussagekraft dieser Studie stellen die Blutentnahmezeitpunkte dar. Diesbezüglich wäre eine Observanz der HPP1-Spiegel bis zum Ende der Studie wünschenswert, da besonders im späteren Verlauf vermehrte Krankheitsprogrese und Rezidive zu erwarten sind. Das fehlende *follow up* ist im Rahmen dieser Studie dem damit verbundenen erhöhten finanziellen Aufwand geschuldet. Jedoch sind demgegenüber in dieser Studie als besonders positiv die genau definierten Blutentnahmezeitpunkte hervorzuheben mit nur geringfügigen Abweichungen in der Durchführung. Dies ist umso bedeutsamer, wenn berücksichtigt wird, dass es sich dabei um eine Multicenter-Studie handelt. Diese HPP1 mfcDNA-Bestimmungen im Therapieverlauf sollten auch in künftigen Studien beibehalten werden. Ein wichtiges Ziel könnte dabei sein, aufgrund der Datenauswertung einen optimalen Zeitpunkt für die Untersuchung des HPP1 mfcDNA-Spiegels festlegen zu können, um die Blutentnahmen für die Patienten so gering wie möglich zu halten.

Des Weiteren wurden, abgesehen von der Messung des CEAs als einzigen etablierten Tumormarker beim kolorektalen Karzinom, keine weiteren potentiellen Biomarker mit

Prognoserelevanz bestimmt. Hierfür kämen beispielsweise die bereits erörterten Marker des CIMP-Panels in Frage. Im Rahmen einer weiteren Studie wurde HPP1 ebenfalls aufgrund der Assoziation mit Tumornekrose und Zelltod auf eine Korrelation mit LDH untersucht. (Philipp et al. 2014) Ein derartiger Vergleich sollte Gegenstand weiterer Forschungen an noch größeren Patientenkollektiven sein.

Ein weiterer limitierender Faktor der Studie war ein initial verfügbares Blutvolumen von nur 200 µl pro Patientenprobe. Ein deutlich größeres Probenvolumen könnte auch Patienten mit aktuell aufgrund der geringen Konzentration vermeintlich nicht vorhandenem mfcDNA-Gehalt als HPP1-positiv detektieren und somit die Aussagekraft der Studie deutlich verbessern. Im Falle eines erhöhten Probenvolumens stellt allerdings das Fassungsvermögen der Zentrifugationssäulen sowie die Maximalkapazität der Membranen eine Einschränkung dar. Besonders in den Patientengruppen dieser Studie, bei denen ein Wechsel von HPP1 mfcDNA-Positivität zu Negativität und umgekehrt nachgewiesen werden konnte, kann nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich dabei um eine echte Abbildung des Krankheitsverlaufs der Patienten handelt oder die Probe aus Gründen der technischen Limitation als falsch-negativ bewertet wurde. Möglicherweise bietet dieser Aspekt auch einen Erklärungsansatz für das vorbeschriebene Patientenkollektiv des *dotplots* von Abbildung 5.2, da sich der Markerverlauf nicht durch die erwartete Patientenprognose erklären lässt. Um diese Problematik der falsch-negativen Ergebnisse minimieren zu können, wurden sämtliche HPP1-Werte einer Probe in Dreifach-Bestimmungen mittels qPCR gemessen.

Dieser wichtige Aspekt, dass geringe Konzentrationen an mfcDNA einer Detektion durch das Testverfahren entgehen können, führt zu den allgemeinen Kritikpunkten an der *liquid biopsy* als Diagnostikverfahren in der Onkologie. Es handelt sich hierbei um eine sehr elegante Methodik der genetischen Untersuchung eines Tumors, da die dafür notwendige Blutentnahme für die Patienten keinerlei Risiko birgt und deshalb beliebig oft zur Verlaufsbeurteilung wiederholt werden kann. Besonders bei nicht möglicher invasiver Biopsie des Primärtumors, beispielsweise bei NSCLC, nimmt die *liquid biopsy* einen immer wichtigeren Stellenwert ein (Ilié und Hofman 2016; Mino-Kenudson 2016). Laut aktuellem Stand der Wissenschaft ist die Wertigkeit der Detektion einer Mutation im Tumorgewebe und in der *liquid biopsy* als vergleichbar anzusehen, Schwierigkeiten bereitet allerdings die Interpretation eines fehlenden Nachweises in der *liquid biopsy*. Dann besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich keine Tumormutation vorliegt oder diese aufgrund der niedrigen Sensitivität von 67% des Testverfahrens

und der geringen cfDNA-Menge nicht detektiert werden kann (Jung und Kirchner 2018). Um diesen Aspekt ausschließen zu können, wird nach Möglichkeit primär die molekularpathologische Untersuchung des Tumorbiopsats auf Treibermutationen und in Kenntnis dessen ergänzend die *liquid biopsy* empfohlen. Ein derartiger Vergleich fehlt in der vorliegenden Studie, wurde aber bereits von Philipp A et al in einer früheren HPP1-Studie unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Bei dem Studienkollektiv handelte es sich ebenfalls um Patienten mit metastasiertem KRK UICC IV. Als Teil der Studie wurden simultan 54 Gewebeproben aus dem Primärtumor auf Methylierung von HPP1 und HLTF sowie Serumproben auf HPP1 und HLTF mfcDNA untersucht. In den untersuchten Gewebeproben fand sich ähnlich zu vorangehenden Studien in 93% der Fälle eine Methylierung von HPP1, hingegen konnte lediglich in 56% der Serumproben HPP1 mfcDNA nachgewiesen werden. Allerdings gab es keinen Fall, bei dem HPP1 mfcDNA im Serum und nicht in der Gewebeprobe detektiert werden konnte. Als möglichen Erklärungsansatz für die 22 Fälle mit negativer HPP1mfc DNA und positivem Nachweis im Primärtumor wurde unter anderem eine niedriger DNA Umsatz oder zu geringe Tumovaskularisation aufgeführt (Philipp et al. 2012). Auch künftig sind weiterführende derartige Studien zur simultanen Testung von HPP1 mfcDNA sowohl in Blut- als auch in Tumorgewebeproben auf dem Weg zur Etablierung von HPP1 als epigenetischen Marker im Blut beim metastasierten KRK notwendig. Auch die *liquid biopsy* sollte anhand weiterer derartiger Testverfahren zur Validierung als verlässliches Diagnostikverfahren in der Onkologie auf den Prüfstand gestellt werden.

Die bereits aufgeführten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten allesamt anhand statistisch signifikanter Ergebnisse die prognostische Bedeutung von HPP1 mfcDNA im Blut bei Patienten mit KRK belegen. Ein solches Resultat mit statistisch signifikanten Unterschieden in den HPP1 mfcDNA-Spiegeln zwischen Patienten mit guter und schlechter Prognose ließ sich auch anhand des Patientenkollektivs dieser Studie bestätigen. Streng genommen fehlt der Studie allerdings ein Test-Validierungsansatz, wodurch anhand einer zweiten Testkohorte die Testung auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich ist. In künftigen Studien an HPP1 mfcDNA wäre die Berücksichtigung eines Studienaufbaus nach einem solchen Prinzip wünschenswert, um sämtliche Ergebnisse validieren und zufällige Parameter mit Sicherheit ausschließen zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erarbeiteten Ergebnisse einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung der Etablierung von HPP1 mfcDNA als neuen Biomarker beim kolorektalen Karzinom darstellen. Jedoch empfehlen sich in Zukunft Studien an

größeren Kollektiven mit Test-Validierungsansätzen sowie eine simultane Mutationsanalyse anhand des Primärtumorgewebes, um die vorliegenden Ergebnisse noch weiter validieren zu können.

## **6.6. Klinische Bedeutung und Ausblick**

Kolorektale Karzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden Malignomen in der westlichen Welt. Die ab 55 Jahren in Deutschland im Rahmen der gesetzlichen Früherkennungsmaßnahmen angebotene Vorsorgekoloskopie stellt nach wie vor den diagnostischen Goldstandard dar, wird jedoch von einem Großteil der Bevölkerung nicht wahrgenommen. Die Möglichkeit des Nachweises eines hochsensitiven und spezifischen Tumormarkers aus einer Blutprobe könnte für größere Akzeptanz und dahingehend gesteigerter Bereitschaft zur Teilnahme an Screeningmaßnahmen in der Gesellschaft sorgen. Abgesehen von der Früherkennung stellt die Detektion von Tumormarkern als Verlaufsparemeter bei bereits erkrankten Patienten einen weiteren wichtigen Anwendungsbereich dar. Diesbezüglich wäre es wünschenswert, dass diese zuverlässig das Therapieansprechen und die Überlebensprognose der Erkrankten vorhersagen können.

Damit ein in Studien untersuchter Marker im klinischen Alltag Anwendung finden kann, sollte er idealerweise eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen und in so hoher Konzentration vom Primärtumor ins Blut abgegeben werden, dass bereits geringste Tumormassen detektiert werden können. Weitere wichtige Kriterien beinhalten die Bestimmung der Tumorausbreitung und Vorhersage einer Prognose und des Therapieansprechens. Bezüglich der Methodik ist die Standardisierung der Probengewinnung sowie der DNA-Aufbereitung und nachfolgende PCR-basierte Messung der DNA-Methylierungsmuster mit hoher Testwiederholbarkeit von entscheidender Bedeutung. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden von der DNA-Isolation bis zur Ergebnisauswertung bringen einen relativ hohen Zeitaufwand mit sich. Mehrmalige Einfrierungs- und Auftauprozesse gefährden die Stabilität der DNA, ebenso wie die Vielzahl an kleinen Arbeitsschritten zu DNA-Verlusten prädestiniert. Der Aspekt des DNA-Verlustes wiegt noch schwerer, wenn man erneut bedenkt, dass sich die Menge an frei zirkulierender DNA im Nanogrammbereich befindet. Dies kann dazu führen, dass besonders geringe, aber dennoch vorhandene Mengen an DNA-Molekülen, wie beispielsweise nach erfolgreicher Therapie oder noch frühzeitigem Tumorstadium, einem

Nachweis entgehen. Mithilfe interner Kontrollen sowie hochspezifischer PCR-Verfahren wird versucht, dieser Problematik entgegenzutreten. Zusätzlich zur hohen Zeitintensität ist die Messung von HPP1 mfcDNA im Vergleich zur CEA-Routinelabor Diagnostik mit erheblich höheren Kosten verbunden.

Zur Etablierung von HPP1 mfcDNA als Marker im klinischen Alltag wäre eine Standardisierung und Vereinfachung bzw. Minimierung der Arbeitsschritte wünschenswert. Um die Methodik besonders effizient zu gestalten, würde die Analyse mehrerer Biomarker im Rahmen einer DNA-Aufbereitung eine gute Möglichkeit bieten. Demgegenüber ist allerdings der 2016 zugelassene Epi proColon® Test zum Nachweis von Septin 9 aus Blutplasma zu betrachten. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen *real-time* PCR-basierten Nachweis von methylierter Septin 9-DNA in Bisulfit-konvertierter DNA aus humanen Plasmaproben. Die einzelnen Arbeitsschritte gleichen denen der HPP1-Messung in dieser Arbeit: Es erfolgt zunächst eine DNA-Isolation und Bisulfit Behandlung mit anschließender *real-time* PCR mittels spezifischer Primer und Sonden unter Vergleich mit internen Positiv- und Negativkontrollen. Für sämtliche Arbeitsschritte stehen drei Kits (Epi proColon Plasma Quick Kit, Epi proColon Sensitive PCR Kit, Epi proColon Control Kit) zur Verfügung. Die Kosten von ca. 150 € werden derzeit nicht von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen. Der Vergleich mit diesem bereits zugelassenen epigenetischen Test soll zeigen, dass ein derartiges Testverfahren trotz mehrerer teils aufwendiger Arbeitsschritte bereits im klinischen Alltag Verwendung findet (Lamb und Dhillon 2017).

In der dieser Arbeit vorausgehenden Studie konnte HPP1 mfcDNA eine Aussagekraft bezüglich des Therapieansprechens auf die Induktionschemotherapie zugesprochen werden. Dieses Ergebnis ließ sich in der gegenwärtigen Auswertung nicht reproduzieren. Um diesbezüglich genauere Erkenntnisse zu gewinnen, sollten randomisierte prospektive Studien bei einem größeren Patientenkollektiv mit Vergleich unterschiedlicher Chemotherapeutika durchgeführt werden. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Therapieumstellung auf den HPP1 mfcDNA-Spiegel und Progress im radiologischen Staging auswirkt. Ebenfalls ist im Rahmen zukünftiger Studien darauf zu achten, dass die Blutentnahmen regelmäßig über einen noch längeren Therapiezeitraum erfolgen. Auch sollten Patienten, die im Laufe der Studie aufgrund eines Progresses oder einer Resektabilität keine weitere Chemotherapie erhalten weiterhin bezüglich ihres HPP1 mfcDNA-Gehaltes im Blut untersucht werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist dies die erste Studie, die das Biomarkerverhalten von HPP1 hinsichtlich seiner prognostischen und therapeutischen Rolle bei Patienten mit metastasiertem KRK unter dreierlei verschiedener Erhaltungskemotherapien vergleicht. Die Arbeit zeigt, dass HPP1 zum Zeitpunkt BE III im Plasma als unabhängige prognostische Faktor am besten mit dem Überleben der Patienten korreliert. Die vorbeschriebene Aussagekraft von HPP1 als Marker für ein Therapieansprechen konnte anhand dieser Arbeit nicht belegt werden. Dies ist allerdings durch die ähnlichen Ergebnisse für das mediane Gesamt- und progressionsfreie Überleben der einzelnen Therapiearme bei homogenem Patientenkollektiv im Rahmen der Gesamtstudie zu erklären.

Diese Dissertation liefert somit wichtige Erkenntnisse auf dem Weg zur Etablierung von HPP1 als Tumormarker beim KRK, weiterführende Studien sind jedoch notwendig, um diesen Marker in den klinischen Alltag einführen zu können.

## Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland die zweithäufigste Krebserkrankung. Trotz etablierter Screeningverfahren wird dieser Tumor bei fehlender Frühsymptomatik bei einigen Patienten erst in bereits metastasiertem Stadium detektiert, sodass ein multimodales Therapiekonzept in palliativer Intention die einzige Behandlungsoption darstellt. In diesem Krankheitsstadium konnte methylierte, frei-zirkulierende HPP1-DNA (HPP1 mfcDNA) im Rahmen von Studien als prognostischer Marker für ein Therapieansprechen im Blut der Erkrankten detektiert werden.

In dieser Dissertation wurde der HPP1 mfcDNA-Spiegel im Plasma von Patienten mit metastasiertem KRK im Rahmen der prospektiven Multicenterstudie AIO-KRK 0207 untersucht. 195 Probanden wurden nach einheitlicher Induktionschemotherapie verschiedenen Erhaltungskemotherapiearmen aus Fluoropyrimidinen und Bevacizumab, einer Bevacizumab-Monotherapie oder keiner medikamentösen Therapie zugeteilt. Zur Analyse von HPP1 mfcDNA erfolgte eine Blutentnahme bei Randomisierung (BE III), sowie 6 Wochen nach Therapiebeginn (BE IV). Aus den Blutproben wurde fc-DNA isoliert, zur Anreicherung methylierter fc-DNA eine Bisulfit-Behandlung durchgeführt und diese im Anschluss mithilfe einer methylierungsspezifischen PCR quantifiziert.

Bei 42 Probanden (21,54%) konnten zur BE III HPP1 mfcDNA-positive Messwerte nachgewiesen werden. Diese Anzahl stieg ca. 6 Wochen nach Therapiebeginn zur BE IV auf 77 an. (39,49%) Zu beiden Zeitpunkten war ein positiver Nachweis mit einer signifikant schlechteren Prognose hinsichtlich Gesamt- und progressionsfreiem Überleben für den Patienten assoziiert, wobei der Wert zur BE III sich diesbezüglich als am prognoserelevantesten erwies (OS: HPP1 BE III: HR= 4,31; 95% CI: 2,75-6,74; HPP1 BE IV: HR= 1,87; 95% CI: 1,25-2,79; PFS: HPP1 BE III: HR= 2,62; 95% CI: 1,82-3,78; HPP1 BE IV: HR= 2,03; 95% CI: 1,48-2,78). Die Auswertung verschiedener Cox-Modelle im Anschluss zeigte HPP1 mfcDNA als unabhängigen prognostischen Biomarker.

ROC-Analysen wurden zum Nachweis von HPP1 mfcDNA als Marker für ein Therapieansprechen herangezogen. Dabei ließen die AUC-Werte keine suffizienten Rückschlüsse hinsichtlich eines im radiologischen Stagings diagnostizierten Therapieansprechens bzw.-versagens zu (HPP1 BE III AUC: 0,6762; BE IV AUC: 0,5597). Dies war jedoch auf die Homogenität des Patientenkollektives und die Erhaltungskemotherapie mit geringeren Therapieauswirkungen zurückzuführen.

Diese Resultate zeigen, dass HPP1 mfcDNA zum Zeitpunkt BE III ein multivariater Prognosemarker ist. Jedoch sind weitere prospektive Studien mit aktiver Therapieanpassung zur Evaluation von HPP1 mfcDNA als Marker für ein Therapieansprechen notwendig.

Anhang

**Anhang**

**Abkürzungsverzeichnis**

AUC	area under the curve
BE	Blutentnahme
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CI	Konfidenzintervall
CIMP	CpG island methylator phenotype
CR	complete remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IEN	intraepitheliale Neoplasie
Fc-DNA	frei-zirkulierende DNA
HLTF	Helicase-like transcription factor
HNPCC	hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HPP1	Hyperplastic polyposis 1
HR	hazard ratio
KRK	Kolorektales Karzinom
LDH	Laktatdehydrogenase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	partial remission
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	stable disease
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1.1:</b> Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten .....	2
<b>Abbildung 1.2:</b> Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 .....	3
<b>Abbildung 1.3:</b> Mechanismen epigenetische Veränderungen beim kolorektalen Karzinom .....	7
<b>Abbildung 1.4</b> Schematische Darstellung der biochemischen Prozesse der DNA- Methylierung .....	8
<b>Abbildung 3.1</b> Aufbau der Gesamtstudie AIO-KRK 0207 .....	29
<b>Abbildung 4.1:</b> Patientenkollektiv der Gesamtstudie: .....	33
<b>Abbildung 4.2:</b> Übersicht der einzelnen Versuchsschritte .....	34
<b>Abbildung 4.3:</b> Chemische Reaktionsschritte der Bisulfitbehandlung .....	37
<b>Abbildung 4.4:</b> Funktionsweise der Taqman-Sonden bei der quantitativen real-time PCR.....	39
<b>Abbildung 4.5:</b> Triplikate der Standardkurve HPP1 mit Verdünnungsreihe .....	43
<b>Abbildung 4.6:</b> Berechnung der Template-Menge mittels Standardkurve und linearer Funktionsgleichung .....	44
<b>Abbildung 5.1:</b> Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs .....	51
<b>Abbildung 5.2</b> Dotplot: Verteilungsmuster der Messwerte für die Gruppen pos./neg. bzw neg./pos .....	53
<b>Abbildung 5.3</b> Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms I: Fluorpyrimidine + Bevacicumab .....	57
<b>Abbildung 5.4:</b> Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms II: Bevacicumab Monotherapie: .....	59
<b>Abbildung 5.5:</b> Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des Therapiearms III: Keine medikamentöse Erhaltungstherapie .....	61
<b>Abbildung 5.6</b> Kaplan-Meier Kurven des PFS für das Gesamtkollektiv .....	64
<b>Abbildung 5.7:</b> Kaplan-Meier Kurven PFS unter Therapie von Fluoropyrimidinen+Bevacicumab .....	67
<b>Abbildung 5.8</b> Kaplan-Meier Kurven PFS unter Bevacicumab Monotherapie.....	68
<b>Abbildung 5.9:</b> Kaplan-Meier Kurven PFS bei fehlender medikamentöser Chemotherapie:.....	69
<b>Abbildung 5.10:</b> Kaplan Meier Kurven der zusammengefassten Obergruppen mit ähnlichem HPP1-Muster BE I bis BE IV .....	77
<b>Abbildung 5.11:</b> ROC- Kurven mit jeweiligen AUC-Werten .....	80

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.1</b> TNM-Klassifikation .....	13
<b>Tabelle 1.2:</b> Stadiengruppierung .....	13
<b>Tabelle 4.1:</b> DNA-Sequenzen von Primern und Sonden sowie Fragmentlängen der verwendeten Methylierungsmarker .....	40
<b>Tabelle 4.2:</b> Mastermix der PCR.....	41
<b>Tabelle 4.3</b> Protokoll der Echtzeit-quantitativen PCR .....	42
<b>Tabelle 5.1:</b> Klinisch-pathologische Patientendaten des Gesamtkollektivs .....	48
<b>Tabelle 5.2:</b> Zuordnung der Probanden zu Therapieansprechen auf die Induktionstherapie und zu den Therapiearmen .....	49
<b>Tabelle 5.3:</b> Medianes Überleben und Hazard Ratios (HR) für HPP1 mfcDNA und CEA Werte beim Gesamtkollektiv .....	52
<b>Tabelle 5.4:</b> Analyse der Überlebensdaten verschiedener klinischer Parameter.....	55
<b>Tabelle 5.5</b> Medianes Überleben Therapiearm I: Fluoropyrimidine + Bevacicumab	58
<b>Tabelle 5.6</b> Medianes Überleben Therapiearm II: Bevacicumab Monotherapie .....	60
<b>Tabelle 5.7:</b> Medianes Gesamtüberleben Therapiearm III: Keine Therapie .....	62
<b>Tabelle 5.8</b> Medianes PFS Gesamtkollektiv .....	65
<b>Tabelle 5.9</b> Medianes PFS in Monaten für verschiedene klinische Parameter .....	66
<b>Tabelle 5.10:</b> Fluoropyrimidine+Bevacicumab: medianes PFS.....	70
<b>Tabelle 5.11:</b> Bevacicumab Monotherapie: medianes PFS .....	70
<b>Tabelle 5.12:</b> Keine medikamentöse Therapie: medianes PFS.....	71
<b>Tabelle 5.13:</b> Cox-Modelle für das OS und PFS.....	72
<b>Tabelle 5.14</b> Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens (OS).....	73
<b>Tabelle 5.15:</b> Multivariate Analyse zum PFS .....	73
<b>Tabelle 5.16:</b> HPP1 Messwerte im Verlauf der Gesamtstudie .....	74
<b>Tabelle 5.17:</b> Medianes OS im Verlauf BE II/III und BE II/IV beim Gesamtkollektiv..	75
<b>Tabelle 5.18:</b> Medianes PFS im Verlauf BE II/III und BE II/IV beim Gesamtkollektiv	76
<b>Tabelle 5.19:</b> Obergruppen mit jeweils gleichem HPP1 Muster Medianes OS .....	77
<b>Tabelle 5.20</b> Obergruppen mit jeweils gleichem HPP1 Muster Medianes PFS .....	77
<b>Tabelle 5.21:</b> ROC-Analyse .....	80

**Literaturverzeichnis**

Aarnio, M.; Mecklin, J. P.; Aaltonen, L. A.; Nyström-Lahti, M.; Järvinen, H. J. (1995): Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. In: *International journal of cancer* 64 (6), S. 430–433.

Ahlquist, David A.; Taylor, William R.; Mahoney, Douglas W.; Zou, Hongzhi; Domanico, Michael; Thibodeau, Stephen N. et al. (2012): The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (3), 272-7.e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2011.10.008.

Ahuja, N.; Li, Q.; Mohan, A. L.; Baylin, S. B.; Issa, J. P. (1998): Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. In: *Cancer research* 58 (23), S. 5489–5494.

Ambros, Victor (2004): The functions of animal microRNAs. In: *Nature* 431 (7006), S. 350–355. DOI: 10.1038/nature02871.

Andre, Thierry; Boni, Corrado; Navarro, Matilde; Taberero, Josep; Hickish, Tamas; Topham, Clare et al. (2009): Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (19), S. 3109–3116. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.6771.

Anwar, Suhail; Fraser, Sheila; Hill, Jim (2012): Surgical specialization and training - its relation to clinical outcome for colorectal cancer surgery. In: *Journal of evaluation in clinical practice* 18 (1), S. 5–11. DOI: 10.1111/j.1365-2753.2010.01525.x.

Ashktorab, Hassan; Smoot, Duane T.; Carethers, John M.; Rahmanian, Majid; Kittles, Rick; Vosganian, Greg et al. (2003): High Incidence of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer from African Americans. In: *Clin Cancer Res* 9 (3), S. 1112–1117. Online verfügbar unter <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/3/1112.full.pdf>.

Bachet, J. B.; Bouché, O.; Taieb, J.; Dubreuil, O.; Garcia, M. L.; Meurisse, A. et al. (2018): RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGE0 RASANC prospective multicenter study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. DOI: 10.1093/annonc/mdy061.

- Baker, S. J.; Fearon, E. R.; Nigro, J. M.; Hamilton, S. R.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M. et al. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. In: *Science (New York, N.Y.)* 244 (4901), S. 217–221.
- Barault, Ludovic; Amatu, Alessio; Siravegna, Giulia; Ponzetti, Agostino; Moran, Sebastian; Cassingena, Andrea et al. (2017): Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. In: *Gut*. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313372.
- Barbazan, Jorge; Muinelo-Romay, Laura; Vieito, Maria; Candamio, Sonia; Diaz-Lopez, Antonio; Cano, Amparo et al. (2014): A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. In: *International journal of cancer* 135 (11), S. 2633–2643. DOI: 10.1002/ijc.28910.
- Barone, Carlo; Pinto, Carmine; Normanno, Nicola; Capussotti, Lorenzo; Cognetti, Francesco; Falcone, Alfredo; Mantovani, Lorenzo (2014): KRAS early testing: consensus initiative and cost-effectiveness evaluation for metastatic colorectal patients in an Italian setting. In: *PloS one* 9 (1), e85897. DOI: 10.1371/journal.pone.0085897.
- Bast, R. C., JR; Ravdin, P.; Hayes, D. F.; Bates, S.; Fritsche, H., JR; Jessup, J. M. et al. (2001): 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19 (6), S. 1865–1878. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.6.1865.
- Bestor, T. H. (2000): The DNA methyltransferases of mammals. In: *Human molecular genetics* 9 (16), S. 2395–2402.
- Bettington, Mark; Walker, Neal; Rosty, Christophe; Brown, Ian; Clouston, Andrew; McKeone, Diane et al. (2017): Clinicopathological and molecular features of sessile serrated adenomas with dysplasia or carcinoma. In: *Gut* 66 (1), S. 97–106. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310456.
- Bettington, Mark L.; Chetty, Runjan (2015): Traditional serrated adenoma: an update. In: *Human pathology* 46 (7), S. 933–938. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.04.002.
- Bird, Adrian (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes & development* 16 (1), S. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Bird, Adrian (2007): Perceptions of epigenetics. In: *Nature* 447 (7143), S. 396–398. DOI: 10.1038/nature05913.

- Bokemeyer, C.; Bondarenko, I.; Hartmann, J. T.; Braud, F. de; Schuch, G.; Zube, A. et al. (2011): Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 22 (7), S. 1535–1546. DOI: 10.1093/annonc/mdq632.
- Boyiadzis, Michael M.; Kirkwood, John M.; Marshall, John L.; Pritchard, Colin C.; Azad, Nilufer S.; Gulley, James L. (2018): Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 6 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s40425-018-0342-x.
- Brahmer, Julie R.; Tykodi, Scott S.; Chow, Laura Q. M.; Hwu, Wen-Jen; Topalian, Suzanne L.; Hwu, Patrick et al. (2012): Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. In: *The New England journal of medicine* 366 (26), S. 2455–2465. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694.
- Brenner, Hermann; Schrotz-King, Petra; Holleczer, Bernd; Katalinic, Alexander; Hoffmeister, Michael (2016): Declining Bowel Cancer Incidence and Mortality in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 113 (7), S. 101–106. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0101.
- Cai, Jun; Ma, Hong; Huang, Fang; Zhu, Dichao; Bi, Jianping; Ke, Yang; Zhang, Tao (2013): Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. In: *World journal of surgical oncology* 11, S. 306. DOI: 10.1186/1477-7819-11-306.
- Carragher, Linda A. S.; Snell, Kimberley R.; Giblett, Susan M.; Aldridge, Victoria S. S.; Patel, Bipin; Cook, Simon J. et al. (2010): V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a. In: *EMBO molecular medicine* 2 (11), S. 458–471. DOI: 10.1002/emmm.201000099.
- Chen, Xi; Ba, Yi; Ma, Lijia; Cai, Xing; Yin, Yuan; Wang, Kehui et al. (2008): Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. In: *Cell research* 18 (10), S. 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.

Church, Timothy Robert; Wandell, Michael; Lofton-Day, Catherine; Mongin, Steven J.; Burger, Matthias; Payne, Shannon R. et al. (2014): Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. In: *Gut* 63 (2), S. 317–325. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304149.

Compton, Carolyn; Fenoglio-Preiser, Cecilia M.; Pettigrew, Norman; Fielding, L. Peter (2000): American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. In: *Cancer* 88 (7), S. 1739–1757. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000401)88:7<1739::AID-CNCR30>3.0.CO;2-T.

Coulondre, Christine; Miller, Jeffrey H.; Farabaugh, Philip J.; Gilbert, Walter (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. In: *Nature* 274 (5673), S. 775–780. DOI: 10.1038/274775a0.

Dalerba, Piero; Sahoo, Debashis; Paik, Soonmyung; Guo, Xiangqian; Yothers, Greg; Song, Nan et al. (2016): CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. In: *The New England journal of medicine* 374 (3), S. 211–222. DOI: 10.1056/NEJMoa1506597.

Devos, Theo; Tetzner, Reimo; Model, Fabian; Weiss, Gunter; Schuster, Matthias; Distler, Jurgen et al. (2009): Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. In: *Clinical chemistry* 55 (7), S. 1337–1346. DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808.

Di Fiore, F.; Blanchard, F.; Charbonnier, F.; Le Pessot, F.; Lamy, A.; Galais, M. P. et al. (2007): Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. In: *British journal of cancer* 96 (8), S. 1166–1169. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603685.

Dionísio de Sousa, Isabel José; Ferreira, Joana; Rodrigues, Joana; Bonito, Nuno; Jacinto, Paula; Marques, Mariela et al. (2016): Association between bevacizumab-related hypertension and response to treatment in patients with metastatic colorectal cancer. In: *ESMO Open* 1 (3), e000045. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000045.

Douillard, Jean-Yves; Oliner, Kelly S.; Siena, Salvatore; Tabernero, Josep; Burkes, Ronald; Barugel, Mario et al. (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 369 (11), S. 1023–1034. DOI: 10.1056/NEJMoa1305275.

Duffy, M. J. (2001a): Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? In: *Clinical chemistry* 47 (4), S. 624–630.

Duffy, M. J.; Lamerz, R.; Haglund, C.; Nicolini, A.; Kalousova, M.; Holubec, L.; Sturgeon, C. (2014): Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. In: *International journal of cancer* 134 (11), S. 2513–2522. DOI: 10.1002/ijc.28384.

Duffy, Michael J. (2001b): Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? In: *Clinical chemistry* 47 (4), S. 624–630. Online verfügbar unter <http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/47/4/624.full.pdf>.

Eads, C. A.; Danenberg, K. D.; Kawakami, K.; Saltz, L. B.; Blake, C.; Shibata, D. et al. (2000): MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. In: *Nucleic acids research* 28 (8), E32.

Ebert, Matthias P.A.; Mooney, Suzanne H.; Tonnes-Priddy, Lori; Lograsso, Joe; Hoffmann, Juliane; Chent, Jie et al. (2005): Hypermethylation of the TPEF/HPP1 Gene in Primary, Metastatic Colorectal Cancers. In: *Neoplasia* 7 (8), S. 771–778. DOI: 10.1593/neo.05235.

Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R. et al. (2009): New response evaluation criteria in solid tumours. Revised RECIST guideline (version 1.1). In: *European Journal of Cancer* 45 (2), S. 228–247. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.

Elahi, Abul; Zhang, Li; Yeatman, Timothy J.; Gery, Sigal; Sebti, Said; Shibata, David (2008): HPP1-mediated tumor suppression requires activation of STAT1 pathways. In: *International journal of cancer* 122 (7), S. 1567–1572. DOI: 10.1002/ijc.23202.

Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Dikshit, Rajesh; Eser, Sultan; Mathers, Colin; Rebelo, Marise et al. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. In: *International journal of cancer* 136 (5), E359-86. DOI: 10.1002/ijc.29210.

Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. In: *Endocrine reviews* 18 (1), S. 4–25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.

Field, Kathryn (2007): Metastatic colorectal cancer-past, progress and future. In: *WJG* 13 (28), S. 3806. DOI: 10.3748/wjg.v13.i28.3806.

Filella, X.; Molina, R.; Pique, J. M.; Garcia-Valdecasas, J. C.; Grau, J. J.; Novell, F. et al. (1994): Use of CA 19-9 in the early detection of recurrences in colorectal cancer: comparison with CEA. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 15 (1), S. 1–6.

Folkman, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. In: *The New England journal of medicine* 285 (21), S. 1182–1186. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.

Frazier, Marsha L.; Xi, Lixuan; Zong, Jihong; Viscofsky, Nancy; Rashid, Asif; Wu, Elsie F. et al. (2003): Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. In: *Cancer research* 63 (16), S. 4805–4808.

Frommer, M.; McDonald, L. E.; Millar, D. S.; Collis, C. M.; Watt, F.; Grigg, G. W. et al. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5), S. 1827–1831.

Gardiner-Garden, M.; Frommer, M. (1987): CpG Islands in vertebrate genomes. In: *Journal of Molecular Biology* 196 (2), S. 261–282. DOI: 10.1016/0022-2836(87)90689-9.

Garlan, Fanny; Laurent-Puig, Pierre; Sefrioui, David; Siauve, Nathalie; Didelot, Audrey; Sarafan-Vasseur, Nasrin et al. (2017): Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (18), S. 5416–5425. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3155.

Garrigou, Sonia; Perkins, Geraldine; Garlan, Fanny; Normand, Corinne; Didelot, Audrey; Le Corre, Delphine et al. (2016): A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. In: *Clinical chemistry* 62 (8), S. 1129–1139. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253609.

GEKID-Atlas - Tabellenabfrage. Online verfügbar unter [http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen\\_D.php?Method=INCIDENCE\\_EU&ICD10=C18-C21&Year\\_from=2010&Year\\_to=2013&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on](http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C18-C21&Year_from=2010&Year_to=2013&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on), zuletzt geprüft am 09.02.2017.

- Giacchetti, S.; Itzhaki, M.; Gruia, G.; Adam, R.; Zidani, R.; Kunstlinger, F. et al. (1999): Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 10 (6), S. 663–669.
- Giantonio, Bruce J.; Catalano, Paul J.; Meropol, Neal J.; O'Dwyer, Peter J.; Mitchell, Edith P.; Alberts, Steven R. et al. (2007): Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (12), S. 1539–1544. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.6305.
- Gold, P.; Freedman, S. O. (1965): DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES. In: *The Journal of experimental medicine* 121, S. 439–462.
- Goldstein, M. J.; Mitchell, E. P. (2005a): Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. In: *Cancer investigation* 23 (4), S. 338–351.
- Goldstein, Mitchell J.; Mitchell, Edith Peterson (2005b): Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. In: *Cancer investigation* 23 (4), S. 338–351.
- Goonetilleke, K. S.; Siriwardena, A. K. (2007): Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. In: *European Journal of Surgical Oncology* 33 (3), S. 266–270. DOI: 10.1016/j.ejso.2006.10.004.
- Grady, W. M. (2003): Genetic testing for high-risk colon cancer patients. In: *Gastroenterology* 124 (6), S. 1574–1594.
- Grady, William M.; Carethers, John M. (2008): Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. In: *Gastroenterology* 135 (4), S. 1079–1099. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.07.076.
- Grasselli, J.; Elez, E.; Caratù, G.; Matito, J.; Santos, C.; Macarulla, T. et al. (2017): Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-

EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (6), S. 1294–1301. DOI: 10.1093/annonc/mdx112.

Grutzmann, Robert; Molnar, Bela; Pilarsky, Christian; Habermann, Jens K.; Schlag, Peter M.; Saeger, Hans D. et al. (2008): Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. In: *PloS one* 3 (11), e3759. DOI: 10.1371/journal.pone.0003759.

Hagman, Helga; Bendahl, Par-Ola; Melander, Olle; Sundberg, Jan; Johnsson, Anders; Belting, Mattias (2017): Vasoactive peptides associate with treatment outcome of bevacizumab-containing therapy in metastatic colorectal cancer. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, S. 1–8. DOI: 10.1080/0284186X.2017.1302098.

Hall, Peter A.; Russell, S. E. Hilary (2004): The pathobiology of the septin gene family. In: *The Journal of pathology* 204 (4), S. 489–505. DOI: 10.1002/path.1654.

Haller, Daniel G.; Tabernero, Josep; Maroun, Jean; Braud, Filippo de; Price, Timothy; van Cutsem, Eric et al. (2011): Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (11), S. 1465–1471. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.6297.

Hansen, T. F.; Carlsen, A. L.; Heegaard, N. H. H.; Sorensen, F. B.; Jakobsen, A. (2015): Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. In: *British journal of cancer* 112 (4), S. 624–629. DOI: 10.1038/bjc.2014.652.

Hawkins, Nicholas; Norrie, Mark; Cheong, Kay; Mokany, Elisa; Ku, Su-Lyn; Meagher, Alan et al. (2002): CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. In: *Gastroenterology* 122 (5), S. 1376–1387.

Hegewisch-Becker, Susanna; Graeven, Ullrich; Lerchenmüller, Christian A.; Killing, Birgitta; Depenbusch, Reinhard; Steffens, Claus-Christoph et al. (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. In: *The Lancet Oncology* 16 (13), S. 1355–1369. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00042-X.

Heinemann, Volker; Weikersthal, Ludwig Fischer von; Decker, Thomas; Kiani, Alexander; Vehling-Kaiser, Ursula; Al-Batran, Salah-Eddin et al. (2014): FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3). A randomised, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 15 (10), S. 1065–1075. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70330-4.

Herbst, Andreas; Kolligs, Frank T. (2012): Detection of DNA hypermethylation in remote media of patients with colorectal cancer: new biomarkers for colorectal carcinoma. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33 (2), S. 297–305. DOI: 10.1007/s13277-012-0346-y.

Herbst, Andreas; Rahmig, Konstanze; Stieber, Petra; Philipp, Alexander; Jung, Andreas; Ofner, Andrea et al. (2011): Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. In: *The American journal of gastroenterology* 106 (6), S. 1110–1118. DOI: 10.1038/ajg.2011.6.

Herbst, Andreas; Vdovin, Nikolay; Gacesa, Sanja; Philipp, Alexander; Nagel, Dorothea; Holdt, Lesca M. et al. (2017): Methylated free-circulating HPP1 DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer. In: *International journal of cancer*. DOI: 10.1002/ijc.30625.

Herbst, Andreas; Wallner, Maike; Rahmig, Konstanze; Stieber, Petra; Crispin, Alexander; Lamerz, Rolf; Kolligs, Frank T. (2009): Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 21 (5), S. 565–569. DOI: 10.1097/MEG.0b013e328318ecf2.

Herold, Gerd (Hg.) (2016): Innere Medizin 2016. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverlag.

Hinoue, Toshinori; Weisenberger, Daniel J.; Lange, Christopher P. E.; Shen, Hui; Byun, Hyang-Min; van den Berg, David et al. (2012): Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. In: *Genome research* 22 (2), S. 271–282. DOI: 10.1101/gr.117523.110.

Hinoue, Toshinori; Weisenberger, Daniel J.; Pan, Fei; Campan, Mihaela; Kim, Myungjin; Young, Joanne et al. (2009): Analysis of the association between CIMP and

BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling. In: *PloS one* 4 (12), e8357. DOI: 10.1371/journal.pone.0008357.

Huang, Suyun; Bucana, Corazon D.; van Arsdall, Melissa; Fidler, Isaiah J. (2002): Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. In: *Oncogene* 21 (16), S. 2504–2512. DOI: 10.1038/sj.onc.1205341.

Hurwitz, Herbert; Fehrenbacher, Louis; Novotny, William; Cartwright, Thomas; Hainsworth, John; Heim, William et al. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 350 (23), S. 2335–2342. DOI: 10.1056/NEJMoa032691.

Ilié, Marius; Hofman, Paul (2016): Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? In: *Translational Lung Cancer Research* 5 (4), S. 420–423. DOI: 10.21037/tlcr.2016.08.06.

Ionov, Y.; Peinado, M. A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M. (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. In: *Nature* 363 (6429), S. 558–561. DOI: 10.1038/363558a0.

Issa, J. P.; Ottaviano, Y. L.; Celano, P.; Hamilton, S. R.; Davidson, N. E.; Baylin, S. B. (1994): Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. In: *Nature genetics* 7 (4), S. 536–540. DOI: 10.1038/ng0894-536.

Issa, Jean-Pierre (2008): Colon cancer: it's CIN or CIMP. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (19), S. 5939–5940. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1596.

Jablonka, Eva; Lamb, Marion J. (2002): The changing concept of epigenetics. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 981, S. 82–96.

Jaenisch, Rudolf; Bird, Adrian (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. In: *Nature genetics* 33 Suppl, S. 245–254. DOI: 10.1038/ng1089.

Jasperson, Kory W.; Tuohy, Therese M.; Neklason, Deborah W.; Burt, Randall W. (2010): Hereditary and familial colon cancer. In: *Gastroenterology* 138 (6), S. 2044–2058. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.

- Jass, J. R. (2007): Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. In: *Histopathology* 50 (1), S. 113–130. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x.
- Jass, Jeremy R.; Whitehall, Vicki L. J.; Young, Joanne; Leggett, Barbara A. (2002): Emerging concepts in colorectal neoplasia. In: *Gastroenterology* 123 (3), S. 862–876.
- Jo, Won-Seok; Carethers, John M. (2006): Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer<sup>1</sup>. In: *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2 (1-2), S. 51–60.
- Jones, Peter A.; Baylin, Stephen B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. In: *Nature reviews. Genetics* 3 (6), S. 415–428. DOI: 10.1038/nrg816.
- Jover, Rodrigo; Zapater, Pedro; Castells, Antoni; Llor, Xavier; Andreu, Montserrat; Cubiella, Joaquín et al. (2009): The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45 (3), S. 365–373. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.07.016.
- Jung, Andreas; Kirchner, Thomas (2018): Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. In: *Deutsches Arzteblatt international* 115 (10), S. 169–174. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0169.
- Kambara, T.; Simms, L. A.; Whitehall, V. L. J.; Spring, K. J.; Wynter, C. V. A.; Walsh, M. D. et al. (2004): BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. In: *Gut* 53 (8), S. 1137–1144. DOI: 10.1136/gut.2003.037671.
- Karthaus, Meinolf; Hofheinz, Ralf-Dieter; Mineur, Laurent; Letocha, Henry; Greil, Richard; Thaler, Josef et al. (2016): Impact of tumour RAS/BRAF status in a first-line study of panitumumab + FOLFIRI in patients with metastatic colorectal cancer. In: *British journal of cancer* 115 (10), S. 1215–1222. DOI: 10.1038/bjc.2016.343.
- Kjersem, J. B.; Ikdahl, T.; Lingjaerde, O. C.; Guren, T.; Tveit, K. M.; Kure, E. H. (2014): Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment. In: *Molecular oncology* 8 (1), S. 59–67. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.09.001.
- Knudson, A. G. (1993): Antioncogenes and human cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (23), S. 10914–10921.

- Krebs - Darmkrebs (2017). Online verfügbar unter [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html), zuletzt aktualisiert am 09.02.2017, zuletzt geprüft am 09.02.2017.
- Lamb, Yvette N.; Dhillon, Sohita (2017): Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. In: *Molecular diagnosis & therapy* 21 (2), S. 225–232. DOI: 10.1007/s40291-017-0259-y.
- LANE, DP. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. In: *Nature* 358, S. 15–16.
- Le, Dung T.; Uram, Jennifer N.; Wang, Hao; Bartlett, Bjarne R.; Kemberling, Holly; Eyring, Aleksandra D. et al. (2015): PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. In: *The New England journal of medicine* 372 (26), S. 2509–2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596.
- Le Voyer, T. E.; Sigurdson, E. R.; Hanlon, A. L.; Mayer, R. J.; Macdonald, J. S.; Catalano, P. J.; Haller, D. G. (2003): Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (15), S. 2912–2919. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.062.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 -Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021 -007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 18.02.2017], zuletzt geprüft am 18.02.2017.
- Leung, Wai K.; To, Ka-Fai; Man, Ellen P. S.; Chan, Michael W. Y.; Bai, Alfa H. C.; Hui, Aric J. et al. (2005): Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. In: *The American journal of gastroenterology* 100 (10), S. 2274–2279. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.50412.x.
- Lichtenstein, P.; Holm, N. V.; Verkasalo, P. K.; Iliadou, A.; Kaprio, J.; Koskenvuo, M. et al. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. In: *The New England journal of medicine* 343 (2), S. 78–85. DOI: 10.1056/NEJM200007133430201.
- Lievre, A.; Merlin, J. L.; Laurent-Puig, P.; Artru, P.; Seronde, A.; Gicquel, C. et al. (2015): 420 Flash RAS study: RAS testing assessment in patients with metastatic colorectal cancer in 2014. In: *European Journal of Cancer* 51, S85. DOI: 10.1016/S0959-8049(16)30254-4.

Lievre, Astrid; Bachet, Jean-Baptiste; Boige, Valerie; Cayre, Anne; Le Corre, Delphine; Buc, Emmanuel et al. (2008): KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (3), S. 374–379. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.5906.

Lievre, Astrid; Bachet, Jean-Baptiste; Le Corre, Delphine; Boige, Valerie; Landi, Bruno; Emile, Jean-Francois et al. (2006): KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. In: *Cancer research* 66 (8), S. 3992–3995. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191.

Lochhead, Paul; Kuchiba, Aya; Imamura, Yu; Liao, Xiaoyun; Yamauchi, Mai; Nishihara, Reiko et al. (2013): Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication. In: *Journal of the National Cancer Institute* 105 (15), S. 1151–1156. DOI: 10.1093/jnci/djt173.

Lofton-Day, Catherine; Model, Fabian; Devos, Theo; Tetzner, Reimo; Distler, Juergen; Schuster, Matthias et al. (2008): DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. In: *Clinical chemistry* 54 (2), S. 414–423. DOI: 10.1373/clinchem.2007.095992.

machmabunt® Munzinger & Jaecklin GbR: Epi proColon® 2.0 CE: Die 2- Generation des Septin9-Tests. Online verfügbar unter [http://www.epiprocolon.com/fileadmin/site\\_files/02\\_epi\\_procolon/02\\_medical-professionals/PDF/MKT\\_0014\\_Darmkrebs\\_Frueherkennung\\_DE\\_rev4.pdf](http://www.epiprocolon.com/fileadmin/site_files/02_epi_procolon/02_medical-professionals/PDF/MKT_0014_Darmkrebs_Frueherkennung_DE_rev4.pdf), zuletzt geprüft am 01.03.2017.

Malesci, Alberto; Laghi, Luigi; Bianchi, Paolo; Delconte, Gabriele; Randolph, Ann; Torri, Valter et al. (2007): Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (13), S. 3831–3839. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0366.

Malka, D.; Boige, V.; Jacques, N.; Vimond, N.; Adenis, A.; Boucher, E. et al. (2012): Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (4), S. 919–927. DOI: 10.1093/annonc/mdr365.

- Matsusaka, Satoshi; Suenaga, Mitsukuni; Mishima, Yuji; Takagi, Koichi; Terui, Yasuhito; Mizunuma, Nobuyuki; Hatake, Kiyohiko (2011): Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 68 (3), S. 763–768. DOI: 10.1007/s00280-010-1543-2.
- McInnes, Tyler; Zou, Donghui; Rao, Dasari S.; Munro, Francesca M.; Phillips, Vicky L.; McCall, John L. et al. (2017): Genome-wide methylation analysis identifies a core set of hypermethylated genes in CIMP-H colorectal cancer. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 228. DOI: 10.1186/s12885-017-3226-4.
- Mino-Kenudson, Mari (2016): Cons: Can liquid biopsy replace tissue biopsy?—the US experience. In: *Translational Lung Cancer Research* 5 (4), S. 424–427. DOI: 10.21037/tlcr.2016.08.01.
- Moertel, Charles G. (1993): An Evaluation of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test for Monitoring Patients With Resected Colon Cancer. In: *JAMA* 270 (8), S. 943. DOI: 10.1001/jama.1993.03510080047030.
- Moinova, Helen R.; Chen, Wei-Dong; Shen, Lanlan; Smiraglia, Dominic; Olechnowicz, Joseph; Ravi, Lakshmeswari et al. (2002): HLTF gene silencing in human colon cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7), S. 4562–4567. DOI: 10.1073/pnas.062459899.
- Muchardt, C.; Yaniv, M. (1999): ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. In: *Journal of Molecular Biology* 293 (2), S. 187–198. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2999.
- Nakayama, Izuma; Shinozaki, Eiji; Matsushima, Tomohiro; Wakatsuki, Takeru; Ogura, Mariko; Ichimura, Takashi et al. (2017): Retrospective study of RAS/PIK3CA/BRAF tumor mutations as predictors of response to first-line chemotherapy with bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 38. DOI: 10.1186/s12885-016-2994-6.
- Ogino, Shuji; Kawasaki, Takako; Brahmandam, Mohan; Cantor, Mami; Kirkner, Gregory J.; Spiegelman, Donna et al. (2006a): Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 8 (2), S. 209–217. DOI: 10.2353/jmoldx.2006.050135.

Ogino, Shuji; Kawasaki, Takako; Kirkner, Gregory J.; Kraft, Peter; Loda, Massimo; Fuchs, Charles S. (2007): Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 9 (3), S. 305–314. DOI: 10.2353/jmoldx.2007.060170.

Ogino, Shuji; Kawasaki, Takako; Kirkner, Gregory J.; Loda, Massimo; Fuchs, Charles S. (2006b): CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 8 (5), S. 582–588. DOI: 10.2353/jmoldx.2006.060082.

Ogino, Shuji; Nosho, Katsuhiko; Irahara, Natsumi; Shima, Kaori; Baba, Yoshifumi; Kirkner, Gregory J. et al. (2009a): Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (27), S. 4591–4598. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.8858.

Ogino, Shuji; Nosho, Katsuhiko; Kirkner, Gregory J.; Kawasaki, Takako; Meyerhardt, Jeffrey A.; Loda, Massimo et al. (2009b): CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. In: *Gut* 58 (1), S. 90–96. DOI: 10.1136/gut.2008.155473.

Ogino, Shuji; Odze, Robert D.; Kawasaki, Takako; Brahmandam, Mohan; Kirkner, Gregory J.; Laird, Peter W. et al. (2006c): Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. In: *The American journal of surgical pathology* 30 (9), S. 1175–1183. DOI: 10.1097/01.pas.0000213266.84725.d0.

Ohtani, H.; Tamamori, Y.; Arimoto, Y.; Nishiguchi, Y.; Maeda, K.; Hirakawa, K. (2011): A meta-analysis of the short- and long-term results of randomized controlled trials that compared laparoscopy-assisted and conventional open surgery for colorectal cancer. In: *Journal of Cancer* 2, S. 425–434.

Panageas, Katherine S.; Schrag, Deborah; Riedel, Elyn; Bach, Peter B.; Begg, Colin B. (2003): The effect of clustering of outcomes on the association of procedure volume and surgical outcomes. In: *Annals of internal medicine* 139 (8), S. 658–665.

Pantel, Klaus; Alix-Panabières, Catherine (2019): Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 16 (7), S. 409–424. DOI: 10.1038/s41571-019-0187-3.

- Park, Y. J.; Youk, E. G.; Choi, H. S.; Han, S. U.; Park, K. J.; Lee, K. U. et al. (1999): Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors. In: *International journal of colorectal disease* 14 (2), S. 101–106.
- Pazin, Michael J.; Kadonaga, James T. (1997): SWI2/SNF2 and Related Proteins. ATP-Driven Motors That Disrupt-Protein–DNA Interactions? In: *Cell* 88 (6), S. 737–740. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81918-2.
- Pentheroudakis, George; Kotoula, Vassiliki; Roock, Wendy de; Kouvatses, George; Papakostas, Pavlos; Makatsoris, Thomas et al. (2013): Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. In: *BMC cancer* 13, S. 49. DOI: 10.1186/1471-2407-13-49.
- Philipp, A. B.; Stieber, P.; Nagel, D.; Neumann, J.; Spelsberg, F.; Jung, A. et al. (2012): Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer. In: *International journal of cancer* 131 (10), S. 2308–2319. DOI: 10.1002/ijc.27505.
- Philipp, Alexander B.; Nagel, Dorothea; Stieber, Petra; Lamerz, Rolf; Thalhammer, Isabel; Herbst, Andreas; Kolligs, Frank T. (2014): Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer. In: *BMC cancer* 14, S. 245. DOI: 10.1186/1471-2407-14-245.
- Postow, Michael A.; Callahan, Margaret K.; Wolchok, Jedd D. (2015): Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (17), S. 1974–1982. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358.
- Prandi, Mario; Lionetto, Rita; Bini, Antonio; Francioni, Gianfranco; Accarpio, Giuseppe; Anfossi, Antonio et al. (2002): Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. In: *Annals of surgery* 235 (4), S. 458–463.
- Presta, Leonard G.; Chen, Helen; O'Connor, Shane J.; Chisholm, Vanessa; Meng, Y. Gloria; Krummen, Lynne et al. (1997): Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders. In: *Cancer Res* 57 (20), S. 4593–4599. Online verfügbar unter <http://cancer-res.aacrjournals.org/content/canres/57/20/4593.full.pdf>.

Roock, W. de; Piessevaux, H.; Schutter, J. de; Janssens, M.; Hertogh, G. de; Perso-  
neni, N. et al. (2008): KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early  
radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. In: *Annals  
of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 19 (3), S.  
508–515. DOI: 10.1093/annonc/mdm496.

Roth, Arnaud D.; Delorenzi, Mauro; Tejpar, Sabine; Yan, Pu; Klingbiel, Dirk; Fiocca,  
Roberto et al. (2012): Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors  
in stage II/III colon cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 104 (21), S.  
1635–1646. DOI: 10.1093/jnci/djs427.

Saltz, Leonard B.; Clarke, Stephen; Diaz-Rubio, Eduardo; Scheithauer, Werner; Figer,  
Arie; Wong, Ralph et al. (2008): Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based  
chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase  
III study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of  
Clinical Oncology* 26 (12), S. 2013–2019. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9930.

Sanchez-Vega, Francisco; Gotea, Valer; Margolin, Gennady; Elnitski, Laura (2015):  
Pan-cancer stratification of solid human epithelial tumors and cancer cell lines reveals  
commonalities and tissue-specific features of the CpG island methylator phenotype.  
In: *Epigenetics & chromatin* 8, S. 14. DOI: 10.1186/s13072-015-0007-7.

Sandoval, Juan; Heyn, Holger; Moran, Sebastian; Serra-Musach, Jordi; Pujana, Miguel  
A.; Bibikova, Marina; Esteller, Manel (2011): Validation of a DNA methylation microar-  
ray for 450,000 CpG sites in the human genome. In: *Epigenetics* 6 (6), S. 692–702.

Sauer, Rolf; Becker, Heinz; Hohenberger, Werner; Rodel, Claus; Wittekind, Christian;  
Fietkau, Rainer et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy  
for rectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 351 (17), S. 1731–1740.  
DOI: 10.1056/NEJMoa040694.

Sauer, Rolf; Liersch, Torsten; Merkel, Susanne; Fietkau, Rainer; Hohenberger, Wer-  
ner; Hess, Clemens et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiother-  
apy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 ran-  
domized phase III trial after a median follow-up of 11 years. In: *Journal of clinical on-  
cology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (16), S. 1926–  
1933. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.1836.

Schwarzenbach, Heidi; Hoon, Dave S. B.; Pantel, Klaus (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (6), S. 426–437. DOI: 10.1038/nrc3066.

SEPT9 septin 9 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10801>, zuletzt geprüft am 01.03.2017.

Sharma, Manish R.; Maitland, Michael L.; Ratain, Mark J. (2012): RECIST: no longer the sharpest tool in the oncology clinical trials toolbox---point. In: *Cancer research* 72 (20), 5145-9; discussion 5150. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0058.

Simkens, L. H. J.; Tol, J.; Terstappen, L. W. M. M.; Teerenstra, S.; Punt, C. J. A.; Nagtegaal, I. D. (2010): The predictive and prognostic value of circulating endothelial cells in advanced colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy and bevacizumab. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 21 (12), S. 2447–2448. DOI: 10.1093/annonc/mdq640.

Singal, R.; Ginder, G. D. (1999): DNA methylation. In: *Blood* 93 (12), S. 4059–4070.

Sorbye, Halfdan; Dahl, Olav (2003): Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: implications for tumor marker monitoring and guidelines. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (23), S. 4466–4467. DOI: 10.1200/JCO.2003.99.200.

Stintzing, Sebastian; Modest, Dominik P.; Rossius, Lisa; Lerch, Markus M.; Weikersthal, Ludwig Fischer von; Decker, Thomas et al. (2016): FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 17 (10), S. 1426–1434. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30269-8.

Suzuki, Hiromu; Igarashi, Shinichi; Nojima, Masanori; Maruyama, Reo; Yamamoto, Eiichiro; Kai, Masahiro et al. (2010): IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. In: *Carcinogenesis* 31 (3), S. 342–349. DOI: 10.1093/carcin/bgp179.

Swaminathan, R.; Butt, Asif N. (2006): Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075, S. 1–9. DOI: 10.1196/annals.1368.001.

Tabernero, J.; Hozak, R. R.; Yoshino, T.; Cohn, A. L.; Obermannova, R.; Bodoky, G. et al. (2017): Analysis of Angiogenesis Biomarkers for Ramucirumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer from RAISE, a Global, Randomized, Double-Blind, Phase III Study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. DOI: 10.1093/annonc/mdx767.

Tahover, Esther; Uziely, Beatrice; Salah, Azzam; Temper, Mark; Peretz, Tamar; Hubert, Ayala (2013): Hypertension as a predictive biomarker in bevacizumab treatment for colorectal cancer patients. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 30 (1), S. 327. DOI: 10.1007/s12032-012-0327-4.

Tebbutt, Niall C.; Wilson, Kate; GebSKI, Val J.; Cummins, Michelle M.; Zannino, Diana; van Hazel, Guy A. et al. (2010): Capecitabine, bevacizumab, and mitomycin in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the Australasian Gastrointestinal Trials Group Randomized Phase III MAX Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (19), S. 3191–3198. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.7723.

Thibodeau, S. N.; Bren, G.; Schaid, D. (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5109), S. 816–819.

Thirunavukarasu, Pragatheeshwar; Sukumar, Shyamsunder; Sathaiah, Magesh; Mahan, Meredith; Pragatheeshwar, Kothai Divya; Pingpank, James F. et al. (2011): C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. In: *Journal of the National Cancer Institute* 103 (8), S. 689–697. DOI: 10.1093/jnci/djr078.

Tie, J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Wong, H. L.; Roebert, J.; Christie, M. et al. (2015): Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (8), S. 1715–1722. DOI: 10.1093/annonc/mdv177.

Toth, Kinga; Sipos, Ferenc; Kalmar, Alexandra; Patai, Arpad V.; Wichmann, Barnabas; Stoehr, Robert et al. (2012): Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. In: *PloS one* 7 (9), e46000. DOI: 10.1371/journal.pone.0046000.

Tournigand, Christophe; Andre, Thierry; Bonnetain, Franck; Chibaudel, Benoist; Lledo, Gerard; Hickish, Tamas et al. (2012): Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin

in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (27), S. 3353–3360. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.5645.

Toyota, M.; Ahuja, N.; Ohe-Toyota, M.; Herman, J. G.; Baylin, S. B.; Issa, J.-P. J. (1999): CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (15), S. 8681–8686. DOI: 10.1073/pnas.96.15.8681.

van Cutsem, Eric; Köhne, Claus-Henning; Hitre, Erika; Zaluski, Jerzy; Chang Chien, Chung-Rong; Makhson, Anatoly et al. (2009): Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. In: *N Engl J Med* 360 (14), S. 1408–1417. DOI: 10.1056/NEJMoa0805019.

van Engeland, Manon; Derks, Sarah; Smits, Kim M.; Meijer, Gerrit A.; Herman, James G. (2011): Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (10), S. 1382–1391. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.2319.

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

Venook, Alan P.; Niedzwiecki, Donna; Lenz, Heinz-Josef; Innocenti, Federico; Fruth, Briant; Meyerhardt, Jeffrey A. et al. (2017): Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 317 (23), S. 2392–2401. DOI: 10.1001/jama.2017.7105.

Vidal, J.; Muínelo, L.; Dalmases, A.; Jones, F.; Edelstein, D.; Iglesias, M. et al. (2017): Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (6), S. 1325–1332. DOI: 10.1093/annonc/mdx125.

Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M. et al. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. In: *The New*

*England journal of medicine* 319 (9), S. 525–532. DOI: 10.1056/NEJM198809013190901.

Volik, Stanislav; Alcaide, Miguel; Morin, Ryan D.; Collins, Colin (2016): Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. In: *Molecular cancer research : MCR* 14 (10), S. 898–908. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0044.

WADDINGTON, C. H. (2015): STRATEGY OF THE GENES. [Place of publication not identified]: TAYLOR & FRANCIS.

Wallner, Maike; Herbst, Andreas; Behrens, Andrea; Crispin, Alexander; Stieber, Petra; Goke, Burkhard et al. (2006a): Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (24), S. 7347–7352. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1264.

Wallner, Maike; Herbst, Andreas; Behrens, Andrea; Crispin, Alexander; Stieber, Petra; Goke, Burkhard et al. (2006b): Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (24), S. 7347–7352. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1264.

Wang, Chun-Li; Qu, Gang; Xu, Hong-Wei (2014): The short- and long-term outcomes of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer: a meta-analysis. In: *International journal of colorectal disease* 29 (3), S. 309–320. DOI: 10.1007/s00384-013-1827-1.

Wang, W. S.; Chen, P. M.; Chiou, T. J.; Liu, J. H.; Fan, F. S.; Lin, T. C. et al. (2000): Factors predictive of survival in patients with node-positive colorectal cancer in Taiwan. In: *Hepato-gastroenterology* 47 (36), S. 1590–1594.

Warren, Jorja D.; Xiong, Wei; Bunker, Ashley M.; Vaughn, Cecily P.; Furtado, Larissa V.; Roberts, William L. et al. (2011): Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. In: *BMC medicine* 9, S. 133. DOI: 10.1186/1741-7015-9-133.

Watanabe, T.; Wu, T. T.; Catalano, P. J.; Ueki, T.; Satriano, R.; Haller, D. G. et al. (2001): Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer.

In: *The New England journal of medicine* 344 (16), S. 1196–1206. DOI: 10.1056/NEJM200104193441603.

Weber, J. L.; May, P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. In: *American Journal of Human Genetics* 44 (3), S. 388–396.

Weiner, Alan M. (2002): SINEs and LINEs. The art of biting the hand that feeds you. In: *Current Opinion in Cell Biology* 14 (3), S. 343–350. DOI: 10.1016/S0955-0674(02)00338-1.

Weisenberger, Daniel J.; Campan, Mihaela; Long, Tiffany I.; Kim, Myungjin; Woods, Christian; Fiala, Emerich et al. (2005): Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. In: *Nucleic acids research* 33 (21), S. 6823–6836. DOI: 10.1093/nar/gki987.

Weisenberger, Daniel J.; Siegmund, Kimberly D.; Campan, Mihaela; Young, Joanne; Long, Tiffany I.; Faasse, Mark A. et al. (2006): CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. In: *Nature genetics* 38 (7), S. 787–793. DOI: 10.1038/ng1834.

Yagi, Koichi; Akagi, Kiwamu; Hayashi, Hiroshi; Nagae, Genta; Tsuji, Shingo; Isagawa, Takayuki et al. (2010): Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (1), S. 21–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2006.

Young, J.; Biden, K. G.; Simms, L. A.; Huggard, P.; Karamatic, R.; Eyre, H. J. et al. (2001): HPP1. A transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (1), S. 265–270. DOI: 10.1073/pnas.98.1.265.

Yuste, Ana L.; Aparicio, Jorge; Segura, Angel; Lopez-Tendero, Pedro; Girones, Regina; Perez-Fidalgo, Jose A. et al. (2003): Analysis of clinical prognostic factors for survival and time to progression in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. In: *Clinical colorectal cancer* 2 (4), S. 231–234. DOI: 10.3816/CCC.2003.n.004.

Zhang, Ben Y.; Jones, Jeremy C.; Briggler, Andrew M.; Hubbard, Joleen M.; Kipp, Benjamin R.; Sargent, Daniel J. et al. (2017): Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. In: *Clinical colorectal cancer* 16 (2), S. 124–128. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.09.003.

Zhang, Jian; Zhang, Kejun; Bi, Meisheng; Jiao, Xuelong; Zhang, Dianliang; Dong, Qian (2014): Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. In: *Anti-cancer drugs* 25 (3), S. 346–352. DOI: 10.1097/CAD.000000000000049.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Ausarbeitung dieser Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Kolligs herzlich bedanken, der es mir ermöglichte, diese Dissertation mit der sehr interessanten Thematik in seiner Arbeitsgruppe zu erstellen und mir stets mit seiner herausragenden fachlichen Kompetenz beratend zur Seite stand und mir immer neue Impulse geben konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn PD Dr. Andreas Herbst, für die sehr gute Betreuung bei der experimentellen Durchführung dieser Doktorarbeit, seine zahlreichen Hilfestellungen und das Engagement bei der späteren Ausarbeitung, sowie für seine große Geduld über den gesamten Zeitraum. Wann immer Fragen oder Probleme auftraten, konnte ich mich stets auf seine rettende Antwort verlassen und auf seine umfangreiche wissenschaftliche Expertise bauen. Auch aus so manch kreativer Pause konnte er mich immer wieder motivieren.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Andrea und Max und der gesamten AG Kolligs für das humorvolle Miteinander und die stets sehr unterhaltsame und angenehme Atmosphäre im Labor und die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche. Vielen Dank an meine Mitdoktoranden Nikolay Vdovin und Sanja Gacesa für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls herzlichst bei Frau Dr. Dorothea Nagel für die große Unterstützung bei der graphischen Aufbereitung und statistischen Auswertung der Daten und die kompetente Hilfe bei Fragen und Problemen.

Zuletzt gilt mein außerordentlicher Dank meinen Eltern und meiner Schwester Anja für die uneingeschränkte Unterstützung und ständige Motivation. Sie standen mir nicht nur bei dieser Dissertation, sondern all die Jahre meines Studiums mit Rat und Tat zur Seite.

Von Herzen danken möchte ich auch meinen Freund Norman, auf dessen Verständnis, Hilfsbereitschaft und liebevolle Art stets Verlass war.

**Lebenslauf**

---

---



**Publikationen**

In Bearbeitung

**Eidesstattliche Versicherung**

Klein Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema

Prognostische und therapeutische Rolle molekularer Biomarker im Plasma von  
Patienten mit kolorektalem Karzinom

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, 30.01.2020

Ort, Datum

Katharina Klein

Name