

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Bedeutung der Metastasierungstendenz und der perioperativen Morbidität
in der onkologischen Viszeralchirurgie**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. med. Elise Bettine Pretzsch
(2023)

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Fachmentorat	Prof. Dr. med. Jens Werner Prof. Dr. med. Martin Angele Prof. D. med. Jens Neumann
Gutachter	Prof. Dr. med. Jörg Kleeff Prof. Dr. med. Jürgen Weitz
Dekan	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag des Fakultätskolloquiums	08.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Teilprojekte und Signifikanz	9
2a Pretzsch*, Lampert* et al., Pathology Research and Practice, 2022 [38]	10
2b Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2022 [50]	10
2c Pretzsch et al., Cancers, 2022 (accepted, in press) [55]	13
2d Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022 [57]	15
2e Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2021 [78]	21
2f Pretzsch et al., BMC Surgery, 2021 [86]	22
2g Pretzsch et al., British Journal of Surgery Open, 2022 (in press)	25
3. Zusammenfassung	29
4. Literatur	31

1. Einleitung

Die Ausbildung von Metastasen ist die häufigste Todesursache bei Patient*innen mit vorliegender Tumorerkrankung [1],[2]. Circa 20% der Patient*innen mit kolorektalem Karzinom (KRK) weisen bereits bei Erstdiagnose synchrone Lebermetastasen auf und bis zu 50% entwickeln Fernmetastasen im weiteren Krankheitsverlauf, wobei hier die Leber am häufigsten im Sinne einer metachronen Metastasierung betroffen ist [1],[3],[4],[5],[6]. Trotz signifikanter Fortschritte in der Entwicklung und Anwendung lokaler sowie systemischer Therapieverfahren, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patient*innen mit metastasiertem KRK (mKRK) immer noch bei nur 14-17% [7]. Dank erweiterter diagnostischer Verfahren einschließlich molekulargenetischer Testung aus Blut- und Gewebeproben (z.B. zirkulierende Tumor-DNA, *next generation sequencing* (NGS) aus reseziertem Tumorgewebe), mit dem Ziel die individuelle Tumorbiologie zu berücksichtigen und intra- und intertumorale Heterogenität abzubilden (Präzisionsonkologie), gelingt es, die Behandlung des mKRK zunehmend zu personalisieren [8]. Die Empfehlungen der aktuell gültigen nationalen (deutsche S3-Leitlinie, NCCN) und internationalen (ESMO, ESMO-Asia) Leitlinien im Sinne eines personalisierten Therapieansatzes sind limitiert auf die Untersuchung des Mikrosatellitenstatus sowie die Analyse des RAS (*rat sarcoma oncogene*) und B-RAF Status [9],[10],[11],[12]. Die Identifikation neuer Biomarker bietet das Potential, diese nicht nur als Zielstruktur für neue Therapieansätze zu verwenden, sondern könnte auch eine noch präzisere Risikostratifizierung und Vorhersage der Prognose sowie tumorbiologisch assoziierter Metastasierungsmuster ermöglichen. Diese Informationen sind aus mechanistischer Sicht aber auch für die klinische Translation von großem Interesse und ermöglichen eine Definition risikostratifizierter Subgruppen für klinische Studien. Zudem könnten sie die Entscheidung über die Sequenz von multimodalen Therapien erleichtern und so mittelfristig die Therapieeffizienz (unter Wahrung der Ökonomie und Vermeidung unnötiger Nebenwirkungen) steigern.

Pretzsch et al., Journal of Oncology 2019 [13]

Die der Metastasierung zugrundeliegenden Mechanismen sind schematisch in dem Konzept der Invasions-Metastasierungs-Kaskade zusammengefasst, ein aus fünf Stufen bestehender Prozess: (1) lokale Invasion der Tumorzellen in die umgebende Matrix, (2) Eintritt in das Gefäßsystem, (3) systemische Ausbreitung, (4) Austritt aus dem Gefäßsystem, (5) Kolonisation des Zielorgans und Ausbildung makroskopisch sichtbarer Metastasen [13] (Abbildung 1).

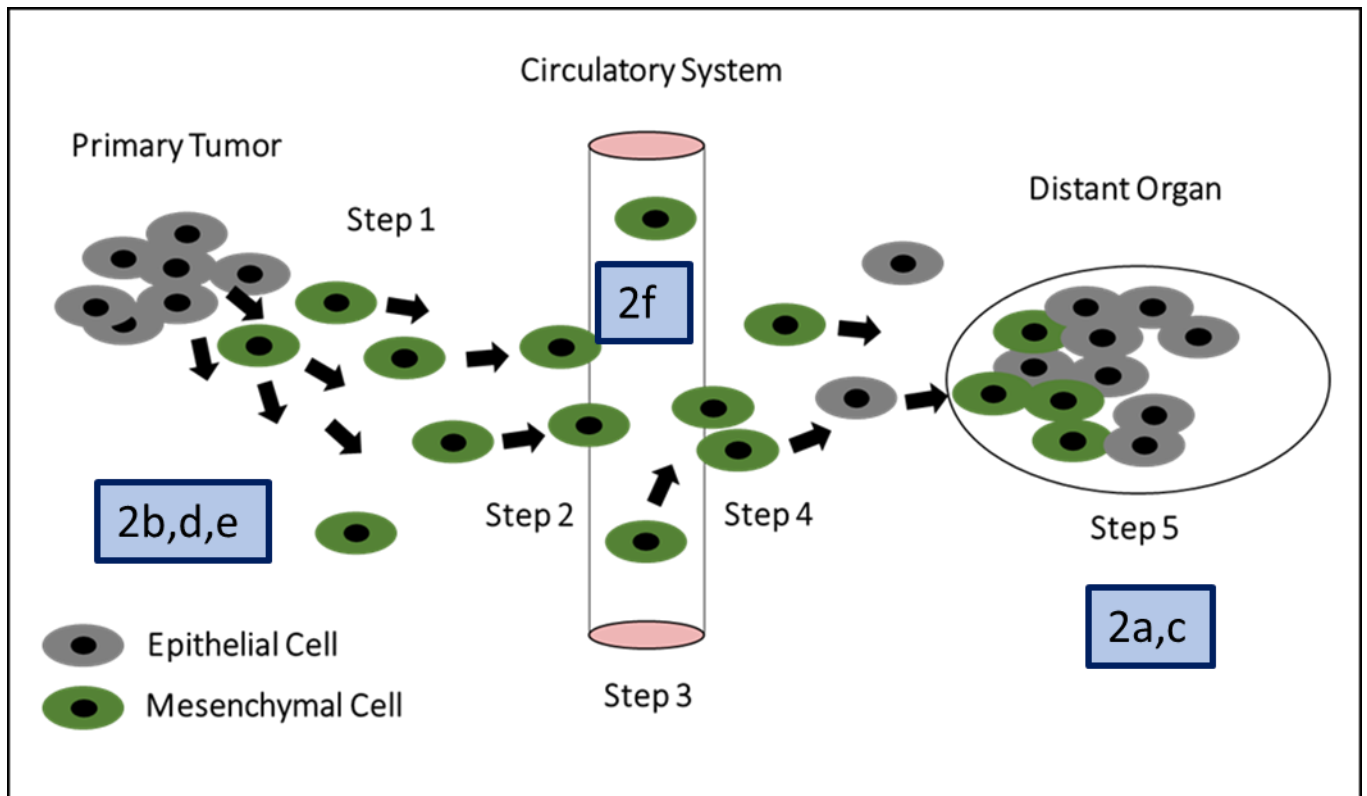


Abbildung 1 (adaptiert nach Pretzsch et al., Journal of Oncology, 2019). Invasions-Metastasierung-Kaskade. Lokale Invasion der KRK Zellen in umgebende Matrix (1), Intravasation (2), systemische Ausbreitung (3), Extravasation (4), Kolonisation des Zielorgans (5) [13]. Ergänzend ist dargestellt (blau markiert mit Bezeichnung der Kapitel dieser Habilitationsschrift) an welcher Stelle die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen in den Prozess der Metastasierung eingreifen.

Grundvoraussetzung für die Metastasierung ist zunächst das Loslösen der Tumorzellen aus dem epithelialen Zellverband des Primärtumors und der Erwerb mesenchymaler Charakteristika, welche essenziell sind für die Zellmotilität und folgende lokale Invasion in die umgebende Matrix. Dieser Prozess wird als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet [14],[15]. E-Cadherin, ein Transmembranprotein, welches von Epithelzellen exprimiert wird [16], gilt für den Erhalt der Zellpolarität und Zusammenhalt der Zellen im epithelialen Zellverband als entscheidend. Im Rahmen der EMT kommt es zu einer *Downregulation* von E-Cadherin, gefolgt von einer *Upregulation* von N-Cadherin, einem Adhäsionsmolekül, welches in nicht-epithelialen Geweben exprimiert wird. Die *Downregulation* von E-Cadherin ist mit einem aggressiven Tumorphänotyp, fortgeschrittenem Tumorstadium, geringer Differenzierung, Lymphknotenmetastasen, und vaskulärer Invasion assoziiert [17]. Dabei erfolgt die *Downregulation* von E-Cadherin über direkt (z.B. SNAIL, ZEB) und indirekt (z.B. TWIST, SOX2) hemmende Transkriptionsfaktoren unter Einbindung aller zentralen tumorzelleintrinsischen Signalwege [18],[19],[20],[21],[22]. Diese umfassen u.a. eine Aktivierung des

WNT Signalwegs, PI3K/AKT Signalwegs und RAS/RAF/MEK/ ERK/MAPK Signalwegs sowie eine Suppression des TGF- β /Smad Signalwegs, welche alle in einer *Downregulation* von E-Cadherin münden. Zusätzlich kann die EMT posttranskriptional und posttranslational über miRNAs reguliert werden, sowie im Rahmen von *Tumorzell-Tumor microenvironment* Interaktionen durch Zytokine getriggert werden [14],[23],[24],[25],[26],[27],[28] (Abbildung 2).

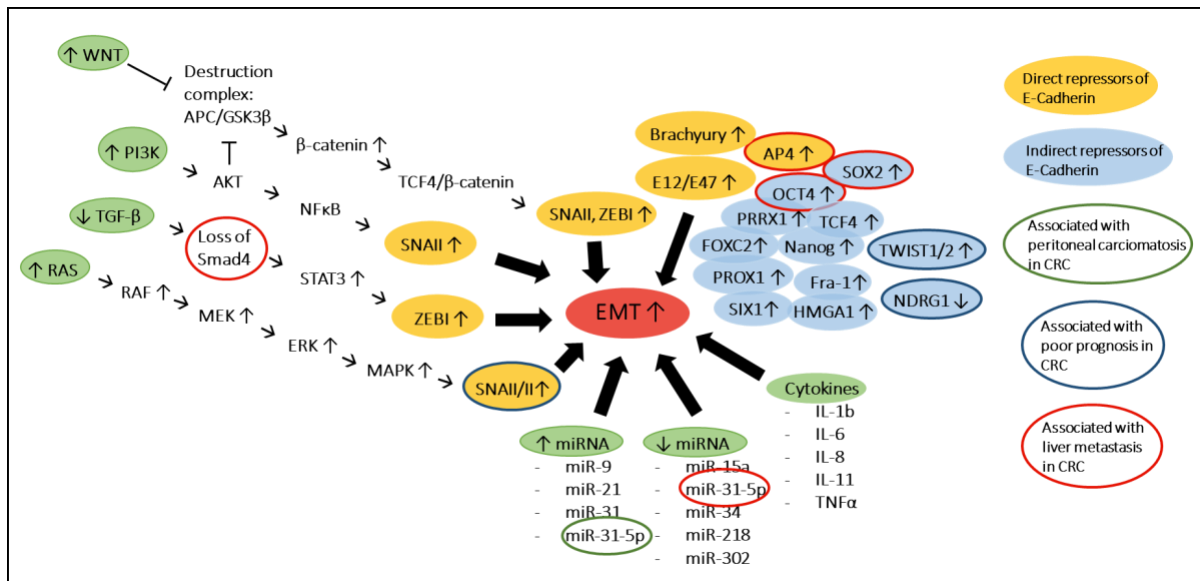


Abbildung 2 (adaptiert nach Pretzsch et al., Journal of Oncology, 2019). Regulation der EMT. Durch Aktivierung des WNT, PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK/ ERK/MAPK Signalwegs sowie Suppression des TGF- β /Smad Signalwegs, welche in einer *Downregulation* von E-Cadherin münden, wird die EMT initiiert. Neben der *Downregulation* von E-Cadherin durch direkte und indirekte Transkriptionsfaktoren, kann die EMT auch auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene durch miRNAs und Zytokine getriggert werden [13].

Kapitel 2a-c dieser kumulativen Habilitationsarbeit beschäftigen sich mit der Bedeutung EMT-assoziierter Gene für die Metastasierung bei soliden gastrointestinalen Tumoren unter besonderer Berücksichtigung des KRK.

Neben der EMT als zentraler Mechanismus für eine erfolgreiche Metastasierung, spielen auch der Tumorstammzell-Phänotyp sowie stammzellassoziierte Marker (z.B. CD133, CD44) eine entscheidende Rolle. Diese haben nicht nur bedeutenden Einfluss auf den Organotropismus (z.B. hepatische versus peritoneale Metastasierung) und die Prognose des KRK, sondern können ebenfalls über eine Aktivierung des WNT Signalwegs die EMT mit beeinflussen und dadurch die Tumorprogression und Metastasierung anregen [29],[30],[31].

In Kapitel 2d-e werden stammzellassoziierte Marker und ihre Relevanz im Hinblick auf die Metastasierung auf mechanistischer Ebene *in vitro* und *in vivo* sowie auf klinischer Ebene untersucht. Entscheidend für die Prognose bei Patient*innen mit vorliegender Tumorerkrankung ist neben der Prävention und Therapie einer vorliegenden Metastasierung die Reduktion der Morbidität im perioperativen Setting. Trotz positiver Effekte einer Resektion des Primärtumors für die Patient*innen können das chirurgische Trauma und physiologische Veränderungen in der perioperativen Phase das onkologische Outcome negativ beeinflussen und die Ausbildung von Metastasen begünstigen [32],[33] (siehe Abbildung 3). Durch die perioperative Immunsuppression mit Unterdrückung der (v.a. zellvermittelten) Immunabwehr können zirkulierende Tumorzellen, d.h. Tumorzellen, die sich vom Primärtumor gelöst haben und den Eingang ins vaskuläre System gefunden haben, nicht mehr effektiv eliminiert werden. Damit stellt die perioperative Phase eine besonders vulnerable Phase dar, welche den weiteren Krankheitsverlauf der Patient*innen entscheidend beeinflusst [34]. Gleichzeitig können pro-metastatische Aspekte therapeutisch angegangen werden und als Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dienen, eine Fragestellung, die in Kapitel 2f näher untersucht wird.

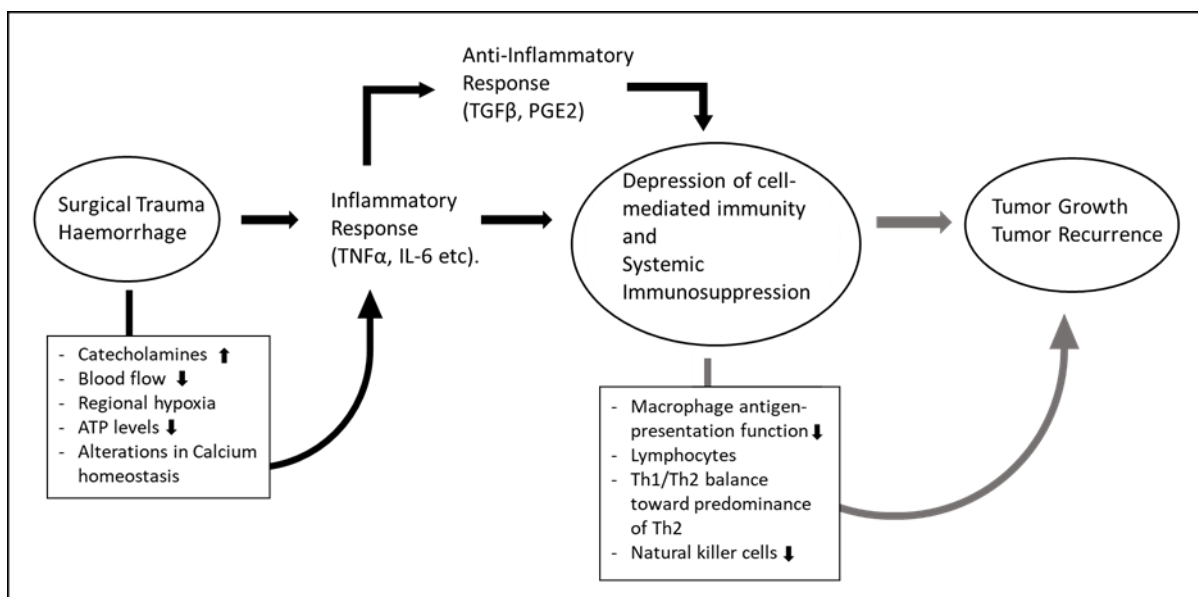


Abbildung 3 (adaptiert nach Pretzsch et al., Shock, 2021). Perioperative Immunaktivierung und Immunsuppression. Auf die postoperative inflammatorische Reaktion folgt gegenregulatorisch eine Suppression des Immunsystems mit Unterdrückung der (v.a. zellvermittelten) Immunität, was in Folge durch die eingeschränkte Elimination maligner Zellen durch das Immunsystem zu vermehrtem Tumorwachstum und der Ausbildung von Metastasen führen kann [32].

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der Metastasierung sowie der perioperativen Morbidität auf das Outcome von Patient*innen mit vorliegender Tumorerkrankung beschäftigt sich das letzte Kapitel (2g) mit der Frage, welche Kriterien den idealen Verlauf nach Operation in der viszeralchirurgischen Onkologie definieren, zusammengefasst unter dem Begriff *Textbook outcome* [35]. Durch den Fortschritt in chirurgischer Technik und perioperativer Versorgung ist die viszeralchirurgische Onkologie zwar sicherer geworden, gleichzeitig findet sich aber auch eine zunehmende Tendenz zur Ausweitung der chirurgischen Therapieindikationen auf Patient*innen mit fortgeschrittener Tumorerkrankung oder Multimorbidität [36],[37]. Unter Berücksichtigung dieser Entwicklungen ist es besonders wichtig, chirurgische Qualität zu messen und eine operative Versorgung sicherzustellen, die den Standards entspricht. Idealerweise lassen hier zum Einsatz kommende Kriterien auch eine Aussage über den weiteren Krankheitsverlauf und das langfristige Outcome zu und können bei Nicht-Erreichen als Ansatzpunkte für mögliche Verbesserungen dienen.

2. Teilprojekte und Signifikanz

Das KRK, das Magenkarzinom und das Pankreaskarzinom sind häufige Tumorentitäten, bei denen die chirurgische Resektion des Tumors im Sinne eines kurativen Verfahrens den Goldstandard darstellt.

Trotz chirurgischer Resektion besteht in vielen Fällen jedoch ein hohes Rezidiv- und Metastasierungsrisiko, welches die Haupttodesursache bei Patient*innen mit Tumorerkrankung darstellt [1],[2]. In der metastasierten Situation ist eine Heilung kaum möglich, sodass erheblicher Forschungsbedarf bei adjuvanten, additiven und palliativen Therapieverfahren besteht. Fortschritte in der molekulargenetischen Testung unter Berücksichtigung der individuellen Tumorbioogie (Präzisionsonkologie) sind vielversprechend bezüglich zielgerichteter Therapieverfahren im Sinne der personalisierten Medizin und könnten zukünftig eine Risikostratifizierung von Patient*innen unter Berücksichtigung der individuellen Prognose zulassen. Ein besseres Verständnis der Mechanismen der Metastasierung und die Identifikation von Faktoren, welche die Tumorigenität sowie folglich die Tumorprogression begünstigen, können dazu beitragen, zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

Neben der Ausbildung von Metastasen wird die Prognose der Patient*innen nach Resektion des Tumors entscheidend durch die perioperative Morbidität beeinflusst. Diese kann direkt und indirekt auf die Metastasierungstendenz Einfluss nehmen, welche das onkologische Ergebnis negativ beeinflusst. Ein möglichst ideales Ergebnis nach Operation spiegelt sich langfristig in einem längeren Überleben wider. In diesem Zusammenhang kommt der Reduktion der perioperativen Morbidität somit eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Arbeiten dieser kumulativen Habilitationsschrift befassen sich mit der Metastasierungstendenz sowie dem Einfluss der perioperativen Morbidität in der viszeralchirurgischen Onkologie. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Bedeutung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) als zentraler Mechanismus für die Metastasierung sowie der Relevanz stammzellassoziierter Marker in Bezug auf die Tumorprogression. Hierzu werden die fünf wichtigsten Arbeiten der Autorin zum Adenokarzinom des Gastrointestinaltrakts aufgeführt, welche das Metastasierungsverhalten in vitro sowie in vivo im Tiermodell, sowie die Bedeutung EMT-assoziierter Gene im metastasierten Stadium in der Kohorte der prospektiv randomisierten FIREIII Studie untersucht haben. Im zweiten Teil wird auf mögliche Strategien zur Reduktion der perioperativen Morbidität eingegangen, mit dem Ziel das onkologische Ergebnis weiter zu verbessern und um das ideale Outcome für Patient*innen zu erreichen.

2a Pretzsch*, Lampert* et al., Pathology Research and Practice, 2022 [38]

Die Lymphknotenmetastasierung beeinflusst entscheidend die Prognose von gastrointestinalen Tumoren (siehe TNM Klassifikation) und trägt zur Therapiestratifizierung bei (siehe Magenkarzinom). Während die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen allgemein als prognostisch ungünstig anerkannt ist, weisen neuere Studien zunehmend auch auf die prognostische Relevanz des Wachstumsmusters der Lymphknotenmetastasen hin. Hierbei stellt das kapselüberschreitende (extrakapsuläre) Wachstum (ECG) im Vergleich zum intrakapsulären Wachstum (ICG) einen prognostisch ungünstigen Marker dar, welcher möglicherweise auf einen aggressiveren Tumorphänotyp hindeutet [39],[40],[41],[42],[43]. So hat das Lymphknotenwachstumsmuster (ICG und ECG) bereits in die UICC Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen des HNO Bereichs und der Vulva Eingang gefunden [44],[45]. Die dem ECG zugrundeliegenden Mechanismen sind bis dato nicht bekannt.

Aufgrund der bestehenden Assoziation der EMT mit einem fortgeschrittenen und aggressiveren Tumorstadium sowie Lymphknotenmetastasen beim Magenkarzinom [46],[47],[48],[49], haben wir die Expression EMT-assoziiierter Gene in Bezug auf das Lymphknotenwachstumsmuster in dieser Tumorentität untersucht. Unser Fokus lag dabei auf der Fragestellung, ob die Hochregulation EMT-assoziiierter Gene im Primärtumor möglicherweise mit einem ECG assoziiert ist. Hierzu bestimmten wir nach RNA-Isolation die Expression von 84 EMT-assoziierten Genen im resezierten Primärtumor bei Patient*innen mit nodalem Befall mittels RT2 Profiler PCR Array und verglichen Patient*innen mit ICG (n=20) und ECG (n=20) in Bezug auf die Genexpression. Insgesamt zeigten sich 14 EMT-assoziierte Gene differenziell, jedoch nicht signifikant unterschiedlich exprimiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein signifikanter Einfluss EMT-assoziiierter Gene auf das Lymphknotenwachstumsmuster unwahrscheinlich ist. In wie weit die Ergebnisse des ECG auf andere Entitäten des Gastrointestinal-Traktes übertragen werden können ist bisher unklar und Ausgangspunkt weiterer Studien.

2b Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2022 [50]

Das Therapieansprechen des Magenkarzinom weist große Unterschiede zwischen Patient*innen auf mit Rezidivraten von 25-40%, was auf die hohe Heterogenität in der Tumorbiologie zurückzuführen ist [51]. Es existieren verschiedene Klassifikationssysteme, welche das Magenkarzinom molekular charakterisieren und tumorbiologischen Subtypen zuordnen, mit dem Ziel, das Therapieansprechen vorherzusagen, gegebenenfalls steuern, und eine Einschätzung zur Prognose gewinnen zu können. Die *Asian Cancer Research Group (ACRG)* hat kürzlich eine Einteilung des Magenkarzinoms nach folgenden prognostisch relevanten Subtypen veröffentlicht: Mikrosatelliteninstabil (MSI),

Mikrosatellitenstabil/EMT-aktiv (MSS/EMT), MSS/Tumorprotein 53 aberrant (MSS/TP53 +) und MSS/TP53 inaktiv (MSS/TP53 -) [52].

Wir haben uns in dieser Arbeit mit zwei Fragestellungen auseinander gesetzt: (1) Nachdem sich in unserer ersten Arbeit kein Zusammenhang zwischen EMT-assoziierten Genen und dem Lymphknotenwachstumsmuster gezeigt hatte [38], beschäftigten wir uns weiter mit der Fragestellung, ob der molekulare Subtyp mit dem Lymphknotenwachstum assoziiert ist und eine Erklärungsgrundlage für das unterschiedliche Wachstumsmuster bietet. (2a) Die molekulare Subtypisierung mittels Genexpressionsanalyse ist ein aufwendiges und teures Verfahren, welches für die klinische Routine ungeeignet ist. Wir setzten uns daher das Ziel, ein Klassifikationssystem zu entwickeln, welches das Magenkarzinom nach ACRG charakterisiert, jedoch unter reiner Verwendung der Immunhistochemie, einem deutlich kostengünstigeren und weniger aufwendigem Verfahren. (2b) Neben gängigen und bereits etablierten immunhistochemischen Methoden zur Evaluation des Mikrosatellitenstatus (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 als Surrogatmarker) sowie der p53 Expression (Färbung von p53 und Bestimmung des prozentualen Anteils gefärbter Zellen), bestimmten wir das *Tumor Budding* als morphologisches Korrelat zur EMT mit dem Ziel die Gruppe MSS/EMT-aktiv von den Gruppen MSS/EMT-nicht aktiv zu differenzieren. *Tumor buds* sind definiert als Cluster von bis zu vier Tumorzellen an der invasiven Front des Tumors und gelten als morphologisches Korrelat zu den molekularen Veränderungen, die zur Erlangung des EMT Phänotyps führen, welcher Invasion und Metastasierung begünstigt [53],[54]. Eine hohe *Tumor Bud* Anzahl stellt somit eine aktive EMT dar und könnte deswegen ein geeigneter Surrogatmarker für die EMT sein (Abbildung 4).

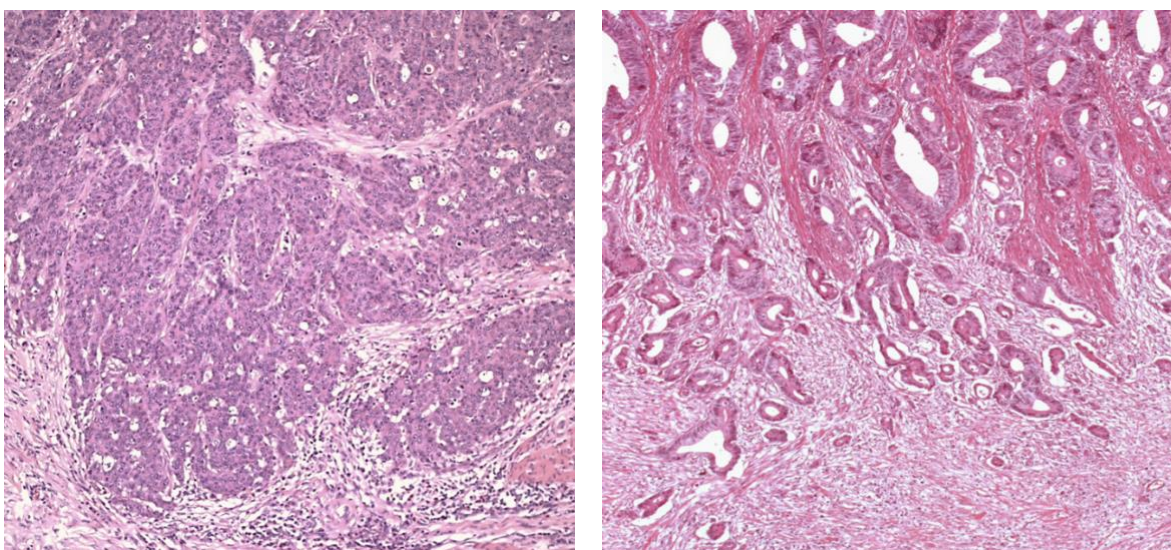


Abbildung 4. *Tumor Budding* beim Magenkarzinom. Das Bild links stellt den Befund eines gering ausgeprägten *Tumor Budding* dar, wohingegen das Bild rechts den Befund eines ausgeprägten *Tumor*

Budding als Surrogat für eine aktive EMT zeigt (Bilder aus eigenem Archiv mit freundlicher Genehmigung von Prof. J. Neumann).

Insgesamt wurde das Primärtumorgewebe von 189 Patient*innen mit Magenkarzinom (UICC III und IV) immunhistochemisch gefärbt (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, p53). Das *Tumor Budding* wurde entsprechend den Empfehlungen der *International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC)* unter Verwendung der Hotspot Methode bestimmt. Die mediane *Bud* Anzahl (pro *High Power Field*) lag bei 11 und wurde als Cut-off verwendet, um zwischen EMT aktiv (*Bud* Anzahl ≥ 11) und EMT nicht aktiv (*Bud* Anzahl < 11) zu differenzieren (Abbildung 4). Abbildung 5 gibt eine Übersicht über den von uns etablierten Algorithmus, nach welchem die Patient*innen immunhistochemisch nach *ACRG* charakterisiert wurden. Sie enthält zudem die prozentuale Verteilung der molekularen Subgruppen.

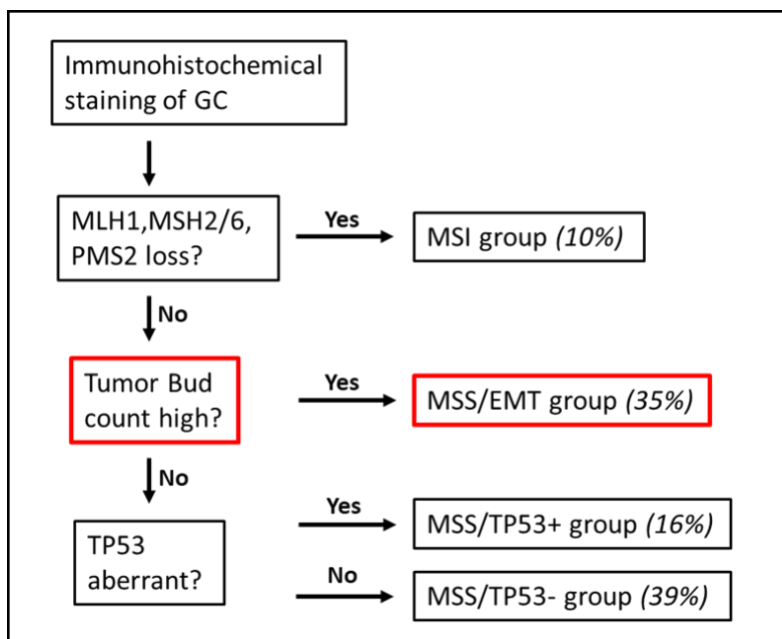


Abbildung 5 (adaptiert nach Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2022). Etablierung eines Algorithmus zur molekularen Subtypisierung des Magenkarzinoms nach *ACRG* unter Verwendung von Immunhistochemie. Verwendung von *Tumor Budding* als Surrogatmarker für eine aktive EMT. Patient*innen mit einer *Bud* Anzahl ≥ 11 pro High Power Field wurden der MSS/EMT Gruppe zugeordnet [50].

Insgesamt erwies sich die molekulare Subtypisierung mittels Immunhistochemie als geeignete Methode, das Magenkarzinom nach *ACRG* zu charakterisieren, korrelierte signifikant mit relevanten

klinischen Parametern (Lauren Klassifikation, Tumorstadium, Gefäßinvasion) und bietet damit eine geeignete Methode, die molekulare Charakterisierung in die klinische Routine aufzunehmen (2a). Die Bestimmung des *Tumor Budding* stellte sich als geeignete Methode heraus, um zwischen aktiver und nicht aktiver EMT zu differenzieren (2b). Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen molekularem Subtyp und Lymphknotenwachstumsmuster (1).

2c Pretzsch et al., Cancers, 2022 (accepted, in press) [55]

Trotz signifikanter Fortschritte in der Entwicklung und Anwendung lokaler sowie systemischer Therapieverfahren, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patient*innen mit metastasiertem KRK (mKRK) immer noch bei nur 14-17% [7]. Die Empfehlungen der aktuell gültigen nationalen (deutsche S3-Leitlinie, NCCN) und internationalen (ESMO, ESMO-Asia) Leitlinien im Sinne eines personalisierten Therapieansatzes beschränken sich auf die Untersuchung des Mikrosatellitenstatus sowie die Analyse des RAS (*rat sarcoma oncogene*) und B-RAF Status [9],[10],[11],[12]. Um eine Über- oder Untertherapie zu vermeiden, besteht die dringende Notwendigkeit einer Risikostratifizierung der Patient*innen im Hinblick auf die Therapiestrategie im Sinne der Präzisionsonkologie. Hierfür ist die Identifikation innovativer Marker und Risikosignaturen basierend auf der individuellen Tumorbilogie von hoher klinischer Relevanz. In einer Vorarbeit konnten wir kürzlich die prognostische Relevanz EMT-assoziiierter Gene im Stadium II und III des KRK an 1780 Patient*innen nachweisen. Es gelang, eine EMT-Signatur zu identifizieren, welche prädiktiv für das Eintreten eines Rezidivs im Stadium II/III war und signifikant mit dem Gesamtüberleben korrelierte [56].

Nachdem die EMT als kritischer Schritt der Metastasierung gilt und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert ist, war es Ziel dieser Arbeit, erstmals die prognostische Relevanz EMT-assoziiierter Gene im metastasierten Stadium zu untersuchen, was bis dato wissenschaftlich unerforscht war. Hierzu wurde das Kollektiv der FIRE III Studie (*open-label* mulizentrische randomisiert-kontrollierte Phase III Studie zur Erstlinientherapie von Patient*innen mit RAS Wildtyp mKRK), welches klinisch und molekular exzellent charakterisiert ist, gewählt (n=350) [57].

Es wurde die prädiktive Performance (gemessen mittels *integrated brier score*) fünf statistischer Modelle (Kaplan Meier, Cox, *regularised Cox*, *Random Survival Forest* und *Gradient boosted trees*) verglichen. Allein auf klinische Daten basierende Modelle wurden verglichen mit Modellen, welche zusätzlich die EMT-Genexpressionsdaten berücksichtigten. Wenn sich die prädiktive Performance durch Hinzunahme dieser genetischen Daten verbessern würde, würde dies dafürsprechen, dass EMT-assoziierte Gene eine prognostische Relevanz hätten. Als Endpunkte wurden hierfür das progressionsfreie (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) gewählt. Unter Berücksichtigung der EMT-

Genexpressionsdaten konnte jedoch die prädiktive Performance keines der Modelle signifikant verbessert werden (siehe Abbildung 6 und 7).

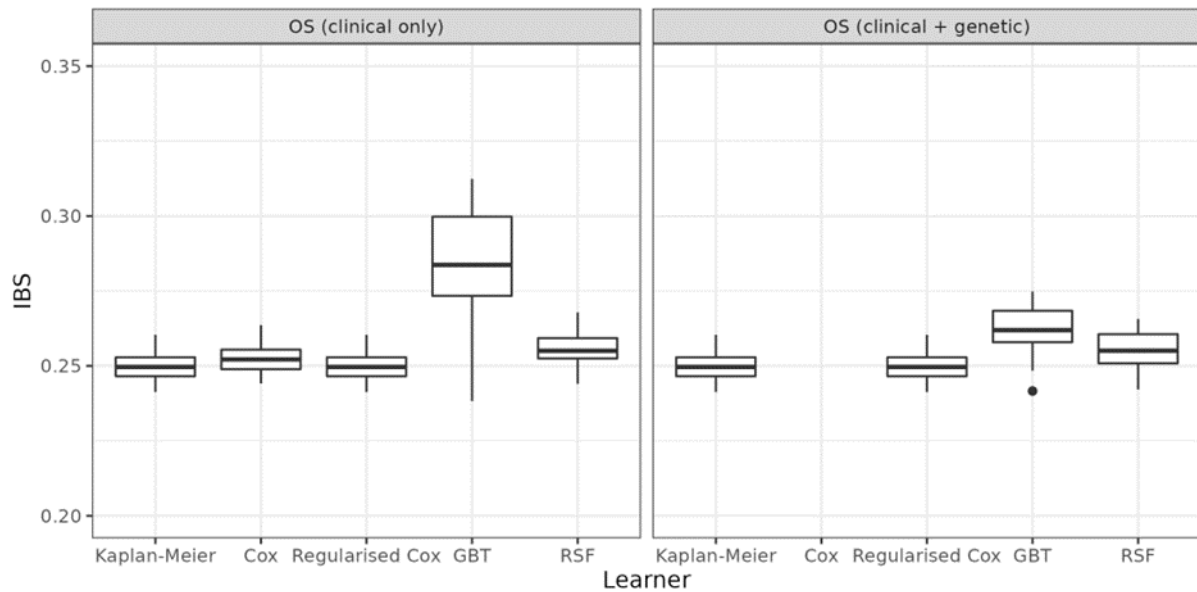


Abbildung 6 (adaptiert nach Pretzsch et al., Cancers, 2022). Prädiktive Performance in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS). Prädiktive Performance von fünf Modellen gemessen mittels *integrated brier score (IBS)*. Niedrige Werte entsprechen besserer Performance. Die Performance klinischer Daten allein (links) wurde mit der Performance unter zusätzlicher Berücksichtigung der Genexpressionsdaten (rechts) verglichen (ns). Die Performance des *unregularised Cox* Modells wurde im hoch-dimensionalen Setting (bei Berücksichtigung der Genexpressionsdaten) ausgespart [55].

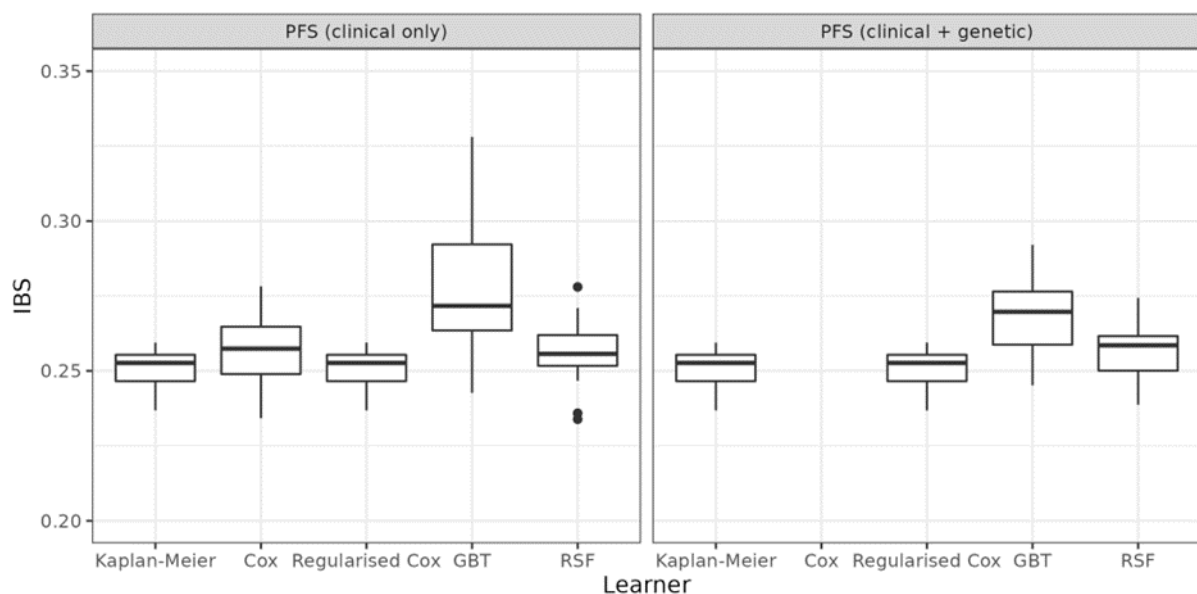


Abbildung 7 (adaptiert nach Pretzsch et al., Cancers, 2022). Prädiktive Performance in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (PFS). Prädiktive Performance von fünf Modellen gemessen mittels *integrated brier score (IBS)*. Niedrige Werte entsprechen besserer Performance. Die Performance klinischer Daten allein (links) wurde mit der Performance unter zusätzlicher Berücksichtigung der Genexpressionsdaten (rechts) verglichen. Die Performance des *unregularised Cox* Modells wurde im hoch-dimensionalen Setting (bei Berücksichtigung der Genexpressionsdaten) ausgespart [55].

Unsere Ergebnisse deuten dementsprechend darauf hin, dass die prognostische Relevanz EMT-assoziiertes Gene stadienabhängig ist. Während EMT-assoziierte Gene im Stadium II/III prognostisch relevant sind, scheinen sie im metastasierten Stadium keine signifikante Rolle für die Prognose zu spielen [55]. Wahrscheinlich zeichnet sich das metastasierte Stadium somit dadurch aus, dass alle Patient*innen den pathophysiologischen Prozess der EMT durchlaufen haben, insbesondere wenn die Gewinnung des zu untersuchenden Materials aus der Lebermetastasierung erfolgte.

2d Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022 [58]

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Rolle von Olfactomedin 4 (OLM4) für die Tumorprogression und Metastasierung. Wir konnten in Vorarbeiten die Bedeutung stammzellossoziierten Marker für den Organotropismus und die Metastasierung aufzeigen. Die Kombination aus Mikrosatellitenstabilität und hoher Expression der stammzellossoziierten Marker CD133 und β -Catenin, war signifikant mit einer hepatischen Metastasierung sowie der Prognose beim KRK assoziiert. Der Transkriptionsfaktor SOX2 als Regulator von β -Catenin korrelierte ebenfalls mit der Ausbildung von Fernmetastasen [13],[29],[30],[31],[59].

OLFM4 wird in der Stammzellnische, am Boden der Krypten, zusammen mit dem *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5* (LGR5), einem bedeutenden Stammzellmarker für das KRK, ko-exprimiert [60],[61],[62]. Nachdem OLFM4 in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren als prognostischer Biomarker identifiziert werden konnte, wurde mehrfach vermutet, dass dies auf Stammzell-Eigenschaften von OLFM4 zurückzuführen ist und OLFM4 möglicherweise als Stammzell-Surrogatmarker herangezogen werden könnte [63],[64],[65],[66],[67],[68]. Diese Hypothese wurde weiter unterstützt nachdem gezeigt werden konnte, dass OLFM4 den WNT Signalweg moduliert, welcher essenziell für den Erhalt der Stammzellnische ist [69],[70],[71],[72],[73],[74]. Eine aberrante Aktivierung des WNT Signalwegs in KRK Stammzellen ist Initiator in der Karzinogenese des KRK [23],[75]. β -Catenin als wichtiges *Downstream*-Molekül aktiviert die EMT und fördert damit die Tumorprogression und Metastasierung [14]. OLFM4 wurde als negativer Regulator des WNT/ β -

Catenin Signalwegs mit folglich Aktivierung der Tumorentstehung berichtet. Zudem wurde OLFM4 in anderen Studien in gut- bis mäßig differenzierten Tumoren und im Frühstadium Adenom (des KRK) nachgewiesen. OLFM4 korrelierte dabei mit einem signifikant besseren tumorspezifischen Überleben [73],[76],[77],[77],[78].

In unserer Arbeit untersuchten wir die Rolle von OLFM4 mit der Frage, ob es ähnlich zu LGR5 als Stammzellmarker fungiert und über eine Modulation des WNT Signalwegs und Aktivierung der EMT die Tumorprogression und Metastasierung fördert. Hierzu wurde die Bedeutung von OLFM4 anhand funktionaler Tests in vitro, in vivo im Tiermodell und klinisch an verschiedenen Patient*innenkohorten untersucht.

In vitro (KRK Zellkultur) korrelierte OLFM4 nicht mit der Expression stammzellassoziierter Marker (LGR5, ALDH1A1 (aldehyde-dehydrogenase 1 A1), CD44, CD133, PROM1 (prominin1)), jedoch mit der Expression von Markern der Zelldifferenzierung (FABP2, MUC2, CK20).

Wie in Kapitel 2.2 aufgezeigt, stellt das *Tumor Budding* einen geeigneten Surrogatmarker für die EMT, und damit aberrante Aktivierung des WNT Signalwegs mit nukleärer Expression von β -Catenin, dar. In der Auswertung von Gewebeschnitten von Patient*innen mit prototypischem *Tumor Budding* und nukleärer Expression von β -Catenin ergab sich keine Ko-Expression von OLFM4 und nukleärem β -Catenin. Auch in der Auswertung zweier Patient*innenkohorten (Metastasenkollektiv, n=106, gematchte Fall-Kontrolle mit Patient*innen mit und ohne Metastasen; Überlebenskollektiv, n=252 mit UICCII, T3/4, N0, M0 mit kurativer Resektion und 5-Jahres Follow-Up) fand sich immunhistochemisch keine Korrelation zwischen OLFM4 und β -Catenin, jedoch korrelierte OLFM4 erneut mit der Expression des Differenzierungsmarkers CK20 (Abbildung 8).

In folgenden funktionellen Experimenten, in vitro und in vivo im Tiermodell, untersuchten wir den Einfluss einer forcierten Überexpression von OLFM4 auf stammzellassozierte Eigenschaften und Mechanismen, d.h. WNT Signalweg, Expression von stammzellassozierten Markern, EMT, Migration, Koloniebildung, Proliferation und Tumorwachstum. Insgesamt zeigte sich hier kein signifikanter Einfluss. Während OLFM4 mit oben genannten Differenzierungsmarkern korrelierte, beeinflusste die forcierte Überexpression von OLFM4 deren Expression nicht (Abbildung 9, 10 und 11).

Hiermit übereinstimmend ergab sich in der klinischen Korrelation unter Verwendung des Metastasen- und Überlebenskollektiv keine signifikante Korrelation zwischen OLFM4 und der Ausbildung von Metastasen oder dem Überleben.

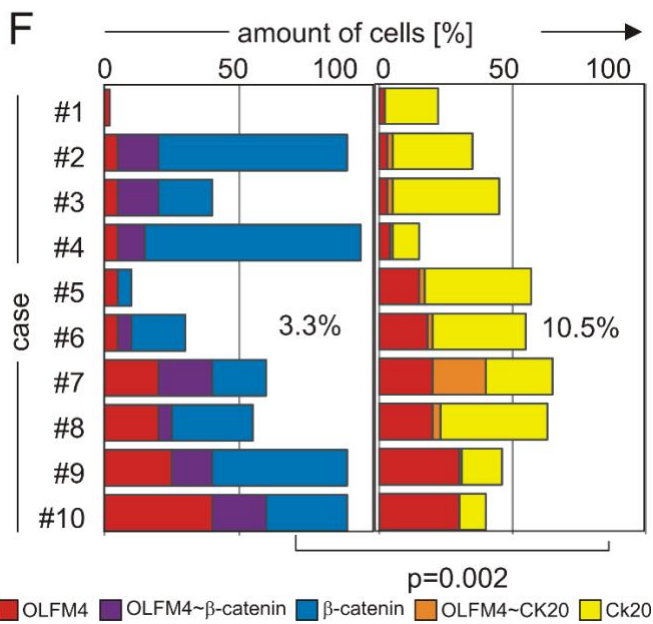
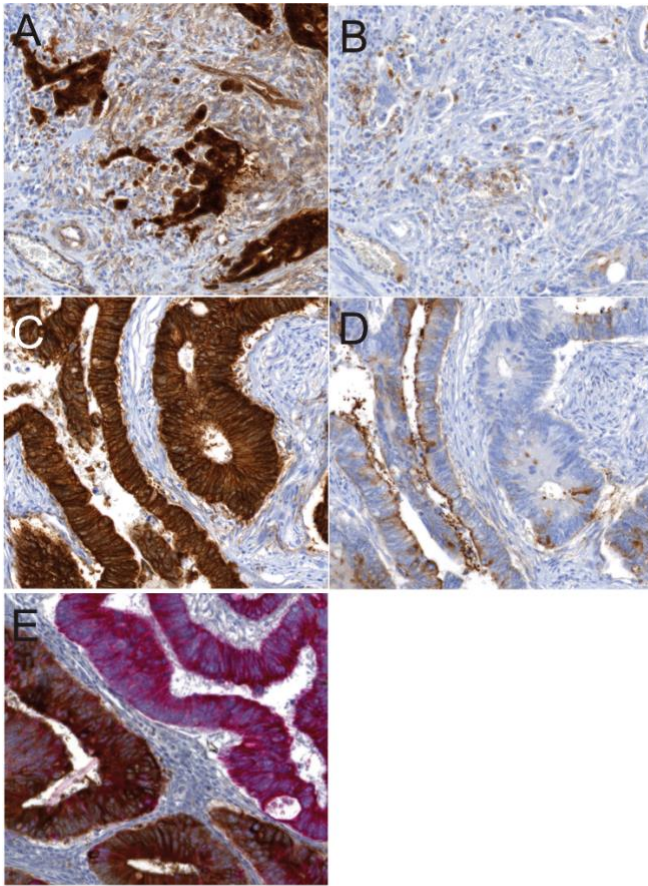


Abbildung 8 (adaptiert nach Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022). Ko-Expression von OLFM4 und CK20 im KRK. (A) Tumorzellen an der invasiven Front mit starker nukleärer β-Catenin Expression, (B) weisen keine Ko-Expression mit OLFM4 auf. (C) Areale ohne nukleäre β-Catenin Expression zeigen (D) ebenfalls keine OLFM4 Ko-Expression. (E) Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutliche Ko-Expression von OLFM4 (braun chromogen) und CK20 (rot chromogen). (F) Die Auszählung von Arealen mit Ko-Expression entweder von nukleärem β-Catenin

und OLFM4 oder CK20 und OLFM4 ergab, dass nur 3,3% der Tumorzellen nukleäres β -Catenin und OLFM4 ko-exprimierten, während 10,5% der Tumorzellen CK20 und OLFM4 ko-exprimierten ($p=0,002$) [58].

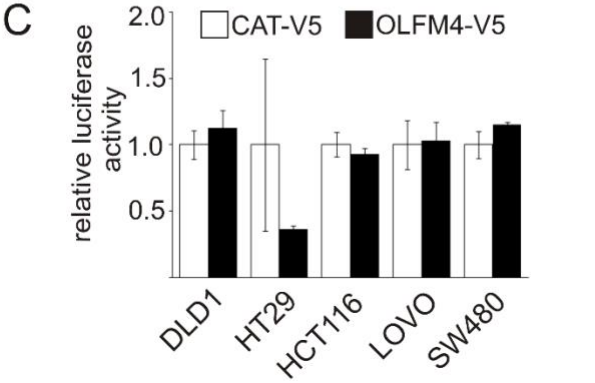
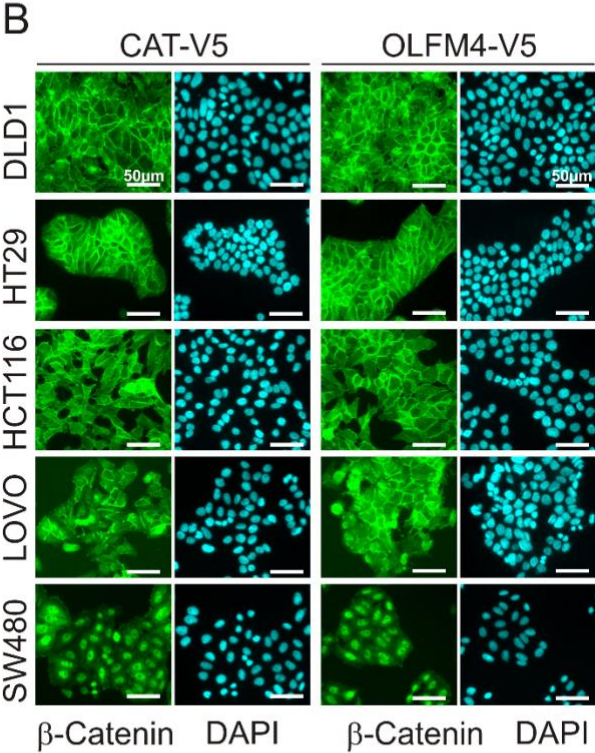
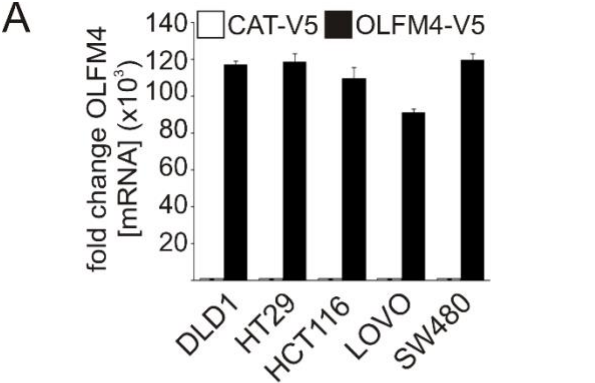


Abbildung 9 (adaptiert nach Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022). Forcierte Überexpression von OLFM4 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin oder die Aktivität des WNT Signalwegs. (A) Stabile Transfektion von KRK Zellen (DLD1, HT29, HCT116, LOVO, or SW480) mit stabiler Überexpression von OLFM4-V5 auf mRNA Ebene. (B) OLFM4 Überexpression führte nicht zu einer Veränderung in der subzellulären Lokalisation von β -Catenin. (C) Kongruent mit (B) führte die OLFM4-V5 Überexpression zu keiner Veränderung in der Aktivität des WNT Signalwegs (bestimmt mittels TOP- und FOP Flash Aktivität Verhältnis) [58].

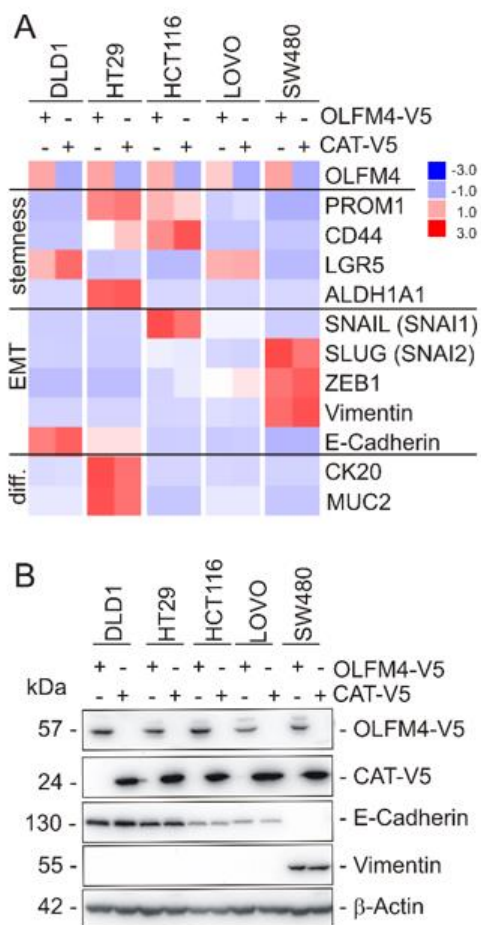


Abbildung 10 (adaptiert nach Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022). Forcierte Überexpression von OLFM4 führt zu keiner Veränderung von tumorstammzellassozierten Markern, EMT oder Differenzierungsmarkern. (A) Stabil transfizierte KRK Zellen (DLD1, HT29, HCT116, LOVO, SW480) mit Überexpression von OLFM4-V5 oder CAT-V5 (Kontrolle) zeigten keine Veränderung in der mRNA Expression stammzellassoziierter Marker (ALDH1A1, CD44, LGR5, PROM1), noch Markern der EMT (E-Cadherin, SLUG (SNAI2), SNAIL (SNAI1), vimentin, ZEB1), noch Differenzierungsmarkern (CK20, MUC2). (B) Validierung der OLFM4-V5 und

CAT-V5 Expression und der Ergebnisse aus (A) auf Proteinebene (Westernblot), wobei sich keine Veränderung der Expression von EMT-Markern zeigte [58].

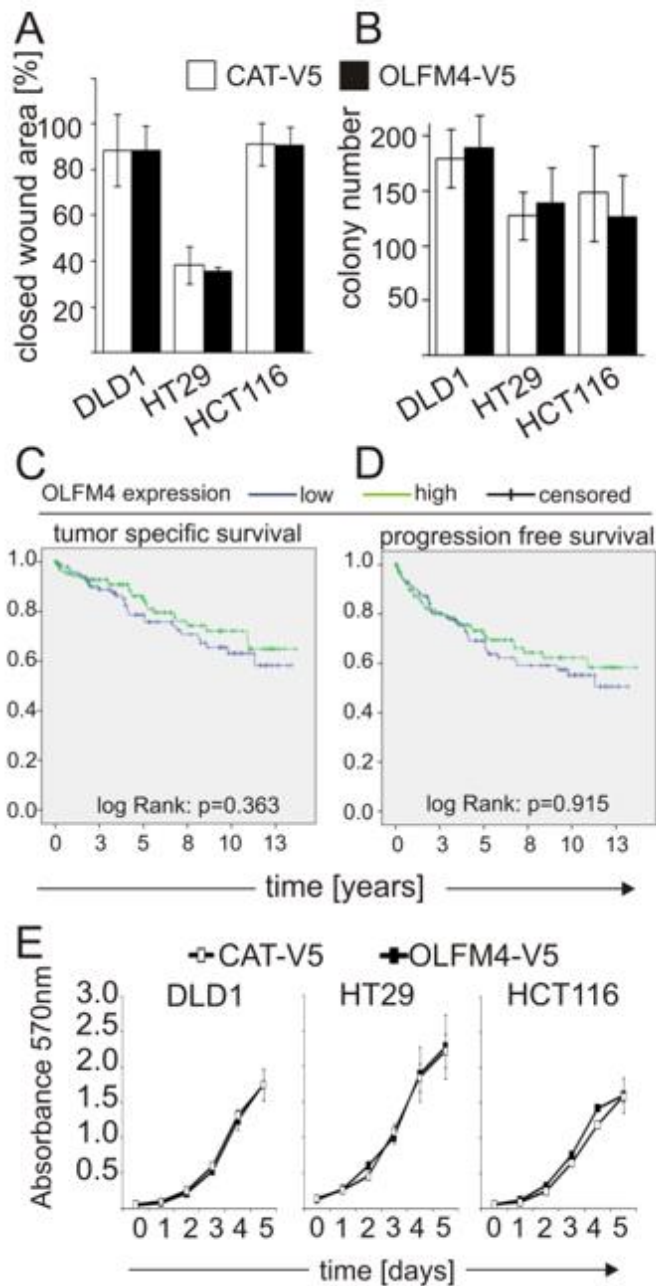


Abbildung 11 (adaptiert nach Jaitner*, Pretzsch*, Neumann* et al., Journal of Pathology: Clinical Research, 2022). Forcierte Überexpression von OLFM4-V5 zeigt keinen Einfluss auf Migration, Koloniebildung oder Proliferation. (A) Stabil transfizierte KRK Zellen (DLD1, HT29, und HCT116) mit OLFM4-V5 Überexpression zeigten keine erhöhte Rate an Migration im Vergleich zu CAT-V5 exprimierenden Zellen (Kontrolle). (B) Gleiche Ergebnisse zeigten sich in Bezug auf die

Koloniebildung. OLFM4 Expression korrelierte weder mit (C) tumorspezifischem Überleben, noch mit (D) progressionsfreiem Überleben im Stadium UICC II. (E) OLFM4-V5 Überexpression hatte ferner keinen Einfluss auf die Proliferation der transfizierten Zellen (DLD1, HT29 HCT116) [58].

Zusammenfassend korrelierte OLFM4 mit Differenzierungsmarkern, jedoch nicht mit stammzellassozierten Markern und wies funktional in vitro und in vivo keine stammzellassozierten Eigenschaften auf. Damit scheint OLFM4 charakteristisch für eine gute Differenzierung beim KRK zu sein, hat jedoch keine Relevanz für Tumorprogression oder Metastasierung.

2e Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2021 [79]

Diese Arbeit beschäftigte sich weiter mit der Bedeutung stammzellassoziierter Marker für die Metastasierungstendenz des KRK. LIN28A/B gilt als wichtiger Regulator der Tumorprogression über eine Aktivierung des WNT Signalwegs und *maintenance* der Stammzellfunktion [80],[81],[82],[83]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von LIN28A/B mit einem verminderten Gesamtüberleben und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs bei KRK Patient*innen korrelierte [83],[84],[85],[86]. Nachdem das verminderte Gesamtüberleben bei Tumorpatient*innen hauptsächlich auf die Ausbildung von Metastasen zurückzuführen ist, untersuchten wir inwiefern LIN28A/B einer Metastasierung beim KRK zugrunde liegt.

Hierzu verglichen wir immunhistochemisch die Expression von LIN28A/B in einer gematchten Fall-Kontroll-Studie zwischen Patient*innen mit KRK mit Lebermetastasen (n=42) und Patient*innen ohne Ausbildung von Lebermetastasen innerhalb von fünf Jahren (n=42) (Abbildung 12).

1a)			
Metastasis	LIN28A Low	LIN28A High	P
M0	17 (40%)	25 (60%)	ns
M1	22 (52%)	20 (48%)	
1b)			
Metastasis	LIN28B Low	LIN28B High	P
M0	20 (48%)	22 (52%)	ns
M1	21 (50%)	21 (50%)	
1c)			
Metastasis	LIN28A/B Low	LIN28A/B High	P
M0	10 (12%)	32 (38%)	ns
M1	14 (17%)	28 (33%)	

Abbildung 12 (adaptiert nach Pretzsch et al., Pathology Research and Practice, 2021). Korrelation zwischen LIN28 Expression und dem Vorhandensein von Metastasen. Korrelation zwischen einer

vorhandenen Lebermetastasierung und der LIN28A Expression (a), der LIN28B Expression (b), und der LIN28A/B Expression (c) [79].

Des Weiteren untersuchten wir eine mögliche Korrelation zwischen LIN28A/B und SOX2, welches in einer Vorarbeit ebenfalls als wichtiger stammzelloassoziierter Marker, welcher mit der Ausbildung von Fernmetastasen korrelierte, identifiziert werden konnte [31]. Zusammenfassend ließ sich in dieser Arbeit zeigen, dass LIN28A/B zwar mit der Expression von SOX2 signifikant korrelierte, diese Korrelation sich jedoch nicht in einem erhöhten Auftreten von Lebermetastasen widerspiegelte. Somit muss davon ausgegangen werden, dass LIN28A/B zwar ein wichtiger stammzelloassoziierter Marker ist, jedoch nicht mit der Ausbildung von Fernmetastasen korreliert oder diese initiiert.

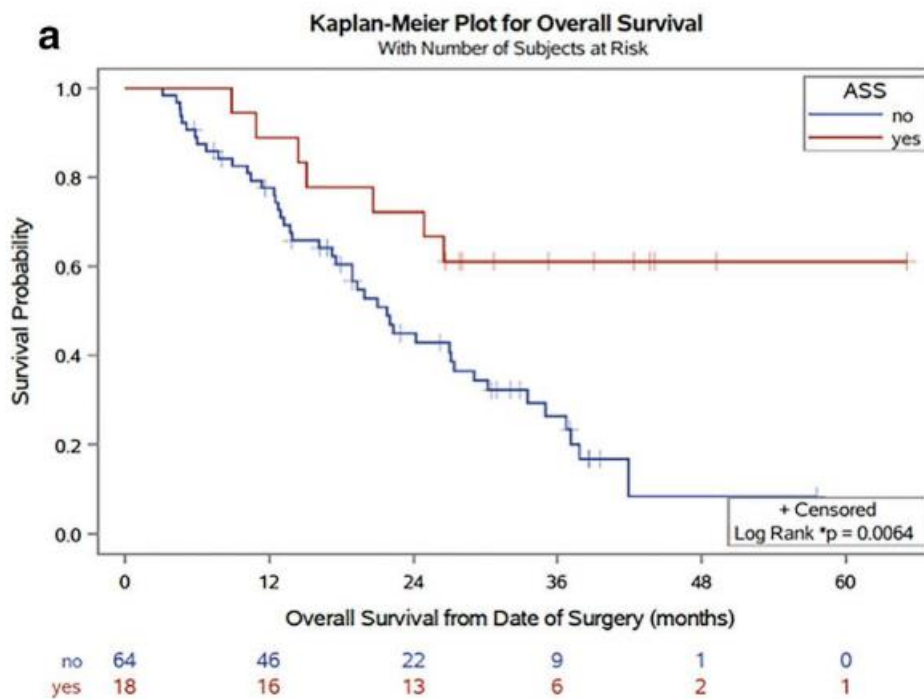
2f Pretzsch et al., BMC Surgery, 2021 [87]

Die perioperative Phase stellt eine hochvulnerable Phase dar, welche durch eine Suppression der Immunantwort und damit verminderter Elimination zirkulierender Tumorzellen charakterisiert ist. Das Risiko der Absiedelung von Fernmetastasen ist hierdurch erhöht, welche wiederum das onkologische Outcome negativ beeinflussen. Die begünstigende Wirkung von Thrombozyten im Hinblick auf die Metastasenentstehung wurde bereits mehrfach nachgewiesen [88]. Thrombozyten schützen zirkulierende Tumorzellen durch Abschirmung von Immunzellen (vor allem *natural killer cells*) und verhindern so deren Elimination. Ferner halten sie EMT Signale aufrecht und unterstützen das Überleben der zirkulierenden Tumorzellen über parakrine Signale [89].

Aspirin gilt als wichtiger Thrombozytenaggregationshemmer, der neben kardioprotektiver Effekte auch die Tumorinzidenz sowie tumorbedingte Mortalität günstig beeinflusst [90],[91]. Es wird angenommen, dass Aspirin durch Hemmung der Thrombozytenfunktion deren prometastatische Wirkung aufhebt und damit besonders in der sensiblen perioperativen Phase die Ausbreitung von zirkulierenden Tumorzellen und damit die Metastasenbildung verhindert. Wir untersuchten basierend auf dieser Hypothese den Einfluss einer perioperativen Aspirineinnahme auf das postoperative Langzeit-Überleben.

Hierzu betrachteten wir in einer *Propensity-Score* gematchten Analyse den Effekt einer perioperativen Aspirineinnahme (d.h. kontinuierlichen Einnahme von Aspirin ohne Pausierung) auf das Gesamtüberleben, das krankheitsfreie Überleben und das hämatogene metastasenfremde Überleben von Patient*innen nach kurativer Resektion bei Pankreaskarzinom.

Die perioperative Aspirineinnahme korrelierte unabhängig mit einem verbesserten durchschnittlichen Gesamtüberleben (46,5 vs. 24,6 Monate, *p = 0,006), krankheitsfreien Überleben (26,0 vs. 10,5 Monate, *p = 0,001) und hämatogenen metastasenfreien Überleben (41,9 vs. 16,3 Monate, *p = 0,005). Die 3-Jahres-Überlebensrate bei Patient*innen mit perioperativer Aspirineinnahme lag bei 61,1% im Vergleich zu 26,3% bei Patient*innen ohne Aspirineinnahme. Die multivariate Cox Regression zeigte eine signifikant unabhängige Korrelation zwischen perioperativer Aspirineinnahme und allen drei Überlebensendpunkten mit *Hazard Ratios* von 0,36 (95% CI 0,15–0,86) für das Gesamtüberleben (*p = 0,021), 0,32 (95% CI 0,16–0,63) für das krankheitsfreie Überleben (**p = 0,001), and 0,36 (95% CI 0,16–0,77) für das hämatogene metastasenfreie Überleben (*p = 0,009) (Abbildung 13).



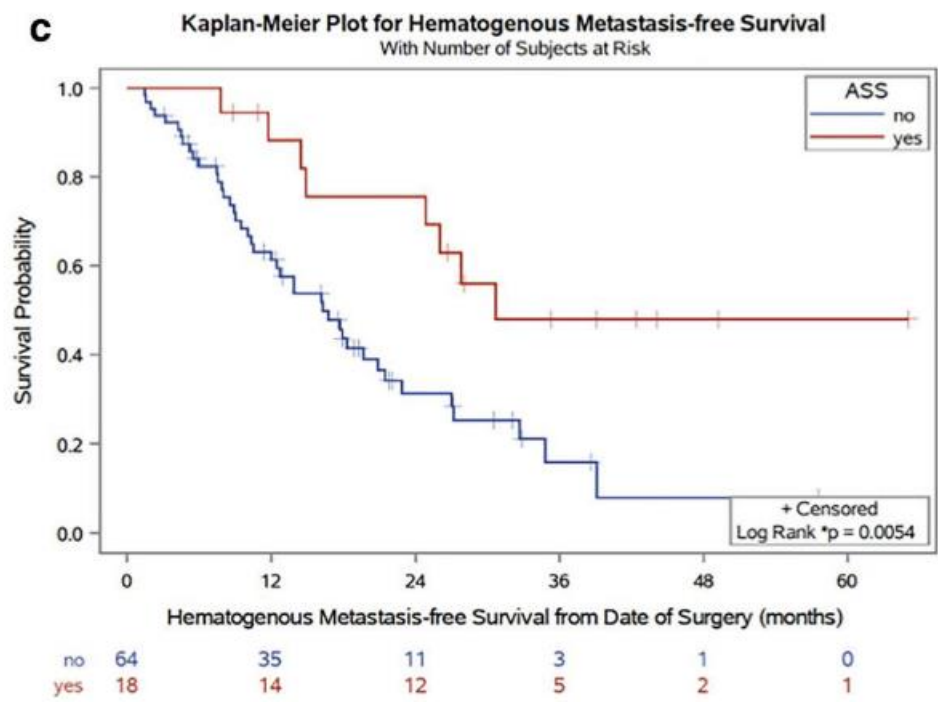
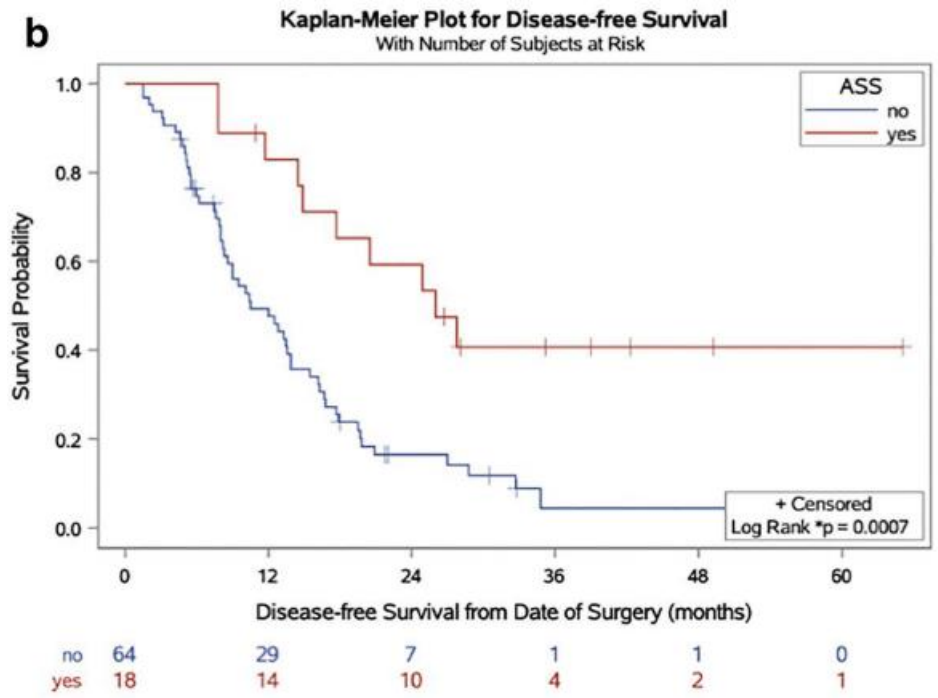


Abbildung 13 (adaptiert nach Pretzsch et al., BMC Surgery, 2021). Überleben nach perioperativer Aspirineinnahme nach kurativer Resektion bei Pankreaskarzinom. Gesamtüberleben (OS) (a), krankheitsfreies Überleben (DFS) (b), und hämatogenes metastasenfreies Überleben (HMFS) (c) in Monaten bei Patient*innen nach kurativer Resektion bei Pankreaskarzinom mit Aspirineinnahme (rote Linie) und ohne Aspirineinnahme (blaue Linie), (P-Werte wurden mittels Log-Rank Test ermittelt) [87].

Zusammenfassend wiesen Patient*innen mit perioperativer Aspirineinnahme damit ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben nach kurativer Resektion bei Pankreaskarzinom auf, was besonders auf ein verbessertes hämatogenes metastasenfreies Überleben zurückgeführt werden kann. Damit erscheint der perioperative Einsatz von Aspirin zur Verbesserung des Outcomes in der viszeralchirurgischen Onkologie durch Hemmung der Metastasierungstendenz vielversprechend und dient als Grundlage folgender prospektiver randomisierter Studien.

2g Pretzsch et al., British Journal of Surgery Open, 2022 (in press)

Ziel der vorangegangenen Studien ist mittelfristig mitunter eine tumorbiologische Steuerung multimodaler Therapien. Dabei ist neben der onkologischen Betrachtungsweise eine Gesamtsicht auf die Patient*innen zu berücksichtigen. Insbesondere müssen die Auswirkungen der einzelnen Maßnahmen bezüglich der Belastung der Patient*innen und der Nebenwirkungen berücksichtigt werden. Die Etablierung von verlässlichen Qualitätsindikatoren ist dabei ein fundamentaler Bestandteil. Eine einheitliche Definition von Kriterien, welche einen idealen postoperativen Verlauf kennzeichnen, ist besonders vor dem Hintergrund, dass aufgrund der Fortschritte in chirurgischer Technik und perioperativer Versorgung eine zunehmende Ausweitung der Patient*innenselektion mit Einschluss von Patient*innen mit fortgeschrittener Tumorerkrankung oder Multimorbidität, stattfindet, besonders relevant, um chirurgische Qualität zu messen und sicherzustellen und therapeutische Entscheidungen zu treffen.

Hierzu wurde kürzlich das *Textbook outcome (TO)* als multimodales Maß eingeführt, welches den idealen Verlauf nach Operation in einem einzelnen Indikator zusammenfasst [35]. Dabei folgt das *TO* dem Alles-oder-nichts Prinzip, d.h. nur wenn alle vorab definierten Kriterien, welche in das *TO* eingehen, erfüllt sind, spricht man von einem Erreichen des *TO*. Dies bietet darüber hinaus den Vorteil, dass einzelne Faktoren, welche das Erreichen des *TO* verhindert haben, einfach identifiziert werden können. Diese können dann als Orientierung dienen für neue Maßnahmen, welche das postoperative Ergebnis verbessern. Ein weiterer Vorteil zeigte sich darin, dass Patient*innen die Zusammenfassung einzelner Faktoren in einem einzelnen Indikator für eine präoperative Einschätzung und Entscheidungsfindung bevorzugen [92],[93].

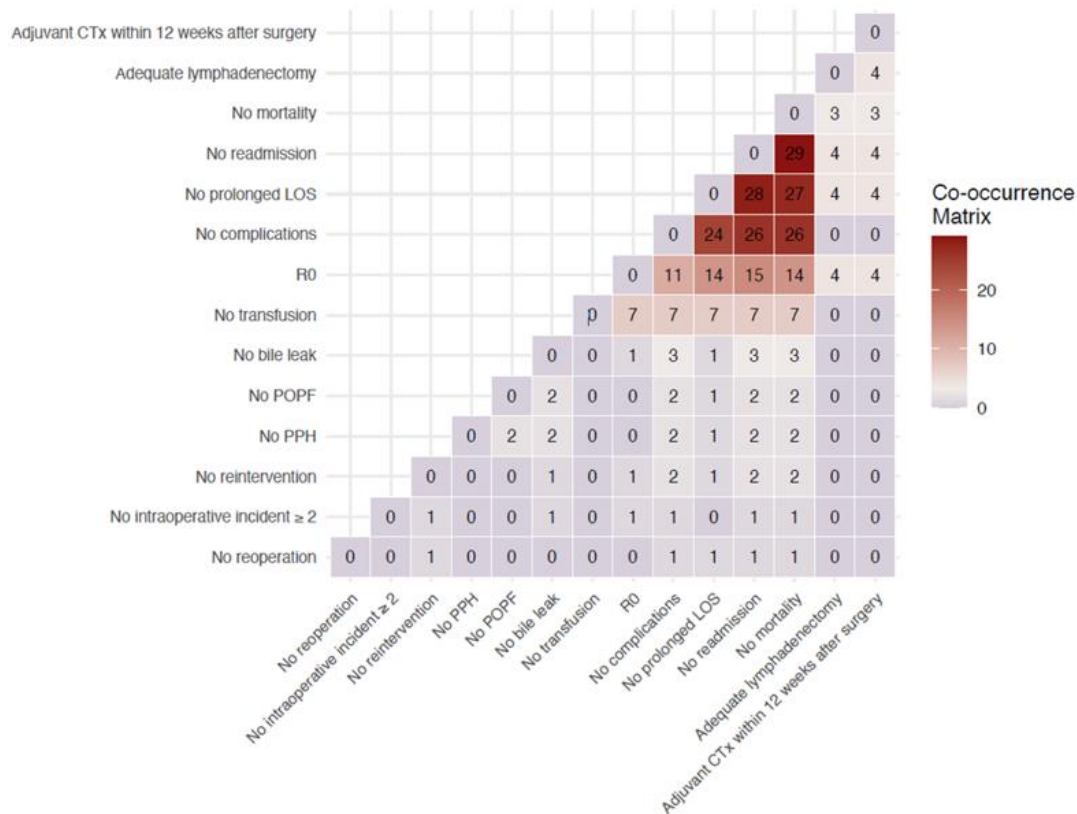
Während Studien zunehmend das *TO* zur Messung von chirurgischer Qualität und postoperativem Outcome nutzen, existieren bis dato keine einheitlichen Kriterien zur Definition des *TO*, was die Vergleichbarkeit über Studien hinweg deutlich einschränkt.

Wir führten diesbezüglich eine systematische Literaturrecherche aller Arbeiten, welche sich mit dem *TO* in der hepato-pankreatikobiliären (HPB) Chirurgie beschäftigt haben, durch, um erstmalig einen

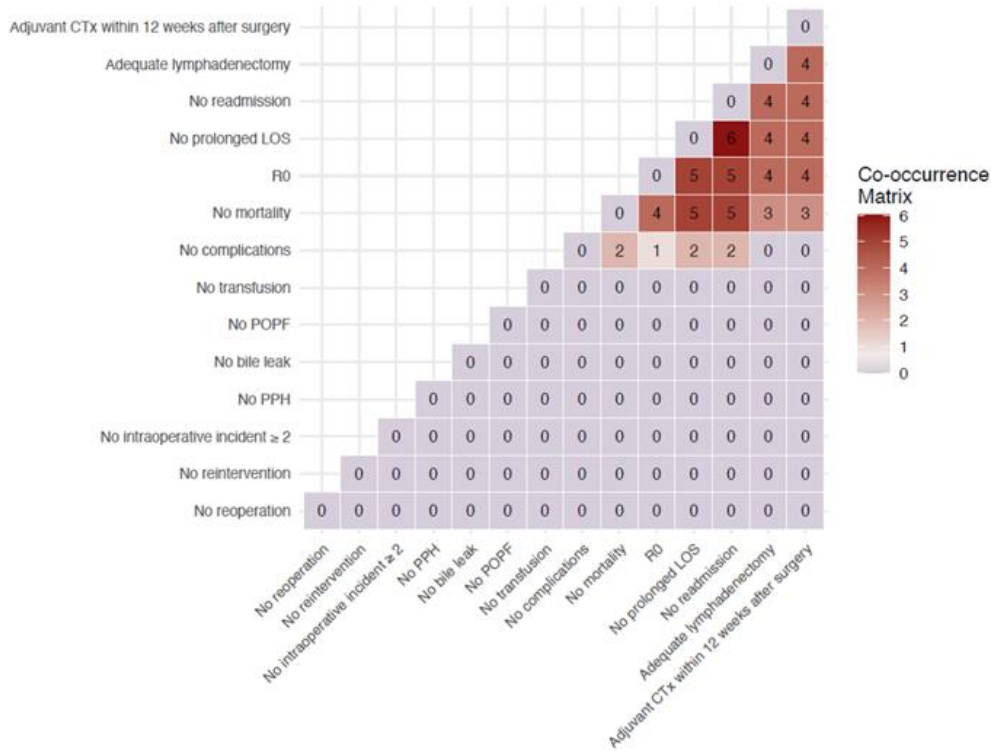
Vorschlag für eine einheitliche, entitätenspezifische Definition des *TO* in der HPB Chirurgie zu generieren. Darüber hinaus war es Ziel, Faktoren zu identifizieren, welche das Eintreten des *TO* (d.h. des idealen postoperativen Verlaufs) begünstigen oder verhindern. Zudem analysierten wir die Korrelation zwischen dem *TO* und dem Überleben als auch zwischen dem *TO* und verschiedener gesundheitsökonomischer Faktoren.

Insgesamt konnten wir nach systematischer Literaturrecherche zu *TO* und HPB Chirurgie (*PubMed*, *Embase* und *Cochrane Database* gemäß der *PRISMA Guidelines*) 30 Studien einschließen. Unter Erstellung von *Co-Occurrence Maps* konnten wir die am häufigsten gemeinsam gewählten Kriterien zur Definition des *TO* innerhalb der Studien identifizieren. Somit schlagen wir zur Definition des *TO* in der HPB Chirurgie folgende Kriterien vor: „keine verlängerte Krankenhausverweildauer“, „keine Komplikationen“, „keine Wiederaufnahme“ und „keine Mortalität“ (Abbildung 14).

a)



b)



c)

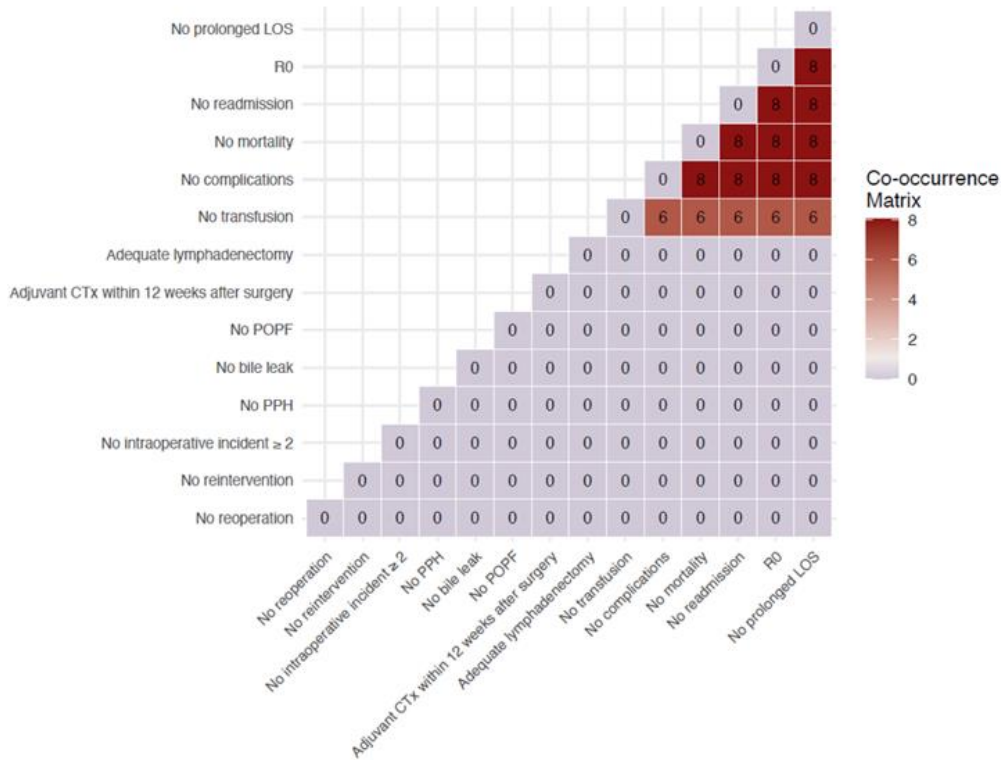


Abbildung 14 (adaptiert nach Pretzsch et al., British Journal of Surgery Open, 2022). Definition Textbook outcome (TO). Co-Occurrence Maps zeigen wie oft einzelne TO Kriterien gewählt wurden

und wie oft in Kombination. Die *TO* Kriterien werden entlang der X- und Y-Achse gelistet, die Zahlen und Farben der einzelnen Kacheln geben die Anzahl der *Co-Occurrence*, d.h. des gemeinsamen Auftretens innerhalb der Studien an. a) alle HPB Studien. LOS (*length of stay*, verlängerte Krankenhausverweildauer) b) alle Studien unter Berücksichtigung ausschließlich des Pankreaskarzinoms c) alle Studien unter Berücksichtigung ausschließlich hepatobiliärer maligner Tumore

Größtes Hindernis für das Nicht-Eintreten des *TO* waren eine verlängerte Krankenhausverweildauer, Komplikationen und eine Wiederaufnahme. In der multivariaten Analyse war das *TO* unabhängig mit einem besseren Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben bei Tumorpatient*innen assoziiert. Das Eintreten eines *TO* war in ausgezeichneten Zentren wahrscheinlicher und darüber hinaus mit prozeduralen und strukturellen Indikatoren (*Case Mix Index*, Anzahl der durchgeführten Operationen etc.) assoziiert.

3. Zusammenfassung

Solide Tumoren des Gastrointestinaltrakts stellen einen Großteil der bundesweiten Morbidität und krebisbedingten Mortalität dar. Dabei ist die Ausbildung von Metastasen die häufigste Todesursache bei Patient*innen mit Tumorerkrankung. Die Chirurgie stellt bis auf wenige Ausnahmen den Goldstandard für einen kurativen Therapieansatz dar. Mit fortschreitendem Tumorstadium kommt jedoch multimodalen interdisziplinären Ansätzen eine besondere Bedeutung zu. Erweiterte (molekular)diagnostische Verfahren bieten zunehmend die Möglichkeit, die individuelle Tumorbiologie zu berücksichtigen und die Behandlung in der onkologischen Viszeralchirurgie im Sinne der Präzisionsmedizin zu personalisieren. Das Ziel bei der Identifikation neuer Biomarker muss die Verbesserung des Outcome der Patient*innen sein. Dabei haben bestimmte Eigenschaften einen hohen Stellenwert, z.B. solche die Zielstrukturen für neue Therapieansätze definieren und solche die eine präzisere Risikostratifizierung und Vorhersage der Prognose ermöglichen.

Aufgrund von Fortschritten der chirurgischen Technik und perioperativen Versorgung kommt es zu einer zunehmenden Ausweitung der Patient*innenselektion mit operativer Versorgung von multimorbiden Patient*innen und *borderline resectable* Tumoren. Vor diesem Hintergrund ist es besonders wichtig, die perioperative Morbidität so gering wie möglich zu halten, um das onkologische Outcome günstig zu beeinflussen.

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift beschäftigte sich im ersten Teil mit Mechanismen der Metastasierung unter besonderer Berücksichtigung stammzellassoziierter Marker sowie EMT-assoziierter Gene und ihrer Bedeutung für die Tumorprogression, das Metastasierungsverhalten sowie die Prognose. Wir konnten zeigen, dass die Relevanz EMT-assoziierter Gene stadienabhängig ist. Während EMT-assozierte Gene beim KRK im Stadium II/III signifikant mit der Prognose und der Rezidiventstehung assoziiert waren, wiesen sie im metastasierten Patient*innenkollektiv der prospektiv randomisierten FIREIII Studie keine zusätzliche prognostische Relevanz auf.

Ferner legen die Ergebnisse nahe, dass EMT-assozierte Gene die Lymphknotenmetastasierung begünstigen und pathognomonisch für ein aggressives und prognostisch ungünstiges Tumorwachstum sind. Sie zeigen dagegen aber keine Relevanz in Bezug auf das Wachstumsmuster von Lymphknotenmetastasen (z.B. das prognostisch ungünstige kapselüberschreitende Wachstum). Unter Bestimmung des *Tumor Budding* als morphologisches Surrogat für eine aktivierte EMT gelang es, einen Algorithmus zu etablieren, anhand dessen eine immunhistochemische molekulare Subtypisierung des Magenkarzinoms möglich ist. Diese Bestimmung kann an bereits routinemäßig etablierten Methoden erfolgen und bedarf somit keiner komplexer, teurer, und für die derzeitige Routine ungeeigneter molekularer Verfahren.

Die Bedeutung des stammzellassozierten Markers OLFM4 für die Tumorprogression und Metastasierung beim KRK wurde erstmalig *in vitro*, *in vivo* im Tiermodell und klinisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass OLFM4 signifikant mit Differenzierungsmarkern korrelierte, jedoch nicht die Metastasierung initiiert oder Tumorprogression triggert, worüber aufgrund der Ko-Expression mit dem bedeutenden Stammzellmarker LGR5 in der Stammzellnische bis dato viel Unklarheit herrschte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die prognostisch ungünstige Wirkung einer Expression von LIN28A/B beim KRK nicht auf die Ausbildung von Lebermetastasen zurückzuführen ist.

Der zweite Teil der kumulativen Habilitationsschrift beschäftigte sich im Kontext der Metastasierung mit Strategien, welche das onkologische Outcome weiter verbessern können. Es wurde gezeigt, dass die perioperative Aspirineinnahme mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben nach Pankreasresektion assoziiert ist, was insbesondere auf ein verlängertes Intervall bis zur Entstehung hämatogener Fernmetastasen zurückgeführt werden kann. Dies wird am ehesten durch eine Hemmung der pro-metastatischen Thrombozytenfunktion und damit möglicherweise Unterbindung von EMT-Signalen erklärt, welche sonst die Metastasierung begünstigen. Nachdem Aspirin in den Prozess der Metastasierung einzugreifen scheint, könnte es möglicherweise bei allen Tumoren mit EMT-assoziiierter Metastasierung günstige Effekte besitzen.

Neben der onkologischen Betrachtungsweise ist eine Gesamtsicht auf die Patient*innen essenziell, um Auswirkungen einzelner Maßnahmen bezüglich Belastung und Nebenwirkungen der Patient*innen beurteilen zu können. Die Etablierung verlässlicher Qualitätsindikatoren ist dabei fundamental. Das *Textbook outcome* könnte hier einen Beitrag leisten, chirurgische Qualität nicht nur zu messen, sondern auch über Studien hinweg zu vergleichen. Es konnte hierzu von uns erstmalig eine krankheitsspezifische Definition von Faktoren, welche den idealen postoperativen Verlauf darstellen, erstellt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Habilitationsschrift die Bedeutung verschiedener Faktoren der Metastasierungstendenz und der perioperativen Morbidität in der onkologischen Viszeralchirurgie untersucht. Neue diagnostische und therapeutische Ansätze sowie qualitätsverbessernde perioperative Maßnahmen bieten das Potential, das Outcome der Patient*innen mit viszeralen Tumorerkrankungen zu verbessern.

4. Literatur

- [1] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 383, no. 9927, pp. 1490–1502, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [2] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin, "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008," *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 12, pp. 2893–2917, 2010, doi: 10.1002/ijc.25516.
- [3] S. Manfredi, C. Lepage, C. Hatem, O. Coatmeur, J. Faivre, and A. M. Bouvier, "Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer," *Ann. Surg.*, vol. 244, no. 2, pp. 254–259, 2006, doi: 10.1097/01.sla.0000217629.94941.cf.
- [4] S. Manfredi, A. M. Bouvier, C. Lepage, C. Hatem, V. Dancourt, and J. Faivre, "Incidence and patterns of recurrence after resection for cure of colonic cancer in a well defined population," *Br. J. Surg.*, vol. 93, no. 9, pp. 1115–1122, 2006, doi: 10.1002/bjs.5349.
- [5] M. A. G. Elferink, K. P. de Jong, J. M. Klaase, E. J. Siemerink, and J. H. W. de Wilt, "Metachronous metastases from colorectal cancer: a population-based study in North-East Netherlands," *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 30, no. 2, pp. 205–212, 2015, doi: 10.1007/s00384-014-2085-6.
- [6] G. Brandi *et al.*, "Adjuvant chemotherapy for resected colorectal cancer metastases: Literature review and meta-analysis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 2, pp. 519–533, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i2.519.
- [7] "Colorectal Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging," *American Cancer Society*, 2022. .
- [8] R. Dienstmann, L. Vermeulen, J. Guinney, S. Kopetz, S. Tejpar, and J. Tabernero, "Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 2, pp. 79–92, 2017, doi: 10.1038/nrc.2016.126.
- [9] A. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe and L. Onkologie, "S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1," *AWMF Regist. 021/0070L*, pp. 1–328, 2019.
- [10] A. B. Benson *et al.*, "Journal of the National Comprehensive Cancer Network, Colon Cancer, Version 1.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology," *NCCN Clin. Pract. Guidel. Oncol.*, vol. 19, no. 3, pp. 329–359, 2021.
- [11] E. Van Cutsem *et al.*, "ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1386–1422, 2016, doi:

- 10.1093/annonc/mdw235.
- [12] T. Yoshino *et al.*, "Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: A JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS," *Ann. Oncol.*, vol. 29, no. 1, pp. 44–70, 2018, doi: 10.1093/annonc/mdx738.
- [13] E. Pretzsch *et al.*, "Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread," *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/7407190.
- [14] M. L. Hui Cao, Enping Xu, Hong Liu, Ledong Wan, "Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review," *Pathol. - Research Pract.*, vol. 211, no. 8, pp. 557–569, 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.05.010>.
- [15] S. Brabletz, H. Schuhwerk, T. Brabletz, and M. P. Stemmler, "Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression," *EMBO J.*, vol. 40, no. 18, pp. 1–22, 2021, doi: 10.15252/embj.2021108647.
- [16] F. Van Roy, "Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 121–134, 2014, doi: 10.1038/nrc3647.
- [17] C. Peña *et al.*, "E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: Clinicopathological correlations," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 22, pp. 3361–3370, 2005, doi: 10.1093/hmg/ddi366.
- [18] E. Batlle *et al.*, "The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. February, pp. 84–89, 2000.
- [19] A. Cano *et al.*, "The transcription factor Snail controls epithelial – mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. February, pp. 76–83, 2000.
- [20] J. Comijn *et al.*, "The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 1267–1278, 2001.
- [21] J. Yang *et al.*, "Twist , a Master Regulator of Morphogenesis , Plays an Essential Role in Tumor Metastasis," *Cell*, vol. 117, no. 7, pp. 927–939, 2004.
- [22] X. Han *et al.*, "Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. 41335, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041335.

- [23] E. Vincan and N. Barker, "The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 25, no. 6, pp. 657–663, 2008, doi: 10.1007/s10585-008-9156-4.
- [24] S. Markowitz *et al.*, "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability," *Science (80-.)*, vol. 268, no. June, pp. 1336–1339, 1995.
- [25] S. D. Markowitz and M. M. Bertagnolli, "Molecular Basis of Colorectal Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, pp. 2449–2460, 2009.
- [26] H. Xiong *et al.*, "Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 8, pp. 5819–5832, 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.295964.
- [27] S. Suman, V. Kurisetty, T. P. Das, A. Vadodkar, and G. Ramos, "Activation of AKT Signaling Promotes Epithelial – Mesenchymal Transition and Tumor Growth in Colorectal Cancer Cells," *Mol. Carcinog.*, vol. 160, no. September 2013, pp. 151–160, 2014, doi: 10.1002/mc.22076.
- [28] M. Katoh, "Cross-talk of WNT and FGF Signaling Pathways at GSK3 β to Regulate β -catenin and SNAIL signaling cascades," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 4047, pp. 1059–1064, 2006, doi: 10.4161/cbt.5.9.3151.
- [29] J. Neumann *et al.*, "Cancer Stem Cell Markers Are Associated with Distant Hematogenous Liver Metastases but Not with Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer," *Cancer Invest.*, vol. 33, no. 8, pp. 354–360, 2015, doi: 10.3109/07357907.2015.1047507.
- [30] D. Horst *et al.*, "The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer," *J. Pathol.*, vol. 219, no. June, pp. 427–434, 2009, doi: 10.1002/path.
- [31] J. Neumann *et al.*, "SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer," *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, p. 518, 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-518.
- [32] E. Pretzsch, F. Bösch, B. Renz, J. Werner, M. Angele, and I. H. Chaudry, "Operative Trauma and Blood Loss - Impact on Tumor Growth and Recurrence," *Shock*, vol. 55, no. 4, pp. 455–464, 2021, doi: 10.1097/SHK.0000000000001656.
- [33] E. Pretzsch *et al.*, "Molecular Mechanisms of Ischaemia-Reperfusion Injury and Regeneration in the Liver-Shock and Surgery-Associated Changes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 10, pp. 1–14, 2022.

- [34] G. Shakhar and S. Ben-Eliyahu, "Potential prophylactic measures against postoperative immunosuppression: Could they reduce recurrence rates in oncological patients?," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 10, no. 8, pp. 972–992, 2003, doi: 10.1245/ASO.2003.02.007.
- [35] N. E. Kolfshoten *et al.*, "Focusing on desired outcomes of care after colon cancer resections; Hospital variations in 'textbook outcome,'" *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 39, no. 2, pp. 156–163, 2013, doi: 10.1016/j.ejso.2012.10.007.
- [36] S. K. Perera *et al.*, "Global demand for cancer surgery and an estimate of the optimal surgical and anaesthesia workforce between 2018 and 2040: a population-based modelling study," *Lancet Oncol.*, vol. 22, no. 2, pp. 182–189, 2021, doi: 10.1016/S1470-2045(20)30675-6.
- [37] J. Cloyd *et al.*, "Comprehensive Complication Index Validates Improved Outcomes Over Time Despite Increased Complexity in 3,707 Consecutive Hepatectomy," *Ann. Surg.*, vol. 271, no. 4, pp. 724–731, 2020, doi: 10.1097/SLA.0000000000003043.Comprehensive.
- [38] E. Pretzsch *et al.*, "EMT-related genes are unlikely to be involved in extracapsular growth of lymph node metastases in gastric cancer," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 229, no. September 2021, 2022, doi: 10.1016/j.prp.2021.153688.
- [39] H. Link *et al.*, "Extra-capsular growth of lymph node metastasis correlates with poor prognosis and high SOX9 expression in gastric cancer," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 483, pp. 1–10, 2018.
- [40] K. Nakamura, N. Ozaki, T. Yamada, and T. Hata, "Evaluation of prognostic significance in extracapsular spread of lymph node metastasis in patients with gastric cancer," *Surgery*, vol. 137, no. 5, pp. 511–517, 2005, doi: 10.1016/j.surg.2005.01.007.
- [41] T. Okamoto *et al.*, "Prognostic value of extracapsular invasion and fibrotic focus in single lymph node metastasis of gastric cancer," *Gastric cancer*, vol. 11, pp. 160–167, 2008, doi: 10.1007/s10120-008-0473-8.
- [42] I. Lee *et al.*, "Impact of extranodal extension on prognosis in lymph node-positive gastric cancer," *Br. J. Surg.*, vol. 101, no. 12, pp. 1576–1584, 2014, doi: 10.1002/bjs.9640.
- [43] H. Alakus *et al.*, "Extracapsular Lymph Node Spread -A Prognostic Factor in Gastric Cancer," *Cancer*, vol. 116, no. 2, pp. 309–315, 2010, doi: 10.1002/cncr.24764.
- [44] T. Asakage *et al.*, "A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition)," *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 49, no. 7, pp. 589–595, 2019, doi: 10.1093/jjco/hyz052.
- [45] N. F. Hacker, M. B. Bs, and H. I. Qld, "Staging for vulvar cancer," *Best Pract. Res. Clin. Obstet.*

- Gynaecol.*, vol. 29, no. 6, pp. 802–811, 2015, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.01.004.
- [46] K. Han *et al.*, “Predictive value for lymph node metastasis of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell marker expression in early gastric cancer,” *Pathol. - Res. Pract.*, vol. 213, no. 9, pp. 1221–1226, 2017, doi: 10.1016/j.prp.2017.03.010.
- [47] K. Okubo, Y. Uenosono, T. Arigami, and S. Yanagita, “Clinical significance of altering epithelial – mesenchymal transition in metastatic lymph nodes of gastric cancer,” *Gastric Cancer*, vol. 20, no. 5, pp. 802–810, 2017, doi: 10.1007/s10120-017-0705-x.
- [48] T. Murai, S. Yamada, and B. C. Fuchs, “Epithelial-To-Mesenchymal Transition Predicts Prognosis in Clinical Gastric Cancer,” *J. Surg. Oncol.*, vol. 109, no. 10, pp. 684–689, 2014, doi: 10.1002/jso.23564.
- [49] M. A. Kim, H. S. Lee, H. E. Lee, J. H. Kim, H. Yang, and W. H. Kim, “Prognostic importance of epithelial – mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma,” *Histopathology*, vol. 54, pp. 442–451, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03247.x.
- [50] E. Pretzsch *et al.*, “Molecular subtyping of gastric cancer according to ACRG using immunohistochemistry – Correlation with clinical parameters,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 231, no. December 2021, pp. 1–5, 2022, doi: 10.1016/j.prp.2022.153797.
- [51] P. Rawla and A. Barsouk, “Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention,” *Prz. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 1, pp. 26–38, 2019, doi: 10.5114/pg.2018.80001.
- [52] R. Cristescu *et al.*, “Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 5, pp. 449–456, 2015, doi: 10.1038/nm.3850.
- [53] N. Kemi, M. Eskuri, J. Ikäläinen, T. J. Karttunen, and J. H. Kauppila, “Tumor budding and prognosis in gastric adenocarcinoma,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 43, no. 2, pp. 229–234, 2019, doi: 10.1097/PAS.0000000000001181.
- [54] A. Lugli *et al.*, “Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016,” *Mod. Pathol.*, vol. 30, no. 9, pp. 1299–1311, 2017, doi: 10.1038/modpathol.2017.46.
- [55] E. Pretzsch *et al.*, “EMT-Related Genes Have No Prognostic Relevance in Metastatic Colorectal Cancer as Opposed to Stage II / III ;,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 5596, pp. 1–11, 2022.
- [56] H. Ren *et al.*, “Identification of an EMT-related Gene Signature Predicting Recurrence in Stage II/III Colorectal Cancer – A Retrospective Study in 1780 Patients,” *Ann. Surg.*, vol. Publish Ah,

- no. 5, pp. 897–904, 2022, doi: 10.1097/sla.0000000000005644.
- [57] V. Heinemann *et al.*, “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,” *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1065–1075, 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70330-4.
- [58] S. Jaitner *et al.*, “Olfactomedin 4 associates with expression of differentiation markers but not with properties of cancer stemness, EMT nor metastatic spread in colorectal cancer,” *J. Pathol. Clin. Res.*, no. November, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1002/cjp2.300.
- [59] J. Neumann *et al.*, “A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer,” *Histopathology*, vol. 60, no. 3, pp. 416–426, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04126.x.
- [60] L. G. van der Flier, A. Haegebarth, D. E. Stange, M. van de Wetering, and H. Clevers, “OLFM4 is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells,” *Gastroenterology*, vol. 137, no. 1, pp. 15–17, 2009, doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.035.
- [61] N. Barker *et al.*, “Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5,” *Nature*, vol. 449, no. 7165, pp. 1003–1007, 2007, doi: 10.1038/nature06196.
- [62] N. Barker, A. Van Oudenaarden, and H. Clevers, “Identifying the stem cell of the intestinal crypt: Strategies and pitfalls,” *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 452–460, 2012, doi: 10.1016/j.stem.2012.09.009.
- [63] A. Reynolds *et al.*, “Canonical Wnt signals combined with suppressed TGF β /BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium,” *Gut*, vol. 63, no. 4, pp. 610–621, 2014, doi: 10.1136/gutjnl-2012-304067.
- [64] W. Liu, J. Zhu, L. Cao, and G. P. Rodgers, “Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma,” *Histopathology*, vol. 51, no. 2, pp. 157–165, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02763.x.
- [65] N. Oue *et al.*, “Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients,” *Int. J. Cancer*, vol. 125, no. 10, pp. 2383–2392, 2009, doi: 10.1002/ijc.24624.
- [66] D. Kobayashi, S. Koshida, R. Moriai, N. Tsuji, and N. Watanabe, “Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells,” *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 334–340, 2007, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00397.x.

- [67] R. Grützmann *et al.*, "Systematic isolation of genes differentially expressed in normal and cancerous tissue of the pancreas," *Pancreatology*, vol. 3, no. 2, pp. 169–178, 2003, doi: 10.1159/000070087.
- [68] W. Liu, Y. Liu, J. Zhu, E. Wright, I. Ding, and G. P. Rodgers, "Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 1041–1049, 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4125.
- [69] S. Tomarev and N. Nakaya, "Olfactomedin Domain-Containing Proteins: Possible Mechanisms of Action and Functions in Normal Development and Pathology," *Mol Neurobiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 122–138, 2009, doi: 10.1007/s12035-009-8076-x.Olfactomedin.
- [70] H.-S. Kwon, H.-S. Lee, Y. Ji, J. S. Rubin, and S. I. Tomarev, "Myocilin Is a Modulator of Wnt Signaling," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 8, pp. 2139–2154, 2009, doi: 10.1128/mcb.01274-08.
- [71] N. Nakaya, H. S. Lee, Y. Takada, I. Tzchori, and S. I. Tomarev, "Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 31, pp. 7900–7910, 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0617-08.2008.
- [72] V. Korinek *et al.*, "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4," *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 4, pp. 379–383, 1998, doi: 10.1038/1270.
- [73] W. Liu, H. Li, S. H. Hong, G. P. Piszczek, W. Chen, and G. P. Rodgers, "Olfactomedin 4 deletion induces colon adenocarcinoma in ApcMin/+ mice," *Oncogene*, vol. 35, no. 40, pp. 5237–5247, 2016, doi: 10.1038/onc.2016.58.
- [74] W. Liu and G. P. Rodgers, "Olfactomedin 4 expression and functions in innate immunity, inflammation, and cancer," *Cancer Metastasis Rev. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 201–212, 2016, doi: 10.1007/s10555-016-9624-2.
- [75] R. Pardal, M. F. Clarke, and S. J. Morrison, "Applying the principles of stem-cell biology to cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 12, pp. 895–902, 2003, doi: 10.1038/nrc1232.
- [76] N. Seko *et al.*, "Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer," *Exp. Ther. Med.*, vol. 1, pp. 73–78, 2010, doi: 10.3892/etm.
- [77] D. Besson *et al.*, "A quantitative proteomic approach of the different stages of colorectal cancer establishes OLFM4 as a new nonmetastatic tumor marker," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 12, pp. 1–14, 2011, doi: 10.1074/mcp.M111.009712.
- [78] N. Wentzensen *et al.*, "Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma

- compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization.," *Int. J. Oncol.*, vol. 24, no. 4, pp. 987–994, 2004, doi: 10.3892/ijo.24.4.987.
- [79] E. Pretzsch *et al.*, "LIN28 promotes tumorigenesis in colorectal cancer but is not associated with metastatic spread," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 228, no. September, p. 153669, 2021, doi: 10.1016/j.prp.2021.153669.
- [80] J. Zhou, S. B. Ng, and W. J. Chng, "LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 5, pp. 973–978, 2013, doi: 10.1016/j.biocel.2013.02.006.
- [81] Q. Hu *et al.*, "Lin28B is a novel prognostic marker in gastric adenocarcinoma," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 8, pp. 5083–5092, 2014.
- [82] H. Xiong *et al.*, "Oncogenic mechanisms of Lin28 in breast cancer: New functions and therapeutic opportunities," *Oncotarget*, vol. 8, no. 15, pp. 25721–25735, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14891.
- [83] H. C. Tu *et al.*, "LIN28 cooperates with WNT signaling to drive invasive intestinal and colorectal adenocarcinoma in mice and humans," *Genes Dev.*, vol. 29, no. 10, pp. 1074–1086, 2015, doi: 10.1101/gad.256693.114.
- [84] C. E. King, M. Cuatrecasas, A. Castells, A. R. Sepulveda, J. S. Lee, and A. K. Rustgi, "LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 12, pp. 4260–4268, 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4637.
- [85] Y. Ye, B. Madison, X. Wu, and A. K. Rustgi, "A LIN28B polymorphism predicts for colon cancer survival," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 13, no. 14, pp. 1390–1395, 2012, doi: 10.4161/cbt.22336.
- [86] M. Pang *et al.*, "LIN28B promotes colon cancer migration and recurrence," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, pp. 1–6, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0109169.
- [87] E. Pretzsch *et al.*, "Effect of platelet inhibition with perioperative aspirin on survival in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer: a propensity score matched analysis," *BMC Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1186/s12893-021-01083-9.
- [88] N. M. Bambace and C. E. Holmes, "The platelet contribution to cancer progression," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. 2, pp. 237–249, 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x.
- [89] M. Labelle and R. O. Hynes, "The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 12, pp. 1091–1099, 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0329.The.

- [90] A. Chan, S. Ogino, and C. Fuchs, "Aspirin Use and Survival After Diagnosis of Colorectal Cancer Andrew," *JAMA*, vol. 302, no. 6, pp. 649–658, 2009, doi: 10.1001/jama.2009.1112.Aspirin.
- [91] P. M. Rothwell, M. Wilson, J. F. Price, J. F. F. Belch, T. W. Meade, and Z. Mehta, "Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: A study of incident cancers during randomised controlled trials," *Lancet*, vol. 379, no. 9826, pp. 1591–1601, 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60209-8.
- [92] P. J. Marang-Van De Mheen *et al.*, "The relative importance of quality of care information when choosing a hospital for surgical treatment: A hospital choice experiment," *Med. Decis. Mak.*, vol. 31, no. 6, pp. 816–827, 2011, doi: 10.1177/0272989X10386799.
- [93] J. Dijs-Elsinga *et al.*, "Choosing a hospital for surgery: the importance of information on quality of care.," *Med. Decis. Making*, vol. 30, no. 5, pp. 544–555, 2010, doi: 10.1177/0272989X09357474.