

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C.- T. Germer
Molekulare Onkoimmunologie
Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

**Über die prognostische Wertigkeit der präoperativen Serumspiegel
von AXL, C-MET, ALDH1 und ALCAM
und ihre Rolle als Tumorstammzellmarker beim
rektalen Karzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Efstathia Nikolakopoulou
aus Pyrgos Ilias
Griechenland

Würzburg, Februar 2019

Referent: Prof. Dr. med. M. Gasser

Korreferent: Prof. Dr. med. Volker Kunzmann

Dekan: Prof. Dr. med M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. GRUNDLAGEN	1
1.1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.1.2. Anatomische Grundlagen	1
1.1.3. Ätiologie	2
1.1.4. Pathogenese	3
1.1.5. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung	5
1.2. DIAGNOSTIK	7
1.2.1. Screening	7
1.2.2. Präoperative Untersuchung	7
1.3. THERAPIE UND PROGNOSE	8
1.3.1. Kurative Operationsverfahren	8
1.3.2. Neoadjuvante Therapieverfahren	9
1.3.3. Adjuvante Therapieverfahren	9
1.3.4. Tumorspezifische Therapien bei metastasiertem KRK	10
1.3.5. Palliative Therapie und Klassifikation des Residualtumors	10
1.3.5. Nachsorge	11
1.3.6. Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSCs) und CSC Biomarker	11
1.4. KANDIDATEN FÜR NEUE CSC TUMORMARKER	12
1.4.1. Das Protein AXL	12
1.4.1.1. Proteinstruktur und Liganden	13
1.4.1.2. Signalkaskade	14
1.4.1.3. Aktivierung des Gas6/Axl Signalwegs in Tumorzellen	15
1.4.2. Das C-MET Protein	16
1.4.2.1. Proteinstruktur	16
1.4.2.2. Signalkaskade	17
1.4.2.3. Rolle von C-MET bei Tumorerkrankungen	18
1.4.3. Das Protein ALDH1	19
1.4.3.1. Struktur und Funktionsweise	19
1.4.3.2. Rolle von ALDH1 bei Tumorerkrankungen	20
1.4.4. Das Protein ALCAM	20
1.4.4.1. Proteinstruktur	21
1.4.4.2. Rolle von ALCAM bei Tumorerkrankungen	21
1.5. ZIELE DER ARBEIT	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. PATIENTENGUT	23
2.2. LABORMETHODEN	24
2.3. STATISTISCHE METHODEN	24
2.3.1. Chi-Quadrat Test	25
2.3.2. Unpaired t-Test	25
2.3.3. One-way Anova	25
2.3.4. Kaplan-Meier- Schätzung	25

3. ERGEBNISSE	26
3.1. ALLGEMEINE AUSWERTUNG DER PATIENTENBEZOGENEN DATEN	26
3.1.1. GESCHLECHTS- UND ALTERSVERTEILUNG, TUMORSTADIUM NACH TNM UND UICC	26
3.1.2. EINFLUSS PROGNOSERELEVANTER FAKTOREN AUF DAS TUMORBEDINGTE ÜBERLEBEN	28
3.2. VERGLEICH DER SERUMSPIEGEL VON AXL, C-MET, ALCAM UND ALDH1 BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM UND GESUNDEN PROBANDEN	29
3.2.1. VERGLEICH DER SERUMSPIEGEL VON AXL BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM UND KONTROLLPERSONEN SOWIE DES THERAPIEEINFLUSSES	29
3.2.2. VERGLEICH DER SERUMSPIEGEL VON ALCAM BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM UND KONTROLLPERSONEN SOWIE DES THERAPIEEINFLUSSES	32
3.2.3. VERGLEICH DER SERUMSPIEGEL VON ALDH1 BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM UND KONTROLLPERSONEN SOWIE DES THERAPIEEINFLUSSES	33
3.2.4. VERGLEICH DER SERUMSPIEGEL VON C-MET BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM UND KONTROLLPERSONEN SOWIE DES THERAPIEEINFLUSSES	35
3.3. KORRELATION DER SERUMSPIEGEL MIT PROGNOSERELEVANTEN FAKTOREN	37
3.4. ASSOZIATION ZWISCHEN AXL, C-MET, ALCAM UND ALDH1 UND GESAMTÜBERLEBEN/KRANKHEITSFREIEM ÜBERLEBEN DER PATIENTEN	40
3.5. KORRELATION ZWISCHEN AXL, C-MET, ALCAM UND ALDH1 UND THERAPIEANSPRECHEN	42
3.6. KORRELATION ZWISCHEN AXL, C-MET, ALCAM UND ALDH1	43
4. DISKUSSION	44
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. LITERATURVERZEICHNIS	50
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
8. DANKSAGUNG	
9. LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

1.1. Grundlagen

1.1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen und stellt derzeit weltweit bei Männern die dritthäufigste und bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Die altersstandardisierte Inzidenzrate des KRK ist häufiger bei Männern (20,6 pro 100.000) als bei Frauen (14,3 pro 100.000). Das Erkrankungsrisiko steigt mit fortschreitendem Alter stetig an. Dem entspricht ein mittleres Erkrankungsalter von 71 Jahren bei Männern bzw. 75 Jahren bei Frauen. Mehr als die Hälfte der Betroffenen erkrankt jenseits des 70. Lebensjahres, nur etwa 10 % vor dem 55. Lebensjahr. Das rektale Karzinom tritt meist schon etwas früher auf als proximale und distale Kolontumoren: 63 Jahre bei Frauen und 65 Jahre bei Männern. Betrachtet man die Mortalität der Erkrankung so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate beim Rektumkarzinom mit 66,5% nur geringfügig höher als die des Kolonkarzinoms (64,2%). Das stadienspezifische Überleben ist jedoch bei beiden Tumoren nahezu gleich.

1.1.2. Anatomische Grundlagen

Als Kolonkarzinome werden diejenigen Tumore bezeichnet, deren aboraler Rand mehr als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt liegt ¹. Die arterielle Blutversorgung erfolgt für das rechte Kolon und das Querkolon über die Arteria mesenterica superior (A. mesent. sup.), während die Abschnitte distal der Flexura lienalis über die Arteria mesenterica inferior (A. mesent. inf.) versorgt werden. Der venöse Abfluss des rechten Hemikolons und Colon transversum erfolgt parallel zu den arteriellen Gefäßen, während sich das Blut aus dem linken Hemikolon in der Vena mesenterica inferior (V. mesent. inf.) sammelt, mit der V. lienalis zusammenfließt und in der Pfortader endet. Der Lymphabfluss erfolgt ebenfalls entlang der Arterien und umfasst 4 Lymphknotenstationen: epikolische, parakolische, intermediäre und zentrale (aorten-nahe).

Rektumkarzinome werden je nach Region des Auftretens in obere, mittlere und untere Karzinome unterteilt ². Die arterielle Blutversorgung erfolgt dementsprechend über die

Arteria rectalis superior, media und inferior. Das venöse Blut fließt aus den oberen Rektalgefäßen über die V. mesent. inf. in die Pfortader. Die mittleren und unteren Rektalgefäße münden über die V. iliaca interna in die V. cava inferior. Der lymphogene Abfluss erfolgt ebenfalls in 2 Richtungen: Tumoren des oberen und mittleren Rektumdrittels drainieren größtenteils entlang der A. rectalis superior, während diejenigen im unteren Rektumdrittel nach kranial und lateral entlang der A. rectalis media drainieren. Tumorbedingte Lymphbahnblockaden können allerdings auch retrograde Drainage verursachen.

Aus der Blut- und Lymphdrainage lassen sich die Metastasierungswege des kolorektalen Karzinoms herleiten: die hämatogene Ausbreitung folgt dem venösen Abfluss über die V. portae in die Leber bzw. beim distalen Rektumkarzinom über die V. cava inferior primär in die Lunge. Leber (75%) und Lunge (15%) sind dementsprechend am häufigsten betroffen. Erst danach folgen andere Organe bzw. das Gehirn (Kaskadentheorie). Bei 25% aller Tumoren sind bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen nachweisbar. Bei mehr als 50% der Patienten entwickeln sich diese im Laufe der Zeit³.

Die lymphogene Metastasierung des Kolonkarzinoms erfolgt in der Regel sequentiell, d.h. über die epikolischen und parakolischen Lymphknoten an den Marginalgefäßen der Darmwand entlang zu den intermediären Lymphknoten und dann zu den zentralen Lymphknoten an den Gefäßstämmen. In etwa 5% der Fälle können aber auch sogenannte "Skip-Metastasen" vorkommen, die Lymphknotenstationen überspringen⁴.

Die lymphogene Metastasierung des Rektumkarzinoms erfolgt in 3 Richtungen je nach Tumorlokalisation. Tumoren des oberen Drittels infiltrieren hauptsächlich die paraaortalen Lymphknoten. Je weiter distal der Primärtumor lokalisiert ist, desto häufiger sind zusätzlich iliakale bzw. inguinale Lymphknoten betroffen.

1.1.3. Ätiologie

Die Ätiologie des KKR ist mit vielen verschiedenen Einflussfaktoren verbunden. Eine ballaststoffarme Diät mit einer gleichzeitigen fleischreichen Ernährung (vor allem rohes Fleisch) gilt als sichere Risikofaktoren bei der Karzinogenese. Darüber hinaus sind Fettleibigkeit und mangelnde körperliche Aktivität mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert. Nikotin- und Alkoholkonsum sind ebenfalls positiv

korreliert mit der Entstehung eines KRK. Zu den Risikogruppen gehören des Weiteren Patienten mit langjährig bestehender Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn ⁵. Dementsprechend könnte eine frühzeitige Intervention in Form einer medikamentösen oder chirurgischen Behandlung das Malignomrisiko bei den betroffenen Individuen deutlich reduzieren. Schließlich stellt auch eine positive Familienanamnese einen wesentlichen Risikofaktor für das Auftreten eines KRK dar ¹. Allerdings ist nur ein kleiner Teil der Tumore (5-10%) hereditär bedingt. Das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC; oder auch als Lynch-Syndrom bekannt) stellt die häufigste Form der hereditären KRK Syndrome dar, während die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) wesentlich seltener auftritt ⁶.

Für das HNPCC sind Mutationen der DNA Mismatch-Repair-Gene (MMR Gene) verantwortlich. Bei Inaktivierung dieser Gene ist die Reparatur von DNA Schäden gestört, sodass sich Mutationen im zellulären Genom anhäufen und es in Folge zu unkontrollierter Zellproliferation kommt. Das HNPCC ist daher auch mit der Entstehung zahlreicher weiterer maligner Tumoren assoziiert. Hierzu zählen z.B. Endometriumkarzinome, Ovarialkarzinome sowie Magen-, Urothel- und Pankreaskarzinome ^{7,8}.

Bei der FAP handelt es sich ursächlich um eine Mutation des Adenomatosis-Polyposis-Coli-(APC-) Gens, das autosomal-dominant vererbt wird ⁹. Schon im Alter von 30 Jahren haben sich bei den betroffenen Personen zumeist zahlreiche Polypen in Kolon und Rektum entwickelt. Bis zum 40. Lebensjahr erfolgt dann in der Regel die Progression zum Karzinom ¹⁰. Bei Patienten mit FAP stellt eine Kolektomie bereits im Alter von 20 Jahren die einzige effektive Maßnahme zur Prävention eines KRK dar.

1.1.4. Pathogenese

Im Vordergrund der Entstehung des KRK steht die Theorie der Adenom-Karzinom Sequenz, d.h. aus gutartigen Vorstufen heraus entwickelt sich allmählich (meist nach 7-10 Jahren) ein Karzinom ¹¹. Die molekularbiologischen Mechanismen, die an der Pathogenese des KRK beteiligt sind, werden in 2 Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe beinhaltet die Aktivierung von Proto-Onkogenen (K-Ras-Gene), während die andere Gruppe durch einen Funktionsverlust von Tumorsuppressor-Genen (APC, DCC, p53) charakterisiert ist. Dies kommt durch verschiedene molekulare Prozesse zu Stande.

Hierzu zählen unter anderem Punktmutationen, genetische Rekombinationen oder Änderungen der Promotoraktivität z.B. durch Methylierung (ein Prozess, der zum sogenannten „Gene-silencing“ und damit zum Funktionsverlust des betroffenen Gens führt). So steht bei der familiären Adenomatosis Polyposis Coli (APC) die Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens ganz am Anfang der Sequenz der Tumorentstehung. Aufgrund der erblich bedingten Inaktivierung eines Allels des APC Gens (autosomal dominante Erkrankung) führt bereits die zufällige Inaktivierung des einen noch intakten Allels zur Einleitung der Adenom-Karzinom Sequenz. Hierbei führt der Verlust des APC-Gens zur Anreicherung von intrazellulärem β -Catenin, was wiederum im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt und die Zellproliferation triggert. Der Zellzyklus wird damit gestört und es kommt zur unkontrollierbaren Ausbildung von hunderten Polypen im Kolon. Die Adenom-Karzinom Sequenz wird so stark beschleunigt, dass es schon im jungen Erwachsenenalter zur Entstehung eines Karzinoms kommt ¹².

Bei den sporadischen Tumoren steht in der Regel die Aktivierung von K-ras Proto-Onkogenen am Anfang der Karzinogenese. Sie ist bei etwa 40-50% aller KRK nachweisbar ¹³. K-ras spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion für Zellwachstum und Zelldifferenzierung ¹⁴. Einzelne Punktmutationen im K-ras Gen führen dabei zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs ¹⁰. Neben K-ras stellt die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 (Chromosom 17p) ebenfalls einen zentralen Schritt in der Karzinomentwicklung dar. Sie ist ebenso bei etwa 50% aller KRK nachweisbar ¹³. Das p53 Protein ist der zentrale Regulator, der bei DNA Schäden den Zellzyklus bis zur Reparatur des Schadens unterbricht ¹⁵. Die Zelle gewinnt damit Zeit, entweder den DNA-Schaden zu reparieren oder, bei erfolgloser Reparatur oder extensiven Schäden, den programmierten Zelltod (Apoptose) einzuleiten. Somit verhindert p53 effizient die Proliferation genomisch suspekter bzw. entartender Zellen. Eine Inaktivierung beider Kopien des p53 Gens, bzw. das Auftreten dominant negativer Mutationen, stellt daher einen der wesentlichen Schritte auf dem Weg vom Adenom zum Karzinom dar ¹⁰.

1.1.5. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung

Makroskopisch lassen sich 4 Wachstumsformen des KRK definieren:

1. Das *ulzeröse* Karzinom wächst zirkulär oder oval und infiltriert die Darmwand in der Regel tief. Sowohl eine frühe lymphatische Metastasierung als auch tumorbedingte Wandperforation sind für diese Wachstumsform charakteristisch.
2. Der *polypoide* Typ wächst häufig gelappt, infiltriert die Wand nicht so tief und wird vor allem in Zökum und Kolon ascendens gefunden.
3. Die *zirkulär* oder *anulär* wachsende Form nimmt die ganze Wandzirkumferenz ein und führt häufig zu kurzen oder sogar länger-streckigen Stenosen, die sich naturgemäß häufig als Ileus manifestieren. Diese Art von Karzinomen tritt meistens im Kolon transversum, Kolon descendens und im Rektum auf. Nur ganz selten wächst das KRK diffus und infiltriert über größere Areale hinweg die Darmwand.
4. Eine seltenere Form des KRK sind *flache* oder *flach-prominente* Tumoren. Dabei handelt es sich zumeist um leicht erhabene Karzinome mit zentraler Einsenkung und oder Ulzeration. Die Veränderungen können bei der Koloskopie leicht übersehen werden.

Histologisch handelt es sich beim KRK so gut wie immer um Adenokarzinome. Die histopathologische Beschreibung des Differenzierungsgrades (Grading) benutzt eine Nummerierung von 1-4 (G1-G4) entsprechend der Adjektive: gut, mäßig, schlecht und undifferenziert. Weiter können die Karzinome auch in Low-grade-Karzinome (G1, G2) und High-grade-Karzinome (G3, G4) eingeteilt werden. Dukes konnte nachweisen, dass das Grading unmittelbar mit dem Ausmaß von Lymphknoten- und Fernmetastasierung zusammenhängt^{16,17}. Des Weiteren wurde später festgestellt, dass auch die Wahrscheinlichkeit venöser und lymphatischer Gefäßeinbrüche und die lokale Tumorausdehnung mit dem Ausmaß der De-differenzierung korrelieren. Für die Stadieneinteilung des KRK wird die 1932 von Dukes vorgeschlagene und später von Astler und Coller¹⁸ modifizierte Klassifikation verwendet, wobei allerdings die TNM-Tumorklassifikation nach UICC heute weitaus gebräuchlicher ist¹⁹⁻²¹.

Im Folgenden ist die Stadieneinteilung des KRK nach der TNM-Klassifikation (Tumor-Node-Metastasis-System) beschrieben (siehe Tab. 1).

TNM	
	Primärtumor (T)
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltrierte die Submukosa
T2	Tumor infiltrierte die Muscularis propria
T3	Tumor infiltrierte die Subserosa oder perirektales Gewebe
T4a	Tumor perforierte viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltrierte andere Organe oder Strukturen
	Regionäre Lymphknoten (N)
Nx	regionäre Lymphknoten sind nicht beurteilbar
N0	kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
N1b	Metastase in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumor setzt sich in Subserosa, Mesenterium oder nicht-peritoneales Perirektales/Perikolisches Gewebe ab, ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
	Fernmetastasen (M)
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Metastasierung auf ein Organ beschränkt (z.B. Leber, Lunge)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder Seite, Peritoneal- Metastase

Tab. 1: TNM- Klassifikation des KRK nach der UICC

Je Ausdehnung des Tumors können die Tumorstadien in UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) Stadien zusammengefasst werden. Das Vorgehen dieser Einteilung nennt man auch „Staging“. Es erlaubt eine bessere Vorhersage für den weiteren Verlauf der Erkrankung. Mit dieser international einheitlichen Klassifikation lassen sich zudem weltweit durchgeführte Studien miteinander vergleichen.

UICC STADIEN	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

Tab. 2: UICC Klassifikation des KRK

1.2. Diagnostik

1.2.1. Screening

Ziel der Screeningprogramme ist die frühzeitige Erkennung und Diagnose von kolorektalen Karzinomen, um die Heilungschancen der Patienten zu verbessern. Die American Cancer Society empfiehlt ein generelles Screening inklusive Koloskopie jenseits des 50. Lebensjahres für asymptomatische Individuen, während bei Risikogruppen ein Screening bereits vor dem 50. Lebensjahr indiziert ist ²². Dieses sollte bei unauffälligem Befund nach 10 Jahren wiederholt werden. Durch Koloskopie und erfolgreiche koloskopische Polypektomie lässt sich eine Reduktion der KRK-bedingten Mortalität um über 50% erreichen ²³.

1.2.2. Präoperative Untersuchung

Das Ziel der präoperativen Untersuchung ist die Feststellung der genauen Lokalisation, Größe, Ausbreitung und Histologie des Primärtumors sowie der Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen. Hiermit lässt sich dann eine optimal angepasste Therapie durchführen. Zudem sollte auch eine Koloskopie des gesamten Kolons

durchgeführt werden, um Zweittumoren auszuschließen, die sich in 2-3% aller Fälle nachweisen lassen.

Parallel zum üblichen Routinelabor sollten präoperativ die Serumwerte für einzelne Tumormarker bestimmt werden. Tumormarker sind körpereigene Substanzen (zumeist tumorale Proteine), deren erhöhte Konzentrationen hinweisend auf das Vorliegen, das Ausmaß oder die Prognose der Tumorerkrankung liefern können²⁴. Mit ihnen lässt sich der Therapieerfolg beurteilen sowie ggf. ein Rezidiv noch vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisen.

Für das KRK eignen sich besonders das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das Carbohydratantigen 19-9 (CA 19-9) in Kombination miteinander²⁵. Das CEA umfasst eine Gruppe heterogener Zelloberflächenglykoproteine mit noch unklarer Funktion. Das CEA ist auch bei gesunden Individuen in niedrigen Konzentrationen im Serum nachzuweisen (1,5-5,0 ng/ml), ist aber bei unterschiedlichen Karzinomen und besonders bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes häufig sehr stark erhöht. Das CA 19-9 ist ein Glykolipid, das sich vom Lewis-Blutgruppensystem ableitet. Der obere Grenzwert beträgt 37 U/ml.

1.3. Therapie und Prognose

1.3.1. Kurative Operationsverfahren

Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms beinhaltet die Resektion des Tumors im Gesunden und eine partielle oder totale En-bloc-Entfernung des Mesorektums und des regionären Lymphabflussgebietes²⁶. Bei einer Tumordinfiltration des Sphinkters und einem intramuralen Sicherheitsabstand kleiner 2 cm zwischen Tumorrand und Linea dentata kann die abdominoperineale Rektumextirpation (APR) mit Anlage eines endständigen Anus praeter (Kolostoma) nicht umgangen werden. Dies ist die radikalste Form der Rektumresektion mit TME inklusive der Resektion des Sphinkterapparates und des Beckenbodens.

1.3.2. Neoadjuvante Therapieverfahren

Bei T4-Tumoren bzw. nodal positiven Tumoren des Rektums empfiehlt sich eine präoperative Radio- bzw. Radiochemotherapie, wenn aufgrund des präoperativen Stagings eine R0-Resektion nicht mehr möglich ist. Ziel ist die Verkleinerung der Tumorgröße („Downstaging“) mit anschließender R0 Resektion. Häufig erlaubt dies eine verbesserte R0-Resektion des Tumors bei Sphinkter-erhaltender (und damit kontinenz-erhaltender) Operation. Zudem kann häufig durch die neoadjuvant bedingte Tumorverkleinerung ein vorerst inoperabler Tumor in einen operablen Zustand überführt werden²⁷.

Bei Patienten mit R0-resektablem Rektumkarzinom ist eine neoadjuvante Therapie zur Abnahme der Lokalrezidivrate indiziert. Beim Rektumkarzinom ist die präoperative Strahlentherapie mit geringeren Nebenwirkungen verbunden als eine postoperative Strahlentherapie, da sich präoperativ in der Regel weniger Darmschlingen im kleinen Becken befinden. Allerdings besteht das Risiko der neoadjuvanten „Übertherapie“ vor allem bei Tumoren in frühen, d.h. nodal negativen Stadien (präoperatives „Overstaging“), von der die Patienten somit nicht profitieren.

1.3.3. Adjuvante Therapieverfahren

Das zentrale Ziel der adjuvanten Therapie ist es, die Rate von lokalen Rezidiven und Fernmetastasen zu minimieren und somit die Heilungschancen der Patienten zu erhöhen. Voraussetzung hierfür ist jedoch - sowohl für das Kolon- als auch für das Rektumkarzinom - eine R0-Resektion (kein Residualtumor) des Primärtumors. Erst bei nodal positiven Kolonkarzinomen im *UICC Stadium III* ist eine adjuvante *Chemotherapie* indiziert. Als Kombination der Wahl wird das sogenannte FOLFOX Schema empfohlen, bestehend aus: 5-Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin über 6 Monate. Ähnliche Chemotherapie-Schemata stellen das XELOX-Schema (Capecitabin und Oxaliplatin), sowie das FOLFIRI-Schema (Austausch von Oxaliplatin gegen Irinotecan) dar²⁸. Für Tumoren im mittleren und unteren Rektumdrittel im *UICC Stadium II und III* wird hingegen die präoperative *Radiochemotherapie* empfohlen²⁹. Der Bestrahlung kommt dabei eine besondere Bedeutung hinzu. Aktuelle Studien zeigen, dass durch stereotaktische Bestrahlung ein signifikant verlängertes 5-Jahres-

Überleben, eine geringere Metastasierungstendenz sowie eine signifikant verringerte Zahl an Lokalrezidiven erreicht werden kann³⁰.

1.3.4. Tumorspezifische Therapien bei metastasiertem KRK

Die Überlebenszeit der Patienten mit metastasiertem KRK hat sich innerhalb der letzten 20 Jahre deutlich verlängert. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit metastasiertem KRK beträgt heute etwa 30 Monate³¹. Diese Überlebenszeit-Verlängerung ist nicht nur auf verbesserte OP-Techniken und eine wirksamere adjuvante Therapie, sondern insbesondere auf die Einführung neuer tumorspezifischer Therapien zurückzuführen. Für das KRK gibt es derzeit drei wesentliche tumorzielte Therapie-Gruppen: (i) monoklonale Antikörper gegen EGFR (Epidermal Growth Factor Rezeptor): *cetuximab* und *panitumumab*, (ii) monoklonale Antikörper gegen VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A): *bevacizumab* sowie (iii) entweder Fusionsproteine (z.B. *aflibercept*) oder small-molecule Multikinase Inhibitoren (z.B. *regorafenib*) gegen multiple proangiogenetische Wachstumsfaktoren. Diese neuen Therapie-Optionen können sowohl alternativ zur Chemotherapie (bei Chemotherapie-refraktären Tumoren) als auch in Kombination mit unterschiedlichen Chemotherapie-Schemata eingesetzt werden und führen dabei zur Verlängerung des krankheitsfreien und gesamten Überlebens der Patienten³¹.

1.3.5. Palliative Therapie und Klassifikation des Residualtumors

Eine palliative Therapie des KRK ist bei R1- bzw. R2-Resektion des Primärtumors indiziert. Eine R1-Resektion bedeutet, dass der Primärtumor bzw. die Fernmetastasen zwar makroskopisch vollständig entfernt wurden, histologisch jedoch an den Resektionsrändern noch Tumorelemente nachgewiesen werden können. Eine R2-Resektion liegt vor, wenn der Primärtumor bzw. die Fernmetastasen operativ nicht entfernt werden konnten oder der Tumor nach Meinung des Operateurs makroskopisch nicht komplett im Gesunden entfernt wurde.

Residualtumorklassifikation:

R0 = kein Residualtumor

R1 = mikroskopischer Residualtumor

R2 = makroskopischer Residualtumor

Bei diffusen, nicht resektablen Metastasen ist eine Chemotherapie mit 5-FU und Folinsäure durchzuführen. Bei inoperablem Kolon- bzw. Rektumkarzinom besteht die Möglichkeit der Anlage eines Anus praeter naturalis.

1.3.5. Nachsorge

Die regelmäßige Nachsorgeuntersuchung zielt auf die frühzeitige Erkennung und Therapie von Tumorrezidiven, erfasst aber auch negative Operationsfolgen und ermöglicht die Kontrolle und Beurteilung von Therapieerfolgen. Bei Risikopatienten mit HNPCC und FAP sollte zudem eine engmaschige Kontrolle zur rechtzeitigen Erkennung extrakolonischer Zweitumoren durchgeführt werden. Die Nachsorge wird nach den anerkannten Leitlinien (AMWF, Deutsche Krebsgesellschaft) bzw. nach den Empfehlungen der Tumorzentren durchgeführt. Heutzutage werden die kolorektalen Karzinome stadienabhängig und risikoadaptiert nachgesorgt³². Hierbei kommt jetzt der Bestimmung der Tumormarker eine hohe Wertigkeit zu. Besonders der Tumormarker CEA weist eine hohe Sensitivität in Bezug auf Lokalrezidive und neu aufgetretene Lebermetastasen auf. Umso wichtiger ist für die Zukunft die Identifizierung neuer Biomarker, welche einen sensitiven und spezifischen Nachweis von Tumorrezidiven bzw. eine bessere und genauere Prognoseeinschätzung beim KRK ermöglichen.

1.3.6. Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSCs) und CSC Biomarker

Die Theorie von Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSCs) wurde erstmals von Hamburger und Salmon in den 1970 Jahren dargelegt. Sie beobachteten, dass nur ein geringer Prozentsatz der Tumorzellen zur Bildung von Zellkolonien im Agar fähig war und bei der Transplantation in eine Maus einen Tumor generieren konnte³³. Diese spezifische Untergruppe von Tumorzellen, die nur ein kleiner Teil der Haupt-Tumormasse darstellt, scheint die Eigenschaften der normalen Stammzellen zu besitzen, nämlich die Fähigkeit der Selbstregeneration und der Pluripotenz. Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Initiation und Progression von Tumoren sowie bei Tumorrezidiven³⁴. Ein weiteres Charakteristikum dieser Tumorzellpopulation ist ihre erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie. Diese Eigenschaft ist zumindest zum Teil durch eine hohe Expression von Arzneistofftransportern bedingt, die z.B. alkylierende Agenzien aus der Zelle herauspumpen und damit eine effektive Schädigung der Tumorzellen durch die Chemotherapie verhindern. Gegenstand aktueller Forschung ist die Suche nach tumorstammzell-spezifischen Oberflächenmarkern und molekularen

Signalwegen, um die Tumorstammzellen von normalen Zellen sowie von normalen Stammzellen unterscheiden zu können und ggf. gezielt zu erkennen bzw. zu eliminieren. Aus der derzeitigen Literatur ergibt sich eine Reihe solcher möglichen Tumorstammzellmarker, welche mit dem KRK assoziiert wurden. Unter anderem sind hier CD44, CD24, CD133, CD166, EpCAM, LGR5, ALDH1, ALCAM zu erwähnen³⁵⁻³⁷. Besonders CD133 zeigt sich einer neuen Studie zufolge als der geeignetste, einzelne Marker, dessen hohe Expression mit einer niedrigen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten einhergeht³⁸. In dieser Studie wurde zudem nachgewiesen, dass eine kombinierte Analyse von CD133, CD44 und CD166 eine höhere prognostische Aussagekraft besitzt sowie die Differenzierung von niedrig- und hoch-Risiko Patienten mit KRK erlaubt. Die CSC Hypothese stellt zentrale Aspekte der gegenwärtigen diagnostischen und therapeutischen Ansätze in Frage. CSC stellen somit sehr interessante Ziele für neue Konzepte bei Screening, Früherkennung, Prävention und Behandlung von KRK dar^{39,40}. Neue CSC Biomarker könnten zudem eine individualisierte Beurteilung des Therapieverlaufs ermöglichen.

1.4. Kandidaten für neue CSC Tumormarker

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Proteine auf ihre Eignung als Tumormarker von CSC beim KRK untersucht. Hierzu gehörten die beiden Tyrosinkinase (AXL und C-MET) sowie die bereits bekannten Tumormarker Aldehyd Dehydrogenase (ALDH1) und das zelluläre Adhäsionsmolekül ALCAM³⁵⁻³⁷. Im Folgenden werden die Eigenschaften dieser vier Proteine sowie ihre Rolle in der Tumorigenese beschrieben.

1.4.1. Das Protein AXL

AXL gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase Rezeptoren. Der Name stammt vom griechischen Wort *anexelkto* (*ανεξέλεγκτο*), was „unkontrollierbar“ bedeutet. Axl wurde erstmals in Tumorzelllinien von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) entdeckt⁴¹. Es stellt den Gründer einer besonderen Gruppe von Tyrosinkinase Rezeptoren dar, die TAM heißen (*Tyros3*, *Axl*, und *Mertk*). Membranständige Tyrosinkinase Rezeptoren (RTK) wie AXL übernehmen zentrale Aufgaben in der Zell-Zell-Kommunikation. Nach der Bindung eines Liganden auf der extrazellulären Seite des Rezeptors phosphoryliert die intrazelluläre Domäne des Rezeptors zunächst sich selbst an einem eigenen Tyrosinrest (Autophosphorylierung) und im Nachhinein die

Targetproteine im Signalweg. Somit wird die intrazelluläre Signaltransduktion eingeleitet. Die Phosphorylierung der RTKs sowie ihrer Targetproteine stellt eines der wichtigsten Ereignisse in der Regulation von zahlreichen Zelltätigkeiten dar. Zahlreiche Tyrosinkinase Rezeptoren und Signalwege sind für die Initiation und Aufrechterhaltung tumorfördernder Prozesse notwendig.

1.4.1.1. Proteinstruktur und Liganden

AXL besitzt ein Molekulargewicht von 100-140 kDa. Wie alle Tyrosinkinasen der TAM Familie besteht es aus einem extrazellulären (N-terminal) Teil, der 2 Immunglobulin (Ig) - und 2 Fibronectin Typ III -(FN III) Motive beinhaltet, einem transmembranären und einem intrazellulären (C-terminal) Teil, der für die katalytische Funktion des Enzyms verantwortlich ist (siehe Abb. 1) ⁴².

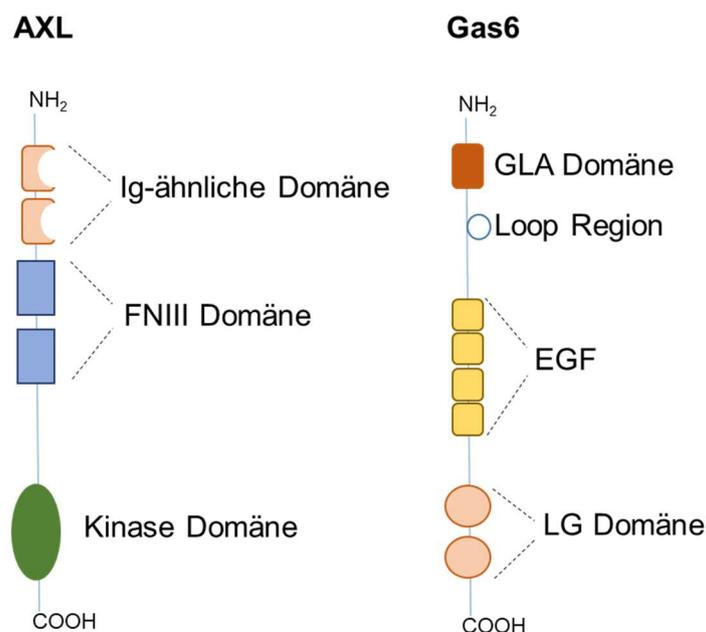


Abb. 1: Struktur des AXL Proteins und seines Liganden Gas 6

Es gibt verschiedene Liganden für die Gruppe von TAM Kinasen: Growth arrest specific gene 6 (Gas6), Protein S, Tubby, Tubby-like protein- 1(Tulp-1) und Galectin 3 sind die Bekanntesten. Gas6 und Protein S sind Mitglieder der Familie der Vitamin K- abhängigen Proteine; d.h. sie benötigen eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylierung von Glutamat (Glu) zu Carboxyglutamat (Gla), um ihre biologische Funktion entfalten zu können.

1.4.1.2. Signalkaskade

AXL kann durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden ⁴³. Neben der ligand-abhängigen Dimerisierung (meist Gas6 induziert) kann die Aktivierung des AXL Signalwegs auch durch ligand-unabhängige Dimerisierung erfolgen. Die wird durch eine hohe Expression von AXL erleichtert. Ein weiterer Aktivierungsmechanismus von AXL, der ebenfalls Ligand-unabhängig ist, ist die sogenannte „homophile“ Bindung von benachbarten AXL Rezeptoren. Dies kann die Aggregation von Zellen begünstigen ⁴¹. Die Dimerisierung von Axl führt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Tyrosinkinase Domäne von Axl. Diese führt zur Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), der Phospholipase C (PLC) und des Growth factor receptor-bound Protein 2 (Grb2). Des Weiteren wurden Wechselwirkungen von Axl mit anderen Signalmolekülen wie zum Beispiel C1-TEN, NCK adaptor Protein(Nck2), Ran binding protein in microtubule organising centre (RanBMP) und suppressor of cytokin signaling 1(SOCS1) beobachtet (siehe Abb. 2) ⁴⁴.

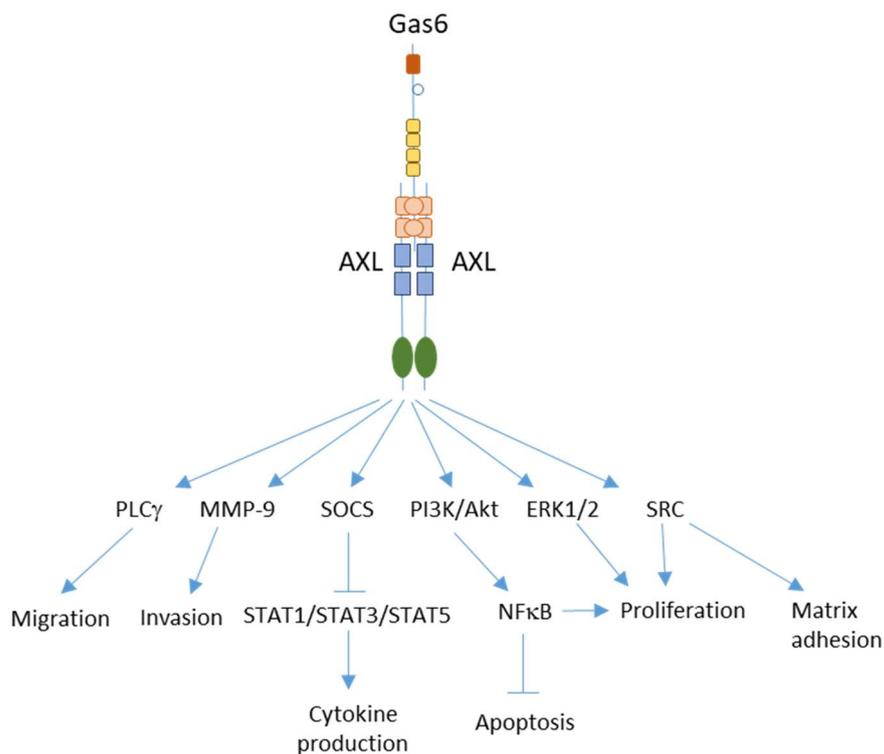


Abb. 2: Aktivierungskaskade des Gas6/Axl Signalwegs

Die Stimulation des PI3K Proteins und seines Zielmoleküls Akt ist ein zentraler Schritt bei der Axl-abhängigen Signalübertragung ⁴¹. Der Gas6/Axl/PI3K/Akt Signalweg

schützt die Zellen vor Apoptose mittels verschiedener Mechanismen: Akt phosphoryliert und inaktiviert das proapoptotische Protein BCL2, inhibiert die proapoptotische Caspase 3 und phosphoryliert den Faktor NF- κ B, was die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl-Xl zur Folge hat. In gewissen Zelltypen stimuliert Axl die Zellproliferation durch Aktivierung des ERK Signalwegs. Des Weiteren induziert der Gas6/Axl Signalweg die Zellmigration in GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) Nervenzellen. Zusammenfassend kann der Gas6/Axl Signalweg je nach Stimulus, Zelltyp und Bindungspartner das Zellüberleben, das Wachstum, die Reifung, die Aggregation sowie die Migration von Zellen fördern.

1.4.1.3. Aktivierung des Gas6/Axl Signalwegs in Tumorzellen

Eine erhöhte Aktivität des Gas6/Axl Wegs wurde bei zahlreichen verschiedenen Tumoren beobachtet ⁴⁴. Die Stimulation der Zellproliferation, der Zellmigration sowie der Angiogenese durch Axl stellen potentielle krebsfördernde Mechanismen dar. Die onkogenen Eigenschaften von AXL sind auch bei Kolonkarzinomen von Bedeutung. Axl ist insbesondere in hoch malignen Kolonkarzinomen sowie in peritonealen Metastasen sehr hoch exprimiert. Erhöhte Konzentrationen von Axl sind dabei mit einer deutlich schlechteren Krankheitsprognose und kürzeren Überlebenszeiten verbunden. Darüber hinaus trägt eine erhöhte Expression von Axl zur Resistenz der Tumoren gegen Chemotherapie bei ⁴⁴.

Eine Überexpression von AXL wurde auch bei zahlreichen anderen Tumoren beschrieben. So ist AXL in circa 60% aller nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) überexprimiert. Ein Effektorprotein des PI3K/AKT Signalwegs, das Rac1 Protein, stimuliert die Produktion von ROS (Reactive Oxygen Species) und begünstigt die Zellmigration bei Lungenkarzinom ⁴⁴. Des Weiteren ist AXL mit einem höheren Metastasierungsrisiko bei Brustkrebs sowie mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ebenso stellt AXL einer neuen Studie zufolge einen unabhängigen prognostischen Marker sowie ein effizientes therapeutisches Ziel bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) dar ⁴⁵. Die AML Zellen können die Expression und Sekretion von Gas6 aus Knochenmarksstromazellen stimulieren. Dabei fördert Gas6 selbst die Zellproliferation sowie die Chemotherapieresistenz von AXL exprimierenden AML Zellen ⁴⁵. Beim hepatozellulären Karzinom sind die Serum Konzentrationen von Axl substantiell erhöht und korrelieren maßgebend mit einer

raschen Tumorprogression, die gekennzeichnet ist durch Gefäßinvasion und Lymphknotenmetastasen. Daraus resultieren ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie sowie dramatisch reduzierte Überlebensraten bei Patienten mit hohen Axl Expressionskonzentrationen. Eine Erhöhung des Migrations- und Invasionspotentials von Tumorzellen wurde zudem bei verschiedenen Adenokarzinomen, malignen Melanomen sowie bei Plattenepithelkarzinomen beschrieben. Hinzu kommt eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie ⁴⁴.

Alle diese Befunde deuten darauf hin, dass Axl ein wichtiger prognostischer Biomarker und gleichzeitig ein vielversprechendes therapeutisches Ziel beim Kolonkarzinom sein könnte. Bis zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Studien bezüglich der Expression von AXL beim Rektumkarzinom, der Krankheitsprogression bzw. dem Therapieansprechen. Dies sollte in dieser Studie erstmalig untersucht werden.

1.4.2. Das C-MET Protein

Das Protein **C-MET**, auch bekannt als **hepatocyte growth factor receptor (HGFR)** gehört ebenfalls zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und wird von dem gleichnamigen Protoonkogen kodiert. In gesundem adultem Gewebe wird das Protein nur auf niedrigem Niveau und hauptsächlich in Zellen epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Die Expression von MET und seinem Ligand Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist bei diversen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Embryogenese, der Zellproliferation, dem Zellüberleben, der Differenzierung und der Gewebereparatur assoziiert. Eine übermäßige Expression des Proteins ist dabei eng mit krebsfördernden Prozessen assoziiert ⁴⁶.

1.4.2.1. Proteinstruktur

Aus dem 1390 Aminosäuren großen Vorläuferprotein entsteht posttranslational durch proteolytischen Abbau eine extrazelluläre α -Untereinheit und eine transmembranäre β -

Untereinheit, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (siehe Abb. 3)⁴⁷.

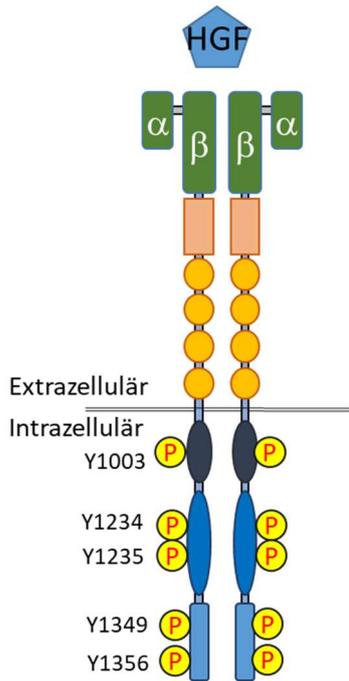


Abb. 3: Struktur des MET Proteins

Der extrazelluläre Teil des MET Proteins enthält eine sogenannte Sema Domäne (Region of homology to Semaphorins), welche die α -Untereinheit und den N-terminalen Anteil der β -Kette einschließt, an die HGF bindet, sowie die MRS (Cysteine-rich MET-related sequence) Domäne (hellbraun) und 4 Ig- (Immunoglobulin-like) Domänen (orange). Im transmembranären Teil des Proteins kann über die Phosphorylierung von Serin 985 die Rezeptorkinase Aktivität des Enzyms inhibiert werden. Hierüber werden zudem Endozytose und Degradation des Proteins reguliert. Die katalytische Tyrosinkinase Domäne liegt in der C-terminalen Region und umfasst insbesondere Tyrosin 1349 und Tyrosin 1356.

1.4.2.2. Signalkaskade

Die Bindung von HGF (hepatocyte growth factor) an den extrazellulären Teil des C-MET Rezeptors führt zu dessen Dimerisierung und Aktivierung mittels Transphosphorylierung von Tyr1234 und Tyr1235 innerhalb der katalytischen Domäne. Mutationen von Tyr1234 und Tyr1235, die zur konstitutiven Rezeptor Aktivierung führen, wurden beim papillären Nierenkarzinom identifiziert⁴⁸. An der weiteren Signaltransduktion mittels C-MET sind verschiedene Signalwege beteiligt, wie z.B. der PI3K/AKT, der RAS/RAF/MEK/ERK und der SRC/FAK Signalweg (siehe Abb. 4). Durch die Aktivierung dieser molekularen Kaskaden wird das Zellwachstum, die Proliferation, das Überleben, die Motilität der Zellen, sowie die Neuvaskularisation induziert⁴⁹.

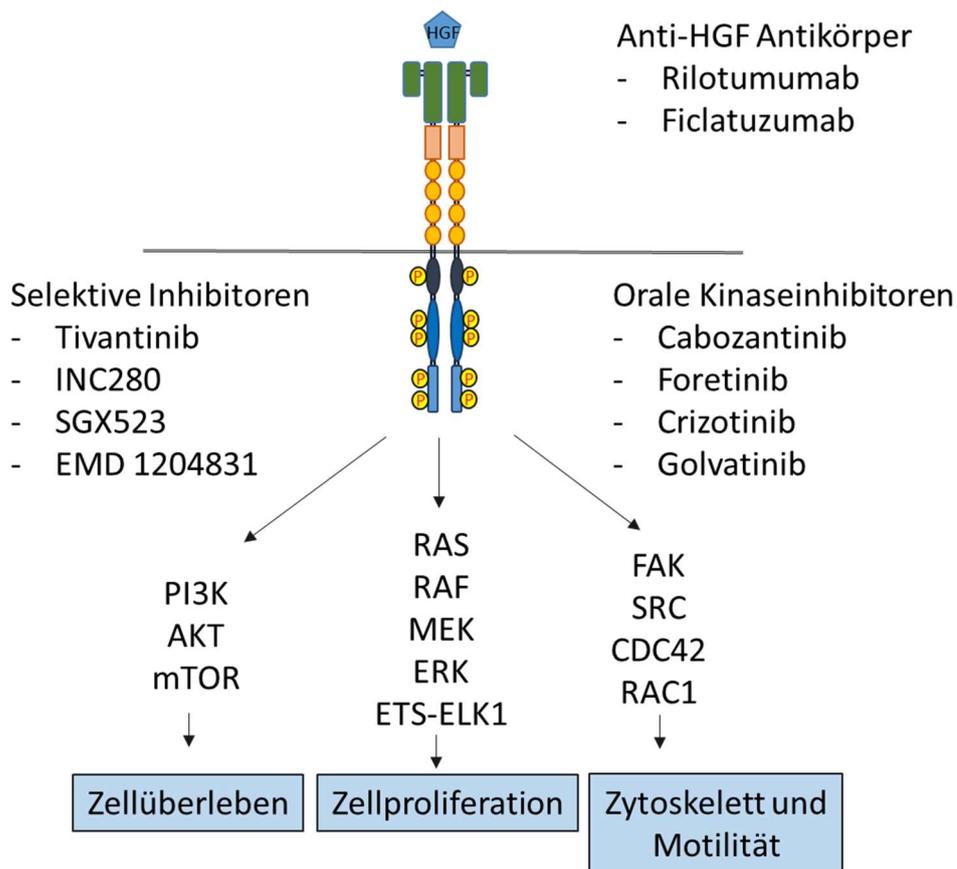


Abb. 4: Signalwege und Inhibitoren des C-MET/HGF Signalwegs

1.4.2.3. Rolle von C-MET bei Tumorerkrankungen

C-MET scheint eine maßgebliche Rolle bei der Tumorgenese zu spielen. So wurde eine übermäßige Expression von C-MET in verschiedenen soliden Tumoren, wie z.B. Mamma-, Bronchial-, Magen-, Nieren- und Kolonkarzinomen beobachtet ⁴⁶. Interessanterweise ist die Dysregulation von MET in den verschiedenen Tumoren aber unterschiedlichen molekularen Mechanismen zuzuordnen. So werden je nach Tumortyp vermehrt aktivierende Mutationen, Genamplifikation, Überexpression und gesteigerte autokrine und parakrine ligand-abhängige Stimulation des MET Signalwegs beobachtet. All diese Mechanismen begünstigen die Tumoraggressivität und das Metastasepotential der malignen Zellen und sind im Allgemeinen mit einer schlechten Prognose korreliert. Besonders beim KRK ist eine Überexpression von C-MET mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert, scheint die VEGF-A Produktion und dadurch die Angiogenese bei Tumorzellen zu stimulieren und fördert die Therapieresistenz bei Patienten, die mit anti-EGFR monoklonalen Antikörpern behandelt werden ⁵⁰.

1.4.3. Das Protein ALDH1

Das Protein ALDH1 (Aldehyde Dehydrogenase 1) gehört zur Familie der ALDH Enzyme, die verantwortlich für die Oxidation von einem breiten Spektrum von toxischen endogenen und exogenen Aldehyden sind. Es gibt 3 verschiedene Klassen von diesen Enzymen: die zytosolische Form ALDH1, die mitochondriale Form ALDH2 und die dritte, eher seltene Form ALDH3. Die ersten beiden Formen werden vor allem in Geweben exprimiert, die Detoxifikationsaufgaben übernehmen. Die dritte Form besitzt zusätzlich nicht-enzymatische Funktionen und bindet z.B. bestimmte Hormone und kleine Moleküle (wie zum Beispiel Androgene, Cholesterol-Moleküle und Thyroidhormone). Zudem weist sie eine schützende Wirkung vor der schädigenden ultravioletten Strahlung in der Kornea auf⁵¹.

Die Mehrheit der Kaukasier besitzt beide Haupt-Isoenzymen ALDH1 und ALDH2, während ca. 50% der Asiaten nur die zytosolische Form aufweisen. Eine bemerkenswert höhere Frequenz von akuter Alkoholintoxikation unter den Asiaten im Vergleich zu der Frequenz in der kaukasischen Population hängt wahrscheinlich mit dem Fehlen der katalytisch aktiven Form des mitochondrialen Isoenzym zusammen. Die erhöhte Exposition gegenüber Acetaldehyd in Individuen mit der katalytisch inaktiven Form könnte dadurch zu einer größeren Anfälligkeit für viele Krebsarten beitragen. Mutationen in den ALDH Genen, die zu einem defekten Stoffwechsel von Aldehyden führen, sind zudem mit verschiedenen anderen Krankheiten assoziiert. Besonders erwähnenswert sind hier das Sjögren-Larsson Syndrom, die Hyperprolinämie vom Typ II, die Pyridoxin- abhängige Epilepsie, Linsentrübungen und andere Stoffwechsel- und Entwicklungskrankheiten⁵¹. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte zytosolische Form ALDH1A des Enzyms wird unter anderem in humanen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und kann als Stammzellmarker bei zahlreichen Krebsarten, inklusive kolorektalen-, Magen-, Pankreas-, Brust- und Hirntumoren verwendet werden.

1.4.3.1. Struktur und Funktionsweise

Das ALDH1 kodiert für ein Protein von 54 kDa, das als Tetramer vorliegt⁵². Das aktive Zentrum des Enzyms bindet ein Aldehyd sowie ein NAD(P) Molekül, das als Kofaktor funktioniert. Für diese Wechselwirkung sind ein Cystein- und ein Glutamat-Rest im katalytischen Zentrum des Enzyms erforderlich⁵³.

Diese Aminosäure-Reste sind an der Übertragung von H⁺ der Aldehyd-Substrate auf das zentrale NAD⁺-Molekül beteiligt. Das Endprodukt dieser Oxidationsreaktion ist die entsprechende Carbonsäure sowie ein NADH Molekül ⁵⁴.

1.4.3.2. Rolle von ALDH1 bei Tumorerkrankungen

Hohe Expressionsniveaus von ALDH1 sind mit einer schlechten Prognose bei vielen verschiedenen soliden Tumoren assoziiert, inklusive Ösophagus-, Brust-, Lungen-, Magen- und Ovarialkrebs ⁵⁵. Eine erhöhte Expression von ALDH1 wurde jedoch auch in kolorektalen Tumoren beobachtet, obwohl sie paradoxerweise in manchen Studien (die sich in fortgeschrittenen Krankheitsstadien fokussierten) eine absteigende Tendenz zeigte ⁵⁶. ALDH1 begünstigt die Resistenz gegen alkylierende chemotherapeutische Agenzien und schützt vor der oxidativen Zerstörung der Tumorzellen, indem es die irreversible Oxidation der zellulären Aldehyde katalysiert ⁵⁶. Darüber hinaus ist ALDH1 an der Umwandlung von Retinaldehyd zu Retinsäure beteiligt - eine Reaktion, die zur Zellproliferation und Differenzierung beiträgt ⁵⁷. Außerdem induziert ALDH1 die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) in Tumorzellen und fördert damit die Tumorinvasivität und das Metastasierungspotenzial der Krebszellen ⁵⁸. In zahlreichen Studien wurde ALDH1 als ein wichtiger unabhängiger prognostischer Marker bei KKR nachgewiesen ⁵⁹. In einer weiteren Studie wurde die Expression von ALDH1 in Zusammenhang mit verschiedenen klinischen bzw. pathologischen Parametern untersucht. Dabei wurde eine starke Assoziation zwischen der Proteinexpression und dem Tumorstadium (T), dem Lymphknotenstatus (N) und dem Differenzierungsgrad des Tumors (G) beobachtet. Das Patientenalter erschien prognostisch irrelevant ⁶⁰.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die aus der Literatur bereits bekannte Assoziation zwischen der ALDH1 Expression und den klinikopathologischen Charakteristika der KKR Patienten genauer aufzuklären.

1.4.4. Das Protein ALCAM

Das Protein ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) - auch bekannt als CD166 (Cluster of Differentiation 166) - ist ein Mitglied der Familie der Immunglobulin Rezeptoren mit 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen in seiner extrazellulären Domäne. Seine Funktion besteht darin, Zelladhäsions- und Migrationsprozesse zu fördern. Eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung solcher Prozesse ist die Bindung seines Liganden CD6, eines Oberflächen-Antigens, das eine

maßgebende Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen spielt. Durch die molekulare Wechselwirkung zwischen ALCAM und CD6 (heterotypische Wechselwirkung) werden die T-Lymphozyten zur Proliferation und weiter zur Differenzierung getriggert.

Eine hohe Expressionsrate von ALCAM wird physiologisch in aktivierten Leukozyten (wie sein Name schon erahnen lässt) registriert ⁶¹. Aber auch in Nervenzellen scheint die Rolle von ALCAM ausschlaggebend zu sein. So induziert ALCAM (durch homotypische ALCAM-ALCAM Wechselwirkungen) die Extension von Neuronen und fördert das Wachstum von Nervenzellaxonen ⁶¹. Des Weiteren ist ALCAM für die Erhaltung einer normalen Zahl von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark erforderlich ⁶². In einer weiteren in vitro Studie wurde nachgewiesen, dass ALCAM notwendig für die Aktivierung der Proliferation und der Differenzierung von Osteoblasten ist ⁶³.

1.4.4.1. Proteinstruktur

Das ALCAM Protein besitzt ein Molekulargewicht von 100-105kD ⁶⁴. Die Adhäsions-Eigenschaften von ALCAM werden durch dessen extrazellulären Teil mit insgesamt 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen vom IgV- bzw. IgC2-Typ bestimmt. Die strukturelle Einheit von ALCAM wird noch durch eine transmembräne Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus vervollständigt ⁶⁵.

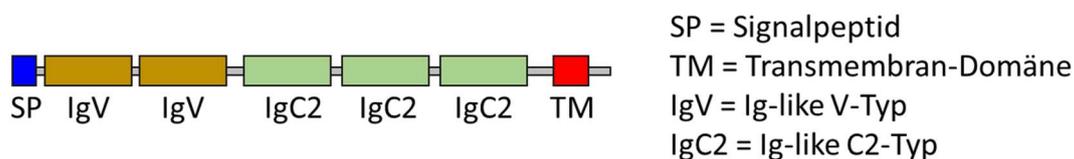


Abb. 5: Genstruktur von CD166 (ALCAM)

1.4.4.2. Rolle von ALCAM bei Tumorerkrankungen

Alterationen in der Expression von ALCAM wurden in einer Reihe von Tumoren registriert. Hierzu zählen Melanome, Prostata-, Ösophagus-, Mamma- und Urothelkarzinome ⁶⁴. In manchen von diesen Tumoren wurde eine Hochregulation der Expression des Gens nachgewiesen, während es in anderen Tumoren paradoxerweise zu einer Herabregulation von ALCAM kam.

Derzeit gibt es nur wenige Daten zur Expression von ALCAM beim KRK. In einer neuen immunhistochemischen Studie wurden die zytoplasmatische und membranöse Expression von ALCAM in Kolonadenomen sowie in Kolonkarzinomen gleichzeitig analysiert und in Verbindung mit Patientenalter, Tumorstadium sowie Lymphknotenstatus beobachtet⁶⁶. Die membranöse Expression von ALCAM war mit einem signifikant kürzeren Überleben korreliert. Ebenso erwähnenswert ist die stark ausgeprägte zytoplasmatische Expression von ALCAM, die in allen Kolonadenomen derselben Studie registriert wurde⁶⁶. Laut der Autoren ist die Hochregulation von ALCAM ein frühes Ereignis in der malignen Transformation bei Kolontumoren⁶⁶.

Da bisher kaum wissenschaftliche Daten hinsichtlich der ALCAM Expression beim KRK vorliegen, wurde ALCAM ebenfalls in dieser Arbeit bzgl. seiner Rolle bei der Entstehung, der Progression und dem Therapieerfolg vom KRK näher untersucht.

1.5. Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine wissenschaftlichen Daten bezüglich der Rolle der Tyrosinkinase-Rezeptoren C-MET und AXL als potentielle Tumorstammzellmarker beim KRK vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher anhand eines Kollektivs von 164 Patienten mit KRK des Universitätsklinikums Würzburg zu klären, ob sich diese beiden Oberflächen-Rezeptoren einzeln oder in Kombination mit den bereits bekannten Stammzellmarkern ALDH1 und ALCAM als Tumorstammzellmarker von Patienten mit KRK eignen. Hierzu wurden die Serumspiegel von C-MET, AXL, ALDH1 und ALCAM in Patientenproben mittels eines ELISAs bestimmt, um retrospektiv zu untersuchen, ob sich hieraus Vorhersagen über den Krankheitsverlauf und das Langzeitüberleben der Patienten hätten ableiten lassen.

2. Material und Methoden

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit eingesetzten bzw. angewandten Materialien und Methoden aufgeführt.

2.1. Patientengut

In der vorliegenden Arbeit wurden von 164 Patienten (42 weibliche und 122 männliche) mit histologisch gesichertem Rektumkarzinom die Daten retrospektiv erhoben. Dazu wurden die zu untersuchenden Parameter unter Datenausnutzung aus Akten, die per ICD-Schlüssel erfasst wurden, ausgewertet. Das Datenkollektiv beinhaltete unter anderem folgende wichtigsten Parameter: Geschlecht, Alter und Tumorstadium nach TNM sowie nach UICC Klassifikation. Die zu untersuchenden Proben stammen aus der Tumorgewebe- und Serenbank der Klinik für Chirurgie I der Universitätsklinik Würzburg und wurden nach Abnahme streng bei -80°C asserviert. Die Untersuchung der Serumproben fand auf der Grundlage der in der Chirurgischen Klinik bei jedem Patienten durchgeführten Patientenaufklärungen und Abtretungen der Materialien der Patienten an das UKW in pseudonymisierter Weise statt. Grundlage waren hierbei die von Herrn Prof. Jahns in der Interdisciplinary Biomaterial and Data Bank Würzburg im Comprehensive Cancer Center Mainfranken (CCC) erstellten Regularien.

Die Blutentnahmen wurden von der Chirurgischen Klinik unmittelbar vor der Operation durchgeführt. Allerdings wurden auch einige Blutproben von anderen KRK Patienten eingeschlossen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Operation entnommen wurden. Die Blutproben wurden mittels Zentrifugation abgesert. Die Patientenserum wurden für die Durchführung der Studie verwendet. Die präoperativen Serumwerte der 4 verschiedenen Proteine C-MET, AXL, ALCAM und ALDH1 wurden anhand des ELISA Verfahrens nach entsprechender Protokoll-Anleitung ermittelt (Biosource International, California, USA).

Die Primärtumorthherapie dieser Patienten erfolgte ausschließlich in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg. Nach Entlassung aus der Klinik wurde ein großer Teil der Patienten im Rahmen der Tumornachsorge in der Chirurgischen Poliklinik gesehen, weitere Daten wurden mit der Hilfe der betreuenden Hausärzte gesammelt. Zum Follow-up gehörten eine körperliche Untersuchung, Blutentnahme, Röntgen Thorax, Ultraschall des Abdomens sowie eine Computertomographie beziehungsweise eine Magnetresonanztomographie, je nach den Richtlinien der deutschen Tumorzentren.

2.2. Labormethoden

Serumbestimmungen von C-MET, AXL, ALCAM und ALDH1 mittels ELISA

Die Blutproben der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden bezüglich der in den Proben enthaltenen C-MET, AXL, ALCAM und ALDH1 Proteinkonzentrationen [pg/ μ l] mittels kommerzieller ELISA Kits nach den von den jeweiligen Herstellern angegebenen Protokollen untersucht.

Die Seren von insgesamt 39 gesunden Probanden wurden als Kontrolle verwendet.

Folgende Kits wurden hierbei eingesetzt (**Tab. 3**):

Parameter	Hersteller	Kit	Verdünnung der Probe
C-MET Protein	Invitrogen	Human c-Met (soluble) ELISA Kit Catalog # KHO2031	1:100
AXL	Abnova	AXL (Human) ELISA Kit Catalog # KA1696	1:100
ALCAM	Cloud-Clone-Corp	ALCAM (Human) ELISA Kit Catalog # SEA002Hu	konzentriert 2x 100 μ l
ALDH1	Cloud-Clone Corp.	ALDH1 (Human) ELISA Kit Catalog # SEE824Hu	konzentriert 2x 100 μ l

Tab. 3: In dieser Arbeit eingesetzte ELISA Kits

Die Ergebnisse wurden am ELISA-Reader bei 450 nm abgelesen [Dynatech Laboratories, Sullyfield, USA] und die in den Proben jeweils enthaltenen Proteinkonzentrationen anhand der quantitativen Positivkontrollen nach Angaben der Hersteller bestimmt.

2.3. Statistische Methoden

Für die Erstellung der Abbildungen sowie die damit verbundenen statistischen Analysen wurde Graph Pad Prism 6 eingesetzt. Zudem wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 des Rechenzentrums der Universität Würzburg verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant (*). Werte für $p \leq 0,01$ galten als hochsignifikant (**).

Zur Prüfung der Daten hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede kamen in der vorliegenden Arbeit folgende Tests zur Anwendung:

2.3.1. Chi-Quadrat Test

Der Chi-Quadrat Test ist ein Anpassungstest, mit dessen Hilfe auf die zugrundeliegende Verteilung des Datenmaterials einer Stichprobe geschlossen werden kann. Es wird geprüft, ob eine beobachtete Zufallsgröße X einem vorgegebenem Verteilungsgesetz $F_0(X)$ genügt. Anhand dieser univarianten Analyse wurde der Zusammenhang zwischen den 4 verschiedenen Proteinen C-MET, AXL, ALCAM und ALDH1 analysiert.

2.3.2. Unpaired t-Test

Der unpaired t-Test überprüft anhand der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben, ob sich deren Mittelwerte signifikant unterscheiden. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Messwerte der beiden Stichproben eine Normalverteilung zeigen.

2.3.3. One-way Anova

Die One-way Anova Analyse erlaubt im Gegensatz zum t-Test den gleichzeitigen Vergleich mehrerer verschiedener Stichproben. Dabei wird die Nullhypothese getestet, ob die jeweiligen Stichproben von der gleichen Grundgesamtheit stammen bzw. von Populationen, die gleiche Mittelwerte und Standardabweichungen aufweisen.

2.3.4. Kaplan-Meier- Schätzung

Diese Methode dient der Schätzung der Überlebensfunktion, wenn in einem Beobachtungszeitraum alle Patienten entweder nicht zum gleichen Zeitpunkt in die Beobachtung aufgenommen werden und/oder aus verschiedenen Gründen nicht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachverfolgt werden können. Mit Hilfe des log rank Testes konnte die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Kurven berechnet werden.

Tumorbedingtes Überleben beschreibt den Zeitraum zwischen Diagnose und Tod/letztem Kontakt mit dem Patienten. Rezidivfreie Zeit beschreibt den Zeitraum zwischen Diagnose und erstem Rezidiv. Von zensierten Daten spricht man, wenn bis zu einer bestimmten Zeit (last seen) das Ereignis (tumorbedingter Tod/Rezidiv) noch nicht eingetreten ist.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Auswertung der patientenbezogenen Daten

Diese Studie umfasste insgesamt 164 Patienten des Universitätsklinikums Würzburg mit Neudiagnose eines rektalen Karzinoms im Zeitraum von 2002 bis 2013. Im Folgenden werden zuerst die personenbezogenen Daten dieser Patienten aufgeführt.

3.1.1. Geschlechts- und Altersverteilung, Tumorstadium nach TNM und UICC

Die tumorspezifischen Daten der eingeschlossenen Patienten sind in Tab. 4 dargestellt. Von den 164 Patienten mit Rektumkarzinom zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Geschlechtsverteilung, wobei Männer (74,4%) im Vergleich zu Frauen (25,6%) etwas stärker überrepräsentiert waren als erwartet. Aufgrund der deutlich höheren Zahl von männlichen Patienten und der für eine getrennte Auswertung nicht ausreichenden Patientenzahl wurden alle Patienten unabhängig von ihrem Geschlecht in die Auswertung eingeschlossen. Die erfassten Patienten waren zwischen 31,4 und 83,6 Jahre alt mit einem Medianalter von 64,3 Jahren. Bei einem medianen Follow-up von 45 Monaten waren 53 von 164 Patienten (32,3%) an ihrer Tumorerkrankung verstorben.

Charakteristika	Wert
Gesamtanzahl an Patienten	164
davon weiblich	42 (26%)
davon männlich	122 (74%)
Alter in Jahren (Median, Range)	64,3 (31,4-83,6)
Patienten mit neoadjuvanter Therapie	114
Median Follow-Up	45 Monate
Verstorben insgesamt	53 (32%)
Gestorben am Rektumkarzinom	35 (21%)

Tab. 4: Geschlechts-/Altersverteilung sowie Follow-up

In Tabelle 5 sind die Daten der Tumorpatienten bzgl. des TNM Stadiums dargestellt.

Tumorstadium	Anzahl	%
T1	12	7,3
T2	50	30,5
T3	80	48,8
T4	6	3,7
Tx	16	9,8
Lymphknotenstatus		
N0	104	63,4
N1	35	21,3
N2	22	13,4
Nx	3	1,8
Metastasierungsstatus		
M0	134	81,7
M1	24	14,6
Mx	6	3,7

Tab. 5: Verteilung der Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnose nach der TNM Klassifikation

Präoperativ befanden sich gut ein Drittel der Patienten (37,2%) zum Zeitpunkt der Diagnose in einem frühen Tumorstadium (UICC 0 und 1) mit Tis/T1/T2, N0 und M0, während bei knapp 15% der Patienten (n=24) bereits Fernmetastasen vorlagen und damit ein Spätstadium vorherrschte (siehe Tab. 6).

UICC post-OP	Anzahl (n=164)	%
UICC 0	14	8,5
UICC I	47	28,7
UICC II	41	25
UICC III	38	23,2
UICC IV	24	14,6

Tab. 6: Stadieneinteilung der Tumorpatienten nach UICC

3.1.2. Einfluss prognoserelevanter Faktoren auf das tumorbedingte Überleben

Mit Hilfe des Kaplan-Meier Verfahrens wurde der Einfluss einzelner prognoserelevanter Faktoren beim Rektumkarzinom untersucht. Dabei zeigte sich im Beobachtungszeitraum (Median 45 Monate) kein signifikanter Einfluss von Geschlecht, Alter der Patienten und TNM Stadium der Tumoren auf das tumorbedingte Überleben (Abb. 6). Dahingegen konnte eine hochsignifikante Einflussnahme von UICC Stadium auf das Überleben der Patienten bestätigt werden ($p < 0,001$), was die prognostische Bedeutung dieses Klassifikationsschemas für die Patienten unterstreicht.

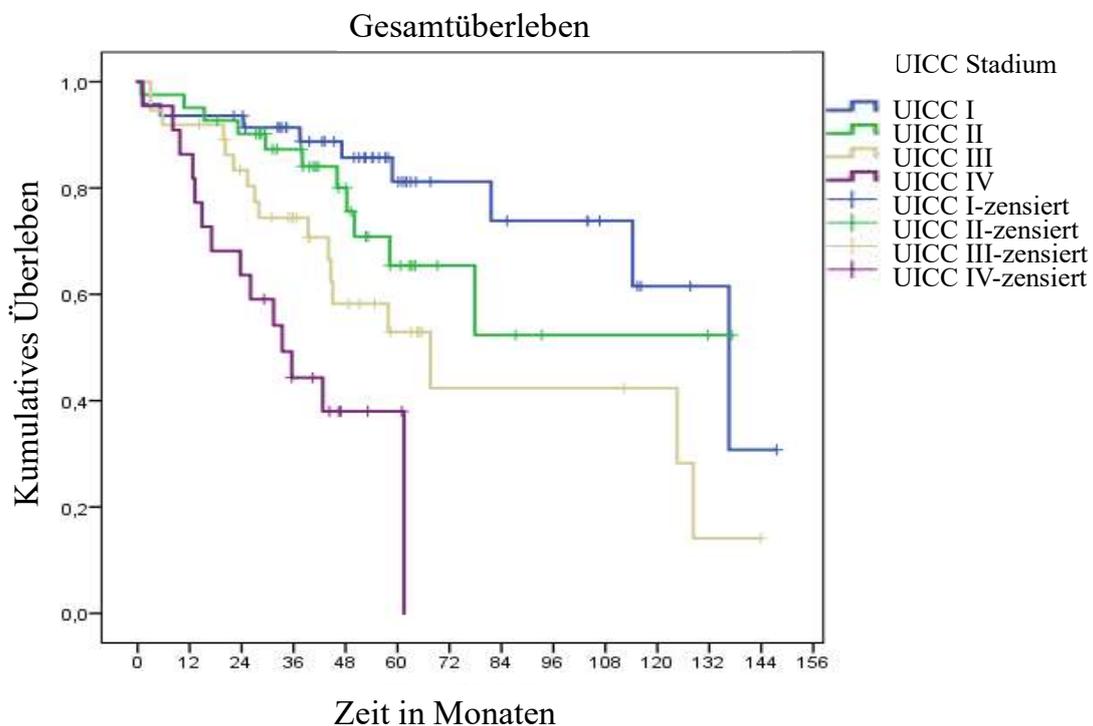


Abb. 6: Einfluss des UICC-Stadiums auf das tumorbedingte Überleben bei den Patienten mit Rektumkarzinom dieser Studie

Die Abbildung zeigt Kaplan-Meier Kurven für die 164 Tumorpatienten unserer Studie eingeteilt nach UICC Stadien.

3.2. Vergleich der Serumspiegel von AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 bei Patienten mit Rektumkarzinom und gesunden Probanden

Um die Bedeutung der Serumspiegel der vier Parameter als potentielle Tumormarker für das KRK zu beurteilen, wurden parallel zu den Patientenproben auch Serumproben von insgesamt 39 gesunden Probanden auf AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 untersucht.

3.2.1. Vergleich der Serumspiegel von AXL bei Patienten mit Rektumkarzinom und Kontrollpersonen sowie des Therapieeinflusses

Für AXL zeigten sich hierbei signifikant niedrigere Serumspiegel ($p < 0,0001$, two-sided unpaired t-Test) bei den Patienten mit Rektumkarzinom als bei den gesunden Probanden (Mittelwerte: 34.500 vs 20.200 pg/ml; Abb. 7).

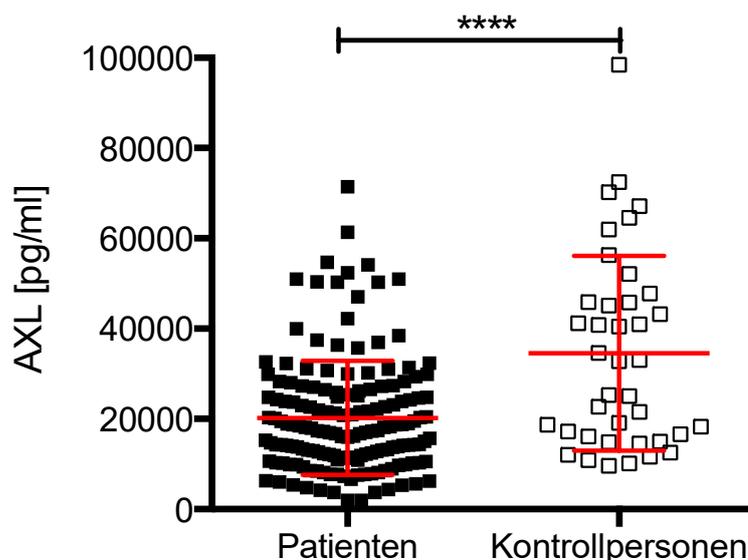


Abb. 7: Vergleich der AXL-Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen
Dargestellt sind die gemessenen AXL Serumspiegel der Rektumkarzinompatienten sowie der gesunden Kontrollpersonen. Mittelwert und Standardabweichung in rot (Unpaired t-Test: **** $p < 0,0001$).

Daher wurde versucht zu klären, ob sich die erniedrigte Serumspiegel bei den Patienten durch den Tumor bzw. die durchgeführten therapeutischen Maßnahmen, wie z.B. die Operation (OP) bzw. die neoadjuvante Therapie erklären lassen. Untersucht wurde zuerst die Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahme relativ zur OP. Dabei wurden die Patienten in insgesamt 5 Gruppen (Blutabnahme >14 d vor OP, innerhalb von 14d vor OP, am Tage der OP, innerhalb von 2 Wochen nach OP und >2 Wochen

nach OP unterteilt. Hierbei zeigten sich erneut signifikant niedrigere AXL Serumwerte bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Allerdings war dies unabhängig vom Zeitpunkt der OP (Abb. 8). Die Entfernung des Tumors im Zuge der OP hatte offensichtlich keinen Einfluss auf die Höhe der AXL Serumspiegel.

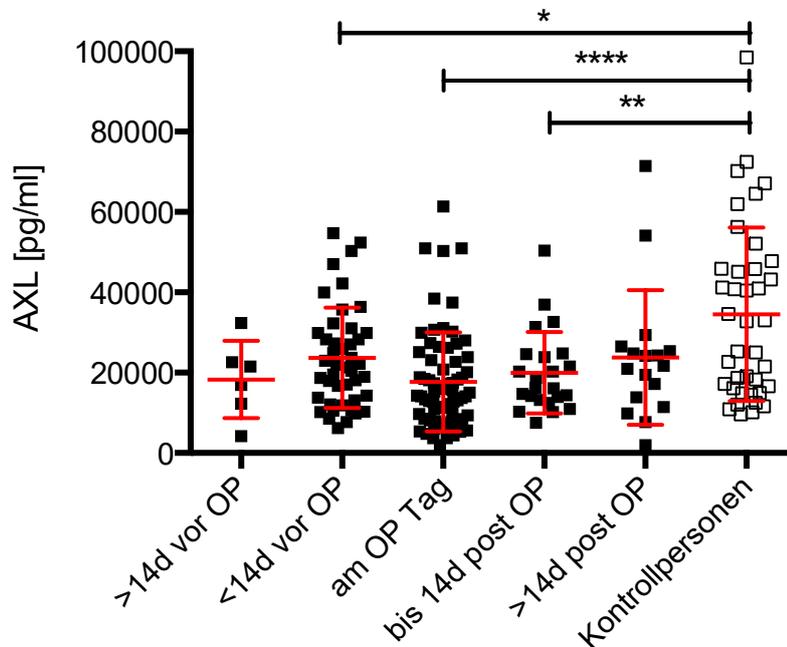


Abb. 8: Korrelation von AXL Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur OP.

Dargestellt sind die AXL Serumspiegel von Patienten mit Rektumkarzinom bei denen die Blutabnahme für die Messung der AXL Serumspiegel >14 Tage (d) vor Operation (OP), <14 Tage vor OP, am Operationstag, innerhalb der ersten 14 Tage nach OP bzw. >14 Tage nach OP erfolgte. Zudem sind die Serumspiegel der gesunden Kontrollpersonen zu sehen. Mittelwert und Standardabweichung in rot. Alle statistisch signifikanten Unterschiede sind in der Abbildung eingetragen (One-way Anova: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Das gleiche Bild zeigte sich auch bzgl. der AXL Serumwerte und der neoadjuvanten Therapie (Abb. 9). Hierbei wurde zwischen Blutabnahmen zur Bestimmung der AXL Serumspiegel Patienten vor bzw. ohne Strahlentherapie, sowie Blutabnahmen für die Messung der AXL Serumspiegel innerhalb der ersten 100 Tage nach Ende der Strahlentherapie bzw. zu noch späteren Zeitpunkten unterschieden.

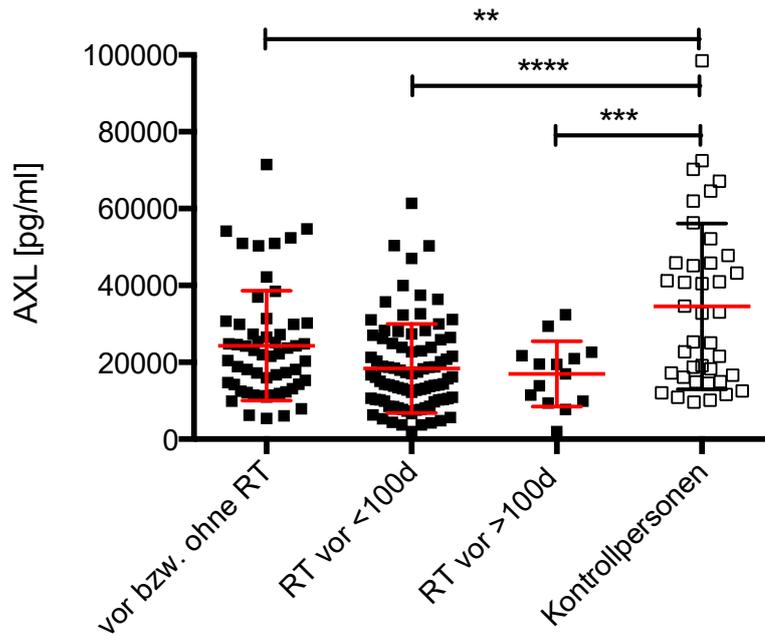


Abb. 9: Korrelation von AXL Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur Strahlentherapie (RT).

Dargestellt sind die AXL Serumspiegel von Patienten mit Rektumkarzinom gruppiert nach Patienten bei denen die Blutabnahme für die Messung der AXL Serumspiegel vor der neoadjuvanten Therapie (inklusive Patienten ohne Strahlentherapie (RT), <100 Tage (d) nach Abschluss der RT bzw. >100 Tage nach Therapieende erfolgte. Zudem sind die Messergebnisse der Kontrollpersonen dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung in rot. Alle statistisch signifikanten Unterschiede sind in der Abbildung eingetragen (One-way Anova: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

3.2.2. Vergleich der Serumspiegel von ALCAM bei Patienten mit Rektumkarzinom und Kontrollpersonen sowie des Therapieeinflusses

Für ALCAM zeigten sich hoch signifikant höhere Serumspiegel ($p < 0,0001$, two-sided unpaired t-Test) bei den Patienten mit Rektumkarzinom als bei den gesunden Probanden (Mittelwerte: 4,4 vs 0,06 pg/ml; Abb. 10).

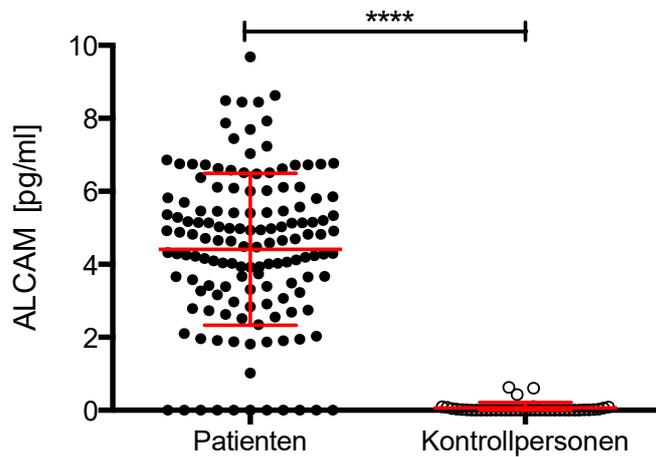


Abb. 10: Verteilung der ALCAM-Serumspiegel bei Tumorkontrollpersonen und Tumorkontrollpersonen
(Unpaired t-Test: **** $p < 0,001$)

Auch hier wurde untersucht, ob sich die hohen ALCAM Werte in Abhängigkeit von der Therapie der Tumorerkrankungen wieder normalisieren würden. Wie schon für AXL zeigte sich aber kein signifikanter Abfall der ALCAM Werte nach OP (Abb.11).

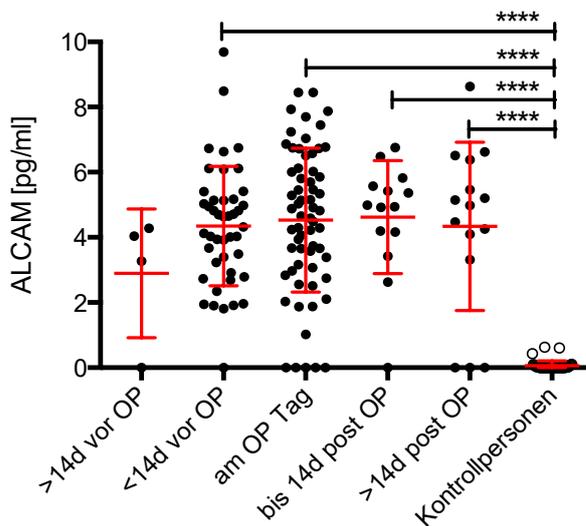


Abb. 11: Korrelation von ALCAM Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur OP
(One-way Anova: **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Das gleiche Bild zeigte sich auch in Bezug auf eine durchgeführte neoadjuvante Therapie (Abb.12). Wie auch für AXL ließen sich die höheren ALCAM Werte bei den Tumorkontrollpersonen nicht durch die neoadjuvante Therapie erklären bzw. beeinflussen.

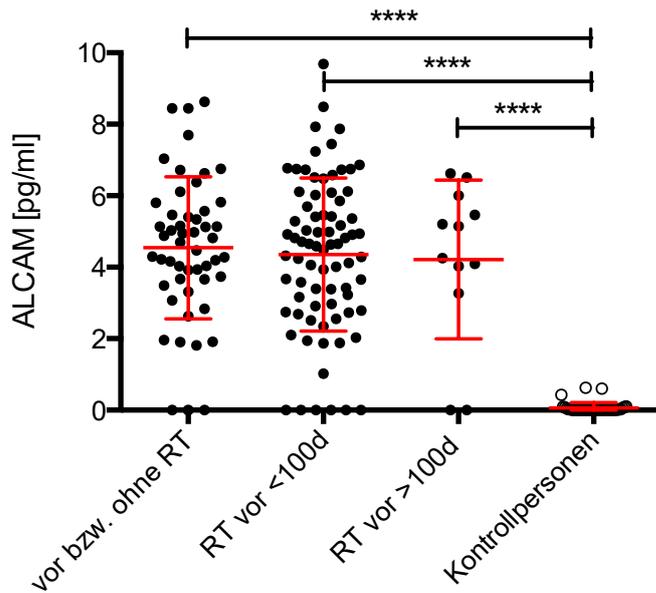


Abb. 12: Korrelation von ALCAM Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur Strahlentherapie (One-way Anova: ** p<0.0001)**

3.2.3. Vergleich der Serumspiegel von ALDH1 bei Patienten mit Rektumkarzinom und Kontrollpersonen sowie des Therapieeinflusses

Für ALDH1 zeigten sich ebenfalls signifikant höhere Serumspiegel ($p < 0,0001$, two-sided unpaired t-Test) bei den Patienten mit Rektumkarzinom als bei den gesunden Probanden (Mittelwerte: 3,9 vs 0,6 pg/ml; Abb. 13).

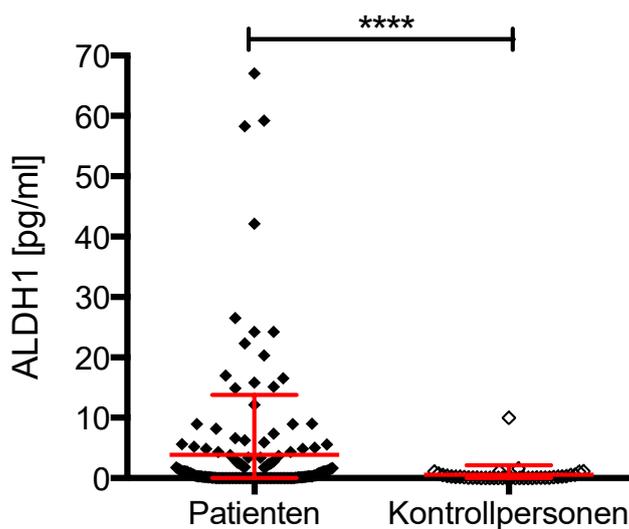


Abb. 13: Verteilung der ALDH1-Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen (Unpaired t-Test: ** p<0,001)**

Auch hier wurde untersucht, ob hohe ALDH1 Werte präferentiell vor operativer Entfernung der Tumore nachzuweisen waren (Abb.14). Auch bei Spiegelmessungen >14 Tage nach OP wurden allerdings noch erhöhte Serumspiegel im Vergleich zu den Kontrollpersonen beobachtet.

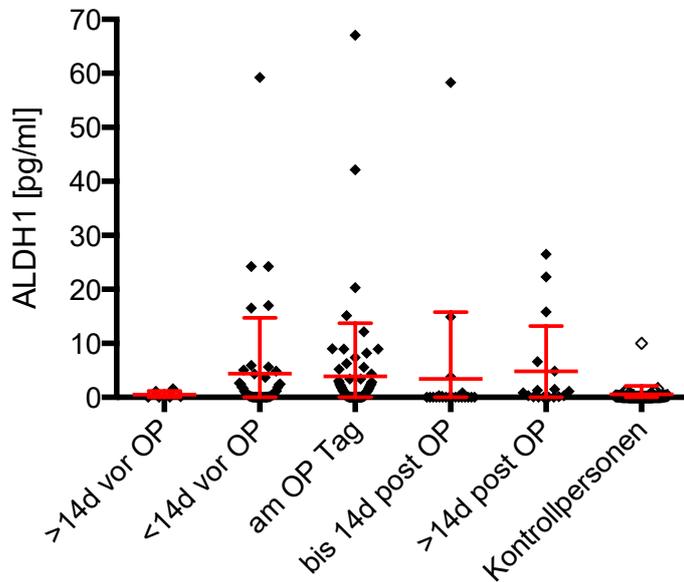


Abb. 14: Korrelation von ALDH1 Serumspiegel in Relation zum zeitlichen Abstand der Blutabnahme von der OP.

Das gleiche Bild zeigte sich auch bei der Untersuchung des Einflusses der neoadjuvanten Therapie auf die ALDH1 Serumspiegel.

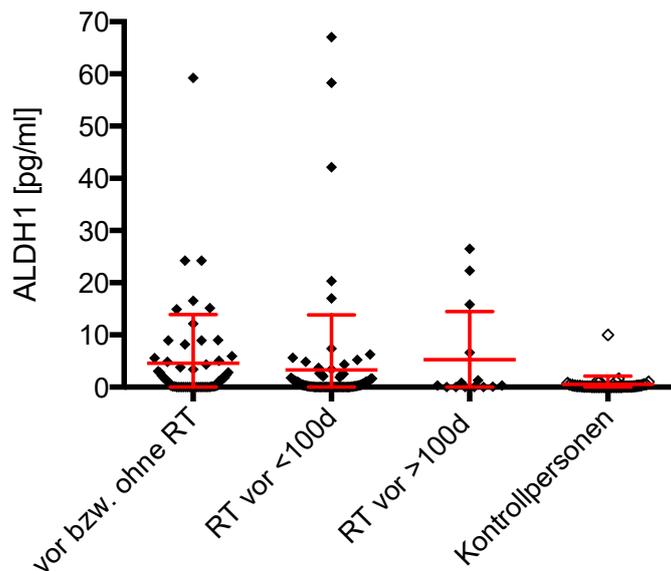


Abb. 15: Korrelation von ALCAM Serumspiegel in Relation zum zeitlichen Abstand der Blutabnahme von der Strahlentherapie.

3.2.4. Vergleich der Serumspiegel von C-MET bei Patienten mit Rektumkarzinom und Kontrollpersonen sowie des Therapieeinflusses

Erstaunlicherweise ergaben sich bei der Auswertung der C-MET Serumspiegel zwei differente Patientenuntergruppen. Während über zwei Drittel der Patienten (111/159 = 70%) leicht höhere C-MET Werte als die gesunden Kontrollpersonen aufwiesen, zeigte ein Drittel (48 Patienten = 30%) im Durchschnitt fast 100-fach niedrigere Werte. Zur besseren Visualisierung der beiden Gruppen sind die C-MET Messwerte in einer Logskala dargestellt (Abb. 16).

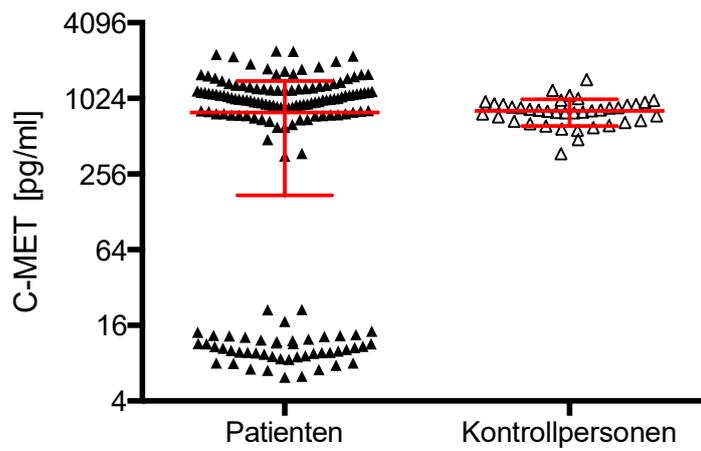


Abb. 16: Verteilung der C-MET- Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen.

Dieses Phänomen wurde lediglich bei der C-MET Auswertung beobachtet. Interessanter Weise zeigte sich eine klare Korrelation zur neoadjuvanten Therapie (Strahlentherapie).

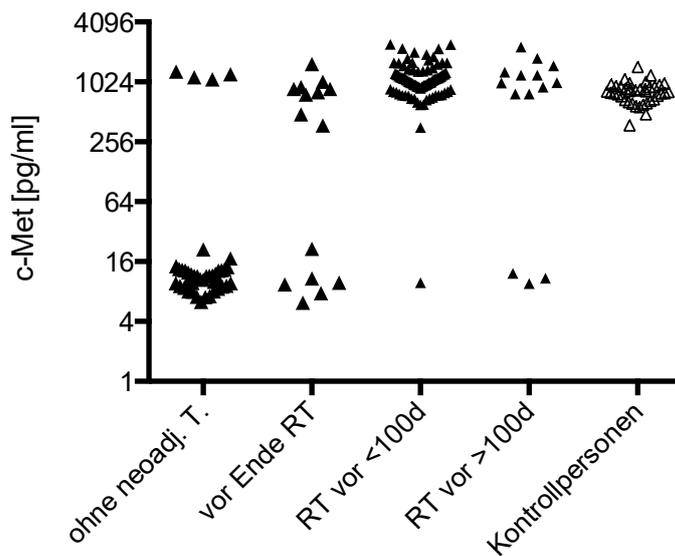


Abb. 17: Verteilung der C-MET-Serumspiegel bei Tumorpatienten mit und ohne neoadjuvante Therapie.
Niedrige C-MET Werte traten fast ausschließlich bei Patienten ohne bzw. vor Strahlentherapie auf.

Patienten ohne Vortherapie wiesen in der Regel extrem niedrige C-MET Werte auf. Dagegen waren bei den vortherapierten Patienten hohe Werte ähnlich wie bei den Kontrollpersonen nachweisbar (siehe Abb.17). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei KRK Patienten bestimmte mit C-MET assoziierte Mechanismen der Gewebereparatur unterdrückt sind, während die neoadjuvante Radiotherapie als Folge ihrer gewebschädigenden Wirkung diejenigen Mechanismen wieder in Bewegung setzt und die Expression von Genen wie C-MET induziert, die maßgeblich an der Gewebereparatur beteiligt sind.

Um den Einfluss der neoadjuvanten Radiotherapie auf die Expression von C-MET besser zu analysieren, wurden die vorbehandelten Patienten in 2 Gruppen unterteilt; denjenigen, die eine Kurzzeit-Therapie bekommen hatten (1 bis 5 Wochen) und denjenigen, die einer Langzeit-Strahlentherapie unterzogen wurden (>5 Wochen). Dabei zeigte sich, dass je länger die Patienten der Strahlentherapie ausgesetzt waren, desto höhere C-MET Werte nachweisbar waren (Abb. 18).

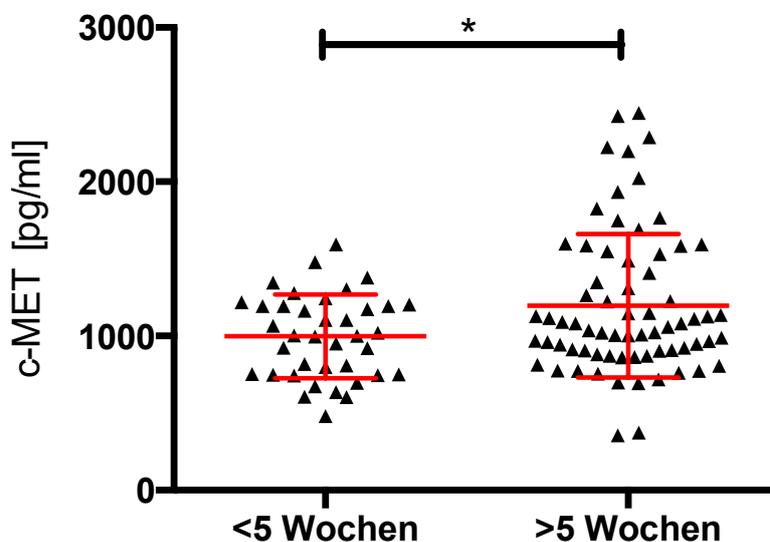


Abb. 18: Einfluss einer Kurzzeit- (1-5 Wochen) bzw. Langzeit- (>6 Wochen) Strahlentherapie auf die C-MET Serumspiegel.

Serumspiegel von C-MET von allen Patienten, die eine neoadjuvante Strahlentherapie erhielten, eingeteilt nach Kurzzeittherapie (<5-Wochen: n=38) und Langzeittherapie (>5 Wochen Therapie: n=69). Mittelwerte und Standardabweichung in rot (Unpaired t-Test: p=0.015).

3.3. Korrelation der Serumspiegel mit prognoserelevanten Faktoren

Im Folgenden wurde die Korrelation der Serumspiegel der vier beschriebenen Parameter mit verschiedenen prognoserelevanten Faktoren wie Geschlecht, Alter und Tumorstadium der Patienten untersucht.

➤ Geschlecht

Für ALCAM zeigte sich eine signifikante Korrelation der Serumspiegel mit dem Geschlecht der jeweiligen Patienten ($p=0.013$; siehe Abb. 19). Dabei wiesen männliche Patienten deutlich höhere Serumspiegel von ALCAM auf als weibliche Patienten. Für AXL zeigten sich ebenfalls bei Männern etwas höhere Werte als bei Frauen. Allerdings erreichten die Unterschiede noch keine statistische Signifikanz ($p=0.06$; two-sided t-Test). Für die anderen beiden Parameter zeigte sich keine signifikante Korrelation (Daten nicht gezeigt).

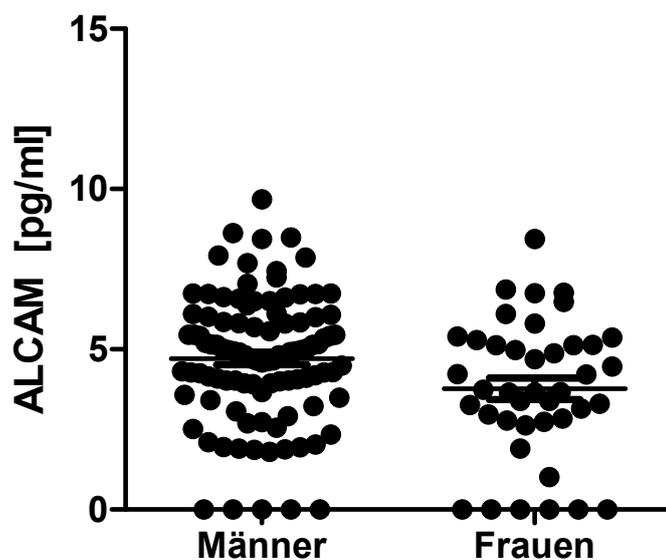


Abb. 19: Korrelation von ALCAM und Geschlecht.

Der Boxplot zeigt die gemessenen Serumwerte für ALCAM bei männlichen und weiblichen Patienten mit Rektumkarzinom. Männer zeigten dabei im Schnitt etwas höhere Serumspiegel ($p=0.013$; two-tailed t-Test).

➤ **Alter**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Serumspiegel der vier Parameter eine Assoziation mit dem Alter der Patienten aufwiesen. Wie die Abb. 20 am Beispiel für AXL veranschaulicht, zeigte sich hierbei keine signifikante Korrelation zwischen den AXL Serumspiegeln und den verschiedenen Altersgruppen der Patienten. Auch die Expression der anderen Parameter korrelierte nicht mit dem Alter der Patienten.

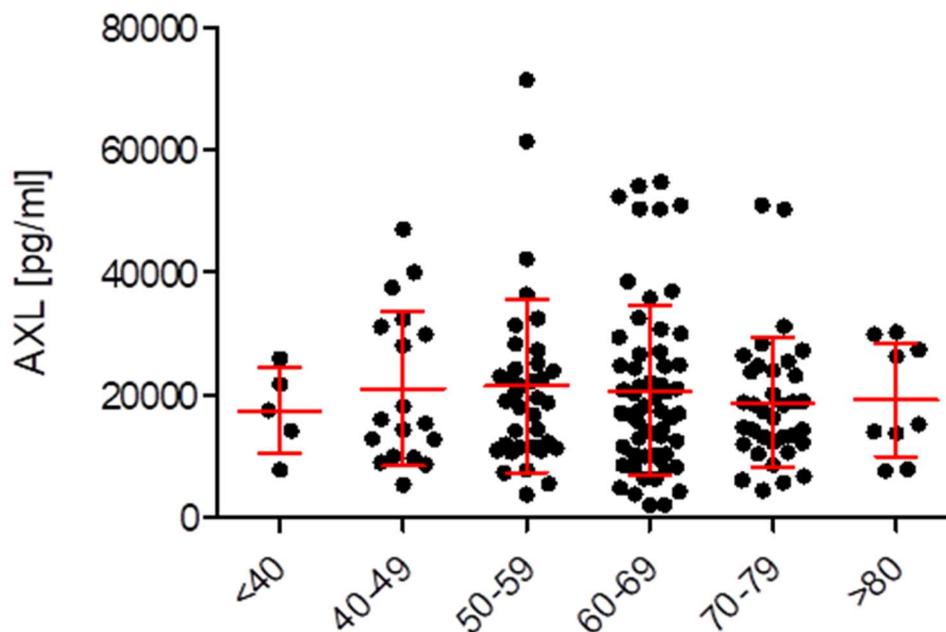


Abb. 20: Einfluss des Alters der Patienten auf die AXL Serumspiegel.

Die Patienten wurden in Altersklassen eingeteilt (<40Jahre bis >80Jahre). Dargestellt sind die AXL Serumspiegel der Tumorpatienten in den verschiedenen Altersklassen mit Mittelwert und Standardabweichung. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation (One-way ANOVA).

➤ Tumorstadien

Für keinen der vier Serummarker ließ sich eine signifikante Assoziation mit der TNM Kategorie oder dem UICC Stadium der Patienten feststellen. Beispielhaft sind in Abb. 21 die Korrelationen zum UICC Stadium dargestellt.

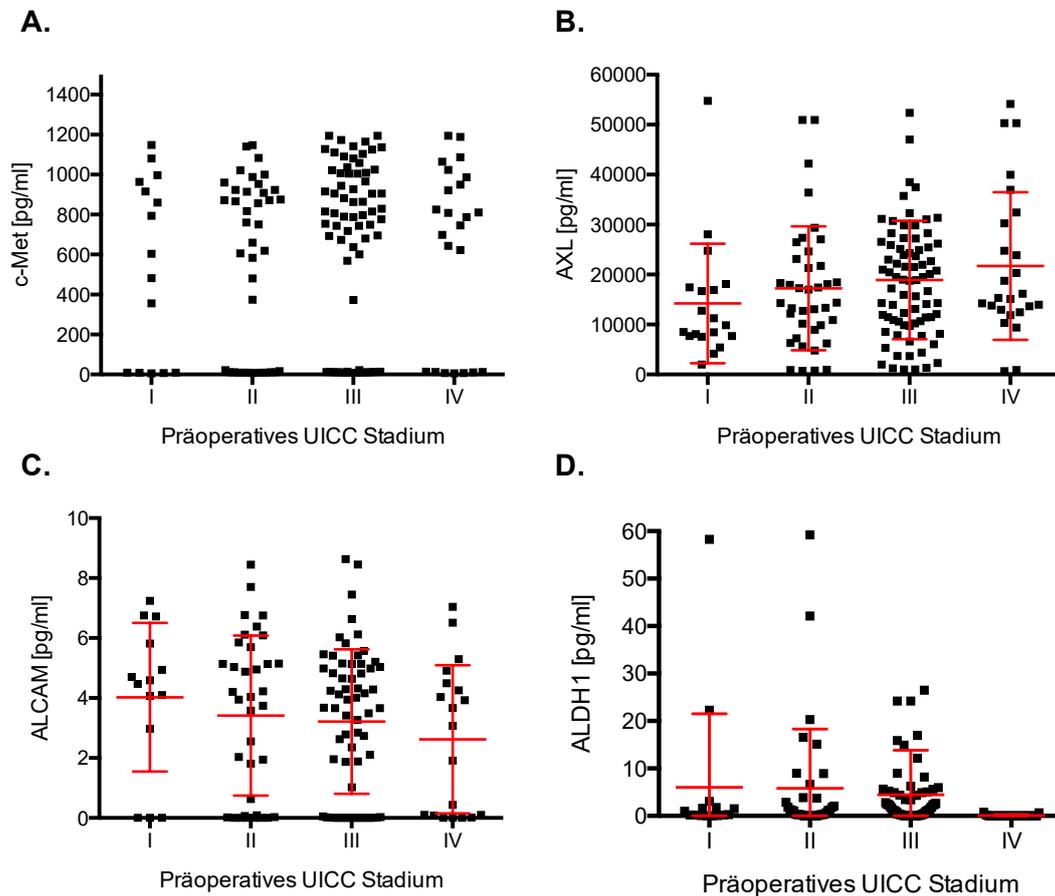


Abb. 21: Korrelation von AXL und UICC Stadium.

Der Boxplot zeigt die gemessenen Serumwerte für AXL in den verschiedenen UICC Stadien. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen (one-way ANOVA).

3.4. Assoziation zwischen AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 und Gesamtüberleben/krankheitsfreiem Überleben der Patienten

Mit Hilfe des Kaplan-Meier Verfahrens wurde der Einfluss der Serum-Expression der vier Proteine sowohl auf das Gesamtüberleben als auch auf das krankheitsfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS) der Patienten untersucht. Dabei zeigte sich im Beobachtungszeitraum (Median 45 Monate) kein signifikanter Einfluss der Proteinkonzentrationen auf das Gesamt- (Abb. 22) bzw. das krankheitsfreie (Abb. 23) Überleben der Patienten.

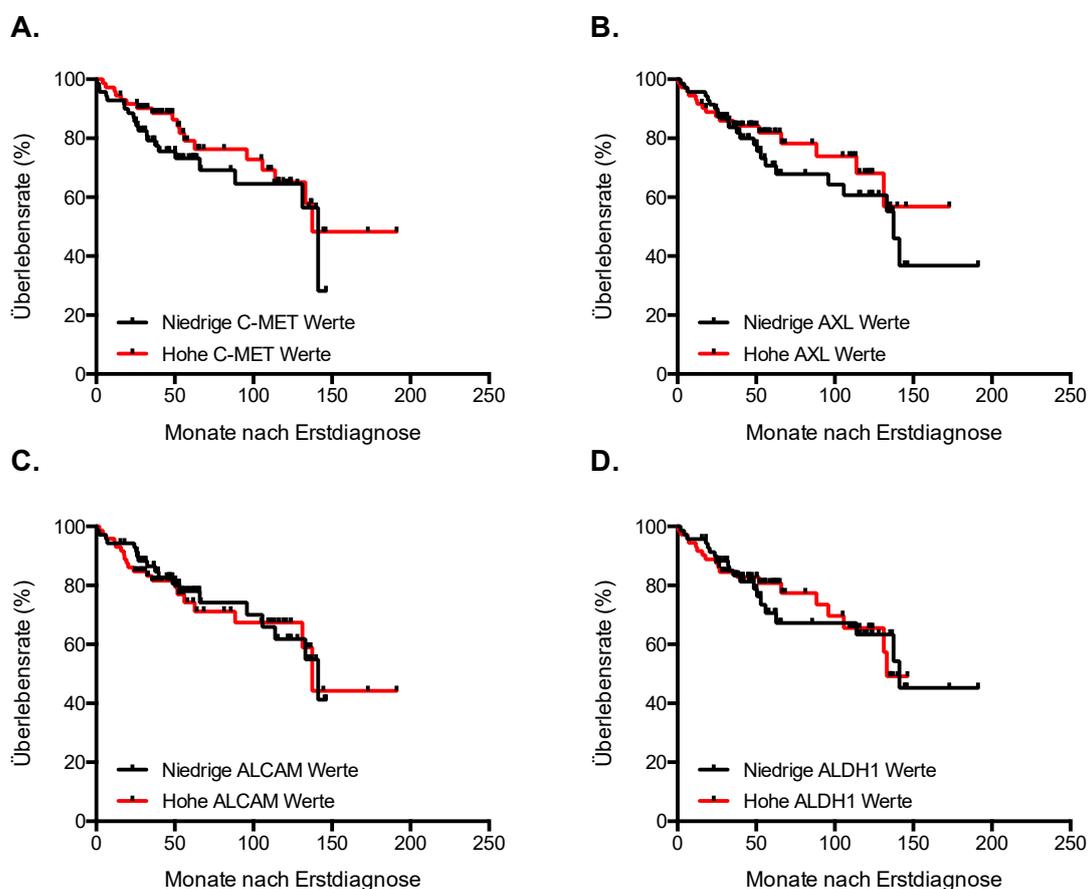


Abb. 22: Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben der Patienten.

Patienten klassifiziert jeweils nach hohen (obere 50%) und niedrigen (untere 50%) Serumwerten für die vier untersuchten Parameter. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

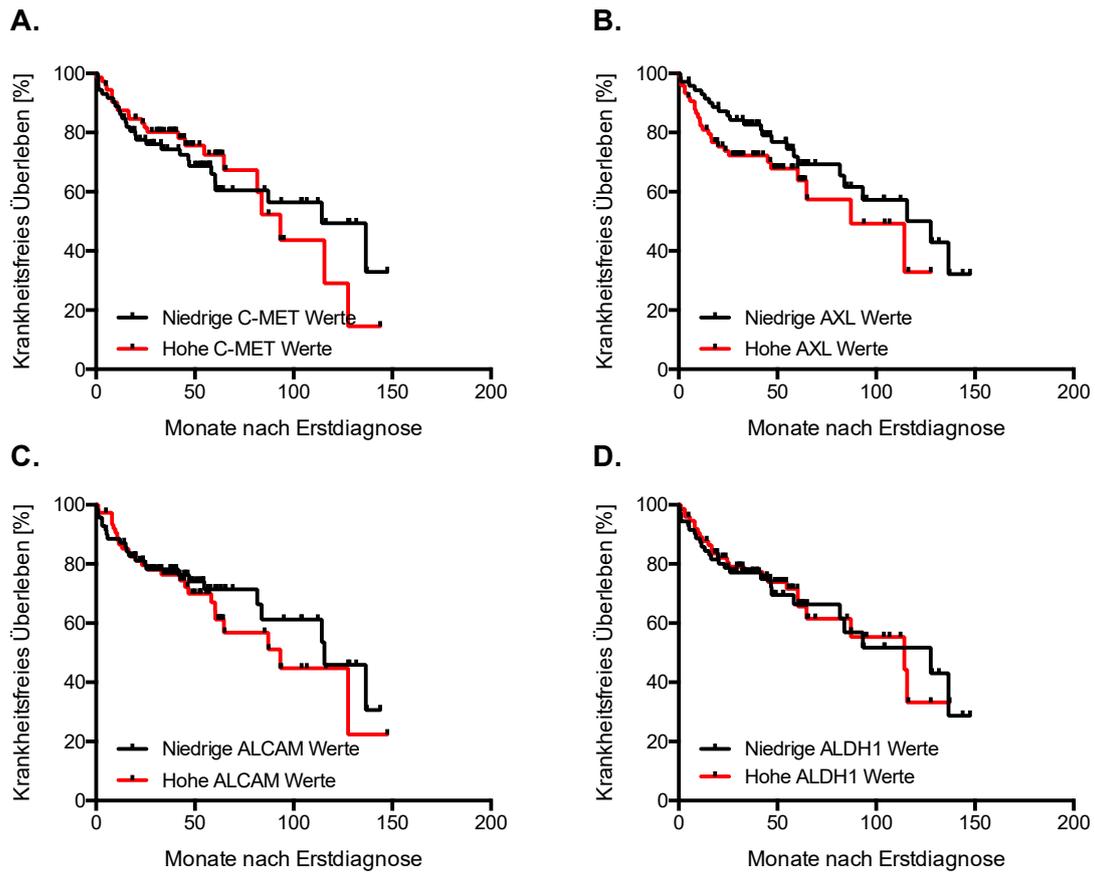


Abb. 23: Kaplan-Meier Kurven zum krankheitsfreien Überleben der Patienten. Patienten klassifiziert jeweils nach hohen (obere 50%) und niedrigen (untere 50%) Serumwerten für die vier untersuchten Parameter. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.5. Korrelation zwischen AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 und Therapieansprechen

Von den vier verschiedenen Markerproteinen deutete sich nur für C-MET ein Einfluss auf das Ansprechen auf die neoadjuvante Behandlung an. Patienten mit hohen C-MET-Werten zeigten ein eher schlechteres Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie (siehe Abb. 24). Dabei erreichte der entsprechende p-Wert mit 0,074 nicht ganz statistische Signifikanz.

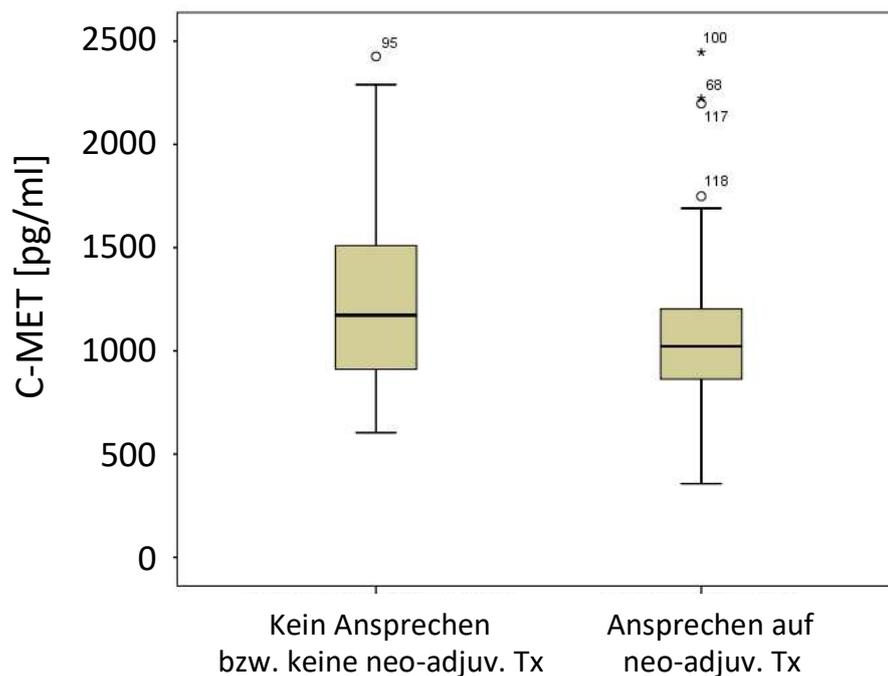


Abb. 24: Korrelation zwischen C-MET und Therapieansprechen.

Patienten mit hohen C-MET-Werten zeigten ein eher schlechteres Ansprechen auf die präoperative Strahlentherapie im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren C-MET Werten ($p=0,074$; two-sided t-Test).

3.6. Korrelation zwischen AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1

Abschließend wurde eine mögliche Assoziation zwischen den vier Parametern untersucht. Dabei zeigte sich für AXL und ALCAM eine signifikante Korrelation ($R=0,29$; $p<0,01$) (siehe Abb. 25). Hingegen war für die anderen drei Parameter keine signifikante Korrelation nachweisbar.

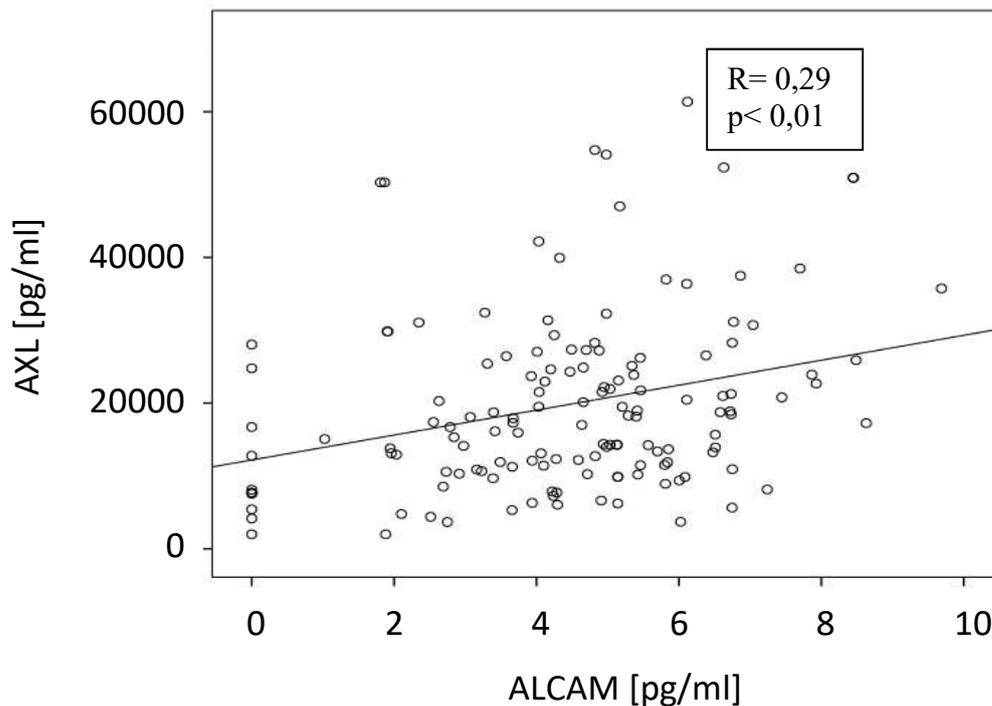


Abb. 25: Korrelation zwischen den Serumwerten für AXL und ALCAM.

Dargestellt ist die Korrelation der gemessenen Serumspiegel für AXL und ALCAM bei den Patienten mit Rektumkarzinom.

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der präoperativen Serumspiegel von vier verschiedenen Proteinen (AXL, C-MET, ALDH1 und ALCAM) untersucht und ihre potentielle Rolle als Tumorstammzellmarker bei rektalem Karzinom analysiert. Alle vier Proteine waren in verschiedenen wissenschaftlichen Studien mit tumorfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht worden ^{44,46,55,66}. Eine (übermäßige) Aktivierung der Expression dieser Proteine fördert die Zellmigration und die Tumorausbreitung in vielen unterschiedlichen Krebsarten, inklusive des Kolorektalen Karzinoms. Darüber hinaus wurden hohe Expressionsniveaus mit schlechteren Krankheitsprognosen sowie mit kürzeren Überlebensraten in einer Reihe von Tumoren korreliert ^{44,46,55,66}.

Bei den hier untersuchten Patienten ließ sich ein in der Literatur beschriebener deutlicher Einfluss des UICC Stadiums auf das Gesamtüberleben der Patienten bestätigen ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu war weder für das Geschlecht, für das Alter der Patienten noch für das TNM Stadium der Tumoren ein signifikanter Einfluss auf das tumorbedingte Überleben nachweisbar. Unsere Ergebnisse sind somit konsistent mit der wissenschaftlichen Erkenntnis, dass das UICC Stadium der aussagekräftigste prognostische Parameter beim KRK ist ⁶⁷.

Für ALDH1 und ALCAM zeigten sich bei den Patienten mit KRK deutlich erhöhte Serumspiegel. Dieses Ergebnis stimmt mit der wissenschaftlichen Literatur zur Überexpression von ALDH1 und ALCAM in Tumorzellen überein ^{56,64,66}. Auch wenn leider keine Serummesswerte vor und nach Operation (OP) vorlagen, so wurde doch versucht anhand von zusätzlichen Blutproben von KRK Patienten nach Operation zu klären, ob sich die erhöhten Serumspiegel bei den Patienten in Abhängigkeit von der Therapie der Tumorerkrankungen wieder normalisierten. So wurde die Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahme relativ zur OP untersucht. Dabei wurden die Patienten in insgesamt 5 Gruppen (Blutabnahme >14d vor OP, innerhalb von 14d vor OP, am Tage der OP, innerhalb von 2 Wochen nach OP und >2 Wochen nach OP) unterteilt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Abfall der ALCAM oder ALDH1 Werte nach OP. Die Entfernung des Tumors im Zuge der OP schien dabei eher keinen Einfluss auf die Höhe der ALCAM/ALDH1 Serumspiegel zu haben. Das gleiche Bild zeigte sich auch in Bezug auf eine durchgeführte neoadjuvante Therapie. Die erhöhten

ALCAM/ALDH1 Werte bei den Patienten ließen sich nicht durch die neoadjuvante Therapie erklären bzw. beeinflussen.

Bei AXL und C-MET zeigten sich erstaunlicherweise bei den Krebspatienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen erniedrigte Expressionswerte. Dies widerspricht den bereits bekannten Literaturdaten ^{41,68}. Die niedrigen AXL/ C-MET Serumspiegel bei den Patienten ließen sich dabei nicht durch den Tumor bzw. die durchgeführten therapeutischen Maßnahmen (OP/neoadjuvante Therapie) erklären und bedürfen der Kontrolle an einer größeren Zahl an Patienten und Kontrollpersonen.

Das interessanteste Ergebnis dieser Untersuchung zeigte sich für C-MET. Hier ließen sich anhand der Serumkonzentration zwei Untergruppen klar voneinander abgrenzen. Während Patienten ohne neoadjuvante Strahlentherapie extrem niedrige Serumwerte im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen, zeigten vorbestrahlte Patienten, d.h. nach Strahlentherapie und vor OP, in Abhängigkeit von der Dosis der Strahlentherapie vergleichbare Serumspiegel wie die Kontrollpersonen. Somit könnte ein erniedrigter C-MET Spiegel ein Indikator für das Vorliegen eines Rektumkarzinoms sein. Dabei könnte die neoadjuvante Radiotherapie durch ihre gewebeschädigende Wirkung wieder die Expression von Genen (inklusive C-MET) induzieren, die an der Reparatur und der Regeneration von Geweben beteiligt sind. Die erniedrigten Serumwerte bei den Tumorpatienten ohne Strahlentherapie sollten daher weiterhin verfolgt und in unabhängigen Messungen sowie in einer zweiten unabhängigen Kohorte inklusive Patienten mit anderen gastroenterologischen Erkrankungen reproduziert und untersucht werden.

Signifikante Korrelationen der Serumspiegel von ALCAM zeigten sich mit dem Geschlecht der Patienten. Männliche Patienten wiesen deutlich höhere Expressionswerte ($p=0,013$) von ALCAM auf als weibliche Patienten. Für AXL zeigten sich ebenfalls bei Männern nicht signifikant erhöhte Werte. Für die weiteren Parameter C-MET und ALDH1 ergaben sich keine signifikanten Korrelationen. Bezüglich des Alters und des TNM Stadiums der Patienten konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen beiden Parametern und der Expression der vier Proteine nachgewiesen werden. In anderen Studien wurden ebenfalls keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Patientenalter, dem TNM Stadium und der Expression von ALCAM beobachtet ^{66,69}.

Des Weiteren konnte mittels immunohistochemischer Analysen gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von ALDH1 im Tumorgewebe mit dem T- und N- Stadium der Patiententumoren korreliert ⁶⁰. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der C-MET Expression im Tumor und dem TNM-Tumorstadium wurde zudem in einer weiteren Studie aufgezeigt ⁷⁰. Die C-MET Expression stieg schrittweise beim Übergang von einem normalen kolorektalen Epithel hin zum Adenom und schließlich zum Karzinom an. Für keinen der vier Parameter ließ sich eine Korrelation mit dem UICC Stadium der Patienten nachweisen. Somit können die Ergebnisse dieser Untersuchung die bereits bekannten Literaturdaten für den Zusammenhang einer erhöhten Expression von C-MET und ALDH1 mit fortgeschrittenen UICC Stadien des KRK nicht bestätigen ^{50,59,71}.

In verschiedenen Studien zeigte sich überwiegend eine schwache Assoziation zwischen den vier Proteinen sowohl mit dem Gesamtüberleben als auch mit dem krankheitsfreien Überleben von KRK Patienten. Hohe Serumspiegel scheinen dabei mit kürzeren Überlebensraten und höheren Rezidivraten einherzugehen ^{44,46,50,59,66}. In der eigenen Untersuchung ließ sich hingegen im Beobachtungszeitraum von median 45 Monaten kein signifikanter Einfluss der Proteinkonzentrationen auf das Gesamt- bzw. das krankheitsfreie Überleben der Patienten beobachten.

Des Weiteren wurde die Korrelation von AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie analysiert. Dabei zeigte nur C-MET einen knapp nicht signifikanten Einfluss der neoadjuvante Behandlung auf das Ansprechen ($p=0,074$). Patienten mit erhöhten C-MET Spiegeln sprachen schlechter auf die präoperative Bestrahlungstherapie an im Vergleich zu denjenigen, die nicht erhöhte Serumwerte aufwiesen. Die gefundenen Ergebnisse unterstützen somit die Ergebnisse anderer Untersuchungen, die für C-MET einen prognostischen Vorhersagewert für das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie beim Rektumkarzinom identifizierten ⁷².

Der Vergleich von AXL, C-MET, ALCAM und ALDH1 untereinander zeigte erstmals eine signifikante Korrelation zwischen den Serumspiegeln von AXL und ALCAM ($p<0,01$). Für ALCAM und ALDH1 fand sich keine Korrelation. Eine solche, bislang nicht beschriebene Korrelation zwischen AXL und ALCAM könnte darauf hinweisen, dass diese zwei Oberflächenproteine an der Aktivierung der Zellproliferation maßgeblich beteiligt sind. Niedrige Expressionsniveaus von AXL sind bei der späten

Embryogenese zu beobachten ⁴¹. Einen solchen positiven Einfluss auf die Zellvermehrung zeigt ebenfalls ALCAM, welches in einer Reihe von Studien als ein erforderliches Element der Hämatopoese, des Nervenwachstums und der Osteoblastenproliferation nachgewiesen ist. Eine Überexpression von sowohl AXL als auch ALCAM scheint die Zellmigration und damit auch die Tumorausbreitung in vielen verschiedenen Krebsarten einschließlich des KRK zu fördern ^{44,66}. Die in der eigenen Untersuchung beobachtete Korrelation von AXL und ALCAM könnte somit einen Hinweis auf die synergistische, tumorfördernde Wirkung dieser Proteine darstellen und auf neue therapeutische Ziele für eine effektivere Behandlung des KRK hinweisen.

Zwei der vier untersuchten Proteine, nämlich ALDH1 und ALCAM, stellen wichtige Vertreter von Tumorstammzellmarkern bei verschiedenen Tumorarten, unter anderem beim KRK, dar ³⁵. Hierbei handelt es sich um spezifische Oberflächenmarker, die Tumorstammzellen von normalen Zellen sowie auch von normalen Stammzellen unterscheiden ³⁴. Als Tumorstammzellen lassen sich diejenige Zellen einer Tumormasse beschreiben, welche die Fähigkeit zur Selbstregeneration und zur Pluripotenz besitzen und daher mit der Initiierung, der Progression und einem Tumorrezidiv einhergehen ³⁴. Bisher sind keine wissenschaftlichen Daten bezüglich der Rolle der Tyrosinkinase-Rezeptoren C-MET und AXL als Tumorstammzellmarker bekannt. Die eigenen Ergebnisse lassen leider keine klaren Rückschlüsse bezüglich des Einflusses beider Proteine auf den Krankheitsverlauf oder das Langzeitüberleben der Patienten zu. Zusammenfassend sind weitere Studien erforderlich, um die Bedeutung der vier Proteine in der Entstehung, der Progression und Therapie des KRK genauer aufzuklären und ihre Wertigkeit als Tumorstammzellmarker besser herauszukristallisieren. Hierbei wäre es insbesondere wichtig, Serumwerte für die vier Parameter AXL, C-MET, ALDH1 und ALCAM, als Verlaufskontrollen der Patienten vor und nach OP sowie bei Rezidiven zu bestimmen. Zudem wäre histologisch die Expression der vier Proteine in den Tumorzellen selbst sowie im umgebenden normalen Gewebe zu analysieren, um Tumoren mit hohen bzw. mit niedrigen Expressionswerten zu differenzieren.

Die Identifizierung neuer und möglichst spezifischer Tumorstammzellmarker beim KRK würde möglicherweise Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf und die Prognose der Erkrankung ermöglichen sowie neue Ansätze für erfolgreichere, personalisierte und somit nebenwirkungsärmere Therapien eröffnen.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen und stellt weltweit bei Männern die dritthäufigste und bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Kolon- und Rektumkarzinom liegt bei etwa 65%.

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Wertigkeit der präoperativen Serumspiegel von vier verschiedenen Proteinen (AXL, C-MET, ALDH1 und ALCAM) untersucht, die in mehreren wissenschaftlichen Studien eine besondere Rolle bei der Entwicklung, der Progression sowie der Prognose und der Therapie unterschiedlicher Krebsarten, inklusive des kolorektalen Karzinoms, spielen. Hierzu wurden die präoperativen Serumspiegel der vier Proteine in einem Kollektiv von 164 Patienten mit KRK des Universitätsklinikums Würzburg mittels ELISA bestimmt. Retrospektiv wurde so untersucht, ob sich hieraus Vorhersagen über den Krankheitsverlauf und das Langzeitüberleben der Patienten ergaben. Zwei der vier Proteine, ALDH1 und ALCAM, stellen interessante Vertreter von Tumorstammzellmarkern bei verschiedenen Tumorarten, unter anderem beim KRK, dar. Hierbei handelt es sich um spezifische Oberflächenmarker, die Tumorstammzellen von normalen Zellen sowie von normalen Stammzellen unterscheiden.

Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich das UICC Stadium auch hier als hochsignifikanter prognostischer Parameter für die Prognose der Patienten, wohingegen das Geschlecht, Alter und TNM Stadium der Patienten keinen wesentlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten.

Patienten mit KRK zeigten vor Operation deutlich erhöhte Expressionswerte für ALDH1 und ALCAM im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Im Gegensatz dazu fanden sich für AXL und C-MET erniedrigte Serumspiegel, wobei sich das interessanteste Ergebnis für C-MET ergab. Hier ließen sich anhand der Serumkonzentrationen zwei Untergruppen klar voneinander abgrenzen. Während KRK Patienten ohne neoadjuvante Strahlentherapie deutlich niedrigere Serumwerte aufwiesen verglichen mit gesunden Kontrollen, zeigten Patienten nach präoperativer Strahlentherapie in Abhängigkeit von der Dosis der Strahlentherapie ähnliche Spiegel wie gesunde Kontrollpersonen. Somit könnte ein erniedrigter C-MET Spiegel ein Risikofaktor für das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms darstellen und

möglicherweise eine prognostische Relevanz besitzen. Die sich wieder dem Wertebereich gesunder Kontrollen annähernden Werte für C-MET nach neoadjuvanter Radiotherapie könnten sich durch die in Folge der Strahlentherapie induzierte Reparatur bzw. Regeneration der bestrahlten Gewebe erklären.

Weiterhin wiesen männliche Patienten deutlich höhere Expressionswerte für ALCAM auf als weibliche Patienten. Für AXL zeigten sich ebenfalls bei Männern nicht signifikant höhere Werte als bei Frauen. Für die weiteren Parameter C-MET und ALDH1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezogen auf das Geschlecht der Patienten. Das Alter und das TNM/UICC Stadium der Patienten ergaben keine Assoziationen zu den Serumspiegeln der vier Proteine. In einem medianen Beobachtungszeitraum von 45 Monaten zeigte keines der vier Proteine im Blut eine Korrelation zum Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben der Patienten. Allerdings ließ sich für C-MET eine schwache negative Korrelation für das Therapieansprechen nachweisen. Patienten mit hohen C-MET Blutspiegeln sprachen dabei nicht signifikant schlechter auf die präoperative Bestrahlungstherapie an. Interessanter Weise zeigte sich eine direkte Korrelation für die beiden Serumspiegel von AXL und ALCAM.

Zusammenfassend ließen sich in dem untersuchten Kollektiv an Patienten mit kolorektalem Karzinom keine klaren Schlussfolgerungen hinsichtlich des Einflusses der beiden Marker AXL und ALCAM auf den Krankheitsverlauf oder das Langzeitüberleben der Patienten ziehen. Die erarbeiteten Ergebnisse bieten allerdings eine gute Grundlage für weiterführende Studien insbesondere zur Rolle von erniedrigten C-MET Serumspiegeln als potentielle Marker für Patienten mit einem KRK. Insgesamt sind weitere Studien erforderlich, um die Bedeutung der Proteine AXL, C-MET, ALDH1 und ALCAM in Tumorstammzellen des kolorektalen Karzinoms und in der Entwicklung, der Progression und der Therapie des KRK genauer zu analysieren.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Johnson, C. M. *et al.* Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* **24**, 1207-1222, doi:10.1007/s10552-013-0201-5 (2013).
- 2 Fielding, L. P. *et al.* Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* **6**, 325-344 (1991).
- 3 Scheele, J., Stang, R., Altendorf-Hofmann, A. & Paul, M. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* **19**, 59-71 (1995).
- 4 Dworak, O. Morphology of lymph nodes in the resected rectum of patients with rectal carcinoma. *Pathol Res Pract* **187**, 1020-1024, doi:10.1016/S0344-0338(11)81075-7 (1991).
- 5 Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M. & Adami, H. O. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* **323**, 1228-1233, doi:10.1056/NEJM199011013231802 (1990).
- 6 Offit, K. Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N Engl J Med* **342**, 124-125 (2000).
- 7 Lynch, H. T., Smyrk, T. & Lynch, J. F. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology* **55**, 103-108 (1998).
- 8 Lynch, H. T. *et al.* Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* **104**, 1535-1549 (1993).
- 9 Herrera, L., Kakati, S., Gibas, L., Pietrzak, E. & Sandberg, A. A. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* **25**, 473-476 (1986).
- 10 Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
- 11 Vogelstein, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-532 (1988).
- 12 Galiatsatos, P. & Foulkes, W. D. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* **101**, 385-398, doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x (2006).
- 13 Munteanu, I. & Mastalier, B. Genetics of colorectal cancer. *J Med Life* **7**, 507-511 (2014).
- 14 Fearon, E. R. K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1978-1980 (1993).
- 15 Vazquez, A., Bond, E. E., Levine, A. J. & Bond, G. L. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 979-987, doi:10.1038/nrd2656 (2008).
- 16 Dukes, C. E. The surgical pathology of rectal cancer. *Am J Surg* **79**, 66-71, illust; Disc, 94 (1950).
- 17 Dukes, C. E. The relation of histology to spread in intestinal cancer. *Br J Cancer* **4**, 59-62 (1950).
- 18 Astler, V. B. & Coller, F. A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* **139**, 846-852 (1954).
- 19 Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C. & International Union against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. 7th edn, (Wiley-Blackwell, 2010).

- 20 Hermanek, P., Wittekind, C. & Seib, H. J. [Current TNM aspects. 5. TNM classification and stage grouping]. *Zentralbl Chir* **122**, 934-937 (1997).
- 21 Hermanek, P. The superiority of the new International Union Against Cancer and American Joint Committee on Cancer TNM staging of gastric carcinoma. *Cancer* **88**, 1763-1765 (2000).
- 22 Smith, R. A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* **66**, 96-114, doi:10.3322/caac.21336 (2016).
- 23 Zauber, A. G. *et al.* Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med* **366**, 687-696, doi:10.1056/NEJMoa1100370 (2012).
- 24 von Kleist, S., Wagener, C. & Breuer, H. [Second International Expert Meeting of the German Foundation for Cancer Research, "Current trends in cancer research." Critical review of tumour markers in diagnosis and surveillance]. *Onkologie* **3**, 310-315 (1980).
- 25 Chen, C. C. *et al.* Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* **124**, 169-174 (2005).
- 26 Dayal, S., Battersby, N. & Cecil, T. Evolution of Surgical Treatment for Rectal Cancer: a Review. *J Gastrointest Surg* **21**, 1166-1173, doi:10.1007/s11605-017-3427-9 (2017).
- 27 Ahmed, S. & Eng, C. Neoadjuvant Strategies: Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin Colon Rectal Surg* **30**, 383-386, doi:10.1055/s-0037-1606372 (2017).
- 28 Kim, J. H. *et al.* Prognostic factors for metastatic colorectal cancer after first-line chemotherapy with FOLFOX-4 or FOLFIRI regimen. *Korean J Gastroenterol* **63**, 209-215 (2014).
- 29 McCleary, N. J., Benson, A. B., 3rd & Dienstmann, R. Personalizing Adjuvant Therapy for Stage II/III Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **37**, 232-245, doi:10.14694/EDBK_175660 (2017).
- 30 Song, C. *et al.* Impact of Postoperative Chemoradiotherapy versus Chemotherapy Alone on Recurrence and Survival in Patients with Stage II and III Upper Rectal Cancer: A Propensity Score-Matched Analysis. *PLoS One* **10**, e0123657, doi:10.1371/journal.pone.0123657 (2015).
- 31 Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15065, doi:10.1038/nrdp.2015.65 (2015).
- 32 S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. *AWMF-Registernummer: 021/007OL* (2017).
- 33 Hamburger, A. W. & Salmon, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**, 461-463 (1977).
- 34 Abdul Khalek, F. J., Gallicano, G. I. & Mishra, L. Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res*, S16-23 (2010).
- 35 Rassouli, F. B., Matin, M. M. & Saeinasab, M. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumour Biol* **37**, 7-21, doi:10.1007/s13277-015-4155-y (2016).
- 36 Langan, R. C. *et al.* Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *J Cancer* **4**, 241-250, doi:10.7150/jca.5832 (2013).
- 37 Langan, R. C. *et al.* A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. *J Cancer* **3**, 231-240, doi:10.7150/jca.4542 (2012).
- 38 Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T. & Jung, A. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* **27**, 844-850, doi:10.1080/07357900902744502 (2009).

- 39 Vaiopoulos, A. G., Kostakis, I. D., Koutsilieris, M. & Papavassiliou, A. G. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* **30**, 363-371, doi:10.1002/stem.1031 (2012).
- 40 Subramaniam, D., Ramalingam, S., Houchen, C. W. & Anant, S. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* **10**, 359-371 (2010).
- 41 Korshunov, V. A. Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clin Sci (Lond)* **122**, 361-368, doi:10.1042/CS20110411 (2012).
- 42 Wu, X. *et al.* AXL kinase as a novel target for cancer therapy. *Oncotarget* **5**, 9546-9563, doi:10.18632/oncotarget.2542 (2014).
- 43 Schoumacher, M. & Burbridge, M. Key Roles of AXL and MER Receptor Tyrosine Kinases in Resistance to Multiple Anticancer Therapies. *Curr Oncol Rep* **19**, 19, doi:10.1007/s11912-017-0579-4 (2017).
- 44 Axelrod, H. & Pienta, K. J. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget* **5**, 8818-8852, doi:10.18632/oncotarget.2422 (2014).
- 45 Ben-Batalla, I. *et al.* Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* **122**, 2443-2452, doi:10.1182/blood-2013-03-491431 (2013).
- 46 Christensen, J. G. *et al.* A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res* **63**, 7345-7355 (2003).
- 47 Gentile, A., Trusolino, L. & Comoglio, P. M. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 85-94, doi:10.1007/s10555-007-9107-6 (2008).
- 48 Schmidt, L. *et al.* Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **16**, 68-73, doi:10.1038/ng0597-68 (1997).
- 49 Rosen, L. S. *et al.* A phase I dose-escalation study of Tivantinib (ARQ 197) in adult patients with metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res* **17**, 7754-7764, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1002 (2011).
- 50 Bardelli, A. *et al.* Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* **3**, 658-673, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0558 (2013).
- 51 Jackson, B. *et al.* Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* **5**, 283-303 (2011).
- 52 Moore, S. M. *et al.* Identification of a novel cytosolic aldehyde dehydrogenase allele, ALDH1A1*4. *Hum Genomics* **3**, 304-307 (2009).
- 53 Liu, Z. J. *et al.* The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* **4**, 317-326 (1997).
- 54 Oelze, M. *et al.* Regulation of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity by electrophiles in vitro. *J Biol Chem* **286**, 8893-8900, doi:10.1074/jbc.M110.190017 (2011).
- 55 Avoranta, S. T. *et al.* ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer. *Hum Pathol* **44**, 966-974, doi:10.1016/j.humpath.2012.10.003 (2013).
- 56 Hessman, C. J., Bubbers, E. J., Billingsley, K. G., Herzig, D. O. & Wong, M. H. Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with advanced-stage colorectal cancer. *Am J Surg* **203**, 649-653, doi:10.1016/j.amjsurg.2012.01.003 (2012).

- 57 Singh, S., Arcaroli, J., Thompson, D. C., Messersmith, W. & Vasiliou, V. Acetaldehyde and retinaldehyde-metabolizing enzymes in colon and pancreatic cancers. *Adv Exp Med Biol* **815**, 281-294, doi:10.1007/978-3-319-09614-8_16 (2015).
- 58 Chen, C. *et al.* Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **6**, e16466, doi:10.1371/journal.pone.0016466 (2011).
- 59 Deng, Y. *et al.* ALDH1 is an independent prognostic factor for patients with stages II-III rectal cancer after receiving radiochemotherapy. *Br J Cancer* **110**, 430-434, doi:10.1038/bjc.2013.767 (2014).
- 60 Chen, J. *et al.* Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0145164, doi:10.1371/journal.pone.0145164 (2015).
- 61 Hansen, A. G. *et al.* Elevated ALCAM shedding in colorectal cancer correlates with poor patient outcome. *Cancer Res* **73**, 2955-2964, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2052 (2013).
- 62 Jeannet, R., Cai, Q., Liu, H., Vu, H. & Kuo, Y. H. Alcam regulates long-term hematopoietic stem cell engraftment and self-renewal. *Stem Cells* **31**, 560-571, doi:10.1002/stem.1309 (2013).
- 63 Chitteti, B. R., Cheng, Y. H., Kacena, M. A. & Srour, E. F. Hierarchical organization of osteoblasts reveals the significant role of CD166 in hematopoietic stem cell maintenance and function. *Bone* **54**, 58-67, doi:10.1016/j.bone.2013.01.038 (2013).
- 64 Ofori-Acquah, S. F. & King, J. A. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res* **151**, 122-128, doi:10.1016/j.trsl.2007.09.006 (2008).
- 65 Donizy, P. *et al.* Prognostic significance of ALCAM (CD166/MEMD) expression in cutaneous melanoma patients. *Diagn Pathol* **10**, 86, doi:10.1186/s13000-015-0331-z (2015).
- 66 Weichert, W., Knosel, T., Bellach, J., Dietel, M. & Kristiansen, G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* **57**, 1160-1164, doi:10.1136/jcp.2004.016238 (2004).
- 67 Zlobec, I. & Lugli, A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J* **84**, 403-411, doi:10.1136/jcp.2007.054858 (2008).
- 68 Ma, P. C. *et al.* Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 1025-1037, doi:10.1002/gcc.20604 (2008).
- 69 Shafaei, S., Sharbatdaran, M., Kamrani, G. & Khafri, S. The association between CD166 detection rate and clinicopathologic parameters of patients with colorectal cancer. *Caspian J Intern Med* **4**, 768-772 (2013).
- 70 Gayyed, M. F., Abd El-Maqsoud, N. M., El-Hameed El-Heeny, A. A. & Mohammed, M. F. c-MET expression in colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases. *J Gastrointest Oncol* **6**, 618-627, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.072 (2015).
- 71 Oh, S. Y. *et al.* ALDH1 is a prognostic factor for patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy and radical resection for stage III rectal cancer. *J Surg Oncol* **111**, 243-247, doi:10.1002/jso.23792 (2015).
- 72 Senetta, R. *et al.* YKL-40/c-Met expression in rectal cancer biopsies predicts tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy: a multi-institutional study. *PLoS One* **10**, e0123759, doi:10.1371/journal.pone.0123759 (2015).

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur des AXL Proteins und seines Liganden Gas 6.....	13
Abb. 2: Aktivierungskaskade des Gas6/Axl Signalwegs.....	14
Abb. 3: Die Struktur des MET Proteins.....	17
Abb. 4: Signalwege und Inhibitoren des C-MET/HGF Signalwegs.....	18
Abb. 5: Genstruktur von CD166 (ALCAM).....	21
Abb. 6: Einfluss des UICC-Stadiums auf das tumorbedingte Überleben bei den Patienten mit Rektumkarzinom dieser Studie.....	28
Abb. 7: Vergleich der AXL-Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen.....	29
Abb. 8: Korrelation von AXL Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur OP.	30
Abb. 9: Korrelation von AXL Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur Strahlentherapie (RT).....	31
Abb. 10: Verteilung der ALCAM-Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen.....	32
Abb. 11: Korrelation von ALCAM Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur OP.....	32
Abb. 12: Korrelation von ALCAM Serumspiegel und Abstand der Blutabnahme relativ zur Strahlentherapie.....	33
Abb. 13: Verteilung der ALDH1-Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen.....	33
Abb. 14: Korrelation von ALDH1 Serumspiegel in Relation zum zeitlichen Abstand der Blutabnahme von der OP.....	34
Abb. 15: Korrelation von ALCAM Serumspiegel in Relation zum zeitlichen Abstand der Blutabnahme von der Strahlentherapie.....	34
Abb. 16: Verteilung der C-MET- Serumspiegel bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen.....	35
Abb. 17: Verteilung der C-MET-Serumspiegel bei Tumorpatienten mit und ohne neoadjuvante Therapie.....	35
Abb. 18: Einfluss einer Kurzzeit- (1-5 Wochen) bzw. Langzeit- (>6 Wochen) Strahlentherapie auf die C-MET Serumspiegel.....	36
Abb. 19: Korrelation von ALCAM und Geschlecht.....	37
Abb. 20: Einfluss des Alters der Patienten auf die AXL Serumspiegel.....	38
Abb. 21: Korrelation von AXL und UICC Stadium.....	39
Abb. 22: Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben der Patienten.....	40
Abb. 23: Kaplan-Meier Kurven zum krankheitsfreien Überleben der Patienten.....	41
Abb. 24: Korrelation zwischen C-MET und Therapieansprechen.....	42
Abb. 25: Korrelation zwischen den Serumwerten für AXL und ALCAM.....	43

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich in meinem Studium und bei der Anfertigung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C.-T. Germer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die damit verbundene Möglichkeit zur Analyse des chirurgischen Patientenkollektivs der Chirurgischen Klinik.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser, der Leiterin der Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie, danke ich herzlich für das interessante Thema, die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die ständige Unterstützung und die exzellente Betreuung in allen Phasen meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Gasser danke ich für die freundliche, fachliche Unterstützung und die Diskussion der Ergebnisse meiner Arbeit.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Sabine Müller, Frau Mariola Dragan sowie Frau Ingrid Strauss möchte ich für die gute Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente herzlich danken.

Herrn Dr. Bülent Polat gilt mein Dank für seine freundliche und unverzichtbare Unterstützung bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinem Ehemann, Lars. Vielen Dank für die liebevolle Unterstützung und den grenzenlosen Rückhalt während der Anfertigung dieser Arbeit.

Vielen Dank, dass Ihr immer an mich geglaubt, mich in schwierigen Phasen motiviert und alles für die Verwirklichung meiner Lebensträume gegeben habt. Ich werde euch ewig dankbar sein. Die vorliegende Arbeit sei euch allen vom ganzen Herzen gewidmet.