

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Michael Flentje

**Untersuchung der Biomarker Osteopontin, CD44 und Isovariante 6 beim
Rektumkarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Volker Liebendörfer

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2020

Referenten:

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Bülent Polat

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2021

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1) Abkürzungsverzeichnis	
2) Tabellenverzeichnis	
3) Abbildungsverzeichnis	
4) Einleitung	1
4.1) Das kolorektale Karzinom	1
4.1.1) Epidemiologie	1
4.1.2) Risikofaktoren, Ätiologie & Pathogenese	2
4.1.3) Metastasierung	4
4.1.4) Tumorklassifikationen	4
4.1.5) Diagnostik	6
4.1.6) Therapie	7
4.2) Osteopontin	10
4.3) Zelloberflächenantigen CD44	14
4.3.1) CD44, CD44v6 und kolorektales Karzinom	16
4.4) Fragestellung	17
5) Material und Methoden	18
5.1) Studienteilnehmer	18
5.2) Studiendurchführung	21
5.2.1) Herkunft, Lagerung, Aufbereitung der Blutproben	21
5.3) Untersuchte Laborparameter	21
5.3.1) Vorbereitungen	22
5.3.2) Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung mittels ELISA	22
5.3.3) Untersuchung von CD44 Standard	23
5.3.4) Untersuchung von CD44 Variante 6	25
5.3.5) Untersuchung von Osteopontin	26
5.3.6) Das Prinzip der Wertebestimmung	27
5.3.7) Auswertung	27
5.3.8) Statistik	28
6) Ergebnisse	30
6.1) Osteopontin	30
6.1.1) Osteopontin-Konzentrationen	30
6.1.2) Osteopontin und Geschlecht, UICC, TNM	32
6.2) CD44	39

6.2.1)	CD44 Konzentrationen	39
6.2.2)	CD44 und UICC Stadien.....	41
6.2.3)	CD44 und einzelne TNM Stadien	43
6.3)	Korrelationen von OPN und CD44	51
6.4)	Gesamtüberleben.....	54
6.4.1)	CD44 und Überleben	63
6.4.2)	Osteopontin und Überleben.....	66
7)	Diskussion.....	68
7.1)	OPN Serum-Konzentration und Limitationen	68
7.2)	OPN und klinische Parameter	68
7.3)	OPN und Prognose	69
7.4)	CD44	70
7.5)	Überlebenszeitanalyse	73
7.6)	Weitere Tumormarker und Ausblick	73
8)	Anhang: Übersichtstabellen	76
9)	Zusammenfassung	79
10)	Literaturverzeichnis.....	80
11)	Danksagung	
12)	Lebenslauf.....	

1) Abkürzungsverzeichnis

ABCB5	-	“ATP-binding cassette member B5“ Effluxprotein
APR	-	Abdominoperineale Rektumexstirpation
BSP	-	Bone Sialoprotein
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
CICs	-	Cancer initiating cells
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAP	-	Familiäre adenomatöse Polyposis
GAGs	-	Glycosaminglycane
DMP1	-	Dentin Matrix Protein 1
DSPP	-	Dentin Sialophosphoprotein
ECM/EZM	-	Extracellular matrix (Extrazellulärmatrix)
GM-CSF	-	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HA	-	Hyaluronsäure
HNPCC	-	Hereditary non-polyposis colon cancer
MDR1	-	Multi-drug-resistance-Protein1
MEPE	-	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
MSI	-	Mikrosatelliten-Instabilität
OPN	-	Osteopontin
RCT	-	Radiochemotherapie
SIBLINGS	-	Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins
TME	-	Totale Mesorektumexzision
UICC	-	Union internationale contre le cancer

2) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patienten-Charakteristika I	18
Tabelle 2: Patienten-Charakteristika II (Fortsetzung)	19
Tabelle 3: Therapie	20
Tabelle 4: Therapie Ansprechen	20
Tabelle 5: Übersicht der p-Werte über den Vergleich der Mittelwerte (t-Test bzw. ANOVA) sowie der Korrelationen und des Überlebens in Bezug auf die Biomarker	76
Tabelle 6: Univariate Cox-Regression bzgl. des Gesamtüberlebens und klinisch relevanter Parameter einschließlich der Biomarker	77
Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression bzgl. des Gesamtüberlebens und der statistisch signifikanten Parameter	78

3) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: OPN Signalwege	12
Abbildung 2: Boxplot OPN Konzentrationen nach Gruppen	31
Abbildung 3: Boxplot OPN und Geschlecht	32
Abbildung 4: Boxplot OPN und UICC Stadien postoperativ	33
Abbildung 5: Boxplot OPN und Primärtumorstadien	34
Abbildung 6: Boxplot OPN und Lymphknotenstatus	35
Abbildung 7: Boxplot OPN und Metastasierung	36
Abbildung 8: Boxplot OPN und Tumoransprechen auf neo-adjuvante Therapie	37
Abbildung 9: Boxplot OPN und Tumorregression nach Dworak	38
Abbildung 10: Boxplot CD44 std Konzentration nach Gruppen	39
Abbildung 11: Boxplot CD44 v6 Konzentrationen nach Gruppen	40
Abbildung 12: Boxplot CD44 std und UICC Stadien	41
Abbildung 13: Boxplot CD44 v6 und UICC Stadien	42
Abbildung 14: Boxplot CD44 std und T-Stadium	43
Abbildung 15: Boxplot CD44 v6 und T-Stadium	44
Abbildung 16: Boxplot CD44 std und Lymphknotenstatus	45
Abbildung 17: Boxplot CD44 v6 und Lymphknotenstatus	46
Abbildung 18: Boxplot CD44 std und pM	47
Abbildung 19: Boxplot CD44 v6 und Fernmetastasierung	48
Abbildung 20: Boxplot CD44 std und Tumorregression	49
Abbildung 21: Boxplot CD44 v6 und Tumorregression nach Dworak	50
Abbildung 22: CD44 std und OPN Korrelation	51

Abbildung 23: CD44v6 und OPN Korrelation	52
Abbildung 24: CD44 std und v6 Korrelation	53
Abbildung 25: Kaplan Meier Kurve zum relativen Gesamtüberleben für alle Patienten in Monaten	54
Abbildung 26: Gesamtüberleben nach UICC Stadien	55
Abbildung 27: Überleben bei Remission	56
Abbildung 28: krankheitsfreies Überleben bei kompletter Remission.....	57
Abbildung 29: Überlebenszeit bei Therapieansprechen/Remission	58
Abbildung 30: krankheitsfreies Überleben bei Resektion (R0, R1, R2)	59
Abbildung 31: Gesamtüberleben bei Resektion (R0, R1, R2)	60
Abbildung 32: Krankheitsfreies Überleben	61
Abbildung 33: Gesamtüberleben und Tumorregression (Dworak).....	62
Abbildung 34: CD44std und Überleben	63
Abbildung 35: CD44 v6 und Überleben	64
Abbildung 36: OPN, CD44v6 und Überleben	65
Abbildung 37: OPN & Gesamtüberleben	66
Abbildung 38: OPN & rezidivfreies Überleben.....	67

4) Einleitung

4.1) Das kolorektale Karzinom

4.1.1) Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. In den letzten Jahren hat die Anzahl der Malignome deutlich zugenommen. Bei Männern und Frauen ist es die zweithäufigste Krebserkrankung (Inzidenz), wobei Männer mit 60/100.000/Jahr häufiger als Frauen (37/100.000/Jahr) erkranken [1].

Am kolorektalen Karzinom erkranken mehr als sechs Prozent aller Deutschen im Laufe ihres Lebens (Lebenszeitprävalenz) und es ist somit die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache der BRD [2].

Das kolorektale Malignom ist eine Erkrankung der alternden Menschen: 90% der Diagnosen werden zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr gestellt, der Altersgipfel beträgt bei den Männern 65-74 Jahren, bei Frauen 75-84 Jahren [1].

Rektumkarzinom

Die Inzidenz des Rektumkarzinoms hat sich zwar in der letzten Dekade um circa 3% pro Jahr verringert; jedoch ist die Anzahl der Neuerkrankungen bei der Altersgruppe <50 Jahren um 1,8% angestiegen. Im Vergleich zu proximalen und distalen Kolontumoren ist das mediane Erstdiagnosealter geringer: 63 Jahre bei Frauen, 65 Jahre bei Männern. Das 5-Jahresüberleben bei Rektumkarzinom (66,5%) ist etwas höher als das der Kolonkarzinome (64,2%), jedoch ist das stadienspezifische Überleben annähernd gleich. Die Ethnie kann ebenso einen Einfluss auf die Mortalität haben [3, 4].

4.1.2) Risikofaktoren, Ätiologie & Pathogenese

Aufgrund der hohen Inzidenzraten ist es besonders wichtig, auf Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms hinzuweisen: Zum Beispiel ist Zigarettenrauchen signifikant assoziiert mit einer erhöhten Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms [5]. Ebenso zu nennen sind ein Mangel an körperlicher Aktivität [6], Übergewicht (verursacht durch hochkalorische Ernährung) und hoher Alkoholkonsum [7, 8]. Bei der Ernährung ist darauf zu achten, möglichst geringe Mengen rotes bzw. verarbeitetes Fleisch zu konsumieren. Der Anteil an frischen Früchten und Gemüse sollte nicht zu gering sein (allgemeine Ernährungsempfehlung „Iss fünf am Tag“ [9]). Außerdem ist das Risiko eines kolorektalen Karzinoms erhöht, wenn ein/e nahe/r Verwandte/r bereits daran erkrankt ist [10]. Zur Risikosenkung sollte die Ballaststoffaufnahme möglichst 30g pro Tag betragen [11].

Das Karzinom tritt häufig sporadisch aufgrund somatischer Mutation und genetischer Instabilität auf. In 95% der Fälle handelt es sich um ein sporadisches Karzinom, d.h. eine erworbene Genmutation. In fünf Prozent der Fälle geht man von einer hereditären Genese aus [12].

Meistens folgt dies der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz, d.h. aus gutartigen Vorstufen heraus entwickelt sich allmählich ein Karzinom [13].

Die meisten Entitäten treten sporadisch auf, allerdings gibt es auch hereditäre Formen: genetische Mutationen können zum hereditären non-polypösen Kolonkarzinom führen, kurz HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer). Dieses wird auch Lynch-Syndrom genannt.

Zur Diagnosestellung kommen sogenannte Amsterdam oder Bethesda-Kriterien zum Einsatz. Hierbei werden Alter, Histologie (MSI: Mikrosatelliteninstabilität) und Verwandtschaftsgrad Betroffener erfasst. So sollten HNPCC-Patienten und Risikopersonen ab dem 25. Lebensjahr jährlich koloskopiert werden [14].

Bei diesem autosomal-dominant vererbten Syndrom liegt ein Defekt der sogenannten Mismatch-Reparatur Gene (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) vor. Diese können die DNA nicht korrekt reparieren und Fehler bei der Zellteilung

fallen an. Dies führt zu einer MSI, d.h. die DNA kann verkürzt oder verlängert sein [15, 16].

Differenzialdiagnostisch ist auch an die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) zu denken, die eine obligate Präkanzerose darstellt: durch autosomal-dominante Mutation des APC-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5 kommt es zur Anreicherung von intrazellulärem β -Catenin. Dieses wiederum wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor und initiiert das Zellwachstum. Der normale Zellzyklus wird gestört und es kommt zur unkontrollierten Ausbildung von bis zu 1000 Polypen im Kolon. Die Adenom-Karzinom-Sequenz wird beschleunigt, sodass es schon im juvenilen Alter zum Auftreten eines Karzinoms kommt [17]. Daher sollten nach molekulargenetischer Testung alle Patienten nach Abschluss der Pubertät proktokolektomiert werden.

Ein weiterer bedeutender Risikofaktor stellt die Colitis ulcerosa dar, bei deren Auftreten das Karzinomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist. Neben der Dauer der Erkrankung ist die Ausdehnung dieser chronisch entzündlichen Darmerkrankung ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines Karzinoms.

Deshalb wird in den S3 Leitlinien betont, dass in der Praxis regelmäßige Überwachungskoloskopien, auch unabhängig von der Krankheitsaktivität, stattfinden sollten. Spätestens 8 Jahre nach Beginn der Symptomatik sollte sie ein- bis zweimal jährlich erfolgen. Dies führt zu einer Senkung der Karzinommortalität [18].

Bei der Colitis ulcerosa spricht man von der „Inflammation – Dysplasie – Karzinom“ Sequenz, d.h. dass es unter ständiger Inflammation der Zellen sukzessive erst zu einer Dysplasie und anschließend zu einem Karzinom kommen kann. Vermutlich spielt hier oxidativer Stress inflammatorischer Zellen eine bedeutende Rolle, der wiederum karzinogene Signalwege begünstigt, wie Veränderungen in p53-Proteinen, DNA mismatch Reparatur-Genen sowie DNA Basen Exzision-Reparatur-Genen [19].

4.1.3) Metastasierung

Die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms kann verschiedene Wege beschreiten: zum einen „per continuitatem“, d.h. direkt vom Primärtumor in das angrenzende perikolische oder perirektale Fettgewebe.

Lymphogen metastasiert das kolorektale Karzinom über drei verschiedene Wege in Abhängigkeit vom Tumorsitz: vom oberen Rektumdrittel (ca 12 – 16cm ab ano) gelangen die malignen Zellen in Richtung der paraaortalen Lymphknotenstationen. Vom mittleren Rektumdrittel ausgehend (6 – 12cm ab ano) gelangen sie zu den paraaortalen Lymphknoten. Im unteren Rektumdrittel (d.h. <6cm ab ano) führt der Metastasierungsweg hauptsächlich über die iliacal int. Lymphknoten. Dadurch wird die Operabilität schwieriger und die Prognose ungünstiger.

Die hämatogene Metastasierung folgt dem venösen Abfluss, d.h. man spricht zum einen vom „Cavatyp“, d.h. entlang der Vena cava direkt in die Lunge. Dies ist anatomisch nur beim distalen Rektumkarzinom möglich. Von der Vena cava aus gelangen die metastatischen Zellen über den venösen Rückstrom zum rechten Herzen und von dort aus in die Lungenkapillaren.

Die übrige hämatogene Metastasierung läuft über den „Pfortadertyp“, d.h. eingeschwemmte Metastasen treten vor allem in der Leber auf. Von dort aus können die malignen Zellen auch weiter in andere Organe gelangen (Kaskadentheorie).

Bei 25% der Patienten finden sich bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen. Unbehandelt kommt es in über 50% der Fälle zur Lebermetastasierung [20, 21].

4.1.4) Tumorklassifikationen

Wie bei den meisten malignen soliden Tumoren wird das kolorektale Karzinom anhand der TNM-Klassifikation eingeteilt. Dadurch erreicht man eine

einheitliche Dokumentation des Tumorstadiums, um zielgerecht, standardisiert die Therapie durchzuführen.

Hierbei steht das T für Tumor, N für Nodus (Lymphknoten), M für Metastase.

Der Zusatz „c“ bedeutet „clinical“ und ist nicht der gesicherte Typ, sondern der „klinisch“ ermittelte, zum Beispiel durch sonografisch kontrollierte Biopsien.

Im Gegensatz dazu bedeutet der Zusatz „p“ „pathology“, was die histopathologische Untersuchung eines OP-Resektates voraussetzt.

Zusätzliche Kategorien sind noch „L0/1“ (Invasion der Lymphgefäße), „V0/1“ (Invasion der Venen), „Pn0/1“ (Perineurale Invasion).

Das „R“ bezieht sich auf die Resektion, und zwar wie viel Tumorstückgewebe noch vorhanden ist: meist können die Tumore komplett reseziert werden (=“R0“).

Beim sogenannten „Grading“ wird zwischen Ziffern von G1 – G4 unterschieden, dies zeigt den Grad der Differenzierung an. Mit G1 ist beispielsweise gemeint, dass das Tumorgewebe gut differenziert ist. Gut differenzierte Tumoren (niedriges Grading) haben in der Regel eine bessere Prognose als schlechter differenzierte (entsprechend hohes Grading) Tumore [22].

Je nach Befall und Ausgangsstadium richtet sich dann die Therapie aus. Daher ist es wichtig, eine normierte Klassifikation zu haben. Von der UICC (frz.: *Union internationale contre le cancer*) wurde 2017 die aktuelle, 8. Version veröffentlicht. Sie ist der internationale Standard Krebsstadien und Progression zu beschreiben [23].

Je nach Ausdehnung des Tumors können die Tumorstadien in UICC Stadien zusammengefasst werden. Das Vorgehen dieser Einteilung nennt man auch „Staging“. Es erlaubt eine gute Vergleichbarkeit von Patienten einer Erkrankung in wissenschaftlichen Studien und ist zudem ein starker Prädiktor. Eine internationale Einteilung ermöglicht also erst internationale Vergleichbarkeit [24].

4.1.5) Diagnostik

Das kolorektale Karzinom ist klinisch schwer zu diagnostizieren, da es keine zuverlässigen bzw. spezifischen Frühsymptome gibt. Am ehesten kann ein Hinweis auf einen malignen Prozess die Blutbeimischung im Stuhl sein. Wenn kein Blut vorhanden ist, schließt das ein Karzinom aber nicht aus. Ebenso sollte der Arzt hellhörig werden, wenn in der Anamnese von einer plötzlichen Änderung der Stuhlgewohnheit berichtet wird (sogenannte Bleistiftstühle, Flatus mit Stuhlabgang, Meteorismus). Ebenso können eine Leistungsminderung, Ileussyndromatik und chronische Blutungsanämie erste klinische Anzeichen eines kolorektalen Karzinoms sein.

Der Tumor ist meistens, d.h. in 50% der Fälle im Rektum lokalisiert, in 30% im Sigma, in 10% im Coecum/Colon ascendens. Dies hat diagnostische Konsequenz: eine wichtige Bedeutung kommt damit der rektalen Untersuchung zu, da man eine große Anzahl (ca. 10%) von Karzinomen palpieren kann.

Zusätzlich zur klinischen Untersuchung und Anamnese kommt der apparativen Diagnostik ebenfalls große Bedeutung zu, allen voran die Koloskopie als Goldstandard. Mit ihr ist nicht nur eine deskriptive Diagnostik möglich, sondern sie bietet auch die Möglichkeit der Intervention (Biopsie, Adenom-abtragung). 60% der Tumoren sind durch eine Rektosigmoidoskopie erfassbar.

Falls die herkömmliche Koloskopie nicht möglich ist, kommt das Spiral-CT zum Einsatz („virtuelle Koloskopie“).

Weitere Diagnostik ist:

- Endosonografie, MRT Becken
- Metastasen Suche: Sonografie Leber, Röntgen Thorax, bzw. CT Thorax/Abdomen
- Tumormarker CEA (nicht tumorspezifisch)
- FDG-PET bei postoperativen Rezidiven

[18, 20]

4.1.6) Therapie

Das Rektumkarzinom ist durch Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie behandelbar.

Das heutige Vorgehen sieht bei UICC Stadium I (d.h. bis T2, N0, M0) die lokale Exzision vor.

Ab UICC Stadium II und III (d.h. T3/4, und/oder N+) wird bei Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels neoadjuvant (Radiochemotherapie) vorbehandelt oder eine Kurzzeit-Radiotherapie durchgeführt.

Diese Therapieschritte werden im Folgenden nun näher erläutert.

Bei der chirurgischen Therapie von Rektumkarzinomen unterscheidet man zwischen der Sphinkter-erhaltenden TME (totale Mesorektumexzision) und der abdominoperinealen Rektumexstirpation (APR). Die TME ist prinzipiell anzustreben um die Kontinenz zu erhalten. Dies ist möglich bei allen Tumoren im oberen und mittleren Rektumdrittels. Dabei ist ein Sicherheitsabstand zu beachten: 5cm am oberen Drittel, 2cm im mittleren. Das regionäre Lymphabflussgebiet entlang des Mesorektums ist dabei stets zu entfernen. Die meisten Tumore können so operiert werden.

Die APR muss durchgeführt werden, wenn der Tumor näher als 5cm an der Anokutanlinie lokalisiert ist. Hierbei wird das gesamte Rektum entfernt und vernäht; ein endständiger Anus praeter zur Stuhlableitung wird angelegt.

Bei low-grade-T1-Karzinomen ohne Lymphgefäßinvasion kann auf beide Operationsarten verzichtet werden. Hier kann eine transanale Lokalexzision durch endoskopische Mukosaresektion durchgeführt werden.

Beim Kolonkarzinom steht die En-bloc-Resektion im Vordergrund. Das Mesenterium einschließlich des regionalen Lymphabflussgebietes wird entfernt. Um intraoperativ das Risiko einer Metastasenverschleppung gering zu halten, wurde die sogenannte „no touch“ Technik entwickelt.

Leber- und Lungenmetastasen können bei limitierter Metastasierung mit kurativer Zielsetzung entfernt werden.

Bei Metastasierung des Peritonealraumes kann eine radikale Peritonealoperation mit einer intraoperativen Chemotherapie („HIPEC“: Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie) in palliativer Intention kombiniert werden.

Bei fortgeschrittenen Tumoren wird ab Stadium II präoperativ die neoadjuvante Therapie angestrebt. Diese verbessert das lokal-rezidivfreie Überleben [25]. Auch aus chirurgischer Sicht ergeben sich direkte Verbesserungen: durch Tumorzellreduktion lässt sich die Gesamtmasse des Tumors verringern, man spricht dabei von „Downsizing“. Oftmals wird dadurch auch ein niedrigeres T-Stadium erreicht. Dabei spricht man von Downstaging. Hieraus resultiert eine Verbesserung der R0-Resektion und der (tiefsitzende) Tumor kann somit eher Sphinkter-erhaltend (und damit Kontinenz-erhaltend) operiert werden. Außerdem kann durch die Tumorverkleinerung ein vorerst inoperabler Tumor in einen operablen Befund überführt werden. Ferner ist die Verträglichkeit und Therapietreue höher, wenn präoperativ behandelt wird [26].

Die Chemotherapie soll mit 5-FU (5-Fluoruracil), mit oder ohne Folinsäure, durchgeführt werden. Indiziert ist diese Therapie beim UICC Stadium III und wird simultan mit Bestrahlung ausgeführt [18, 27].

In der Regel wird an fünf Tagen pro Woche über kumulativ 28Tage mit 1,8Gy bestrahlt, bis eine Gesamtstrahlendosis von 50,4Gy erreicht ist. Eine Alternative ist die Kurzzeitbestrahlung. Hierbei bestrahlt man 5mal mit 5Gy die Tumorregion mit einer Gesamtdosis von 25Gy.

Das Ziel ist hier ebenfalls die Reduktion der Rezidiv Rate. Da hier direkt im Anschluss an die Radiochemotherapie operiert wird, kommt es zu keiner Tumorverkleinerung. Neuere Daten zeigen, dass eine Kurzzeit-Radiotherapie gefolgt von Chemotherapie vergleichbare Kontroll- und Überlebenszeiten zeigt wie die Langzeit Radiochemotherapie [28], auch wenn die Kurzzeit Radiotherapie nicht zu einem Downstaging führt [29].

Generell hat sich in den letzten Jahren die Strahlentherapie deutlich weiter entwickelt: durch korrekte Lagerung und moderne Bestrahlungstechniken können die Nebenwirkungen, die durch die Bestrahlung verursacht werden, minimiert werden [30, 31].

Die gängigen Therapieschemata werden ständig re-evaluiert: Beispielsweise zeigte sich, dass die Vorteile einer präoperativen Radiochemotherapie gegenüber der postoperativen Behandlung eine geringere Komplikationsrate, ein verbessertes Downsizing/Resektabilität, reduzierte Toxizität und eine höhere Rate von operablen sphinkternahen Tumoren sind. Auch wenn die präoperative Therapie keinen zusätzlichen Überlebensvorteil im Vergleich zur postoperativen schafft, so zeigte sich jedoch eine deutlich reduzierte Lokalrezidivrate von 11% auf 6%. Diese Ergebnisse waren so ausschlaggebend, dass sich die präoperative RT bis heute als Standardtherapie durchgesetzt hat [27].

Die Patienten, die keine neoadjuvante Therapie (ab UICC-Stadium II) erhalten haben, sollen eine adjuvante Radiochemotherapie bekommen [18].

Das aktuelle Vorgehen befindet sich in einem laufenden Reevaluationsprozess: Beispielsweise zeigte eine aktuelle Studie, dass gerade Patienten mit UICC II und III Stadien von der Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie profitieren [32].

Kommt es nach neoadjuvanter RCT zu einer kompletten Tumorregression, weisen diese Patienten eine besonders gute Prognose auf [25].

4.2) Osteopontin

Zentraler Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist das Protein Osteopontin (OPN). Dieses Protein gehört zur Familie der „SIBLINGS“, was ein Akronym ist und „small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins“ bedeutet.

Fünf Proteine machen diese Familie aus:

- Osteopontin (OPN),
- Bone sialoprotein (BSP),
- Dentin Matrix Protein 1 (DMP1),
- Dentin Sialophosphoprotein (DSPP)
- Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE)

Diese Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Tumorprogression. So sind SIBLINGs lösliche, sekretorische Proteine, die sowohl zellmodulatorische, als auch zelladhäsive Effekte haben. OPN hat dabei beim Fortschreiten eines Karzinoms eine herausragende Stellung. So konnte in vielen Tumorentitäten eine prognostische Rolle nachgewiesen werden; erste therapeutische Konzepte könnten hier angreifen [33].

Alle SIBLINGs haben die Eigenschaft an eine Reihe von verschiedenen membranständigen Rezeptoren zu binden; besonders bedeutend dabei sind die Integrine: Diese Interaktion soll Zellen aktivieren, die wiederum Metalloproteasen exprimieren, um zum Beispiel extrazelluläre Matrix abzubauen.

Früher nahm man an, dass die SIBLINGs Proteine speziell im Knochengewebe vorkommen und eine bedeutende Rolle bei der Ossifikation einnehmen. Ab den 1990er Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen hochregulierten SIBLINGs bei Mammakarzinom festgestellt, bei dem es zu pathologischen Mikrokalzifikationen kam und diese Tumore damit zu Knochenmetastasen neigten [34].

Osteopontin ist ein saures Glykoprotein mit einer RGD Sequenz (R: Arginin, G: Glycin, D: Aspartat) und hat eine molekulare Masse von etwa 44 kDa [35]. OPN bindet über die RGD Sequenz an Integrinen. Über eine weitere Bindungsstelle kann es CD44 Rezeptoren an der Plasmamembran binden [36]. Durch

proteolytisches Schneiden von Thrombin an der entsprechenden RGD Sequenz kommt es zur Aktivierung, bzw. Modellierung der Funktion von OPN; neben der RGD Sequenz gibt es noch zahlreiche weitere Bindungsstellen [37]. In Vermittlung mit β 1-Integrinen können so Signalwege aktiviert werden um Metalloproteasen (MMP-3, MMP-7) zu exprimieren, was zu einer verstärkten Zelladhäsion und Zellmigration führen kann [38].

Weitere Arbeiten kamen zu dem Ergebnis, dass Osteopontin im Organismus viel verbreiteter ist als zunächst angenommen: es wird von verschiedensten Geweben und Organsystemen exprimiert wie z. Bsp. Knochen, Niere, Gefäße, aktivierte Makrophagen, Lymphozyten oder Brustdrüsen-Epithelgewebe [39, 40]. Zusätzlich ist OPN auch in diversen Körperflüssigkeiten zu finden, wie z. Bsp. in Blut, Milch, Urin und Sperma.

Die Serum OPN Konzentration korreliert positiv mit dem Ausmaß des Tumorbefalls bei Krebspatienten: Beim Mammakarzinom eignet sich OPN als prognostischer Marker [41].

Zudem soll es neben der Zelladhäsion auch die Chemoattraktion und Immunmodulation beeinflussen, sowie die Zellmigration in Zusammenhang mit VEGF induzieren [42–44].

Es wurde außerdem gezeigt, dass OPN an CD44 bindet und damit die Migration von Zellen beeinflusst [45]. Vor allem Osteoklasten und Makrophagen sind durch Aktivierung ihrer Pseudopodien aktivierbar. Es kommt dabei zur Bildung eines CD44/OPN/ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) Komplexes, der eine positive Auswirkung auf die Aktin Filament Struktur hat, was wiederum die Zellmigration fördert [46].

Wenn OPN fehlt, kann beobachtet werden, dass z. Bsp. die Osteoklasten-Mobilität beträchtlich eingeschränkt wird und die Knochenresorptionsrate signifikant herabsinkt. Auch wird diese OPN Funktion autokrin über CD44 vermittelt [47].

Als eine weitere CD44 vermittelte Wirkung von Osteopontin sei die Anti-apoptotische Wirkung GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) genannt. Hierbei wird wie bei der IL-3 vermittelten Signalkaskade

ebenso der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway aktiviert, der dann wiederum seine anti-apoptotische Wirkung entfaltet [48].

Die Abbildung 1 zeigt vereinfacht die Signalwege von OPN: Es begünstigt Tumorprogress über den CD44 und $\alpha\beta3$ Rezeptor und regt die Angiogenese an, sorgt für EZM Abbau und Migration, fördert Zellüberleben und Proliferation. (Eigene modifizierte Abbildung nach [49], mit Genehmigung von Baishideng Publishing Group Inc, Pleasanton, USA).

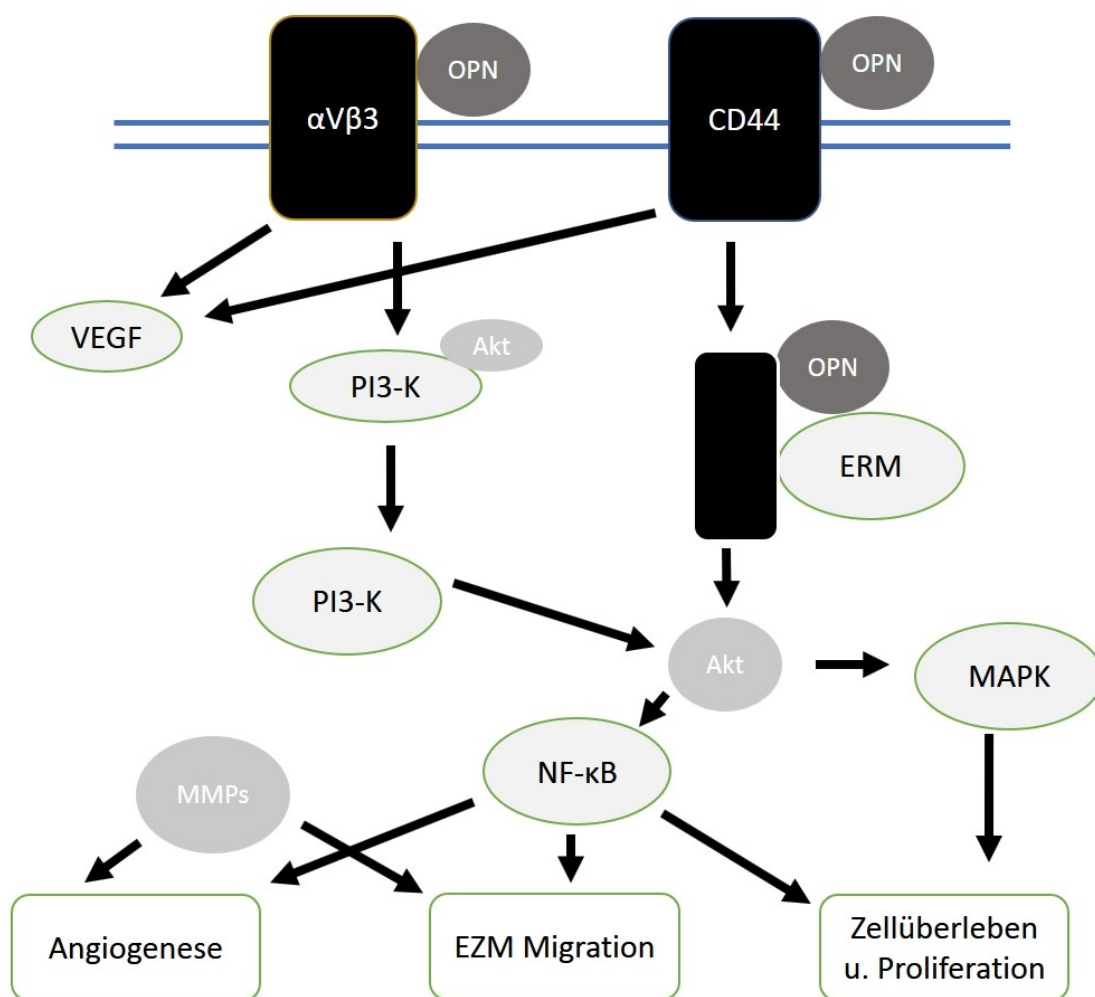


Abbildung 1: OPN Signalwege (eigene modifizierte Abbildung nach [49], mit Genehmigung von Baishideng Publishing Group Inc, Pleasanton, USA)

VEGF: Vascular endothelial growth factor; PI3-K: Phosphoinositid 3-kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; NF: Nuclear factor; MMP: Matrix Metalloprotease; ERM: Ezrin/radixin/moesin; Akt: Proteinkinase B.

Es soll verdeutlicht werden, dass die Wirkung des OPN neben den bereits erwähnten pro-inflammatorischen Wirkungen (verstärkte Chemotaxis, Zelladhäsion, sowie T-Zell Funktion und Monozyten & Makrophagen Funktion) auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist: Dabei kann die Expression von Stickstoffmonoxid durch OPN inhibiert werden. Während einer Sepsis wird so verstärkt OPN in den Gefäßen sezerniert, wodurch weniger NO freigesetzt werden kann. NO selbst induziert die Expression von OPN, sodass von einer sich selbst tragenden autoregulatorischen Schleife gesprochen werden kann [50, 51].

In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass OPN auch in der Synovia bei rheumatoider Arthritis vorkommt und dort die Produktion von NO und Prostaglandin E2 inhibiert und so Knorpelschäden und letztendlich der Gelenksdestruktion entgegenwirkt [52, 53].

In einer aktuellen Metanalyse wurde die herausragende Rolle von Osteopontin zusammengefasst: in zahlreichen unterschiedlichen Malignomen zeigte es sich als Diagnose- und Prognoseparameter, insbesondere auch bei Kindern und jungen Erwachsenen [54].

In einer Vorgänger Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigten sich postoperativ erhöhte OPN Serum Konzentrationen bei HNO Tumoren, die auf einen inflammatorischen Prozess zurückgeführt wurden. Es wurde dabei aber auch die These unterstützt, dass OPN sich bei fortgeschrittenen HNO Tumoren als prognostischer Marker eignet [55].

Des Weiteren zeigte eine andere Arbeit unserer Arbeitsgruppe, dass OPN unter Hypoxie beim Kolon Karzinom hochreguliert werden kann, was zu erhöhter Strahlenresistenz führt. Dies wiederum hätte bedeutende therapeutische Konsequenz. Die Vermutung liegt nahe, dass der OPN Rezeptor unterschiedlich exprimiert wird, je nach Malignität der Zellreihe. Dies würde erklären, weshalb bei höhergradiger Malignität die Strahlenresistenz durch OPN steigt. Dies müsste in zukünftigen Arbeiten weiter erforscht werden [56].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Osteopontin viele unterschiedliche Funktionen im Organismus hat. In vielen Arbeiten wird

Osteopontin bereits als prognostischer Marker bestätigt, eine Metaanalyse stellt Osteopontin als den sensitivsten Marker für das kolorektale Karzinom dar [57]. Eine Arbeit sieht OPN als hauptsächlichen Marker für das Kolonkarzinom [58]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass OPN bei der Metastasierung von kolorektalen Karzinomen eine wichtige Bedeutung haben soll [59]. Durch den p38-MAPK Signalweg aktiviert OPN Zellprogression und hemmt Zellautophagie [60]. Aktuellste Untersuchungen zeigen eine OPN Serumkonzentrationserhöhung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom [61]. Also ist die Rolle von OPN bei der Tumorentstehung, Progression und Therapie bei kolorektalen Karzinomen besonders wichtig und bedarf weiterer Erforschung.

4.3) Zelloberflächenantigen CD44

Das CD44 Antigen ist ein ubiquitär auf der Zelloberfläche exprimiertes Glykoprotein, das Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte vermittelt. In menschlichen Zellen befindet sich das CD44 Antigen auf Chromosom 11 [62].

Es hat sieben extrazelluläre, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische Domäne [63]. Es wurden zwei aktive Bindungsstellen für Glycosaminglycane (GAGs) [64] gefunden, außerdem kann am CD44 Rezeptor Laminin [65] und Fibronectin [66] binden. Diese beiden Glykoproteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix. Durch Bindung dieser ist es Zellen mit CD44 Rezeptoren überhaupt möglich, eine Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion einzugehen und somit Adhäsion und Migration zu vollziehen [67]. Proliferierende Epithelien steigern die Hochregulation von sowohl CD44, als auch die Synthese von Hyaluronsäure (HA) [68]. HA dient CD44 als Ligand und wird besonders bei Angiogenese [69], Wundheilung [70] und embryonaler Zellmigration exprimiert [71]. HA dient damit als CD44 vermittelter Ligand für Zellbewegungen und auch Zell-Zell Kontakten, vor allem in Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten [72].

Die Lymphozyten-Funktion soll auch wesentlich von der CD44 Aktivität abhängen: Bei aktivierten T-Zellen fand man eine verstärkte Expressierung von

CD44 Proteinen auf der Zelloberfläche. Dies soll die Extravasation positiv beeinflussen [73].

Verschiedene Isoformen von CD44 sollen außerdem für die korrekte Antigenpräsentation und Migration von Langerhans Zellen und dendritischen Zellen verantwortlich sein [74].

Des Weiteren ist CD44 ein Ziel des Wnt-pathway: Patienten mit einer adenomatösen Polyposis coli (APC) entwickeln hunderte von kolorektalen Polypen, die auf einen Verlust der APC Funktion und damit konstitutiven Aktivierung von β -Catenin zurückzuführen sind. Gerade in mutierten Zellen in den Darmkrypten sollen CD44 Isoformen besonders zahlreich exprimiert werden. Ein Zusammenhang zwischen CD44 und der Tumorgenese ist denkbar [75].

Ferner stabilisiert CD44 die MDR1 (multi-drug-resistance-Protein1) Expression, was ein Mechanismus darstellen könnte, wieso Stammzellen gegenüber einer Chemotherapie relativ resistent sind [76].

CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure und kann ebenso mit anderen Liganden interagieren, wie z.B. mit Osteopontin, Kollagenen, und Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Die wichtigste physiologische Rolle von CD44 ist aber die Aufrechterhaltung von Gewebsstrukturen über Zell-Zell Kontakte und Zell-Matrix Adhäsion. Einige Isoformen können aber auch Lymphozyten aktivieren und bei der Präsentation von sekundären Botenstoffen und Hormonen beteiligt sein. Herausragend könnte jedoch die Rolle einer hochregulierten Expression von multiplen CD44 Isoformen sein, die möglicherweise als diagnostischer, prognostischer oder sogar therapeutischer Marker eingesetzt werden könnten [67].

Man fand heraus, dass bei vielen Tumorentitäten CD44, inklusive verschiedener Isoformen, verstärkt exprimiert wird. Dies geschieht auf sogenannten Tumor-initiiierenden Zellen: CICs (cancer initiating cells) [77]. Die Apoptose ist, wie bei Stammzellen, bei diesen Zellen nicht leicht zu initiieren.

Nach einer langen Ruhephase können sie ihren Zellzyklus wieder aktivieren und so zu einem Rezidiv führen [78].

Eine aktuelle Untersuchung zeigte CD44 als bedeutendes Adhäsionsmolekül, dass eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielt. CD44 bindet OPN (sowie Hyaluronan und andere sekundäre Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren, Cytokine) an der Extrazellulären Matrix. Dabei wurde CD44 als Tumorstammzellenmarker in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert. [79]

4.3.1) CD44, CD44v6 und kolorektales Karzinom

Wie schon erwähnt, soll bei zahlreichen Malignomen die Anzahl von CD44 und Isoformen hochreguliert sein. In einer Arbeit wurde gezeigt, dass CD44 im Serum von fortgeschrittenen Magen- und Rektumkarzinomen signifikant erhöht war und dabei auch mit der Tumormasse und Metastasierung korrelierte [80].

Einer weiteren Arbeit zufolge, waren CD44 und CD133 bei erhöhten Serumkonzentrationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert. So erklärten die Autoren die Antigene zu Verlaufsmarkern [81]. Zu einem ähnlichen Schluss kommt eine weitere Studie, die in CD44v6 als einen bedeutenden prognostischen Indikator für Patienten mit kolorektalen Karzinomen sahen [82].

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte eine geringe Korrelation der Serumkonzentration mit der immunhistochemischen Expression feststellen. Postoperativ nahmen die CD44v8-10 Serumkonzentrationen ab. Hier konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Serum CD44 und einer Serosainfiltration bzw. dem histologischen Typ aufgestellt werden. Allerdings war dies bei lymphatischer und Lebermetastasierung der Fall [83], was auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte: Besonders hoch waren die Konzentrationen von CD44v6 bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen, was möglicherweise Rückschlüsse auf die Bedeutung dieses Moleküls auf die Tumorgenese zulässt [84, 85].

Auf der anderen Seite gab es auch widersprüchliche Ergebnisse. Eine Arbeitsgruppe fand keinen Zusammenhang zwischen Serumkonzentration und

Ausmaß des Tumorbefalls [86]. Weitere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass kein Zusammenhang zwischen CD44, bzw. CD44v6 und Rektumkarzinom zu finden sei [85, 87].

Es besteht also dringend Klärungsbedarf um die Bedeutung von CD44 weiter zu erforschen.

4.4) Fragestellung

Es ist bekannt, dass sowohl Osteopontin, als auch CD44 und seine Variante 6 einen positiven Effekt auf die Progression von Karzinomen haben.

Diese Arbeit hat zum Ziel, Zusammenhänge der drei Biomarker im Blutserumspiegel von Patienten mit Rektumkarzinomen zu finden und aufzuzeigen. Es soll dabei untersucht werden, ob sich Osteopontin und CD44 als prognostische Serummarker bei Rektumkarzinom Patienten bestätigen.

Anhand retrospektiver Untersuchungen an asservierten Patientenproben soll die prognostische Wertigkeit von OPN, CD44 und CD44v6 evaluiert werden.

Es soll untersucht werden, wie die unterschiedlichen Biomarker untereinander korrelieren.

Des Weiteren wird die Korrelation dieser Biomarker mit klassischen klinischen Prognosemarkern wie Alter, Tumorstadium, etc. untersucht werden.

5) Material und Methoden

5.1) Studienteilnehmer

In nachfolgender Tabelle sind die Patientencharakteristika aufgezählt. Die Daten beruhen auf einer umfassenden Recherche von Patientenakten im Archiv der Strahlenklinik der Universitätsklinik Würzburg und der digitalen Daten im SAP, sowie dem klinischen Tumorregister. Die wichtigsten Punkte sind im Folgenden zusammengefasst.

Patienten-Charakteristika I	Wert
Gesamtanzahl	164
Geschlecht: männlich / weiblich	122 / 42
Alter bei Erstdiagnose (Mittelwert \pm SD)	63,9 \pm 10,9
(Median, range)	64,3 (31,4 – 83,6)
Blutproben präOP	137
Blutproben postOP	8
Blutproben vor Metastasen OP	19

Tabelle 1: Patienten-Charakteristika I

Patienten-Charakteristika II (Forts.)		Anzahl
TNM-Stadium		
Tumorstadium	T0*	14
	T1	12
	T2	50
	T3	80
	T4	6
	N0	104
	N1	35
	N2	22
	M0	134
	M1	24
UICC präOP	I	19
	II	41
	III	77
	IV	25
UICC postOP	I	47
	II	41
	III	39
	IV	22
Grading G1		2
Grading G2		118
Grading G3		19
MSI +		2
Follow-Up in Monaten (Median)		45

Tabelle 2: Patienten-Charakteristika II (Fortsetzung)

** nach neoadjuvanter Therapie*

Therapie	Anzahl
Anzahl neoadjuvanter Therapien	114
Keine neoadjuvante Therapie	50
Art der Bestrahlung (Langzeit vs Kurz)	91 / 21
Resektion R0	148
Resektion R1	3
Resektion R2	9
Mercury Grad1	67
Mercury Grad2	11

Tabelle 3: Therapie

Therapie Ansprechen	Anzahl
Downstaging	72
komplette Remission (pCR)	14
Regressionsgrad (Dworak) 1	9
Regressionsgrad (Dworak) 2	28
Regressionsgrad (Dworak) 3	14
Regressionsgrad (Dworak) 4	10
Rezidiv	56
Todesfälle	53
gestorben am Rektumkarzinom	35

Tabelle 4: Therapie Ansprechen

5.2) Studiendurchführung

5.2.1) Herkunft, Lagerung, Aufbereitung der Blutproben

Die zu untersuchenden Blutproben entstammen aus der Tumorgewebe- und Serenbank in Kooperation mit der Klinik für Allgemeinchirurgie der Universitätsklinik Würzburg. Nach Abnahme wurde das Blut zentrifugiert, einige Milliliter Serum in ein handelsübliches Mikroreaktionsgefäß gefüllt und das Blutserum streng bei -80°C gelagert.

Bei jeder Serumprobe fand die Abtretung der Materialien im Rahmen der durchgeführten Patientenaufklärungen an das UKW (Universitätsklinikum Würzburg) statt. Grundlage für die Verwendung der Proben waren die gültigen Bestimmungen in der Interdisciplinary Biomaterial and Data Bank Würzburg im CCC (Comprehensive Cancer Center Mainfranken).

Bei allen Proben ist sichergestellt, dass es sich dabei um EDTA Blutplasma von Patienten handelt, bei denen ein Rektumkarzinom histologisch gesichert wurde. Bei 83% der Patienten lag der Zeitpunkt der Blutentnahme einen Tag vor der OP oder direkt am selben Tag (präOP n=137).

Um Messfehler zu vermeiden, wurde ein rezidivierendes Auf-/Abtauen vermieden. So wurde das Plasma im Rahmen dieser Arbeit gesammelt bearbeitet. Nach kurzem Auftauen wurden die Proben direkt in die entsprechenden Eppendorf-Reaktionsgefäße („Eppis“) gegeben und sofort nach den zu untersuchenden Parametern geordnet: Osteopontin, CD44 Variante 6, CD44 Standard Variante.

Anschließend wurden diese Proben bis zur endgültigen Bearbeitung im Probenschrank des Labors der Strahlenklinik der Universitätsklinik Würzburg bei -80°C gelagert.

5.3) Untersuchte Laborparameter

Im Labor der Strahlenklinik untersuchte ich neben der Konzentration von Osteopontin in Blutseren von Rektumkarzinom Patienten auch die Blutserum

Konzentrationen der Glykoproteine CD44 Variante „Standard“ und die gesonderte „Variante 6“.

Beim Vorgehen habe ich mich streng an die Gebrauchsinformation des Herstellers gehalten. Die folgenden Werte und Lösungen wurden als fertig gepacktes Set von der Firma IBL (IBL International GmbH, Hamburg) geliefert.

5.3.1) Vorbereitungen

Zuerst legt man alle benötigten Materialien zurecht und fertigt eine Skizze der ELISA Platte an. Für die Standard Lösungen, die für die später benötigte Eichgerade angefertigt werden, benutzt man je zwei wells (*engl.* Wanne) der ELISA Platte. Für die Patientenproben benutzt man pro Patienten drei wells, wovon später der Mittelwert genommen wird, um (ev. falsche) Wertschwankungen möglichst gering zu halten.

5.3.2) Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Um die Konzentration der drei Parameter (Osteopontin, CD44 Variante 6, CD44 Standard Variante) in den Seren der Patienten zu ermitteln, entschieden wir uns für das antikörperbasierte Nachweisverfahren „ELISA“: Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Im Folgenden wird das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beschrieben:

In diesem Fall sind spezifische Antikörper an Mikrotiterplatten mit 96 wells fest gebunden. Das nachzuweisende Antigen wird in die wells gegeben und an der Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und angereichert. Dann wird die Platte gewaschen und somit ungebundene Bestandteile entfernt. Im folgenden Schritt wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der ein anderes Epitop (Bindungsstelle des Proteins für den Antikörper) binden kann. So entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Bildlich betrachtet entspricht dies einem „Sandwich“, daher spricht man bei dieser Methode auch von einem „Sandwich-ELISA“.

Nun wird ein erneuter Antikörper, hinzugegeben, der mit einem Enzym assoziiert ist. Das Reaktionsgefäß wird geleert, sodass nur noch Antigen-Antikörper Komplexe vorhanden sind. Wenn man ein passendes Substrat, auch „Chromogen“ genannt, hinzufügt, findet eine chemische Reaktion statt, die man als Farbumschlag sehen und messen kann. Je intensiver die Färbung, desto mehr Antigen-Antikörper Komplexe sind vorhanden. Dies kann man mit einem Photometer exakt bestimmen. Für quantitative Nachweise wird eine Serie mit einer bekannten Antigenkonzentration, eine sogenannte Standardreihe, durchgeführt. Da man das optische Signal und das photometrische Ergebnis kennt, ist es möglich eine mathematische Funktion, eine Kalibrierungsgerade, aufzustellen. Nun lassen sich auch unbekannte Konzentrationen anhand dieser Funktion bestimmen.

Die Durchführung der ELISA Bestimmung werde ich in den kommenden Kapiteln konkret für meinen Fall beschreiben.

5.3.3) Untersuchung von CD44 Standard

Zur Vorbereitung gehört das Anrichten der Waschpufferlösungen: 50ml davon werden in 950ml destilliertes Wasser gegeben, so erhält man 1000ml Waschpuffer.

5ml Assay Buffer Konzentrat werden zu 95ml destilliertem Wasser gegeben, was 100ml Assay Buffer ergibt. Es ist darauf zu achten, dass dieser vor dem Anrichten bei +2 bis +8°C gekühlt gelagert wird.

Die Patientenproben werden aus dem Eisschrank geholt und langsam aufgetaut. 8µl werden in Eppis pipettiert und mit 472µl Puffer verdünnt, sodass man ein Verhältnis von 1:60 erhält.

Anschließend wird die ELISA Platte mit jeweils 400µl Waschlösung pro well befüllt und kurz darauf wieder entleert; diesen Vorgang nennt man „waschen“. Es ist darauf zu achten, zügig aber korrekt zu arbeiten.

Nun wird der Standard angerichtet: Dieser soll 1:2 verdünnt werden, sodass man 225µl der Sample Diluent Lösung in jedes well pipettiert, anschließend 225µl (Konzentration von 8ng/ml) der Standard Lösung in die erste Standard well (S1). Dadurch ergibt sich eine S1 Konzentration von 4ng/ml. Man nimmt daraus erneut 225µl und gibt sie in die zweite Standard well (S2), mischt gut durch und pipettiert erneut 225µl in die nächste Standard well. Bei jedem Abpipettieren ist darauf zu achten, eine neue Pipettenspitze zu nehmen, um Verunreinigungen vorzubeugen. So erhält man insgesamt sechs Standard Lösungen, die zum Erstellen der Eichgerade benötigt werden.

Anschließend wird die Standard Verdünnung („Standard Dilution“) auf die ELISA Platte aufgetragen: 100µl in jedes Standard well.

Im ersten Feld wird ein „Blank“ (*engl.* Leere) aufgetragen mit 100µl Sample Diluent (d.h. lediglich Verdünnungslösung ohne weiteren Inhalt).

Nun können die zu untersuchenden Seren der Patienten aufgetragen werden: 20µl der bereits verdünnten Lösung werden jetzt nochmals 1:5 verdünnt und zusammen mit jeweils 80µl Sample Diluent in jedes well pipettiert. So wird jedes well mit 100µl befüllt.

Nun bereitet man die Lösung der Antikörper vor und achtet darauf, dies maximal 30 Minuten vor der Anwendung zu tun. Es finden zwei Verdünnungsstufen statt: bei der ersten werden 490µl Assay Buffer zu 10µl HRP Conjugate (= Antikörper) gegeben. Die Antikörper werden nun 1:50 verdünnt. Bei der zweiten Verdünnungsstufe werden 150µl der ersten Verdünnung zu 5850µl Assay Buffer gegeben; diese Verdünnung ist damit 1:40. Man erhält damit 6000µl Antikörper Pufferlösung.

Davon pipettiert man 50µl in alle wells und lässt die gesamte Platte 3 Stunden lang bei Raumtemperatur (18°-25°C) auf einem Shaker inkubieren.

45 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit stellt man die TMB Solution (Enzymreaktionslösung) aus dem Kühlschrank, sodass diese auf Raumtemperatur gebracht werden kann.

Schließlich leert man die gesamte ELISA Platte und wäscht sie dreimalig. Dann gibt man 100µl der TMB Solution auf alle wells, lässt diese 7 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren. Die Lösung wird blau; je dunkler (in diesem Fall kräftigere Blaufärbung) die Färbung des einzelnen wells, desto höher die Konzentration.

Im letzten Schritt gibt man 100µl der Stop Solution auf alle wells; die enzymatische Reaktion wird dadurch gestoppt. Sichtbar ist das an der Gelbfärbung der Lösung.

Die Platte wird nun im Photometer bei 450nm ausgelesen: Je kräftiger die Farbe, desto höher die Lichtabsorption, desto höher auch der Wert der zu bestimmenden Konzentration.

5.3.4) Untersuchung von CD44 Variante 6

Die Bestimmung der Konzentration von CD 44 Variante 6 ist prinzipiell fast identisch zur vorhergehenden Beschreibung von CD 44 Standard Variante. Im Nachfolgenden werden also nur die Abweichungen davon beschrieben:

- Es werden 20µl Patientenserum zu 380µl Sample Dilution (*engl.* Probenverdünnungslösung), also ein Verhältnis von 1:20, hinzugefügt.
- Die Standardwerte sind höher konzentriert: S1 beträgt 10ng/ml, S2 5ng/ml, usw. .
- Bei der zweiten Verdünnung der Patientenseren wird weniger verdünnt: 40µl der ersten Verdünnung wird mit 60µl Sample Dilution vermengt.
- D.h. die erste Verdünnung ist 1:20, die zweite Verdünnung ist 1:2,5; somit erreicht man eine gesamte Verdünnung von 1:50, die man mit dem Faktor 50 in der Wertebestimmung (s.u.) einfließen lassen muss.
- Außerdem ist die Antikörperlösung verdünnter: bei der ersten Verdünnung 1:20 (10µl HRP Konzentrat zusammen mit 190µl Assay Buffer) und bei der zweiten Verdünnung 1:100 (60µl der ersten Verdünnung zusammen mit 5940µl Assay Buffer). Dies war eine Vorgabe des Herstellers und hat keine weitere Konsequenz in der Vorgehensweise.

5.3.5) Untersuchung von Osteopontin

Auch hier war die Vorgehensweise bis auf einige Punkte ähnlich mit den vorhergehenden Verfahren. Die Unterschiede werden im Folgenden erläutert:

- Es werden 50µl Patientenserum zu 400µl Puffer, also ein Verhältnis von 1:9, hinzugefügt. Davon kommen 100µl in ein well.

Die Verdünnung wurde zuvor in Vorversuchen von meinem Vorgänger Philipp Kaiser und der betreuenden Biologin Gisela Wohlleben auf ein optimales Ergebnis vorgetestet.

- Die Standardwerte von OPN sind höher konzentriert: Man löst zuerst mit 0,5ml destilliertem Wasser eine Lösung mit 640ng/ml. Nach Zugabe von 230µl Puffer (entsprechend einer 1:1 Verdünnung) entsteht so die erste Standardverdünnung: S1 beträgt 320ng/ml, S2 160ng/ml, usw.
- Die Antikörperlösung wird 1:30 verdünnt: 400µl konzentrierter OPN Antikörper wird mit 11600µl Lösung verdünnt.
- Bei der Reihenfolge der Vorgehensweise ergeben sich die größten Unterschiede zu den CD44 Versuchen: Nachdem man die Proben (jeweils 100µl in jedes well) aufgetragen hat, wird die Platte für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird sie acht Mal gewaschen. Erst jetzt wird der Antikörper (jeweils 100µl pro well) hinzugegeben. Dieser wird erneut bei +4°C inkubiert. Im Anschluss wird die Platte erneut neun Mal gewaschen. Erst dann wird nach Abwerfen des Überschusses das Substrat „Chromogen“ hinzugefügt und 30 Minuten im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Lösung färbt sich blau, nach Zugabe der „Stop Solution“ verändert sich die Farbe zu gelb und wird sofort im Lesegerät bei 450nm ausgelesen.

Das letzte Drittel der Osteopontin Ergebnisse wurde dankbarerweise aus zeitlichen und organisatorischen Gründen von der betreuenden Biologin Gisela Wohlleben ermittelt.

5.3.6) Das Prinzip der Wertebestimmung

Nach der photometrischen Bestimmung der Werte der Seren, errechnet man die Eichgerade anhand der Standardwerte. Die Höhe der Konzentration der sechs Standardwerte ist bekannt, ebenfalls die photometrische Bestimmung. Anhand dieser Werte kann mithilfe des Programms Microsoft Excel® eine lineare Funktion berechnet werden. So kann man anhand dieser Funktion die Werte der Blutseren berechnen. Es ist darauf zu achten, dass man die Werte um den Faktor multipliziert, mit dem man sie zuvor verdünnt hatte. Zum Beispiel ist bei der CD44 Standard Variante die erste Verdünnung 1:60, die zweite Verdünnung 1:5; insgesamt also 1:300. Man muss das photometrische Ergebnis also auch mit 300 multiplizieren um den korrekten Wert zu berechnen.

5.3.7) Auswertung

Nachdem alle Serumproben auf deren Konzentration hin untersucht wurden, folgt der nächste Arbeitsschritt: Im Archiv der Strahlentherapie wird eine MS Excel® Tabelle angefertigt, die die Ergebnisse der Laboruntersuchung mit individuellen Patientendaten kombiniert. Folgende Werte werden anhand der Daten des Tumorregisters der Universitätsklinik Würzburg und anhand der Papierakten bzw. elektronischen Dokumentation erhoben:

- Datum der Probenentnahme
- Patientename mit Geschlecht, Geburtsdatum (pseudoanonymisiert)
- Datum der Erstdiagnose
- Erfolgte Therapie
- Neoadjuvante Therapie
- TNM Klassifikation mit UICC Stadien, sowohl prä- als auch postoperativ
- Pathohistologie (G, L, V, Pn, Regression, Mercury, MSI)
- Datum der Rektumoperation
- Beginn und Ende der Radiotherapie mit Fraktionierung und ev. simultaner Chemotherapie
- OPN, CD44 Standard und Variante 6 Werte

- „last seen“ (letzter Patientenkontakt, bzw. Todesdatum)
- Overall-survival (Gesamtüberleben), am Karzinom verstorben
- Progression und Datum des Progresses
- Fernmetastasen Lokalisation
- Bemerkungen, Verlaufsinformationen

5.3.8) Statistik

Zur statistischen Analyse verwenden wir die Software SPSS Version 23 und Version 26 (IBM, USA). Als Signifikanzniveau wird ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt. Um das Gesamtüberleben zu analysieren, wurden Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier angefertigt. Die Signifikanz wurde mittels Log-Rank-Test überprüft. Das Versterben eines Patienten wurde als Ereignis definiert; zensiert wurden die Daten zum Zeitpunkt des Endes einer Nachsorge.

Der Test auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt.

Da für alle drei Biomarker keine Normalverteilung vorlag, wurden Mittelwertvergleiche durch nichtparametrische Tests untersucht:

Bei zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test ("Wilcoxon Rangsummen-Test") durchgeführt.

Bei mehr als zwei unabhängigen Kategorien einer Variablen erfolgte der Mittelwertvergleich durch eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) nach Kruskal-Wallis.

Die Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens wurde mittels Cox-Regression ermittelt.

Boxplot Definition

Boxplots in den Ergebnissen werden wie folgt definiert: Die mittleren 50% (25-75%) der Daten liegen innerhalb der Box. Oberhalb und unterhalb des Medianwertes (horizontaler Querstrich) wird die Box vom oberen und unteren Quartil begrenzt. Die oberen und unteren Whisker (T-Balken) entsprechen dem

1,5-fachen der Höhe der Box. In der Regel liegen 95% der Daten innerhalb dieser Whisker.

Ausreißer werden als Kreise dargestellt, Sterne sind extreme Ausreißer.

6) Ergebnisse

6.1) Osteopontin

6.1.1) Osteopontin-Konzentrationen

In der folgenden Abbildung [Abbildung 2] teilten das Gesamtkollektiv nach drei Gruppen ein, um die Osteopontin Werte zu vergleichen: in der ersten und größten Gruppe (n=137) waren die Patienten vertreten, die direkt vor der Rektum Operation (d.h. Primärtumor) das Blut mit entsprechenden OPN Serumspiegeln abgenommen bekamen. In der zweiten Gruppe (n=19) bekamen die Patienten das Blut im Rahmen von Metastasen Operationen (in der Regel Lebermetastasen) abgenommen. Die dritte Gruppe (n=8) umfasste alle postoperativen Blutabnahmen innerhalb einer Woche.

In der ersten Gruppe betrug der OPN Mittelwert 673 ng/ml (+/-389 ng/ml), in der zweiten Gruppe bereits 893 ng/ml (+/-429 ng/ml).

Die Gruppeneinteilung wurde deshalb vorgenommen, da sich postoperative Werte erwartungsgemäß durch inflammatorische Reaktion erhöhen [43]. So können die Gruppen getrennt betrachtet werden, erhöhte Werte können gesondert dokumentiert werden.

Die dritte Gruppe zeigte im Vergleich die höchsten OPN Werte mit einem Mittelwert von 1483 ng/ml. Dieser Wert war signifikant höher im Vergleich zur ersten Gruppe mit $p=0,028$.

Ein Boxplot Diagramm soll das Ergebnis visuell verdeutlichen:

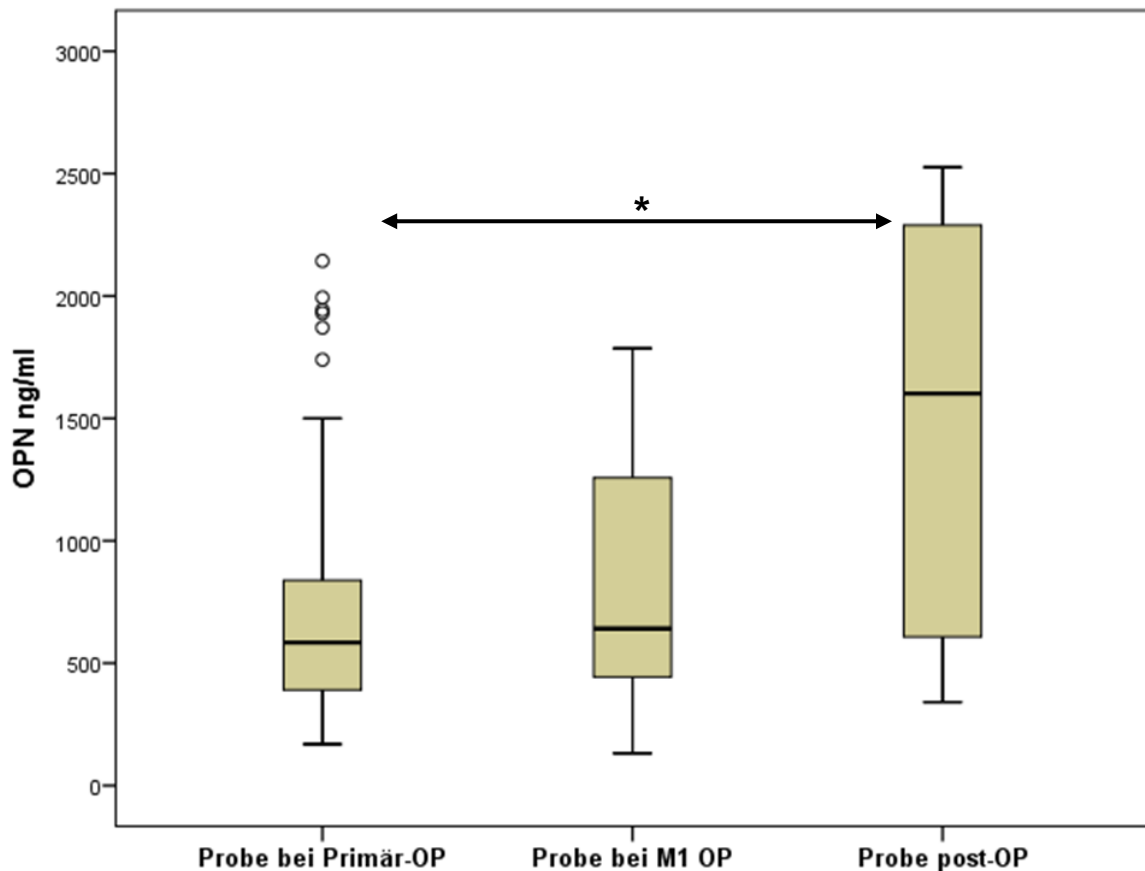


Abbildung 2: Boxplot OPN Konzentrationen nach Gruppen

* signifikanter Unterschied, $p=0,028$.

In diesem Boxplot wird die OPN Konzentration entsprechend der prä-OP, Metastasen-OP und post-operativ angezeigt. Die mittleren 50% (25-75%) der Daten liegen innerhalb der Box. Oberhalb und unterhalb des Medianwertes (horizontaler Querstrich) wird die Box vom oberen und unteren Quartil begrenzt. Die oberen und unteren Whisker (T-Balken) entsprechen dem 1,5-fachen der Höhe der Box. In der Regel liegen 95% der Daten innerhalb dieser Whisker. Ausreißer werden als Kreise dargestellt, Sterne sind extreme Ausreißer. Verglichen mit dem OPN Werten bei prä-OP steigen die OPN Werte sowohl nach Metastasen-OP und insbesondere post-operativ signifikant an (Markierung mit „*“).

6.1.2) Osteopontin und Geschlecht, UICC, TNM

Osteopontin und Geschlecht

Wir untersuchten, ob sich die OPN Werte unter den Geschlechtern unterscheiden. Im folgenden Boxplot [Abbildung 3] veranschaulichen wir, dass die Unterschiede nicht signifikant waren ($p > 0,05$):

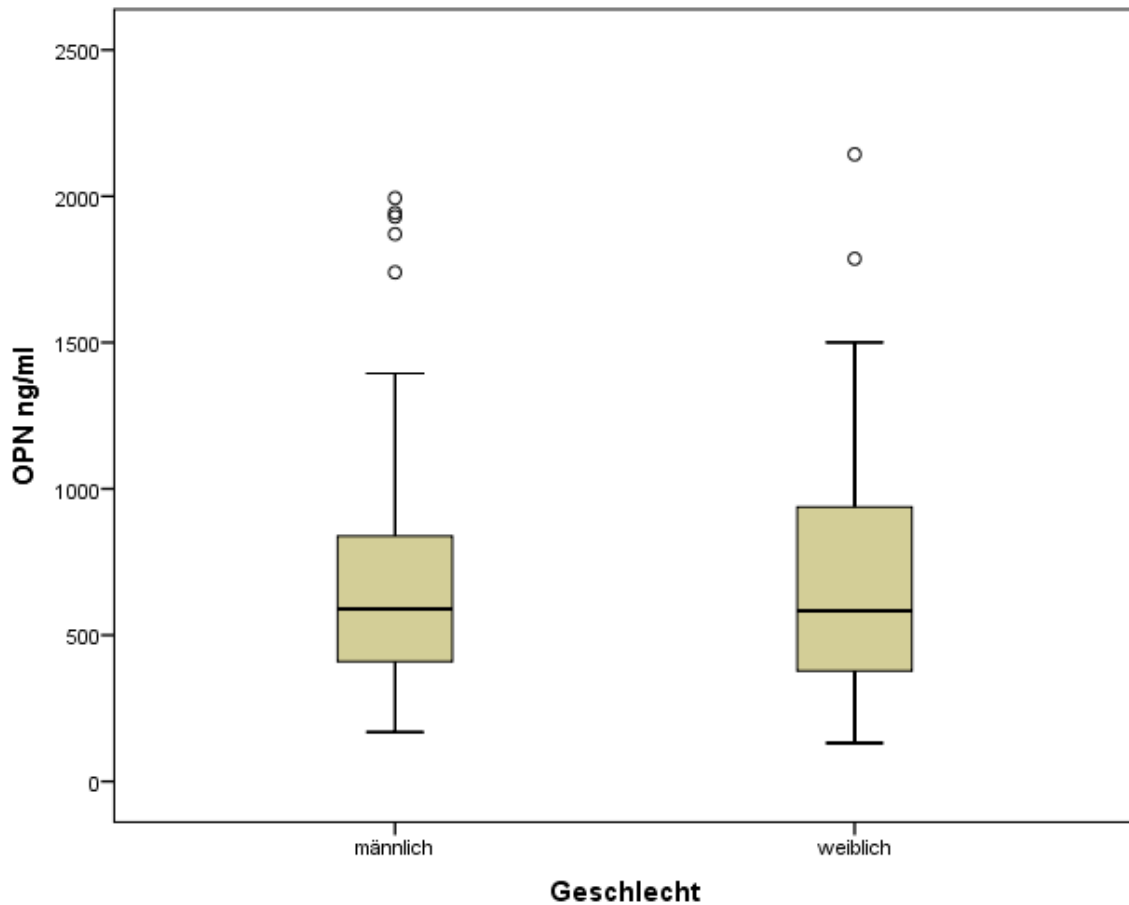


Abbildung 3: Boxplot OPN und Geschlecht

Osteopontin und UICC Stadien

Um zu untersuchen, inwiefern die Blutkonzentration von Osteopontin mit den UICC Stadien (postoperativ) zusammenhängt, stellten wir die Werte in einem Boxplot [Abbildung 4] dar. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen herausfinden (ANOVA). Zur Veranschaulichung hier der dazugehörige Boxplot:

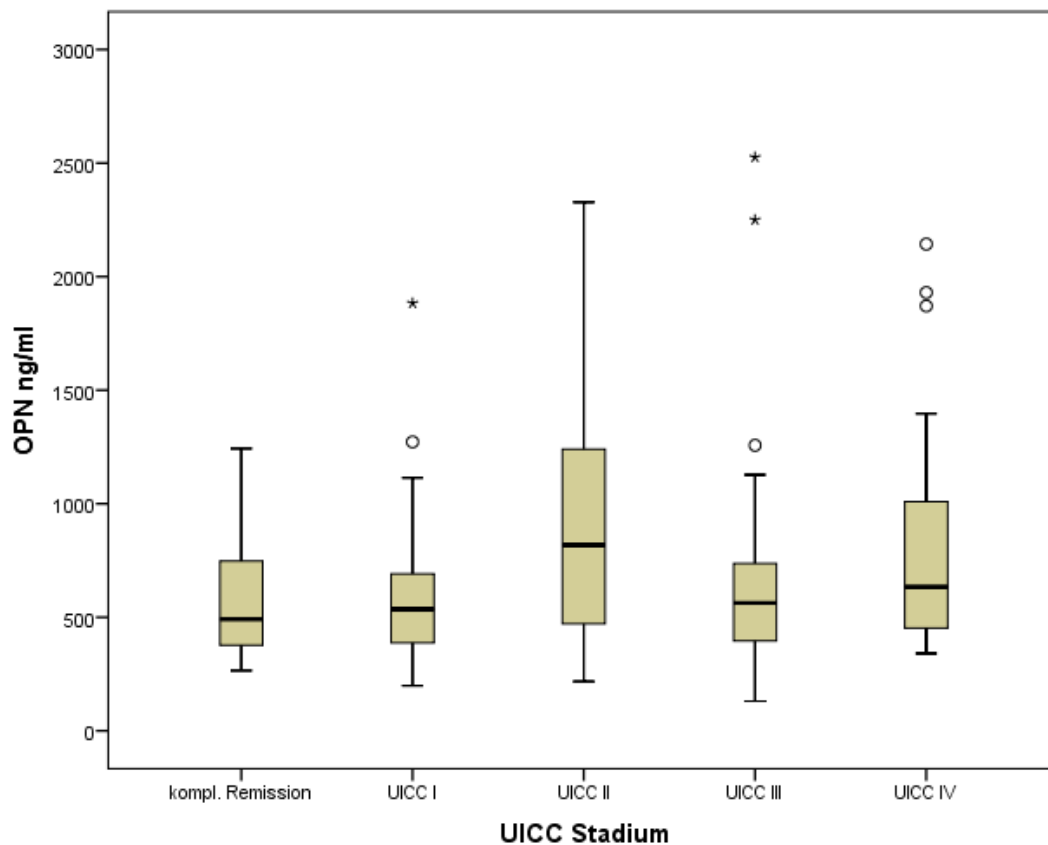


Abbildung 4: Boxplot OPN und UICC Stadien postoperativ

n(Remission)=14, n(UICC I)=45, n(UICC II)=37, n(UICC III)=37, n(UICC IV)=20

Osteopontin und (primär) Tumorstadium:

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen OPN und dem (primär) Tumorstadium und führten einen ANOVA Test durch [Abbildung 5].

Es zeigte sich im Gesamtvergleich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen T0 bis T4 ($p=0,014$). Vor allem zwischen der Gruppe T2 und T4 bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0,006$), und ebenso zwischen Stadium T2 und T3 ($p=0,008$).

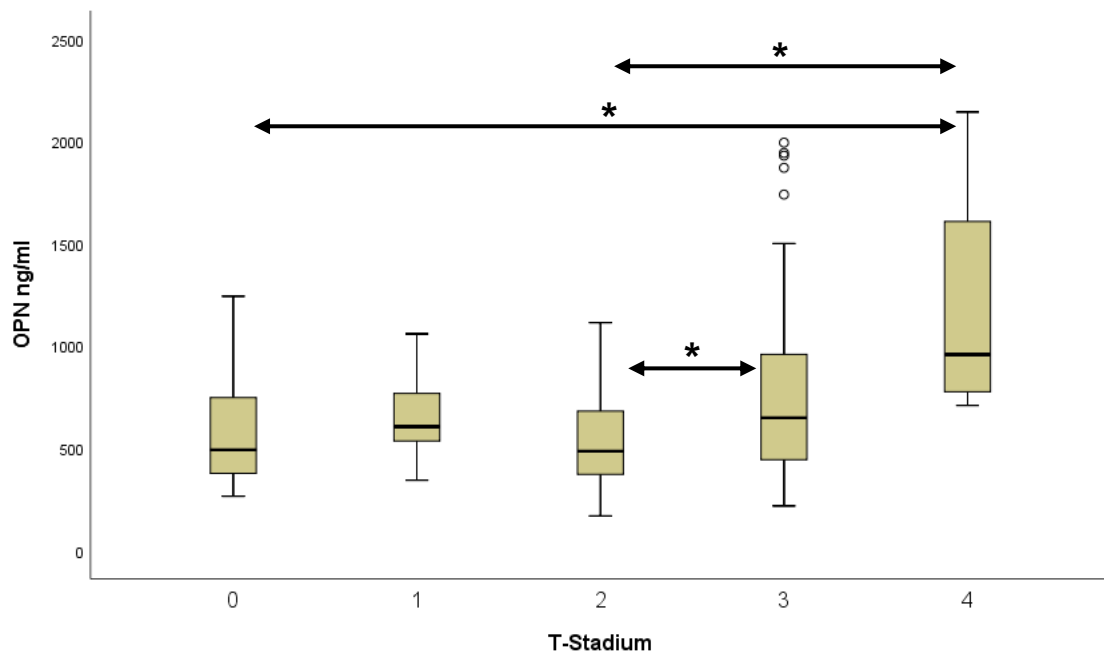


Abbildung 5: Boxplot OPN und Primärtumorstadien

$n(T0)=14$, $n(T1)=12$, $n(T2)=47$, $n(T3)=75$, $n(T4)=4$

* signifikanter Unterschied

Osteopontin und Lymphknotenstatus

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Osteopontin und Lymphknotenstatus [Abbildung 6]: Es zeigten sich bei höheren N-Stadien keine signifikant höheren Werte:

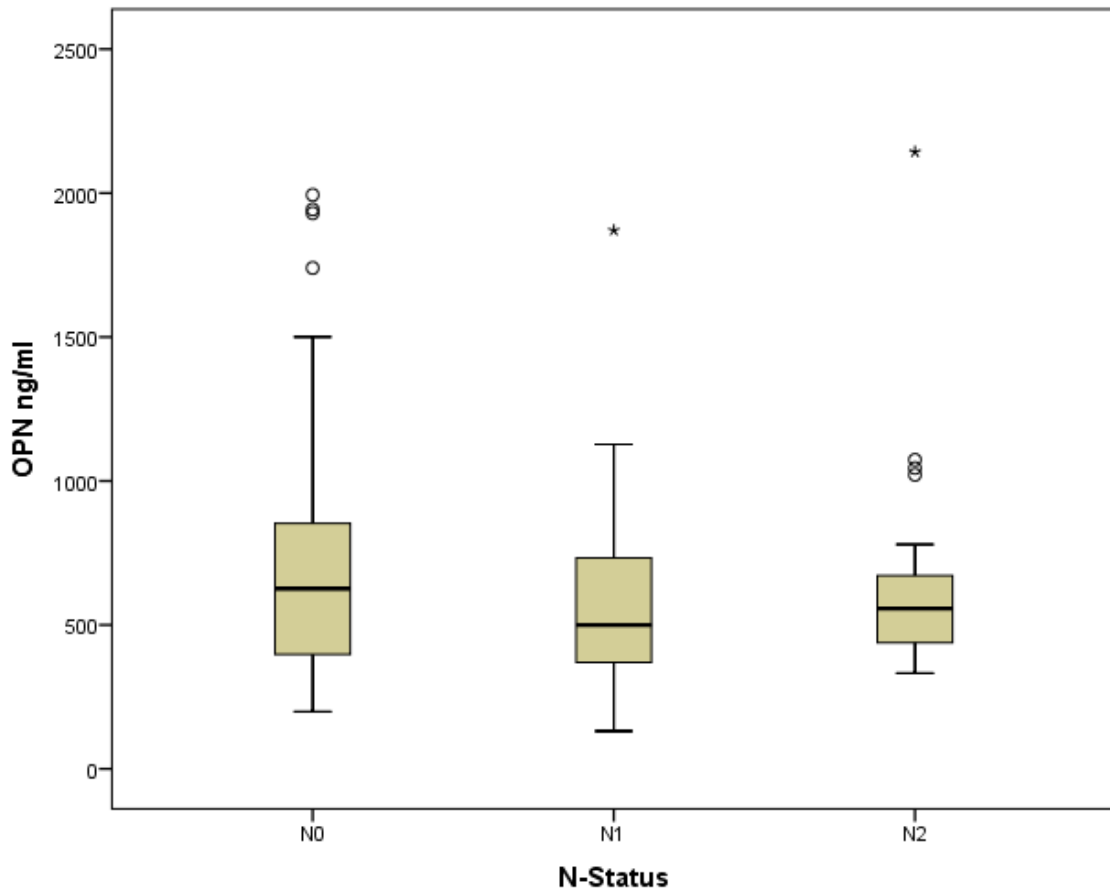


Abbildung 6: Boxplot OPN und Lymphknotenstatus

n(N0)= 98, n(N1)=32, n(N2)=21

Osteopontin und Metastasierung

Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist Osteopontin bei der Tumorausbreitung und Zellmigration ein wichtiger Faktor. Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen Osteopontin und Metastasierung [Abbildung 7]: Es zeigten sich bei einer Metastasierung jedoch keine signifikant höheren Werte: Der OPN Mittelwert ohne Metastasierung betrug 646 ng/ml, der Serumwert mit Metastasierung betrug 812 ng/ml.

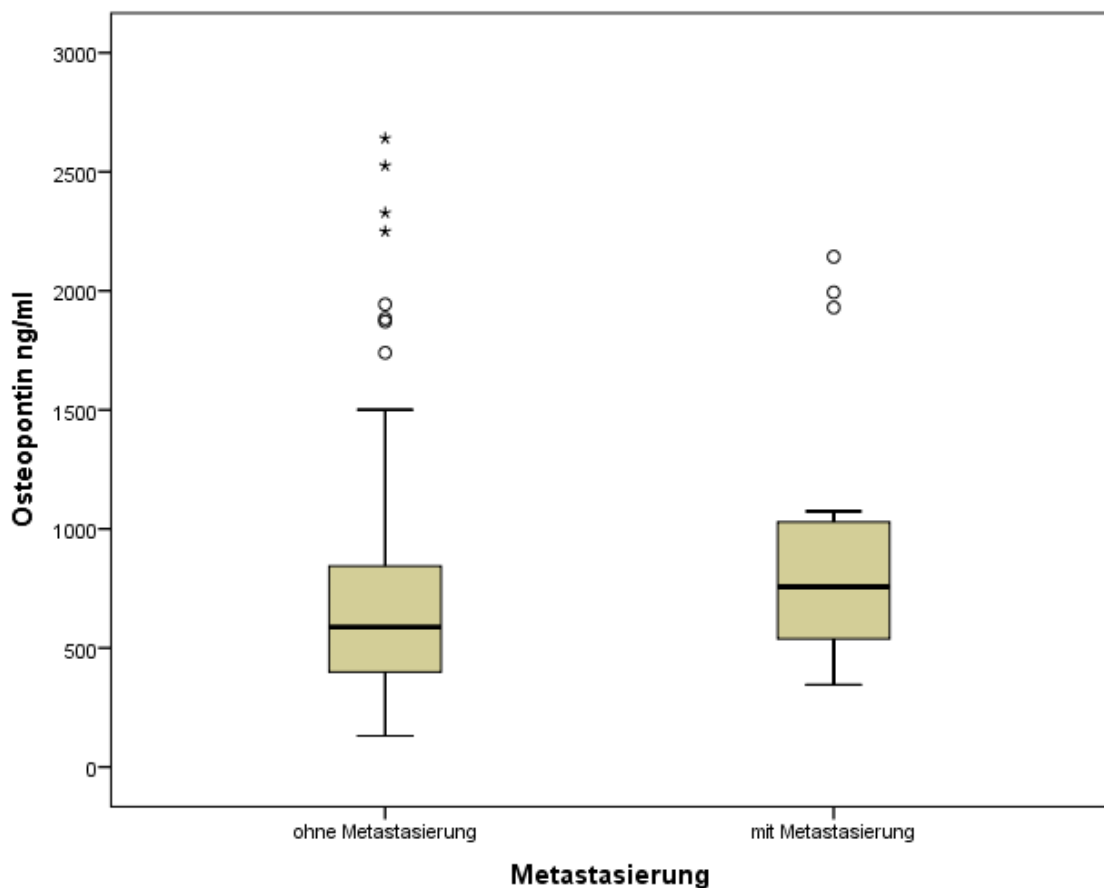


Abbildung 7: Boxplot OPN und Metastasierung

n(M0)=126, n(M1)=22

Osteopontin und Therapieansprechen

Wir untersuchten [Abbildung 8] ob sich nach neoadjuvanter Therapie der OPN Serumspiegel hinsichtlich des klinischen Therapieansprechens unterscheidet. Hier zeigte sich, dass Patienten mit einem Ansprechen niedrigere OPN-Werte hatten als Patienten ohne Ansprechen, jedoch nicht signifikant (OPN: 643,9 ng/ml vs. 814,3 ng/ml; $p=0,078$).

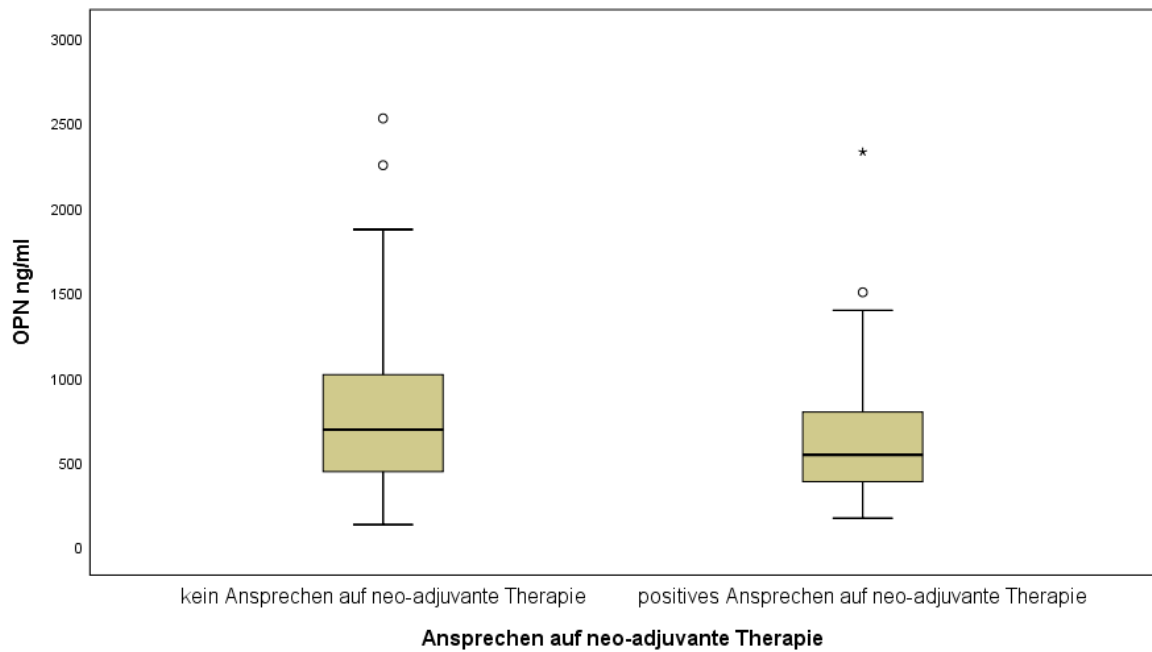


Abbildung 8: Boxplot OPN und Tumoransprechen auf neo-adjuvante Therapie

Bei 61 Patienten lagen uns Daten für das Therapieansprechen (Regressionsgrade nach Dworak) vor [Abbildung 9]. Wir bildeten zunächst Gruppen mit schlechtem Ansprechen (Dworak Regressionsgrad 0 und 1, n=11), mittlerem Ansprechen (Dworak Regressionsgrad 2 und 3, n=40) und mit totaler Regression (Gruppe 4, n=10). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

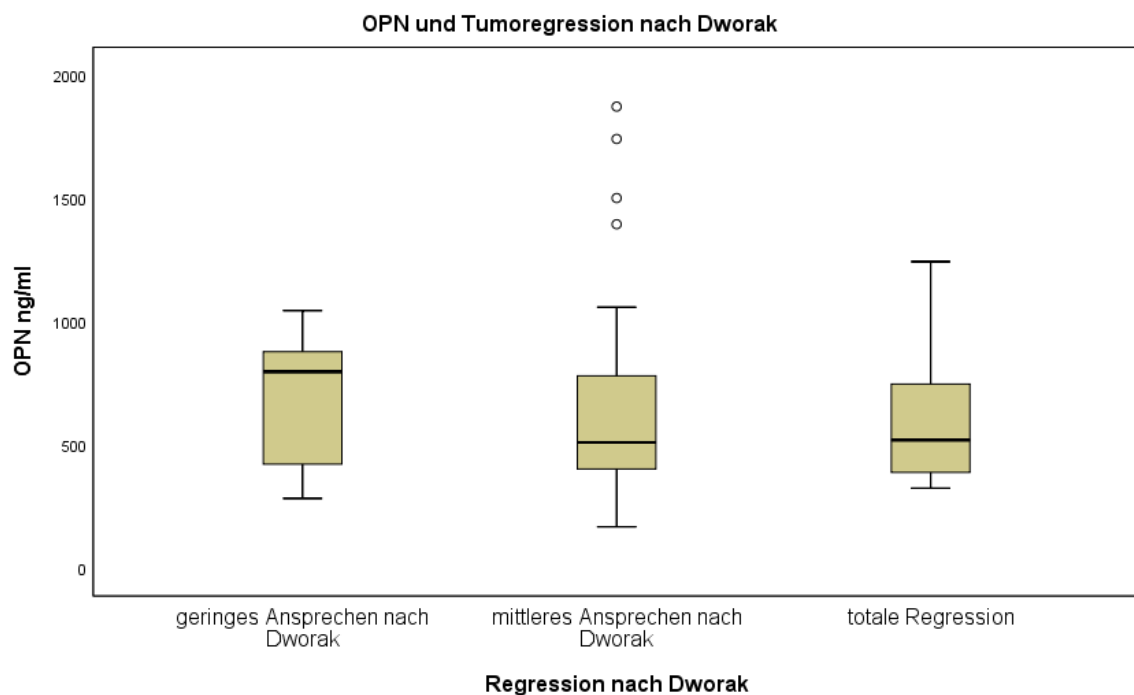


Abbildung 9: Boxplot OPN und Tumoregression nach Dworak

6.2) CD44

6.2.1) CD44 Konzentrationen

CD44 Standard

Die Gruppeneinteilung ist identisch mit der Einteilung der Osteopontin Werte: Probe bei Primär-OP, Probe bei Metastasen OP, sonstige Werte.

Hier [Abbildung 10] ergaben sich jedoch kaum Unterschiede zwischen den CD44 Standard Werten: Die erste Gruppe („Primär OP“) hatte einen Mittelwert von 328 ng/ml bei einer Standardabweichung von 124 ng/ml.

Die zweite Gruppe unterschied sich davon nur gering mit einem Mittelwert von 376 ng/ml bei einer Standardabweichung von 168 ng/ml.

Daher konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CD44 Werten der ersten beiden Gruppen gezeigt werden ($p=0,189$).

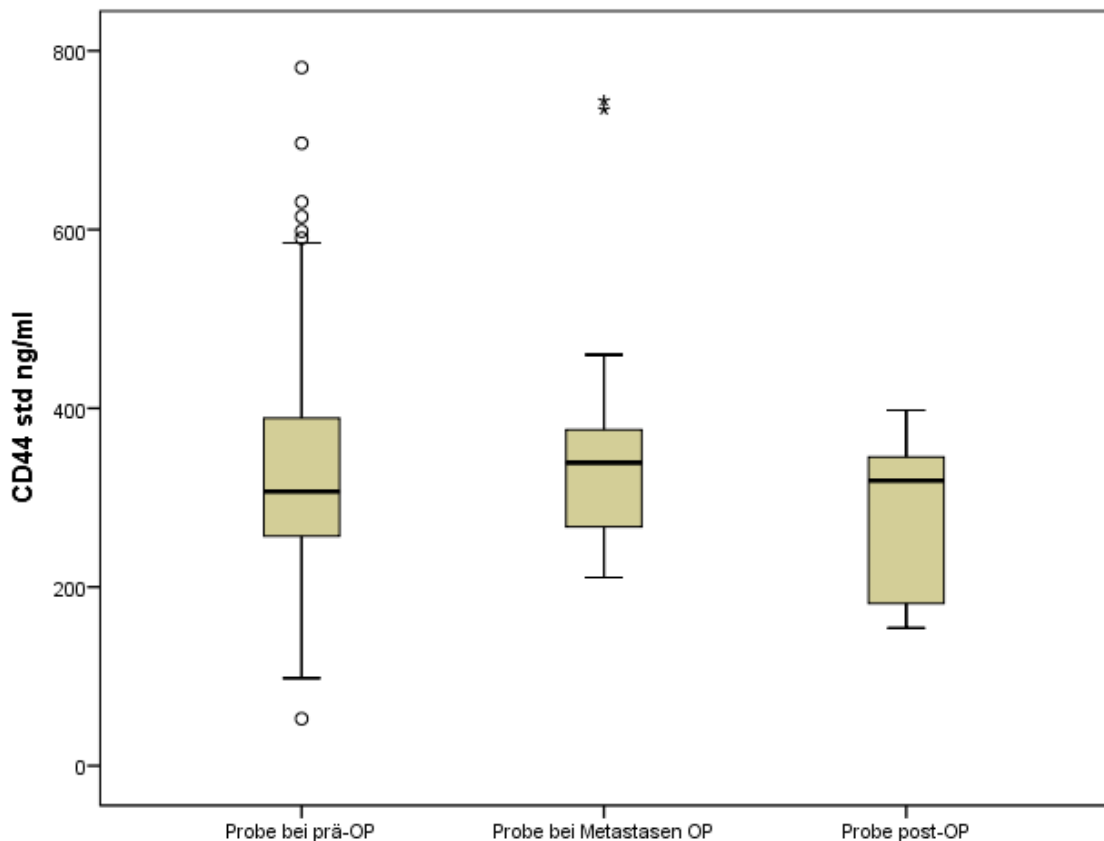


Abbildung 10: Boxplot CD44 std Konzentration nach Gruppen

CD44 Variante6

Auch hier [Abbildung 11] ergeben sich kaum Unterschiede zwischen den CD44 v6 Gruppen: Die erste Gruppe („Primär OP“) hatte einen Mittelwert von 77 ng/ml bei einer Standardabweichung von 30 ng/ml.

Die zweite Gruppe unterschied sich nur gering mit einem Mittelwert von 79ng/ml bei einer Standardabweichung von 26 ng/ml.

Daher konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CD44 Werten der ersten beiden Gruppen gezeigt werden ($p=0,189$).

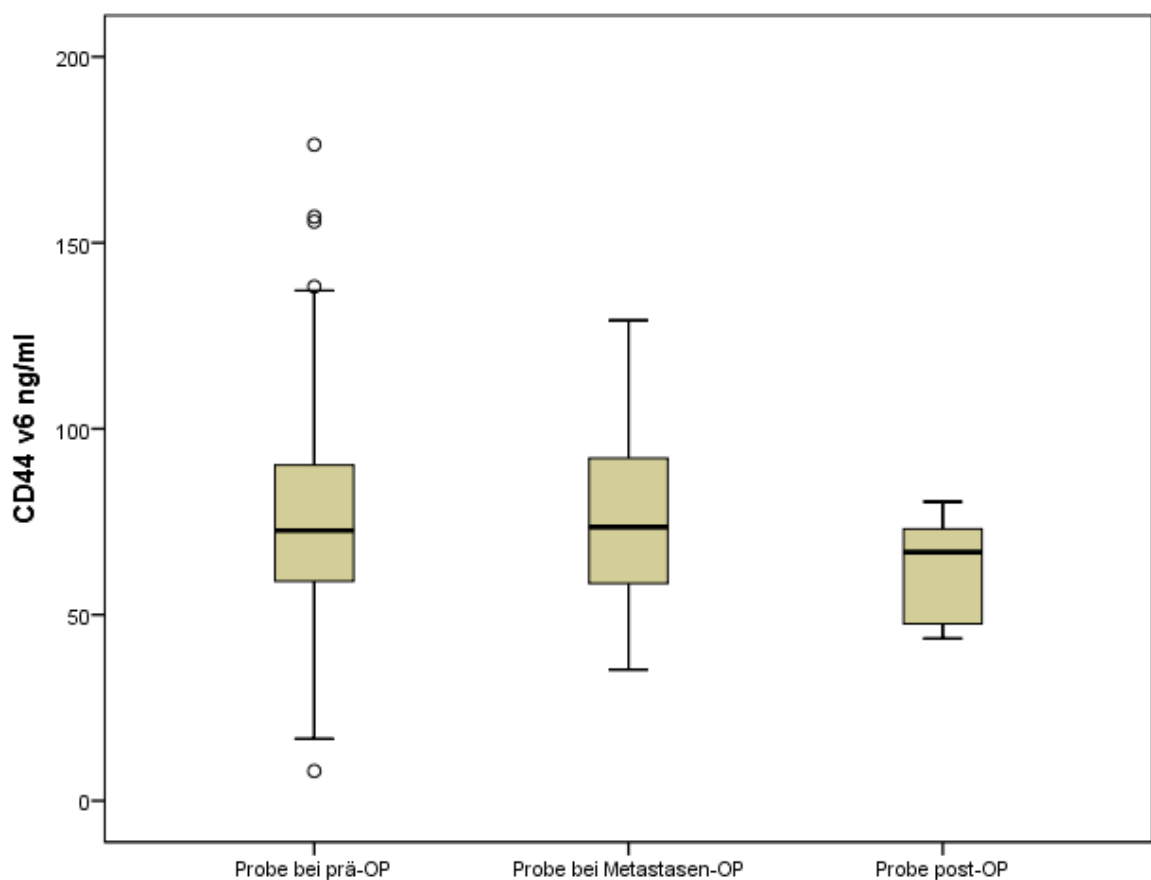


Abbildung 11: Boxplot CD44 v6 Konzentrationen nach Gruppen

6.2.2) CD44 und UICC Stadien

CD44 std und UICC Stadien

Um zu klären, inwieweit CD44 Serumkonzentrationen mit UICC Stadien und damit mit der Ausprägung der malignen Erkrankung zusammenhängen, errechneten wir folgenden Boxplot [Abbildung 12]. Die Median-Werte waren auch in unterschiedlichen UICC Stadien sehr ähnlich.

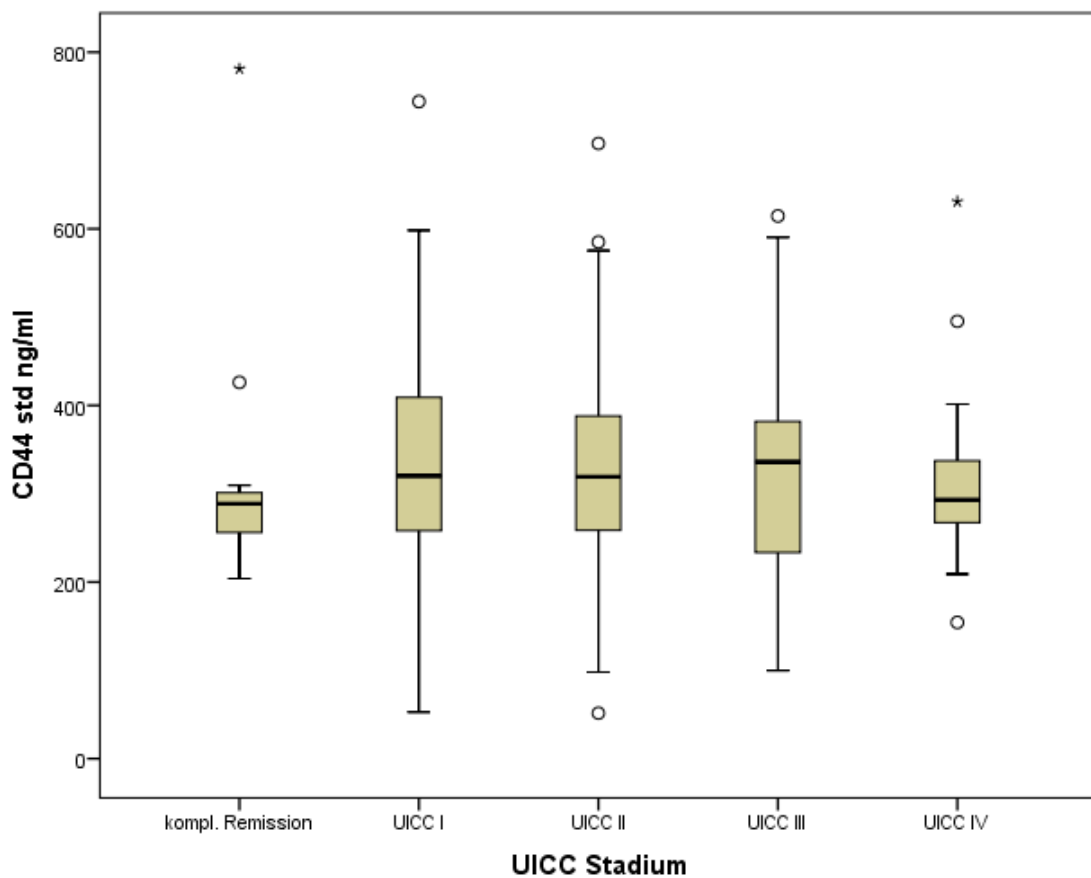


Abbildung 12: Boxplot CD44 std und UICC Stadien

n(Remission)=14, n(UICC I)=45, n(UICC II)=37, n(UICC III)=37, n(UICC IV)=20

CD44 v6 und UICC

Wie auch bei der CD44 Standard Variante zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen UICC Stadien [Abbildung 13].

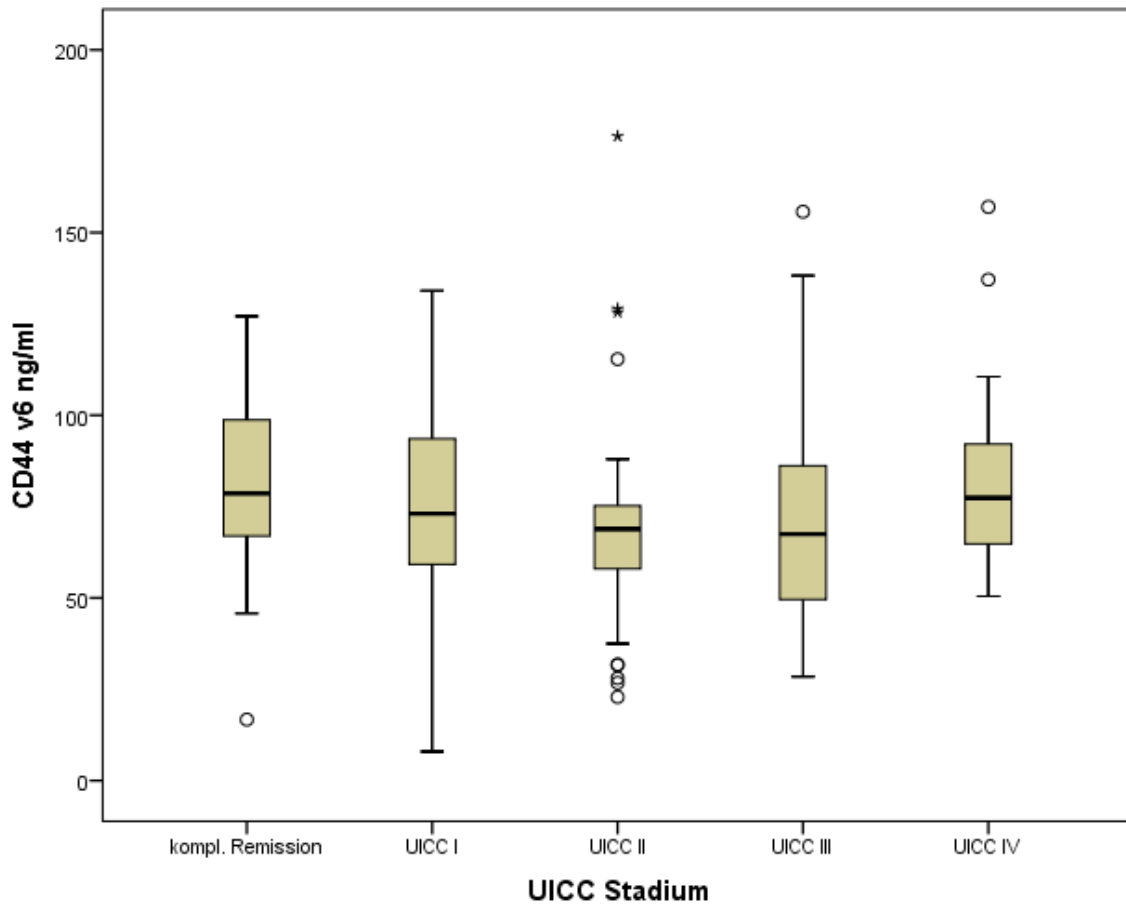


Abbildung 13: Boxplot CD44 v6 und UICC Stadien

n(Remission)=14, n(UICC I)=45, n(UICC II)=37, n(UICC III)=37, n(UICC IV)=20

6.2.3) CD44 und einzelne TNM Stadien

CD44 std und (primär) Tumorstadium:

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 v6 und (primär) Tumorstadium [Abbildung 14]. Es zeigten sich jedoch bei höheren T-Stadien keine signifikanten Unterschiede:

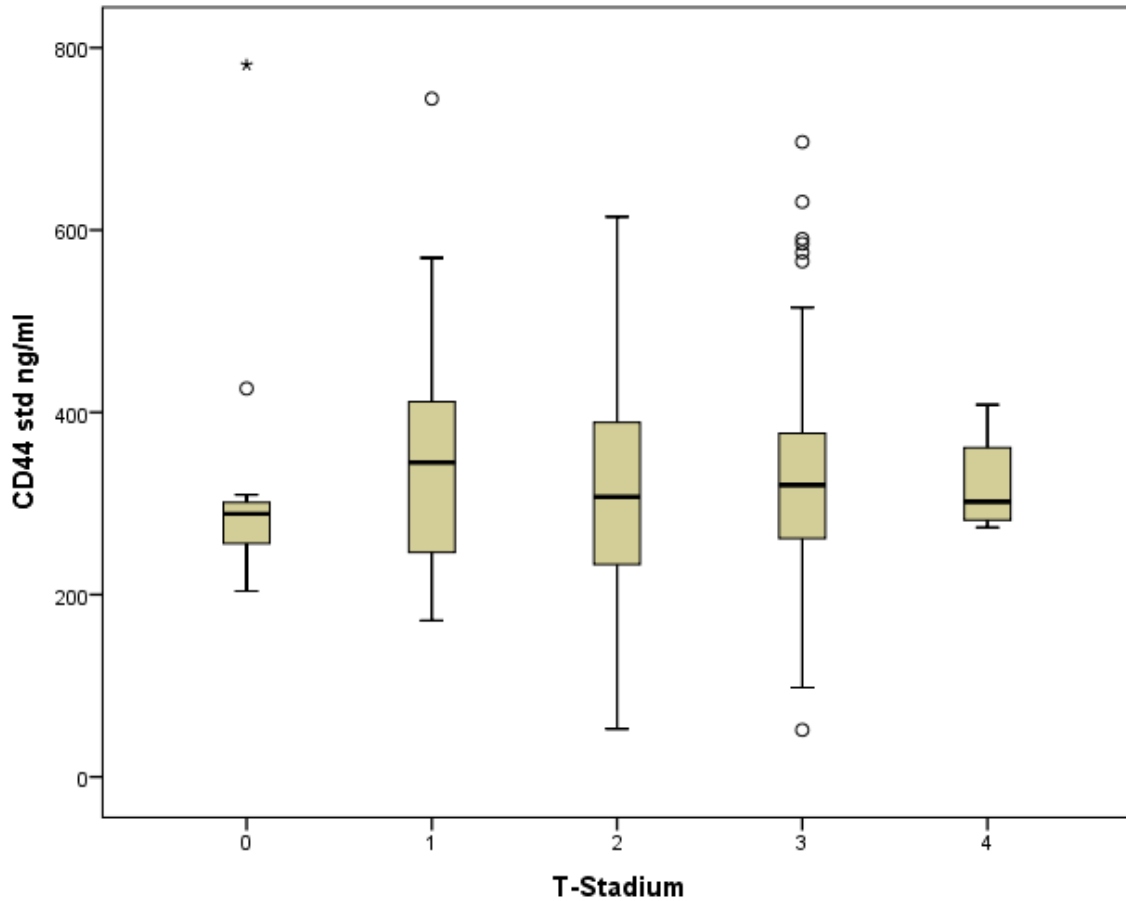


Abbildung 14: Boxplot CD44 std und T-Stadium

n(T0)= 14, n(T1)=12, n(T2)=47, n(T3)=75, n(T4)=4

CD44 v6 und (primär) Tumorstadium:

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 v6 und (primär) Tumorstadium [Abbildung 15]. Es zeigten sich jedoch bei höheren pT-Stadien keine höheren Werte, die Unterschiede sind nicht signifikant:

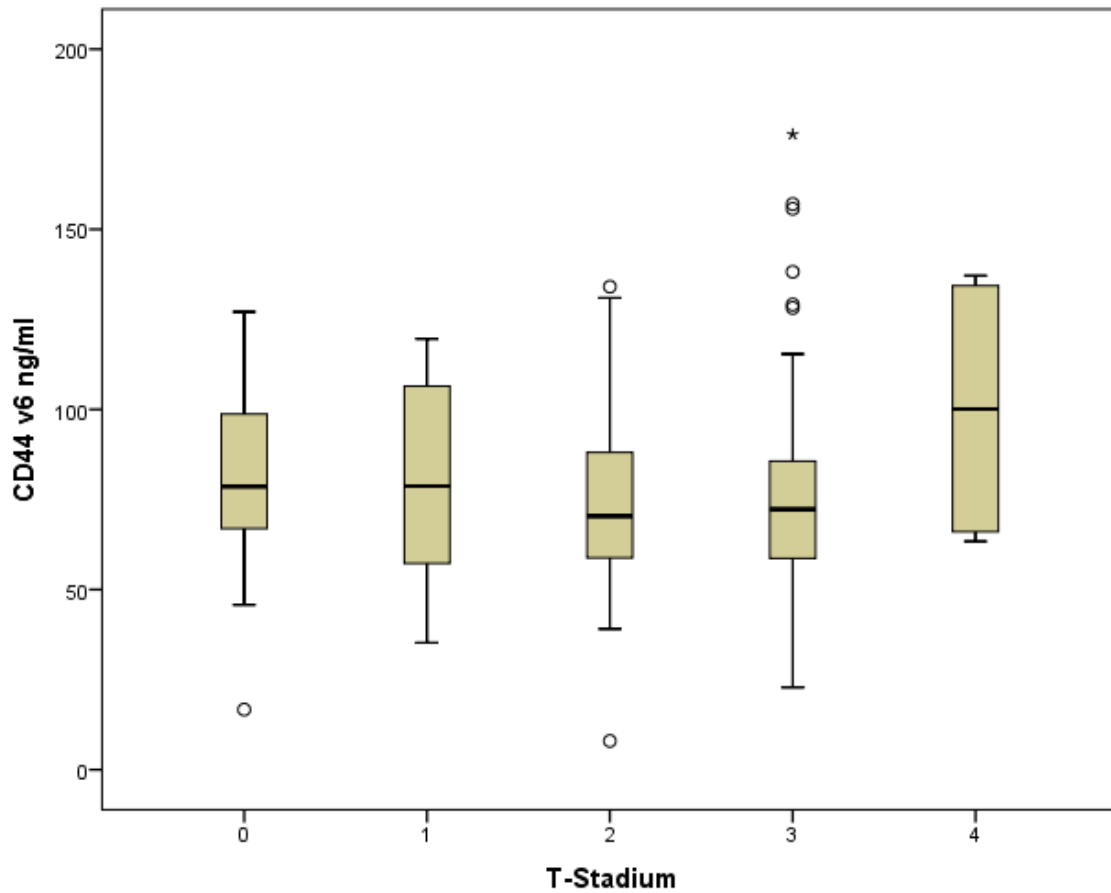


Abbildung 15: Boxplot CD44 v6 und T-Stadium

n(T0)= 14, n(T1)=12, n(T2)=47, n(T3)=75, n(T4)=4

CD44 std und Lymphknotenstatus

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 std und Lymphknotenstatus [Abbildung 16]. Es zeigten sich jedoch bei höheren N-
Stadien keine höheren Werte, die Unterschiede waren nicht signifikant:

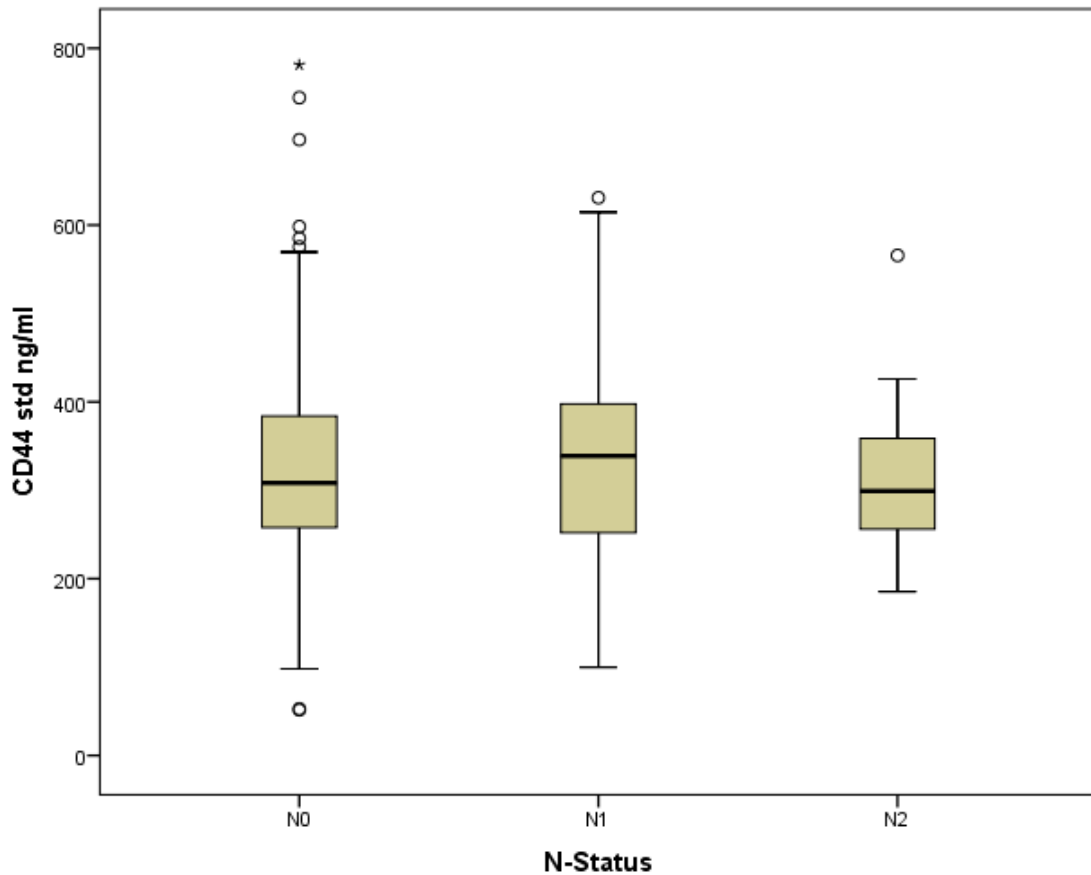


Abbildung 16: Boxplot CD44 std und Lymphknotenstatus

n(N0)= 98, n(N1)=32, n(N2)=21

CD44 v6 und Lymphknotenstatus

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 v6 und Lymphknotenstatus. Im Boxplot [Abbildung 17] zeigten sich leicht erhöhte Werte beim höheren N-Stadium N2:

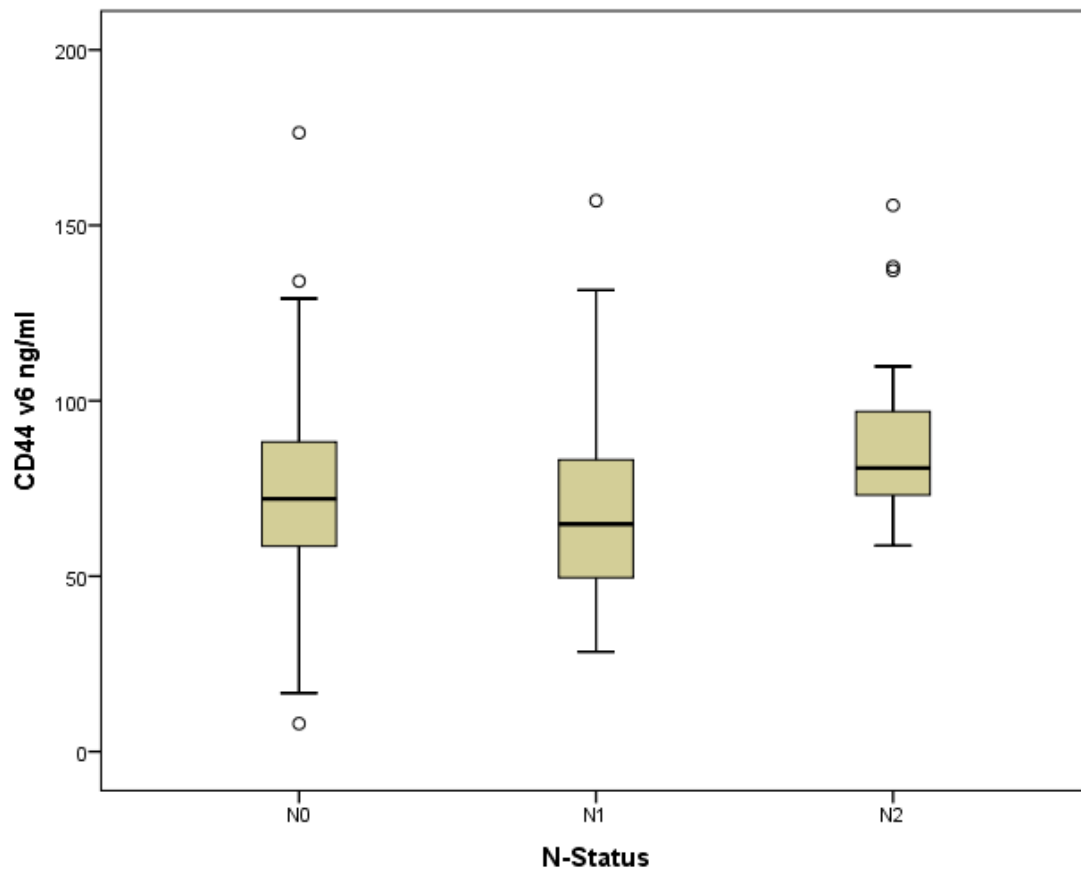


Abbildung 17: Boxplot CD44 v6 und Lymphknotenstatus

$n(N0) = 98$, $n(N1) = 32$, $n(N2) = 21$

CD44 std und Fernmetastasierung

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 std und Fernmetastasierung. Im Boxplot [Abbildung 18] zeigten sich jedoch beim höheren M-Stadium (M1) kaum höheren Werte:

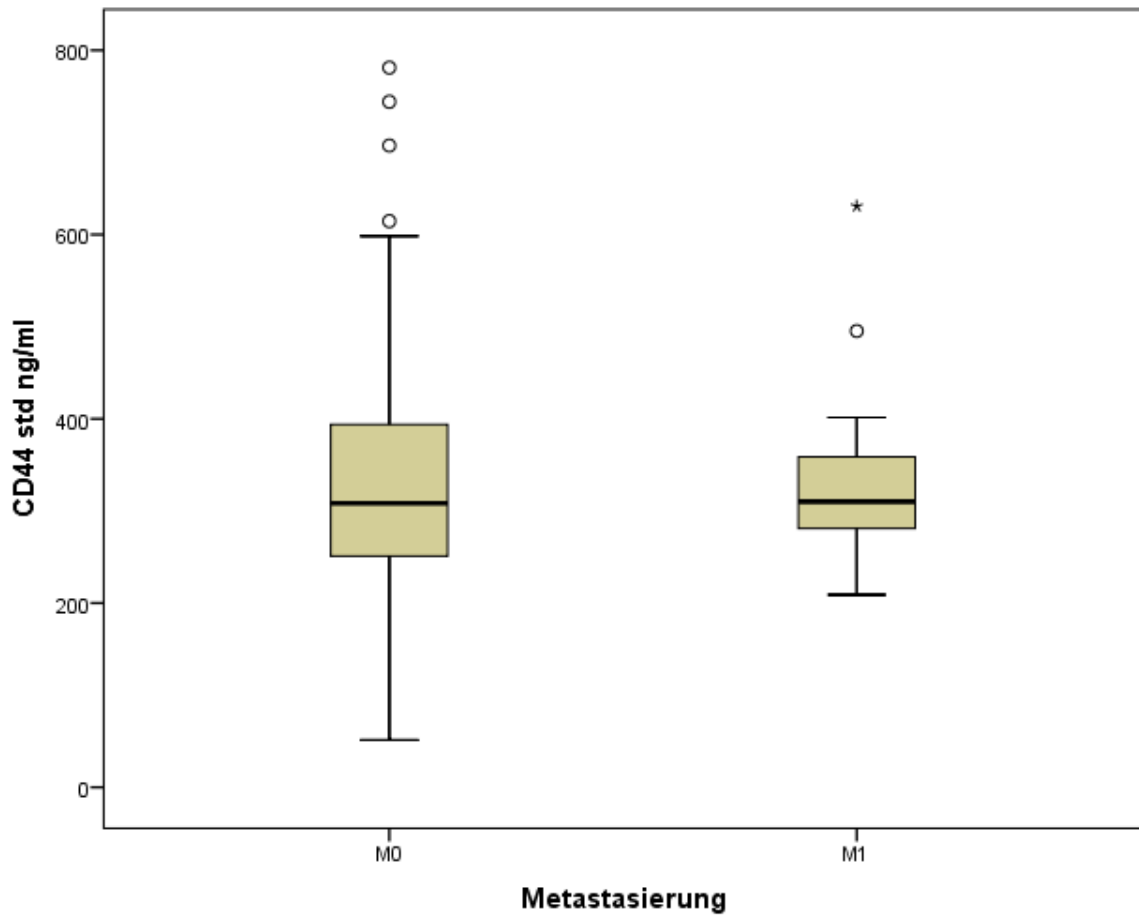


Abbildung 18: Boxplot CD44 std und pM

n(M0)=126, n(M1)=22

CD44 v6 und Fernmetastasierung

Außerdem untersuchten wir den Zusammenhang zwischen CD44 v6 und Fernmetastasierung. Im Boxplot [Abbildung 19] zeigten sich jedoch beim höheren M-Stadium (M1) kaum höheren Werte:

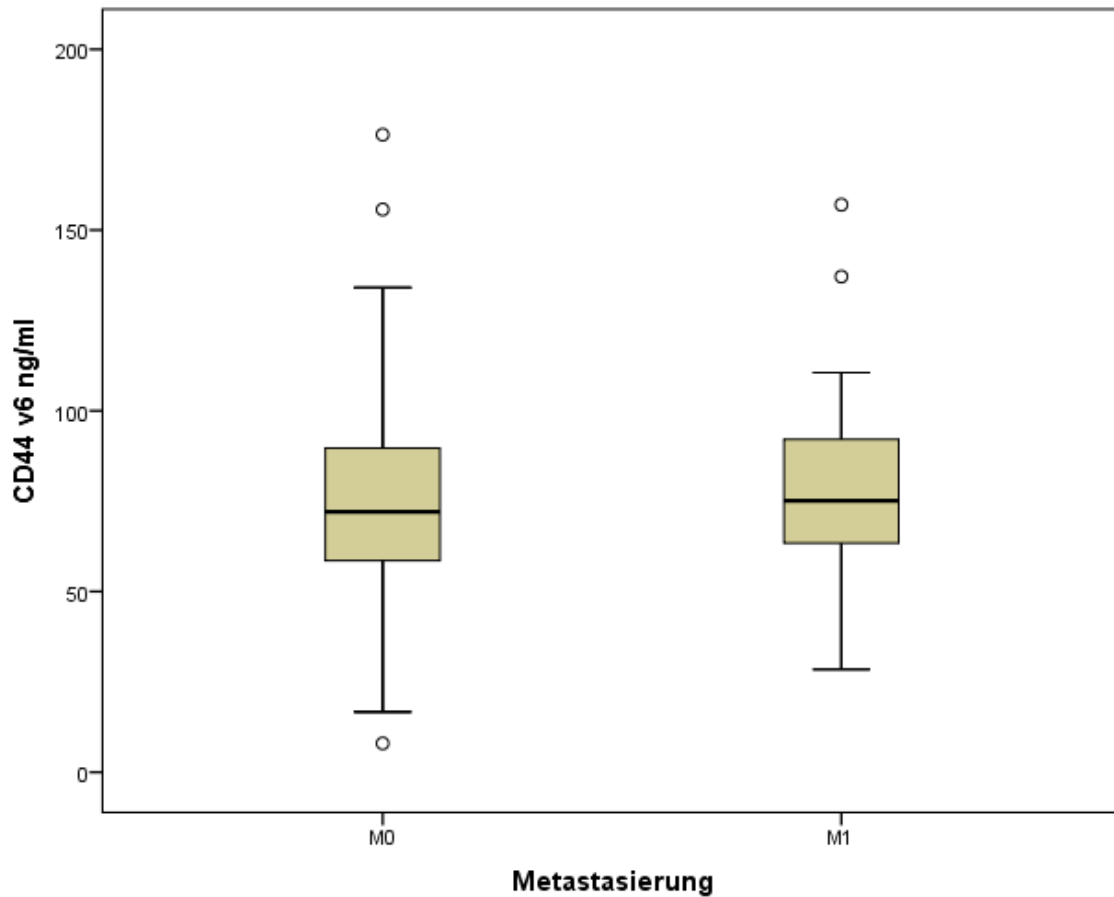


Abbildung 19: Boxplot CD44 v6 und Fernmetastasierung

n(M0)=126, n(M1)=22

CD44 std und Tumorregression nach Dworak

Wir untersuchten auch, ob sich nach der neoadjuvanten Therapie und damit verbundenen Tumorregression auch der CD44 std Serumspiegel verändert [Abbildung 20]. Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Regressionsstadien feststellen.

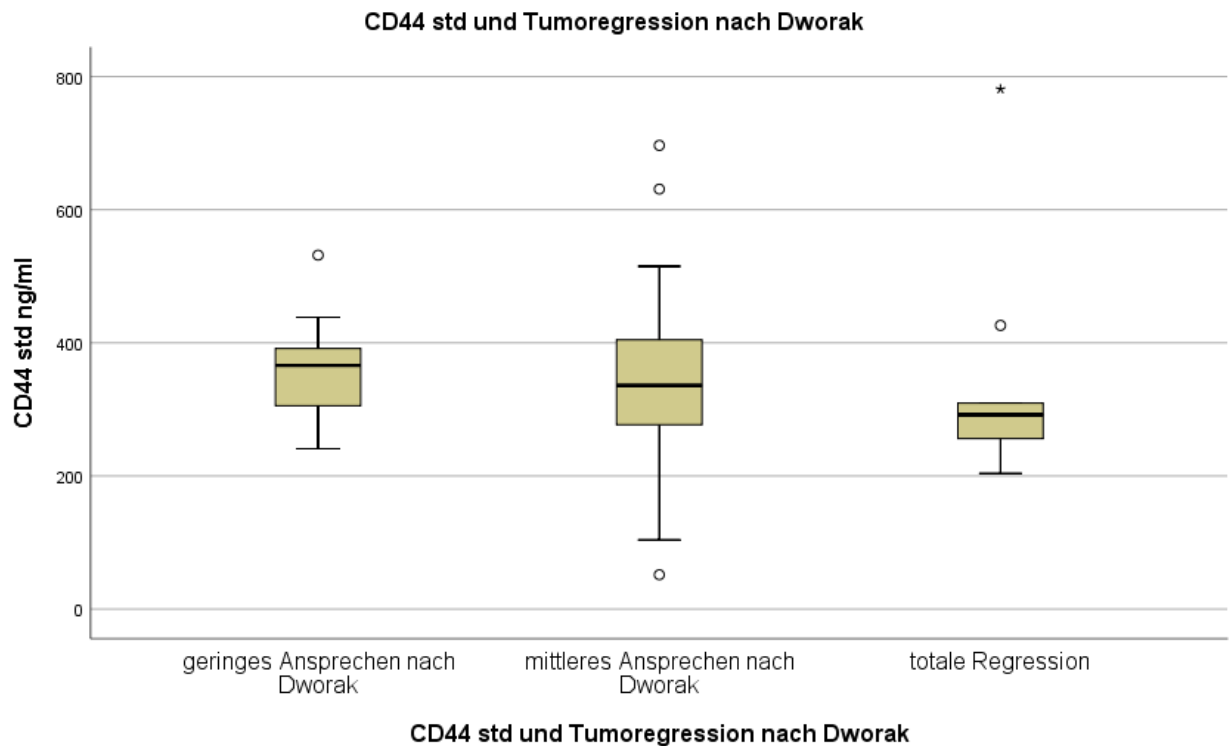


Abbildung 20: Boxplot CD44 std und Tumorregression

Keine Regression: $n=2$, Kaum Regression: $n=10$, Geringe Regression: $n=28$, Gute Regression: $n=14$, totale Regression: $n=10$

CD44 v6 und Tumorregression nach Dworak

Wir untersuchten auch [Abbildung 21], ob sich nach der neoadjuvanten Therapie und damit verbundenen Tumorregression auch der CD44 v6 Serumspiegel verändert. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Regressionsstadien feststellen.

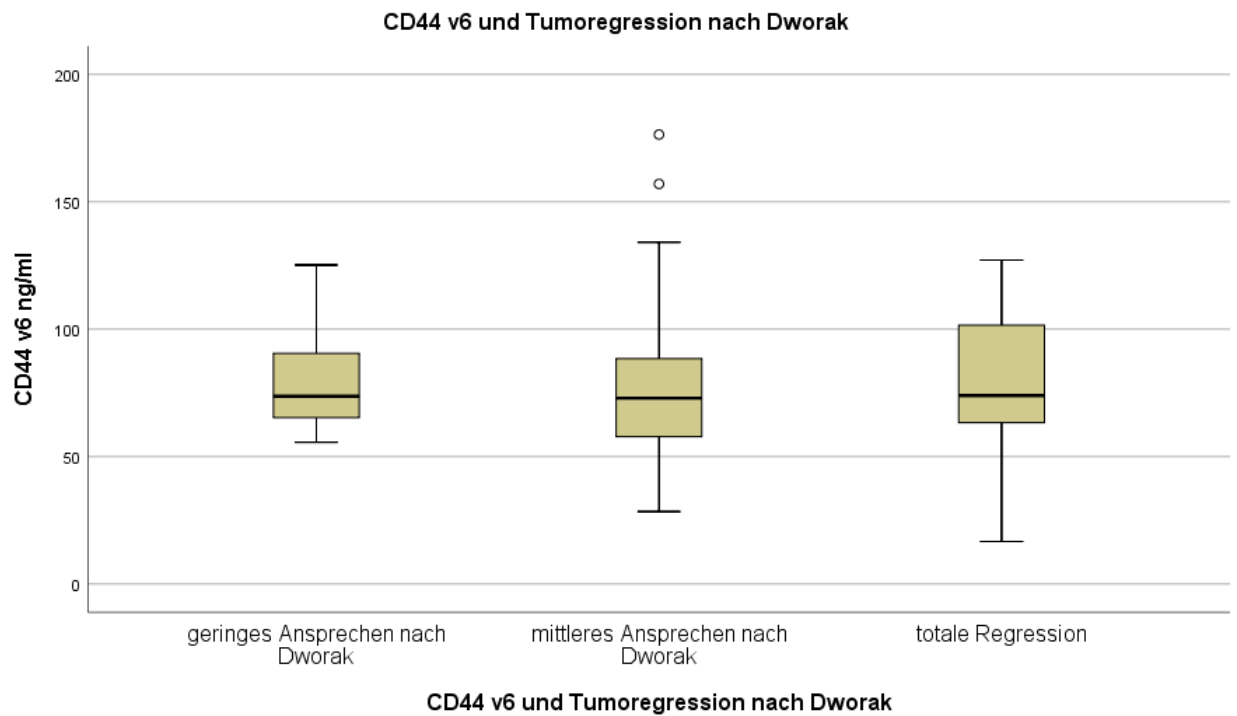


Abbildung 21: Boxplot CD44 v6 und Tumorregression nach Dworak

Keine Regression: n=2, Kaum Regression: n=10, Geringe Regression: n=28, Gute Regression: n=14, Komplette Regression: n=10

6.3) Korrelationen von OPN und CD44

CD44 std und OPN

Die Konzentration von CD44 std und die Konzentration von Osteopontin korrelierte schwach mit $R=0,24$, aber signifikant mit $p=0,01$ [Abbildung 22].

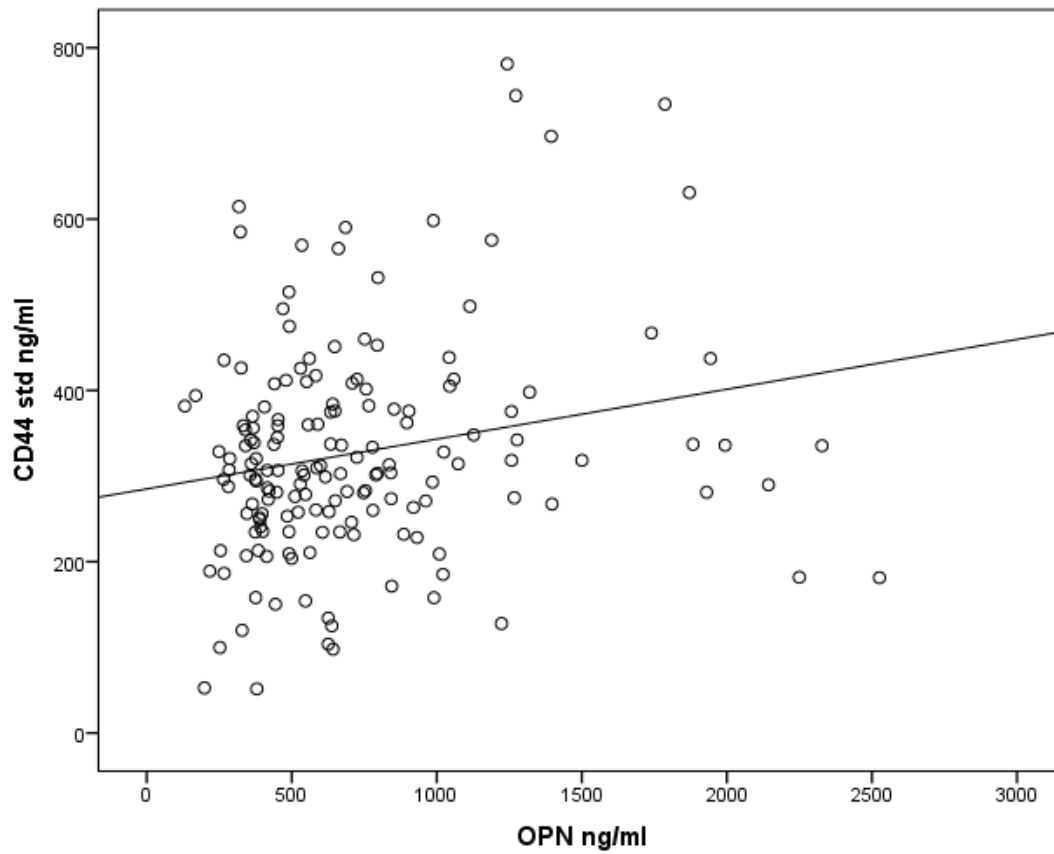


Abbildung 22: CD44 std und OPN Korrelation

CD44v6 und OPN

Die Konzentration von CD44v6 und die Konzentration von Osteopontin korrelierte ($R=0,002$) nicht signifikant [Abbildung 23].

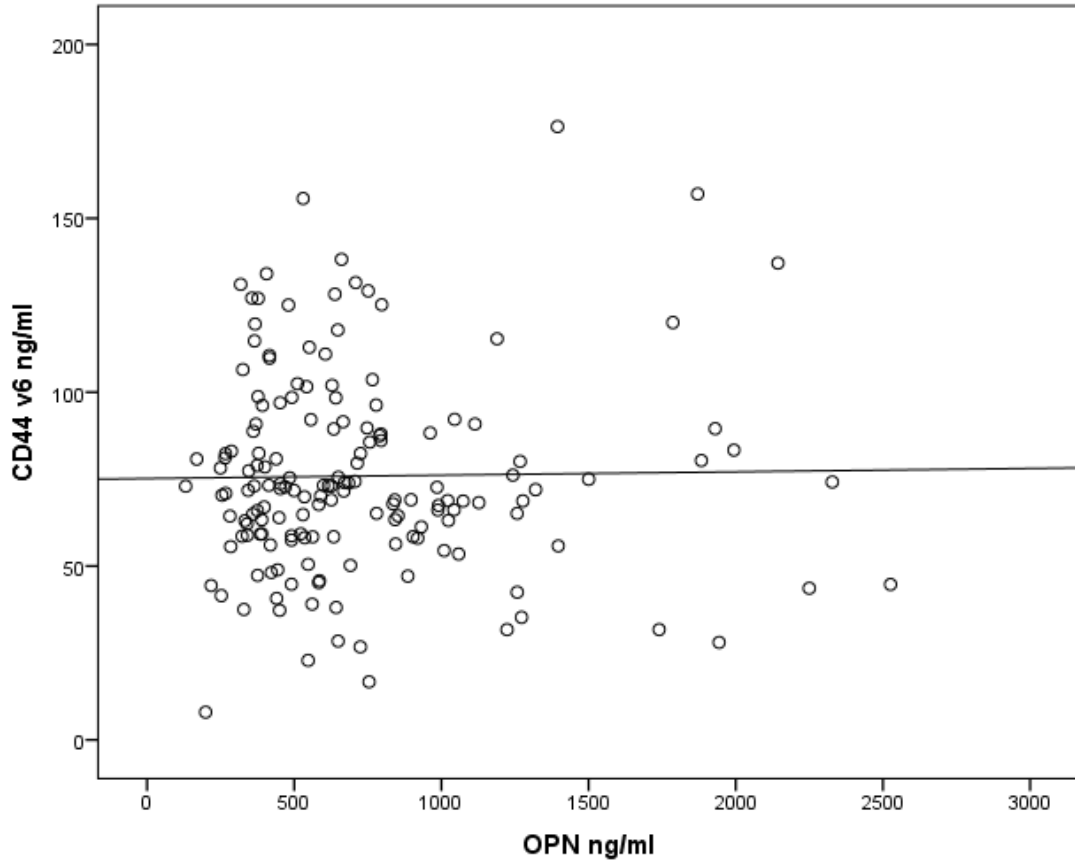


Abbildung 23: CD44v6 und OPN Korrelation

CD44std vs. CD44v6

CD44std und die Isovariante6 korrelierten wie zu erwarten direkt positiv miteinander. Diese Korrelation ($R=0,46$) war mit $p=0,01$ signifikant. Dies veranschaulicht folgendes Schaubild [Abbildung 24]:

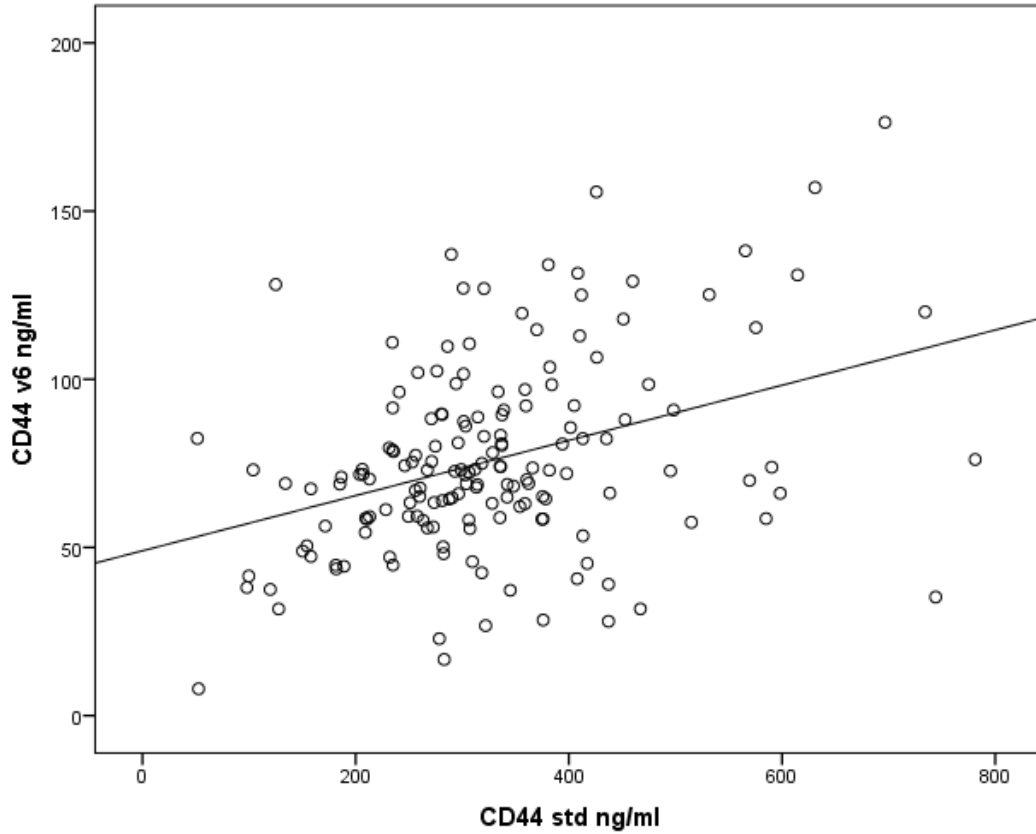


Abbildung 24: CD44 std und v6 Korrelation

6.4) Gesamtüberleben

Das Gesamtkollektiv betrachtet, sind von insgesamt n=164 Patienten 56 verstorben. Nach der Erstdiagnose war die Überlebenszeit im Mittel 92 Monate. Der mediane Wert betrug 117 Monate. Die folgende Grafik [Abbildung 25] soll dies verdeutlichen:

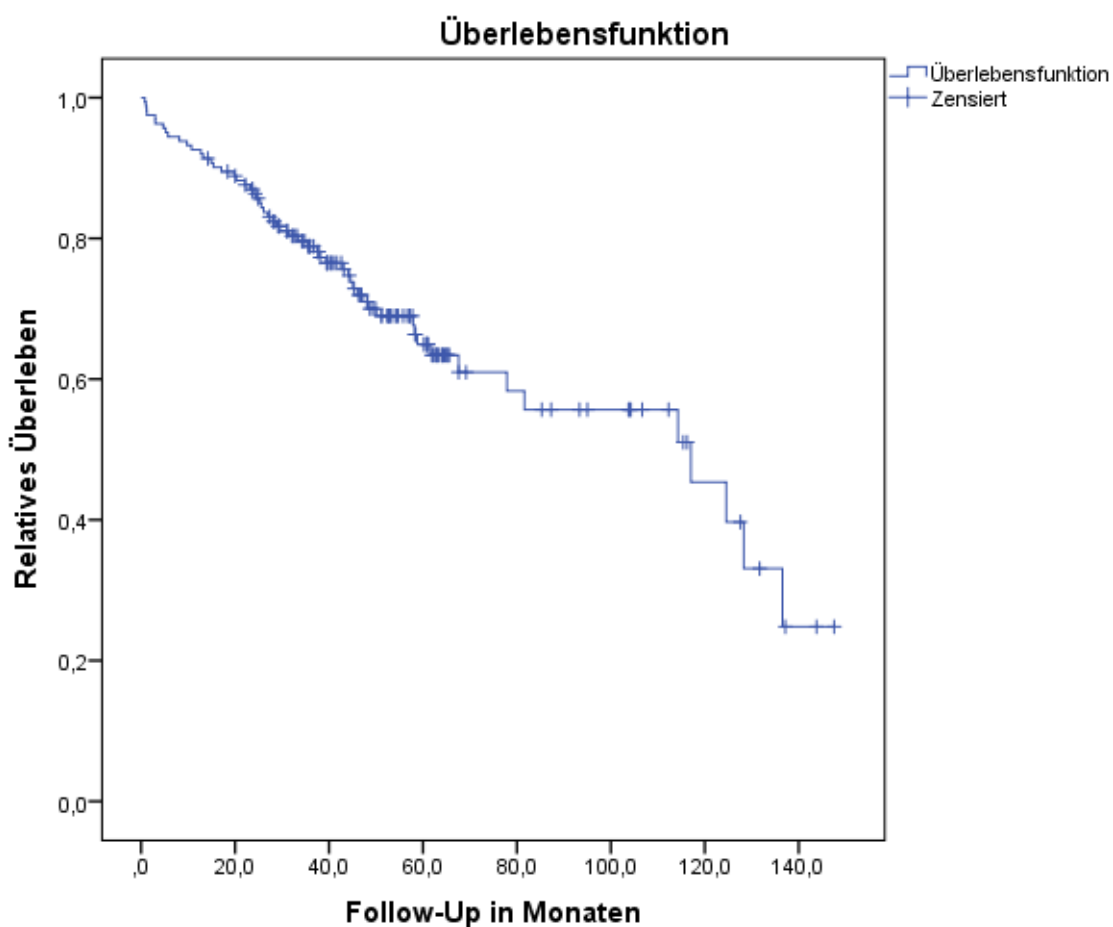


Abbildung 25: Kaplan Meier Kurve zum relativen Gesamtüberleben für alle Patienten in Monaten

Die folgende Grafik [Abbildung 26] zeigt das Gesamtüberleben nach UICC Stadien eingeteilt. Man erkennt, dass niedrige UICC Stadien hochsignifikant ($p < 0,01$) mit einer verlängerten Lebensdauer korrelierten. UICC Stadium III und insbesondere IV ging allerdings mit einer erwartungsgemäß erhöhten Mortalität einher.

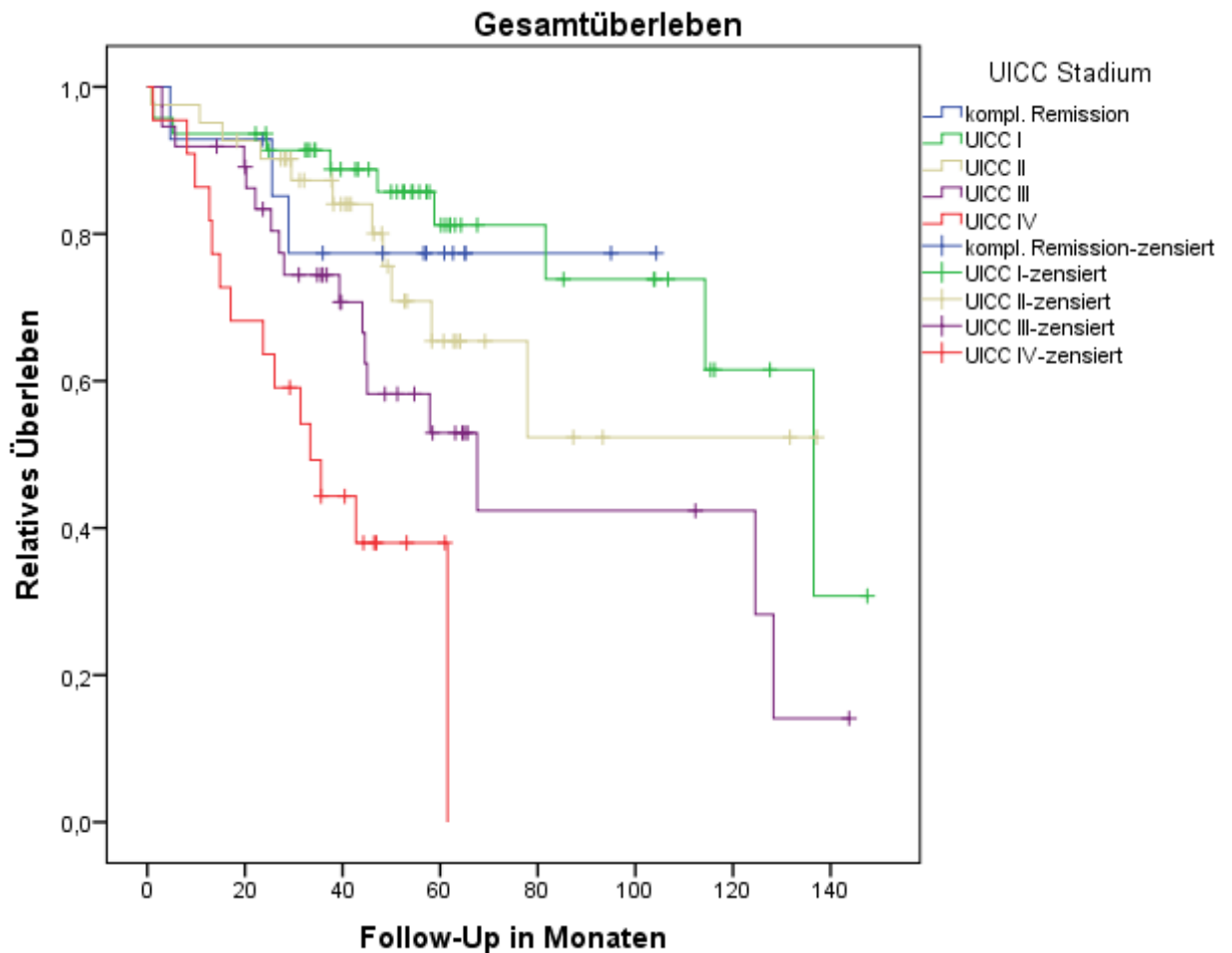


Abbildung 26: Gesamtüberleben nach UICC Stadien

Kaplan Meier Kurven zum Überleben nach postoperativen UICC Stadien I – IV, bzw. nach Erreichen einer kompletten Remission.

$p < 0,01$. $n(\text{kompl. Remission})=14$, $n(\text{UICC I})=45$, $n(\text{UICC II})=37$, $n(\text{UICC III})=37$, $n(\text{UICC IV})=20$

Überleben bei Remission

Bei Patienten, die eine komplette Remission (n = 14) hatten, konnte statistisch kein verlängertes Überleben festgestellt werden (p=0,382).

Das bedeutet, das mediane Überleben betrug 124 Monate ohne komplette Remission (n = 132). Das mediane Überleben wurde hingegen bei kompletter Remission nicht erreicht [Abbildung 27].

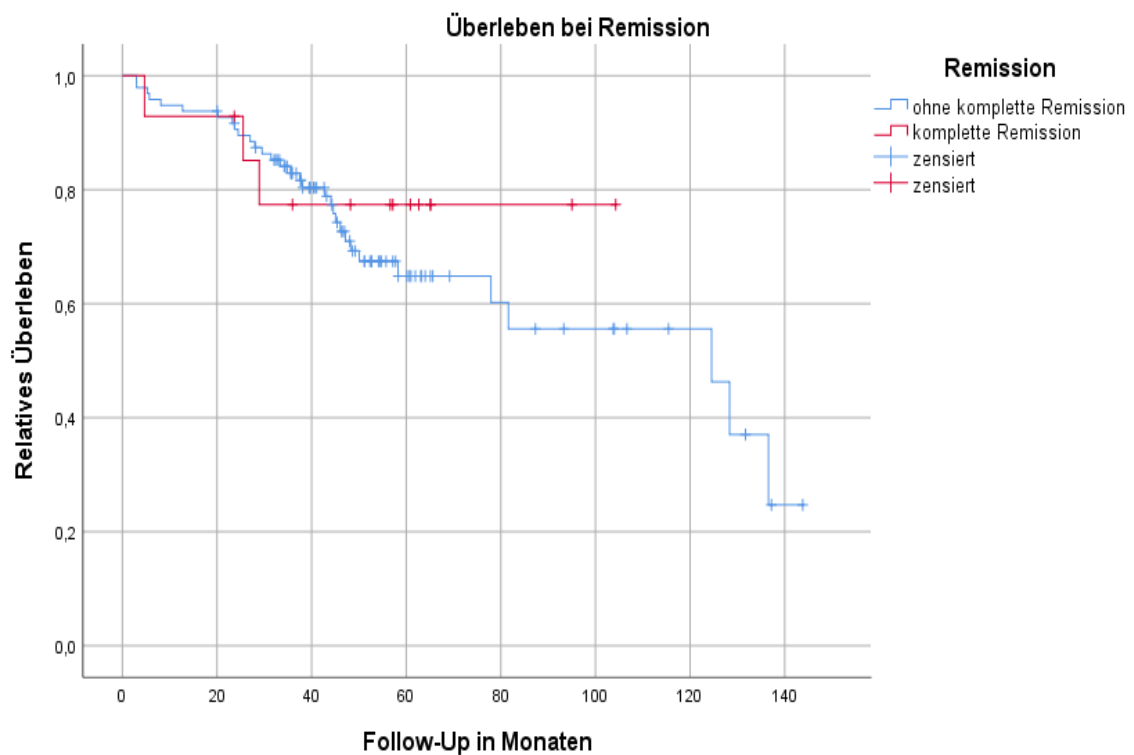


Abbildung 27: Überleben bei Remission

Krankheitsfreies Überleben bei Remission

Patienten mit einer kompletten Remission (Gruppe „1“, n = 14), hatten eine deutlich verlängerte Zeit bis zum Rezidiv [Abbildung 28]. Das Ergebnis war aber nicht signifikant verschieden ($p=0,196$).

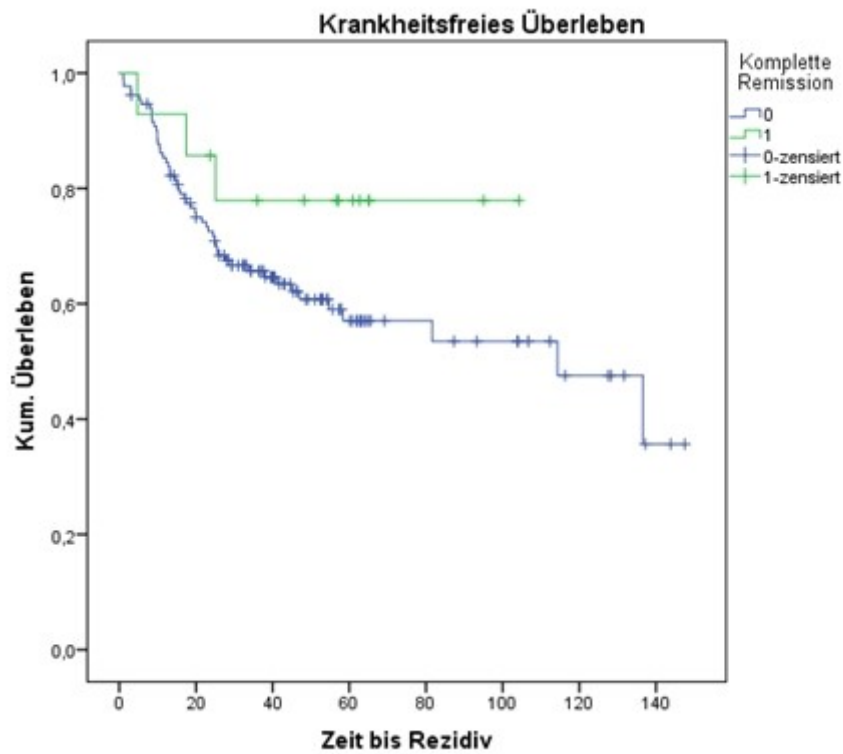


Abbildung 28: krankheitsfreies Überleben bei kompletter Remission

Überlebenszeit bei Therapieansprechen

Diejenigen Patienten, die ein Downstaging durch die neoadjuvante Therapie erfuhren (n = 66), hatten ein medianes Überleben von 136 Monaten [Abbildung 29]. Dahingegen zeigte sich ein medianes Überleben von 58 Monaten bei der Gruppe 1 (n= 44) ohne Ansprechen. Dieses Ergebnis war signifikant verschieden (p=0,002).

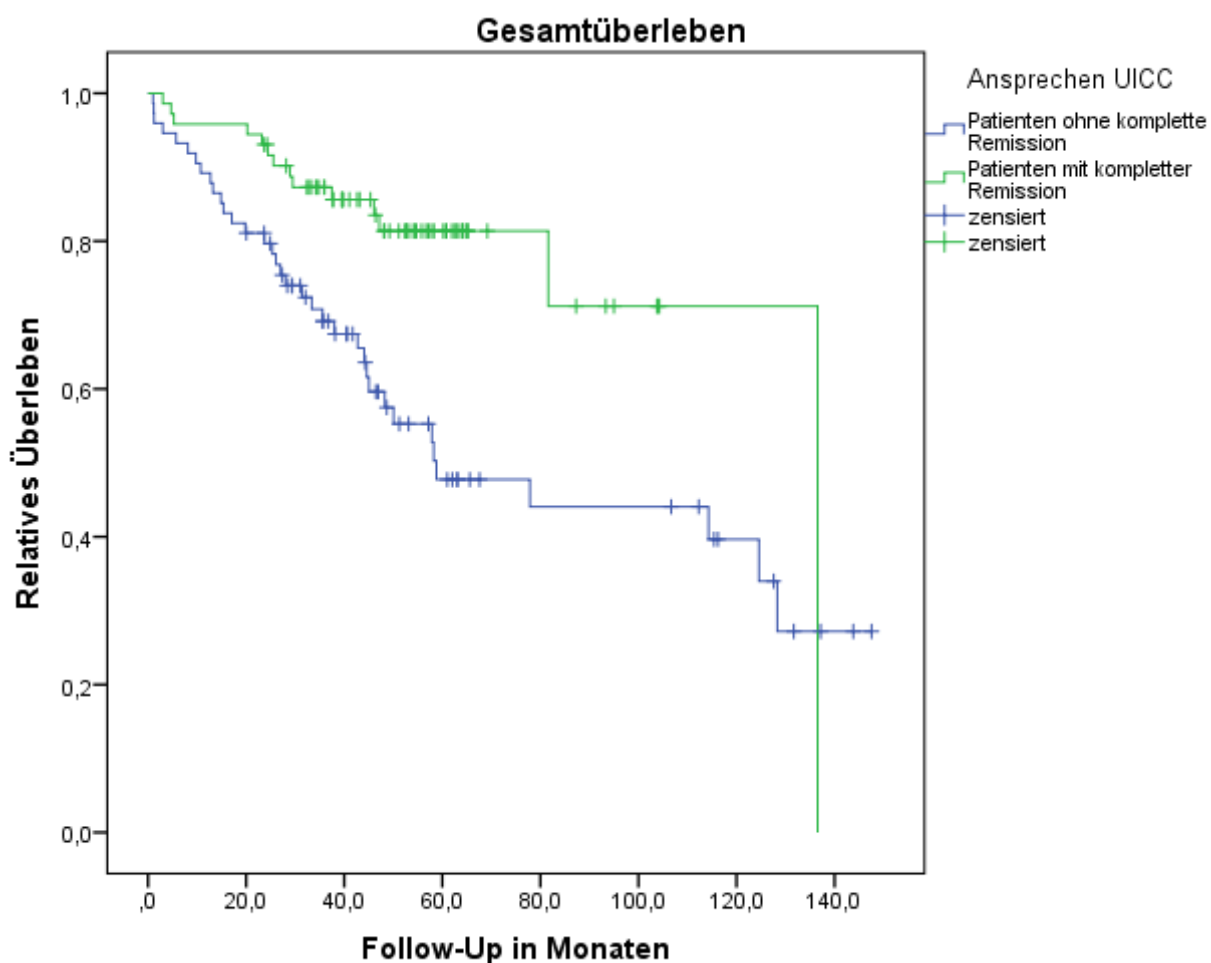


Abbildung 29: Überlebenszeit bei Therapieansprechen/Remission

Krankheitsfreies Überleben nach Resektions-Status

Je nach Resektionsstaus kann man das krankheitsfreie Überleben überprüfen, also wie lange die Patienten nach jeweiliger Resektion Rezidiv-frei blieben [Abbildung 30].

Die meisten Patienten wurden R0 reseziert (n=150), die wenigsten R1 (n=3), und ein paar R2 (n=9). Der Mittelwert des krankheitsfreien Überlebens der R0 Resektion lag bei 91 Monaten; der Median bei 114 Monaten.

Bei der R1 Resektion lag der Mittelwert des krankheitsfreien Überlebens bei 22 Monaten, der Median betrug 21 Monate. Bei der R2 Resektion hingegen lag der Mittelwert bei nur 13 Monaten und der Median bei nur 10 Monaten.

Im Log Rank Test waren die Unterschiede hochsignifikant ($p < 0,001$).

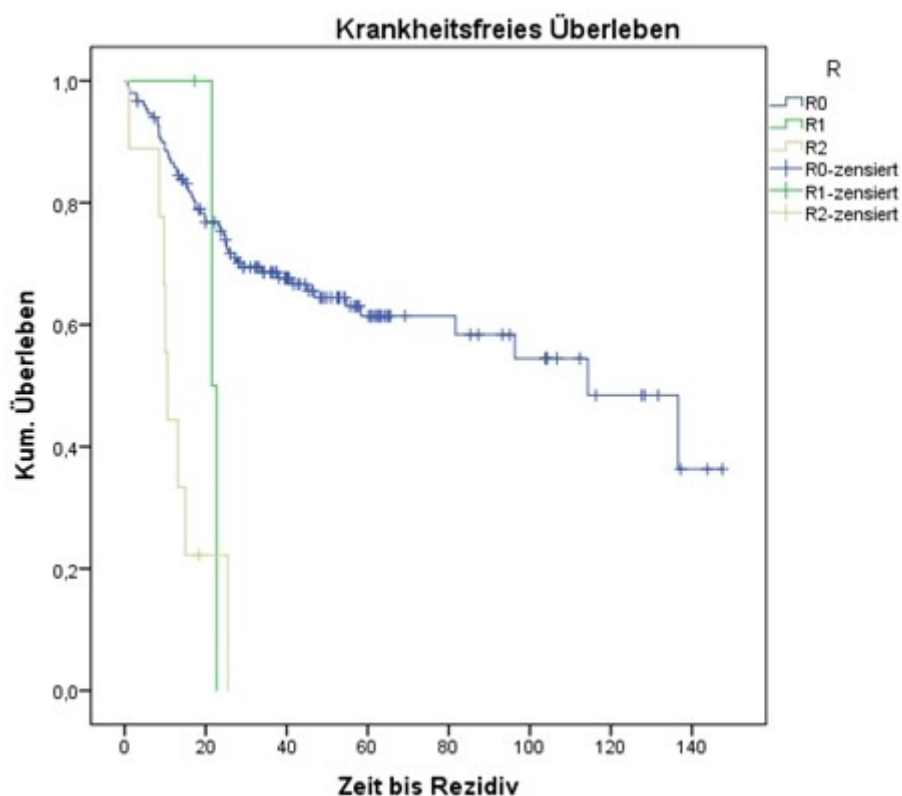


Abbildung 30: krankheitsfreies Überleben bei Resektion (R0, R1, R2)

Überleben nach R-Status:

Auch das Überleben könnte vom Resektionsstatus abhängig sein, so untersuchten wir auch dieses [Abbildung 31]. Der Mittelwert der Überlebenszeit der R0 Resektion lag bei 96 Monaten; der Median bei 117 Monaten.

Bei der R1 Resektion lag der Mittelwert der Überlebenszeit bei 37 Monaten, bei der R2 Resektion hingegen bei nur 20 Monaten und im Median bei nur 17 Monaten.

Dieses Ergebnis war im Log Rank Test hoch signifikant ($p < 0,001$).

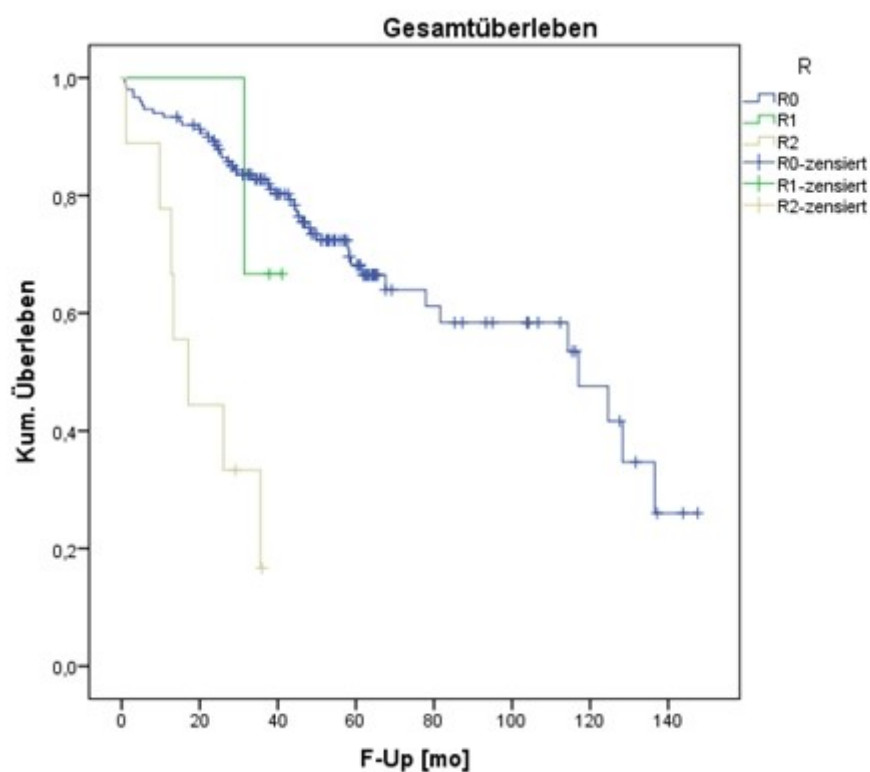


Abbildung 31: Gesamtüberleben bei Resektion (R0, R1, R2)

Krankheitsfreies Überleben

Das krankheitsfreie Überleben definierten wir als Intervall zwischen Rektum Operation und Auftreten eines Rezidivs. Über die Hälfte der Patienten (n=74) hatte ein Rezidiv [Abbildung 32]. Diese Personengruppe hatte eine mediane krankheitsfreie Zeit von 45 Monaten. Die Patienten ohne Rezidiv (n=71) hatten mit 136 Monaten eine deutlich längere krankheitsfreie Zeit. Auch dieses Ergebnis war signifikant verschieden (p=0,005).

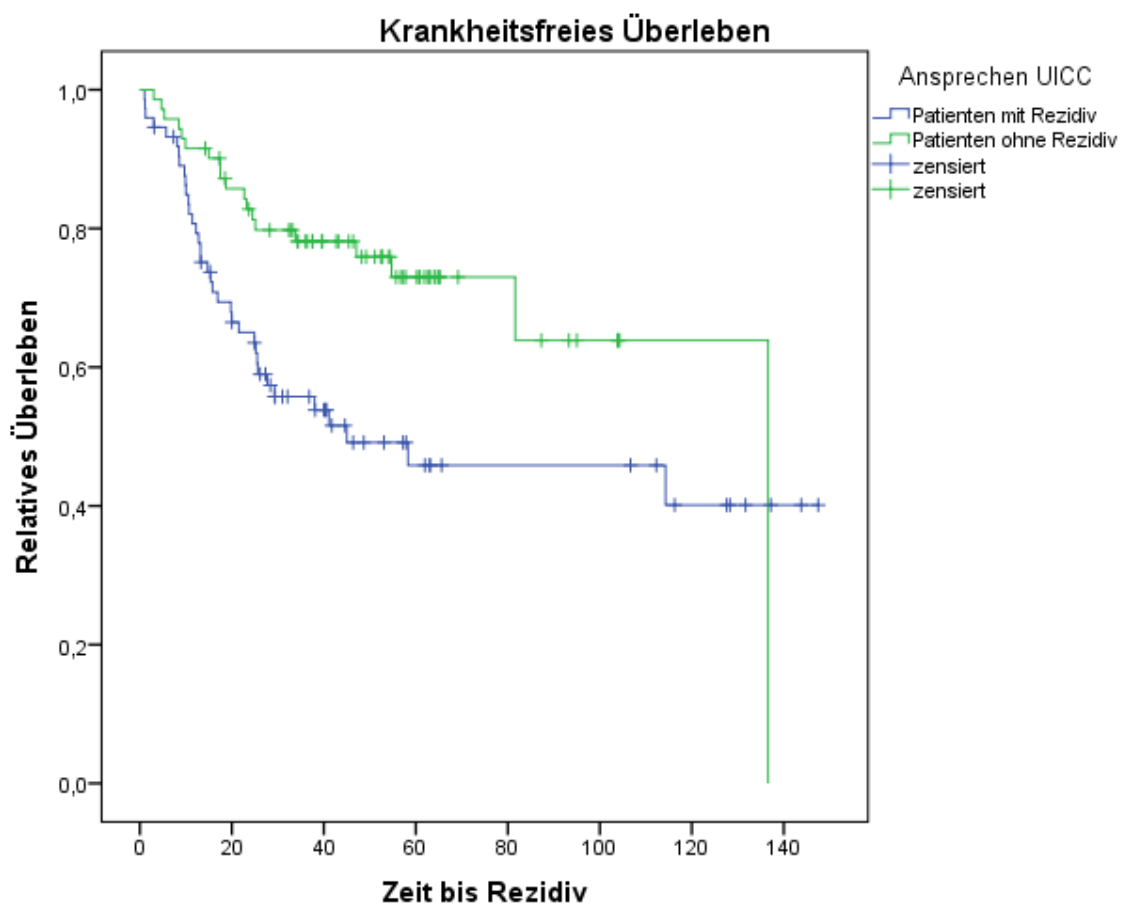


Abbildung 32: Krankheitsfreies Überleben

Überleben nach Regressionsstadien (Dworak)

Um zu untersuchen, wie die Tumorregression mit dem Gesamtüberleben korrelierte, trugen wir dies ebenfalls in eine Kaplan-Meier Grafik ein [Abbildung 33]. Es ließen sich daraus aber keine Ergebnisse ableiten, dass ein gewisser Regressionsgrad mit dem Überleben korrelierte. Dies zeigt folgende Grafik:

Keine Regression: n=2

Kaum Regression: n=10

Geringe Regression: n=28

Gute Regression: n=14

Komplette Regression: n=10

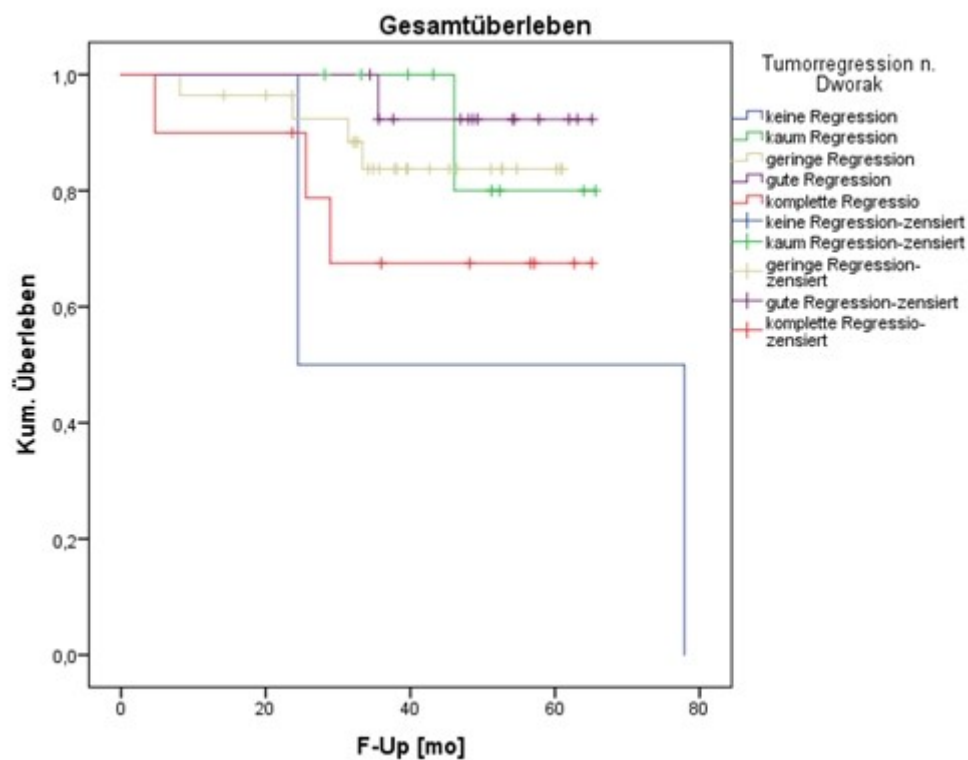


Abbildung 33: Gesamtüberleben und Tumorregression (Dworak)

6.4.1) CD44 und Überleben

CD44 Standard und Überleben

Wie auch das Osteopontin, so möchten wir die CD44 Konzentration in Zusammenhang mit dem Überleben untersuchen [Abbildung 34]: Dazu teilten wir das Gesamtkollektiv wieder in zwei Gruppen ein: die eine hat kleinere CD44 Standard Konzentrationen als der Median (n=80); die andere Gruppe hat höhere Konzentrationswerte vom Median aus gesehen (n=80). Die beiden Gruppen waren aber nicht signifikant unterschiedlich (p=0,34).

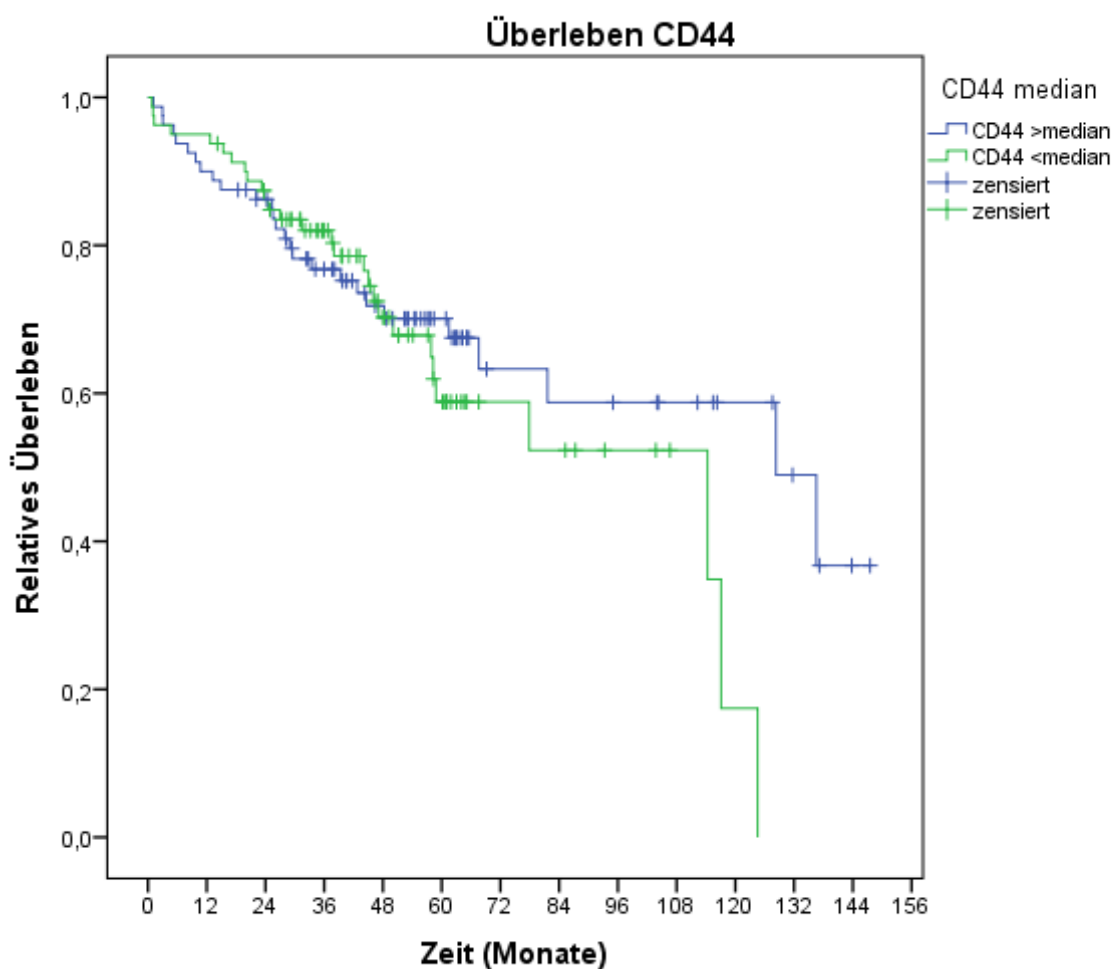


Abbildung 34: CD44std und Überleben

CD44 v6 und Überleben

Auch hier haben wir das Kollektiv nach Medianwert aufgeteilt [Abbildung 35]. Die eine Gruppe hatte kleinere CD44 Standard Konzentrationen als der Median (n=79); die andere Gruppe hatte höhere Konzentrationswerte (n=81). Die beiden Gruppen waren aber nicht signifikant unterschiedlich (p=0,352).

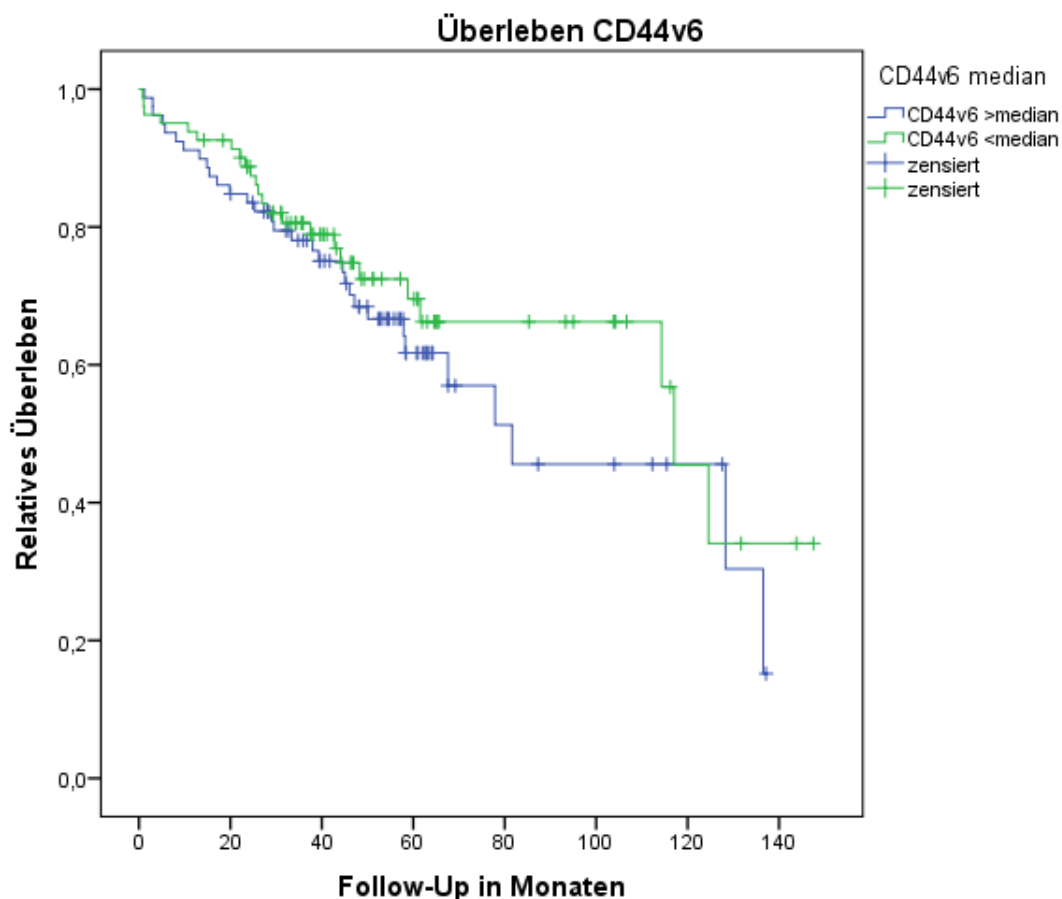


Abbildung 35: CD44 v6 und Überleben

OPN, CD44v6 und Überleben

Auch hier teilten wir das Gesamtkollektiv wieder in zwei Gruppen ein [Abbildung 36]. In der ersten Gruppe sind sowohl OPN als auch CD44v6 Werte über der medianen Serumkonzentration (n=42). In der anderen Gruppe sind OPN-Wert, der CD44v6 oder beide unterhalb des Medians (n=118).

Die beiden Gruppen waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,502$).

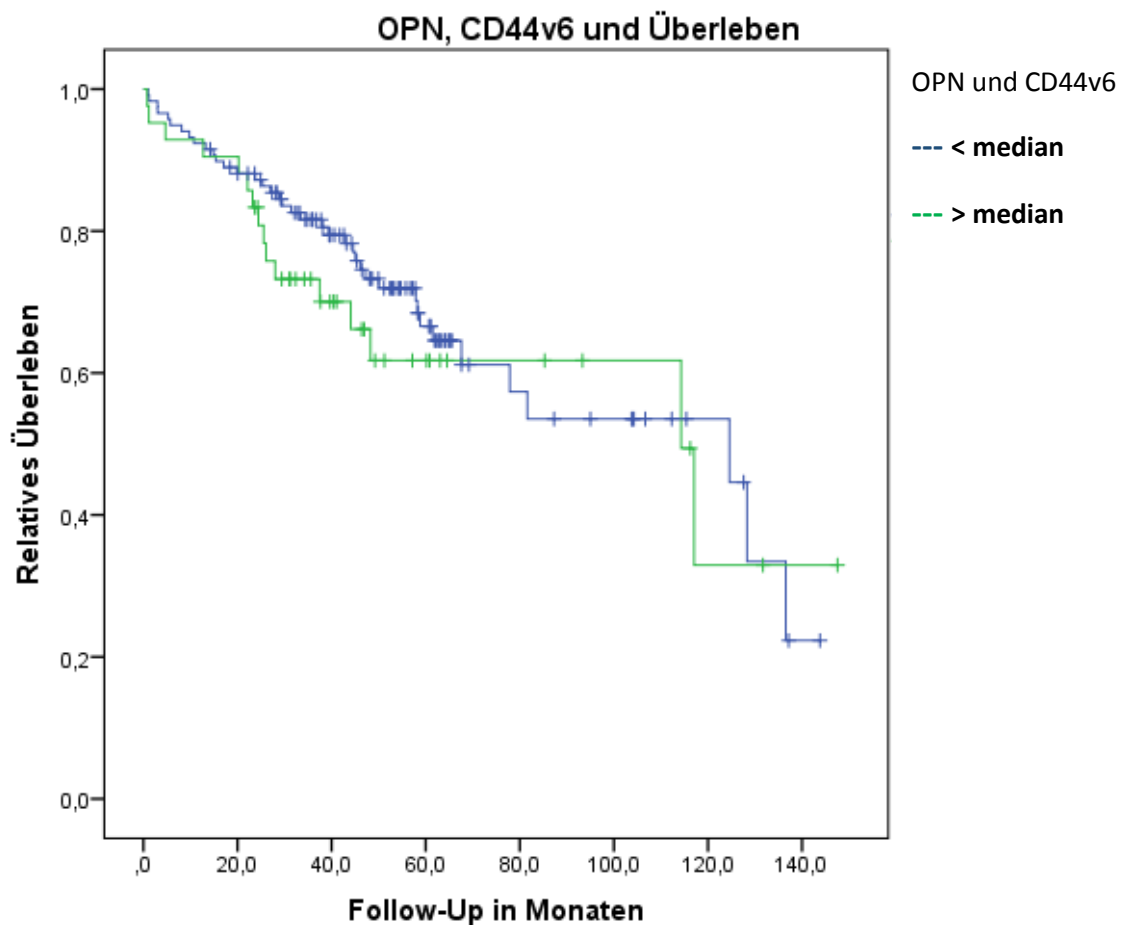


Abbildung 36: OPN, CD44v6 und Überleben

6.4.2) Osteopontin und Überleben

Wir untersuchten den Zusammenhang der Osteopontin Blutserum Konzentration mit dem Gesamtüberleben [Abbildung 37]. Dazu teilten wir das Gesamtkollektiv (n = 160) in zwei Gruppen ein: die eine Gruppe (n = 80) mit einem höheren OPN Wert als der Median (602,7 ng/ml); und die andere Gruppe (n = 80) mit niedrigeren OPN Werten. Es zeigte sich, dass Patienten mit höheren OPN Werten deutlich früher starben. Demnach hatten Patienten mit der niedrigeren OPN Konzentration ein signifikant besseres Gesamtüberleben mit 137 vs. 78 Monaten ($p=0,001$).

Die Kaplan-Meier Kurve im Anschluss verdeutlicht dies visuell:

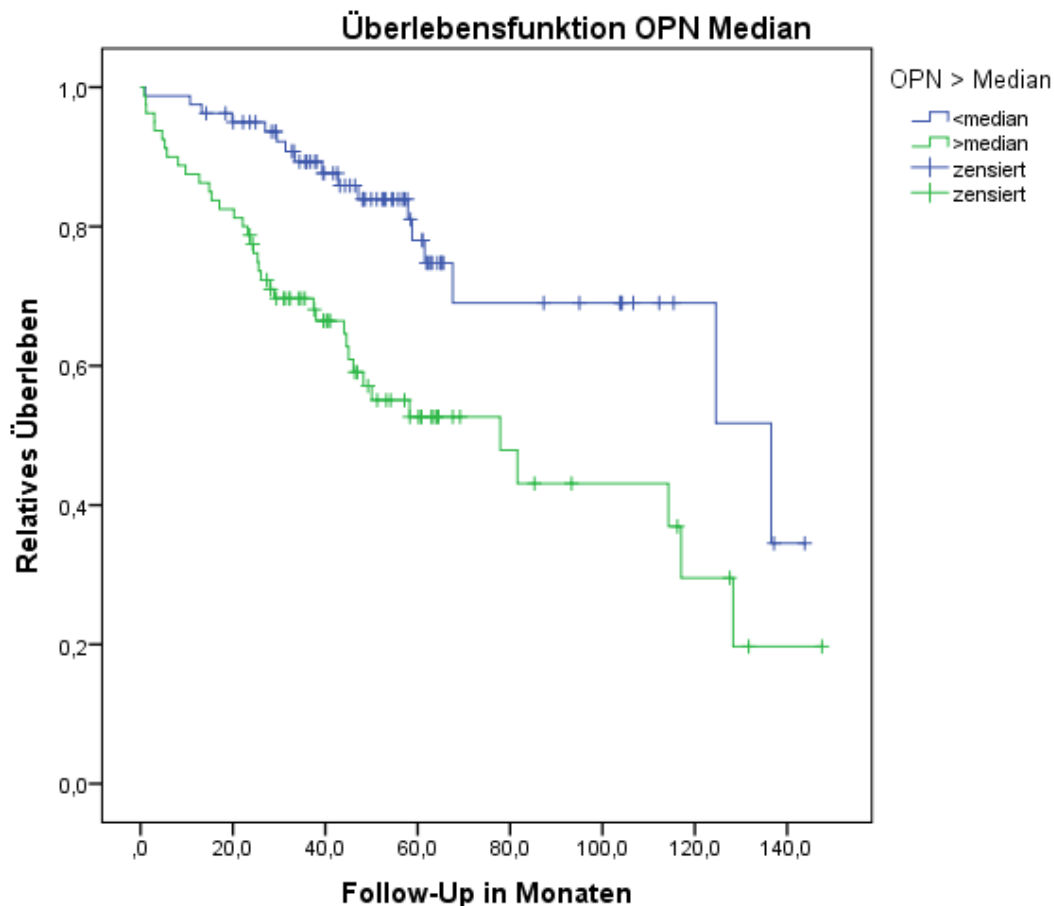


Abbildung 37: OPN & Gesamtüberleben

Osteopontin und rezidivfreies Überleben

Analog zum Gesamtüberleben ist auch das rezidivfreie Überleben in der Gruppe der niedrigeren OPN Werte (<602 ng/ml entspr. Median) verlängert [Abbildung 38]: 137 Monate versus 58 Monate. Auch dieses Ergebnis ist hochsignifikant mit $p = 0,008$.

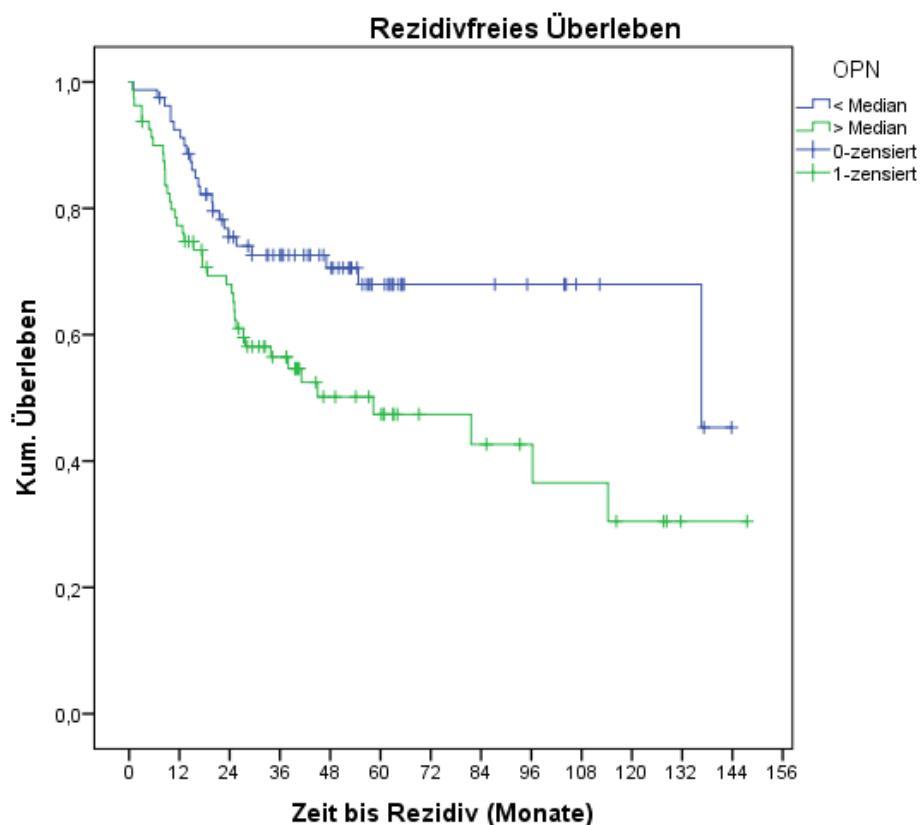


Abbildung 38: OPN & rezidivfreies Überleben

7) Diskussion

7.1) OPN Serum-Konzentration und Limitationen

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die OPN Serum Konzentrationen bei den postoperativen Patienten höher lagen als präoperativ [Abbildung 2: Boxplot OPN Konzentrationen nach Gruppen. Wir vermuten, dass Osteopontin direkt nach der Operation vermehrt exprimiert wird, im Sinne des inflammatorischen Prozesses und Umbauvorgänge der Extrazellulärmatrix, wie es z.B. bei einsetzender Wundheilung der Fall ist. Vorhergehende Arbeiten bestätigten diesen Zusammenhang bereits [42, 43].

In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe wurden postoperativ bei Kopf-, Halstumoren erhöhte OPN-Werte gemessen. Das Maximum wurde bereits am ersten postoperativen Tag erreicht. Im Laufe von 3-4 Wochen normalisierten sich die Werte wieder auf das präoperative Ausgangsniveau. Dies konnten wir auch in der aktuellen Kohorte beim Rektumkarzinom feststellen. Der Zeitpunkt der Blutentnahme lag hier bei einer Woche postoperativ [55].

Auf der anderen Seite kann man dies kritisch hinterfragen, da man lediglich Blutserumwerte quantitativ misst, ohne eine *qualitative* Aussage gesichert darüber treffen zu können. Natürlich liegen postoperative Einflüsse im Sinne der Wundheilung und inflammatorische Prozesse nahe, jedoch könnten auch andere, bisher ungeklärte Prozesse für diesen OPN Anstieg verantwortlich sein. Die genauen (patho-)physiologischen Prozesse sind noch ungeklärt. Bekannt ist, dass OPN bei vielen inflammatorischen Prozessen freigesetzt wird und somit ein unspezifischer Marker ist.

Eine qualitative Untersuchung des Ursprungs von Osteopontin kann dabei ein Ansatz für weiterführende Studien sein.

7.2) OPN und klinische Parameter

In unseren Ergebnissen konnten wir nachweisen, dass Patienten mit einem hohen Tumorstadium des Rektumkarzinoms einen signifikant höheren

Osteopontin-Serumspiegel aufwiesen. Vor allem zwischen der Gruppe T2 und T4 bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0,006$) [Abbildung 5].

Dies entspricht der aktuellen Literatur, in der andere Arbeitsgruppen hohe Osteopontin Werte mit verstärktem Tumorprozess [54, 88], bzw. mit einem geringeren Überleben korreliert sahen [89–91].

Dabei zeigte sich oft ein Zusammenhang zwischen Metastasierung und OPN-Serumspiegel, welchen wir nicht bestätigen konnten [Abbildung 7]. Wir möchten die Schlussfolgerung der Tumorgenität im Sinne der erhöhten Zell-Invasion und Antiapoptose betonen. Demnach könnten die erhöhten OPN Spiegel aufgrund des fortschreitenden Primärtumors verursacht werden. So sehen wir diese Arbeit vereinbar mit Ergebnissen anderer, die Osteopontin eine anti-apoptotische Wirkung auf kanzerogene Zellen zuschreiben, z.B. über die Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [48]; oder auch die Inhibition der Zell-Autophagie über die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges [92].

In einer Vorgänger Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigte sich durch Hypoxie eine Hochregulation von OPN und anschließende steigende Strahlenresistenz der Tumorzellreihen. In der Vorgängerarbeit wurde vermutet, dass OPN bei unterschiedlichen Malignitätsgraden verschieden exprimiert wird [56]. Dies sollte in zukünftigen Studien weiterverfolgt werden.

Bei weiteren klinischen Parametern zeigten sich die OPN Werte nicht signifikant unterschiedlich (Ergebnis Kapitel: Osteopontin und Geschlecht, UICC, TNM).

7.3) OPN und Prognose

Patienten mit niedriger OPN Konzentration besaßen mit 137 vs. 78 Monaten ein signifikant besseres Gesamtüberleben. Dies zeigte sich auch hochsignifikant in der multivariaten Analyse [Abbildung 37].

In der aktuellen Literatur fanden sich Arbeiten, die den Zusammenhang von OPN und Überleben bestätigten [49, 54, 58, 89–91, 93]. In anderen Arbeiten war zu finden, dass OPN die Motilität der Tumorzellen durch CD44 Interaktion regulieren soll. Die OPN Expression könnte so die interzelluläre Adhäsion

reduzieren, was für metastatische Krebszellen von großer Bedeutung wäre. Eine Arbeitsgruppe konnte in in vivo Experimenten eine erhöhte Osteopontin Expression nachweisen, die eine erhöhte Metastasierungsrate zur Folge hatte [88]. Wir konnten in unserem Patientenkollektiv keine hohe Korrelation von OPN und CD44 nachweisen [Abbildung 22].

Des Weiteren fand sich eine Arbeit, die zeigte, dass die Metastasen-Genese über den Rezeptor CD44v6 zusammen mit Osteopontin vermittelt werden soll. Interessanterweise soll normales Lebergewebe ebenfalls verstärkt OPN und CD44v6 exprimieren [94].

Es wären also noch weitere Untersuchungen notwendig, um der Frage nach zu gehen, ob OPN Werte bei Metastasen erhöht sind oder nicht. Metaanalysen mit höheren Fallzahlen könnten eine Möglichkeit darstellen.

So kommen wir zu dem Schluss, dass hohe Osteopontin Werte auf eine signifikant erhöhte Mortalität hinweisen, und sich damit gut als prognostische Marker eignen.

Dies entspricht somit auch einer vorgehenden Arbeit, in der erhöhte OPN Werte sich ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert zeigten. Die Arbeitsgemeinschaft untersuchte daraufhin die immunhistochemische Korrelation zwischen OPN Werten und β -catenin, welches ein Hinweis auf die Aktivierung des Wnt-Signalweges sein könnte. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation. In vivo wurde der Wnt-Signalweg mit Expression von OPN von Mäusen untersucht: Die Voraussetzung für eine hohe OPN Expression soll zum einen die Wnt-Signalweg-Aktivierung, und zum anderen eine Mutation des APC Suppressorgens sein. Die Arbeitsgruppe kam daher zum Schluss, dass OPN ein Produkt des Wnt-Signalweges ist. [93].

7.4) CD44

Beim CD44 Oberflächenglykoprotein konnten wir keine Zusammenhänge mit Tumorausbreitung, Progress oder Mortalität herstellen [Abbildung 10, Abbildung 12, Abbildung 14, Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 34, Abbildung 36].

Durch die Literaturangaben hätten wir einen erhöhten Einfluss von v.a. CD44 erwartet, der jedoch bei sämtlichen Parametern nicht zu verzeichnen war.

In der Literatur waren jedoch zahlreiche Hinweise darauf zu finden, dass CD44 ein potentieller Marker für das kolorektale Karzinom sein soll [81, 83, 86].

So ist in einer umfassenden Übersichtsarbeit [95] zu lesen, dass unter vielen Markern wie „CD133, CD24, CD29, CD166, EpCAM, ALDH1A1, ALDH1B1, Lgr5“ auch CD44 zu finden ist, das als Glykoprotein für Zelladhäsion und Zellmigration fungiert. Eine erhöhte Expression in Brustkrebs Epithelzellen würde die Zellmigration erleichtern. Ein Signalweg über den Wnt/B-catenin pathway wurde diskutiert. Die Arbeitsgruppe merkte aber auch an, dass in neueren Studien CD44 zunehmend kritisch betrachtet würde und es anzuzweifeln sei, ob sich das Glykoprotein auch wirklich als Marker eigne: Es mehren sich Argumente, dass CD44 sich weder als prognostischer Marker für Überleben, noch für (primär) Tumor, Lymphknoten- oder Fernmetastasierung eignet.

Da wir ebenfalls keine Zusammenhänge feststellten (Aufzählung der Abbildungs-Querverweise siehe Kapitelbeginn), unterstützen wir diese These.

Lediglich beim Lymphknotenbefall (N2) der TNM Klassifikation stellten wir leicht erhöhte Konzentrationswerte von CD44v6 fest [Abbildung 17].

In einer vergleichbaren Arbeit, in der die Arbeitsgruppe präoperativ CD44 Serumspiegel mittels ELISA bestimmte, waren die Konzentrationen von CD44v6 signifikant mit Lymphknotenmetastasierung assoziiert [82]. Auch andere Untersuchungen zeigten eine signifikante CD44v6 Erhöhung im Serum von Patienten mit Lymphknotenmetastasen [84]. In einer Untersuchung war die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit höherer Serumkonzentration signifikant schlechter [82].

Wir sehen ersteres Ergebnis (Lymphknotenmetastasierung) von unserer Untersuchung bestätigt [Abbildung 17], letzteres (5JÜR) jedoch nicht [Abbildung 34, Abbildung 35]. Für uns lässt das den Rückschluss zu, dass CD44v6 mit verstärktem Lymphknotenbefall assoziiert ist, aber nicht mit dem Gesamtüberleben. Es ist daher möglich, dass CD44 in den Tumorprogress involviert ist, zumindest ist es nicht auszuschließen. Einen stärkeren Zusammenhang können wir aber nicht bestätigen.

Eine weitere Arbeit sah CD44v6 (und v5) daher auch nicht als prognostischen Marker für kolorektale Karzinome an; auch folgende Arbeit fand keine weiteren Korrelationen zwischen den gewählten Parametern von Patienten [85].

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen auch daraufhin zurück zu führen, dass jeweils unterschiedliche Tumorentitäten untersucht wurden. In einigen Arbeiten, die andere Tumoren als das Rektumkarzinom untersuchten, wurde CD44 als prognostischer Marker betrachtet; so zum Beispiel beim Magenkarzinom, vor allem in Kombination mit CD133 [96]. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass eine CD44v6 Expression bei Ovarialkarzinom mit Progression, Metastasierung und Rezidiv assoziiert ist. Laut den Autoren könnte CD44v6 als Verlaufsmarker zum Rezidiv Screening benutzt werden. CD44v6 spiele eine Rolle bei der Metastasierung von Ovarialkarzinom, in dem es Zelladhäsion und Migration vermittelt [97].

Auch zu beachten ist, dass wir lediglich die Blutserumkonzentrationen von CD44 und dessen Isovariante 6 bestimmten. Andere Arbeitsgruppen bestimmten auch immunhistochemisch das Vorkommen von CD44 direkt am Primärtumor und kamen zu erhöhten CD44 und CD44v6 Werten [84].

Es empfiehlt sich, diesen Sachverhalt noch breiter zu untersuchen: Steigt die Konzentration von CD44 bei malignen Prozessen im Serum an, oder ist der (vermutliche) Anstieg im Serum in erster Linie nur auf den Besatz am Primärtumor zurückzuführen? Es werden also noch weitere Studien dazu folgen müssen um genauer differenzieren zu können.

Wenn wir also CD44 als Marker untersuchen, so sollten wir sowohl die Herkunft (Serum versus Primärtumor) aber auch die verschiedenen Tumorentitäten getrennt betrachten. Unsere Ergebnisse zeigten zwar (außer bei Lymphmetastasierung) keine Zusammenhänge mit verschiedenen Patientenparametern; es ließ sich dadurch aber auch nicht widerlegen, dass es vor allem bei anderen Tumorentitäten durchaus (pathogenetische) Zusammenhänge geben könnte.

7.5) Überlebenszeitanalyse

Beim Überleben konnten wir die bisherigen Daten aus der Literatur bestätigen: Je höher das UICC Stadium ist, desto kürzer die Überlebenszeit [Abbildung 26]. Beim UICC Stadium IV (n=20) starben alle Patienten 60 Monate nach Erstdiagnose. Hingegen lebten beim UICC Stadium I (n=45) 50% der Patienten noch länger als 10 Jahre. Das Überleben bei kompletter Remission war in unserer Arbeit nicht signifikant verlängert im Vergleich zu höheren UICC Stadien. Hierüber kann aber keine genauere Aussage getroffen werden, da es nur wenige Patienten in dieser Kategorie gab (n=14). Bei der Überlebenszeit nach Therapieansprechen [Abbildung 29] und beim krankheitsfreien Überleben [Abbildung 32] zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede.

Beim krankheitsfreien Überleben abhängig vom Resektionsstatus der Rektum Operation erkannten wir klare Zusammenhänge: Diejenigen, die keine R0 Resektion hatten, starben signifikant früher oder erlitten früher ein Rezidiv.

Die klinische Erfahrung entspricht auch unseren Ergebnissen: Das Ansprechen auf eine neoadjuvante Therapie [Abbildung 29] verlängert das Überleben signifikant. Dies unterstreicht die Bedeutung der multimodalen Therapie.

7.6) Weitere Tumormarker und Ausblick

Die hier untersuchten Biomarker stellen nur ein kleines Spektrum der Tumormarker für das kolorektale Karzinom dar. In einer Multianalyse verschiedenster Marker wurde Osteopontin als hoch sensitiver Marker angesehen (45%), höchste Spezifität lag bei CEA (67%). CYFRA 21-1 und CA 72-4 besaßen eine ähnliche Sensitivität, aber unterschiedliche Spezifität (37% vs. 89%). Eine Kombination der fünf Marker erreichte 74% Sensitivität und 94% Spezifität [57].

Eine weitere Übersichtsarbeit stellte die große Vielfalt von Biomarkern bei gastrointestinalen Tumoren dar und veranschaulichte die diagnostischen Möglichkeiten [98]. Dies zeigte, dass die multiparametrische Betrachtung einen

synergistischen Effekt aufzeigt und lässt umgekehrt den Schluss zu, dass die Betrachtung eines einzelnen Markers dazu führen kann, diesen zu überschätzen oder gar falsch einzuschätzen, da er nur ein Teil eines größeren Systems ist.

Da im Laufe der Zeit immer weitere Tumormarker identifiziert werden, lässt sich die diagnostische Bandbreite auch weiter ausdehnen. Durch eine breitere Diagnostik wiederum kann diese auf einzelne Individuen optimiert angewendet werden. Prädiktive Marker könnten durch eine individuelle Therapie in der Zukunft die Morbidität und Mortalität signifikant senken und so ein neues Kapitel der personalisierten Medizin eröffnen [99].

In einer weiteren Arbeit wurde ABCB5 (ATP-binding cassette member B5) als Tumormarker identifiziert. Dieser Marker könnte Therapiehinweise liefern, speziell bei Therapie-refraktären Tumorzellen von kolorektalen Karzinomen, die mit 5FU behandelt wurden und Resistenzen aufzeigen [100].

Ein weiterer prognostischer Marker aus der Familie der „Cluster of Differentiation“ ist CD133. CD133 weist auf Kolon Karzinom Stammzellen hin und ist ein Hinweis auf eine Lebermetastasierung [101].

Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass CD133 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Radiochemotherapie einhergeht. Die erhöhte CD133 Expression präoperativ korrelierte mit einem geringeren Tumoransprechen, vermehrter Fernmetastasierung und verringertem Überleben [102].

Das Glykoprotein wurde sowohl im Blut als auch immunhistochemisch am Primärtumor detektiert. Bemerkenswerterweise wurde CD133 zwar auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen lokalisiert, jedoch nicht den Zellen in vorderster Front der Zellinvasion [103].

Dies ist ein Beispiel dafür, wie schwierig es bei Tumormarkern sein kann, verlässliche Aussagen treffen zu können: Die Expression kann sehr unterschiedlich ausfallen. Um genauere Aussagen über die pathogenetischen Mechanismen treffen zu können, sind also auch differenzierte immunhistochemische Nachweise erforderlich.

Im Ausblick bedarf es gerade für Osteopontin weiterer Studien, ob OPN nicht auch ein therapeutischer Angriffspunkt sein könnte. Da das Protein im Tumorprozess eine wichtige Rolle spielt, wäre zu untersuchen, wie sich eine Blockade dieses Signalweges auswirken würde. Da Osteopontin ubiquitär im Körper exprimiert wird und normale physiologische Funktionen besitzt, muss daher mit Komplikationen gerechnet werden. Eine klinische Studie ist in Anbetracht der medizinischen Bedeutung des kolorektalen Karzinoms wünschenswert. Jüngste Untersuchungen bestätigen dies und fordern weitere Erforschung [104].

Eine klinische Konsequenz dieser Arbeit wäre jedoch schon früher greifbar: wir konnten zeigen, dass hohe OPN Werte mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [Abbildung 37, Abbildung 38]. Als Konsequenz könnte man bei Patienten mit hohen OPN Werten aggressivere Therapiemodalitäten innerhalb von Studien weiterentwickeln. Denkbar wäre eine Intensivierung der neoadjuvanten Therapie im Sinne einer Erhöhung der Bestrahlungsdosis oder der Erweiterung der Chemotherapie um Oxaliplatin oder neuerer Substanzen.

8) Anhang: Übersichtstabellen

Zur Veranschaulichung die Zusammenfassung der Biomarker Ergebnisse in Bezug auf die klinischen Parameter:

Übersicht Signifikanz			
	OPN	CD44 std	CD44 V6
Primäre OP, M1, postOP	0,048; 0,035	n.s.	n.s.
Geschlecht	n.s.		
UICC Stadien	n.s.	n.s.	n.s.
T-Stadium (T2 vs T4)	p=0,023	n.s.	n.s.
Lymphknotenstatus	n.s.	n.s.	n.s.
Metastasierung	n.s.	n.s.	n.s.
Regression Dworak	n.s.	n.s.	n.s.
Therapie Ansprechen	n.s.		
Korrelationen CD44 std	R=0,24 p=0,01		R=0,46 p=0,01
Überleben in Monaten (getrennt nach Medianwert)	137 vs. 78 p=0,001	n.s.	n.s.
Rezidivfreies Überleben	137 vs. 58 p=0,008		

Tabelle 5: Übersicht der p-Werte über den Vergleich der Mittelwerte (t-Test bzw. ANOVA) sowie der Korrelationen und des Überlebens in Bezug auf die Biomarker

Uni- und Multivariate Auswertung:

Parameter		HR	95% CI	p-Wert
Alter (<> 64 Jahre)		0,44	0,25 - 0,77	0,004
Geschlecht (m/w)		0,75	0,42 - 1,35	0,34
T-Stadium T0-3 vs T4	T0	0,13	0,3 - 0,56	0,006
	T1	0,04	0,005 – 0,36	0,004
	T2	0,19	0,07 – 0,55	0,002
	T3	0,24	0,09 – 0,62	0,003
N-Stadium (N0 / N+)		0,37	0,22 – 0,64	<0,001
M-Stadium (M0 / M1)		0,31	0,16 – 0,59	<0,001
UICC-Stadium 0-III vs IV	0	0,19	0,06 – 0,69	0,01
	I	0,16	0,07 – 0,38	< 0,001
	II	0,25	0,11 – 0,55	0,001
	III	0,45	0,22 – 0,93	0,03
Therapieansprechen Kein A. vs Ansprechen		2,63	1,41 – 4,92	0,002
pCR (kompl.Remission) nein / ja		1,67	0,52 – 5,41	0,38
OPN (<> Median)		0,38	0,21 – 0,67	0,001
CD44s		0,77	0,44 – 1,33	0,34
CD44v6		1,29	0,76 – 2,2	0,35

Tabelle 6: Univariate Cox-Regression bzgl. des Gesamtüberlebens und klinisch relevanter Parameter einschließlich der Biomarker

Die statistisch signifikanten Parameter aus der univariaten Analyse wurden im nächsten Schritt mittels multivariater Cox-Regression ausgewertet.

In der folgenden Tabelle sind die drei prognostisch relevanten Parameter Alter, N-Stadium und OPN Spiegel aufgeführt:

Parameter	HR	95% CI	p-Wert
Alter (< vs. > 64 Jahre)	0,20	0,097 – 0,426	< 0,001
N-Stadium (N0 vs. N+)	0,12	0,02 – 0,83	0,03
OPN (< vs. > Median)	0,22	0,1 – 0,48	< 0,001

Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression bzgl. des Gesamtüberlebens und der statistisch signifikanten Parameter

9) Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Biomarkern Osteopontin und CD44 Standard, sowie CD44 Isovariante 6 beim Rektumkarzinom. Wir konzentrierten uns in dieser Arbeit auf die prognostische Bedeutung von Osteopontin und CD44std, sowie CD44v6. In einigen Vorgängerarbeiten zeigten sich Zusammenhänge vor allem bei der Tumorinduktion, Metastasierung und Überleben.

In unserer Arbeit konnten wir bestätigen, dass sich hohe Serumkonzentrationen von Osteopontin bei Patienten mit Rektumkarzinom hochsignifikant negativ auf das Gesamtüberleben auswirken. Niedrigere Serumkonzentrationen sind daher mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Dies zeigte sich auch in der durchgeführten multivariaten Analyse. Wir kommen daher zu dem Schluss, dass sich Osteopontin als prognostischer Marker eignet.

Daraus lässt sich die klinische Konsequenz ableiten, dass man die bestehende Therapie bei hohen OPN Werten reevaluieren sollte. Bei hohen Werten wären dann ggfs. aggressivere Therapieprotokolle vorstellbar.

In der Literatur wurde das Glykoprotein CD44 mit der Isovariante v6 mit Metastasierung assoziiert. Dies konnten wir nicht bestätigen.

Wir sahen CD44 Standard und auch dessen Isovariante v6 weder mit Gesamtüberleben, noch mit Tumorstadium und Metastasierung assoziiert. Auch wenn wir CD44 mit OPN gemeinsam auf das Gesamtüberleben untersuchten, fanden wir keinen signifikanten Einfluss.

Lediglich bei der Lymphknotenmetastasierung zeigte sich im Stadium N2 eine erhöhte Konzentrationen der Isovariante v6, was durch aktuellste Literatur bestätigt wird. Inwieweit dieses Ergebnis für einen diagnostischen Nutzen relevant ist, muss durch weitere, größere Studien untersucht werden.

10) Literaturverzeichnis

- [1] Tumorregister München (TRM), *Evaluation der Versorgung von Darmkrebspatienten im Einzugsgebiet des Tumorregisters München (TRM) auf der Basis der aktuellen S3-Leitlinie*. [Online] Available: http://www.tumorregister-muenchen.de/versorgungsforschung/Abschlussbericht_S3-Leitlinie_Darm.
- [2] Metzler Poeschel, *Statistisches Jahrbuch 1998 der BRD* (de). Stuttgart.
- [3] M. S. Fazeli and M. R. Keramati, "Rectal cancer: a review," (ENG), *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, vol. 29, p. 171, 2015.
- [4] R. Siegel, C. Desantis, and A. Jemal, "Colorectal cancer statistics, 2014," (eng), *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 64, no. 2, pp. 104–117, 2014.
- [5] E. Botteri *et al.*, "Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis," (eng), *JAMA*, vol. 300, no. 23, pp. 2765–2778, 2008.
- [6] D. Leyk, "The preventive and therapeutic roles of regular physical activity," (eng), *Deutsches Ärzteblatt international*, vol. 106, no. 44, pp. 713–714, 2009.
- [7] E. K. Wei *et al.*, "Comparison of risk factors for colon and rectal cancer," (eng), *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 108, no. 3, pp. 433–442, 2004.
- [8] E. Giovannucci, "Modifiable risk factors for colon cancer," (eng), *Gastroenterology clinics of North America*, vol. 31, no. 4, pp. 925–943, 2002.
- [9] DGE, *DGE Ernährungskreis*. [Online] Available: <https://www.dge.de/ernaehrungspraxis/vollwertige-ernaehrung/ernaehrungskreis/>.
- [10] C. M. Johnson *et al.*, "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors," (eng), *Cancer causes & control : CCC*, vol. 24, no. 6, pp. 1207–1222, 2013.
- [11] E. T. Jacobs *et al.*, "Fiber, sex, and colorectal adenoma: results of a pooled analysis," (eng), *The American journal of clinical nutrition*, vol. 83, no. 2, pp. 343–349, 2006.
- [12] J. J. Centelles, "General aspects of colorectal cancer," (eng), *ISRN oncology*, vol. 2012, p. 139268, 2012.
- [13] B. Vogelstein *et al.*, "Genetic alterations during colorectal-tumor development," (eng), *The New England journal of medicine*, vol. 319, no. 9, pp. 525–532, 1988.
- [14] C. Pox *et al.*, "S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 – Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL: S3-Guideline Colorectal Cancer Version 1.0," (ger), *Zeitschrift für Gastroenterologie : offizielles Organ*, vol. 51, no. 8, pp. 753–854, <https://www.thieme-connect.de/ejournals/pdf/10.1055/s-0033-1350264.pdf>, 2013.
- [15] U. Manne, C. Shanmugam, V. R. Katkooori, H. L. Bumpers, and W. E. Grizzle, "Development and progression of colorectal neoplasia," (eng),

- Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, vol. 9, no. 1-6, pp. 235–265, 2010.
- [16] R. Schneider *et al.*, “Kolorektales Karzinom bei V. a. Lynch-Syndrom: ein interdisziplinärer Algorithmus,” (GER), *Zentralblatt für Chirurgie*, 2014.
- [17] P. Galiatsatos and W. D. Foulkes, “Familial adenomatous polyposis,” (eng), *The American journal of gastroenterology*, vol. 101, no. 2, pp. 385–398, 2006.
- [18] C. Pox *et al.*, *AWMF Leitlinie: Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. [Online] Available: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/021-007OL.html>. Accessed on: Aug. 12 2015.
- [19] S. H. Itzkowitz and X. Yio, “Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation,” (eng), *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 287, no. 1, p. 17, 2004.
- [20] G. Herold, *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Herold, 2014.
- [21] V. Schumpelick, “Moderne Operationsverfahren des Rektumkarzinoms: Sind adjuvante Maßnahmen notwendig?,” *Dtsch Arztebl International*, p. 1138, <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=22755>, 2000.
- [22] R. C. Newland, P. H. Chapuis, M. T. Pheils, M. Chir, and J. G. Macpherson, “The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: A prospective study of 503 cases,” *Cancer*, vol. 47, no. 6, pp. 1424–1429, 1981.
- [23] C. Wittekind, *TNM-Klassifikation maligner Tumoren: Klassifikation maligner Tumoren*, 2017.
- [24] C. C. Compton and F. L. Greene, “The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond,” (eng), *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 54, no. 6, pp. 295–308, 2004.
- [25] I. J. Park *et al.*, “Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer,” (eng), *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 15, pp. 1770–1776, 2012.
- [26] P. T. Phang and X. Wang, “Current controversies in neoadjuvant chemoradiation of rectal cancer,” (eng), *Surgical oncology clinics of North America*, vol. 23, no. 1, pp. 79–92, 2014.
- [27] R. Sauer *et al.*, “Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer,” (eng), *The New England journal of medicine*, vol. 351, no. 17, pp. 1731–1740, 2004.
- [28] K. Bujko *et al.*, “Postoperative complications in patients irradiated pre-operatively for rectal cancer: Report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs chemoradiation,” (eng), *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, vol. 7, no. 4, pp. 410–416, 2005.

- [29] C. A. Marijnen *et al.*, “No downstaging after short-term preoperative radiotherapy in rectal cancer patients,” (eng), *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 19, no. 7, pp. 1976–1984, 2001.
- [30] J.-F. Bosset *et al.*, “Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer,” (eng), *The New England journal of medicine*, vol. 355, no. 11, pp. 1114–1123, 2006.
- [31] B. D. Minsky *et al.*, “Enhancement of radiation-induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy,” (eng), *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 10, no. 1, pp. 79–84, 1992.
- [32] C. Song *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,” (eng), *PloS one*, vol. 10, no. 4, pp. e0123657, 2015.
- [33] A. Bellahcène, V. Castronovo, K. U. E. Ogbureke, L. W. Fisher, and N. S. Fedarko, “Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer,” (eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 8, no. 3, pp. 212–226, 2008.
- [34] A. Bellahcène and V. Castronovo, “Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases,” (eng), *Bulletin du cancer*, vol. 84, no. 1, pp. 17–24, 1997.
- [35] C. W. Prince *et al.*, “Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone,” (eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 6, pp. 2900–2907, 1987.
- [36] D. R. Senger, C. A. Perruzzi, A. Papadopoulos-Sergiou, and L. van de Water, “Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain,” (eng), *Molecular biology of the cell*, vol. 5, no. 5, pp. 565–574, 1994.
- [37] B. Christensen, L. Schack, E. Kläning, and E. S. Sørensen, “Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D,” (eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 11, pp. 7929–7937, 2010.
- [38] R. Agnihotri *et al.*, “Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin),” (eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 30, pp. 28261–28267, 2001.
- [39] Y. Higashibata *et al.*, “Identification of promoter regions involved in cell- and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice,” (eng), *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 19, no. 1, pp. 78–88, 2004.

- [40] F. Takahashi *et al.*, "Osteopontin is strongly expressed by alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome," (eng), *Lung*, vol. 182, no. 3, pp. 173–185, 2004.
- [41] K. Zduniak *et al.*, "Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker," (eng), *British journal of cancer*, vol. 112, no. 4, pp. 729–738, 2015.
- [42] S. Kon *et al.*, "Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms," (eng), *Journal of cellular biochemistry*, vol. 77, no. 3, pp. 487–498, 2000.
- [43] N. Shijubo, T. Uede, S. Kon, M. Nagata, and S. Abe, "Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology," (eng), *Critical reviews in oncogenesis*, vol. 11, no. 2, pp. 135–146, 2000.
- [44] D. Ramchandani and G. F. Weber, "Interactions between osteopontin and vascular endothelial growth factor: Implications for cancer," (eng), *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1855, no. 2, pp. 202–222, 2015.
- [45] D. T. Denhardt, M. Noda, A. W. O'Regan, D. Pavlin, and J. S. Berman, "Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival," (eng), *The Journal of clinical investigation*, vol. 107, no. 9, pp. 1055–1061, 2001.
- [46] R. Zohar *et al.*, "Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration," (eng), *Journal of cellular physiology*, vol. 184, no. 1, pp. 118–130, 2000.
- [47] M. A. Chellaiah *et al.*, "Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression," (eng), *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 1, pp. 173–189, 2003.
- [48] Y. H. Lin and H. F. Yang-Yen, "The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway," (eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 49, pp. 46024–46030, 2001.
- [49] D.-X. Cao *et al.*, "Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers," (eng), *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 18, no. 30, pp. 3923–3930, 2012.
- [50] F. Takahashi, K. Takahashi, K. Maeda, S. Tominaga, and Y. Fukuchi, "Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells," (eng), *IUBMB life*, vol. 49, no. 3, pp. 217–221, 2000.
- [51] J. A. Scott *et al.*, "Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue," (eng), *The American journal of physiology*, vol. 275, no. 6 Pt 2, p. 65, 1998.
- [52] P. K. Petrow *et al.*, "Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts," (eng), *Arthritis and rheumatism*, vol. 43, no. 7, pp. 1597–1605, 2000.
- [53] M. G. Attur *et al.*, "Osteopontin: an intrinsic inhibitor of inflammation in cartilage," (eng), *Arthritis and rheumatism*, vol. 44, no. 3, pp. 578–584, 2001.

- [54] G. Karpinsky *et al.*, “Osteopontin: Its potential role in cancer of children and young adults,” (eng), *Biomarkers in medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 389–402, 2017.
- [55] B. Polat *et al.*, “Perioperative changes in osteopontin and TGFβ1 plasma levels and their prognostic impact for radiotherapy in head and neck cancer,” (eng), *BMC cancer*, vol. 17, no. 1, p. 6, 2017.
- [56] G. Wohlleben *et al.*, “Hypoxia induces differential expression patterns of osteopontin and CD44 in colorectal carcinoma,” (eng), *Oncology reports*, vol. 39, no. 1, pp. 442–448, 2018.
- [57] F. Lumachi, F. Marino, R. Orlando, G. B. Chiara, and S. M. M. Basso, “Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer,” (eng), *Anticancer research*, vol. 32, no. 3, pp. 985–988, 2012.
- [58] D. Agrawal *et al.*, “Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling,” (eng), *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 94, no. 7, pp. 513–521, 2002.
- [59] L. Ng *et al.*, “Post-operative plasma osteopontin predicts distant metastasis in human colorectal cancer,” (eng), *PloS one*, vol. 10, no. 5, pp. e0126219, 2015.
- [60] R.-H. Huang *et al.*, “Osteopontin Promotes Cell Migration and Invasion, and Inhibits Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer by activating the p38 MAPK Signaling Pathway,” (eng), *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 41, no. 5, pp. 1851–1864, 2017.
- [61] A. Kamal *et al.*, “Association of Osteopontin Gene Polymorphisms with Colorectal Cancer,” (eng), *Cancer investigation*, vol. 35, no. 2, pp. 71–77, 2017.
- [62] F. A. Spring *et al.*, “The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene,” (eng), *Immunology*, vol. 64, no. 1, pp. 37–43, 1988.
- [63] R. L. Idzerda *et al.*, “Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium,” (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 12, pp. 4659–4663, 1989.
- [64] N. Toyama-Sorimachi and M. Miyasaka, “A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan,” (eng), *International immunology*, vol. 6, no. 4, pp. 655–660, 1994.
- [65] S. Ishii *et al.*, “CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen,” (eng), *Surgical oncology*, vol. 2, no. 4, pp. 255–264, 1993.
- [66] S. Jalkanen and M. Jalkanen, “Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin,” (eng), *The Journal of cell biology*, vol. 116, no. 3, pp. 817–825, 1992.

- [67] S. Goodison, V. Urquidi, and D. Tarin, "CD44 cell adhesion molecules," (eng), *Molecular pathology : MP*, vol. 52, no. 4, pp. 189–196, 1999.
- [68] A. M. Alho and C. B. Underhill, "The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells," (eng), *The Journal of cell biology*, vol. 108, no. 4, pp. 1557–1565, 1989.
- [69] G. Cao *et al.*, "Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis," (eng), *The American journal of pathology*, vol. 169, no. 1, pp. 325–336, 2006.
- [70] M. Jain *et al.*, "Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury," (eng), *The Journal of clinical investigation*, vol. 97, no. 3, pp. 596–603, 1996.
- [71] L. Sherman *et al.*, "The CD44 proteins in embryonic development and in cancer," (eng), *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 213 (Pt 1), pp. 249–269, 1996.
- [72] M. Culty, H. A. Nguyen, and C. B. Underhill, "The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan," (eng), *The Journal of cell biology*, vol. 116, no. 4, pp. 1055–1062, 1992.
- [73] P. Estess, H. C. DeGrendele, V. Pascual, and M. H. Siegelman, "Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity," (eng), *The Journal of clinical investigation*, vol. 102, no. 6, pp. 1173–1182, 1998.
- [74] J. M. Weiss, "An Essential Role for CD44 Variant Isoforms in Epidermal Langerhans Cell and Blood Dendritic Cell Function," *The Journal of cell biology*, vol. 137, no. 5, pp. 1137–1147, 1997.
- [75] V. J. Wielenga *et al.*, "Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway," (eng), *The American journal of pathology*, vol. 154, no. 2, pp. 515–523, 1999.
- [76] J. Hao *et al.*, "Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression," (eng), *British journal of cancer*, vol. 103, no. 7, pp. 1008–1018, 2010.
- [77] M. Z. Ratajczak, "Cancer stem cells--normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side"," (eng), *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, vol. 43, no. 4, pp. 175–181, 2005.
- [78] A. L. Allan, S. A. Vantyghem, A. B. Tuck, and A. F. Chambers, "Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis," (eng), *Breast disease*, vol. 26, pp. 87–98, 2006.
- [79] I. Morath, T. N. Hartmann, and V. Orian-Rousseau, "CD44: More than a mere stem cell marker," (eng), *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 81, no. Pt A, pp. 166–173, 2016.
- [80] Y. J. Guo *et al.*, "Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer," (eng), *Cancer research*, vol. 54, no. 2, pp. 422–426, 1994.

- [81] T. Nagata *et al.*, “Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer,” (eng), *Anticancer research*, vol. 31, no. 2, pp. 495–500, 2011.
- [82] N. Yamane, S. Tsujitani, M. Makino, M. Maeta, and N. Kaibara, “Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer,” (eng), *Oncology*, vol. 56, no. 3, pp. 232–238, 1999.
- [83] A. Yamaguchi *et al.*, “Clinical significance of serum levels of CD44 variant exons 8-10 protein in colorectal cancer,” (eng), *Journal of gastroenterology*, vol. 33, no. 3, pp. 349–353, 1998.
- [84] Z. Amirghofran *et al.*, “Evaluation of CD44 and CD44v6 in colorectal carcinoma patients: soluble forms in relation to tumor tissue expression and metastasis,” (eng), *Journal of gastrointestinal cancer*, vol. 39, no. 1-4, pp. 73–78, 2008.
- [85] B. Zalewski, “Levels of v5 and v6 CD44 splice variants in serum of patients with colorectal cancer are not correlated with pT stage, histopathological grade of malignancy and clinical features,” (eng), *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 10, no. 4, pp. 583–585, 2004.
- [86] D. Masson *et al.*, “Soluble CD44: quantification and molecular repartition in plasma of patients with colorectal cancer,” (eng), *British journal of cancer*, vol. 80, no. 12, pp. 1995–2000, 1999.
- [87] S. Weg-Remers *et al.*, “Soluble CD44 and CD44v6 serum levels in patients with colorectal cancer are independent of tumor stage and tissue expression of CD44v6,” (eng), *The American journal of gastroenterology*, vol. 93, no. 5, pp. 790–794, 1998.
- [88] R. B. Irby, S. M. McCarthy, and T. J. Yeatman, “Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression,” (eng), *Clinical & experimental metastasis*, vol. 21, no. 6, pp. 515–523, 2004.
- [89] S. H. Loosen *et al.*, “Elevated levels of circulating osteopontin are associated with a poor survival after resection of cholangiocarcinoma,” (eng), *Journal of hepatology*, vol. 67, no. 4, pp. 749–757, 2017.
- [90] A. Psyrri *et al.*, “Association of osteopontin with specific prognostic factors and survival in adjuvant breast cancer trials of the Hellenic Cooperative Oncology Group,” (eng), *Journal of translational medicine*, vol. 15, no. 1, p. 30, 2017.
- [91] J. P. C. Wong *et al.*, “Clinical and in vitro analysis of Osteopontin as a prognostic indicator and unveil its potential downstream targets in bladder cancer,” (eng), *International journal of biological sciences*, vol. 13, no. 11, pp. 1373–1386, 2017.
- [92] R.-H. Huang *et al.*, “Osteopontin Promotes Cell Migration and Invasion, and Inhibits Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer by activating the p38 MAPK Signaling Pathway,” (eng), *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 41, no. 5, pp. 1851–1864, 2017.

- [93] F. Rohde *et al.*, “Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer,” (eng), *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, vol. 121, no. 8, pp. 1717–1723, 2007.
- [94] J. Huang, C. Pan, H. Hu, S. Zheng, and L. Ding, “Osteopontin-enhanced hepatic metastasis of colorectal cancer cells,” (eng), *PloS one*, vol. 7, no. 10, pp. e47901, 2012.
- [95] R. C. Langan *et al.*, “Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells,” (eng), *Journal of Cancer*, vol. 4, no. 3, pp. 241–250, 2013.
- [96] S. Chen *et al.*, “Clinicopathologic significance of putative stem cell marker, CD44 and CD133, in human gastric carcinoma,” (eng), *Journal of surgical oncology*, vol. 107, no. 8, pp. 799–806, 2013.
- [97] J. Shi, Z. Zhou, W. Di, and N. Li, “Correlation of CD44v6 expression with ovarian cancer progression and recurrence,” (eng), *BMC cancer*, vol. 13, p. 182, 2013.
- [98] L. Ng, R. T. P. Poon, and R. Pang, “Biomarkers for predicting future metastasis of human gastrointestinal tumors,” (eng), *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 70, no. 19, pp. 3631–3656, 2013.
- [99] P. Kapur, “Tailoring treatment of rectal adenocarcinoma: immunohistochemistry for predictive biomarkers,” (eng), *Anti-cancer drugs*, vol. 22, no. 4, pp. 362–370, 2011.
- [100] B. J. Wilson *et al.*, “ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients,” (eng), *Cancer research*, vol. 71, no. 15, pp. 5307–5316, 2011.
- [101] D. Horst *et al.*, “The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer,” (eng), *The Journal of pathology*, vol. 219, no. 4, pp. 427–434, 2009.
- [102] T. Sprenger *et al.*, “Enrichment of CD133-expressing cells in rectal cancers treated with preoperative radiochemotherapy is an independent marker for metastasis and survival,” (eng), *Cancer*, vol. 119, no. 1, pp. 26–35, 2013.
- [103] D. Horst, L. Kriegl, J. Engel, T. Kirchner, and A. Jung, “CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer,” (eng), *British journal of cancer*, vol. 99, no. 8, pp. 1285–1289, 2008.
- [104] M. Bandopadhyay *et al.*, “Osteopontin as a therapeutic target for cancer,” (eng), *Expert opinion on therapeutic targets*, vol. 18, no. 8, pp. 883–895, 2014.

11) Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Bülent Polat. Nur durch seine permanente Betreuung, Hilfe und Unterstützung ist das Erstellen dieser Arbeit erst möglich gewesen.

Ebenso gilt besonderer Dank an Frau Dr. Gisela Wohlleben für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellungen bei der Labor Arbeit.

Danke auch an Frau Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova aus dem Strahlenlabor und an das gesamte Laborteam für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Flentje für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie danken.

12) Lebenslauf

Ausbildung:

07/2019 – 2022	Arzt in Weiterbildung in der Kinder- und Jugendarztpraxis Dr. Gabriele Lieb, Würzburg
10/2015 – 06/2019	Arzt in Weiterbildung an der Kinderklinik im Klinikum Würzburg Mitte / Kinderklinik Missionsärztliche Klinik Würzburg
10/2008 – 05/2015	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2007 – 09/2008	Gesundheits- u. Krankenpfleger, Intensivstation, Klinik Schillerhöhe in Gerlingen - Zentrum für Thoraxchirurgie und Pneumologie
10/2004 – 09/2007	Ausbildung zum Gesundheits- u. Krankenpfleger, Klinikverbund Südwest in Leonberg/Böblingen
10/2003 – 07/2004	Zivildienst an der Schule für körperbehinderte Kinder und Jugendliche in Sindelfingen
08/1994 – 06/2003	Johannes-Kepler-Gymnasium in Weil der Stadt