

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Michael Flentje

**Evaluierung prognostischer und prädiktiver Biomarker
beim neoadjuvant vorbehandelten Rektumkarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Theresa Dalkmann

aus Coesfeld

Würzburg, Mai 2022



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

Korreferent: Prof. Dr. med. Armin Wiegering

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2024

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Kolorektale und das Rektumkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren	2
1.1.3	Screening	3
1.1.4	Klinisches Bild, Diagnostik und Staging.....	3
1.1.5	Metastasierung	4
1.1.6	Tumorstadien und Pathologie.....	4
1.1.7	Therapie	6
1.1.8	Nachsorge	9
1.2	Osteopontin.....	10
1.3	c-Met und HGF.....	13
2	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Ethikvotum	18
3.2	Studienaufbau	18
3.3	ELISA.....	19
3.3.1	Osteopontin-ELISA.....	20
3.3.2	c-MET-ELISA.....	21
3.3.3	HGF-ELISA.....	22
3.4	Klinische Parameter	23
3.5	Statistik.....	25
4	Ergebnisse	26

4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	26
4.2	Quantitative Bestimmung der Biomarker-Konzentrationen.....	29
4.3	Überleben.....	31
4.3.1	Klinisch-pathologische Parameter und Überleben	32
4.3.2	Therapieansprechen und Überleben	38
4.3.3	Verlaufsparemeter und Überleben.....	41
4.3.4	Biomarker und Überleben: Osteopontin als Prognoseparameter .	41
4.4	Osteopontin.....	44
4.4.1	Die Osteopontin-Konzentration ist mit dem Tumorstadium assoziiert 44	
4.4.2	Osteopontin als prädiktiver Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie.....	47
4.4.3	Osteopontin im Verlauf	50
4.5	c-Met.....	53
4.5.1	c-Met und klinisch-pathologische Daten	53
4.5.2	c-Met ist kein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz	54
4.5.3	c-Met im Verlauf.....	54
4.6	Hepatocyte Growth Factor (HGF)	56
4.6.1	HGF und klinisch-pathologische Daten.....	56
4.6.2	HGF ist kein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz.	57
4.6.3	HGF und Verlaufsparemeter.....	57
4.7	Korrelationen zwischen den Biomarkern	57
5	Diskussion	59
5.1	Überleben.....	59
5.1.1	Osteopontin als Prognosemarker für das Langzeitüberleben	59

5.1.2	c-Met und HGF: Prognosemarker für das Überleben?	62
5.2	Prädiktive Biomarker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom	65
5.2.1	Klinische Endpunkte zur Evaluierung prädiktiver Marker für das Therapieansprechen	66
5.2.2	Osteopontin als Prädiktor für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz	67
5.2.3	c-Met und HGF: prädiktive Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie?.....	70
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	74
I	Abkürzungsverzeichnis	83
II	Abbildungsverzeichnis	85
III	Tabellenverzeichnis.....	87
IV	Danksagung.....	88

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist als dritthäufigster Tumor in Deutschland eine der häufigsten Krebserkrankungen. Bisher erfolgt die Standardtherapie beim Rektumkarzinom in lokal fortgeschrittenen Stadien (UICC-Stadium II und III) als neoadjuvante Radiochemotherapie, gefolgt von einer Tumorresektion und ggf. einer adjuvanten Chemotherapie (Adj. CT). Dabei variiert das Tumoransprechen von einer pathologisch kompletten Remission bis hin zu fehlendem Tumoransprechen oder einer Progression der Erkrankung. Obwohl die Kombination aus präoperativer Radiochemotherapie und Operation die Lokalrezidivrate deutlich verbessern konnte, ist das Auftreten von Fernmetastasen mit bis zu 30 % der Fälle trotz leitliniengerechter und evidenzbasierter Therapie nach wie vor sehr hoch. Auch das Gesamtüberleben scheint durch die neoadjuvante Therapie nicht verlängert zu werden. [1, 2]

Um eine bessere Vorhersage über das Therapieansprechen vor allem der neoadjuvanten Radiochemotherapie (RCT) und über den langfristigen Erkrankungsverlauf betroffener Patienten treffen zu können, werden prognostische Biomarker benötigt. Mithilfe dieser Biomarker könnten Risikopatienten identifiziert werden und eine intensivere Therapie (z.B. im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie) bzw. eine engmaschigere Nachsorge erhalten. Des Weiteren könnten sich durch die Evaluierung prognostischer Biomarker Angriffspunkte für neue Therapien bieten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die potenziellen Biomarker Osteopontin sowie die Rezeptortyrosinkinase c-Met und ihr Substrat *hepatocyte growth factor* (HGF) untersucht.

1.1 Das Kolorektale und das Rektumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist trotz der in Deutschland insgesamt rückläufigen Inzidenz der letzten 15 Jahre eine der häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Mit 13,3 % ist es in Deutschland bei Männern der dritthäufigste maligne Tumor, bei Frauen mit 12,3 % der zweithäufigste. Bei ca. 61.000 Neuerkrankungen pro Jahr erkrankten im Jahr 2014 etwa 33.100 Männer und 27.900 Frauen. Über 50 % der Neuerkrankungen treten mit mehr als 70 Jahren auf. Bei Frauen liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 75 Jahren, bei Männern bei 72 Jahren. Vor dem 55. Lebensjahr treten hingegen nur etwa 10 % der

Neuerkrankungen auf. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 60 %. Etwa ein Drittel der kolorektalen Karzinome befindet sich im Rektum. Dabei liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate etwa zwei Prozentpunkte niedriger als beim Kolonkarzinom. [3, 4]

1.1.2 Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren

Das kolorektale Karzinom entsteht zu über 90 % aus adenomatösen Polypen, von denen etwa zwei Drittel im Rektosigmoid lokalisiert sind. Diese Adenome entsprechen prä malignen Veränderungen, die im Rahmen der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz in invasive Karzinome übergehen können. Die Adenom-Karzinom-Sequenz umfasst eine Reihe molekulargenetischer Veränderungen, die einen mehrschrittigen Prozess der Karzinomentstehung beinhalten. Dazu gehören u.a. Punktmutationen im KRAS-Protoonkogen, Mutationen im APC-Gen und Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens (TP53). [5, 6]

Ein weiterer Teil der Karzinome entsteht durch die sogenannte serratierte Karzinogenese. Hierbei entwickeln sich einerseits Karzinome aus traditionellen serratierten Adenomen, bei welchen die Onkogenese ebenfalls über KRAS, das APC-Gen oder TP53 vermittelt wird. Diese gehen mit einer Mikrosatellitenstabilität oder einer niedrigen Mikrosatelliteninstabilität einher. Andererseits stellen sessile serratierte Adenome, die mit Mutationen im BRAF-Gen einhergehen, Vorläuferläsionen dar, bei denen durch epigenetische Promotor-(CpG)-Methylierungen und Genausfälle eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität entsteht. [7]

Nur etwa 5 % der Neuerkrankungen treten hereditär auf. Dabei unterscheidet man die seltenen Polyposissyndrome von häufigeren nicht polypösen Tumorsyndromen. Zu den Polyposissyndromen gehören u.a. die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) sowie die MYH-assoziierte Polyposis. Die FAP ist gekennzeichnet durch das Auftreten zahlreicher adenomatöser Polypen im Dickdarm und geht u.a. mit einem Verlust des APC-Gens einher. Bei der MYH-assoziierten Polyposis liegt eine Mutation des MUT4H-Gens vor. Beide Syndrome werden autosomal-dominant vererbt. Die häufigste Form der nicht polypösen Tumorsyndrome ist das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom (HNPCC). Es geht mit Keimbahnmutationen verschiedener Gene wie MSH2 und MLH1 einher, was zu einer Mikrosatelliteninstabilität führt. Auch das HNPCC wird autosomal-dominant vererbt. [8]

Wichtige Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms sind neben Alkohol- und Nikotinkonsum Adipositas und eine geringe körperliche Aktivität [9-12]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen einem hohen Konsum von rotem

Fleisch und dem Auftreten eines kolorektalen Karzinoms besteht [13]. Weiter zeigt sich eine erhöhte Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bei Patienten mit positiver Familienanamnese und bei Patienten mit lange bestehenden chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa [14, 15].

1.1.3 Screening

Zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms sind Vorsorgeuntersuchungen ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. Diese sollte zunächst jährlich eine digital rektale Untersuchung sowie einen immunologischen Stuhltest auf okkultes Blut umfassen. Ab dem 55. Lebensjahr wird eine komplette Koloskopie – ggf. mit Abtragung von Adenomen – empfohlen, die bei unauffälligem Befund alle 10 Jahre wiederholt werden sollte. Falls keine komplette Koloskopie gewünscht wird, kann beim Rektumkarzinom alternativ eine Kombination aus dem jährlichen Stuhltest auf okkultes Blut und einer Sigmoidoskopie alle 5 Jahre durchgeführt werden. Falls auch die Sigmoidoskopie abgelehnt wird, sollte jährlich der Stuhltest auf okkultes Blut erfolgen. [4, 16]

Bei Risikopatienten sollte die Screening-Vorsorgeuntersuchung engmaschiger durchgeführt werden. Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom oder Adenom sollten bereits 10 Jahre vor Erkrankungsalter des Indexpatienten die erste Koloskopie erhalten, spätestens aber mit 45-55 Jahren. Bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit kolorektalem Karzinom und Mikrosatellitenstabilität sollte eine Koloskopie alle 3-5 Jahre durchgeführt werden. Liegen Hinweise auf genetische Mutationen wie das HNPCC vor, sollten die regelmäßigen Untersuchungen bereits ab dem 25. Lebensjahr erfolgen. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa sollte die erste komplette Koloskopie spätestens 8 Jahre nach Erkrankungsbeginn durchgeführt werden und dann regelmäßig im Abstand von 1-2 Jahren erfolgen. [16]

1.1.4 Klinisches Bild, Diagnostik und Staging

Das kolorektale Karzinom verursacht kaum Frühsymptome. Erste Hinweise können Blut im Stuhl, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten oder -konsistenz sowie abdominelle Schmerzen sein. Zudem treten Allgemeinsymptome wie ungewollte Gewichtsabnahme und Leistungsschwäche auf [17]. Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Karzinoms wird zunächst eine komplette Koloskopie inklusive Biopsien durchgeführt. Nach histopathologischer Untersuchung folgt bei Vorliegen einer malignen Erkrankung das Staging. Dazu gehören beim Rektumkarzinom Untersuchungen sowohl zur Einschätzung des Lokalbefundes als auch zur Abklärung des Vorliegens von

Fernmetastasen. So wird eine starre Rektoskopie zur genauen Evaluierung des Abstands des Tumorunterrandes zur Linea anocutanea durchgeführt, wonach die erste Einteilung des Tumors erfolgt. Zudem werden eine rektale Endosonographie und eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Beckens zur Einschätzung der Tumordinfiltrationstiefe und des Lymphknotenstatus durchgeführt. In der MRT wird zusätzlich der zirkumferentielle Abstand zur mesorektalen Faszia angegeben (CRM). Zur Abklärung möglicher Fernmetastasen wird eine Abdomensonographie in Kombination mit einem Röntgen-Thorax durchgeführt. Bei unklarem Befund oder Verdacht auf Fernmetastasen bzw. Infiltration von Nachbarorganen sollte im Anschluss eine Computertomographie (CT) des Abdomens und des Beckens bzw. des Thorax erfolgen. [16]

1.1.5 Metastasierung

Die Metastasierung beim Rektumkarzinom erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen, wobei die Wege je nach Lokalisation des Karzinoms variieren. Die oberen Rektumkarzinome metastasieren lymphogen v.a. in die paraaortalen Lymphknoten und hämatogen über die Vena porta in die Leber. Karzinome des mittleren Drittels metastasieren lymphogen ebenfalls in die paraaortalen Lymphknoten und zusätzlich in die Beckenwand. Die hämatogene Metastasierung erfolgt einerseits über die Vena porta in die Leber und andererseits über die Vena cava in die Lunge. Die unteren Rektumkarzinome hingegen metastasieren lymphogen in die paraaortalen Lymphknoten, die Beckenwand und teils in die inguinalen Lymphknoten und hämatogen über die Vena cava in die Lunge. In einigen Fällen kommt zudem die Metastasierung per continuitatem in umgebendes Binde- und Fettgewebe oder Nachbarorgane vor. [17]

1.1.6 Tumorstadien und Pathologie

Das Rektumkarzinom wird zunächst nach der Lokalisation eingeteilt. So unterscheidet man nach der *Union for International Cancer Control* (UICC) je nach Entfernung des distalen Randes des Tumors von der Anokutanlinie ein Rektumkarzinom des oberen (12 - 16 cm), mittleren (6 - 12 cm) und unteren (< 6 cm) Drittels.

Die weitere Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation. Dabei erfolgt zunächst die prätherapeutische Einteilung anhand von klinisch erhobenen Daten, die sogenannte **cTNM** Klassifikation. Die histopathologische Stadieneinteilung (**pTNM**) erfolgt dann postoperativ nach der Resektion des Primärtumors. T steht jeweils für die Tiefe der Tumordinfiltration, N repräsentiert die Lymphknotenmetastasierung und M das Vorliegen von Fernmetastasen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Klassifikation des Rektumkarzinoms nach UICC Stadieneinteilung, 7. Auflage.

LK = Lymphknoten; N = Anzahl befallener Lymphknoten; M = Vorliegen von Fernmetastasen; T = Tumordinfiltrationstiefe; Tis = Tumor in situ; UICC: Union for International Cancer Control.

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1 T2	N0	M0
II A	T3a (< 1 mm) T3b (1 - 5 mm) T3c (5 - 15 mm) T3d (> 15 mm)	N0	M0
II B	T4	N0	M0
III A	T1 T2	N1 (1 - 3 LK)	M0
III B	T3 T4	N1 (1 - 3 LK)	M0
III C	alle T	N2 (≥ 4)	M0
IV A	alle T	alle N	M1 (in einem Organ)
IV B	alle T	alle N	M1 (in mehreren Organen)

Für die genaue Einschätzung des N-Stadiums ist die Resektion und pathologische Untersuchung von mindestens zwölf Lymphknoten erforderlich. Zur genauen Risikoeinschätzung ist die zusätzliche Erhebung wichtiger pathologischer Faktoren, meist anhand des resezierten Karzinoms, erforderlich. Ergänzend gibt der Pathologe an, ob eine Infiltration von Lymphgefäßen (L0/L1), von Blutgefäßen (V0/V1) oder der Perineuralscheide (Pn0/Pn1) vorliegt. Zudem wird das Grading bestimmt, das den Differenzierungsgrad des jeweiligen Tumors in vier Grade einteilt, je nachdem wie stark sich das Tumorgewebe vom normalen Organgewebe abgrenzt (G1: hochdifferenzierter Tumor; G2: mäßig differenzierter Tumor; G3: schlecht differenzierter Tumor; G4: undifferenzierter Tumor). Von großer Bedeutung ist ebenfalls die sogenannte R-Klassifikation, die angibt, ob der Tumor vollständig reseziert werden konnte bzw. ob ein Residualtumor postoperativ nachgewiesen werden kann (R0: kein Residualtumor; R1: mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor; R2: makroskopisch sichtbarer Residualtumor). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Frage nach dem zirkumferentiellen Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie (CRM). Beträgt dieser mehr als 1 mm, gilt

der Befund als CRM-negativ (CRM-). Ist der Abstand zur mesorektalen Faszie kleiner als 1 mm, gilt der Befund als CRM-positiv (CRM+). Dies wird präoperativ mittels MRT untersucht bzw. postoperativ im pathologischen Präparat. Des Weiteren wird die Qualität der mesorektalen Exzision postoperativ nach der sogenannten M.E.R.C.U.R.Y.-Klassifikation in die drei Grade gut, mittel und schlecht eingeteilt.

Nach einer neoadjuvanten Radiochemotherapie erfolgt eine pathologische Untersuchung des Rückgangs von Tumorzellen im Operationspräparat, die sogenannte Tumorregression, um das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie einschätzen zu können (TRG, engl. *tumor regression grading*). Für die Tumorregression gibt es verschiedene Klassifikationssysteme; in dieser Arbeit wurde eine initial von Dworak et al. beschriebene Einteilung verwendet [18]. Dabei wird die Tumorregression in fünf Grade unterteilt, zwischen TRG 0 mit keiner nachweisbaren Regression bis TRG 4 mit vollständiger Tumorregression. Dazwischen liegen TRG 1 mit einer Dominanz der Tumorzellen und wenig Fibrose, TRG 2 mit Dominanz der Fibrose und noch einigen Tumorzellen und TRG 3 mit Dominanz der Fibrose und spärlichen Tumorzellen [18, 19]. Laut Fokas et al. lässt sich die Tumorregression als Prognosefaktor für den klinischen Verlauf verwenden, insbesondere für das Auftreten von Fernmetastasen und das krankheitsfreie Überleben [20, 21]. Dabei wurde eine gruppierte Einteilung der Tumorregressionsgrade vorgenommen, die für diese Arbeit ebenfalls verwendet wurde (TRG 0+1: geringe Regression; TRG 2+3: mittlere Regression; TRG 4: komplette Regression).

Aus Tumorstadium und pathologischen Daten lässt sich ein Risikoprofil für das Auftreten von Lokalrezidiven erstellen. Risikofaktoren sind eine R1-Resektion, ein intraoperativer Tumoreinriss, CRM+, eine unzureichende Qualität der totalen mesorektalen Exzision (TME) nach M.E.R.C.U.R.Y., extranodale Tumorherde im Mesorektum und ein Tumorstadium von pT4, pT3c/d, pN2 bzw. bei Tumoren des unteren Rektumdrittels generell pT3.

1.1.7 Therapie

Die Therapie des Rektumkarzinoms erfolgt abhängig vom UICC Stadium, von der Lokalisation des Tumors und anhand von pathologischen Risikofaktoren für ein Lokalrezidiv. Wichtigste Therapiekomponenten sind die operative Resektion des Tumors, sowie ggf. eine neoadjuvante bzw. adjuvante Therapie, die aus einer Radiotherapie, einer Chemotherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie besteht.

1.1.7.1 UICC Stadium I

Im UICC Stadium I, das T1 und T2 Tumoren beinhaltet, bei denen keine lymphogene oder Fernmetastasierung (N0, M0) vorliegt, besteht die Standardtherapie in der chirurgischen Tumorexzision. Eine neoadjuvante Therapie wird nicht durchgeführt.

Bei pT1 Tumoren mit einem geringen Risiko für ein Rezidiv ist eine lokale chirurgische Tumorexzision im Sinne einer transanalen Vollwandexzision ausreichend. Ein niedriges Rezidivrisiko weisen Tumore auf, die einen Durchmesser von ≤ 3 cm besitzen, eine gute oder mäßige Differenzierung (G1 oder G2) zeigen und keine Lymphknotenmetastasen vorweisen (N0). Zudem muss eine komplette Resektion (R0) erfolgt sein. Werden diese Kriterien nicht erfüllt – handelt es sich also um ein pT1-Stadium mit hohem Risiko bzw. um ein pT2-Stadium – wird statt einer rein lokalen Exzision eine radikal chirurgische Tumorexzision durchgeführt. Diese besteht je nach Lokalisation aus der totalen (unteres und mittleres Rektumdrittel) bzw. partiellen (oberes Rektumdrittel) mesorektalen Exzision. Dabei wird je nach Höhe der mesorektale Fettkörper komplett bzw. inkomplett inklusive der darin enthaltenen Lymphknoten (≥ 12 Lymphknoten) entfernt. Wichtigstes Prinzip ist die saubere Präparation in der gefäßarmen Schicht zwischen Fascia pelvis visceralis und parietalis, ohne die mesorektale Faszie zu beschädigen. Die Qualität der mesorektalen Exzision wird im Anschluss pathologisch nach der M.E.R.C.U.R.Y.-Klassifikation eingeteilt (siehe Kapitel 1.1.6.). Im oberen Rektumdrittel sollte ein angemessener Sicherheitsabstand zum distalen makroskopisch sichtbaren Tumorrand mindestens 5 cm betragen. Im unteren bzw. mittleren Drittel reicht bei einem Differenzierungsgrad G1 oder G2 ein Abstand von 1-2 cm aus; bei G3 oder G4 Tumoren sollte der minimale Abstand größer sein. Nach Möglichkeit wird im Rahmen einer anterioren Rektumresektion kontinenserhaltend operiert. Bei sehr tief sitzenden Tumoren wird alternativ eine abdomino-perineale Rektumresektion inklusive einer Resektion des Anus durchgeführt.

Eine adjuvante Therapie wird im UICC Stadium I nur bei Vorliegen von Risikofaktoren für ein Lokalrezidiv durchgeführt. Die adjuvante Therapie soll dann als kombinierte Radiochemotherapie durchgeführt werden. [16]

1.1.7.2 UICC Stadium II und III

Im UICC Stadium II und III umfasst die Standardtherapie die Komponenten Neoadjuvante Therapie, Operative Therapie und ggf. eine adjuvante Therapie. Essenziell ist wie in UICC Stadium I die chirurgische Tumorexzision, die analog den Vorgaben im UICC Stadium I je nach Lokalisation als totale bzw. partielle mesorektale

Exzision erfolgt. Der größte therapeutische Unterschied besteht in der ab Stadium II durchgeführten neoadjuvanten, das heißt präoperativen, Therapie. Diese wird bei Tumoren des unteren sowie des mittleren Drittels generell empfohlen. Ausnahmen stellen ein cT1/2-Stadium mit fraglichem Lymphknotenbefall, sowie ein cT3a/b-Stadium im mittleren Drittel mit fraglicher Infiltration des perirektalen Fettgewebes dar. Bei Tumoren des oberen Rektumdrittels wird eine neoadjuvante Therapie nicht standardmäßig durchgeführt, kann aber bei Risikokonstellationen wie cT4-Stadium oder CRM+ erwogen werden. Die neoadjuvante Therapie erfolgt in der Regel als kombinierte Radiochemotherapie. Die Radiotherapie kann als Kurzzeitbestrahlung von 5 x 5 Gy ablaufen. Dabei muss die Operation entweder innerhalb von zehn Tagen oder vier bis acht Wochen nach Bestrahlung durchgeführt werden. Eine Alternative stellt die konventionell fraktionierte Radiotherapie mit 1,8 – 2 Gy bis 45 – 50 Gy dar, bei der ein Abstand von sechs bis acht Wochen zur Operation eingehalten werden sollte. Die neoadjuvante Chemotherapie kann entweder nach Kurzzeitbestrahlung oder parallel zur fraktionierten Radiotherapie in Woche 1 und 5 verabreicht werden. Dies erfolgt standardgerecht entweder mit einer oralen Gabe von Capecitabine oder einer intravenösen Therapie mit 5-Fluoruracil (5-FU). In zahlreichen Studien wurde ein möglicher Vorteil einer zusätzlichen Gabe von Oxaliplatin untersucht. In einer 2017 erhobenen Meta-Analyse von 8 Studien konnte unter Addition von Oxaliplatin ein höherer Anteil an pathologisch kompletten Remissionen, sowie ein besseres 3-Jahres-Überleben nachgewiesen werden [22]. Jedoch konnte in den meisten Studien kein verbessertes 5-Jahres-Überleben gezeigt werden. Zudem zeigte sich teils eine erhöhte Toxizität. In der deutschen CAO/ARO/AIO-04-Studie konnte ein verlängertes krankheitsfreies sowie Gesamtüberleben bei jüngeren Patienten (< 60 Jahren) unter Hinzunahme von Oxaliplatin gezeigt werden [23]. Insgesamt bleibt die Datenlage jedoch kontrovers, sodass noch keine generelle Empfehlung zur Addition von Oxaliplatin zur neoadjuvanten Therapie gegeben werden kann.

Für die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie wird in UICC-Stadium II und III nach aktueller Leitlinie ebenfalls keine eindeutige Empfehlung gegeben. Jedoch gibt es Studien, wie die ADORE-Studie, sowie die ACRNaCT-Studie, die zeigen, dass bei Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie die Kombination von 5-FU mit Oxaliplatin ein besseres Outcome erzielt, als die alleinige Therapie mit 5-FU [24, 25].

Tumore im oberen Rektumdrittels werden adjuvant analog den Empfehlungen für das kolorektale Karzinom therapiert. [16]

1.1.7.3 UICC Stadium IV

Das UICC Stadium IV ist durch bereits vorhandene Fernmetastasen in einem (IVa) oder mehreren (IVb) Organen gekennzeichnet. In diesem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium erfolgt die Therapie orientiert am Allgemeinzustand des Patienten. Sofern es sich um solitäre Lungen- oder Lebermetastasen handelt, die primär resektabel sind, wird eine kurative Therapie inklusive Tumorresektion und perioperativer Chemotherapie angestrebt, z.B. als FOLFOX-Schema (Folinsäure + 5-FU + Oxaliplatin) für jeweils drei Monate prä- und postoperativ. Erfolgt keine neoadjuvante Therapie, kann eine adjuvante Therapie mit einem Fluoropyrimidin und Oxaliplatin durchgeführt werden. Falls es sich zu Beginn um einzelne, aber nicht resektable Metastasen handelt, kann mithilfe einer systemischen Therapie versucht werden, im Sinne einer sogenannten Konversionstherapie ein Downsizing und nachfolgend eine Resektabilität zu erreichen (z.B. Kombination mit Bevacizumab). Bei Patienten mit multiplen Fernmetastasen wird je nach Allgemeinzustand eine (intensive) Chemotherapie angestrebt. Ist eine intensive Therapie möglich, werden die Kombinationen Fluoropyrimidin (5-FU oder Capecitabin) plus Irinotecan und/oder Oxaliplatin eingesetzt. Zusätzliche Komponente ist im UICC Stadium IV die molekulargenetische Bestimmung von RAS/BRAF-Mutationen. Liegen keine Mutationen vor, kann mit Anti-EGFR-Antikörpern wie Cetuximab oder Panitumumab therapiert werden. Bei Patienten mit RAS-Mutationen kann der Antikörper Bevacizumab verwendet werden. Liegen BRAF-Mutationen vor, scheinen Patienten von der Kombination spezifischer BRAF-Antikörper mit Inhibitoren des MAP-Kinase-Signalwegs wie Trametinib + Dabrafenib oder Cetuximab + Encorafenib ± Binimetinib profitieren zu können [26, 27]. Bei Nichtansprechen kann nach der Erstlinientherapie ein Substanzwechsel von Irinotecan auf Oxaliplatin bzw. umgekehrt versucht werden. Ist eine intensive Chemotherapie nicht möglich, können Substanzen dosisreduziert verabreicht oder eine Monotherapie angestrebt werden. [16]

1.1.8 Nachsorge

Die Nachsorge beim Rektumkarzinom unterscheidet sich je nach Tumorstadium und wird nach abgeschlossener Therapie durchgeführt. Im UICC Stadium I sollte bei R0-Situation möglichst innerhalb von sechs Monaten postoperativ, spätestens aber ein Jahr nach Operation, eine komplette Koloskopie durchgeführt werden. Ist der Befund unauffällig, kann die nächste Untersuchung fünf Jahre später durchgeführt werden. In den UICC-Stadien II und III sollte bei vorliegendem R0-Status eine regelmäßige Nachsorge inklusive symptomorientierter Anamnese, körperlicher Untersuchung und

CEA-Diagnostik über zwei Jahre alle sechs Monate erfolgen. Ggf. kann eine Abdomensonographie zur Diagnostik bei Verdacht auf Lebermetastasen bzw. eine jährliche Röntgen-Untersuchung des Thorax zur Abklärung fraglicher Lungenmetastasen ergänzt werden. Eine komplette Koloskopie sollte spätestens sechs Monate postoperativ und bei unauffälligem Befund fünf Jahre später durchgeführt werden. [16]

1.2 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Protein, das an vielen Schritten der Tumorprogression beteiligt ist. Es gehört zur Familie der small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGS), zu der neben OPN auch bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) und matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) gehören. Diese Proteine sind Teil der extrazellulären Matrix, werden auf Chromosom 4q21-23 codiert und wurden erstmals als Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Knochen und Dentin entdeckt [28, 29]. Dort spielen sie u.a. eine Rolle bei der Biomineralisierung. Zunehmend wurden SIBLINGS auch in anderen Geweben nachgewiesen, wie z.B. in Epithelzellen von metabolisch aktiven Gängen der Speicheldrüsen oder Nieren [30]. Sie wirken vor allem über die Bindung an Integrine bzw. andere Zelloberflächenrezeptoren und stimulieren Prozesse wie Tumorwachstum und Metastasierung u.a. über die Aktivierung von verschiedenen Matrix-Metalloproteasen (MMP). [30, 31]

Osteopontin, auch bekannt als early T-lymphocyte activation (ETA-1) und secreted phosphoprotein 1 (SPP1), wurde initial in den 1980er Jahren von Franzen und Heinegard beschrieben [32] und nach einer seiner wesentlichen Funktionen benannt. So ist es an einer Verbindung zwischen Knochen und Extrazellulärmatrix beteiligt und spielt eine Rolle beim Knochenaufbau und -umbau. Neben der gebundenen Form vor allem in Knochen und Dentin, liegt OPN auch in löslicher Form vor. So kann man Osteopontin u.a. in Milch, Urin und Blutserum nachweisen [30]. Zudem wurde es in Nierenzellen, Gehirnzellen und anderen Epithelzellen gefunden und wird neben Osteozyten u.a. von Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten sezerniert [33]. Neben physiologischen Funktionen wie Knochenaufbau bzw. -umbau spielt OPN eine Rolle bei Inflammation und Immunantwort sowie der Angiogenese [34-36]. Es konnte eine Beteiligung an Gefäßverkalkung und Erkrankungen wie Atherosklerose oder renaler Fibrose gezeigt werden, sowie ein Einfluss auf zahlreiche chronisch entzündliche Erkrankungen wie Lupus oder Rheumatoide Arthritis, u.a. über den Einfluss Osteopontins auf T-

Lymphozyten und Makrophagen [37-40]. Bei akuten Entzündungen fördert OPN u.a. die Rekrutierung von Makrophagen, T-Zellen, dendritischen Zellen und Neutrophilen am Ort der Inflammation sowie die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 [33]. Osteopontin kommt zudem eine wichtige Rolle in der Tumorprogression zu. So nimmt Osteopontin als Protein der Extrazellulärmatrix eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Tumorgewebe und den umgebenden Strukturen ein und beeinflusst eine Reihe von Signalkaskaden, die die Tumorprogression beeinflussen. Dazu gehören Angiogenese, Tumormotilität, Proliferation, Invasion, eine anti-apoptotische Funktion und Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) [36, 41-43].

OPN besteht aus ca. 300 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 44 kDa. Es besitzt mehrere Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen und kann durch posttranslationale Modifikation ein Molekulargewicht von 41 bis 75 kDa erreichen [44]. Zudem kann OPN durch Thrombin und Metalloproteasen an mehreren Stellen geschnitten werden, wodurch weitere Bindungsstellen frei werden. Das N-terminale OPN-Fragment bindet an verschiedene Integrine, v.a. $\alpha\beta 1$ und nach Thrombinspaltung auch $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 8$ und $\alpha 9\beta 1$. Das C-terminale Ende hingegen bindet an CD44v6 und an CD44v3. Es sind drei verschiedene Isoformen Osteopontins bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen und in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurden, OPN-a, OPN-b, OPN-c. Das vollständige Osteopontin, OPN-a enthält 7 Exons; bei OPN-b und OPN-c fehlen Exon 4 bzw. 5 [36, 44].

Osteopontin wirkt wie andere Proteine der SIBLINGS-Familie vor allem über CD44-Rezeptoren und Integrin-Rezeptoren. Die Aktivierung der Integrin-Rezeptoren führt über verschiedene Signalkaskaden u.a. zu einer vermehrten Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP), v.a. MMP-2 und MMP-9, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), sowie zur Aktivierung von Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und Aktivator Protein 1 (AP1) (Abbildung 1). [36]

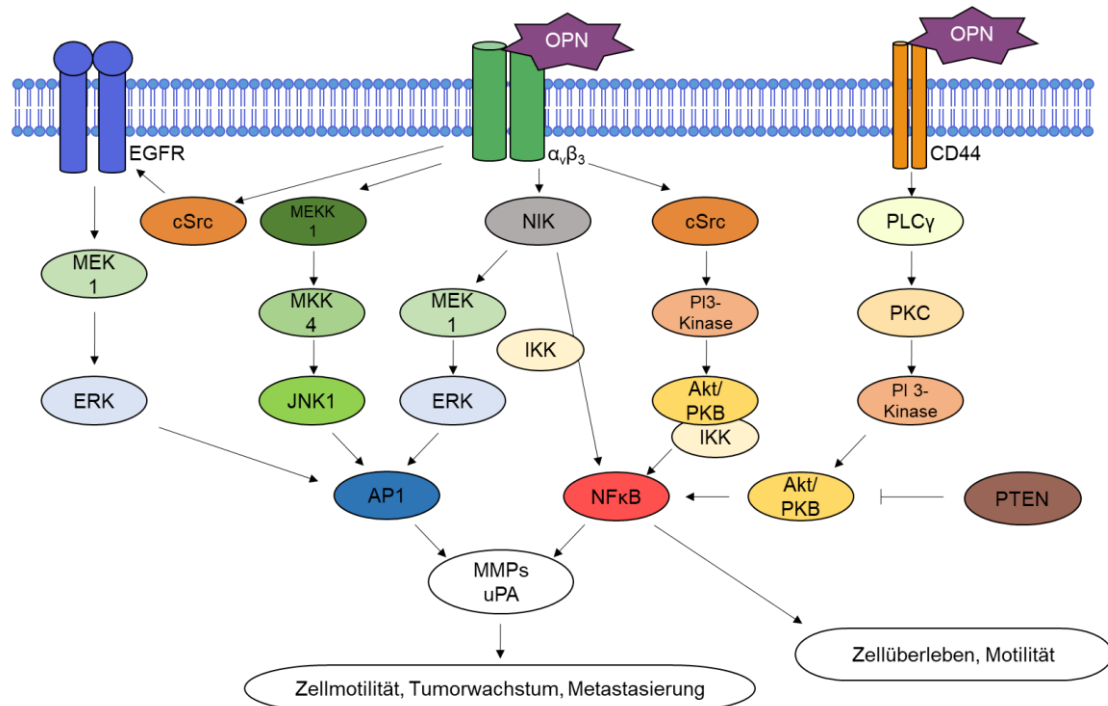


Abbildung 1: Tumorentstehung und -progression über OPN; Signalwege über CD44- und Integrinrezeptoren. Die Bindung von OPN an einen Integrinrezeptor führt über mehrere Signalkaskaden zur erhöhten Expression von MMP und uPA und fördert somit Zellmotilität, Tumorwachstum und Metastasierung. Dies geschieht sowohl über die NIK-abhängige NFκB-Aktivierung als auch über PI3-Kinase und die nachfolgende Aktivierung von Akt/PKB. Der PI3-Kinase-Weg wird einerseits über den Integrinrezeptor und cSRC und andererseits über die Bindung von OPN an CD44 über PLCγ und PKC aktiviert. Akt/PKB begünstigt zudem über eine anti-apoptotische Wirkung das Überleben von Zellen, kann dabei von PTEN inhibiert werden. Der alternative Weg zur Aktivierung von MMPs und uPA ist der MAP-Kinase-Weg. Dieser kann NIK-abhängig oder über die cSRC-abhängige Aktivierung von EGFR über MEK1 und ERK oder über MEKK1 und JNK1 zur Aktivierung von AP1 führen und so die Expression von MMPs und uPA verstärken.

Akt/PKB: Proteinkinase B, AP1: activator protein 1, EGFR: epidermal growth factor receptor, ERK: extracellular-signal regulated kinase, JNK1: c-jun n-terminal kinase, MAP-Kinase: mitogen-activated-protein-kinase, MEK1: MAP2K1, MEKK1: MAP3K1, MMP: Matrix-Metalloproteasen, NFκB: nuclear transcription factor kappa-B, NIK: nuclear factor inducing kinase, OPN: Osteopontin, PI3-Kinase: phosphatidylinositol-3-kinase, PKC: proteinkinase C, PLCγ: phospholipase gamma, PTEN: phosphatase und tensin homolog, uPA: cSRC: Thyrosinkinase SRC, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator. Modifiziert nach Rangaswami, Bulbule und Kundu et al., 2006; Lizenz von Elsevier (Nummer 5304270201263).

Bei verschiedensten Tumorerkrankungen konnte eine Überexpression von Osteopontin nachgewiesen werden. So finden sich erhöhte Werte u.a. bei Brustkrebs, Kopf-Hals-Tumoren, Pankreaskarzinom, Ovar- und Prostatakarzinom, beim Hepatozellulären Karzinom, beim Nicht-kleinzelligen-Lungen-Ca (NSCLC) und bei gastrointestinalen Tumoren [42, 45, 46]. Beim kolorektalen Karzinom konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von OPN gezeigt werden [43, 47, 48]. Viele Studien deuten darauf hin, dass diese Überexpression bei den meisten Tumoren mit einer schlechteren Prognose bezüglich Überleben und Tumorprogression assoziiert ist [48-50]. Beim kolorektalen Karzinom zeigte sich, dass hohe Osteopontinwerte mit Lymphknotenmetastasen, postoperativen Metastasen, venöser Invasion, einem fortgeschrittenen Tumorstadium

und schlechterem Überleben assoziiert sind. Bei einigen der Tumorentitäten wie Brustkrebs [51], Kopf-Hals-Tumoren [46] oder dem NSCLC [50, 52] scheint Osteopontin ein großes Potenzial als Prognosemarker zu besitzen. Dies gilt auch für das kolorektale Karzinom, was von Zhao et al. 2015 in einer Meta-Analyse untersucht [53] und u.a. von Wei et al. 2018 bestätigt wurde [54]. Einige Studien deuten darauf hin, dass Osteopontin ein zusätzlicher Marker für die Strahlenempfindlichkeit eines Tumors sein könnte. Für die Strahlenempfindlichkeit des Tumors ist besonders das Mikromilieu wichtig. Eine entscheidende Rolle kommt dabei der Hypoxie zu, die die Strahlensensibilität des Tumorgewebes verschlechtert [55]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass hypoxische Tumorzellen von Kopf-Hals-Tumoren und beim kolorektalen Karzinom mit hohen Osteopontinspiegeln korrelieren [56, 57] und auch Studien zum Mamma-Karzinom deuten darauf hin, dass die Blockierung von OPN das Ansprechen der Radiotherapie verbessert [58]. Nun stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse auf das Rektumkarzinom übertragbar sind und OPN als prädiktiver Marker für das Ansprechen der Strahlentherapie genutzt werden könnte.

1.3 c-Met und HGF

C-Met (mesenchymale-epitheliale Transition) ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor, der vom MET-Gen codiert wird und auf der Zelloberfläche von Epithelzellen zahlreicher Organe wie Leber, Pankreas oder Niere vorkommt [59]. Zusammen mit seinem Liganden, dem Hepatocyte Growth Factor (HGF) oder scatter factor (SF), ist er an wichtigen Signalwegen sowohl in der Embryogenese als auch im ausgereiften Organismus essenziell beteiligt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass er eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Skelettmuskelvorläuferzellen spielt [60]. Neben vielen physiologischen Funktionen scheinen c-Met und HGF an der Entstehung und dem Progress zahlreicher Tumorerkrankungen beteiligt zu sein [61].

Das MET-Gen wurde erstmalig in den 1980er Jahren entdeckt und als Protoonkogen identifiziert, das für den Tyrosinkinase-Rezeptor c-Met codiert [62]. Der zugehörige Ligand war zu dem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Der c-Met-Rezeptor ist ein über Disulfide verknüpftes Heterodimer, das durch proteolytische Spaltung eines Vorläufers entsteht. In seiner reifen Form besteht c-Met aus zwei Ketten – einer extrazellulären α -Kette und einer β -Kette mit extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Anteilen. Während die α -Kette und der obere Teil der β -Kette als Bindungsstelle für HGF fungieren, ist der intrazelluläre Teil der β -Kette essenziell für die Bindung mehrerer

Proteine und nachfolgende Signalwege. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen von c-Met. C-Met wird u.a. auf Epithelzellen, Endothelzellen und glomerulären mesenchymalen Zellen exprimiert. [61, 63]

Der Ligand, HGF, ist ein pleiotropes Glykoprotein und ähnelt in seiner Struktur der Peptidase Plasminogen [61]. Aufgrund seiner verschiedenen Funktionen wurde zunächst angenommen, dass HGF und SF zwei verschiedene Proteine seien [64, 65]. Weidner et al. zeigten 1991 jedoch, dass es sich um ein einziges Protein handelt [66]. HGF wird als inaktives einkettiges Propeptid sezerniert und zur Aktivierung von Serinproteasen wie HGF-Aktivator und Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) gespalten. Es enthält verschiedene Domänen wie die N-terminale PAN/APPLE-ähnliche Domäne und vier Kringle-Domänen und kann durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen vorliegen [67]. Es ist ein lösliches Protein, kann aber auch an die Extrazellulärmatrix gebunden sein und wird von Fibroblasten, glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen sezerniert [67]. In zahlreichen Pathologien konnte ein erhöhter HGF-Spiegel nachgewiesen werden. So gibt es u.a. bei Leberschäden, Nierenversagen, Myokardinfarkt, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 1 eine Überexpression an HGF, wobei es anscheinend zum Teil eine physiologische protektive Funktion einnimmt [61, 67]. Ebenso zeigt sich eine hohe Konzentration von HGF bei verschiedenen Krebserkrankungen [68], weshalb sich ein Zusammenhang zur Krebsentstehung und Tumorzellinvasion vermuten lässt. HGF induziert die Proliferation und Migration von Epithelzellen und zahlreichen anderen Zelltypen, wie z.B. Hepatozyten, Chondrozyten und Endothelzellen. Während der Embryogenese, der Angiogenese und Gewebereparatur fördert HGF die endotheliale und epitheliale Morphogenese [67]. Dieser Effekt scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung einiger Tumorerkrankungen zu spielen.

Die Bindung von HGF an seinen Rezeptor c-Met führt zur Dimerisierung und Phosphorylierung innerhalb der Rezeptordomänen und bewirkt die Aktivierung zahlreicher Signalwege (Abbildung 2). Dies geschieht bei einigen der Moleküle, wie z.B. GRB2, SHC, SRC und PI3-Kinase, durch direkte Interaktion mit der intrazellulären Bindungsstelle von c-Met. Andere Signalwege werden indirekt über GAB1 aktiviert, das an c-Met bindet und nach Phosphorylierung eine Reihe von Molekülen wie PLC γ , SHC, CRK und PI3-Kinase bindet. Über die verschiedenen Wege aktiviert die Bindung von HGF an seinen Rezeptor onkogene Signalwege wie den RAS-Signalweg, der Proliferation und Morphogenese fördert und den PI3-Kinase-Weg, über den Zellmotilität und Adhäsion unterstützt werden. So werden tumorfördernde Mechanismen für

invasives Wachstum, epithelial-mesenchymale Transition, Zellüberleben, Angiogenese und Metastasierung gefördert. [61, 67] Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression bzw. Gen-Amplifikation von MET und eine erhöhte Sekretion von HGF zu Resistenzen gegen gezielte Therapeutika wie EGFR-Antagonisten führen [68].

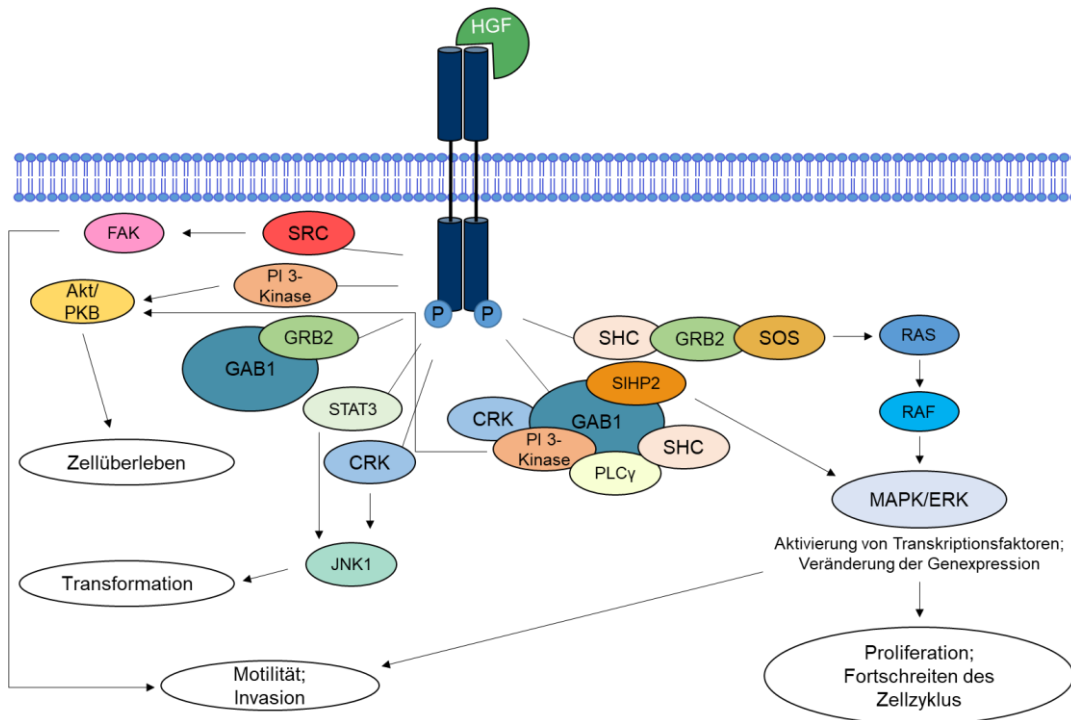


Abbildung 2: HGF und c-Met - Signalwege in der Tumorentstehung. Nach Bindung von HGF an den c-Met-Rezeptor erfolgt die Phosphorylierung der Tyrosindomäne und die Bindung bzw. Aktivierung zahlreicher Mediatoren und Effektoren für nachfolgende Signalwege. Die Bindung von SRC führt über FAK zur Förderung von zellulärer Migration und somit Invasion und Motilität. PI3-Kinase, direkt oder indirekt über GAB1 gebunden wirkt über Akt/PKB antiapoptisch und unterstützt das Zellüberleben. CRK und STAT3 sorgen über JNK1 für Transformation. Über RAS/RAF/MAPK werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Proliferation und Wachstum fördern. Diese Signalwege werden direkt über SHC, GRB2 und SOS aktiviert bzw. indirekt über GAB1 und SHP2 bzw. SHC.

Akt/PKB: Proteinkinase B, CRK: v-crK sarcoma virus CT10 onkogene homolog, FAK: focal adhesion kinase, GAB1: GRB2-binding protein 1, GRB2: growth factor receptor-bound protein 2, JNK1: Januskinase 1, MAPK/ERK: mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase, PI3-Kinase: Phosphatidylinositol 3 kinase, PLCγ: Phospholipase C gamma, RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma, Ras: rat sarcoma viral oncogene homolog, SHC: src-homology 2 domain-containing, SHP2: src homology 2 domain-containing 5'inositol phosphatase 2, SOS: son of sevenless, STAT3: signal transducer and activator of transcription. Modifiziert nach Organ und Tsao et al., 2011 (Keine Lizenz erforderlich bei der Verwendung von bis zu 3 Schaubildern).

Eine Überexpression von c-Met bzw. HGF oder eine vermehrte Gen-Amplifikation von MET wurde bei einer Vielzahl von Tumorentitäten gefunden. Dazu gehören das Mammakarzinom [69], das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom [70], das Prostatakarzinom [71], das maligne Melanom [72] und das kolorektale Karzinom [73]. Bei den meisten dieser Tumore waren hohe Spiegel an HGF bzw. c-Met mit einem

schlechteren Outcome assoziiert. So gibt es eine Assoziation zwischen hohen Werten der Proteine und einer Krankheitsprogression, der Entwicklung von Metastasen, einem schlechteren Therapieansprechen und einem verkürzten Gesamtüberleben [68]. Daher bieten c-Met und HGF ein großes Potenzial, als prognostische Biomarker eingesetzt werden zu können und bereits jetzt gibt es zahlreiche Ansätze für gezielte Therapiestrategien [59, 74, 75]. Am besten untersucht ist c-Met beim Lungenkarzinom, bei dem in den letzten Jahren einige gezielte Therapiestrategien getestet wurden. Eine häufige Genmutation, die unter anderem beim NSCLC auftritt, ist eine Änderung im Splicing von MET Exon 14 [76, 77]. Dabei kann es z.B. durch verschiedene Mutationen in benachbarten Sequenzen zu einer Veränderung oder einem Verlust des Exons kommen. Exon 14 codiert Informationen für die Bindungsstelle Y1003, an die die CBL-Ubiquitin-Ligase bindet. Veränderungen darin führen zu einem verringerten Abbau c-Mets und somit zu einer erhöhten Signalaktivität des Rezeptors, was das onkogene Potential fördert. Das Exon 14 Skipping kommt zwar nur in ca. 4 % der Fälle mit NSCLC vor, aber es zeigte sich ein therapeutisches Potential. Bereits 2015 untersuchten Paik et al. in einer kleinen Studie mit acht Patienten mit fortgeschrittenem Lungen-Adenokarzinom und einer Veränderung in MET Exon 14 die Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren Crizotinib und Cabozantinib [78], die sich insgesamt als vielversprechend zeigte.

Ob diese Ergebnisse auch auf das Rektumkarzinom übertragbar sind und sich mithilfe von HGF und c-Met eine prognostische Aussage bezüglich des Rektumkarzinoms treffen lässt bzw. ob sie als prädiktive Marker für das Therapieansprechen der Radiochemotherapie verwendet werden können, soll im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das kolorektale Karzinom ist als dritthäufigster Tumor in Deutschland eine der häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Im lokal fortgeschrittenen UICC-Stadium II und III variiert das Tumoransprechen trotz leitliniengerechter Standardtherapie von einer pathologisch kompletten Remission bis hin zu einer fehlenden Reaktion. Mithilfe der neoadjuvanten Radio-Chemotherapie, gefolgt von einer Tumorresektion konnte zwar die Lokalrezidivrate deutlich gesenkt werden, das Auftreten von Fernmetastasen bleibt mit einer Rate von bis zu 30 % allerdings nach wie vor hoch. Auch die langfristige Prognose scheint durch die neoadjuvante Therapie nicht verbessert worden zu sein [1, 2, 79]. Dies zeigt, dass prognostische Biomarker dringend benötigt werden, um eine bessere Vorhersage über das Ansprechen bzw. das Nicht-Ansprechen vor allem der neoadjuvanten Radiochemotherapie und über die langfristige Prognose treffen zu können.

Untersucht wurde der Einfluss von Osteopontin, c-Met und HGF. Diese drei potenziellen Biomarker begünstigen über verschiedene Signalwege u.a. Tumorprogression und Metastasierung. Zudem wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt, dass eine Überexpression dieser Proteine bei den meisten Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist und somit ein prognostischer Wert besteht [49, 50, 80]. In einigen Projekten wurde außerdem gezeigt, dass OPN, c-Met und HGF mit Bedingungen korrelieren, die zu einem schlechteren Ansprechen auf die Radiotherapie führen können [58, 68, 71]. Die bereits berichtete Assoziation zu Tumorstadium, Metastasierung und Überleben soll nun in dieser Arbeit überprüft und weitergehend untersucht werden, ob sich mithilfe dieser Marker ebenfalls eine Aussage über das Therapieansprechen der Neoadjuvanz treffen lässt. In Zukunft sollen auf diese Weise Risikopatienten leichter und schneller identifiziert werden, damit diese frühzeitig eine intensiviertere oder additive Therapie bzw. eine engmaschigere Nachsorge erhalten können. Zudem ergeben sich durch die Evaluierung neuer Biomarker ggf. neue Therapiestrategien, die gezielt z.B. im Rahmen von blockierenden Antikörpern gegen die Marker gerichtet sein könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Aktenzeichen 144/13).

3.2 Studienaufbau

Die hier vorliegende Dissertation ist Teil der NeoRec-Studie, einer prospektiven monozentrischen Studie der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Würzburg. Die Patienten willigten nach ausführlicher Aufklärung in die Nutzung ihrer Daten ein. In die Studie wurden Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom eingeschlossen, für deren Behandlung eine neoadjuvante Radiochemotherapie geplant war.

Im Rahmen der Studie erfolgte bei den rekrutierten Patienten eine Blutentnahme von ca. 10ml Serum-EDTA zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie. Die erste Probe diente der Bestimmung der Ausgangswerte der jeweiligen Biomarker und wurde vor Beginn der fünfwöchigen neoadjuvanten Radiochemotherapie abgenommen (Probe A). Am Ende der neoadjuvanten Therapie erfolgte die zweite Blutentnahme und eine weitere direkt vor der Operation (Proben B und C). Im Anschluss wurde vor und nach der Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie jeweils eine Blutprobe entnommen (Proben D und E). Nach Abschluss der Therapie erfolgten weitere Blutentnahmen im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen. Probe F entspricht dabei der Abnahme nach einem Jahr, Probe G der Untersuchung nach zwei Jahren und Probe H der Entnahme nach drei Jahren. Der genaue Studienablauf ist in Abbildung 3 dargestellt. Die entnommenen Blutproben wurden mittels EDTA antikoaguliert und im Anschluss zentrifugiert (4000 rpm). Das Plasma wurde abgetrennt und portioniert bis zur Wiederverwertung bei -80 °C gelagert. Die eingelagerten Blutproben wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Konzentrationen im Blut von Osteopontin, c-Met und HGF zu bestimmen.

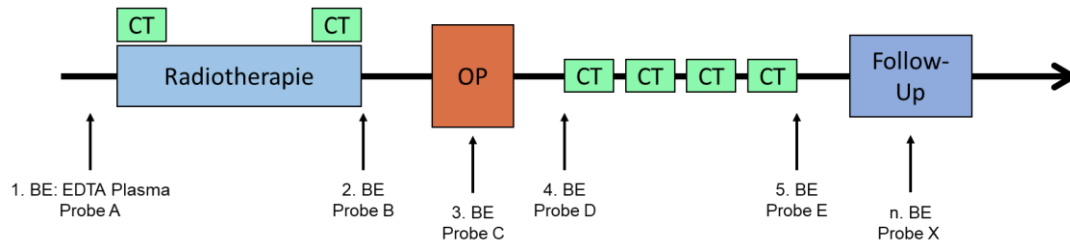


Abbildung 3: Ablauf der Studie. Die Blutentnahme erfolgte im Laufe der Therapie zu verschiedenen Zeitpunkten: Vor und nach neoadjuvanter Radiochemotherapie (Probe A bzw. B), vor der Operation (Probe C), vor und nach der adjuvanten Chemotherapie (Proben D und E) und nach Therapieende im Laufe der Nachsorgeuntersuchungen (Probe X). CT: Chemotherapie, OP: Operation.

3.3 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA, kann u.a. als quantitatives Verfahren verwendet werden, um indirekt Antigenkonzentrationen zu bestimmen. Dabei wird ein Produkt, das durch den enzymatischen Umsatz eines Substrats entsteht, über eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion läuft auf Basis eines Antikörpers ab. Das bedeutet, dass ein Antikörper das nachzuweisende Antigen bindet. Dieser Antikörper wird zunächst mit dem Enzym markiert, das die anschließende Reaktion katalysiert. Das entstandene Produkt wird in der Regel mittels Farbumschlag photometrisch nachgewiesen. Dabei hängt die Konzentration des Produkts direkt von der Konzentration des zu bestimmenden Antigens ab. Mit steigender Konzentration des Antigens können mehr Enzym-gekoppelte-Antikörper binden. Die Reaktion läuft häufiger ab und mehr Substrat wird zum Produkt umgesetzt. Mit steigender Konzentration des Produkts steigt die Intensität der Farbe, was Rückschlüsse auf die Antigenkonzentration ermöglicht. Die Messung erfolgt photometrisch anhand einer Vergleichsprobe (Standardreihe) mit bekannten Antigenkonzentrationen. In unserem Versuch wurde eine der häufigsten Varianten, der Sandwich-ELISA, verwendet. Beim Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die jeweils spezifisch das nachzuweisende Antigen an verschiedenen Stellen binden, sodass es sich zwischen den beiden Antikörpern befindet. Der primäre Antikörper (engl. Coating Antibody) befindet sich in der Regel fest an eine Mikrotiterplatte (hier 96 wells) gebunden. Nach dem Zugabe der Probe mit dem nachzuweisenden Antigen erfolgt die Inkubation der Platte für einen vorgegebenen Zeitraum. Anschließend wird diese gewaschen, sodass die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt werden und nur der Antigen-Antikörper-Komplex zurückbleibt. Nun gibt es zwei Möglichkeiten: Es kann entweder ein sekundärer, mit dem Enzym markierter Antikörper (engl. Labeled Antibody) dazu gegeben werden, der ebenfalls an das Antigen bindet, oder es wird ein unmarkierter antigenbindender Antikörper verwendet. Im ersten

Fall erfolgt nach erneuter Inkubation und Waschung die Zugabe des Substrats, während bei der zweiten Variante zunächst ein an den Sekundärantikörper bindendes Enzym hinzugegeben werden muss. Die weiteren Schritte sind wieder identisch und beinhalten eine weitere Waschung und die anschließende Zugabe des Substrats, anhand dessen die enzymatische Reaktion und somit die Färbung erfolgen.

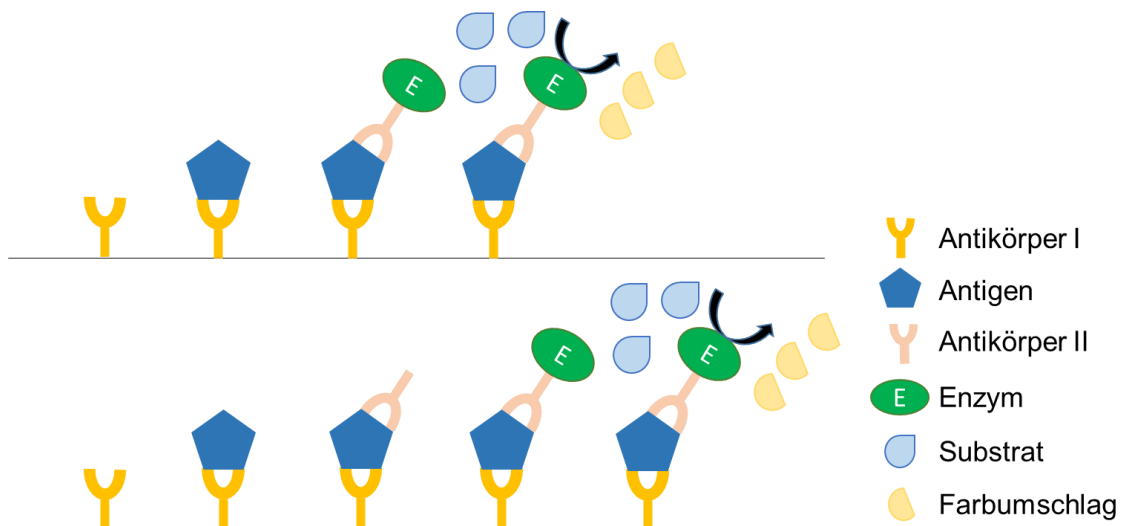


Abbildung 4: Sandwich-ELISA. Oben: Ein Antikörper ist an die Mikrotiterplatte gekoppelt und bindet das zugehörige Antigen. Anschließend wird ein zweiter, das Antigen bindender und mit einem Enzym gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Das Substrat wird hinzugegeben und das Enzym katalysiert die folgende Reaktion mit Farbumschlag. Unten: Ein Antikörper ist an die Mikrotiterplatte gekoppelt und bindet das zugehörige Antigen. Ein zweiter, das Antigen bindender Antikörper wird hinzugegeben. Das Enzym, das an den zweiten Antikörper bindet, wird hinzugefügt. Anschließend wird das Substrat hinzugegeben und die Reaktion mit anschließendem Farbumschlag läuft ab.

3.3.1 Osteopontin-ELISA

Für die Bestimmung der Osteopontin-Konzentration im Patientenserum wurde das Human Osteopontin Assay Kit von IBL (REF JP27158, IBL International GmbH/ a Tecan Group Company, Hamburg, Germany) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben [81].

Zu Beginn des ELISAs wird das Patientenserum im Verhältnis 1:9 (50µl Plasma mit 400µl Puffer) mit einer Pufferlösung (1% *bovine serum albumin* (BSA), 0.05% Polysorbat 20 (Tween 20) in *phosphate buffered saline* (PBS)) verdünnt. Des Weiteren werden das Waschkonzentrat (0.05% Tween20 in *phosphate buffer* (X40)) sowie der *horseradish-peroxidase*-(HRP)-konjugierte Antikörper und ein OPN-Standard nach Herstellerangaben verdünnt. Aus dem OPN-Standard wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml,

0 ng/ml), die später als Referenz zur Berechnung der OPN-Konzentrationen verwendet wird.

Die Durchführung des Assays beginnt nach der Vorbereitung mit dem Auftragen von 100µl Patientenserum auf eine mit Anti-Human-OPN-Rabbit-IgG-Antikörper beschichtete 96 wells Mikrotiterplatte. Dieser erste Antikörper bindet das N-terminale Ende von Osteopontin. Von jeder Probe werden drei Messungen gemacht, um mithilfe der Mittelwertbestimmung ein genaueres Messergebnis zu erzielen. Anschließend werden von der Standardverdünnungsreihe je 100µl in zwei Felder aufgetragen. Zwei Felder enthalten zur Kontrolle die reine Pufferlösung (Blindwert). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und neun anschließenden Waschschritten mit der Waschlösung werden 100µl eines HRP-konjugierten Anti-Human-OPN-Mouse-IgG-Antikörpers allen Proben außer dem Blindwert beigefügt. Der zweite Antikörper bindet an einen Teil der Thrombinschnittstelle von Osteopontin. Die gekoppelte Peroxidase (HRP) fungiert als Reporterenzym. Es folgt eine erneute Inkubation bei 4°C für 30 Minuten. Nach Abwaschen des nicht gebundenen bzw. des überschüssigen Antikörpers mit der Waschlösung wird die Platte nach der Zugabe von je 100µl des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. TMB wird von HRP umgesetzt, sodass sich eine Blaufärbung der Platte zeigt, die proportional zur Menge des an OPN gebundenen HRP – und somit abhängig von der OPN-Konzentration – ist. Nach Zugabe von je 100µl der Stopplösung, einer Schwefelsäure (1N H₂SO₄), wird die Reaktion beendet und es ergibt sich ein Farbumschlag von blau nach gelb, um eine genaue Messung der Intensität bei 450 nm mit einem Spektralphotometer zu ermöglichen. Nach der photometrischen Messung kann mithilfe der Standardreihe eine lineare Funktion erstellt werden, mit der die Konzentrationen der Proben berechnet werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss beachtet werden, dass auch beim Blindwert eine geringe Konzentration von OPN gemessen wird, die als Maß für falsch positive Enzymreaktion von den anderen Proben abgezogen werden muss. Ebenfalls muss die erfolgte Verdünnung beachtet werden; d.h. die errechneten Konzentrationen sind mit 9 zu multiplizieren. Die Messung der Intensität der Gelbfärbung wurde mithilfe eines Photometers (Berthold Technologies, LB 911 Apollo 1) bei 450nm durchgeführt.

3.3.2 c-MET-ELISA

Die c-Met-Konzentration im Patientenplasma wurde mit Hilfe des Human c-Met ELISA Kits von life technologies (REF KHO2031, Life Technologies Corp., Frederick, USA)

bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers [82]. Der c-Met-ELISA ist ebenfalls ein Sandwich-ELISA, bei dem im Gegensatz zum OPN-ELISA jedoch ein nicht konjugierter Antikörper verwendet wird, sodass das Reporterenzym einzeln hinzugefügt werden muss. Die Proben werden zu Beginn im Verhältnis von 1:100 mit dem Standardpuffer (enthält laut Hersteller 0.1% Natriumazid) verdünnt (5 µl Plasma mit 495 µl Puffer). Es wird eine Standardreihe hergestellt (50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,12 ng/ml, 1,56 ng/ml, 0,78 ng/ml, 0 ng/ml). Nach Herstellerangaben werden der Waschpuffer und das Enzym Streptavidin-HRP verdünnt. Nach dem Auftragen von je 100 µl des Standardpuffers sowie 100 µl der Proben und der Standardreihe wird die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden wie bei Osteopontin pro Probe drei Messungen durchgeführt, um den Mittelwert zu bestimmen. Zwei Felder werden zur Kontrolle für das reine Chromogen freigelassen (*Chromogen blank*). Die Waschvorgänge werden jeweils vier Mal durchgeführt. Nach der ersten Inkubation werden je 100 µl des Antikörpers Hu-c-Met-Biotin-Conjugate aufgetragen, wonach eine erneute Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgt.

Nach dem Waschen werden je 100 µl von Streptavidin-HRP (*chromogen blank* bleibt frei) hinzugefügt. Dieses bindet über das konjugierte Biotin an den Antikörper-Antigen-Komplex. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem weiteren Waschvorgang wird das chromogene Substrat TMB (je 100 µl) hinzugefügt. Wie beim OPN-ELISA erfolgt anschließend eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, bevor die Stopplösung (100 µl) zugefügt wird. Es gibt eine Reaktion mit Blaufärbung, die nach Zugabe der Stopplösung in Gelb umschlägt. Je nach c-Met Konzentration der Proben zeigt sich eine unterschiedliche Intensität der Gelbfärbung. Für die darauffolgende photometrische Messung und Auswertung wurde der THERMOmax ROM v.1.72 bei 450nm verwendet.

3.3.3 HGF-ELISA

Zur Bestimmung der HGF-Konzentration im Patientenplasma wurde das Human HGF Quantikine ELISA Kit von R&D Systems (Catalog No. DHG00, R&D Systems, Minneapolis, USA) genutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstelleranleitung [83]. Wie bei den anderen ELISAs muss zunächst ein Waschpuffer aus Verdünnung des Waschpufferkonzentrats des Herstellers mit destilliertem Wasser hergestellt werden. Zudem wird mittels Farbreagens A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid) und B (stabilisiertes TMB) eine Substratlösung hergestellt. Eine Standard-Verdünnungsreihe

wird erstellt (8000 pg/ml, 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 0 pg/ml). Dann folgt die Auftragung von je 150 µl Standardpuffer und 50 µl Probe bzw. Standard pro Kammer. Pro Probe werden zwei Messungen durchgeführt. Drei Qualitätskontrollen werden aufgetragen. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur erfolgt ein Waschdurchlauf mit vier Waschungen. Dann werden 200 µl des Human-HGF-conjugate, eines mit HRP konjugierten Antikörpers, aufgetragen und die Platte erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen werden 200 µl der Substratlösung zugefügt und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es zeigt sich eine Blaufärbung. Anschließend folgt die Zugabe von 50 µl Stopplösung, einer Schwefelsäure, sodass ein erneuter Farbumschlag von blau zu gelb abläuft. Die Intensität ist dabei abhängig von der HGF-Konzentration der jeweiligen Probe. Wie beim c-Met-ELISA wurde zur photometrischen Messung und Auswertung der THERMOMax ROM v1.72 verwendet. Die Bereiche, in denen die Qualitätskontrollen liegen sollten, wurden erreicht.

3.4 Klinische Parameter

Neben den Biomarker-Konzentrationen wurden die Patientencharakteristika und klinischen Parameter der Patienten erhoben.

Die klinischen Daten wurden größtenteils anhand der elektronischen Patientenakten im Krankenhausinformationssystem (SAP) ausgewertet. Weitere Quellen waren die Datenbank des Tumorregisters Unterfranken, Onkostar, und die Datenbank der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie am Universitätsklinikum Würzburg (sis/). Außerdem wurden bezüglich fehlender Daten und der pathologischen Befunde die Kliniken kontaktiert, in denen die Patienten operiert und weiterbehandelt wurden.

Zunächst wurden Patientencharakteristika wie das Geschlecht und das Alter bei Erstdiagnose bestimmt sowie prätherapeutische Daten bezüglich des Rektumkarzinoms. Dazu gehörten Lokalisation, Infiltration der Fascia rectalis im MRT (CRM-/CRM+) und das klinische Tumorstadium (cT, cN, cM, prätherapeutisches UICC). Des Weiteren wurde das postoperative Tumorstadium (pT, pN, pM, postoperatives UICC) ausgewertet. Weiterhin wurden pathologische Parameter wie Tumorresektion (R0/R1), Grading (G1 - 4), Venöse Infiltration (V0/V1), Lymphgefäßinvasion (L0/L1) und Perineuralscheideninfiltration (Pn0/1) erhoben. Für jeden Patienten wurden das Therapieschema (NeoRCT + TME ± adjuvante Chemo), die verwendete Chemotherapie (5-FU ± Oxaliplatin) sowie die Art der adjuvanten Chemotherapie (Capecitabine vs. andere) angegeben. Zudem wurden die Qualität der Totalen mesorektalen Exzision

nach M.E.R.C.U.R.Y und eine Testung auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) angegeben. Um das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie beurteilen und Responder bzw. Non-Responder identifizieren zu können, wurden verschiedene Scores bzw. Parameter verwendet. Zum einen wurde eine pathologisch komplette Remission (pCR) einer inkompletten pathologischen Remission (pIR) gegenübergestellt. Zum anderen erfolgte die Betrachtung einer postoperativen Änderung des UICC-Stadiums im Sinne eines Downsizings im Gegensatz zu einem unveränderten UICC-Stadium bzw. einem Progress. Ein wichtiger Parameter für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie ist der Grad der Tumorregression nach Dworak. Dieser wurde einzeln und gruppiert (geringe Regression: Dworak 0 + 1 + 2, hohe Regression: Dworak 3 + 4) betrachtet. Als letzter Endpunkt für das Therapieansprechen wurde der Neoadjuvant Rectal Score (NAR-Score) verwendet. Dieser Score wurde initial von Valentini et al. als Prognoseparameter u.a. für das krankheitsfreie Überleben beschrieben [84]. Die Arbeitsgruppe um Fokas bestätigte diese Ergebnisse zuletzt 2018 und versprach sich vom modifizierten NAR-Score die schnellere Identifizierung von Non-Respondern, um therapeutisch bessere Entscheidungen treffen zu können [85]. Der NAR-Score wurde von Fokas et al. aus den gewichteten cT-, pT- und pN-Stadien berechnet, wobei cT die Werte 1,2,3 oder 4 annimmt, pT Werte von 0,1,2,3 oder 4 und pN Werte von 0,1 oder 2. Die Formel lautet: $NAR = [5pN - 3(cT - pT) + 12]^2 / 9,61$ und liegt bei Werten zwischen 0 und 100. Die Wichtung von cT, pN und pT erfolgt nach Valentinis Normogramm [84] und die Division durch den Faktor 9,61 dient der Skalierung der Werte zwischen 0 und 100. Die Einteilung des Scores in niedrig (< 8), mittel (8 - 16) und hoch (> 16) erfolgte anhand der Terzile, wobei ein niedrigerer Score mit einer besseren Prognose einhergeht. Neben Fokas et al. [85] haben George et al. [86] den NAR-Score ebenfalls als Endpunkt für klinische Studien vorgeschlagen.

Als letztes wurden Verlaufsdaten der Erkrankung bzw. des Patienten ausgewertet. Diese umfassten u.a. das Auftreten eines Lokalrezidivs, von Fernmetastasen bzw. einem generellen Progress (Tumorprogression, Lokalrezidiv oder Fernmetastasen). Auch das Gesamtüberleben, das krankheitsfreie Überleben und die Nachsorge-Zeit sowie im Fall einer Krankheitsprogression die Zeit bis zum Progress (Time to progression) wurden angegeben. Die Nachsorge-Zeit (Follow-Up-Zeit) wurde dabei ab dem Beginn der Radiotherapie gemessen.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Windows-Version 25 durchgeführt. Die zweiseitige statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Um das Gesamtüberleben zu analysieren, wurden Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier erstellt und die Signifikanz mit einem Log-Rank-Test überprüft. Das Versterben eines Patienten wurde als Ereignis definiert; zensiert wurden die Daten zum Zeitpunkt des Endes einer Nachsorge. Betrachtet wurde zum Vergleich insbesondere der Schätzwert des 3-Jahres-Überlebens der Überlebenstabellen. Eine Cox-Regressionsanalyse war nicht möglich, da nicht genügend Ereignisse vorhanden waren. Zur Bestimmung von Korrelationen zwischen den einzelnen Biomarkern und den klinischen Parametern wurde der Kendall-Tau-Test verwendet. Um eine Aussage über den prädiktiven Wert der Biomarker für die einzelnen Variablen treffen zu können, wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Die Korrelationen der Biomarker untereinander wurden mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet. Im Anschluss wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Um Mittelwerte vergleichen zu können, wurden die Werte der Biomarker bzw. die logarithmisierten Werte der Biomarker zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Zum Vergleich der Mittelwerte verschiedener Gruppen wurde bei Normalverteilung und zwei Gruppen der t-Test verwendet. Um die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für die posthoc-Tests der ANOVA wurden zunächst die Varianzen mittels Levene-Tests auf Homogenität getestet. Bei homogenen Varianzen wurde der Tukey-Test zur posthoc-Analyse verwendet, bei inhomogenen Varianzen der Dunnett-T3-Test. Bei nicht-normalverteilten Variablen wurden Nichtparametrische Tests durchgeführt: zwei verbundene Stichproben wie Biomarker zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels Wilcoxon getestet, zwei unabhängige Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test. Bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben erfolgte der Mittelwertvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik bezüglich Patientencharakteristika, Tumorklassifikationen und pathologischen Parametern sowie die Verlaufparameter sind in Tabelle 2 abgebildet.

Tabelle 2: Übersicht über die Häufigkeitsverteilung und deskriptive Statistik der Patientencharakteristika und Tumorklassifikationen, der pathologischen Parameter und Therapie- und Verlaufs-assoziierten Daten.

adj. CT: adjuvante Chemotherapie; CRM: engl. circumferential resection margin; cTNM-Klassifikation: klinische Tumorklassifikation; 5-FU: Fluorpyrimidine; G: engl. grading; L: Infiltration von Lymphgefäßen; M: Vorliegen von Fernmetastasen; MSI: Mikrosatelliteninstabilität; MSS: Mikrosatellitenstabilität; N: Anzahl befallener Lymphknoten; NAR-Score: engl. neoadjuvant rectal score; Neo-RCT: neoadjuvante Radiochemotherapie; Neo-RT: neoadjuvante Radiotherapie; OP: Operation; Ox: Oxaliplatin; pCR: pathologisch komplette Resektion; pIR: pathologisch inkomplette Resektion; Pn: Infiltration der Perineuralscheide; pTNM-Klassifikation: pathologische Tumorklassifikation; R: Residualtumor; T: Tumordinfiltrationstiefe; TME: Totale mesorektale Exzision; UICC: engl. Union for International Cancer Control; V: Infiltration von Blutgefäßen; XelOx: Oxaliplatin plus Capecitabine.

Patienten-assoziierte Parameter		n	Anzahl	% **
Geschlecht	Männlich	68	48	70,6
	Weiblich		20	29,4
Alter bei Erstdiagnose (in Jahren)	Durchschnitt	68	62,5	19,2-82,5 ± 12,36 63,79
	Bereich Standardabweichung Median			
Zuweiser	UKW	68	20	
	Juliusspital		13	
	Kitzingen		16	
	Lohr		4	
	Wertheim		8	
	Andere		7	
Tumor-assoziierte Parameter präoperativ				
Lokalisation	unteres Rektumdrittel	68	37	54,4
	mittleres Rektumdrittel		29	42,6
	oberes Rektumdrittel		2	3,0
Zirkumferentieller Abstand zur mesorektalen Faszie (CRM) im MRT	CRM-	53 *	26	49,1
	CRM+		27	50,9
cT-Stadium	cT2	68	7	10,3
	cT3		55	80,9
	cT4		6	8,8
cN-Stadium		62 *		

Ergebnisse

	cN0			11	17,7
	cN1			36	58,1
	cN2			15	24,2
cM-Stadium			67 *		
	cM0			60	89,6
	cM1			7	10,4
UICC-Stadium präoperativ			68		
	UICC II			14	20,6
	UICC III			47	69,1
	UICC IV			7	10,3
Tumor-assoziierte Parameter postoperativ					
			n	Anzahl	% **
Zirkumferentieller Abstand zur mesorektalen Faszie (CRM) pathologisch	CRM- CRM+		32 *	29 3	90,6 9,4
pT-Stadium			63 *		
	pT0			9	14,3
	pT1			2	3,2
	pT2			14	22,2
	pT3			36	57,1
	pT4			2	3,2
pN-Stadium			62 *		
	pN0			37	59,7
	pN1			16	25,8
	pN2			9	14,5
pM-Stadium			57 *		
	pM0			52	91,2
	pM1			5	8,8
UICC-Stadium postoperativ			63 *		
	UICC 0			9	14,3
	UICC I			15	23,8
	UICC II			13	20,6
	UICC III			21	33,4
	UICC IV			5	7,9
Änderung UICC			63 *		
	Keine Änderung/ Progress			29	46,0
	Downstaging			34	54,0
Pathologische Parameter					
			n	Anzahl	% **
Resektionsstatus			62 *		
	R0			60	96,8
	R1			2	3,2
Grading			64 *		
	G2			57	89,1
	G3			6	9,4
	G4			1	1,5
Lymphgefäßinfiltration			63 *		
	L0			55	87,3
	L1			8	12,7
Blutgefäßinfiltration			63 *		
	V0			57	90,5

Ergebnisse

	V1		6	9,5
Perineuralscheideninfiltration		51 *		
	Pn0		46	90,2
	Pn1		5	9,8
Pathologisch komplette Remission (pCR) vs. pathologisch inkomplette Remission (pIR)	pCR pIR	63 *	9 54	14,3 85,7
NAR-Score	Mittelwert Bereich Standardabweichung Median	63 *	20,63 0,94- 81,58 17,9 14,98	
NAR-Score Gruppe	Low (<8) Intermediate (8-16) High (>16)	63 *	11 27 25	17,5 42,9 39,6
Regression nach Dworak	Dworak 0 Dworak 1 Dworak 2 Dworak 3 Dworak 4	56 *	1 15 23 10 7	1,7 26,8 41,1 17,9 12,5
Regression nach Dworak, gruppiert	Geringe Regression (Dworak 0+1) Mittlere Regression (Dworak 2+3) Komplette Regression (Dworak 4)	56 *	16 33 7	28,6 58,9 12,5
Regression nach Dworak, gut vs. schlecht	Schlechte Regression (Dworak 0+1+2) Gute Regression (Dworak 3+4)	56 *	39 17	69,6 30,4
Qualität der totalen mesorektalen Exzision (TME) nach M.E.R.C.U.R.Y.	0: nicht bestimmbar 1: good 2: intermediate 3: poor	60 *	2 49 8 1	3,3 81,7 13,3 1,7
Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	Nicht bestimmt MSI MSS	62 *	48 0 14	77,4 0 22,6
Therapie-assoziierte Parameter				
Therapieschema		n	Anzahl	% **
		67 *		
	NeoRCT+TME		17	25,4
	NeoRCT+TME+adj.CT		45	67,2
	NeoRCT, keine OP		5	7,4

Ergebnisse

Neoadjuvante Chemotherapie	5-FU XelOx/5-FU + Ox	67 *	55 12	82,1 17,9
Gesamtdosis neoadjuvante Radiotherapie (Gy)	Median Bereich	68	50,4 21,6-58,8	
Adjuvante Chemotherapie	Keine Capecitabine Andere	64 *	20 34 10	31,3 53,1 15,6
Verlaufs-assoziierte Parameter				
Gesamtüberleben		n	Anzahl	% **
Lebend		68	48	70,6
Verstorben			20	29,4
Tumorspezifisches Überleben	An Tumorerkrankung verstorben Andere oder unklare Todesursache	20	12 8	82,4 17,6
Progression	Ja Nein	68	22 46	32,4 67,6
Lokalrezidiv	Ja Nein	68	7 61	10,3 89,7
Fernmetastasen	Ja Nein	68	19 49	27,9 72,1
Follow-Up (in Monaten)	Median Bereich	68	29,87 0,8-63,05	
Disease-free survival (in Monaten)	Median Bereich	68	24,54 0,8-60,59	
Time to progression (in Monaten)	Median Bereich	22	13,46 1,4-59,74	
* Es waren nicht bei allen Patienten Daten zu dem Punkt verfügbar. ** Alle prozentualen Werte sind auf eine Nachkommastelle aufgerundet.				

4.2 Quantitative Bestimmung der Biomarker-Konzentrationen

Die Konzentrationen der Biomarker zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Tabelle 3 abgebildet.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik der gemessenen Biomarker-Konzentrationen.

Biomarker		
Osteopontin (in ng/ml)	n	**
Probe A: vor neoRT	63 *	
Mittelwert		666,86

Ergebnisse

Probe B: nach neoadjuvanter Radiotherapie	Bereich	61 *	247,62-1803,00
	Standardabweichung		± 277,73
	Median		618,00
	Mittelwert		718,71
Probe C: präoperativ	Bereich	20 *	135,79-1974,60
	Standardabweichung		± 344,52
	Median		630,77
	Mittelwert		546,65
Probe D: vor adjuvanter Chemo	Bereich	10 *	261,39-1192,09
	Standardabweichung		± 228,78
	Median		515,20
	Mittelwert		612,38
Probe E: nach adjuvanter Chemo	Bereich	10 *	394,64-958,50
	Standardabweichung		± 183,72
	Median		570,46
	Mittelwert		722,67
Probe F: 1. Nachsorge, Medianer Zeitpunkt: 10,7 Monate nach Radiotherapie	Bereich	31 *	300,8-1490,25
	Standardabweichung		± 387,46
	Median		633,00
	Mittelwert		577,04
Probe G: 2. Nachsorge, Medianer Zeitpunkt: 22,4 Monate nach Radiotherapie	Bereich	22 *	232,20-1668,60
	Standardabweichung		± 262,28
	Median		557,45
	Mittelwert		547,08
Probe H: 3. Nachsorge, Medianer Zeitpunkt: 34 Monate nach Radiotherapie	Bereich	9 *	148,93-2094,75
	Standardabweichung		± 389,98
	Median		462,69
	Mittelwert		525,33
	Bereich		309,23-686,40
	Standardabweichung		± 144,48
	Median		522,00
	Mittelwert		
<u>c-Met (in ng/ml)</u>		n	**
Probe A	Mittelwert	62 *	636,00
	Bereich		270,16-1063,20
	Standardabweichung		± 140,61
	Median		639,63
Probe B	Mittelwert	62 *	596,36
	Bereich		261,40-1029,00
	Standardabweichung		± 150,26
	Median		597,70
Probe C	Mittelwert	17 *	663,09

Ergebnisse

	Bereich Standardabweichung Median		528,30-948,80 ± 117,62 683,43
HGF (in pg/ml)			
		n	**
Probe A	Mittelwert Bereich Standardabweichung Median	62 *	933,08 551,72-2807,83 ± 352,77 832,17
Probe B	Mittelwert Bereich Standardabweichung Median	62 *	1019,25 554,57-5202,29 ± 681,14 846,19
* Es wurden jeweils alle vorhandenen Proben der jeweiligen Zeitpunkte untersucht			
** Die Konzentrationen wurden auf die zweite Nachkommastelle aufgerundet			

4.3 Überleben

Während der Nachsorge sind innerhalb von 60 Monaten 20 von 68 Personen verstorben, was einer Sterblichkeit von 29,4 % entspricht. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 72,1 % (Abbildung 5). Von den 63 Patienten, von denen Blutproben zur Bestimmung der Biomarker-Konzentrationen vorlagen, verstarben im Verlauf des Überwachungszeitraums 19 Patienten (30,2 %).

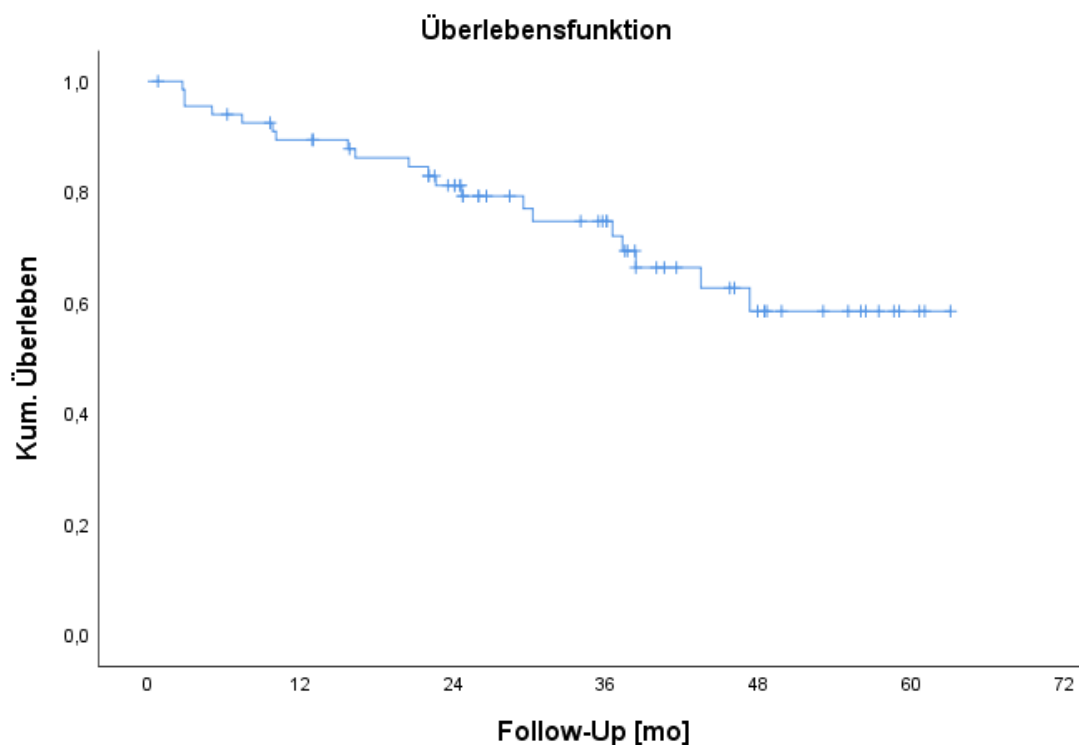


Abbildung 5: Gesamtüberleben der Patienten im Verlauf der Nachsorge. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate

4.3.1 Klinisch-pathologische Parameter und Überleben

Für das cT-Stadium ergibt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben, $p = 0,521$. Für cN ergibt sich insgesamt ebenfalls kein signifikanter Überlebensunterschied, $p = 0,352$. Betrachtet man jedoch die Gruppen cN0, cN1 und cN2 paarweise, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen cN1 und cN2, $p = 0,035$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 88,9 % (cN0), 71,6 % (cN1) und 60,3 % (cN2). Für cM ergibt sich kein signifikanter Überlebensunterschied, $p = 0,134$. Für das pT-Stadium zeigt sich insgesamt kein signifikanter Überlebensunterschied der Gruppen, $p = 0,066$. Bei paarweiser Betrachtung ergibt sich allerdings eine signifikant größere Überlebenswahrscheinlichkeit von pT0 vs. pT1, $p = 0,046$, von pT0 vs. pT4, $p = 0,005$, und von pT2 zu pT3, $p = 0,031$. Für pN zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zum Überleben, $p = 0,014$. Betrachtet man pN paarweise, zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil von pN0 im Vergleich zu pN1, $p = 0,047$, und ein hochsignifikanter Unterschied von pN0 und pN2, $p = 0,006$ (Abbildung 6). Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 88,6 % (pN0), 63,3 % (pN1) und 63,5 % (pN2). Für pM kann ein signifikanter Unterschied des Überlebens festgestellt werden, $p = 0,018$ (Abbildung 7). In der Gruppe pM0 gab es nach drei Jahren 8 Ereignisse bei initial 52

Patienten; bei pM1 gab es nach drei Jahren 2 Ereignisse von anfänglich 5 Patienten. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt somit 82,8 % (pM0) und 60,0 % (pM1).

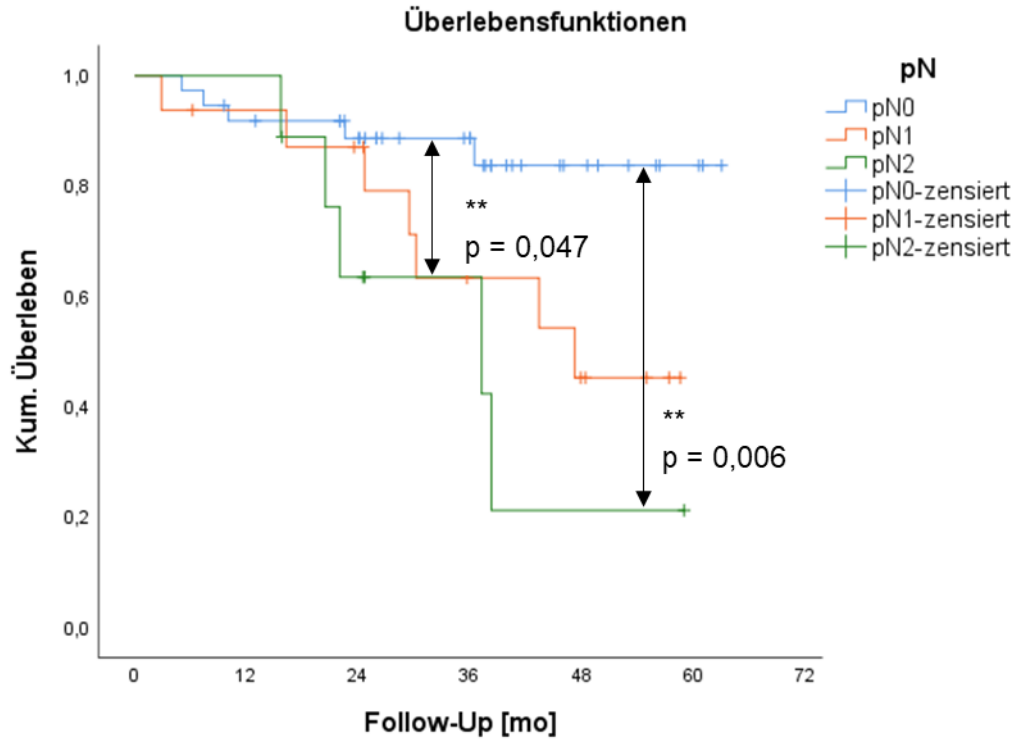


Abbildung 6: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pN-Status. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate, pN: nach der pathologischen TNM-Klassifikation, Anzahl der befallenen Lymphknoten. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

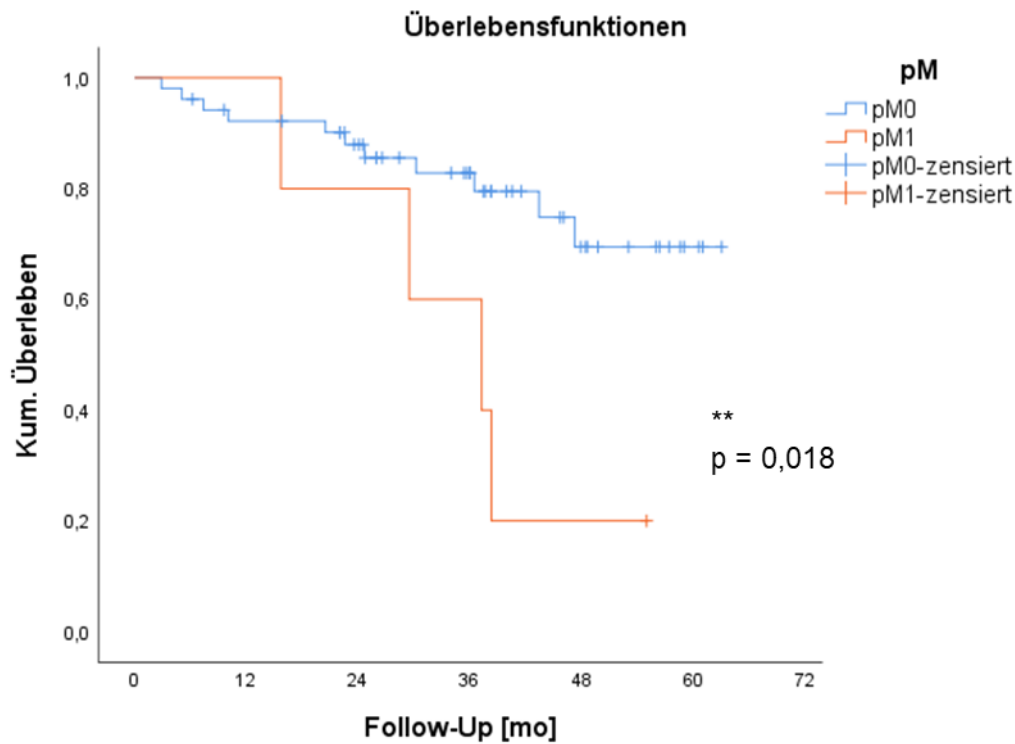


Abbildung 7: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pM-Status. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate, pM: nach der pathologischen TNM-Klassifikation, pM0: keine Fernmetastasen, pM1: Fernmetastasen. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Das präoperative UICC-Stadium zeigt keinen signifikanten Unterschied des Überlebens, $p = 0,085$. Nach paarweiser Betrachtung der einzelnen Stadien ergibt sich mit $p = 0,021$ lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen UICC II und UICC IV. Demgegenüber zeigt das postoperative UICC-Stadium einen größeren Unterschied in Bezug auf das Überleben, $p = 0,032$ (Abbildung 8). Paarweise betrachtet sind die Unterschiede zwischen UICC 0 und UICC III, $p = 0,040$, UICC 0 und UICC IV, $p = 0,008$, und zwischen UICC II und UICC IV, $p = 0,017$, statistisch signifikant (Abbildung 7). Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 78,8 % (UICC I), 92,3 % (UICC II), 64,7 % (UICC III) und 60,0 % (UICC IV). In UICC-Stadium 0 verstarb kein Patient.

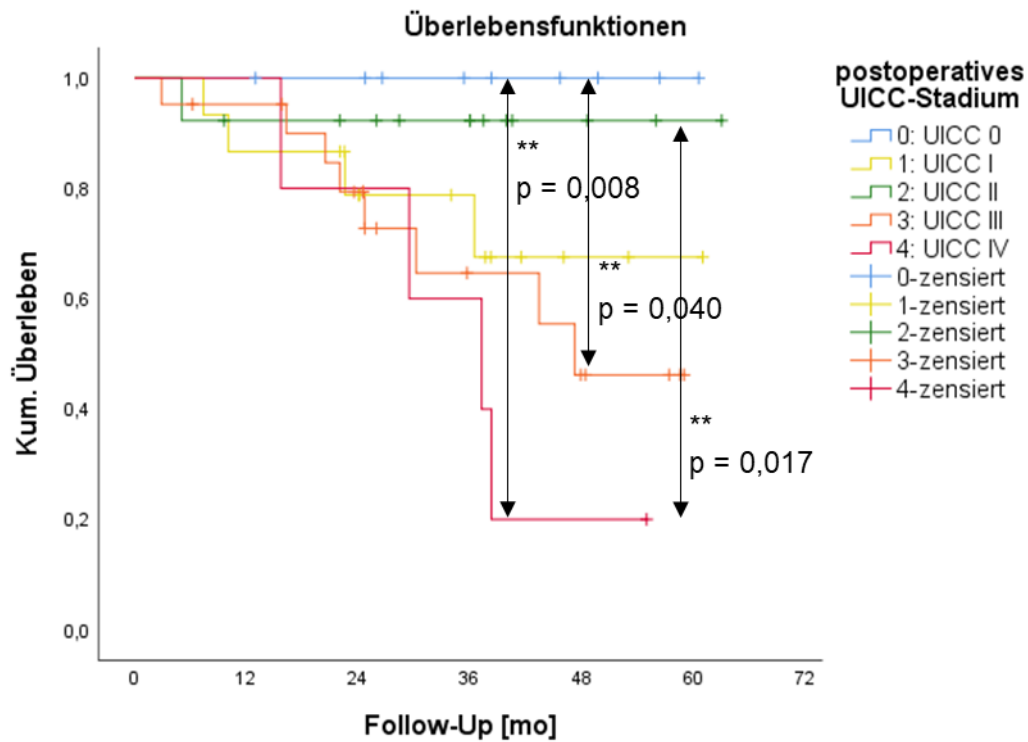


Abbildung 8: Gesamtüberleben je nach UICC-Stadium. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate, UICC: Union for International Cancer Control. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Das Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion (L1) zeigt eine höhere, jedoch statistisch nicht signifikante Sterblichkeit als L0, $p = 0,102$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 82,1 % (L0) bzw. 51,4 % (L1).

Eine pathologisch inkomplette Resektion (R1) zeigt mit $p = 0,004$ eine hochsignifikant erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zur kompletten Resektion (R0) (Abbildung 9). Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 81,4 % (R0) vs. 0,0 % (R1).

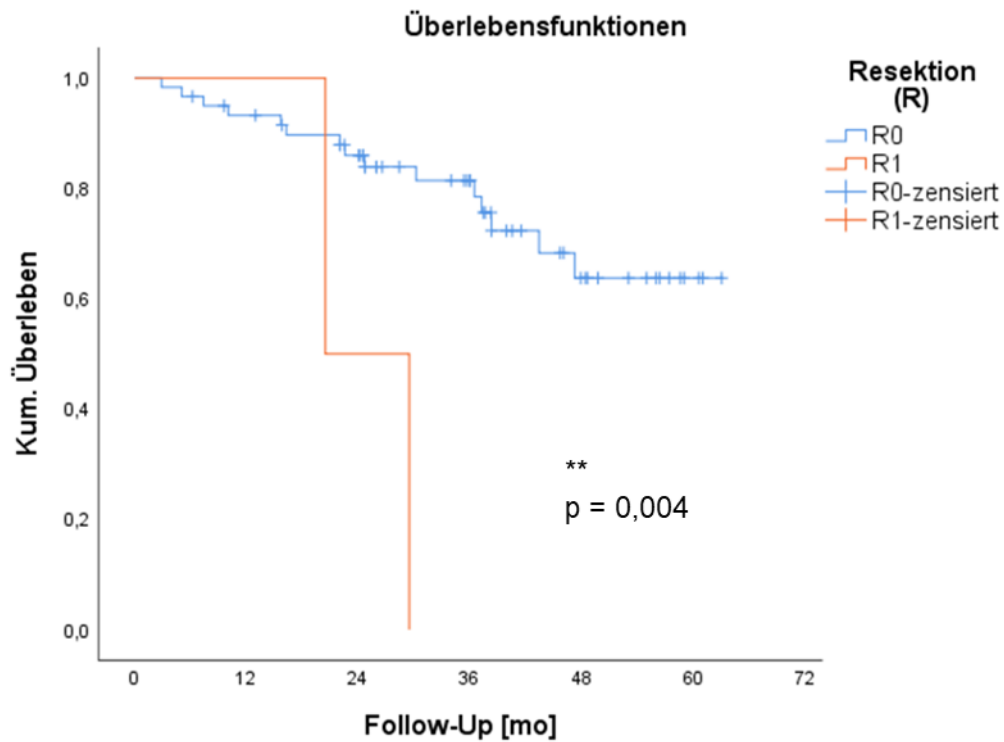


Abbildung 9: Überleben in Abhängigkeit vom Resektionsstatus. R0: komplette Resektion; R1: inkomplette Resektion. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Bei Patienten mit einer Blutgefäßinvasion (V1) ist die Sterblichkeit signifikant höher als die der Patienten ohne Blutgefäßinvasion (V0), $p = 0,011$ (Abbildung 10). Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt 82,1 % (V0) und 50,0 % (V1). Ebenfalls hochsignifikant mit einer höheren Sterblichkeit assoziiert ist das Vorliegen einer Perineuralscheideninfiltration, $p = 0,009$ (Abbildung 11). In der Gruppe ohne Perineuralscheideninfiltration (Pn0) verstarben innerhalb von drei Jahren 7 von 45 Patienten; in der Gruppe mit Perineuralscheideninfiltration verstarben 3 von 5 Patienten. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt 83,1 % (Pn0) vs. 40,0 % (Pn1). Bezüglich des Grading kann kein Unterschied im Überleben festgestellt werden, $p = 0,442$.

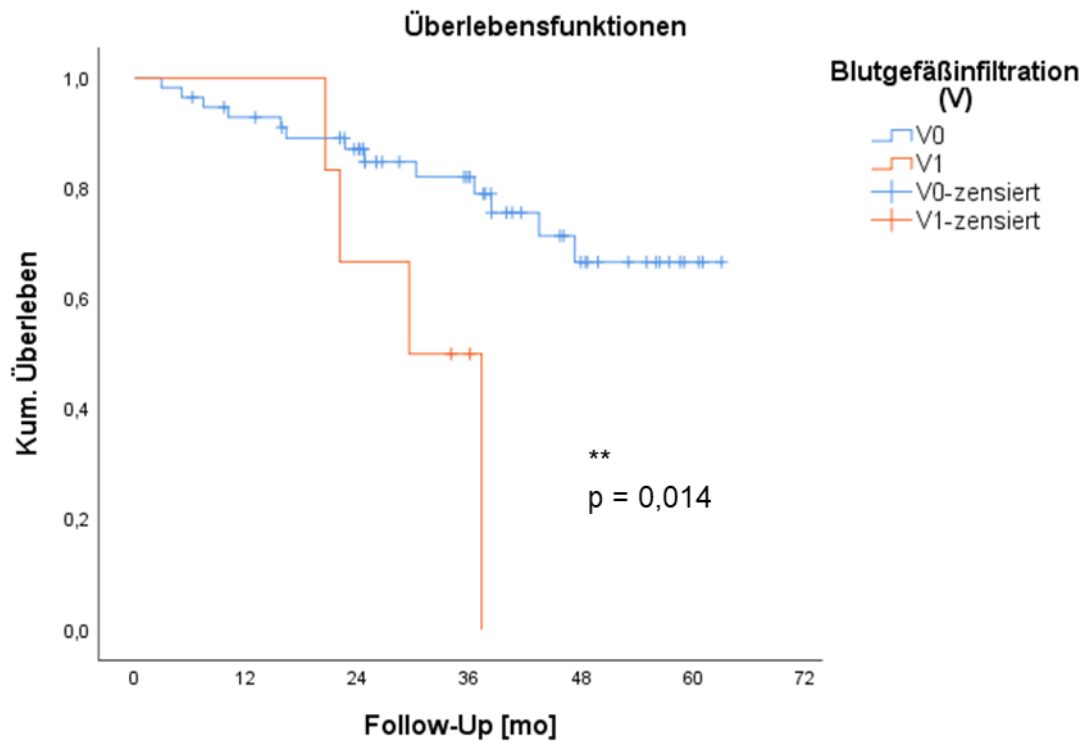


Abbildung 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Blutgefäßinfiltration. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate, V0: keine Blutgefäßinfiltration, V1: Blutgefäßinfiltration. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

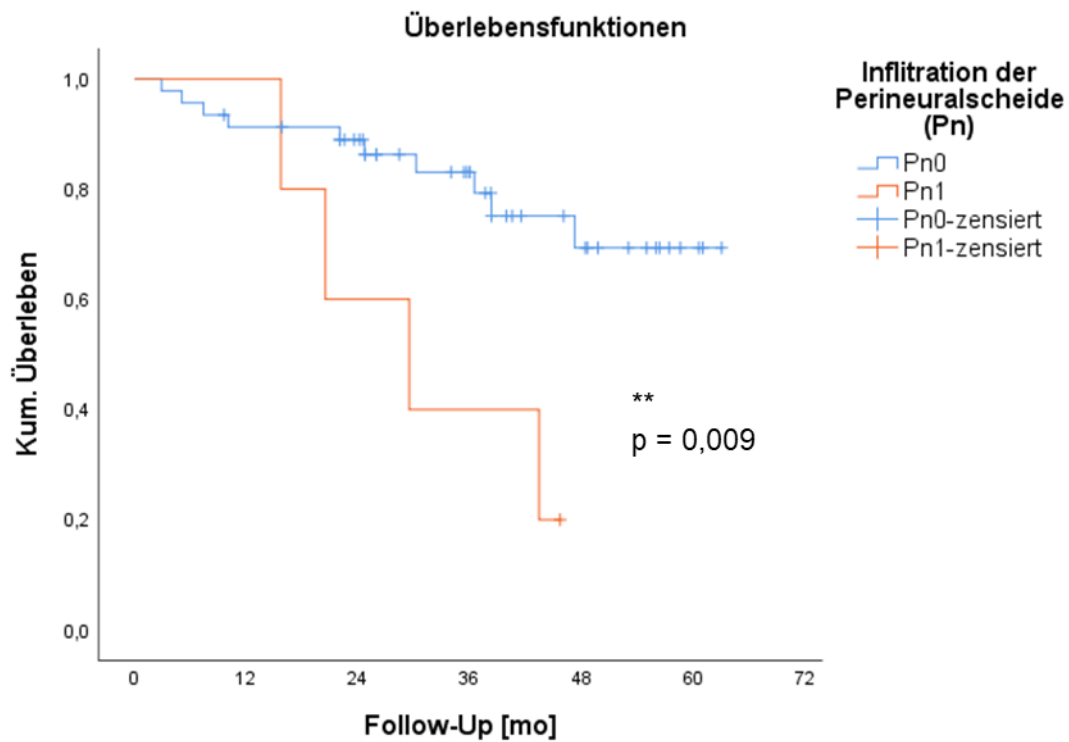


Abbildung 11: Überleben in Abhängigkeit von der Perineuralscheideninfiltration. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate, Pn0: keine Infiltration der Perineuralscheide, Pn1: Infiltration der Perineuralscheide. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

4.3.2 Therapieansprechen und Überleben

Ein Therapieansprechen im Sinne eines Downsizings ist im Vergleich zu einem unveränderten UICC-Stadium bzw. einem Progress mit einem längeren Überleben assoziiert, $p = 0,028$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt 87,9 % vs. 66,3 %. Ein Unterschied bezüglich des Überlebens zeigt sich zudem im Rahmen der pathologischen Remission. Mit $p = 0,061$ ist der Unterschied zwar nicht signifikant, aber in der Gruppe der Patienten mit pCR verstarb keiner der 9 Patienten, während in der Gruppe mit pIR innerhalb von drei Jahren 12 von 54 Patienten verstarben (22,2 %) (Abbildung 12). Das geschätzte 3-Jahres-Überleben in dieser Gruppe beträgt 74,6 %, während es bei pCR aufgrund fehlender Ereignisse nicht geschätzt werden kann.

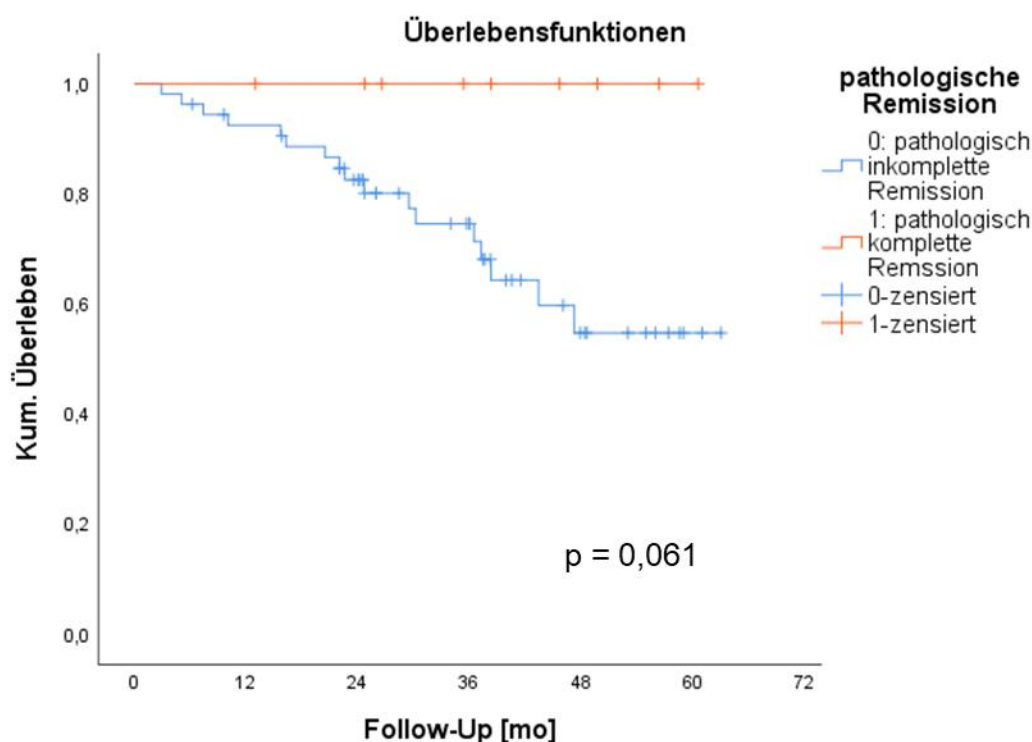


Abbildung 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Remission. Erreichen einer pathologisch kompletten (0) oder inkompletten Remission (1). Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate.

Die Tumorregression nach Dworak (siehe Kapitel 1.1.6) ist ebenfalls mit dem Überleben assoziiert. Eine Signifikanz wird für die einzelne Klassifikation mit $p = 0,053$ knapp verfehlt, aber beim paarweisen Vergleich lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen TRG 1 und TRG 3 bzw. 4 feststellen, $p = 0,029$ und $p = 0,030$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt bei TRG 1 64,2 %, während bei TRG 3 und 4 keine Patienten verstarben. Beim Vergleich der geringen TRG (TRG 0+1+2) mit der guten TRG

(TRG 3+4) zeigt sich ein signifikanter Überlebensunterschied, $p = 0,007$ (Abbildung 13). Das 3-Jahres-Überleben wird für eine geringe TRG auf 71,9 % geschätzt; beim guten TRG sind keine Patienten verstorben.

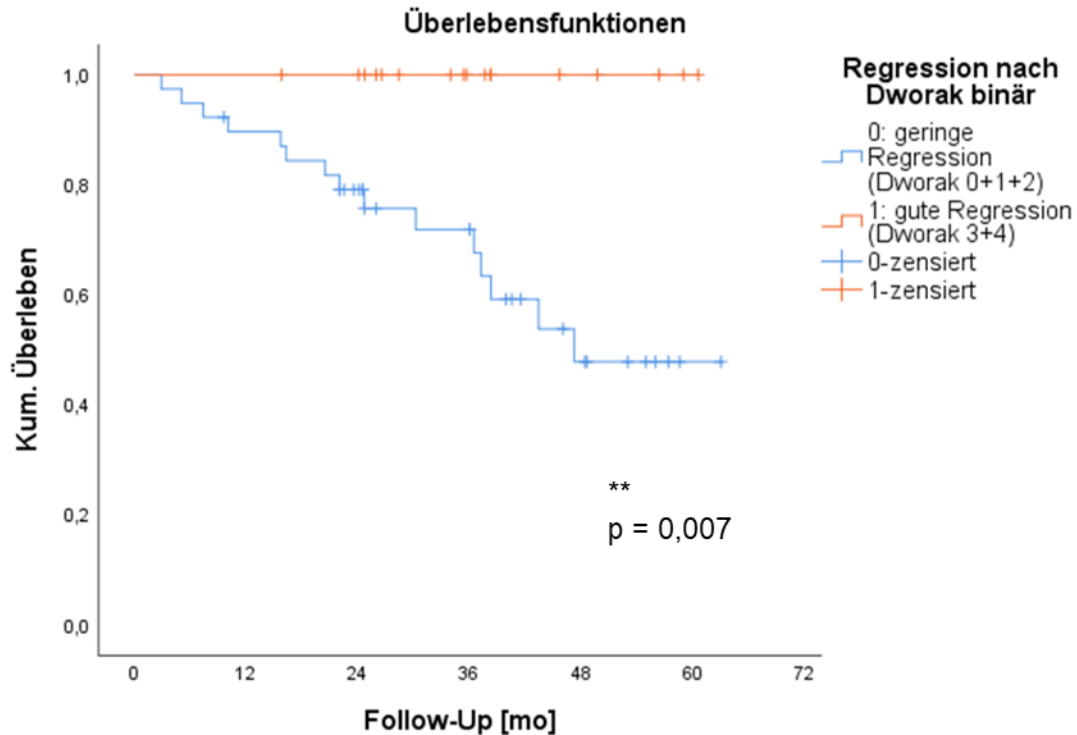


Abbildung 13: Gesamtüberleben je nach Regression (Dworak). Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Auch für den NAR-Score kann ein Zusammenhang zum Überleben gezeigt werden, $p = 0,024$ (Abbildung 14). Die Unterschiede zwischen niedrig und hoch bzw. mittel und hoch sind mit $p = 0,047$ und $p = 0,031$ statistisch signifikant. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt 90 % (niedrig), 88,7 % (mittel) und 62,2 % (hoch). Mit dem NAR-Score lässt sich zudem eine Prognose über das Auftreten von Fernmetastasen treffen, $p = 0,018$ (Abbildung 15). Dabei traten in Gruppe 1 nach drei Jahren bei 1 von 9 Patienten Metastasen auf, in Gruppe 2 bei 2 von 17 und in Gruppe 3 bei 7 von 11 Patienten. Nach drei Jahren entwickeln nach Schätzung in den Gruppen 90 % (1), 90,3 % (2) bzw. 63,3 % (3) keine Metastasen.

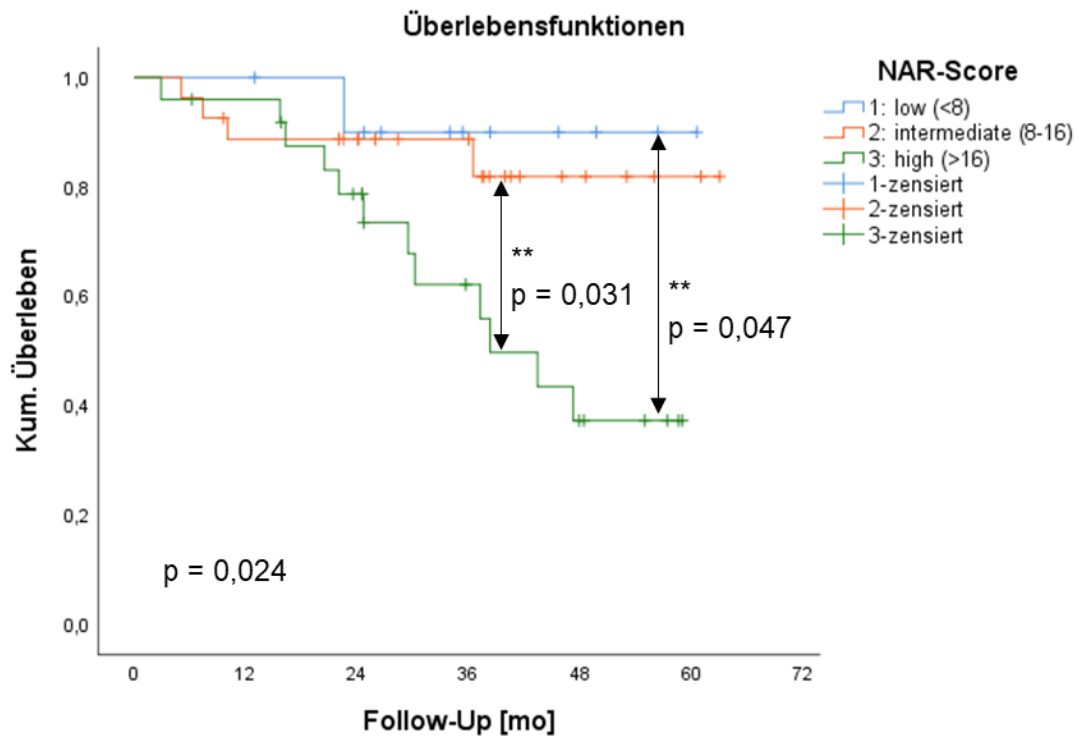


Abbildung 14: Gesamtüberleben je nach Neoadjuvant Rectal Score (NAR-Score). Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

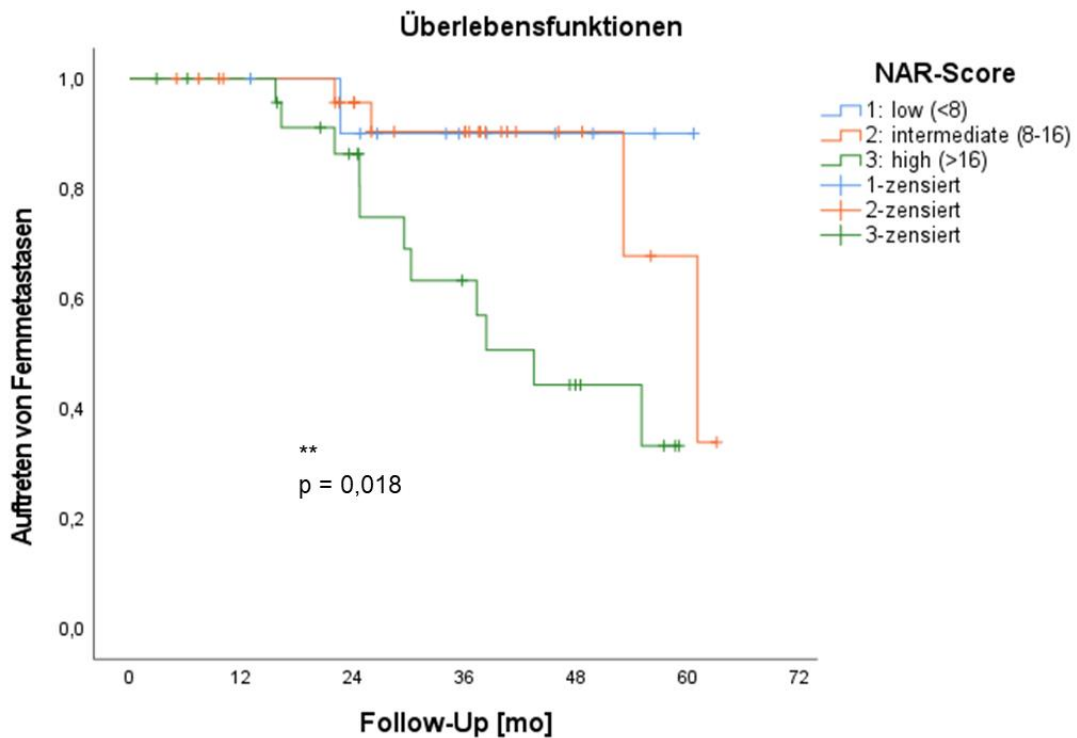


Abbildung 15: Auftreten von Metastasen im zeitlichen Verlauf je nach Neoadjuvant Rectal Score (NAR-Score). Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

4.3.3 Verlaufsparemeter und Überleben

Besonders entscheidend für das Überleben ist das Auftreten von Fernmetastasen, $p = 0,0004$ (Abbildung 16). Nach drei Jahren gab es in der Gruppe ohne Metastasen (M0) sechs Todesfälle bei insgesamt 49 Patienten; in der Gruppe mit Fernmetastasen verstarben innerhalb von drei Jahren hingegen 9 von 19 Patienten. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben beträgt 87,1 % (M0) bzw. 45,4 % (M1). Für das Auftreten eines Lokalrezidivs konnte dagegen kein signifikanter Zusammenhang zum Überleben festgestellt werden, $p = 0,239$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt mit 75,2 % (kein Lokalrezidiv) bzw. 71,4 % (Lokalrezidiv) nah beieinander.

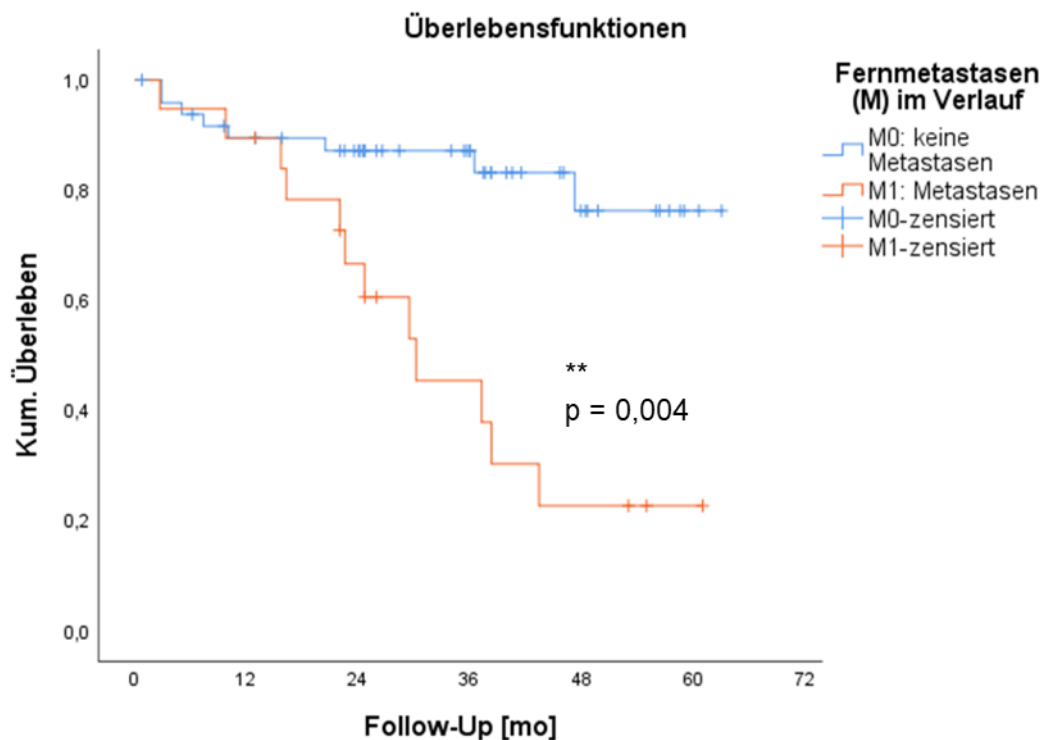


Abbildung 16: Überleben in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen im Verlauf der Erkrankung. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Betrachtet man das generelle Auftreten eines Krankheitsprogresses (Auftreten von Fernmetastasen, Lokalrezidiv oder Tumorprogression), ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zum Überleben, $p = 0,001$. Das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 88,7 % (kein Progress) und 52,5 % (Progression).

4.3.4 Biomarker und Überleben: Osteopontin als Prognoseparameter

Zunächst wird das Überleben in Abhängigkeit von den Ausgangswerten der verschiedenen Biomarker vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Probe A) betrachtet.

In der Gruppe OPN < Median (Gruppe 1) sind im Laufe des Follow-Ups 4 von 32 Patienten verstorben. In der Gruppe OPN > Median (Gruppe 2) verstarben 15 von 31 Patienten. Das Überleben ist mit einem niedrigeren Osteopontin-Wert signifikant höher als mit einem höheren Osteopontin-Wert, $p = 0,001$ (Abbildung 17). Betrachtet man das Überleben der Patienten nach drei Jahren, zeigen sich in Gruppe 1 zwei Ereignisse (Ereignis = Versterben) und ein geschätztes 3-Jahres-Überleben von 91,8 %. In Gruppe 2 gab es drei Jahre nach der Operation 12 Ereignisse und das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt bei 58,6 %.

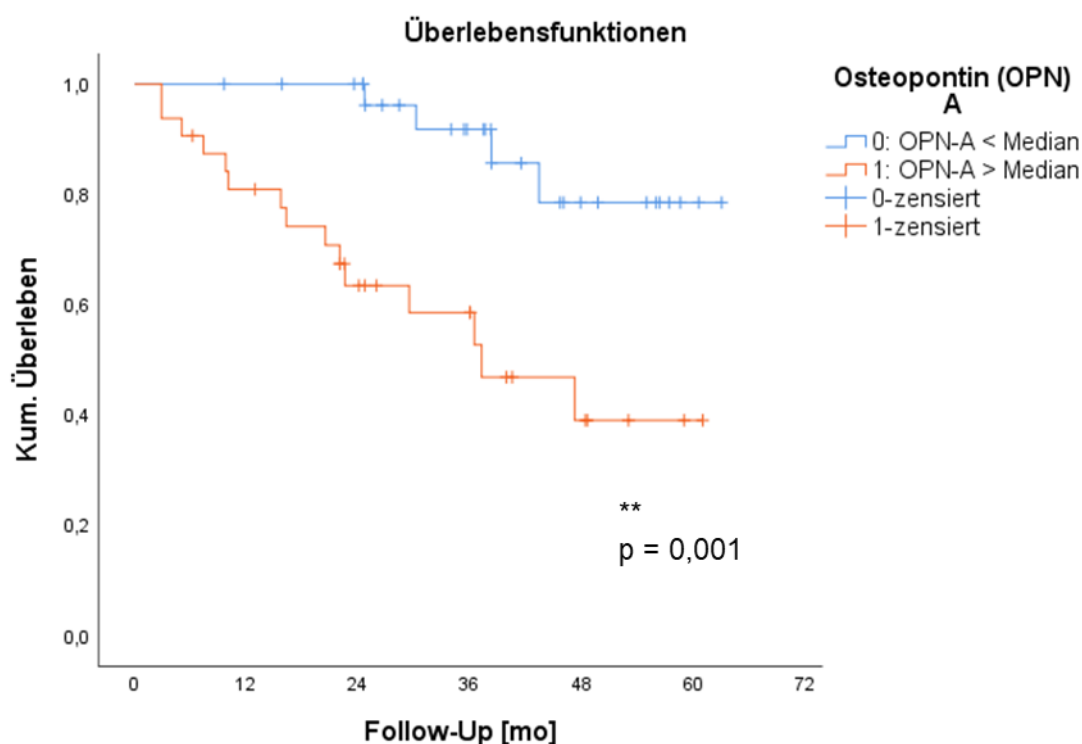


Abbildung 17: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der OPN-Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A). Vergleichsgruppen mit OPN < (Gruppe 1) bzw. > Median (Gruppe 2). Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

In der Gruppe mit c-Met < Median (Gruppe 1) verstarben während der Nachsorge 10 von 31 Patienten, während in Gruppe 2 (c-Met > Median) 9 von 31 Patienten verstarben. Es zeigt sich in Gruppe 1 ein verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zu Gruppe 2, jedoch mit $p = 0,692$ nicht signifikant (Abbildung 18). Drei Jahre nach der Operation gab es in Gruppe 1 fünf Ereignisse und in Gruppe 2 neun Ereignisse. Somit liegt das geschätzte 3-Jahres-Überleben in Gruppe 1 bei 81,7 % und in Gruppe 2 bei 68,6 %.

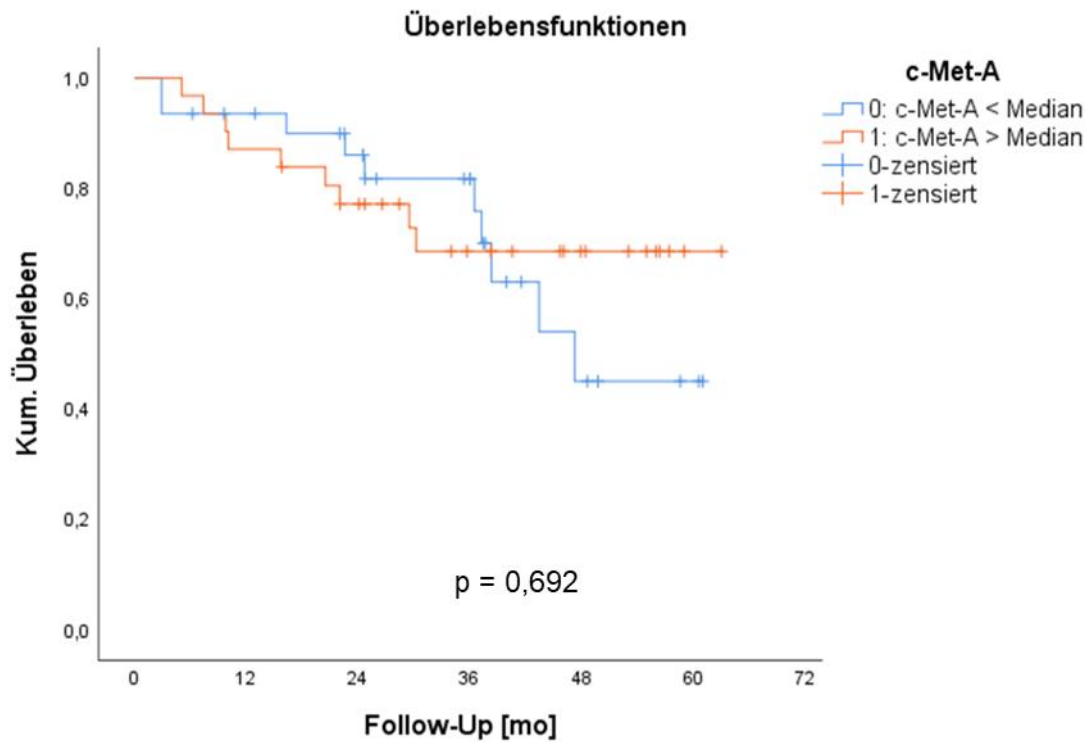


Abbildung 18: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der c-Met Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A). Vergleichsgruppen mit c-Met < (Gruppe 1) bzw. > (Gruppe 2) Median. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate.

In der Gruppe HGF < Median (Gruppe 1) verstarben im Laufe der Nachsorge 8 von 31 Patienten, während in Gruppe 2 (HGF > Median) 11 von 31 Patienten verstarben. Das niedrigere Gesamtüberleben von Gruppe 2 ist im Vergleich zu Gruppe 1 jedoch nicht signifikant niedriger, $p = 0,459$ (Abbildung 19). Nach drei Jahren gab es in Gruppe 1 sechs und in Gruppe 2 acht Ereignisse; das geschätzte 3-Jahres-Überleben liegt somit bei 77,7 % vs. 72,0 %.

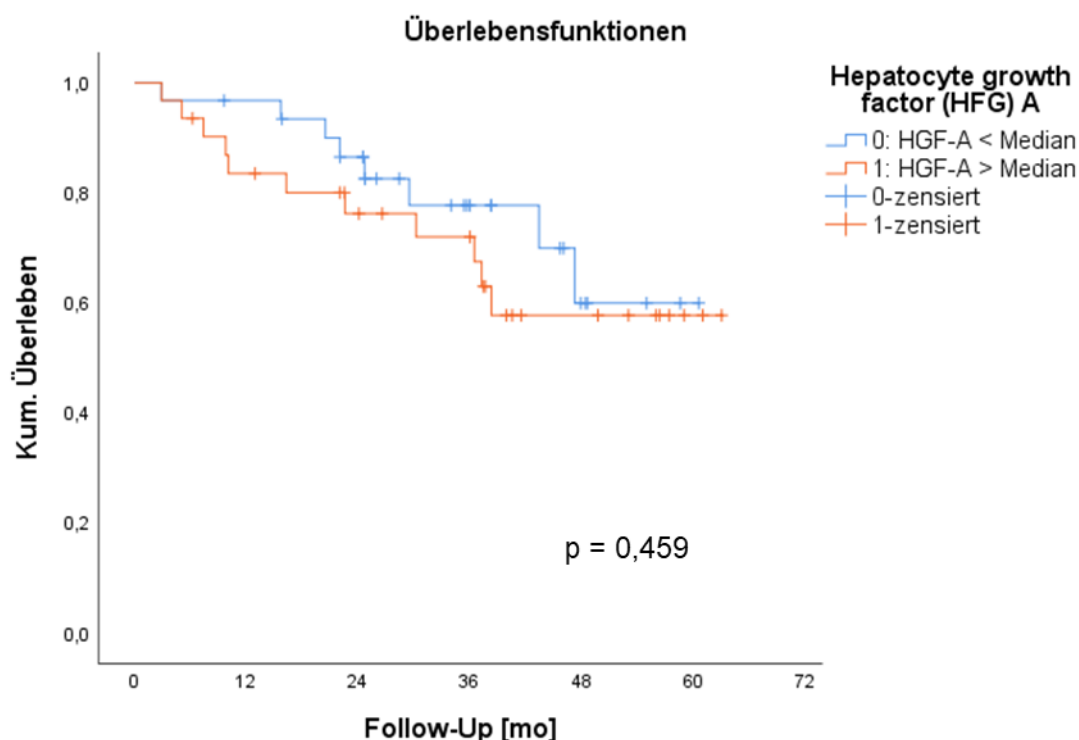


Abbildung 19: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A). Vergleichsgruppen mit HGF < (Gruppe 1) bzw. > (Gruppe 2) Median. Kum. Überleben: kumuliertes Überleben, mo: Monate.

4.4 Osteopontin

Beim Test auf Normalverteilung ergibt sich nur für OPN zu den Zeitpunkten D, E und H eine Normalverteilung (OPN-A: $p < 0,0001$; OPN-B: $p < 0,0001$; OPN-C: $p = 0,025$; OPN-D: $p = 0,552$; OPN-E: $p = 0,351$; OPN-F: $p < 0,0001$; OPN-G: $p < 0,0001$; OPN-H: $p = 0,250$). Daher wurden die logarithmisierten Werte der Osteopontin-Konzentrationen auf Normalverteilung getestet. Für diese ergab sich eine Normalverteilung (logOPN-A: $p = 0,964$; logOPN-B $p = 0,342$; logOPN-C $p = 0,572$; logOPN-D $p = 0,795$; logOPN-E $p = 0,906$; logOPN-F $p = 0,147$; logOPN-G $p = 0,343$; logOPN-H $p = 0,150$). Daher wurden für die folgenden t-Tests und ANOVAs ebenfalls die logarithmisierten Werte verwendet.

4.4.1 Die Osteopontin-Konzentration ist mit dem Tumorstadium assoziiert

OPN-A korreliert nicht mit dem initialen Tumorstadium. Es ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang für cT ($p = 0,93$), cN ($p = 0,631$), cM ($p = 0,585$) oder das präoperative UICC-Stadium ($p = 0,153$). Im Gegensatz dazu zeigt sich in Bezug auf das postoperative UICC-Stadium eine gering signifikante Korrelation zu OPN-A, $R = 0,201$, $p = 0,039$. Höhere OPN-Werte gehen mit höheren Tumorstadien einher. In der darauffolgenden

ANOVA-Analyse ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte, $p = 0,016$, für die logarithmisierten Werte (UICC 0: 2,61, UICC I: 2,79, UICC II: 2,87, UICC III: 2,79, UICC IV: 2,83). Der Mittelwert für Osteopontin A beträgt bei UICC 0 ($n = 8$) $415,85 \pm 62,58$ ng/ml, bei UICC I ($n = 14$) $642,41 \pm 183,26$ ng/ml, bei UICC II ($n = 13$) $826,48 \pm 422,17$ ng/ml, bei UICC III ($n = 20$) $666,87 \pm 242,77$ ng/ml und im UICC-Stadium IV ($n = 5$) $698,94 \pm 221,64$ ng/ml (Abbildung 20). Besonders die Unterschiede zwischen UICC 0 und II sind mit $p = 0,006$ statistisch signifikant. Zudem ergibt sich eine geringe signifikante Korrelation zwischen dem pT-Stadium und OPN-A, $R = 0,277$, $p = 0,006$. Der Mittelwertvergleich mittels ANOVA ergibt mit $p = 0,015$ einen signifikanten Unterschied zwischen den logarithmisierten Mittelwerten (pT0: 2,61, pT1: 2,69, pT2: 2,81, pT3: 2,82, pT4: 2,95). Insbesondere sind pT0 und pT2 bzw. pT0 und pT3 verschieden, $p = 0,001$, $p < 0,001$. Die Mittelwerte der OPN-Konzentrationen betragen bei pT0 ($n = 8$) $415,85 \pm 62,58$ ng/ml, bei pT1 ($n = 2$) $542,2 \pm 342,16$ ng/ml, bei pT2 ($n = 13$) $669,91 \pm 161,83$ ng/ml, bei pT3 ($n = 35$) $713,81 \pm 324,09$ ng/ml und bei pT4 ($n = 2$) $896,73 \pm 140,68$ ng/ml (Abbildung 21). Die OPN-A-Konzentrationen und pN korrelieren nicht signifikant miteinander, $p = 0,390$, OPN-A und pM ebenfalls nicht, $p = 0,556$. Zu den pathologischen Parametern Resektion, Lymphgefäßinvasion, venöse Invasion und Perineuralscheideninfiltration zeigt sich keine signifikante Korrelation ($p = 0,143$, $p = 0,543$, $p = 0,257$, $p = 0,467$).

Ergebnisse

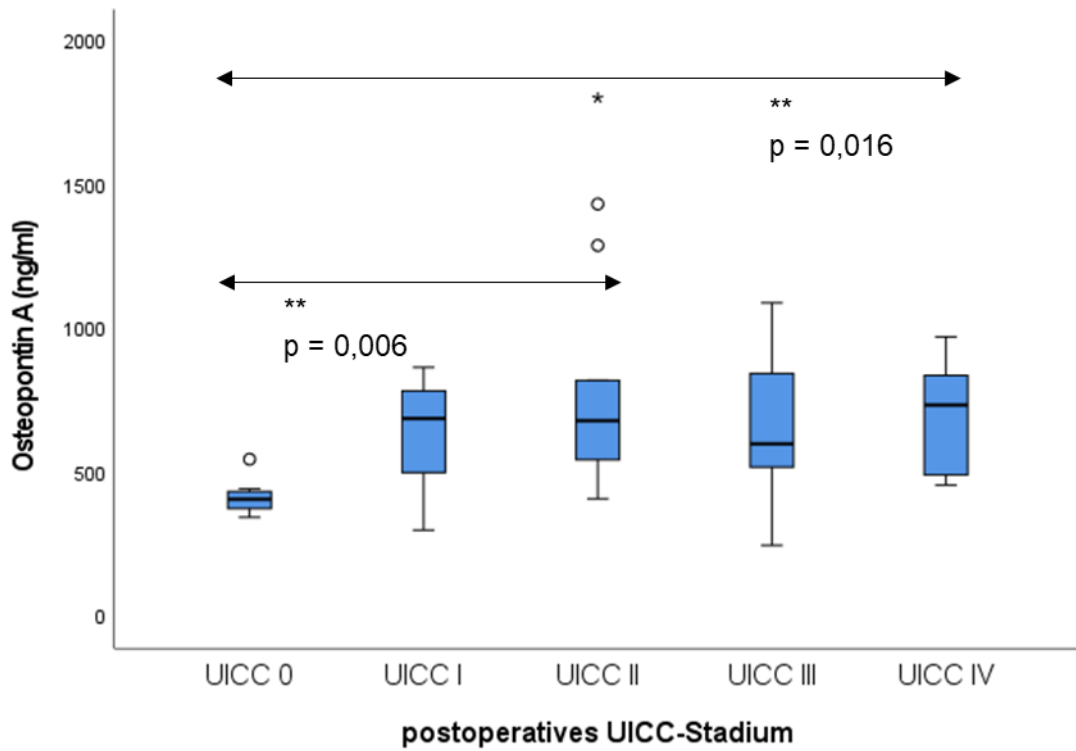


Abbildung 20: Osteopontin A (zum Zeitpunkt vor Beginn der neoadjuvanten Therapie) in Abhängigkeit vom postoperativen UICC-Stadium. UICC: Union for International Cancer Control. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

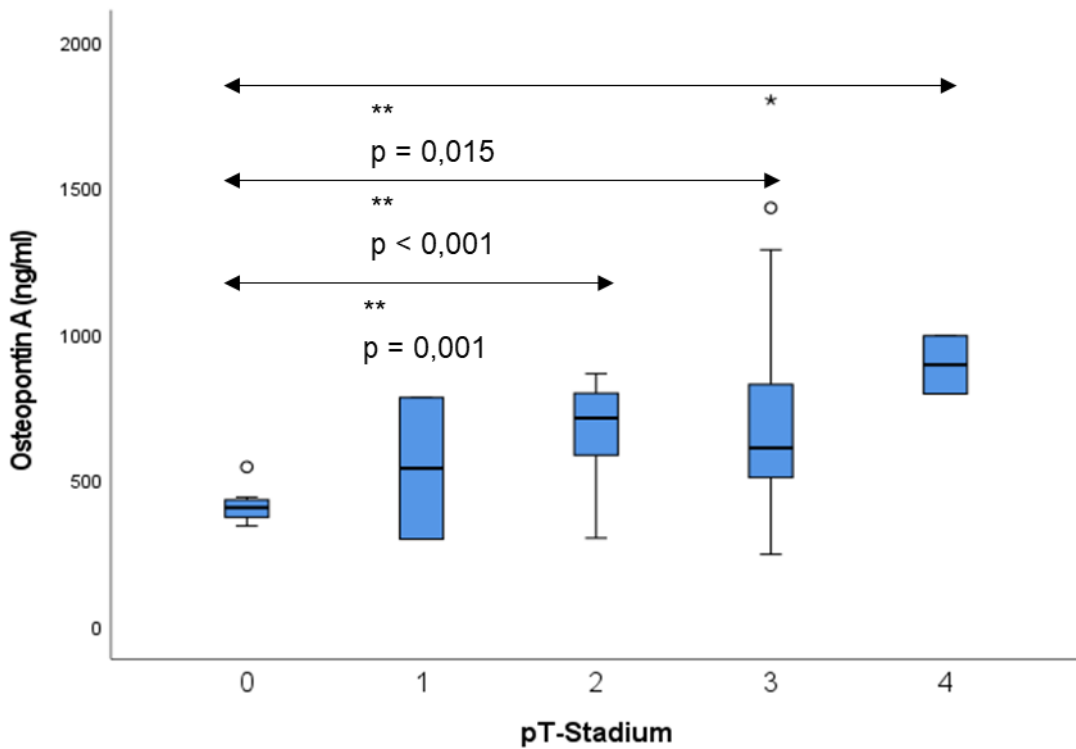


Abbildung 21: Osteopontin A (zum Zeitpunkt vor Beginn der neoadjuvanten Therapie) in Abhängigkeit vom pT-Stadium. pT: nach der pathologischen TNM-Klassifikation, Tumordinfiltrationstiefe. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

4.4.2 Osteopontin als prädiktiver Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie

Die pathologisch komplette Remission bzw. die pathologisch inkomplette Remission zeigen eine geringe signifikante Korrelation zu *OPN-A*, $R = 0,364$, $p = 0,001$. Im t-Test ergibt sich bei nach Levene-Test ungleichen Varianzen ein hochsignifikanter Unterschied der Mittelwerte, $p < 0,001$ (OPN logarithmisiert: pCR: 2,61, pIR: 2,82). In der Gruppe der Patienten mit pathologisch kompletter Remission ($n = 8$) beträgt der Mittelwert von OPN-A $415,85 \pm 62,58$ ng/ml, in der Gruppe mit pathologisch inkompletter Remission ($n = 52$) $703,27 \pm 285,85$ ng/ml (Abbildung 22). Die logistische Regressionsanalyse ergibt einen leicht prädiktiven Wert von OPN-A für die pCR mit $OR = 0,990$ und $p = 0,009$. Wenn sich der OPN-Wert also um 1 erhöht, sinkt die Wahrscheinlichkeit für das Erreichen einer pathologisch kompletten Remission um 1 %.

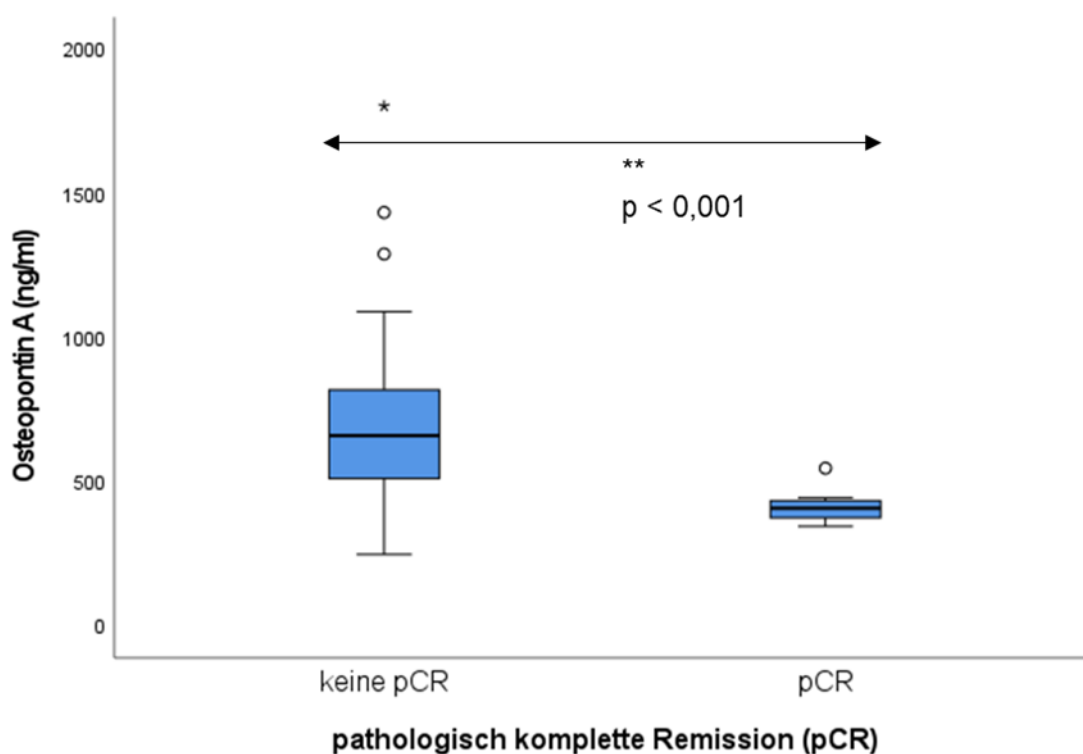


Abbildung 22: Osteopontin-Konzentration vor der neoadjuvanten Therapie (Osteopontin A) im Zusammenhang mit einer pathologisch kompletten Remission. 0 = keine pathologisch komplette Remission; 1 = pathologisch komplette Remission. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Zwischen dem NAR-Score und OPN-A besteht ebenfalls eine leichte signifikante Korrelation, $R = 0,216$ $p = 0,034$. Dabei unterscheiden sich die Mittelwerte der NAR-Score-Gruppen 1 (low, < 8), 2 (intermediate, $8 - 16$) und 3 (high, > 16) laut ANOVA

Ergebnisse

statistisch signifikant, $p = 0,003$ (OPN logarithmiert: NAR 1: 2,63, NAR 2: 2,84, NAR 3: 2,80). Vor allem die Mittelwerte von Gruppe 1 ($n = 10$) mit $441,12 \pm 137,45$ ng/ml und Gruppe 2 ($n = 25$) mit $746,15 \pm 329,74$ ng/ml bzw. von Gruppe 1 und Gruppe 3 ($n = 25$) mit $673,28 \pm 234,55$ ng/ml sind signifikant verschieden, $p = 0,002$, $p = 0,015$ (Abbildung 23). Gruppe 2 und Gruppe 3 werden dann zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst und Gruppe 1 gegenübergestellt (OPN logarithmiert: Gruppe 1: 2,63, Gruppe 2 + 3: 2,83). Dabei zeigt sich im t-Test ein hochsignifikanter Unterschied der logarithmierten Mittelwerte für Gruppe 1 ($n = 10$) mit 2,63 und für Gruppe 2+3 ($n = 50$) mit 2,83. Die OPN-Konzentrationen liegen in Gruppe 1 bei $441,12 \pm 137,45$ ng/ml und in Gruppe 2+3 bei $709,71 \pm 285,58$ ng/ml, $p < 0,001$. In der logistischen Regression ergibt sich ein leicht signifikanter prädiktiver Wert von OPN-A für den NAR-Score, $OR = 1,008$, $p = 0,007$. Steigt OPN-A um eine Einheit, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für einen höheren NAR-Score um 0,8 %.

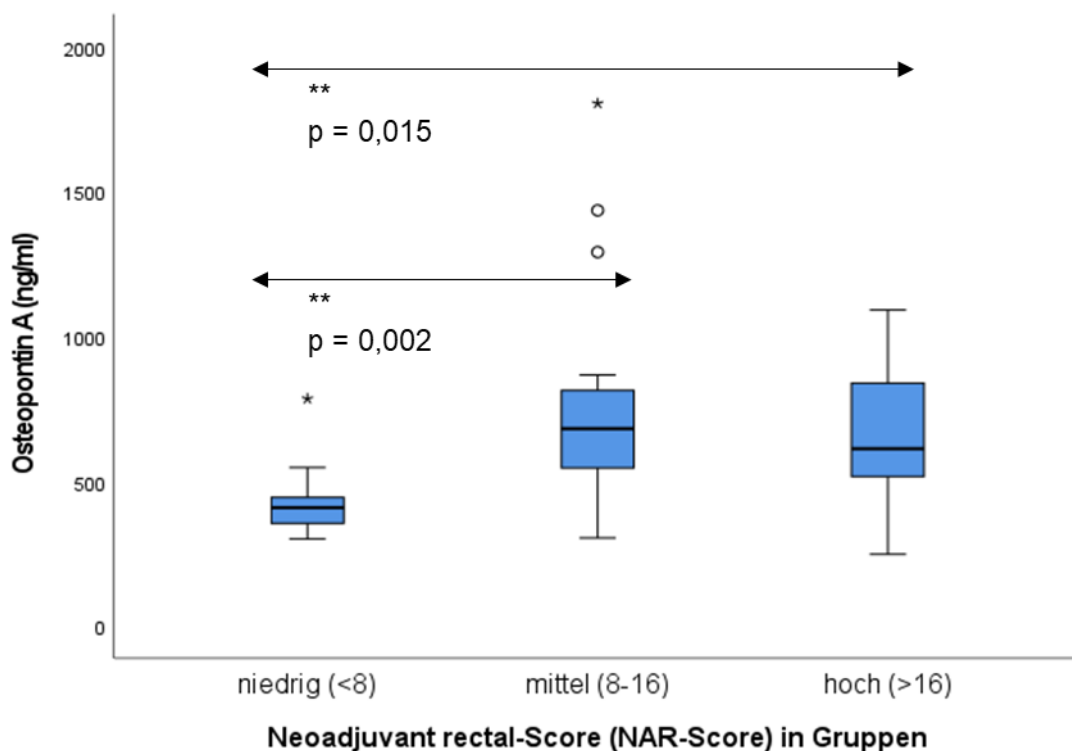


Abbildung 23: Osteopontinkonzentration zum Zeitpunkt A (vor Beginn der neoadjuvanten Therapie) in Abhängigkeit vom NAR-Score (Neoadjuvant Rectal Score). Gruppe 1 „Low“ (<8), Gruppe 2 „Intermediate“ (8-16) und Gruppe 3 „High“ (>16). Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Die Tumorregression nach Dworak korreliert sowohl in den einzelnen Stadien (0 - 4) als auch gruppiert (0 + 1 vs. 2 + 3 vs. 4) und binär (0 + 1 + 2 vs. 3 + 4) leicht mit OPN-A, $R = -0,276$, $p = 0,008$; $R = -0,229$, $p = 0,035$; $R = -0,338$, $p = 0,003$. Die Mittelwerte der

einzelnen Stadien unterscheiden sich signifikant, $p = 0,016$. Auch für die gruppierte Tumorregression zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte, $p = 0,015$ (Mittelwerte für logarithmisierte OPN-A-Konzentrationen: geringe Regression: 2,80; mittlere Regression: 2,81; komplette Regression: 2,60). Die Mittelwerte der OPN-Konzentrationen liegen für eine geringe Regression ($n = 16$) bei $683,33 \pm 288,67$ ng/ml, für eine mittlere Regression ($n = 31$) bei $692,10 \pm 301,04$ ng/ml und für eine komplette Regression ($n = 7$) bei $406,83 \pm 77,86$ ng/ml (Abbildung 24). Bei binärer Betrachtung ergibt sich ebenfalls eine Signifikanz für einen Unterschied der Mittelwerte, $p = 0,004$ (Mittelwerte für logarithmisierte OPN-A-Konzentrationen: TRG 0 + 1 + 2: 2,82; TRG 3 + 4: 2,68). Die Mittelwerte der OPN-A-Konzentrationen betragen für TRG 0 + 1 + 2 ($n = 37$) $720,48 \pm 305,66$ ng/ml und für TRG 3 + 4 ($n = 17$) $504,62 \pm 191,24$ ng/ml. Mithilfe der logistischen Regression werden Non-/Low-Responder (TRG 0,1,2) mit Respondern (TRG 3,4) verglichen. Dabei zeigt sich eine signifikante Aussagekraft von OPN-A für die Regression, $OR = 0,996$, $p = 0,007$. Das heißt, wenn der OPN-Wert um 1 steigt, sinkt die Wahrscheinlichkeit für ein TRG von 3 oder 4 um 0,4 %.

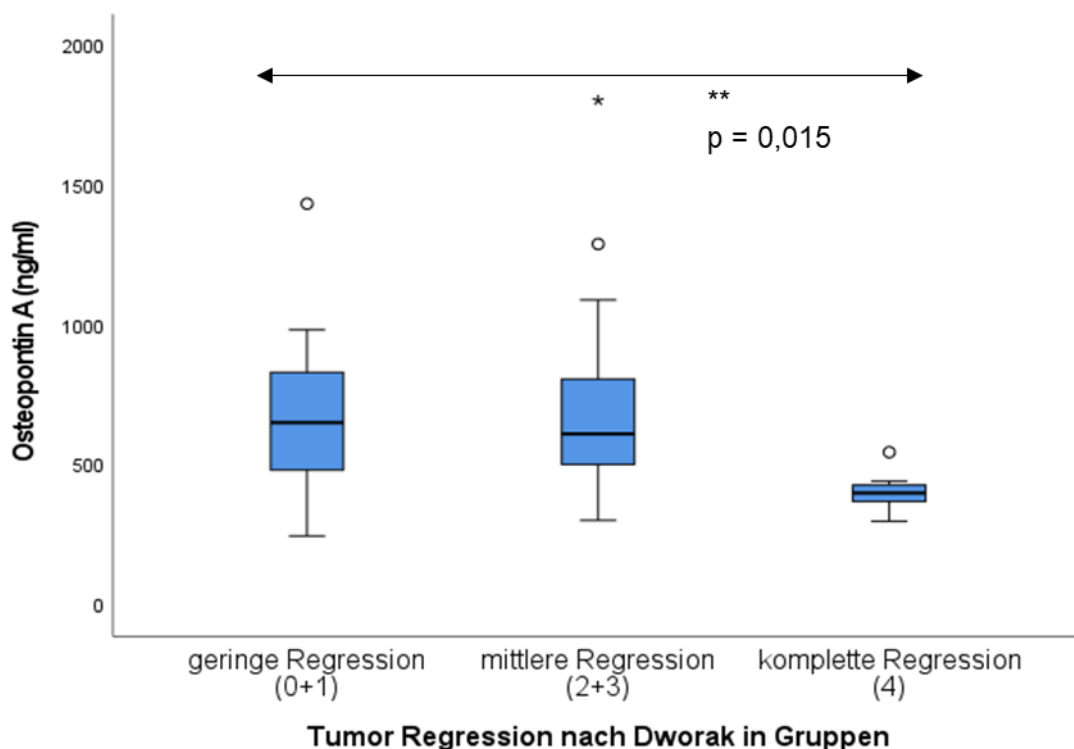


Abbildung 24: Osteopontinkonzentration zum Zeitpunkt A (vor Beginn der neoadjuvanten Therapie) je nach Regression nach Dworak. Hierbei erfolgte die Unterteilung in geringe Regression (Dworak 0 und 1), mittlere Regression (Dworak 2 und 3) und komplette Regression (Dworak 4). Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Zum Therapieansprechen im Sinne einer Änderung des UICC-Stadiums besteht keine signifikante Korrelation von OPN-A, $p = 0,553$.

4.4.3 Osteopontin im Verlauf

Die Mittelwerte der Osteopontin-Konzentration verändern sich im Laufe des Follow-Ups (Abbildung 25), wobei einzelne Werte miteinander korrelieren. Mit abgebildet im Schaubild ist die Anzahl der Patientenproben zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Ein hoher Ausgangswert von Osteopontin (OPN-A) korreliert nach Pearson stark mit OPN-B ($R = 0,626$, $p < 0,001$), OPN-C ($R = 0,646$, $p = 0,002$), OPN-D ($R = 0,763$, $p = 0,010$) und OPN-H ($R = 0,725$, $p = 0,027$). Mit OPN-E, OPN-F und OPN-G korreliert der Ausgangswert hingegen nicht. OPN-B und OPN-C korrelieren stark miteinander ($R = 0,769$, $p < 0,001$). Zudem besteht eine geringe Korrelation von OPN-B mit OPN-F ($R = 0,490$, $p = 0,008$). Im t-Test sind die logarithmisierten Mittelwerte von OPN-A und OPN-H, OPN-B und OPN-F sowie OPN-B und OPN-H mit $p = 0,013$, $p = 0,007$ und $p = 0,038$ signifikant verschieden.

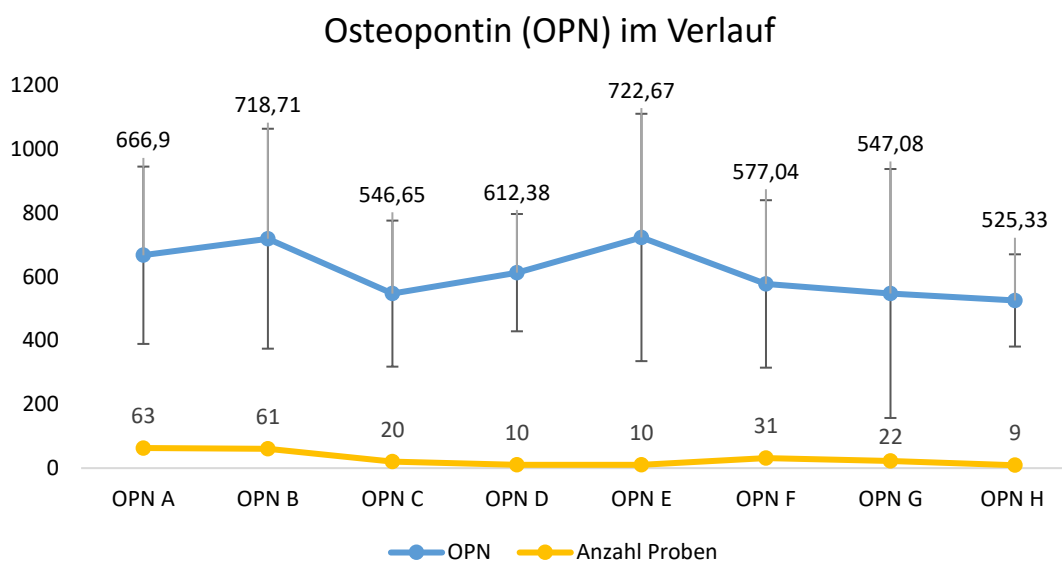


Abbildung 25: Osteopontin-Konzentration. Mittelwert der Osteopontin-Konzentration \pm Standardabweichung zu den verschiedenen Zeitpunkten der Blutentnahme. (OPN-A: $666,86 \pm 277,73$ ng/ml; OPN-B: $718,71 \pm 344,52$ ng/ml; OPN-C: $546,65 \pm$ ng/ml; OPN-D: $612,65 \pm 183,72$ ng/ml; OPN-E: $722,67 \pm 387,46$ ng/ml; OPN-F: $577,04 \pm 262,28$ ng/ml; OPN-G: $547,08 \pm 389,98$ ng/ml; OPN-H: $525,33 \pm 144,48$ ng/ml). Mit abgebildet ist die Anzahl der Patientenproben zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. OPN A: Vor der Radiotherapie; OPN B: Nach der Radiotherapie; OPN C: Vor der Operation; OPN D: Vor der adjuvanten Chemotherapie; OPN E: Nach der adjuvanten Chemotherapie; OPN F: 1. Nachsorge (Median: 10,7 Monate nach der Radiotherapie); OPN G: 2. Nachsorge (Median: 22,4 Monate nach der Radiotherapie); OPN H: 3. Nachsorge (Median: 34 Monate nach der Radiotherapie).

Eine generelle Progression der Erkrankung (Tumorprogress, Fernmetastasen, Lymphknotenmetastasen, Lokalrezidiv) korreliert nicht signifikant mit OPN-A, $p = 0,274$, aber mit OPN-F, $R = 0,326$, $p = 0,031$. Auch sind die Werte insgesamt im Verlauf bei Auftreten einer Progression höher als bei bestehender Remission (Abbildung 26). Im t-Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied der logarithmisierten Mittelwerte von OPN-F ($n = 31$) bei Patienten mit (log-OPN-F: 2,82) und ohne Progression (log-OPN-F: 2,69), $p = 0,039$. In der Gruppe mit Progression ($n = 10$) liegt der Mittelwert bei $711,68 \pm 361,42$ ng/ml, während er in der Gruppe ohne Progression ($n = 21$) $512,92 \pm 176,13$ ng/ml beträgt.

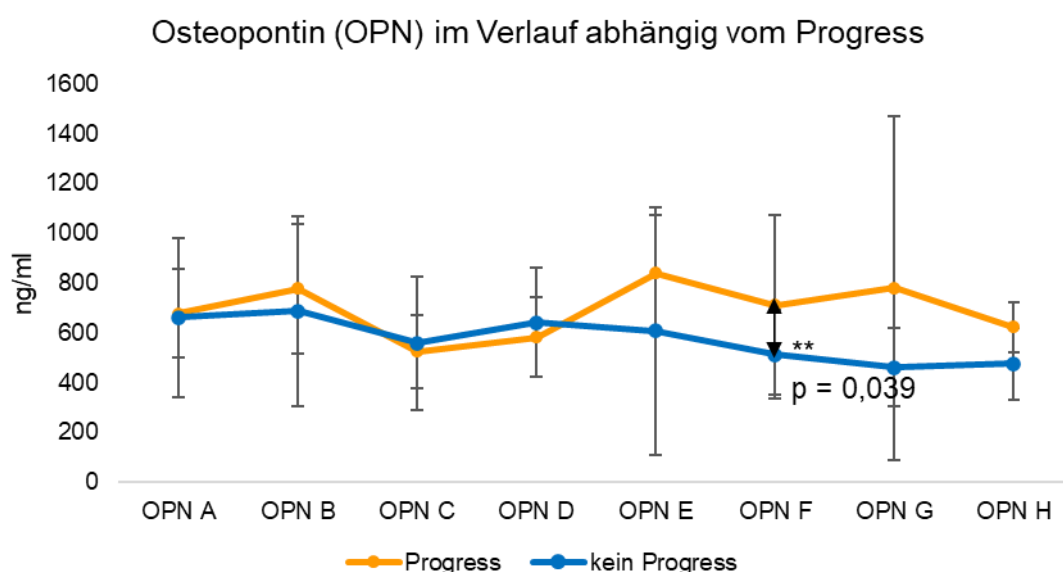


Abbildung 26: Verlauf der Osteopontin-Konzentration in Bezug auf einen Krankheitsprogress. Mittelwert der Osteopontin-Konzentration (ng/ml) \pm Standardabweichung zu den verschiedenen Zeitpunkten der Blutentnahme, abhängig vom Auftreten eines Krankheitsprogresses. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet. OPN kein Progress: A $661,3 \pm 318,0$, B $687,33 \pm 380,65$, C $558,5 \pm 267,29$, D $641,95 \pm 219,87$, E $606,85 \pm 498,74$, F $512,92 \pm 176,13$, G $460,04 \pm 157,46$, H $476,54 \pm 143,89$; OPN Progress: A $677,97 \pm 177,82$, B $778,5 \pm 260,41$, C $524,65 \pm 148,28$, D $582,82 \pm 159,42$, E $838,49 \pm 235,62$, F $711,68 \pm 361,42$, G $779,20 \pm 689,54$, H $622,92 \pm 101,55$. Alle Angaben in ng/ml. OPN A: Vor der Radiotherapie; OPN B: Nach der Radiotherapie; OPN C: Vor der Operation; OPN D: Vor der adjuvanten Chemotherapie; OPN E: Nach der adjuvanten Chemotherapie; OPN F: 1. Nachsorge (Median: 10,7 Monate nach der Radiotherapie); OPN G: 2. Nachsorge (Median: 22,4 Monate nach der Radiotherapie); OPN H: 3. Nachsorge (Median: 34 Monate nach der Radiotherapie).

Zwischen OPN-A und dem Auftreten von Fernmetastasen besteht keine signifikante Korrelation, $p = 0,075$, aber eine leichte zwischen OPN-B und dem Auftreten von Fernmetastasen, $R = 0,262$, $p = 0,014$. Signifikante Unterschiede ergeben sich bei OPN-B, $p = 0,012$ (logarithmisierte Mittelwerte: M0: 2,77; M1: 2,91). Die OPN-B-Konzentrationen besitzen Mittelwerte von $656,98 \pm 329,21$ ng/ml für M0 ($n = 43$) und $866,18 \pm 344,23$ ng/ml für M1 ($n = 18$) (Abbildung 27). Es zeigt sich keine signifikante

Korrelation zwischen dem Auftreten eines Lokalrezidivs und OPN-A, $p = 0,555$, jedoch mit OPN-F, $R = 0,470$, $p = 0,002$. Die Mittelwerte von OPN-F sind je nach Auftreten eines Lokalrezidivs signifikant verschieden, $p = 0,003$ (Abbildung 28). Diese betragen $510,76 \pm 166,39$ ng/ml ohne und $853,17 \pm 407,90$ ng/ml mit Lokalrezidiv.

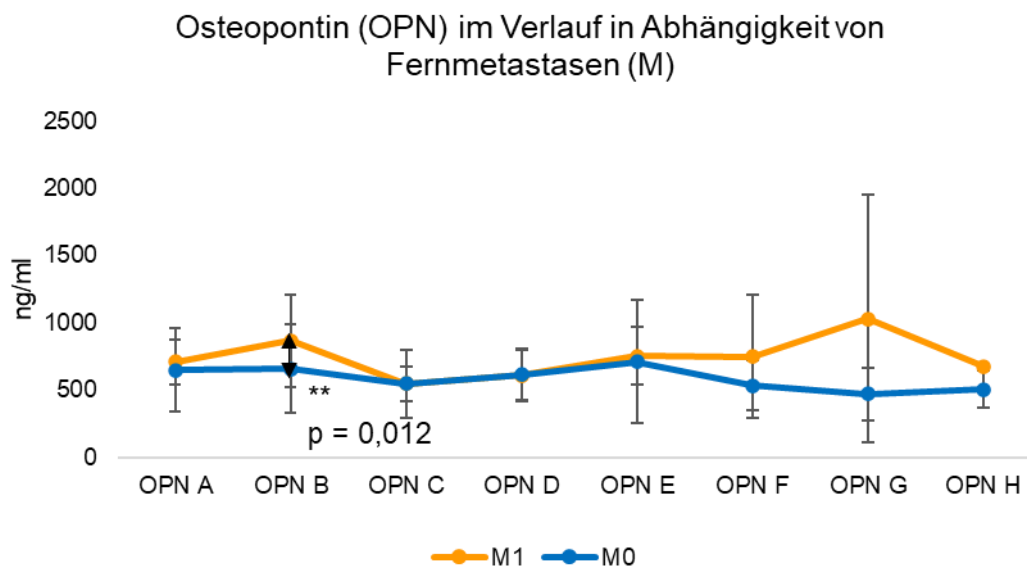


Abbildung 27: Verlauf der Osteopontin-Konzentration in Bezug auf das Auftreten von Fernmetastasen. Mittelwert der Osteopontin-Konzentration (ng/ml) \pm Standardabweichung zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet. OPN M0: A $649,84 \pm 311,56$, B $656,98 \pm 329,21$, C $546,03 \pm 250,98$, D $613,20 \pm 198,54$, E $709,78 \pm 457,51$, F $535,58 \pm 181,94$, G $470,66 \pm 193,08$, H $506,43 \pm 142,06$; OPN M1: A $709,39 \pm 165,47$, B $866,18 \pm 344,23$, C $549,11 \pm 128,50$, D $610,48 \pm 183,38$, E $752,75 \pm 213,79$, F $749,78 \pm 457,64$, G $1031,09 \pm 924,37$, H $676,55$. Alle Angaben in ng/ml. OPN A: Vor der Radiotherapie; OPN B: Nach der Radiotherapie; OPN C: Vor der Operation; OPN D: Vor der adjuvanten Chemotherapie; OPN E: Nach der adjuvanten Chemotherapie; OPN F: 1. Nachsorge (Median: 10,7 Monate nach der Radiotherapie); OPN G: 2. Nachsorge (Median: 22,4 Monate nach der Radiotherapie); OPN H: 3. Nachsorge (Median: 34 Monate nach der Radiotherapie).

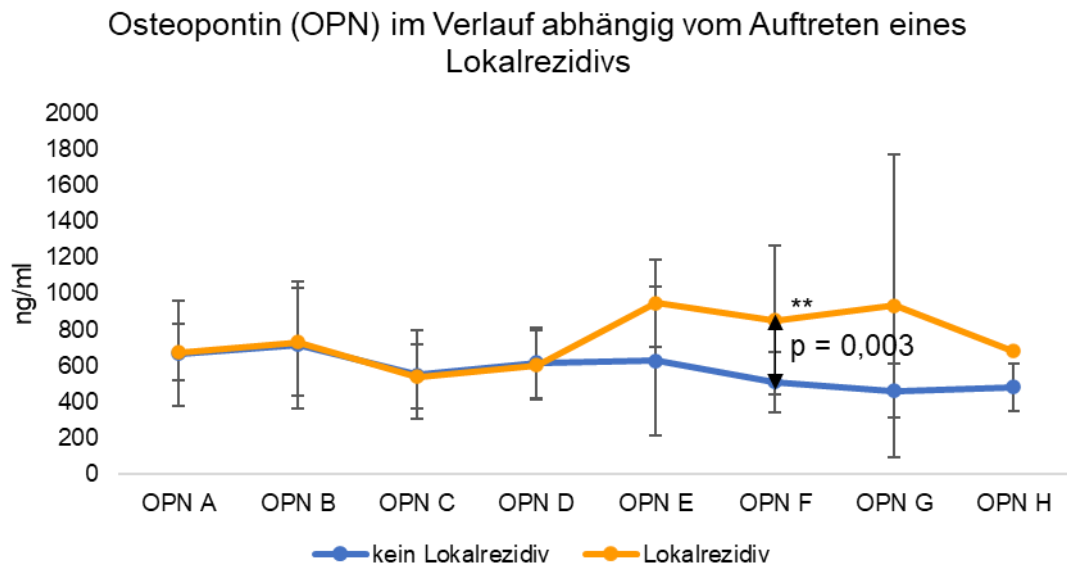


Abbildung 28: Osteopontin-Konzentration in Bezug auf das Auftreten eines Lokalrezidivs. Mittelwert der Osteopontin-Konzentration (ng/ml) ± Standardabweichung während der Nachsorge, abhängig vom Auftreten eines Lokalrezidivs. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet. OPN kein Lokalrezidiv: A 665,99±290,25, B 717,07±352,35, C 548,36±244,90, D 616,12±195,37, E 626,89±412,28, F 510,76±166,39, G 461,58±149,03, H 480,72±131,81; OPN Lokalrezidiv: A 673,83±157,33, B 731,43±300,11, C 539,80±177,59, D 603,66±192,92, E 946,17±241,62, F 853,17±407,90, G 931,85±835,14, H 681,48±6,96. Alle Angaben in ng/ml. OPN A: Vor der Radiotherapie; OPN B: Nach der Radiotherapie; OPN C: Vor der Operation; OPN D: Vor der adjuvanten Chemotherapie; OPN E: Nach der adjuvanten Chemotherapie; OPN F: 1. Nachsorge (Median: 10,7 Monate nach der Radiotherapie); OPN G: 2. Nachsorge (Median: 22,4 Monate nach der Radiotherapie); OPN H: 3. Nachsorge (Median: 34 Monate nach der Radiotherapie).

4.5 c-Met

Für c-Met-A, c-Met-B und c-Met-C ergibt sich eine Normalverteilung, $p = 0,391$, $p = 0,842$ und $p = 0,150$.

4.5.1 c-Met und klinisch-pathologische Daten

c-Met-A korreliert nicht mit den klinischen oder pathologischen Tumorstadien. Es ergeben sich mit $p = 0,062$, $p = 0,154$ und $p = 0,938$ keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zum cT-, cN oder cM-Stadium. Des Weiteren findet sich keine signifikante Korrelation zum präoperativen UICC-Stadium, $p = 0,888$. C-Met-A zeigt ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zu pT, pN und pM oder dem postoperativen UICC-Stadium, $p = 1,00$, $p = 0,620$, $p = 0,447$ und $p = 0,898$. Des Weiteren ergibt sich kein Zusammenhang zwischen c-Met-A und den pathologischen Daten R0/R1, V0/V1, L0/L1, Pn0/Pn1 oder dem Grading ($p = 0,121$; $p = 0,422$; $p = 0,877$; $p = 0,066$, $p = 0,971$).

4.5.2 c-Met ist kein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz

Mithilfe von c-Met-A lässt sich keine deutliche Aussage über das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie treffen. So zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen c-Met-A und einer pathologisch kompletten Remission, $p = 0,982$. Es ergibt sich weder ein Zusammenhang zum gruppierten noch zum binären NAR-Score, $p = 0,943$, $p = 0,936$. Die einzelnen Grade der Tumorregression (0 - 4) korrelieren nicht mit c-Met-A, $p = 0,190$, wie auch nicht die binäre Einteilung, $p = 0,295$. Lediglich zur gruppierten Einteilung (0 + 1 vs. 2 + 3 vs. 4) zeigt sich eine geringe Korrelation, $R = 0,219$, $p = 0,046$. Zum Therapieansprechen im Rahmen eines Downstaging besteht ebenfalls keine Korrelation, $p = 0,988$. In der logistischen Regressionsanalyse zeigt sich kein prädiktiver Wert von c-Met-A für pCR, Downstaging, Regression oder den NAR-Score.

4.5.3 c-Met im Verlauf

Die Mittelwerte von c-Met verändern sich im Erkrankungsverlauf, wobei c-Met-A mit c-Met-B korreliert und c-Met-B mit c-Met-C, $R = 0,448$ $p < 0,001$, $R = 0,782$ $p < 0,001$. Die Mittelwerte von c-Met-A und -B sind mit $636,00 \pm 140,61$ ng/ml und $596,36 \pm 150,26$ ng/ml, $p = 0,043$, signifikant verschieden. Die Mittelwerte von c-Met-B mit $582,69 \pm 10,23$ ng/ml und c-Met-C mit $663,09 \pm 117,62$ ng/ml unterscheiden sich ebenfalls signifikant, $p = 0,038$,

Es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation von c-Met-A zum Auftreten eines generellen Progresses, $p = 0,557$. Jedoch korrelieren die Verlaufswerte c-Met-B und -C leicht bzw. mittelstark mit einer Tumorprogression, $R = -0,222$, $p = 0,035$, $R = -0,533$, $p = 0,011$ (Abbildung 29). Im t-Test zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte von c-Met-B bei Progression ($n = 21$) und ohne Progression ($n = 41$) mit $543,58 \pm 128,45$ ng/ml bzw. $623,39 \pm 154,83$ ng/ml und $p = 0,047$. Für c-Met-C sind die Mittelwerte mit $582,78 \pm 58,39$ ng/ml (Progression, $n = 7$) und $719,30 \pm 117,45$ ng/ml (keine Progression, $n = 10$) ebenfalls signifikant verschieden, $p = 0,013$ (Abbildung 28).

Ergebnisse

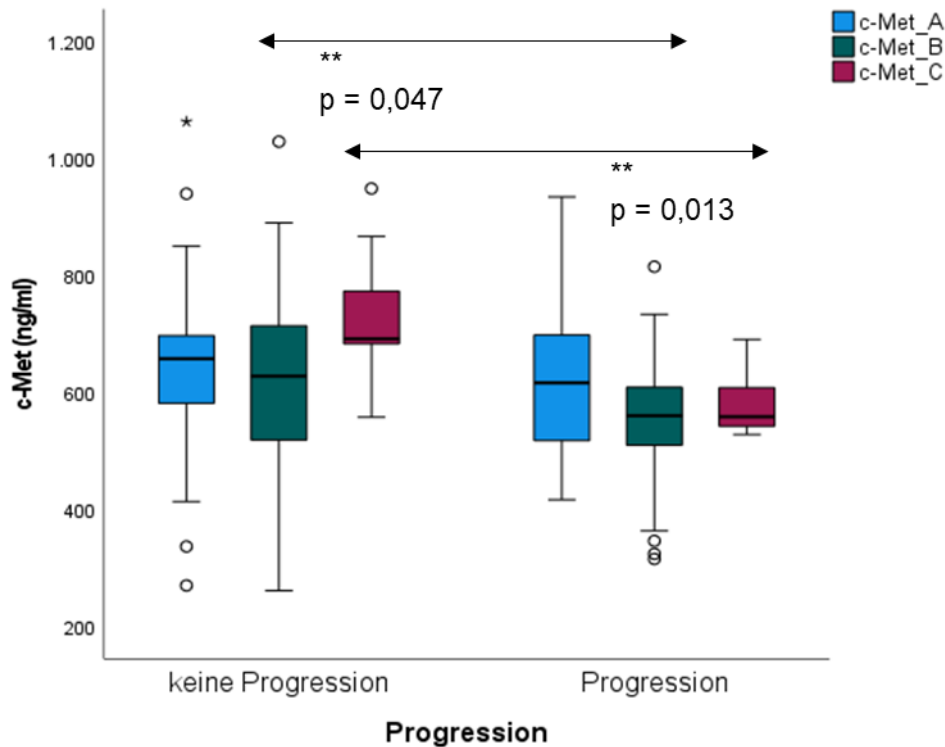


Abbildung 29: c-Met-Konzentrationen je nach Krankheitsprogression. Die Konzentrationen von c-Met zu den Zeitpunkten A, B und C in Abhängigkeit vom Auftreten einer Progression der Erkrankung. A: Vor Beginn der neoadjuvanten Therapie, B: nach Beendigung der neoadjuvanten Therapie, C: vor der Operation. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

Zwischen c-Met-A und dem Auftreten eines Lokalrezidivs besteht mit $p = 0,368$ keine signifikante Korrelation. Für c-Met-B und c-Met-C ergibt sich eine leichte bzw. mittelstarke Korrelation zum Auftreten eines Lokalrezidivs, $R = -0,252$ $p = 0,017$, $R = -0,499$, $p = 0,017$ mit im t-Test signifikant verschiedenen Mittelwerten, $p = 0,016$, $p = 0,030$ (Abbildung 30). Für Patienten mit Lokalrezidiv ($n = 7$) ergibt sich ein Mittelwert von c-Met-B von $469,09 \pm 145,31$ ng/ml, für Patienten ohne Lokalrezidiv ($n = 55$) $612,55 \pm 144,20$ ng/ml. Für c-Met-C zeigen sich Mittelwerte von $555,06 \pm 26,12$ ng/ml bei Patienten mit Lokalrezidiv ($n = 4$) und $696,32 \pm 114,84$ ng/ml bei Patienten ohne Lokalrezidiv ($n = 13$). c-Met-A, -B und -C korrelieren nicht mit dem Auftreten von Fernmetastasen, $p = 0,545$, $p = 0,141$, $p = 0,054$. Somit sind höhere Werte von c-Met-B und c-Met-C, nicht jedoch von c-Met-A mit einem geringeren Auftreten einer Progression bzw. eines Lokalrezidivs assoziiert. Zum Auftreten von Fernmetastasen besteht kein Zusammenhang.

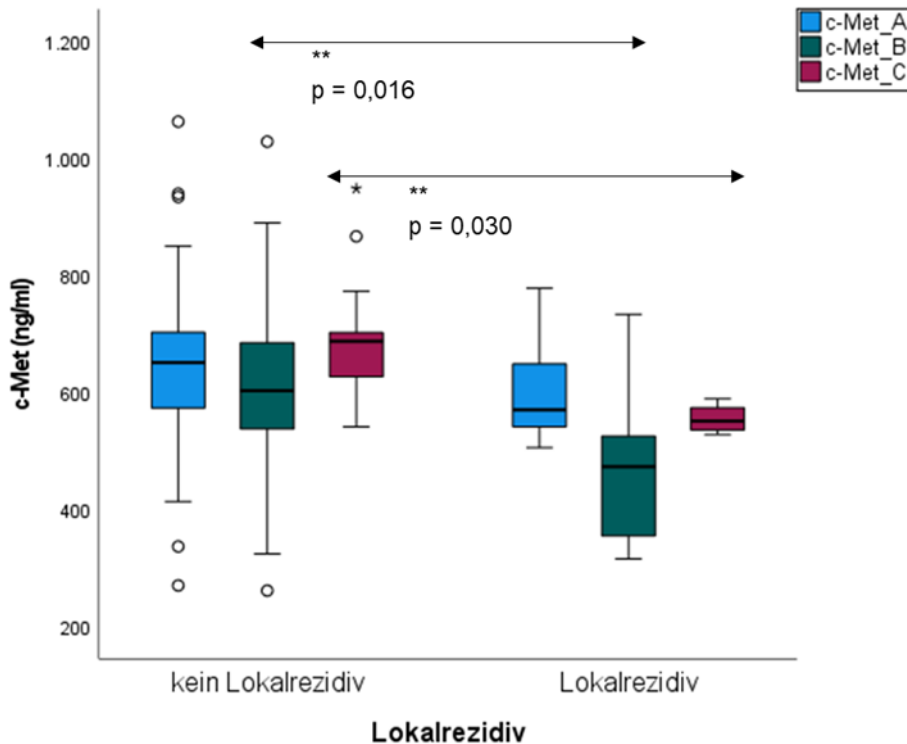


Abbildung 30: c-Met-Konzentrationen und Lokalrezidive. Die Konzentrationen von c-Met zu den verschiedenen Zeitpunkten A, B und C in Abhängigkeit vom Auftreten eines Lokalrezidivs. Signifikante Unterschiede sind mit ** gekennzeichnet.

4.6 Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Für HGF-A und HGF-B ergibt sich keine Normalverteilung.

4.6.1 HGF und klinisch-pathologische Daten

HGF-A korreliert leicht mit dem cT-Stadium, $R = -0,249$, $p = 0,016$. Im Mittelwertvergleich ergibt sich für cT2 ($n = 7$) mit $757,59 \pm 84,46$ pg/ml, cT3 ($n = 50$) mit $945,99 \pm 378,0$ pg/ml und cT4 ($n = 5$) mit $1049,71$ pg/ml kein signifikanter Unterschied, $p = 0,052$. Zu cN- und cM-Stadium bzw. dem präoperativen UICC-Stadium kann keine Korrelation festgestellt werden, $p = 0,761$, $p = 0,903$, $p = 0,673$. Auch zu den pT-, pN- und pM-Stadien sowie dem postoperativen UICC-Stadium besteht keine signifikante Korrelation, $p = 0,670$, $p = 0,149$, $p = 0,208$, $p = 0,622$. HGF-A korreliert leicht mit dem Grading und der Perineuralscheideninfiltration, $R = -0,219$, $p = 0,040$, $R = -0,290$, $p = 0,016$. Im Mittelwertvergleich ergibt sich kein signifikanter Unterschied für das Grading, $p = 0,122$. Für das Vorliegen einer Perineuralscheideninfiltration zeigen sich mit $880,65 \pm 258,67$ pg/ml bei Pn0 ($n = 43$) und $704,42 \pm 41,46$ pg/ml bei Pn1 ($n = 5$) signifikant verschiedene Mittelwerte, $p = 0,016$. Zu R, L und V besteht keine Korrelation, $p = 0,180$, $p = 0,757$, $p = 0,498$. Die Zusammenhänge sind jeweils negativ, sodass ein

höherer HGF-Wert mit einem geringeren cT-Stadium und einem geringeren Grading, sowie Pn0 assoziiert ist.

4.6.2 HGF ist kein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz.

HGF-A korreliert nicht mit dem Downstaging oder einer pathologisch kompletten Remission, $p = 0,241$, $p = 0,084$. Zudem zeigt sich weder für den gruppierten NAR-Score noch den binären NAR-Score eine signifikante Korrelation, $p = 0,629$, $p = 0,286$. Zwischen HGF-A und der einzelnen bzw. gruppierten- und binären Tumorregression kann ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, $p = 0,445$, $p = 0,627$, $p = 0,295$. In der logistischen Regression zeigt sich kein prädiktiver Wert von HGF für Downstaging, pCR, NAR-Score oder TRG.

4.6.3 HGF und Verlaufparameter

HGF-A und HGF-B korrelieren statistisch signifikant miteinander, $R = 0,369$ $p = 0,003$. Im Mittelwertvergleich ergibt sich mit $933,08 \pm 352,77$ pg/ml (HGF-A) und $1019,25 \pm 681,14$ pg/ml kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte, $p = 0,836$. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen HGF-A oder HGF-B und dem Auftreten einer Tumorprogression, $p = 0,577$, $p = 0,958$, eines Lokalrezidivs, $p = 0,404$, $p = 0,081$, oder von Fernmetastasen, $p = 0,321$, $p = 0,368$.

4.7 Korrelationen zwischen den Biomarkern

Es zeigt sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen OPN-A und HGF-A, Korrelationskoeffizient R nach Pearson, $R = 0,483$, $p < 0,001$ (Abbildung 31). Die lineare Regressionsanalyse ergibt ebenfalls einen statistisch hochsignifikanten Zusammenhang, $p < 0,0001$. Zwischen OPN-A und c-Met-A, $p = 0,395$, zeigt sich keine signifikante Korrelation, wie auch nicht zwischen c-Met-A und HGF-A, $p = 0,361$.

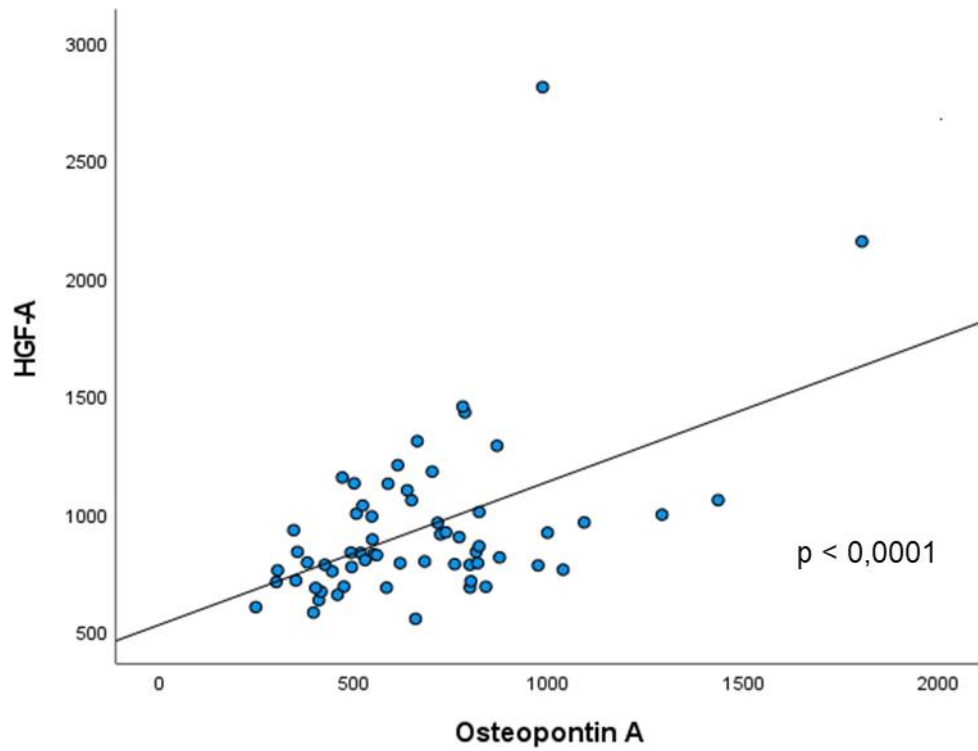


Abbildung 31: Abhängigkeit von OPN-A und HGF-A. Korrelationskoeffizient nach Pearson, $R = 0,483$, $p < 0,001$. Lineare Regressionsanalyse mit signifikanter Korrelation, $p < 0,0001$. A: Vor Beginn der neoadjuvanten Therapie, HGF: hepatocyte growth factor, OPN: Osteopontin.

5 Diskussion

5.1 Überleben

In unserem Patientenkollektiv verstarben innerhalb von 60 Monaten 20 der 68 Personen (29,4 %). Dies entspricht der aus der Literatur bekannten Mortalitätsrate beim Rektumkarzinom [4, 87]. Es zeigte sich ein verkürztes Überleben bei Patienten mit einem höheren postoperativen UICC-Stadium und Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (pN+, pM+). Zudem gingen eine inkomplette Resektion, eine venöse Infiltration und eine Perineuralscheideninfiltration mit einer schlechteren Prognose einher. Auch ein schlechteres Therapieansprechen nach Dworak, ein hoher NAR-Score, eine pIR und ein geringeres Downstaging waren mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Seit Etablierung der neoadjuvanten Therapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom konnte zwar die Lokalrezidivrate deutlich gesenkt werden (5 - 10 %), nicht jedoch die Rate an Fernmetastasierung (bis zu 30 %) [88]. In unserem Patientenkollektiv gab es 7 Lokalrezidive (10,3 %) und 19 Fernmetastasen (27,9 %), was mit diesen internationalen Ergebnissen vergleichbar ist. Für den langfristigen Krankheitsverlauf schien das Auftreten von Fernmetastasen der entscheidende limitierende Faktor. So zeigte sich keine signifikante Assoziation eines Lokalrezidivs mit dem Überleben und das 3-Jahres-Überleben mit und ohne Lokalrezidiv unterschied sich nur gering (71,4 % und 75,2 %); das Auftreten von Fernmetastasen korrelierte hingegen hochsignifikant mit dem Überleben, $p = 0,0004$, und das 3-Jahres-Überleben war mit 87,1 % (keine Fernmetastasen) und 45,4 % (Fernmetastasen) deutlich verschieden. Dies zeigt auch in der vorliegenden Arbeit, dass die neoadjuvante Therapie mit der Reduktion der Lokalrezidivrate keinen großen Einfluss auf das Langzeitüberleben hat und eine systemische Krankheitskontrolle dringend nötig ist. Bisher wird die Prognose für das Überleben im klinischen Alltag anhand des Tumorstadiums und pathologischer Daten gestellt. Nun werden Biomarker gesucht, die einfach und minimalinvasiv wiederholt aus dem Blut bestimmt werden können und eine frühzeitige Einschätzung der Prognose und das Ergreifen notwendiger therapeutischer Maßnahmen ermöglichen.

5.1.1 Osteopontin als Prognosemarker für das Langzeitüberleben

In unserer Fallgruppe von Patienten mit Rektumkarzinom zeigte sich ein hochsignifikant längeres Überleben in der Gruppe mit niedrigen Osteopontin-Ausgangswerten im Vergleich zur Gruppe mit höheren Werten, $p < 0,001$. Es verstarben bei gleichem Stichprobenumfang nur 4 statt 15 Patienten und das 3-Jahres-Überleben lag bei 91,8 %

im Vergleich zu 58,6 %. Es gab somit insgesamt mit höherem Osteopontin-Wert eine erhöhte Sterberate und eine kürzere Überlebenszeit. Damit unterstützen unsere Ergebnisse die Aussagen einer Vielzahl von Studien, wonach Osteopontin bei Krebserkrankungen häufig mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Dies gilt u.a. für Brustkrebs [51, 89] und prämaligene Brustläsionen [90], für Magenkrebs [91], Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) [46], das Pankreaskarzinom [92], das Ovar- und Prostatakarzinom [93, 94], für das Nicht-kleinzellige-Lungenkarzinom (NSCLC) [50, 52] und auch für das kolorektale Karzinom. Eine Metaanalyse von Zhao et al. aus dem Jahre 2015 verglich die Ergebnisse von 15 Studien zur prognostischen Rolle Osteopontins beim kolorektalen Karzinom, wobei Osteopontin überwiegend mittels Immunhistochemie und nur in zwei Studien mittels ELISA im Serum nachgewiesen wurde [53]. Dabei zeigte sich insgesamt bei höheren OPN-Werten ein schlechteres Outcome mit verkürzter Überlebenszeit. Einzelne Studien konnten jedoch keinen Unterschied für das Überleben je nach Osteopontin-Wert feststellen [95, 96]. Neben der prognostischen Aussage für das Überleben sind hohe Osteopontin-Spiegel in einigen Studien mit einer größeren Tumorinvasionstiefe, sowie mit einer Lymphknoten- und Fernmetastasierung assoziiert [53]. In unserer Studie korrelierte OPN weder mit dem initialen UICC-Stadium noch mit den cT-, cN- und cM-Stadien. Dies liegt eventuell daran, dass in unsere Studie eine bezüglich der Tumorstadien homogene Gruppe von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom eingeschlossen wurde. 61 der 68 Studienteilnehmer befanden sich in UICC-Stadium II und III und 80 % unserer Studienteilnehmer zeigten ein cT3-Stadium. Das pathologische UICC-Stadium nach der Radiochemotherapie und der Operation korrelierte auch bei unserer Studie mit den Osteopontinwerten ($p = 0,039$), sodass höhere OPN-Werte mit höheren UICC-Stadien einhergingen.

Für die Tatsache, dass die OPN-Werte in manchen Studien mit den Tumorstadien korrelieren, in anderen hingegen nicht, könnte es unterschiedliche Ursachen geben. Kritisch zu betrachten ist, dass es bis jetzt keine einheitliche Messmethode für die Osteopontin-Spiegel gibt. So wird teilweise das Osteopontin im Serum oder Plasma mittels ELISA bestimmt – wobei sich auch die nachweisbaren OPN-Konzentrationen in Serum und Plasma unterscheiden – und teilweise wird Osteopontin direkt aus dem Tumorgewebe mittels reverse-Transkriptase-PCR bzw. Immunhistochemie bestimmt [53]. Ein weiterer Kritikpunkt ist die fehlende einheitliche Definition von hohen Osteopontinwerten sowie das Fehlen klar definierter Grenzbereiche oder Normwerte. In unserer Studie wurden zwei Gruppen anhand des Medians von OPN erstellt.

Ein weiteres Problem ist, dass mittels der etablierten Nachweismethoden nicht die unterschiedlichen Spleißvarianten von OPN nachgewiesen werden, die jeweils mit verschiedenen Tumorentitäten und nicht alle mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. In einem Review von 2017 stellte die Arbeitsgruppe um Hao et al. heraus, dass beim Brustkrebs i.d.R. hohe Level von OPN-c vorkommen und mit einer schlechteren Prognose sowie erhöhter Fernmetastasierungsrate einhergehen, wohingegen beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) häufiger OPN-a und OPN-b überexprimiert werden. Beim HCC wirke OPN-c ggf. eher einer Migration entgegen [97]. Bezüglich des Rektumkarzinoms muss dies aktuell noch weiter untersucht werden. Der Einfluss Osteopontins auf das Überleben scheint umso plausibler, je mehr die dahinterstehenden Mechanismen verstanden werden. Studien zum kolorektalen Karzinom konnten zeigen, dass Tumorzellen mit hohen OPN-Werten die Fähigkeit zur aggressiveren Proliferation, Migration und Invasion besitzen, was entscheidende prognoselimitierende Faktoren sind. Dies läuft u.a. über die Aktivierung des PI3K-AKT-GSK/3 β -Weges, der Überleben, Metastasierung, Angiogenese und Invasion unterstützt [48]. Zudem stimuliert Osteopontin die Expression verschiedener Metalloproteasen (MMP-3, MMP-7, MMP-9), die eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms einnehmen [98, 99].

Insgesamt scheint die diagnostische Wertigkeit von Osteopontin beim kolorektalen Karzinom gesichert, was wir in unserem Patientenkollektiv mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom nun auch für Serumwerte mittels ELISA bestätigen konnten.

5.1.1.1 Osteopontin als potenzieller Diagnoseparameter im Krankheitsverlauf

Neben der Prognose für das Überleben der Patienten ist die Veränderung der Osteopontinkonzentrationen im Krankheitsverlauf ebenfalls interessant. Es fällt auf, dass die Werte bei den Nachsorgeuntersuchungen im Falle einer Krankheitsprogression deutlich höher lagen als bei einer Remission. Ein Jahr nach der Operation (OPN-F) war der Unterschied der Mittelwerte statistisch signifikant. Auch bei Auftreten bzw. Nicht-Auftreten eines Lokalrezidivs waren die Mittelwerte von OPN-F signifikant verschieden. Dass die Unterschiede trotz weit auseinander verlaufender Kurven nicht zu jedem Zeitpunkt signifikant waren, könnte u.a. daran liegen, dass während unseres Nachsorgezeitraums die Daten von immer weniger Patienten verfügbar waren. Zudem wurde nicht erhoben, welche zusätzlichen therapeutischen Interventionen zu den jeweiligen Zeitpunkten durchgeführt wurden. So könnte Osteopontin z.B. im Rahmen von Operationen etc. ansteigen. Dass Osteopontin pro-metastatische Signalwege induziert, wurde bereits ausführlich erläutert. Eine Studie von Huang et al. zeigte zudem

eine höhere Konzentration Osteopontins in Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms als im Gewebe des Primärtumors [47]. Zudem gab es Studien zum kolorektalen Karzinom, die eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von Osteopontin auf mRNA-Ebene und Lymphknotenmetastasen bzw. lymphogener und venöser Invasion zeigten [100]. In unserem Patientenkollektiv gab es hingegen keine Korrelation zu einer lymphatischen oder venösen Invasion. Da es sich bei uns jedoch ausschließlich um Rektumkarzinomfälle handelt und die OPN-Konzentration im Blut bestimmt wurde, ist die Vergleichbarkeit nicht ganz gegeben. Ob OPN ein Verlaufsparemeter in der klinischen Diagnostik des Rektumkarzinoms sein könnte, muss weiter untersucht werden.

5.1.2 c-Met und HGF: Prognosemarker für das Überleben?

Der c-Met/HGF-Signalweg ist mit Tumorwachstum und Metastasierung assoziiert [67]. Eine Überexpression von c-Met oder HGF konnte bei zahlreichen Karzinomen festgestellt werden, u.a. beim Prostatakarzinom [71], beim Malignen Melanom [72], beim Brustkrebs [69, 101], beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [70], und auch beim kolorektalen Karzinom [102]. Dabei ist eine vermehrte Expression oder eine Genamplifikation häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Vor allem das Lungenkarzinom geht häufig mit Veränderungen von c-Met, wie z.B. Mutationen im MET Exon 14, einer MET Amplifikation oder Überexpression einher [76]. In den letzten Jahren wurden selektive (Tivantinib, Capmatinib) und nicht-selektive (Crizotinib, Cabozantinib) Tyrosinkinaseinhibitoren als *small molecule inhibitors* sowie monoklonale Antikörper (Onartuzumab, Emibetuzumab) getestet und zeigen teilweise vielversprechende Wirkungen [77].

Bezüglich des kolorektalen Karzinoms wurde bisher vor allem die Überexpression von c-Met im Tumorgewebe und dem Mikromilieu analysiert, jedoch kaum die Konzentration des löslichen Proteins mittels ELISA aus dem Blut. In einer Metaanalyse von 2015 verglichen Liu et al. 11 retrospektive Studien mit Daten von insgesamt 1895 Patienten, in denen eine Überexpression von c-Met beim kolorektalen Karzinom analysiert wurde [103]. Bestimmt wurde die Expression entweder mittels PCR oder Immunhistochemie, wobei eine „hohe Expression“ als > 50 % der Zellen definiert wurde; eine der Studien bestimmte die Gen-Amplifikation mittels FISH-Analyse. Eine Gen-Amplifikation zeigte sich jedoch selten und vor allem beim synchron hepatisch metastasierten Karzinom. Insgesamt ergab sich eine Assoziation einer vermehrten c-Met-Expression mit Tumorerinvasion und Metastasen. Zudem waren das

Langzeitüberleben sowie das krankheitsfreie Überleben signifikant verkürzt, sodass c-Met als prognostischer Marker bestätigt werden konnte. Auch eine 2018 von Lee et al. durchgeführte Studie, bei der Daten von 255 Patienten mit metastasiertem KRK verglichen wurden, bestätigte diese Ergebnisse [104]. Bei 15,3 % der Patienten zeigte sich in der Immunhistochemie eine Überexpression von c-Met und bei diesen Patienten gab es ein verkürztes Langzeitüberleben (27 statt 39 Monate im Median). Zudem erlitten die Patienten mit Überexpression unter Bevacizumab-Therapie früher eine Krankheitsprogression (7 vs. 10 Monate im Median); bei der Cetuximab-Therapie zeigte sich hingegen kein Unterschied. Bisher ist eine Studie bekannt, bei der die lösliche c-Met-Konzentration mittels ELISA im Blut bestimmt und auf prognostische Wertigkeit beim kolorektalen Karzinom getestet wurde. Afsar et al. bestimmten die Serumkonzentrationen sowohl von c-Met als auch von HGF bei 103 KRK-Patienten und 30 gesunden Kontrollen [105]. Die Spiegel für HGF und c-Met waren bei den metastasierten Karzinomen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Die Konzentrationen der nicht-metastasierten Karzinome waren hingegen nicht signifikant höher. Eine Assoziation zeigte sich ebenfalls zwischen c-Met und dem pT-Stadium. Es ergab sich weder für HGF noch für c-Met eine Korrelation zum Überleben. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Ausgangswerten von c-Met und der langfristigen Prognose für das Überleben. In der Gruppe „< Median“ lag das 3-Jahres-Überleben zwar mit 81,7 % über dem der Gruppe „> Median“ (68,6 %), betrachtet man aber den weiteren Verlauf der Kurve während der Nachsorge, zeigt sich eine gegenteilige Entwicklung. Eine höhere Konzentration von c-Met war nicht mit dem Tumorstadium, der Tumorgroße, der Lymphknoteninvasion, einer venösen oder Perineuralscheideninfiltration assoziiert. Im Verlauf zeigte sich zwar eine Korrelation zwischen c-Met zum Zeitpunkt B und C mit dem Auftreten einer Progression sowie eines Lokalrezidivs, jedoch war diese Korrelation negativ. Das heißt, niedrige c-Met-Konzentrationen korrelierten mit dem Auftreten einer Progression bzw. eines Lokalrezidivs.

Interessanterweise zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei einer Studie zum Magenkarzinom aus dem Jahre 2013 [106]. Bei dieser verglichen Yang et al. die mittels ELISA gemessenen Plasma-Konzentrationen des löslichen c-Mets bei Patienten, die im Laufe der Studie ein Magenkarzinom entwickelten, mit denen einer gesunden Kontrollgruppe. In der gesunden Kohorte waren die c-Met-Konzentrationen signifikant höher als in der Gruppe mit Magenkarzinom. Zudem war das Level bei Patienten, die innerhalb von einem Jahr ein Karzinom entwickelten, am niedrigsten. Verschiedene

Studien zeigten, dass eine verkürzte lösliche Form und Spleißvarianten von c-Met die Interaktion von HGF mit dem membranständigen c-Met-Rezeptor blockieren können und so der Tumorgenese entgegenwirken [107, 108]. Ähnliche Mechanismen könnte es auch für den löslichen c-Met-Rezeptor geben. Demgegenüber konnte z.B. beim Lungenkarzinom eine signifikante Korrelation einer c-Met-Überexpression im Tumorgewebe (mittels IHC bestimmt) mit erhöhten c-Met-Leveln im Blut (ELISA) gezeigt werden. In einer Studie von 2015 ergab sich außerdem eine Korrelation des löslichen c-Mets mit höheren Tumorstadien und einer schlechteren Tumordifferenzierung, wobei sich das c-Met-Level nach der Tumorsektion verringerte [109]. Um eine genauere Angabe hinsichtlich des Verhaltens beim Rektumkarzinom machen zu können, müsste das Verhältnis von membranständigem und löslichem c-Met-Rezeptor untersucht werden. Auch müsste ein einheitliches Scoring System etabliert werden, um die Höhe der c-Met-Konzentration einordnen zu können.

Der Ligand HGF wurde in den meisten Studien mittels ELISA aus dem Serum oder Plasma bestimmt. 2009 untersuchten Toiyama et al. das Verhalten von HGF-Expression (IHC) und Serum-HGF (ELISA) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom [73]. Verglichen wurden Proben von 184 Patienten mit 30 gesunden Kontrollen. Die Expression war im KRK-Gewebe signifikant höher als im gesunden Gewebe. Zudem ergab sich eine enge Korrelation des Gewebe-HGFs mit dem Serum-HGF. Bei Erkrankten waren die Serum-Spiegel signifikant höher als bei Gesunden und assoziiert mit Tumorgröße, Lymphknoteninvasion und Fernmetastasen. Bei höheren Konzentrationen war das Überleben signifikant verkürzt. In einer Metaanalyse von 2017 verglichen Huang et al. 9 ähnliche Studien, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten [110]. Bei den 777 Patienten ergab sich ein signifikant verkürztes Langzeitüberleben sowie krankheitsfreies Überleben in der Gruppe mit überexprimiertem HGF. Dieses wurde meist mittels ELISA aus dem Plasma oder Serum bestimmt. Die bereits erwähnte Studie von Afsar et al. ergab hingegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten HGF-Leveln und dem Überleben [105]. Allerdings war in dieser Studie das mediane Follow-Up mit 14 Monaten sehr kurz und erfasste das Langzeitüberleben nicht ausreichend. Auch in unserem Patientenkollektiv zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Ausgangswerten von HGF und der langfristigen Prognose für das Überleben. Bei HGF unterschieden sich die Gruppen mit niedrigen und hohen Spiegeln im Blick auf das Überleben nicht groß (77,7 % und 72,0 %), jedoch war unser Nachsorgezeitraum mit einem Median von 29,87 Monaten auch relativ kurz. Es ergab sich zwar eine signifikante Korrelation zwischen HGF und dem cT-Stadium; die Mittelwerte waren aber nicht

signifikant verschieden. Eine leichte Korrelation ergab sich zur Tumordifferenzierung und der Perineuralscheideninfiltration. HGF war nicht mit dem Auftreten eines Lokalrezidivs, einer Tumorprogression oder von Fernmetastasen im Verlauf assoziiert.

Insgesamt scheint die Datenlage zur prognostischen Wertigkeit von löslichem c-Met und HGF beim kolorektalen Karzinom inkongruent. Die Mehrzahl der Studien schreibt HGF eine prognostische Wertigkeit zu, was sich in unserem Patientenkollektiv nicht bestätigt hat. Bezüglich löslichem c-Met gibt es kaum Studien und bisher konnte keine Assoziation zur Prognose gezeigt werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste der Zusammenhang zwischen gebundenem und löslichem c-Met beim Rektumkarzinom untersucht werden. Zudem sollten Studien mit einer größeren Fallzahl und einer Kontrollgruppe durchgeführt werden.

5.2 Prädiktive Biomarker für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom

Prädiktive Biomarker werden gesucht, um beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom das Ansprechen auf die Strahlentherapie vorhersagen und Risikopatienten intensiver bzw. länger behandeln oder engmaschiger kontrollieren zu können. Ein Vorteil ist die minimalinvasive Testung der Marker aus dem Blut, die einfach und häufig wiederholt werden kann. Zudem bietet die Evaluierung prädiktiver Biomarker die Möglichkeit zur Einführung neuer und gezielter Therapiestrategien. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Versuche geeignete Biomarker für das Rektumkarzinom zu identifizieren, von denen bisher jedoch keiner klinische Verwendung findet [111]. 2019 führten Canto et al. eine transkriptionsbasierte Analyse des Sekretoms anhand von Biopsien aus lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen (LARC nach engl. *locally advanced rectal cancer*) durch [112]. Als Referenz für das Therapieansprechen wurde die pathologisch komplette Remission verwendet. Für das gesamte Tumorexpressionsprofil konnte in den Gruppen mit pCR bzw. pIR kein Unterschied festgestellt werden, aber einzelne Gene, darunter MET, waren nur in der Gruppe mit inkompletter Remission überexprimiert. Die Konzentration des zugehörigen Proteins c-Met im Serum war bei pCR und pIR nicht verschieden, was die Autoren der geringen Fallzahl (2 pCR-Patienten, 12 pIR-Patienten) zuschrieben und die Durchführung weiterer Studien empfahlen. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Li et al. versuchte ebenfalls prädiktive Biomarker für die neoadjuvante Radiotherapie bei 218 LARC-Patienten zu evaluieren [113]. Dazu wurde die prädiktive Wertigkeit von im Blut bestimmten Biomarkern mittels logistischer Regression getestet und eine mögliche prognostische Aussagekraft u.a. für CEA

nachgewiesen. Unsere Studie wurde in einem ähnlichen Modell im Blick auf c-Met, HGF und Osteopontin durchgeführt.

5.2.1 Klinische Endpunkte zur Evaluierung prädiktiver Marker für das Therapieansprechen

Als Endpunkte für das Therapieansprechen dienten in unserer Studie die pathologisch komplette Remission, der Grad der Tumorregression nach Dworak, der NAR-Score und das Therapieansprechen im Sinne eines Downstaging. Die pathologisch komplette Remission sowie der Tumorregressionsgrad werden häufig als Endpunkte für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie verwendet [111]. Allerdings gibt es für die Verwendung des Tumorregressionsgrades kein einheitliches System. 2016 verglichen Kim et al. in einer Studie vier häufig verwendete Einteilungen, wonach der modifizierte Dworak-Score die größte prognostische Aussage besaß [114]. Dieser berücksichtigt nicht nur das Gewebe des Primärtumors, sondern auch Rektum- und Mesorektumanteile. Eine andere Studie aus dem Jahr 2014 identifizierte das Tumorregressionsgrading nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) als das mit der größten prognostischen Wertigkeit [115]. Insgesamt scheinen dreigradige Systeme besser zu sein als fünfgradige und die Verwendung eines einheitlichen Systems ist anzustreben. Wir verwendeten die ursprüngliche, fünf Grade umfassende Klassifikation nach Dworak und unterteilten diese zusätzlich in drei Gruppen. Diese gruppierte Version wurde schon u.a. von Fokas et al. 2017 verwendet und als aussagekräftiger Prognosemarker identifiziert [20]. Die ursprüngliche Dworak-Klassifikation wurde verwendet, da die pathologischen Institute, die die Proben unserer Studienteilnehmer untersuchten, regulär mit dieser Klassifikation arbeiten. Um eine logistische Regressionsanalyse durchzuführen, wurde das Grading zudem in Responder (Dworak 3 + 4) und Non-Responder (Dworak 0 + 1 + 2) eingeteilt, was in vergleichbaren Studiendesigns in ähnlicher Form gemacht wurde [111]. Dass eine Aussagekraft des Tumorregressionsgradings nach Dworak bezüglich des Therapieansprechens und der Prognose besteht, scheint sicher; dennoch sollte die einheitliche Verwendung nur eines Score-Systems angestrebt werden. Die pathologisch komplette Remission ist wie die Tumorregression ein etablierter Endpunkt für das Ansprechen der Neoadjuvanz und assoziiert mit einer guten langfristigen Prognose [116, 117]. Jedoch wird die pCR ggf. nicht nur durch das Therapieansprechen beeinflusst, sondern auch durch Faktoren wie Tumormasse, lokal fortgeschrittenere Tumore und das Intervall zwischen präoperativer Radiochemotherapie und Operation [86, 118]. Zudem hängt sie wie auch die

Tumorregression u.a. von der Qualität der pathologischen Untersuchung ab. In unserem Fall scheint der Punkt der Tumormasse bzw. der fortgeschritteneren Tumore vernachlässigbar, da es sich um eine bezüglich des initialen Tumorstadiums recht homogene Gruppe mit durchgehend lokal fortgeschrittenen Tumoren (80 % UICC III) handelt. Auch wurde die Operation bei allen Patienten 6-8 Wochen nach Beendigung der Strahlentherapie durchgeführt; es gab somit ein einheitliches Intervall. Dennoch verwendeten wir als zusätzlichen klinischen Endpunkt den auf Nomogrammen von Valentini et al. basierenden NAR-Score [86], der einen unabhängigeren Parameter als die pCR darstellt. Yothers et al. konnten zeigen, dass mithilfe des NAR-Scores eine genauere Aussage für das Überleben möglich ist als bei Verwendung der pCR [119]. Auch Fokas et al bestätigten 2018, dass der NAR-Score ein validierter Endpunkt ist, um kurzfristig den Behandlungseffekt der neoadjuvanten Radiochemotherapie und das Downstaging messen zu können [85]. Für die binär logistische Regressionsanalyse mussten wir auch hier eine weitere Unterteilung vornehmen, weshalb NAR-Score 1 den zusammengefassten NAR-Scores 2 und 3 gegenübergestellt wurde. Um eine möglichst breite Einschätzung machen zu können, verglichen wir die prädiktiven Eigenschaften der Biomarker mit allen drei Modellen und zusätzlich mit dem generellen Downstaging.

In unserem Patientenkollektiv gab es 9 Patienten, die eine pathologisch komplette Regression erreichten (14,3 %), während 7 Patienten pathologisch als Dworak 4 klassifiziert wurden. Demgegenüber umfasst der NAR-Score alle Patienten mit pCR und Dworak 4 in der Gruppe „niedrig“ (11 Patienten). Um pathologische Fehleinschätzungen bzw. fehlende Klassifikationen zu umgehen, könnte der NAR-Score eine bessere und objektivere Alternative darstellen.

5.2.2 Osteopontin als Prädiktor für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz

Erhöhte Osteopontin-Level vor Therapiebeginn zeigten einen signifikanten Zusammenhang zum Ansprechen der neoadjuvanten Radiotherapie. Es ist bekannt, dass die Strahlensensibilität des Gewebes u.a. stark vom Tumormikromilieu abhängt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Tumorphoxie [120, 121], was bereits in den 1950er Jahren von Thomlinson und Gray gezeigt wurde [122, 123]. Osteopontin gilt als Marker für Tumorphoxie, was bereits bei mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen vermehrter OPN-Expression auf Protein- und mRNA-Linie unter Hypoxie konnte in Zellen des Plattenepithelkarzinoms von Kopf- und Hals-Tumoren (HNSCC) gezeigt werden [127]. Auch konnte eine unter Hypoxie durch

Osteopontin und NF- κ B vermehrte Expression von HIF-1 und VEGF in Brustkrebszellen [128] gezeigt werden, was u.a. zu vermehrtem Tumorwachstum führt. Auch Le et al. zeigten, dass Osteopontin in HNSCC-Zellen unter Hypoxie hochreguliert wird [46]. Dies lässt hoffen, dass OPN als Marker für Hypoxie auch ein prädiktiver Marker für die Radiosensitivität ist. Die aktuelle Studienlage ist jedoch kontrovers. Hui et al. untersuchten dies 2008 beim Nasopharyngealen Karzinom, konnten jedoch unter Hypoxie keine vermehrte Expression von OPN auf mRNA- oder Proteinebene feststellen [129]. Dennoch zeigten die Patienten mit höheren OPN-Werten ein schlechteres Ansprechen auf die Radiotherapie. Beim Zervixkarzinom ist OPN ebenfalls mit einer schlechteren Strahlensensibilität assoziiert [130] und auch bei K-RAS positiven Zellen des Lungenkarzinoms gibt es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des OPN-EGFR-Signalwegs und einem verringerten Ansprechen auf die Radiotherapie [131]. In einer Studie zum Prostatakarzinom zeigte sich hingegen, dass zwar VEGF und HIF-1 eine prädiktive Wertigkeit für die Radiosensibilität besitzen, Osteopontin jedoch lediglich für die operative Therapie [132].

Bezüglich des Rektumkarzinoms gibt es kaum Studien zu Strahlensensibilität, Hypoxie und Osteopontin. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte 2018 den Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Osteopontin und seinem Rezeptor CD44 auf mRNA- und Proteinebene in Zellen des kolorektalen Karzinoms [56]. Auch die Wirkung der Strahlentherapie auf die Expression von OPN wurde beobachtet, sowie das Überleben vier verschiedener Zelllinien unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach der Bestrahlung. Dabei zeigte sich zwar in allen Zelllinien, dass OPN auf Proteinebene unter Hypoxie hochreguliert wird, nicht jedoch auf mRNA-Ebene. Zudem war die Erhöhung auf Proteinebene in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark. Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Radioresistenz konnte bestätigt werden. Auch wurde gezeigt, dass Osteopontin durch die Bestrahlung nicht beeinflusst wird. Unsere aktuellen Ergebnisse zeigen, dass Osteopontin Potential besitzt, als prädiktiver Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie verwendet zu werden. OPN-A korrelierte in unserer Studie sowohl mit einer pCR als auch mit der Tumorregression nach Dworak und dem NAR-Score signifikant ($p=0,003$, $p=0,015$, $p=0,020$); lediglich zum reinen Downstaging bestand keine signifikante Korrelation. Die logistische Regressionsanalyse ergab zudem, dass sich mithilfe von OPN-A eine Prognose über pCR, Dworak und NAR-Score treffen lässt. Allerdings sind die Zusammenhänge nicht sehr stark (OR:0,990, OR:1,008, OR:0,996).

Dies könnte zum einen in der Größe des Patientenkollektivs bedingt sein, zum anderen in der Methodik. Für Osteopontin gibt es kein einheitliches System zur Bestimmung der Werte. Die Messung von OPN-Konzentrationen im Serum mittels ELISA wird zwar häufig verwendet, jedoch konnte eine Studie zum Vergleich verschiedener ELISA-Kits zeigen, dass das Ergebnis nicht nur vom Material abhängt, sondern auch unterschiedliche ELISA-Kits verschiedene Osteopontin-Konzentrationen messen [133]. Dies wurde anhand von Zervixkarzinom-Zellen und Kopf-Hals-Tumoren bestimmt. Dennoch zeigte sich eine signifikante Korrelation der Messungen der verschiedenen Kits, lediglich der Wertebereich variierte. In unserer Studie wurde ein einheitliches Kit zur Bestimmung der Werte verwendet, weshalb die Daten untereinander vergleichbar sind. Dennoch gilt es in Zukunft die Methodik zu verbessern und ein einheitliches System mit definierten Normwerten für Osteopontin zu finden, um eine klinische Verwendbarkeit zu generieren. Zu bedenken gilt es ebenfalls, dass die Osteopontin-Level unseres Patientenkollektivs ggf. durch andere Faktoren beeinflusst wurden. So ist bekannt, dass OPN kein tumorspezifisches Protein ist, sondern u.a. auch bei Inflammation, Biomineralisierung und Wundheilung vermehrt exprimiert wird [33]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte 2017 die Änderung von Osteopontin-Konzentrationen im postoperativen Verlauf bei Patienten mit HNSCC [134]. Proben wurden vor der Operation, am Tag nach der Operation und 3-4 Wochen später entnommen. Es ergab sich eine postoperative Erhöhung von OPN, die sich nach vier Wochen wieder normalisiert hatte. Da TGF β , ein mit Wundheilung und Immunmodulation assoziiertes Protein, ebenfalls erhöht war und zudem mit OPN korrelierte, wurde ein Zusammenhang der OPN-Erhöhung mit der Wundheilung vermutet. Dies wurde in anderen Studien ebenfalls bestätigt [135]. Der Zusammenhang zu Wundheilung bzw. Trauma spielt in unserer Studie vermutlich eine geringe Rolle, da als prädiktiver Marker der prätherapeutische Wert von Osteopontin verwendet wurde. Die Blutentnahme erfolgte somit zu einem Zeitpunkt vor einer interventionellen Maßnahme.

In Kombination mit der Studie von 2018 und unserer aktuellen Untersuchung zeigen unsere Ergebnisse insgesamt, dass Osteopontin mit dem Therapieansprechen korreliert und deuten darauf hin, dass es einen Wert als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf die Strahlentherapie beim neoadjuvant vorbehandelten Rektumkarzinom besitzt. Dies gilt es in weiteren Studien, ggf. mit einem größeren Patientenkollektiv zu bestätigen.

5.2.3 c-Met und HGF: prädiktive Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie?

Der c-Met/HGF-Signalweg spielt eine Rolle bei Resistenzmechanismen gegen Komponenten der Krebstherapie, vor allem gegen gezielte systemische Therapien, wie den Anti-EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Cetuximab beim kolorektalen Karzinom [80]. Studien, bei denen der HGF/c-Met-Signalweg geblockt wurde, konnten eine verbesserte Reaktion auf die Cetuximab-Therapie zeigen [136]. C-Met und HGF sind zudem wie OPN mit Resistenzmechanismen gegen Strahlentherapien, wie z.B. Tumorphoxie, assoziiert. Hypoxie fördert invasives Wachstum, Metastasierung und korreliert mit Radioresistenz. 2003 zeigten Pennacchietti et al. *in vivo* und *in vitro*, dass c-Met unter Hypoxie vermehrt transkribiert wird [137]. Zudem zeigte sich v.a. in hypoxischen Tumorarealen eine Überexpression von c-Met auf Protein- und mRNA-Ebene. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war die unter Hypoxie verstärkte Sensibilität von c-Met für seinen Liganden HGF.

Es ist bekannt, dass auch die Bestrahlung selbst die Transkription des MET-Onkogens erhöhen kann. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität des Rezeptors und zu einer erhöhten Sensibilität für seinen Liganden HGF. So werden u.a. die Invasivität des Tumors gefördert und die Apoptose gehemmt, was De Bacco et al. 2011 bestätigen konnten [138]. Zudem konnten sie zeigen, dass die Blockade von c-Met mittels siRNA oder *small molecule inhibitors* diesen Mechanismen entgegenwirkt. Dass die Inhibierung des c-Met/HGF-Signalwegs zu einem verbesserten Ansprechen auf die Radiotherapie führt, konnte auch in weiteren Studien zum KRAS-mutierten kolorektalen Karzinom gezeigt werden. So untersuchten Cuneo et al. 2019 die Strahlensensibilität bei KRAS-mutierten und gegen Cetuximab resistenten Zellen des KRK unter Gabe von Crizotinib [139]. Es zeigte sich eine Sensibilität auf den Tyrosinkinaseinhibitor und bei Gabe 24 Stunden vor Bestrahlung, erhöhte sich das Ansprechen auf die Strahlentherapie signifikant. Zudem konnten die durch Bestrahlung induzierte Phosphorylierung von c-Met und die damit verbundene Aktivierung nachfolgender Signalwege sowie die von HGF induzierte Zellmigration blockiert werden. Dies deutet daraufhin, dass Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom von einer Crizotinib-Therapie profitieren könnten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Studien zum NSCLC [140] und bei Gliomzellen, in denen nach Gabe eines *small molecule inhibitors* gegen c-Met oder seinen Liganden HGF eine erhöhte Strahlensensibilität gezeigt werden konnte [141].

In einer mit der vorliegenden Studie vergleichbaren Arbeit von Senetta et al. wurde die Expression von c-Met und YKL-40 bei 81 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom und deren prädiktive Wertigkeit für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie untersucht [142]. Die Expression wurde mittels Immunhistochemie bestimmt; eine mittels FISH-Analyse getestete Gen-Amplifizierung von c-Met konnte nicht nachgewiesen werden. Das Therapieansprechen wurde anhand des Tumorregressionsgrades nach den Mandard-Kriterien definiert. Es ergab sich eine signifikante Assoziation von YKL-40 und c-Met mit dem TRG. Da es sich bei der IHC zwar um ein häufig durchgeführtes, aber immer durch die erforderliche Biopsie noch invasives Verfahren handelt, wäre es einfacher, könnte man c-Met als Biomarker aus dem Blut bestimmen. Uns ist bisher keine Studie bekannt, die die prädiktive Wertigkeit des löslichen c-Met-Rezeptors und seines Liganden HGF in Bezug auf das Ansprechen einer Strahlentherapie beim Rektumkarzinom untersucht. Um dies zu evaluieren, wurde unsere Studie durchgeführt. In unserer Gruppe mit LARC-Patienten zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den initialen c-Met- oder HGF-Konzentrationen und dem Therapieansprechen. Es ergab sich weder eine Korrelation zur pCR noch zum TRG oder dem NAR-Score. Weder im Mittelwertvergleich noch in der Regressionsanalyse konnte ein Zusammenhang zwischen c-Met-A bzw. HGF-A und dem Therapieansprechen festgestellt werden. HGF wird anders als c-Met hauptsächlich nicht in Tumorzellen, sondern von Stromazellen des Tumormikromilieus sezerniert. Es gibt kaum Daten zu seiner prädiktiven Wertigkeit für eine Radiotherapie. Wir konnten in unserer Patientengruppe zwar eine Tendenz, aber keine deutliche prädiktive Wertigkeit für HGF feststellen.

Insgesamt scheint wahrscheinlich, dass lediglich die Expression von c-Met, nicht jedoch die lösliche c-Met-Konzentration eine prädiktive Wertigkeit für die Strahlentherapie besitzt. Die durch Bestrahlung häufig erhöhte c-Met-Expression, zeigt sich in unserem Patientenkollektiv auf Proteinebene ebenfalls nicht. Es wäre nötig, den Zusammenhang von membranständigem und löslichem c-Met beim Rektumkarzinom zu analysieren. Dennoch scheinen Therapieansätze, die gezielt gegen die von c-Met und HGF induzierten Signalwege gerichtet sind, eine vielversprechende Option, um das Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Karzinome des Menschen. Beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (LARC) besteht die leitliniengerechte Therapie aus einer neoadjuvanten Radiochemotherapie und einer darauffolgenden totalen mesorektalen Exzision (TME). Diese Kombination der Resektion mit einer vorhergehenden Strahlenchemotherapie führte zwar zu einer Reduktion von Lokalrezidiven, die Entwicklung von Fernmetastasen im Verlauf ist mit einer Rate von bis zu 30 % jedoch immer noch unverändert hoch. Da insbesondere Fernmetastasen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, konnte das Langzeitüberleben durch die neoadjuvante Therapie nicht ausreichend verbessert werden. Um Risikopatienten bzw. Non-Responder auf die neoadjuvante Therapie frühzeitig zu identifizieren, werden Biomarker benötigt, die man minimalinvasiv und wiederholt bestimmen kann. Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische und prädiktive Wertigkeit von Osteopontin, c-Met und HGF im Hinblick auf das LARC zu evaluieren. Osteopontin, ein Glykoprotein der SIBLINGS-Familie, der Tyrosinkinase-Rezeptor c-Met und sein Ligand, HGF, sind an zahlreichen Signalwegen beteiligt, die Tumorwachstum, Invasion, Proliferation und Metastasierung fördern. Zudem sind sie Marker für Tumorphoxie, einem wesentlichen Faktor der Radioresistenz von Tumorzellen. Die Konzentrationen der Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten wurden in unserer prospektiven Studie mittels ELISA aus dem Plasma von 63 Patienten bestimmt und auf ihre Korrelation mit klinischen Daten sowie ihre prognostische und prädiktive Wertigkeit getestet. Zusammenfassend zeigt sich, dass prätherapeutisch erhöhte Osteopontin-Konzentrationen mit einem höheren postoperativen Tumorstadium und dem Auftreten von Tumorprogression, Lokalrezidiv und Fernmetastasen korrelieren. Zudem sind höhere Konzentrationen mit einem verkürzten Überleben und einem schlechteren Ansprechen auf die Radiotherapie assoziiert. Für c-Met ergab sich keine prognostische oder prädiktive Wertigkeit; jedoch zeigte sich eine Korrelation zwischen niedrigeren c-Met-Werten nach der Strahlentherapie und dem Auftreten einer Progression oder eines Lokalrezidivs im Krankheitsverlauf. Die HGF-Konzentration korrelierte mit dem cT-Stadium, nicht jedoch mit dem Überleben. Es ergab sich kein Zusammenhang zum Langzeitüberleben und keine prädiktive Wertigkeit für das Therapieansprechen der Neoadjuvanz. Um genauere Angaben zu machen, sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv und einheitlich erhobenen klinischen Daten nötig. Insbesondere bei c-Met muss der Zusammenhang zwischen einer Überexpression von c-Met und dem löslichen c-Met

beim Rektumkarzinom untersucht werden. Vor allem OPN scheint ein wichtiger Biomarker beim Rektumkarzinom zu sein; für eine klinische Anwendbarkeit ist aber für alle Proteine zwingend notwendig, eine einheitliche Messmethode zu etablieren und einen Normbereich bzw. Grenzwerte zu definieren.

Bereits jetzt gibt es zahlreiche therapeutische Ansätze, die in die Signalwege von Osteopontin bzw. c-Met/HGF eingreifen, von denen bisher allerdings wenige in der klinischen Routine verwendet werden. Die ersten Versuche zeigen jedoch, dass OPN, c-Met und HGF vielversprechende Angriffspunkte sind, um Patienten in Zukunft eine auf das individuelle Risiko abgestimmte und zielgerichtete Therapie zukommen zu lassen. Durch die Identifizierung von Risikopatienten mittels Biomarkern und die Einführung neuer Therapeutika könnten das Risiko für Fernmetastasen gesenkt sowie die Strahlensensibilität und Langzeitprognose für Patienten mit Rektumkarzinom verbessert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Peeters, K.C., et al., *The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma*. *Ann Surg*, 2007. **246**(5): p. 693-701.
2. Sauer, R., et al., *Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(17): p. 1731-40.
3. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Robert Koch-Institut.
4. Koch-Institut, R., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017, Robert Koch-Institut.
5. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
6. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 479-507.
7. Rosty, C., et al., *Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management*. *Journal of gastroenterology*, 2013. **48**(3): p. 287-302.
8. Win, A.K., et al., *Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2017. **26**(3): p. 404-412.
9. Giovannucci, E., et al., *A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(3): p. 183-91.
10. Johnson, C.M., et al., *Meta-analyses of colorectal cancer risk factors*. *Cancer causes & control : CCC*, 2013. **24**(6): p. 1207-1222.
11. Lee, K.J., et al., *Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study*. *Cancer Causes Control*, 2007. **18**(2): p. 199-209.
12. Otani, T., et al., *Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(12): p. 1492-500.
13. Cross, A.J., et al., *A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk*. *PLoS Med*, 2007. **4**(12): p. e325.
14. Karlen, P., et al., *Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(4): p. 1047-52.
15. Slattery, M.L., et al., *Family history and colorectal cancer: predictors of risk*. *Cancer Causes Control*, 2003. **14**(9): p. 879-87.
16. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am 19.11.2019]*.
17. Dietel, M., J. Dudenhausen, and N. Suttrop, *Harrisons Innere Medizin*. *Dtsch Arztebl International*, 2003. **100**(34-35): p. 2218-.

18. Dworak, O., L. Keilholz, and A. Hoffmann, *Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy*. *Int J Colorectal Dis*, 1997. **12**(1): p. 19-23.
19. Rodel, C., et al., *Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(34): p. 8688-96.
20. Fokas, E., et al., *Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(12).
21. Fokas, E., et al., *Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(15): p. 1554-62.
22. Fu, X.L., et al., *Meta-analysis of oxaliplatin-based versus fluorouracil-based neoadjuvant chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(21): p. 34340-34351.
23. Hofheinz, R.D., et al., *Impact of age on the efficacy of oxaliplatin in the preoperative chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy of rectal cancer: a post hoc analysis of the CAO/ARO/AIO-04 phase III trial*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(8): p. 1793-1799.
24. Hong, Y.S., et al., *Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy for Rectal Cancer After Preoperative Chemoradiotherapy (ADORE): Long-Term Results of a Randomized Controlled Trial*. *J Clin Oncol*, 2019. **37**(33): p. 3111-3123.
25. Li, Q., et al., *ACRNACT trial protocol: efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with clinical T3b/T4, N+ rectal Cancer undergoing Neoadjuvant Chemoradiotherapy: a pathology-oriented, prospective, multicenter, randomized, open-label, parallel group clinical trial*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 1117.
26. Tabernero, J., et al., *Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study*. *J Clin Oncol*, 2021. **39**(4): p. 273-284.
27. Corcoran, R.B., et al., *Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(34): p. 4023-31.
28. George, A., et al., *Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(17): p. 12624-30.
29. Hunter, G.K., et al., *Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins*. *Biochem J*, 1996. **317** (Pt 1): p. 59-64.
30. Bellahcène, A., et al., *Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**: p. 212.
31. Fedarko, N.S., et al., *Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases*. *FASEB J*, 2004. **18**(6): p. 734-6.

32. Franzen, A. and D. Heinegard, *Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix*. Biochem J, 1985. **232**(3): p. 715-24.
33. Castello, L.M., et al., *Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression*. Mediators of inflammation, 2017. **2017**: p. 4049098-4049098.
34. Chellaiah, M.A., et al., *Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(1): p. 173-89.
35. Denhardt, D.T., et al., *Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival*. The Journal of clinical investigation, 2001. **107**(9): p. 1055-1061.
36. Rangaswami, H., A. Bulbule, and G.C. Kundu, *Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(2): p. 79-87.
37. Junaid, A. and F.M. Amara, *Osteopontin: correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells*. Histopathology, 2004. **44**(2): p. 136-46.
38. Lund, S.A., C.M. Giachelli, and M. Scatena, *The role of osteopontin in inflammatory processes*. Journal of cell communication and signaling, 2009. **3**(3-4): p. 311-322.
39. Kariuki, S.N., et al., *Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus*. Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 487-94.
40. Sennels, H., et al., *Circulating levels of osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, and high-sensitivity C-reactive protein in patients with active rheumatoid arthritis randomized to etanercept alone or in combination with methotrexate*. Scand J Rheumatol, 2008. **37**(4): p. 241-7.
41. Chong, H.C., et al., *Matricellular proteins: a sticky affair with cancers*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 351089.
42. Shevde, L.A. and R.S. Samant, *Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer*. Matrix Biology, 2014. **37**: p. 131-141.
43. Zhao, H., et al., *The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour*. Cell Death & Disease, 2018. **9**(3): p. 356.
44. Anborgh, P.H., et al., *Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer*. J Cell Commun Signal, 2011. **5**(2): p. 111-22.
45. Ostheimer, C., et al., *Prognostic implications of the co-detection of the urokinase plasminogen activator system and osteopontin in patients with non-small-cell lung cancer undergoing radiotherapy and correlation with gross tumor volume*. Strahlenther Onkol, 2018. **194**(6): p. 539-551.
46. Le, Q.T., et al., *Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 59-67.
47. Huang, J., et al., *Osteopontin-enhanced hepatic metastasis of colorectal cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47901.

48. Cheng, Y., et al., *Osteopontin Promotes Colorectal Cancer Cell Invasion and the Stem Cell-Like Properties through the PI3K-AKT-GSK/3beta-beta/Catenin Pathway*. *Med Sci Monit*, 2019. **25**: p. 3014-3025.
49. Chiu, T.J., et al., *Osteopontin Expression Is Associated with the Poor Prognosis in Patients with Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma Receiving Preoperative Chemoradiotherapy*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 9098215.
50. Mack, P.C., et al., *Lower osteopontin plasma levels are associated with superior outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: SWOG Study S0003*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(29): p. 4771-6.
51. Bramwell, V.H., et al., *Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3337-43.
52. Liu, Y., et al., *Prognostic significance of osteopontin in patients with non-small cell lung cancer: results from a meta-analysis*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015. **8**(8): p. 12765-12773.
53. Zhao, M., et al., *The impact of osteopontin on prognosis and clinicopathology of colorectal cancer patients: a systematic meta-analysis*. *Scientific Reports*, 2015. **5**: p. 12713.
54. Wei, R., et al., *In vitro and clinical data analysis of Osteopontin as a prognostic indicator in colorectal cancer*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(9): p. 4097-4105.
55. Horsman, M.R. and J. Overgaard, *The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy*. *J Radiat Res*, 2016. **57 Suppl 1**: p. i90-i98.
56. Wohlleben, G., et al., *Hypoxia induces differential expression patterns of osteopontin and CD44 in colorectal carcinoma*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(1): p. 442-448.
57. Wohlleben, G., et al., *Influence of hypoxia and irradiation on osteopontin expression in head and neck cancer and glioblastoma cell lines*. *Radiat Oncol*, 2015. **10**: p. 167.
58. Hahnel, A., et al., *Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Radiat Oncol*, 2010. **5**: p. 82.
59. Comoglio, P.M., S. Giordano, and L. Trusolino, *Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(6): p. 504-16.
60. Bladt, F., et al., *Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud*. *Nature*, 1995. **376**(6543): p. 768-71.
61. Organ, S.L. and M.-S. Tsao, *An overview of the c-MET signaling pathway*. *Therapeutic advances in medical oncology*, 2011. **3**(1 Suppl): p. S7-S19.
62. Cooper, C.S., et al., *Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line*. *Nature*, 1984. **311**(5981): p. 29-33.
63. Cecchi, F., D.C. Rabe, and D.P. Bottaro, *The Hepatocyte Growth Factor Receptor: Structure, Function and Pharmacological Targeting in Cancer*. *Curr Signal Transduct Ther*, 2011. **6**(2): p. 146-151.

64. Stoker, M., et al., *Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility*. Nature, 1987. **327**(6119): p. 239-42.
65. Nakamura, T., et al., *Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor*. Nature, 1989. **342**(6248): p. 440-3.
66. Weidner, K.M., et al., *Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(16): p. 7001-7005.
67. Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(12): p. 915-925.
68. Matsumoto, K., et al., *Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery*. Cancer Sci, 2017. **108**(3): p. 296-307.
69. Kim, H., et al., *Prognostic implication of serum hepatocyte growth factor in stage II/III breast cancer patients who received neoadjuvant chemotherapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(3): p. 707-14.
70. Tsuji, T., et al., *Clinical impact of high serum hepatocyte growth factor in advanced non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(42): p. 71805-71816.
71. Gupta, A., et al., *Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7385-90.
72. Hugel, R., et al., *Serum levels of hepatocyte growth factor as a potential tumor marker in patients with malignant melanoma*. Melanoma Res, 2016. **26**(4): p. 354-60.
73. Toiyama, Y., et al., *Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients*. Int J Cancer, 2009. **125**(7): p. 1657-62.
74. Sierra, J.R. and M.S. Tsao, *c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer*. Ther Adv Med Oncol, 2011. **3**(1 Suppl): p. S21-35.
75. Kim, E.S. and R. Salgia, *MET pathway as a therapeutic target*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(4): p. 444-7.
76. Drilon, A., *MET Exon 14 Alterations in Lung Cancer: Exon Skipping Extends Half-Life*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(12): p. 2832-4.
77. Drilon, A., et al., *Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET?* J Thorac Oncol, 2017. **12**(1): p. 15-26.
78. Paik, P.K., et al., *Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping*. Cancer Discov, 2015. **5**(8): p. 842-9.
79. Sebag-Montefiore, D., et al., *Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial*. Lancet, 2009. **373**(9666): p. 811-20.
80. Moosavi, F., et al., *HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2019. **56**(8): p. 533-566.
81. https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/J/P/JP27158_IFU_en_Osteopon_tin_EIA_V2008_10_01_sym2.pdf.

82. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014703_KHO2031_Hu_cMet_ELISA_PI.pdf.
83. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dhg00.pdf>.
84. Valentini, V., et al., *Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(23): p. 3163-72.
85. Fokas, E., et al., *Neoadjuvant rectal score as individual-level surrogate for disease-free survival in rectal cancer in the CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(7): p. 1521-1527.
86. George, T.J., Jr., C.J. Allegra, and G. Yothers, *Neoadjuvant Rectal (NAR) Score: a New Surrogate Endpoint in Rectal Cancer Clinical Trials*. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2015. **11**(5): p. 275-280.
87. Majek, O., et al., *Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century*. *British Journal of Cancer*, 2012. **106**(11): p. 1875-1880.
88. Franke, A.J., et al., *Total Neoadjuvant Therapy: A Shifting Paradigm in Locally Advanced Rectal Cancer Management*. *Clin Colorectal Cancer*, 2018. **17**(1): p. 1-12.
89. Zduniak, K., et al., *Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker*. *Br J Cancer*, 2015. **112**(4): p. 729-38.
90. Walaszek, K., et al., *Breast cancer risk in premalignant lesions: osteopontin splice variants indicate prognosis*. *Br J Cancer*, 2018. **119**(10): p. 1259-1266.
91. Gu, X., et al., *Prognostic significance of osteopontin expression in gastric cancer: a meta-analysis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(43): p. 69666-69673.
92. Franklin, O., et al., *Novel prognostic markers within the CD44-stromal ligand network in pancreatic cancer*. *J Pathol Clin Res*, 2019. **5**(2): p. 130-141.
93. Wisniewski, T., et al., *Osteopontin And Angiogenic Factors As New Biomarkers Of Prostate Cancer*. *Urol J*, 2019. **16**(2): p. 134-140.
94. Hu, Z.D., et al., *Diagnostic value of osteopontin in ovarian cancer: a meta-analysis and systematic review*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0126444.
95. Lin, A.Y., et al., *Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16636.
96. Uhlmann, M.E., et al., *Prognostic value of tumor progression-related gene expression in colorectal cancer patients*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2012. **138**(10): p. 1631-1640.
97. Hao, C., et al., *Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review)*. *Int J Mol Med*, 2017. **39**(6): p. 1327-1337.
98. Herszényi, L., et al., *The Behavior of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Colorectal Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012. **13**(10): p. 13240-13263.
99. Jonsson, A., et al., *Stability of matrix metalloproteinase-9 as biological marker in colorectal cancer*. *Med Oncol*, 2018. **35**(4): p. 50.
100. Likui, W., W. Hong, and Z. Shuwen, *Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer*. *J Gastrointest Surg*, 2010. **14**(1): p. 74-81.

101. Yan, S., et al., *Prognostic significance of c-Met in breast cancer: a meta-analysis of 6010 cases*. *Diagn Pathol*, 2015. **10**: p. 62.
102. Gayyed, M.F., et al., *c-MET expression in colorectal adenomas and primary carcinomas with its corresponding metastases*. *Journal of gastrointestinal oncology*, 2015. **6**(6): p. 618-627.
103. Liu, Y., et al., *Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(12): p. 3706-10.
104. Lee, S.J., et al., *c-MET Overexpression in Colorectal Cancer: A Poor Prognostic Factor for Survival*. *Clin Colorectal Cancer*, 2018. **17**(3): p. 165-169.
105. Usul Afsar, C., et al., *Clinical significance of serum hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor cmet levels in colorectal cancer patients*. *Acta Medica Mediterranea*, 2016. **32**: p. 179.
106. Yang, J.J., et al., *Soluble c-Met protein as a susceptible biomarker for gastric cancer risk: A nested case-control study within the Korean Multicenter Cancer Cohort*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(9): p. 2148-56.
107. Michieli, P., et al., *Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(1): p. 61-73.
108. Tiran, Z., et al., *A novel recombinant soluble splice variant of Met is a potent antagonist of the hepatocyte growth factor/scatter factor-Met pathway*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(14): p. 4612-21.
109. Lv, H., et al., *Soluble c-Met is a reliable and sensitive marker to detect c-Met expression level in lung cancer*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 626578.
110. Huang, C.Y., et al., *Hepatocyte growth factor is a prognostic marker in patients with colorectal cancer: a meta-analysis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(14): p. 23459-23469.
111. Dayde, D., et al., *Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3).
112. Canto, L.M.D., et al., *Locally advanced rectal cancer transcriptomic-based secretome analysis reveals novel biomarkers useful to identify patients according to neoadjuvant chemoradiotherapy response*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 8702.
113. Li, A., et al., *Pretreatment blood biomarkers predict pathologic responses to neo-CRT in patients with locally advanced rectal cancer*. *Future Oncol*, 2019.
114. Kim, S.H., et al., *What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy?* *Cancer Res Treat*, 2016. **48**(3): p. 998-1009.
115. Trakarnsanga, A., et al., *Comparison of tumor regression grade systems for locally advanced rectal cancer after multimodality treatment*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(10).
116. Maas, M., et al., *Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(9): p. 835-44.
117. Martin, S.T., H.M. Heneghan, and D.C. Winter, *Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to*

- neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer*. BJS (British Journal of Surgery), 2012. **99**(7): p. 918-928.
118. Chua, Y.J., *Pathological complete response: still a relevant endpoint in rectal cancer?* The Lancet Oncology, 2010. **11**(9): p. 807-808.
119. Yothers, G., et al., *Predictive validity of NeoAdjuvant Rectal (NAR) Score and pathologic complete response (ypCR) for overall survival (OS) as surrogate endpoints in rectal cancer clinical trial*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(15_suppl): p. 3533-3533.
120. Vaupel, P. and A. Mayer, *Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 225-39.
121. Vaupel, P., O. Thews, and M. Hoeckel, *Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia*. Med Oncol, 2001. **18**(4): p. 243-59.
122. Gray, L.H., et al., *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. Br J Radiol, 1953. **26**(312): p. 638-48.
123. Thomlinson, R.H. and L.H. Gray, *The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy*. British journal of cancer, 1955. **9**(4): p. 539-549.
124. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
125. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 429-41.
126. Yoo, B.C. and S.-G. Yeo, *Clinical utility of pretreatment prediction of chemoradiotherapy response in rectal cancer: a review*. EPMA Journal, 2017. **8**(1): p. 61-67.
127. Zhu, Y., et al., *Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer*. Oncogene, 2005. **24**(43): p. 6555-63.
128. Raja, R., et al., *Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1alpha-mediated VEGF-dependent angiogenesis*. Oncogene, 2014. **33**(16): p. 2053-64.
129. Hui, E.P., et al., *Plasma Osteopontin, Hypoxia, and Response to Radiotherapy in Nasopharyngeal Cancer*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(21): p. 7080-7087.
130. Hockel, M., et al., *Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4509-15.
131. Wang, M., et al., *Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway*. Cancer Res, 2017. **77**(8): p. 2018-2028.
132. Vergis, R., et al., *Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study*. Lancet Oncol, 2008. **9**(4): p. 342-51.
133. Vordermark, D., et al., *Plasma osteopontin levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent on the choice of ELISA system*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 207.

134. Polat, B., et al., *Perioperative changes in osteopontin and TGFbeta1 plasma levels and their prognostic impact for radiotherapy in head and neck cancer*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 6.
135. Wang, W., et al., *Osteopontin activates mesenchymal stem cells to repair skin wound*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0185346.
136. Troiani, T., et al., *Increased TGF-alpha as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6751-65.
137. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 347-61.
138. De Bacco, F., et al., *Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(8): p. 645-61.
139. Cuneo, K.C., et al., *Enhancing the Radiation Response in KRAS Mutant Colorectal Cancers Using the c-Met Inhibitor Crizotinib*. Transl Oncol, 2019. **12**(2): p. 209-216.
140. Zhu, L., et al., *MicroRNA-198 inhibition of HGF/c-MET signaling pathway overcomes resistance to radiotherapy and induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer*. J Cell Biochem, 2018. **119**(9): p. 7873-7886.
141. Bhardwaj, V., et al., *Modulation of c-Met signaling and cellular sensitivity to radiation: potential implications for therapy*. Cancer, 2013. **119**(10): p. 1768-75.
142. Senetta, R., et al., *YKL-40/c-Met expression in rectal cancer biopsies predicts tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy: a multi-institutional study*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123759.

I Abkürzungsverzeichnis

Adj. CT	Adjuvante Chemotherapie
AJCC	engl. American Joint Committee on Cancer
AKT	Serin/Threonin spezifische Proteinkinase
ANOVA	engl. Analysis of Variance
AP-1	engl. Activator protein 1
APC	engl. Adenomatous-polyposis-coli
BRAF	engl. Rapidly accelerated fibrosarcoma, Isoform B
BSP	engl. Bone sialoprotein
CA 9 IX	Carboanhydrase IX
CBL	engl. Casitas B-lineage Lymphoma
c-Met/MET	engl. Mesenchymal Epithelial Transition
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRK	engl. v-crk sarcoma virus CT10 onbogene homolog
CRM	engl. Circumferential resection margin
cSRC	Thyrosinkinase c-SRC, engl. cellular and sarcoma
CT	Computertomographie
cTNM	engl. clinical TNM
DMP1	engl. dentin matrix protein 1
DSPP	engl. dentin sialophosphoprotein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	engl. Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	engl. Extracellular-signal regulated kinase
ETA-1	engl. Early T-lymphocyte activation 1
FAK	engl. Focal adhesion kinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FOLFOX	Kombinationschemotherapie aus: Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin
5-FU	5-Fluoruracil
G	engl. Grading, dt. Tumordifferenzierung
GAB1	engl. GRB2-binding protein 1
GRB2	engl. Growth factor receptor-bound protein 2
HCC	engl. Hepatocellular carcinoma
HGF	engl. Hepatocyte Growth Factor
HRP	engl. Horseradish peroxidase
HNPCC	engl. Hereditary non-polyposis colorectal cancer
HNSCC	engl. Head and neck squamous cell carcinoma
ICH	Immunhistochemie
IL-12	Interleukin 12
JNK1	engl. c-jun n-terminal kinase, Januskinase 1
K-RAS	engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
L	Lymphgefäßinvasion
MAP-Kinase	engl. Mitogen-activated-protein-kinase
MEK1	MAP2K1,
MEKK1	MAP3K1,
MEPE	engl. Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MLH1	engl. mutL homolog 1
MMP	Matrix-Metalloproteasen

Abkürzungsverzeichnis

MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	engl. MutS homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabil
MSS	Mikrosatellitenstabil
MUT4H	engl. mutY DNA glycosylase gene
MYH	engl. myosin heavy chain
NAR-Score	engl. Neoadjuvant rectal Score
NeoRCT	Neoadjuvante Radiochemotherapie
NeoRT	Neoadjuvante Radiotherapie
NF-κB	engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	engl. nuclear factor inducing kinase
NSCLC	engl. Non small cell lung cancer
OP	Operation
OPN	Osteopontin
Ox	Oxaliplatin
pCR	engl. Pathologic complete regression
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
pIR	engl. Pathologic incomplete regression
PKC	Proteinkinase C
PLCy	Phospholipase gamma
Pn	Perineuralscheideninfiltration
Akt/PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase und tensin homolog
pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RCT	Radiochemotherapie
SAP	Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung
SHC	src-homology 2 domain-containing
SIBLINGS	engl.: small integrin binding ligand N-linked glycoproteins
SIHP2	src homology 2 domain-containing 5'inositol phosphatase 2
siRNA	engl. Small interfering RNA
SOS	son of sevenless
SPP1	engl. secreted phosphoprotein 1
STAT3	signal transducer and activator of transcription
TMB	Tetramethylbenzidin
TME	Totale mesorektale Exzision
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TRG	engl. Tumor regression grading
UICC	engl. Union for International Cancer Control
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V	Venöse Infiltration
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Xelox	Kombinationschemotherapie aus: Capecitabin, Oxalipati

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorentstehung und -progression über OPN; Signalwege über CD44- und Integrinrezeptoren.	12
Abbildung 2: HGF und c-Met - Signalwege in der Tumorentstehung.	15
Abbildung 3: Ablauf der Studie.	19
Abbildung 4: Sandwich-ELISA.	20
Abbildung 5: Gesamtüberleben der Patienten im Verlauf der Nachsorge.	32
Abbildung 6: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pN-Status.	33
Abbildung 7: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom pM-Status.	34
Abbildung 8: Gesamtüberleben je nach UICC-Stadium.	35
Abbildung 9: Überleben in Abhängigkeit vom Resektionsstatus.	36
Abbildung 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Blutgefäßinfiltration.	37
Abbildung 11: Überleben in Abhängigkeit von der Perineuralscheideninfiltration.	37
Abbildung 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Remission.	38
Abbildung 13: Gesamtüberleben je nach Regression (Dworak).	39
Abbildung 14: Gesamtüberleben je nach NAR-Score.	40
Abbildung 15: Auftreten von Metastasen im zeitlichen Verlauf je nach NAR-Score.	40
Abbildung 16: Überleben in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen.	41
Abbildung 17: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der OPN-Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A).	42
Abbildung 18: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der c-Met Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A).	43
Abbildung 19: Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration vor Beginn der neoadjuvanten Therapie (Zeitpunkt A).	44
Abbildung 20: Osteopontin A in Abhängigkeit vom postoperativen UICC-Stadium.	46
Abbildung 21: Osteopontin A in Abhängigkeit vom pT-Stadium.	46
Abbildung 22: OPN-Konzentration vor der neoadjuvanten Therapie im Zusammenhang mit einer pathologisch kompletten Remission.	47
Abbildung 23: Osteopontin-Konzentration zum Zeitpunkt A in Abhängigkeit vom NAR-Score.	48
Abbildung 24: Osteopontinkonzentration zum Zeitpunkt A je nach Regression nach Dworak.	49
Abbildung 25: Verlauf der Osteopontin-Konzentration.	50
Abbildung 26: Verlauf der Osteopontin-Konzentration in Bezug auf einen Krankheitsprogress.	51
Abbildung 27: Verlauf der Osteopontin-Konzentration in Bezug auf das Auftreten von Fernmetastasen.	52
Abbildung 28: Osteopontin-Konzentration in Bezug auf das Auftreten eines Lokalrezidivs.	53
Abbildung 29: c-Met-Konzentrationen und Progression.	55
Abbildung 30: c-Met-Konzentrationen und Lokalrezidive.	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: <i>Abhängigkeit von OPN-A und HGF-A</i>	58
--	----

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Klassifikation des Rektumkarzinoms nach UICC Stadieneinteilung.</i>	5
Tabelle 2: <i>Übersicht über die Häufigkeitsverteilung und deskriptive Statistik der Patientencharakteristika und Tumorklassifikationen, der pathologischen Parameter und Therapie- und Verlaufs-assoziierten Daten.....</i>	26
Tabelle 3: <i>Deskriptive Statistik der gemessenen Biomarker-Konzentrationen.</i>	29

IV Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Michael Flentje und Herrn Priv-Doz. Dr. med. Bülent Polat für die Ermöglichung der Dissertation bedanken. Vielen Dank für die gute Betreuung und die andauernde Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gisela Wohlleben und Frau Mariola Dragan für die Betreuung und Einarbeitung im Labor, sowie die hilfreichen Ratschläge bei der Laborarbeit.

Einen weiteren Dank möchte ich an Frau Viktoria Rücker vom epidemiologischen Institut der Universität Würzburg für die Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung richten.

Ein besonderes Dankeschön widme ich meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden für die fortwährende Motivation, die Hilfsbereitschaft und die erfahrene Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe keine Doktorprüfung an einer anderen Hochschule abgelegt oder endgültig nicht bestanden.

Würzburg, den 10.05.2022

Theresa Dalkmann