

Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie  
(Prof. Dr. med. H. Becker)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Prädiktives und prognostisches Potential der Thymidylatsynthase  
als Biomarker im multimodalen Therapiekonzept 5-FU-basierter  
Radiochemotherapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms**

**Immunhistochemische Analyse prätherapeutischer Biopsien und  
korrespondierenden residuellen Tumorgewebes**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Lena-Christin Conradi  
aus  
Hamburg

Göttingen 2010

---

**D e k a n:**

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

PD Dr. med T. Liersch

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. med J. Meller

III. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2010

---

## Inhaltsverzeichnis

### I. Abkürzungsverzeichnis

### II. Abbildungsverzeichnis

### III. Tabellenverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Ätiopathogenese kolorektaler Karzinome.....	1
1.2	Klassifikation kolorektaler Karzinome.....	4
1.3	<b>Tumorstadien-adaptierte Therapie des Rektumkarzinoms .....</b>	<b>6</b>
1.3.1	Lokal begrenzte Rektumkarzinome .....	6
1.3.2	Lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome .....	6
1.3.3	Lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome – Multimodale Therapie .....	8
1.4	<b>Radiochemotherapie-induzierte Tumorregression .....</b>	<b>9</b>
1.5	<b>Individualisierung der onkologischen Therapie .....</b>	<b>10</b>
1.6	<b>Ansätze zur Individualisierung der multimodalen Therapie beim UICC-II/-III-Rektumkarzinom.....</b>	<b>11</b>
1.7	<b>Biomarker beim Rektumkarzinom zur Prädiktion und Prognoseabschätzung.....</b>	<b>12</b>
1.8	<b>5-FU-Metabolismus.....</b>	<b>12</b>
1.9	<b>Tumorbiologische Bedeutung der Thymidylatsynthase .....</b>	<b>14</b>
1.10	<b>Immunhistochemischer Nachweis der Thymidylatsynthase .....</b>	<b>15</b>
1.11	<b>Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Patientenkollektive, Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1	Untersuchtes Patientenkollektiv .....	17
2.2	Material.....	18
2.3	Prätherapeutische Staginguntersuchungen.....	18
2.4	Therapieablauf.....	19
2.5	Peri- und postoperative Qualitätskontrolle des Resektates .....	20
2.6	Histopathologische Aufarbeitung des Resektates und Beurteilung.....	23

---

<b>2.7</b>	<b>Tumoransprechen auf die präoperative RT/CTx</b> .....	<b>25</b>
<b>2.8</b>	<b>Follow-Up-Untersuchungen</b> .....	<b>28</b>
<b>2.9</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>28</b>
2.9.1	Schnittanfertigung.....	29
2.9.2	Automatisierte Färbungen.....	30
2.9.3	Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	31
<b>2.10</b>	<b>Statistische Analysen</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Prätherapeutisches klinisches Staging</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Operationsmethode</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Tumorstadien nach histopathologischem Befund</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Rezidive und tumorbedingte Todesfälle</b> .....	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>TS-Expressionslevel aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie und aus dem Rektumkarzinomresektat</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Korrelation der TS-Expression aus der prätherapeutischen Biopsie mit dem tumorbedingten Gesamtüberleben</b> .....	<b>46</b>
<b>3.7</b>	<b>Korrelation der TS-Expressionslevel aus Tumorgewebe nach Rektumresektion mit dem tumorfreien Überleben</b> .....	<b>47</b>
3.7.1	Effekt der intensivierten RT/CTx auf die intratumorale TS-Expression und ihre prognostische Bedeutung.....	54
<b>3.8</b>	<b>Korrelation der prätherapeutischen TS-Expression mit dem Grad der Tumorregression</b> .....	<b>55</b>
<b>3.9</b>	<b>Multivariate Analyse der TS-Expression mit kliniko-pathologischen Parametern</b> .....	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinikopathologische Parameter des untersuchten Patientenkollektivs</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Korrelation der prätherapeutischen TS-Expression mit dem TRG</b> .....	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Prognostisches</i> Potential der TS-Expression in der prätherapeutischen Biopsie</b> ...	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>Therapiestratifizierung durch Untersuchung des TS-Genotyps</b> .....	<b>64</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Prognostische</i> Bedeutung der TS-Expression aus dem residuellen Tumor</b> .....	<b>65</b>
<b>4.6</b>	<b>Intratumorale TS-Expressionsmuster unter intensivierter RT/CTx</b> .....	<b>66</b>

---

<b>4.7</b>	<b>Ableitungen für die klinische Praxis und Ausblick.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Anhang: Therapieschemata .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>74</b>

---

## I. Abkürzungsverzeichnis

AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli-Tumorsuppressorgen
APR	Abdominoperineale Rektumexstirpation
ARO	Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie
Art.	Arteria
CAO	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie
cm	Zentimeter
CRM	Circumferential Resection Margin
CSS	Cancer Specific Survival
CT	Computertomographie
CTx	Chemotherapie
cTNM	TNM-Klassifikation nach klinischen Stagingergebnissen
DFS	Disease Free Survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
5-FU	5-Fluorouracil
F-β-Ala	2-Fluoro-β-Alanin
FdUMP	Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FdUTP	Fluorodesoxyuridintriphosphat
FM	Fernmetastase
FUR	Fluorouridine
FUTP	Fluorouridintriphosphat
GRCSG	German Rectal Cancer Study Group
K-RAS	Kirsten-ras-Protoonkogen

---

KRK	Kolorektale Karzinome
LR	Lokalrezidiv
LK	Lymphknoten
Min	Minuten
ml	Milliliter
MLH1	mut L alpha homologue
MSH2	mut S alpha homologue
MSH6	mut S homologue 6
OS	Overall Survival
P53	Tumorsuppressorgen
pCR	pathologische Komplettremission
PCR	Polymerase Chain Reaction
PME	Partielle Mesorektale Exzision
pTNM	TNM-Klassifikation nach histopathologischem Befund
rUS	rektale Endosonographie
RNA	Ribonukleinsäure
RTx	Radiotherapie
RT/CTx	Radio-/Chemotherapie
Std.	Stunden
TARR	Tiefe anteriore Rektumresektion
TEM	Transanale endoskopische Mikrochirurgie
TME	Totale Mesorektale Exzision
TNM	Klassifikationssystem maligner Tumore
TRG	Tumor Regression Grading / Tumorregressionsgrad
TS	Thymidylatsynthase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ypTNM	TNM-Klassifikation gemäß histopathologischem (p) Befund nach neoadjuvanter Therapie (y)

---

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	.....	3
Abbildung 2:	.....	5
Abbildung 3:	.....	8
Abbildung 4:	.....	13
Abbildung 5:	.....	19
Abbildung 6:	.....	21
Abbildung 7:	.....	22
Abbildung 8:	.....	22
Abbildung 9:	.....	27
Abbildung 10:	.....	31
Abbildung 11:	.....	32
Abbildung 12:	.....	33
Abbildung 13:	.....	44
Abbildung 14:	.....	45
Abbildung 15:	.....	46
Abbildung 16:	.....	47
Abbildung 17:	.....	48
Abbildung 18:	.....	50
Abbildung 19:	.....	50
Abbildung 20:	.....	52
Abbildung 21:	.....	53
Abbildung 22:	.....	55
Abbildung 23:	.....	56

## III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	.....	5
Tabelle 2:	.....	27
Tabelle 3:	.....	36
Tabelle 4:	.....	40
Tabelle 5:	.....	42
Tabelle 6:	.....	44
Tabelle 7:	.....	58
Tabelle 8:	.....	59
Tabelle 9:	.....	68



## 1 Einleitung und Fragestellung

Seit Beginn der 80er Jahre hat die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) vor allem in den Industriestaaten Westeuropas und den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) einen anhaltend steigenden Trend. Im Jahr 2009 wurden in den USA 106.100 Neuerkrankungen dokumentiert, hiervon traten allein 40.870 im Rektum auf (Jemal et al. 2009). Im Vergleich der Bundesländer Deutschlands nimmt Niedersachsen mittlerweile die Spitzenposition mit 80 neu diagnostizierten Fällen pro 100.000 Einwohner ein (Robert Koch Institut 2010). Weltweit stellt das KRK geschlechtsunabhängig die dritthäufigste Krebserkrankung dar (Jemal et al. 2009). Dies gilt auch für die krebsassoziierten Todesfälle, wenngleich die bundesdeutsche Krebsregister-Statistik für die KRK-Erkrankung einen Rückgang der Mortalität seit Mitte der 90er Jahre verzeichnen kann (Robert Koch Institut 2010).

Nach wie vor stellt das KRK eine Malignomerkrankung von relevantem sozioökonomischem Stellenwert dar. Gerade in den hochindustrialisierten Ländern mit einer vergleichsweise langen Lebenserwartung der Bevölkerung ist die Früherkennung und eine Tumorstadien-adaptierte Behandlung nicht nur für den einzelnen Patienten von größter Bedeutung, sondern auch aus sozioökonomischer und gesundheitspolitischer Sicht relevant (Landis et al. 1998, Midgley und Kerr 1999). Zur Umsetzung moderner Therapiestrategien (z.B. die Kombination aus Chemotherapie und einer zielgerichteten Therapie mit monoklonalen Antikörpern) unter Berücksichtigung eines Kosten-Nutzen-Effektes ist die molekularbiologische Charakterisierung KRK, sei es auf genomischer oder proteomischer Ebene, in den Fokus der Forschung gerückt.

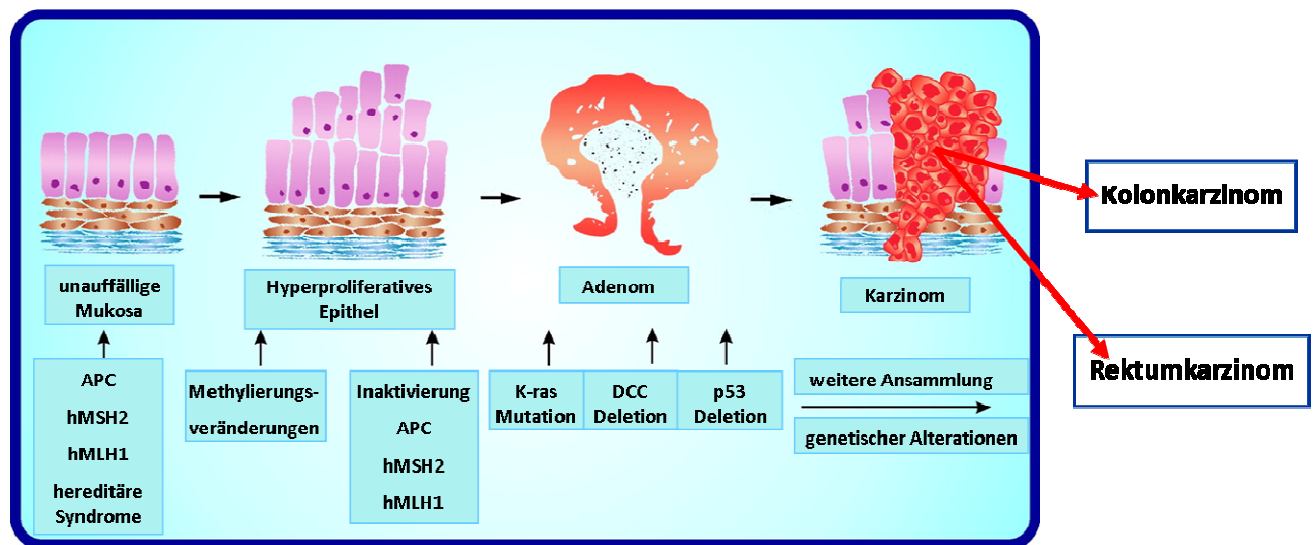
### 1.1 Ätiopathogenese kolorektaler Karzinome

Ätiopathogenetisch werden KRK in sporadische und hereditär auftretende Tumore unterschieden. Beispielsweise treten erblich bedingte KRK im Rahmen einer familiären

adenomatösen Polyposis (FAP) oder eines ‚hereditary nonpolyposis colon-cancer-Syndroms‘ (HNPCC) auf. Letztere machen etwa 5 % aller KRK aus (Keller et al. 2008).

Für die Entstehung sporadischer kolorektaler Adenokarzinome wird postuliert, dass sie sich aus vorbestehenden benignen Adenomen entwickeln. Ein hohes Risiko zur malignen Transformation haben dabei vor allem breitbasige villöse und sehr große Adenome (Seidensticker und Schmiegel 1998). Dieser als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bezeichnete Entstehungsmechanismus (Abbildung 1) wurde erstmals von Muto et al. (1975) beschrieben. Auf zytogenetischer Ebene wurde dieses Modell durch die Identifikation von nacheinander erworbenen Mutationen erweitert, die schließlich über den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (wie z.B. APC oder p53) und die Aktivierung von Onkogenen (z.B. k-ras) zur Karzinomentstehung führen (Vogelstein et al. 1988).

Während die Karzinogenese über diesen sogenannten „Signalweg der Chromosomeninstabilität“ bei nahezu 80 % der sporadischen Tumore nachweisbar ist, finden sich in etwa 16 % der Fälle Mutationen in DNA-Reparaturgenen, wie z.B. MSH2/6 auf Chromosom 2p16 oder MLH1 auf Chromosom 3p21. Die Aufgabe dieser Gene ist die Korrektur von DNA-Replikationsfehlern. Ihr Ausfall führt über eine Anhäufung von Mutationen zur Karzinogenese und wird als „Mikrosatelliteninstabilitäts“-Signalweg bezeichnet (Aaltonen und Peltomaki 1994).



**Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz modifiziert nach Geenen et al. 2004, e18**

Die Hypothese zur Karzinogenese von KRK umfasst einen mehrstufigen Prozess, der über verschiedene morphologische, molekulare und genetische Veränderungen zur Entstehung invasiven Karzinomwachstums aus einem Adenom führt. Es wird angenommen, dass das Zeitintervall zur Entwicklung eines adenomatösen Polypen aus normaler Kolonschleimhaut etwa 5 Jahre beträgt.

Nach ungefähr weiteren 5 Jahren resultiert dann ein invasives Karzinomwachstum. Auf der Annahme dieser Adenom-Karzinom-Sequenz basieren die gegenwärtigen nationalen und internationalen Vorsorgeempfehlungen.

Es wird angenommen, dass das KRK gemäß dieser Hypothese durch frühzeitige Polypektomie eine in ihrem Malignitätspotential vermeidbare Erkrankung darstellt. Dieser Entstehungsmechanismus wird gleichsam für das Kolon- wie auch das Rektumkarzinom postuliert, obgleich es Hinweise gibt, dass man von zwei unterschiedlichen Tumorentitäten auszugehen hat (Minoo 2010).

Für das Auftreten hereditärer KRK wird das Vorliegen von Keimbahnmutationen in entsprechenden Genabschnitten verantwortlich gemacht, woraus dann das Auftreten einer somatischen Mutation des korrespondierenden Allels („Two-Hit-Hypothese“) in der Karzinomentstehung resultiert (Knudson 1970).

Neben diesen endogenen Risikofaktoren, zu denen auch das Vorhandensein einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zählt, sind inzwischen auch einige exogene Risikofaktoren, wie hoher Fleisch- und Fettkonsum, ballaststoffarme Ernährungsweise, unzureichende Vitaminzufuhr, Alkohol- und Kaffeekonsum (Simons et al. 2010), hoher sozioökonomischer Status und körperliche Inaktivität identifiziert worden (Midgley und

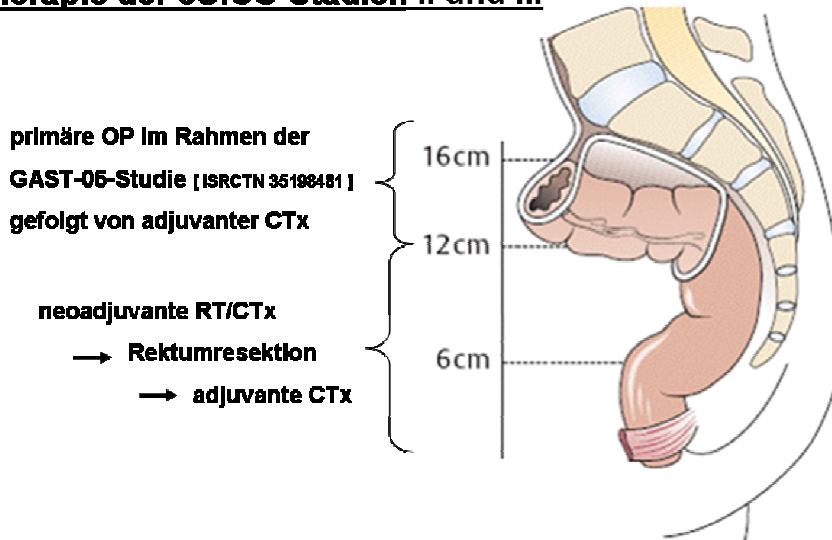
Kerr 1999). Die genauen Entstehungsursachen sind allerdings bis heute nicht geklärt (Liersch et al. 2007a).

## 1.2 Klassifikation kolorektaler Karzinome

Nach der im Behandlungszeitraum der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten geltenden UICC-/TNM-Klassifikation (Sobin 2003, Wittekind et al. 2002, Wittekind und Meyer 2010) werden KRK ihrer Höhenlokalisation entsprechend in Kolon- und Rektumkarzinome unterschieden. Dabei werden Karzinome dem Rektum zugeordnet (Abbildung 2), wenn ihr Sitz mittels starrer Rektoskopie bei  $\leq 16$  cm von der Anokutanlinie bestimmt wird (Fielding et al. 1991). Zudem werden Rektumkarzinome dem unteren ( $< 6$  cm), mittleren (6-  $<12$  cm) oder oberen (12-16 cm) Rektumdrittel zugeordnet und entsprechend dieser Höhenlokalisation (Distanz zwischen Anokutanlinie und aboralem Tumorrund) ihrer spezifischen Therapie zugeführt (Liersch et al. 2007a). Der Anteil an Rektumkarzinomen unter allen KRK beträgt 30-40 % (Jemal et al. 2009), z.T. bis 60% in Abhängigkeit von dem jeweiligen auf diese Malignomerkrankung spezialisierten Therapiezentrum.

Die Einteilung des T-Stadiums (Tabelle 1) orientiert sich beim Rektumkarzinom, wie im Gastrointestinaltrakt üblich, nicht an der diametrischen Größe des Primärtumors, sondern an der Infiltrationstiefe in die Darmwand (Junginger et al. 2002). Eine möglichst valide Erfassung des Lymphknotenstatus - aus der Untersuchung von mindestens 12 regionären Lymphknoten (Hermanek 1995) - diskriminiert die UICC-Stadien II und III. Der histopathologisch evaluierte Lymphknotenstatus ist, wie u.a. bereits auch durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, von erheblicher prognostischer Bedeutung für den postoperativen Langzeitverlauf der Rektumkarzinompatienten (Sprenger et al. 2009a).

## Therapie der cUICC-Stadien II und III



**Abbildung 2: Einteilung des Rektums**

Dritteleinteilung gemessen mittels starrer Rektoskopie ab Anokutanlinie und Stratifizierung in multimodale Therapieregime (nach Liersch et al. 2007a, S. 48)

TNM-Klassifikation (Sobin 2003)		UICC-Stadium	
Tis	Carcinoma in situ	-	
T1	Muscularis propria ist nicht betroffen	I	
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria		
T3	Tumor infiltriert bis in die Subserosa und in perirektales Gewebe Penetration angrenzender Organe oder in viszerales Peritoneum	II	
T4			
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten	III	
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten		
M1	Fernmetastasen	IV	
<b>TNM-Stadiengruppierung: UICC 2003 (Sobin 2003)</b>			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M0

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation und UICC-Stadiengruppierung (nach Wittekind und Meyer 2010, S.98)**

### 1.3 Tumorstadien-adaptierte Therapie des Rektumkarzinoms

Die kurative Therapie des Adenokarzinoms des Rektums erfordert neben einer umfassenden Diagnostik auch die frühzeitige interdisziplinäre Kooperation der an der Tumorstadien-adaptierten Behandlung beteiligten Fachdisziplinen (Pathologie, Chirurgie, Radiologie, Strahlentherapie und internistische Onkologie). Innerhalb eines differenzierten Behandlungskonzeptes hat die chirurgische Therapie einen besonderen Stellenwert, da seit langem bekannt ist, dass die Prognose des Patienten entscheidend von der Qualität der durchgeführten Resektion abhängt.

#### 1.3.1 Lokal begrenzte Rektumkarzinome (UICC-I-Stadien)

Frühzeitig entdeckte, gut differenzierte Rektumkarzinome (T1 G1/2) werden als *low-risk*-Karzinome eingestuft und können lokal mit einer transanal endoskopisch-mikrochirurgischen (TEM) Vollwandexzision behandelt werden (Becker und Liersch 2006). Bei schlecht differenzierten Karzinomen (T1 G3/4), sogenannten *high risk*-Karzinomen, beträgt das Risiko für eine bereits vorhandene lymphogene Metastasierung bereits 30 % (Schmiegel et al. 2005), so dass bei diesen Patienten eine transabdominelle Rektumresektion unter Mitnahme des mesorektalen Fettkörpers mitsamt des rektalen Lymphabstromgebiets indiziert ist (Langer et al. 2003, Liersch et al. 2005). Dies gilt auch für T2N0 Rektumkarzinome (UICC-I-Stadium).

#### 1.3.2 Lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome (UICC-II/-III-Stadien)

Mit der konsequenten Einführung der totalen mesorektalen Exzision (TME) unter Entfernung des gesamten retrorektalen Fettkörpers konnte die bis dahin dokumentierte Lokalrezidivrate von 30-40% auf 5-15% gesenkt werden (Enker 1997, Heald et al. 1982, Kusters et al. 2010). Durch die Präparation innerhalb der embryonal angelegten Faszien-systeme des kleinen Beckens bleibt bei der TME die Integrität der mesorektalen

Hüllfaszie gewahrt (Chapuis et al. 2002, Crapp und Cuthbertson 1974). Die TME erfolgt grundsätzlich nach onkologischen Resektionsprinzipien. Dazu zählt das Operieren in No-Touch-Technik, eine zentrale Gefäßdissektion, die Durchführung einer lokoregionalen Lymphadenektomie sowie eine En-bloc-Resektion tumoradhärenter Gewebe (Liersch et al. 2007a).

Bei einem Tumorsitz in den unteren zwei Rektumdritteln wird grundsätzlich eine tiefe anteriore Rektumresektion (TARR) mit TME durchgeführt. Bei einer Tumorlokalisation im oberen Rektumdrittel (12-16 cm ab Anokutanlinie) kann eine anteriore Rektumresektion (ARR) mit partieller mesorektaler Exzision (PME) erfolgen (Abbildung 3). Die ARR mit PME wird dann als onkologisch ausreichend angesehen (gegenwärtige Überprüfung innerhalb der GAST-05 Studie<sup>1</sup>), wenn in vivo der aborale Sicherheitsabstand 5cm beträgt (entspricht am frischen, nicht ausgespannten Präparat etwa 3cm). Bei der PME muss zusätzlich darauf geachtet werden, dass ein Coning<sup>2</sup> des Mesorektums zum distalen Resektionsrand vermieden wird.

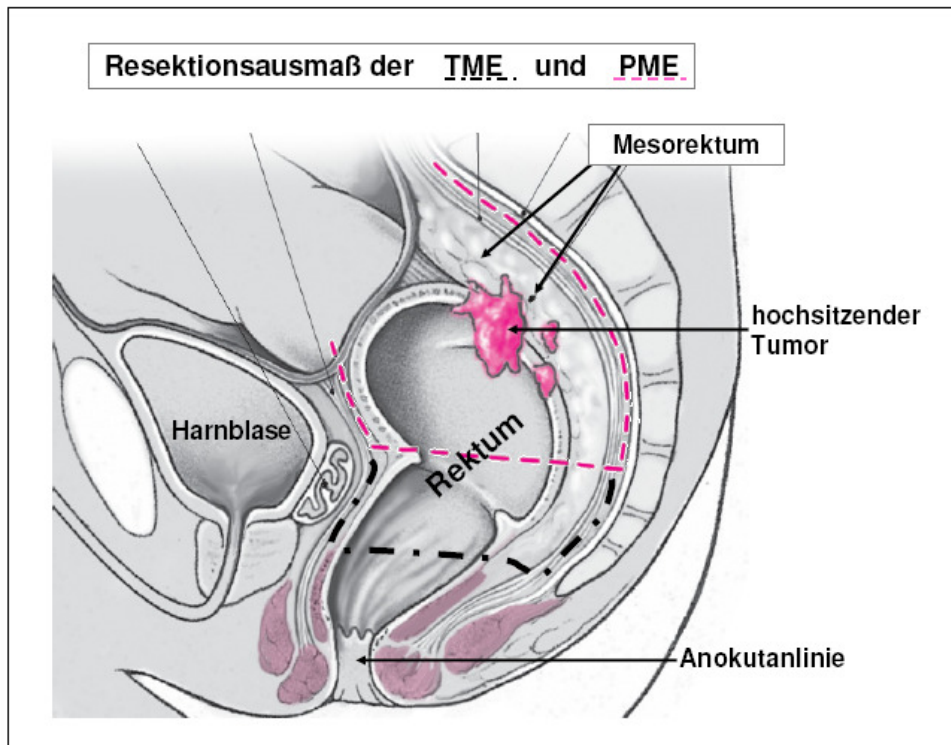
Ist eine kontinenserhaltende Resektion bei einer Tumorlokalisation < 2cm zur Linea dentata oder bei Sphinkterinfiltration nicht möglich, so muss unter kurativem Anspruch eine abdominoperineale Rektumexstirpation erfolgen (Becker und Liersch 2006).

Zusätzlich sollte bei der onkologischen Rektumresektion eine perioperative Qualitätsbeurteilung der TME bzw. PME durch Methylenblauanfärbung des Resektates via A. mesenterica inferior stattfinden (Liersch et al. 2005, Lou et al. 2010, Sterk et al. 2000) sowie eine Klassifikation durch den Pathologen nach den MERCURY-Kriterien (siehe Kapitel 2.5, M.E.R.C.U.R.Y. 2002).

---

<sup>1</sup> Im Rahmen der Gast-05-Studie wird bei cUICC II/III Rektumkarzinomen mit Sitz im oberen Drittel (12-16 cm ab Anokutanlinie) geprüft, ob eine PME der allgemein akzeptierten TME onkologisch und funktionell ebenbürtig ist.

<sup>2</sup> Unter *Coning* versteht man ein fälschlicherweise frühzeitiges proximales konusförmiges Ausdünnen des Mesorektums zur Resektionsebene am Darm. Ein *Coning* wird bei der PME vermieden, sofern das Mesorektum im rechten Winkel zur Darmlängsachse durchtrennt wird. (Becker und Liersch 2006).



**Abbildung 3: Resektionsausmaß der PME und TME  
(modifiziert nach Becker und Liersch 2006, S. 610)**

### 1.3.3 Lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome – Multimodale Therapie

Für lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome (UICC-II und -III-Stadium) hat seit Veröffentlichung der 5-Jahres-Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94 Studie (Sauer et al. 2004), einer multizentrischen Phase-III-Studie der German Rectal Cancer Study Group (GRCSG) unter Einschluss von 980 Patienten, ein Paradigmenwechsel in der Therapie eingesetzt (Rödel 2010): Während es zuvor bereits in spezialisierten Zentren gelungen war, durch Optimierung von Staginguntersuchungen, Resektionstechniken (z.B. Einführung der TME) und postoperativer multimodaler Behandlung (Radiotherapie und/oder Chemotherapie) das tumorfreie Überleben wie auch das Gesamtüberleben zu steigern (GITSG 1992, Moertel 1994, O'Connell et al. 1994), so blieb flächendeckend der langfristige Therapieerfolg durch das Auftreten von Lokalrezidiven in bis zu 40% der Fälle mit konsekutiver, progredienter Malignomkrankung limitiert (Hermanek 1995, Hermanek et al. 1994). Aufgrund dieser Tatsache wurde generell die postoperative (adjuvante) Radiochemotherapie (RT/CTx) empfohlen (Benson et al. 2000).



Durch den Einsatz der neoadjuvanten RT/CTx: Radiatio mit 50,4 Gy und begleitender 5-FU-Monotherapie (siehe Anhang) konnte in der CAO/ARO/AIO-94-Studie die 5-Jahres-Lokalrezidivrate bei cUICC-II/III-Rektumkarzinomen von 13% (Kontrollarm) auf 6% (neoadjuvante RT/CTx) gesenkt werden (Sauer et al. 2004). Im bisherigen Follow-up zeigte sich für die neoadjuvante RT/CTx bisher noch kein signifikanter Effekt auf das Gesamtüberleben. Im Vergleich zu anderen Studien sind jedoch die bisherigen DFS und OS Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie deutlich besser (Link et al. 2010).

Zudem konnte in der multizentrischen CAO/ARO/AIO-94-Studie erstmalig gezeigt werden, dass bei 10% der Patienten mit einem initialen cUICC-II/III-Rektumkarzinom durch die präoperative RT/CTx eine histopathomorphologisch bestätigte, komplette Tumorremission (pCR entsprechend einem Tumorregressionsgrad 4/100%, siehe Kapitel 2.7), erreicht werden kann (Sauer et al. 2004).

#### **1.4 Radiochemotherapie-induzierte Tumorregression**

In weiteren Subgruppenanalysen R0-resezierter Patienten der CAO/ARO/AIO-94-Studie (Rödel et al. 2005) zeigte sich, dass die o.g. Patienten mit kompletter Tumorremission im 5-Jahre-Nachsorgeintervall ein signifikant besseres tumorfreies Überleben (DFS bei Patienten mit TRG 4: 86%) aufwiesen gegenüber jenen Patienten, bei denen durch die präoperative RT/CTx nur eine geringe oder gar keine Tumorregression induziert werden konnte (DFS bei Patienten mit TRG  $\leq 1$ : 63%,  $p=0.006$ ). Zudem war die Rate an Lokalrezidiven mit dem Grad der Tumorregression assoziiert: 6% bei TRG 0-1, 4% bei TRG 2-3 und 0% bei TRG 4. Das krankheitsfreie Überleben der Patienten wurde nahezu ausschließlich vom Auftreten von Fernmetastasen bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich unter einer allein mit 5-FU kombinierten RT/CTx ein sehr heterogenes lokoregionäres Ansprechen beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom beobachten, das von der kompletten Tumorremission bis zur nahezu totalen Therapieresistenz reichen kann.

Um die Rate an Komplettremissionen (pCR-Rate) zu steigern und um die systemische Tumorkontrolle (Vermeidung der Fernmetastasierung) mit konsekutiv verlängertem DFS und OS zu verbessern, wurde durch die GRCSG die aktuelle CAO/ARO/AIO-04-Studie als Phase-III-Nachfolgestudie zur CAO/ARO/AIO-94-Studie initiiert. In dieser gegenwärtig aktiven CAO/ARO/AIO-04-Studie wird der ehemalige experimentelle Therapiearm der „alten“ CAO/ARO/AIO-94-Studie (präoperative RT/CTx mit 5-FU-Monotherapie) als Standardarm gegen die Kombination von 5-FU+Oxaliplatin+RTx (siehe Anhang) geprüft (Liersch et al. 2009). Allerdings stellt auch in diesem intensivierten Therapiekonzept 5-FU als Radiosensitizer weiterhin die zentrale Basistherapie dar.

## 1.5 Individualisierung der onkologischen Therapie

Mit der Entwicklung zur Intensivierung der multimodalen Therapie ist neben einer Steigerung der pCR-Rate vor allem auch mit einer höheren Therapie-assoziierten Toxizitätsrate zu rechnen. Vor diesem Hintergrund wird aus klinischer Sicht zunehmend eine am einzelnen Patienten orientierte, individualisierte Behandlung eingefordert. Dabei soll die onkologische Patientenversorgung bestmöglich dem individuellen Tumorrezidiv-Risikoprofil angepasst sein: Zum einen muss die Malignomerkrankung so aggressiv und effektiv wie möglich behandelt werden; zum anderen soll die Lebensqualität durch die therapieassoziierte Toxizität nur in vertretbarem Maß eingeschränkt werden. Außerdem besteht vor dem Hintergrund begrenzter Ressourcen im Gesundheitssystem zunehmend die Forderung, kostenintensive Anti-Tumorsubstanzen (wie z.B. die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab) nur bei zu erwartender Effektivität beim jeweiligen Patienten einzusetzen.

Für eine Individualisierung der Therapie ist es notwendig, Parameter zu kennen, die tatsächlich eine *Responsprädiktion* erlauben und eine Risikoabschätzung für das Auftreten von Rezidiven ermöglichen. Auf der Grundlage einer Auswahl solcher *prädiktiver* und *prognostischer* Biomarker wäre es möglich zu entscheiden, von welchen

Therapiemaßnahmen der einzelne Patient tatsächlich profitiert und welche unerwünschten Wirkungen billigend in Kauf zu nehmen sind (Liersch et al. 2009).

In der Behandlung des Mammakarzinoms und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sind bereits risikoadaptierte Therapieentscheidungen etabliert: Beim Mammakarzinom verdeutlichen die aktuellen Therapieempfehlungen beispielhaft, wie die genauere Kenntnis der Tumorbilogie die Anwendung sehr individueller, stadienabhängiger Therapieregime ermöglichen kann (Goldhirsch et al. 2009). Ähnliches gilt auch für die akute lymphatische Leukämie (ALL), deren zielgerichtete, Risiko-stratifizierte Therapie auf der Kenntnis der Zytogenetik basiert (Fey und Dreyling 2009)<sup>3</sup>.

## **1.6 Ansätze zur Individualisierung der multimodalen Therapie beim UICC-II/-III-Rektumkarzinom**

In der Behandlung des Rektumkarzinoms hat sich im vergangenen Jahrzehnt mit der Einführung der präoperativen RT/CTx für cUICC-II/III-Rektumkarzinome und der TME als standardisiertem Resektionsverfahren eine rasante Entwicklung vollzogen (Liersch et al. 2007a). Mittlerweile sind aber auch für diese Malignomerkkrankung erste Schritte einer individualisierten Therapie erfolgt: So wird z.B. in der von der DFG geförderten GAST-05-Studie eine Rücknahme der operativen Radikalität (TME) zugunsten einer Nerven schonenden Resektionstechnik (PME) unter Aussetzen der multimodalen neoadjuvanten RT/CTx bei cUICC-II/III-Karzinomen geprüft, die im oberen Drittel des Rektums lokalisiert sind. Andere Forschungsprojekte verfolgen das Ziel, über diese anatomieabhängige Vorgehensweise hinausgehende, individualisierte Therapieempfehlungen in Abhängigkeit von tumorspezifischen Genexpressionsprofilen und Proteinexpressionsmustern abzuleiten (Liersch et al. 2009).

Derartige Expressionsprofile und einzelne Biomarker sollen Rückschlüsse auf die Tumorbilogie und das individuelle Rezidiv-/Progressions-Risiko erlauben.

---

<sup>3</sup> So können inzwischen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und dem Nachweis einer FLT-3-Mutation, die eine schlechtere Prognose vorhersagt, mit Midostaurin - einem Inhibitor der FLT-3-Tyrosinkinase - therapiert werden, um die Remissionsraten zu verbessern (Burnett und Knapper 2007).

## 1.7 Biomarker beim Rektumkarzinom zur Prädiktion und Prognoseabschätzung

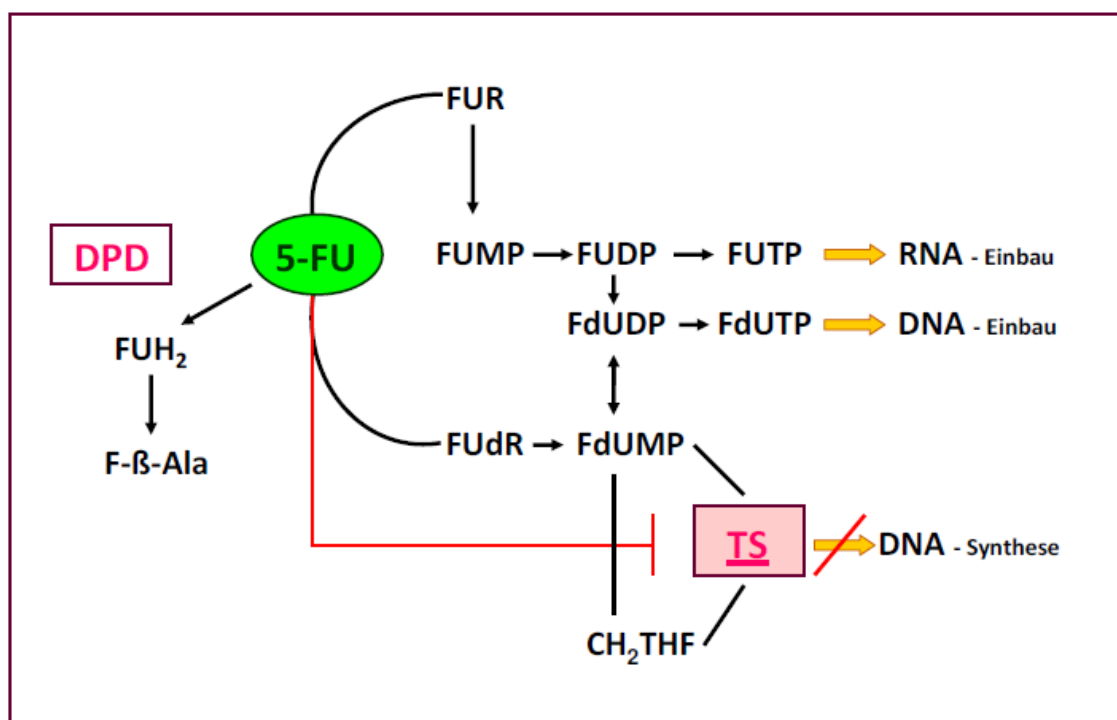
Die bisher untersuchten potentiell prädiktiven und prognostischen Biomarker zum neoadjuvant behandelten Rektumkarzinom sind in den Metaanalysen von Popat et al. (2004) und Kuremsky et al. (2009) zusammengefasst. Aus den dargestellten Analysen lässt sich bisher noch kein routinemäßiger Einsatz in der klinischen Praxis ableiten. Die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse resultieren aus methodisch unterschiedlichen, z.T. nicht standardisierten Analyseverfahren und relativ kleinen, heterogenen Patientenkohorten. Allerdings betont die aktuellste Metaanalyse ein *prädiktives* und *prognostisches* Potential der Biomarker EGFR und Thymidylat Synthase, das in größeren Studien/Patientenkohorten überprüft werden müsse (Kuremsky et al. 2009).

Wie bereits erwähnt, stellt 5-FU weiterhin die chemotherapeutische Basissubstanz in der multimodalen Therapie des Rektumkarzinoms dar. Dies gilt auch für innovative Studienkonzepte mit einer Intensivierung der Systemtherapie (Rödel und Sauer 2007) sowie auch für aktuelle Phase-II-Studien mit Änderung der Therapiesequenz z.B. durch eine vor der neoadjuvanten RT/CTx durchgeführte intensivierete Induktionstherapie (Chua et al. 2010, Fernandez-Martos et al. 2010). Aus diesem Zusammenhang ergibt sich die Rationale der vorliegenden Dissertation zur Untersuchung der Thymidylatsynthase, dem wichtigsten Target des Antimetaboliten 5-FU.

## 1.8 5-FU-Metabolismus

Seit über 40 Jahren hat 5-FU in der Behandlung des KRK eine zentrale Bedeutung (Heidelberger et al. 1957). Beim Rektumkarzinom kann es in seiner Funktion als Radiosensitizer die Wirkung der Strahlentherapie steigern (Minsky et al. 1992, Moertel 1994).

Der Antimetabolit 5-FU zählt zur Gruppe der Pyrimidinantagonisten und hat durch Fehleinbau in RNA wie DNA an Stelle der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin bzw. Uracil hemmende Wirkung auf die Zellteilung und die Proteinexpression. 5-FU selbst ist inaktiv und wird in die Nukleotide FUTP, FdUTP und FdUMP (Abbildung 4) umgewandelt (Pinedo und Peters 1988). Der wichtigste Mechanismus scheint allerdings die Hemmung des Enzyms TS durch FdUMP zu sein (Peters et al. 1987). Die TS stellt durch Methylierung von Pyrimidinbasen die einzige intrazelluläre Quelle der Thymin-de novo-Synthese dar und ist damit essentiell für DNA-Synthese und Zellwachstum.



**Abbildung 4: 5-FU-Signalweg modifiziert nach Pinedo und Peters 1988, S. 1654**

5-FU wird in die wirksamen Nukleotide FUDP und FdUDP umgewandelt, die dann als funktionslose Antimetaboliten die DNA- und RNA-Synthese stören. Zusätzlich wirkt FdUMP direkt hemmend auf die Thymidylatsynthase, die die einzige intrazelluläre Quelle zur Thymin-de-novo-Synthese darstellt. Der 5-FU-Abbau wird durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) katalysiert.

Aus vorklinischen Studien ist bekannt, dass der 5-FU-Wirkmechanismus vom Verabreichungsmodus abhängt. Während der zytotoxische Effekt über den Einbau von FUDP in RNA hauptsächlich durch eine Bolusinjektion < 10 min zu erzielen ist, kommt es zur Thymidylatsynthase-Inhibition vornehmlich unter infusionaler 5-FU-Dauerapplikation

(Aschele et al. 1992). Aus diesem Grund nutzten die multimodalen Therapiedesigns der GRCSG infusionale 5-FU-Dauerapplikationen (siehe Anhang).

## 1.9 Tumorbiologische Bedeutung der Thymidylatsynthase

Ältere Untersuchungen an KRK wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen intratumoralen TS-Expression und schlechtem Respons bzw. erhöhtem Rezidivrisiko nach (Beck et al. 1994, Ichikawa et al. 2003, Johnston et al. 1995, Leichman et al. 1997, Metzger et al. 1998, Salonga et al. 2000). Allerdings umfaßten diese Untersuchungen sowohl Kolon- als auch Rektumkarzinome, die jeweils nach völlig unterschiedlichen Therapieregimen (keine Standardisierung) behandelt wurden.

Unter der Gewährleistung standardisierter Behandlungsprozeduren innerhalb prospektiv randomisierter Therapiestudien wurde in unserer Arbeitsgruppe die TS in Karzinomzellen von 40 cUICC-II/III-Rektumkarzinom-Patienten nach neoadjuvanter RT/CTx (CAO/ARO/AIO-94-Protokoll, siehe Anhang) untersucht (Jakob et al. 2006). Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hoher posttherapeutischer TS-Expression im residuellen Tumor und einem erhöhten Rezidivrisiko in der kleinen Subgruppe von (n=11) Patienten, bei denen kein UICC-Downstaging induziert werden konnte (Liersch et al. 2006c). Die Expressionslevel dieser Subgruppe waren allerdings vergleichbar mit dem TS-Level von Patienten mit einem UICC-Downstaging.

In einer weiteren Analyse wurde zudem ein Zusammenhang zwischen geringer TS-Expression und einer guten Tumorregression bestätigt (Jakob et al. 2008) und gezeigt, dass die TS-Expression bei neoadjuvant behandelten Patienten deutlich geringer ausfiel als in der primär operierten Kontrollgruppe (Liersch et al. 2006c). Der Zusammenhang zwischen niedriger TS-Expression und geringer Tumorregression durch die neoadjuvante Vorbehandlung konnte zuvor auch in weiteren Untersuchungen an Tumor und zugehöriger prätherapeutischer Biopsie (in 14 Fällen) gezeigt werden (Jakob et al. 2004).

## 1.10 Immunhistochemischer Nachweis der Thymidylatsynthase

Jakob et al. (2005) konnten zeigen, dass zum Nachweis der TS-Expression neben dem TS-RNA-Nachweis mittels PCR auch die immunhistochemische Färbung eine geeignete Methode darstellt. Dies setzt allerdings voraus, dass sowohl die Färbeintensität als auch der Anteil an positiv gefärbten Zellen berücksichtigt werden. In der vorliegenden Analyse wurden immunhistochemische Färbungen zum Expressionsnachweis verwendet, da die Methode kostengünstig ist und einfach in der klinischen Routine zum Einsatz kommen kann.

## 1.11 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit hat sich auf Patienten mit einem Rektumkarzinom im cUICC-Stadium-II/III fokussiert und untersucht den potentiellen prädiktiven und prognostischen Stellenwert des intrazellulär exprimierten 5-FU-Targetenzym Thymidylat Synthase (TS). Sämtliche experimentelle Ansätze und Analysen der vorliegenden Dissertation wurden im Teilprojekt 5a der DFG-geförderten klinischen Forschergruppe KFO 179: ‚Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer‘ ([www.kfo179.de](http://www.kfo179.de)) durchgeführt.

Basierend auf den langjährigen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wird erstmals der Stellenwert der TS als *prädiktiver* oder *prognostischer* Biomarker an 208 UICC-II/III-Rektumkarzinomen untersucht und dargestellt. Alle Patienten wurden in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen unter standardisierten Bedingungen innerhalb oder analog zertifizierter multizentrischer Phase-II/-III-Studien (Staging, 5-FU-basierte Radiochemotherapie, qualitätskontrollierte Operation mit TME, adjuvante Therapie und regelhafte Nachsorge) behandelt. Zur Evaluation der TS wurden sowohl die prätherapeutische Tumorbiopsie wie auch das residuelle Tumorgewebe nach erfolgter Rektumresektion und multimodaler Therapie monozentrisch untersucht. Unter Gewährleistung eines Langzeit-Follow-Ups von

durchschnittlich 57 Monaten wurde die Bedeutung der TS nicht nur im Hinblick auf ein lokales Ansprechen (gemessen an der pCR-Rate, am Grad der jeweiligen Tumorregression sowie anderer klinikopathologischer Parameter), sondern auch auf langfristige Tumorfreiheit (Auftreten von lokaler und/oder fernmetastatischer Rezidive) geprüft.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

1. Gibt es einen Einfluss der in der prätherapeutischen Biopsie bestimmten TS-Expression auf das lokale Therapieansprechen gemessen am Grad der Tumorregression und anderer klinikopathologischer Parameter (wie z.B. T-Level-Downsizing, UICC-Downstaging, Nodalstatus)?
2. Hat die prätherapeutisch in der Biopsie bestimmte TS-Expression eine *prognostische* Bedeutung hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (DFS) und des Gesamtüberlebens (OS)?
3. Hat die im residuellen Tumor gemessene TS einen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben (DSF) und das Gesamtüberleben (OS)?
4. Können Schlussfolgerungen für den klinischen Alltag aus der vorliegenden Analyse gezogen werden? Eignet sich die TS als Biomarker zur Therapiestratifizierung von Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom?



## 2 Patientenkollektive, Material und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten Biomaterial (in Paraffin eingebettete Rektumkarzinome) und klinische Daten von 208 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen cUICC-II/III-Rektumkarzinom. Die Diagnosesicherung erfolgte bei den untersuchten Patienten im Zeitraum von März 1998 bis April 2009 mit einer anschließenden Therapie in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. H. Becker).

Von allen in die Analysen einbezogenen Patienten lag vor Einleitung der Therapie eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Durchführung der multimodalen Therapie und der Begleituntersuchungen mit Erhebung von Patienten-bezogenen Follow-Up-Daten vor. Die multimodale Therapie erfolgte in Kooperation mit der Abteilung für Radioonkologie und Strahlentherapie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor: Prof. Dr. Dr. med. C. F. Hess). Die pathologische Diagnostik und Resektataufarbeitung mit Erhebung des histopathologischen Tumorregressionsgrades erfolgte standardisiert in der Abteilung für Gastroenteropathologie (OÄ Dr. med. H. Rothe). In die Untersuchung wurden 64 weibliche (30 %) und 148 (70 %) männliche Patienten mit einem mittleren Lebensalter von 62 Jahren (62,1 +/- 9,5 Jahre) eingeschlossen. Alle Patienten wurden in klinischen, prospektiv randomisierten Phase-II- und -III-Studien therapiert (CAO/AIO/ARO-94, CapOx, CetCapOx, CAO/AIO/ARO-04; siehe Anhang), für die jeweils ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen vorlag.

Von den 208 Patienten erhielten knapp 80% (n=167) eine neoadjuvante RT/CTx mit begleitender 5-FU-Monotherapie (n=103) oder einer durch Oxaliplatin intensivierten zytostatischen Systemtherapie (n=64). Die übrigen 20% der Patienten (n=41) aus dem Kontrollarm der CAO/AIO/ARO-94-Studie (siehe Anhang) erhielten eine adjuvante RT/CTx nach primärer Rektumresektion.

## 2.2 Material

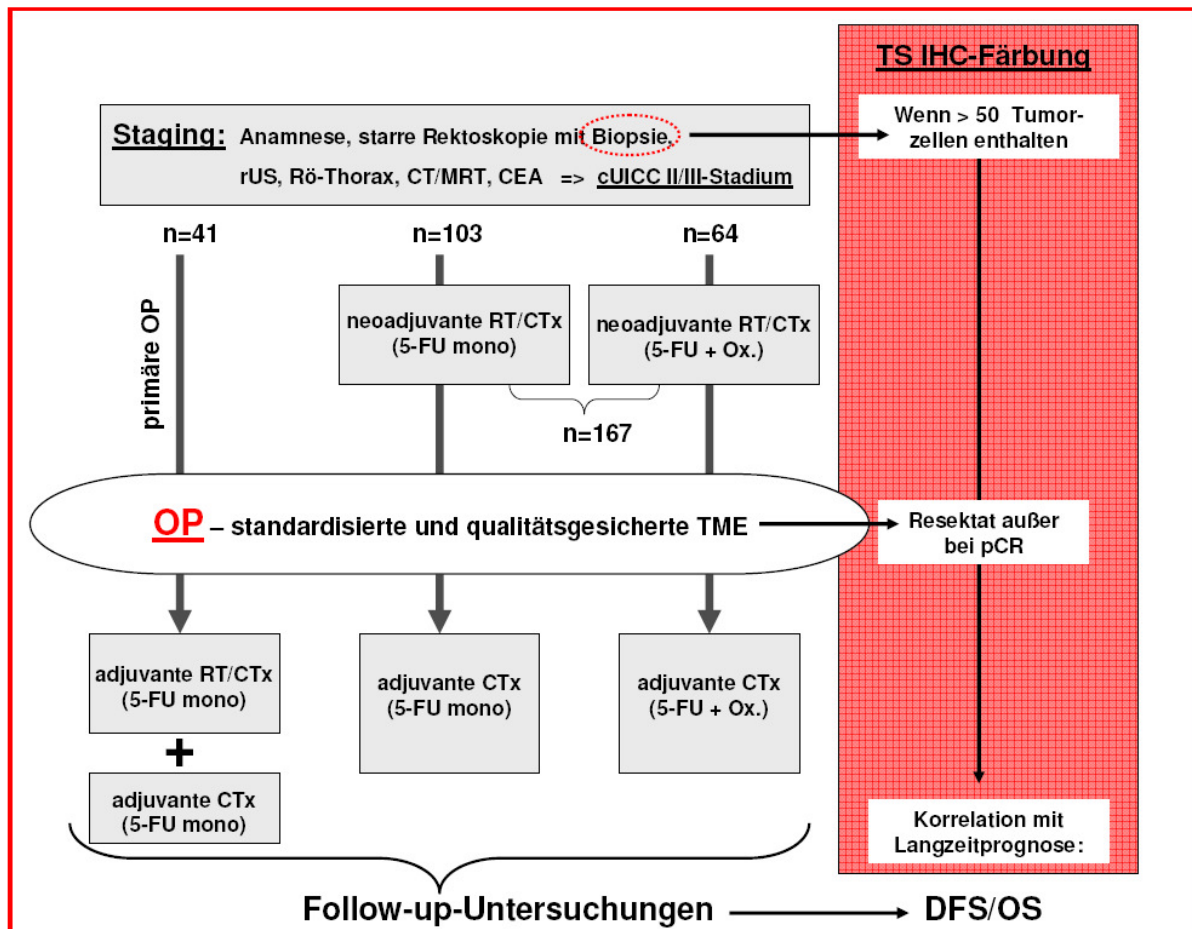
Für die immunhistochemischen Analysen wurde in Paraffin eingebettetes Tumormaterial untersucht. Dabei wurden Gewebelöcke sowohl der prätherapeutischen Tumorbiopsie wie auch des residuellen Tumors aus dem OP-Resektat verwendet (Abbildung 5).

Für die 41 Patienten der Vergleichsgruppe nach primärer Rektumresektion entfielen die Untersuchungen der prätherapeutischen Biopsie zur *Responsprädiktion*, da diese Patientengruppe keine neoadjuvante Vorbehandlung erhalten hatte. Das Tumorgewebe aus dem Resektat wurde auf *prognostische* Bedeutung der TS-Expression bezüglich DFS und OS untersucht.

## 2.3 Prätherapeutische Staginguntersuchungen

Das prätherapeutische Staging (Abbildung 5) umfasste eine vollständige Anamnese, die digital-rektale Untersuchung, die starre Rektoskopie und die rektale Endosonographie (rUS) mit Bestimmung der Tumordinfiltrationstiefe (uT-Status) und des lokoregionären Lymphknotenstatus (uN- oder uN+) (Liersch et al. 2003).

Nach der rUS wurde die rektoskopische Biopsatgewinnung zur histopathologischen Diagnosesicherung durchgeführt (Liersch et al. 2005). Die Biopsatbeurteilung erfolgte nach TNM/UICC-Kriterien, hierbei waren zwingend die Tumorhistologie (z.B. Adenokarzinom) und der Differenzierungsgrad (Grading) anzugeben. Bei Vorliegen eines uT3/4- oder uN+- Rektumkarzinoms wurde das Staging um eine Kontrastmittel-gestützte Computertomographie (CT) des Abdomens/Beckens und/oder eine pelvine Magnetresonanztomographie (MRT) erweitert. Bei keinem der Patienten bestand nach prätherapeutischer Evaluierung und Umfelddiagnostik eine Kontraindikation für eine RT/CTx.



**Abbildung 5: Staginguntersuchungen und Therapiearme**

Abkürzungen: rUS: rektale Endosonographie, CT: Computertomographie, MRT: Magnetresonanztomographie, RT/CTx: Radiochemotherapie, 5-FU: 5-Fluorouracil, Ox.: Oxaliplatin, TME: totale mesorektale Exzision, APE: abdominoperineale Rektumexstirpation, CTx: Chemotherapie, IHC: Immunhistochemie, DFS: Disease Free Survival, OS: Overall Survival.

## 2.4 Therapieablauf

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, wurden 167 Patienten mit einer präoperativen Radiochemotherapie behandelt. Bei 64 Patienten erfolgte eine intensiviertere RT/CTx unter Hinzunahme von Oxaliplatin. Die 41 Patienten aus der CAO/ARO/AIO-94-Studie (Arm A) erhielten nach primärer Operation eine postoperative RT/CTx.

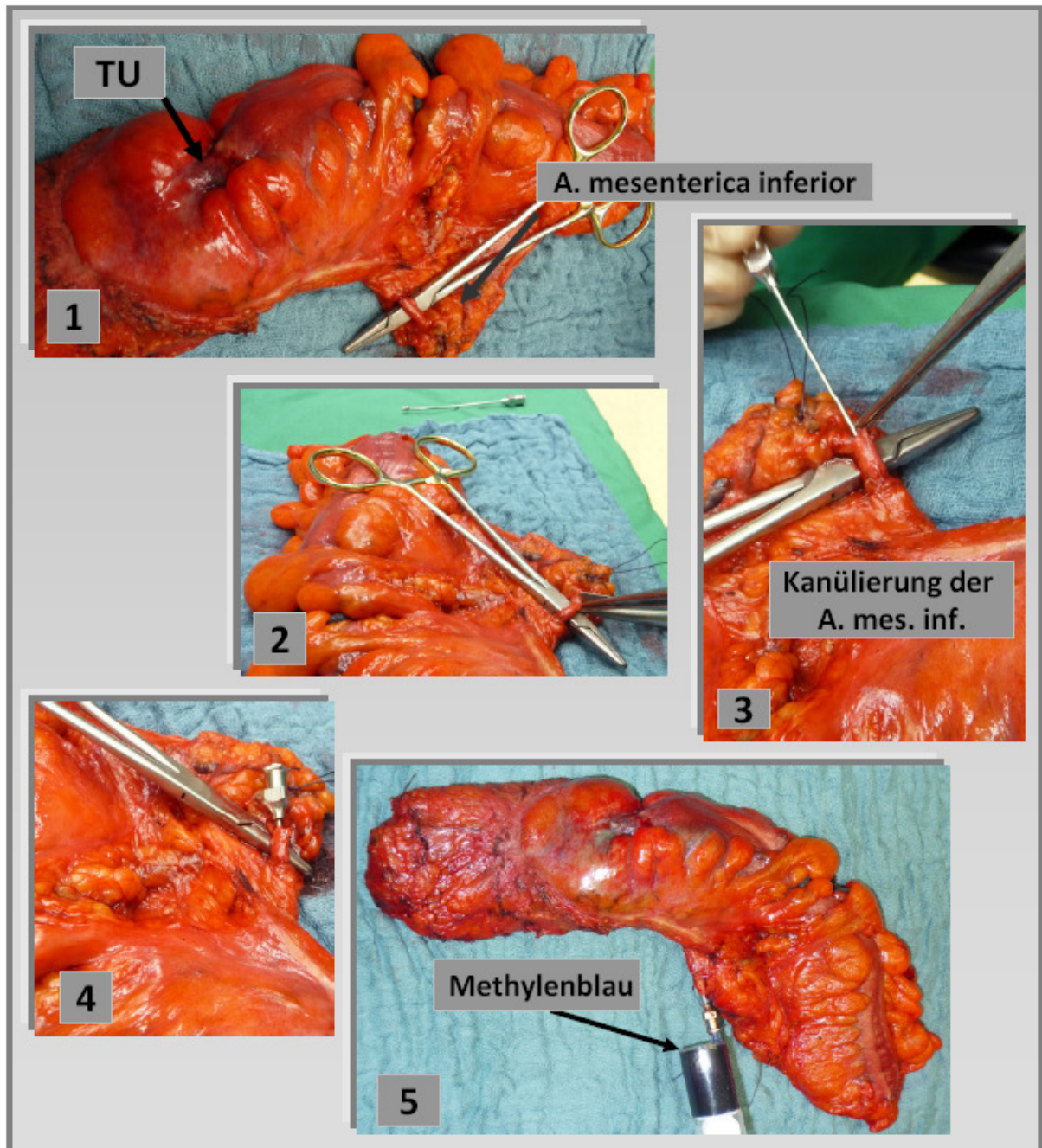
Bei allen Patienten fand eine Rektumresektion nach chirurgisch-onkologischen Prinzipien statt (Liersch et al. 2006a, Liersch et al. 2006b, Liersch et al. 2007a, Liersch et al. 2007b), um die Gefahr einer örtlichen Tumoreroöffnung und Tumorzell dissemination zu

reduzieren. Zudem wurde im Rahmen der angestrebten R0-Resektion des Primärtumors stets das lokoregionäre Lymphabflussgebiet radikal entfernt.

## 2.5 Peri- und postoperative Qualitätskontrolle des Resektates

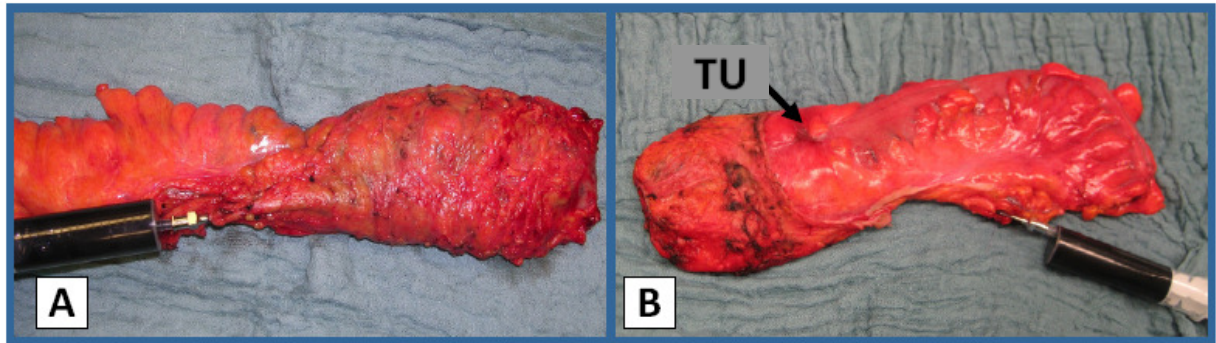
Unmittelbar nach dem intraoperativen Absetzen des Rektums wurde die Qualität der Mesorektumexzision perioperativ nativ nach etablierten Methoden geprüft (Hermanek et al. 2003, Quirke et al. 1986, Syk et al. 2006, Wibe et al. 2002). Nach Kanülierung der Art. mesenterica inferior (Abbildung 7) erfolgte von einem unabhängigen Untersucher (Dauer der Prozedur: 5-10 Min.) die Anfärbung des Resektates mit 20 ml Methylenblau (Abbildung 6) (Sterk et al. 2000). Jede Form des Farbaustrittes durch die mesorektale Hüllfaszie (punktuell, flächig begrenzt, großflächig) wurde fotodokumentiert und klassifiziert (siehe Abbildung 8) (Liersch et al. 2005):

- Grad 1: Kein Farbstoffaustritt während und nach der Injektion: komplette TME
- Grad 2: Punktförmige(r) Farbstoffaustritt(e) während oder nach Injektion: oft makroskopisch nicht eindeutig erkennbare, kleinste Einrisse der Hüllfaszie des Mesorektums
- Grad 3: Flächenhafter Farbstoffaustritt: makroskopisch unvollständige TME.



**Abbildung 6: Perioperative Anfärbeprozedur unmittelbar nach Absetzen des Resektates zur Qualitätsbeurteilung der durchgeführten TME/PME.**

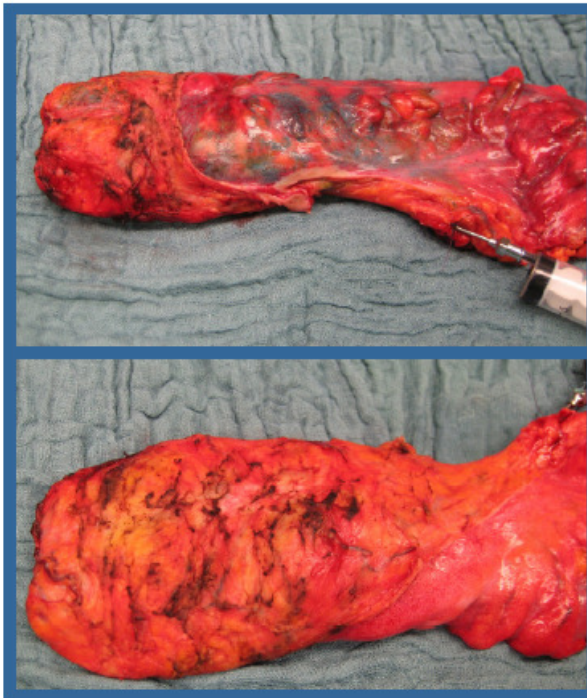
- 1: Die A. mesenterica inferior wird aufgefunden und freipräpariert (am Beispielresektat zeigt sich ventralseitig eine deutliche tumorbedingte Einziehung im Bereich des ventralen Mesorektums oberhalb der peritonealen Umschlagsfalte: TU);
- 2: Inzision der Arterie und
- 3: Kanülierung des Gefäßes mit einer Knopfkanüle;
- 4: Fixierung der Kanüle; 5: Injektion von 1ml Methyleneblau in 19ml NaCl-Lösung über die A. mesenterica inferior zur Überprüfung auf Intaktheit der mesorektalen Oberfläche.



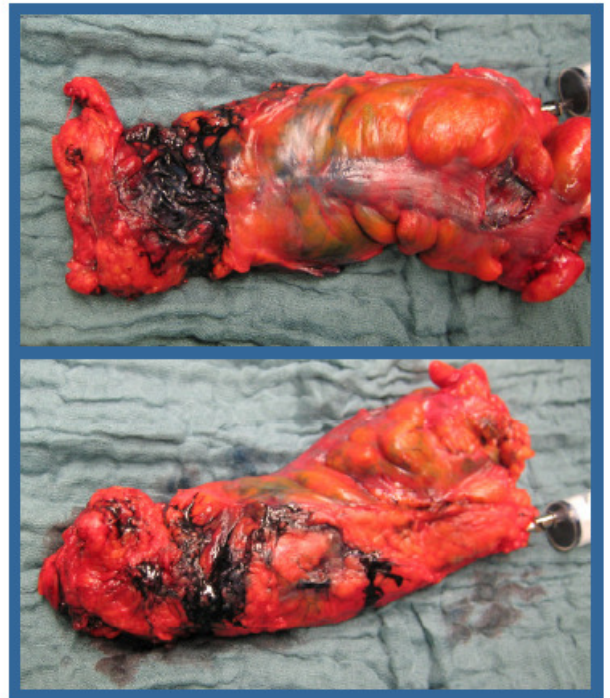
**Abbildung 7: Natives Rektumresektat unmittelbar nach Absetzung und Kanülierung via Art. mesenterica inferior.**

Ansicht von dorsal (A) und ventral (B) mit Einziehung (siehe Pfeil) der mesorektalen Oberfläche im Bereich des Tumorsitzes (TU) oberhalb der peritonealen Oberfläche.

### Qualitätsgrad 1



### Qualitätsgrad 3



**Abbildung 8: TME-Beispiele**

Links: Optimale TME (Qualitätsgrad 1 mit spiegelnd glatter Oberfläche ohne Farbaustritt, oben: Ansicht von ventral während der Injektion; unten: dorsale Ansicht ohne Farbaustritte)  
Rechts: Qualitätsgrad 3 mit flächigem Farbaustritt bei unregelmäßiger mesorektaler Oberfläche einer unvollständigen TME), oben: Flächenhafter Farbaustritt im Bereich des ventralen Mesorektum, unten: Ansicht von dorsal mit multiplen Farbaustritten und Defekten der mesorektalen Oberfläche

## 2.6 Histopathologische Aufarbeitung des Resektates und Beurteilung

Unmittelbar nach der perioperativen Qualitätskontrolle mittels Methylenblaufärbung wurden die Rektumresektate in nativem Zustand dem befundenden Pathologen übergeben. Dieser untersuchte nochmals unabhängig von der perioperativen TME-Beurteilung am nicht eröffneten Operationspräparat die gesamte mesorektale Oberfläche auf Intaktheit der Hüllfaszien. Oberflächliche, tiefe und ausgedehnte Defekte mit sichtbarer Muskulatur wurden unter Angabe der Lokalisation dokumentiert. Dieses Vorgehen resultierte aus Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen nachweisbaren mesorektalen Gewebedefekten und häufigerem Auftreten von Lokalrezidiven und/oder Fernmetastasen gezeigt hatten (Adam et al. 1994, Peeters et al. 2007). Als Rezidivursachen werden derzeit okkult in situ verbliebene Lymphknotenmetastasen, Perineuralinvasionen, tumoröse Gefäßeinbrüche oder intramesorektale Tumorsatelliten diskutiert (Nagtegaal und van Krieken 2007, Peeters et al. 2007).

Die **Resektataufarbeitung** umfasste folgende Prozeduren (Liersch et al. 2006b, Liersch et al. 2007b):

- 1) Makroskopisches Ausmessen des Abstandes zwischen Tumorrand (oral, aboral, zirkumferentiell) und Resektionslinie am frischen Resektat ohne Zug und Ausspannen;
- 2) Vermessen der Präparatelänge: Angabe des größten longitudinalen und transversalen Durchmessers des Tumors; Beschreibung der Wuchsform (polypoid-gestielt, -tailliert, -sessil; plattenartig, ulzerös, szirrhös);
- 3) Dokumentation der Lage des Tumors zur peritonealen Umschlagfalte; Dokumentation assoziierter Läsionen (z.B. Polypen);
- 4) Eröffnung des Präparates oberhalb und unterhalb des Tumors ohne Durchschneiden des tumortragenden Darmsegments;
- 5) Einbringen einer von endoluminal stabilisierenden Tamponade in die Tumorregion

mitsamt den angrenzenden distalen und proximalen Darmabschnitten;

- 6) Zugfreies Aufspannen des Resektates und Formalinfixierung über 48-72h;
- 7) Anfärbung der Mesorektumoberfläche nach Fixation und Beurteilung des Resektates; lamellierende Querschnitte durch das tumortragende Darmsegment und das umgebende Mesorektum mit standardisierter Einbettung relevanter Präparatescheiben zur Beurteilung der perirektalen Karzinominfiltration und der minimalen Entfernung des Tumors zur TME-Oberfläche (sogenannter zirkumferenzieller Resektionsrand: CRM)

Die **Resektatbeurteilung** wurde nach den zum Zeitpunkt der Untersuchungen geltenden TNM/UICC-Richtlinien (Sobin und Fleming 1997, Wittekind et al. 2002, Wittekind und Meyer 2010) durchgeführt:

- 1) Lokalisationsangabe des Tumors im Rektum in Bezug zur peritonealen Umschlagsfalte;
- 2) Tumortyp nach WHO-Klassifikation, Tumordinvasionstiefe (pT-Klassifikation);
- 3) Regionärer Lymphknoten-Status (pN-Klassifikation: pN0-2), Gesamtzahl untersuchter Lymphknoten in Relation zur Anzahl karzinomatös befallener Lymphknoten (Goldstein et al. 1996);
- 4) Grading (0-4);
- 5) Angabe der tumorfreien Resektionsränder mit R-Klassifikation (R0-2); dabei erfolgte stets die makro- und mikroskopische Distanzangabe zwischen dem Tumor- und dem Resektionsrand (oral, aboral, lateral, zirkumferentiell) (Hermanek et al. 2003, M.E.R.C.U.R.Y. 2002); ein tumorfreier, zirkumferentieller Resektionssaum von <1 mm wurde formal als R0-Situation gewertet, jedoch aufgrund der zu erwartenden schlechteren Prognose als CRM-positiv dokumentiert (Compton 2002, Maslekar et al. 2007); direkte Tumorperforationen oder vom Tumor entfernte Darmperforationen wurden gesondert dokumentiert (Birbeck et al. 2002, Quirke und Dixon 1988); Nachweis einer Lymph-/Blutgefäßinvasion peritumoral oder im Mesorektum.



Die Beurteilung der TME-Qualität nach MERCURY-Kriterien erfolgte zusammenfassend in:

komplette TME: Mesorektum intakt, mit nur geringen Unregelmäßigkeiten der glatten, lipomähnlichen Mesorektumoberfläche, kein Defekt größer als 5 mm, bei querer Lamellierung des Resektates glatter CRM;

moderate TME: Mesorektum mit unregelmäßiger Oberfläche, aber an keiner Stelle Muscularis propria sichtbar (außer am Ansatz der Levatormuskulatur), bei querer Lamellierung mäßiggradige Unregelmäßigkeiten des CRM;

inkomplette TME: geringe Mengen an Mesorektum, an der Oberfläche Defekte bis zur Muscularis propria, bei querer Lamellierung sehr unregelmäßiger CRM.

Zusammenfassend wurde durch die systematische Aufarbeitung mit standardisierten Bewertungskriterien die Qualität der histopathologischen Gesamtbefunde deutlich verbessert.

## 2.7 Tumoransprechen auf die präoperative RT/CTx

Zur Beurteilung eines erfolgreichen Tumoransprechens auf die neoadjuvante RT/CTx wurde eine Downkategorisierung des T-Status (T-Level-Downsizing) ebenso erfasst wie das UICC-Downstaging. Des Weiteren wurde der Grad der RT/CTx induzierten histomorphologisch determinierten Tumorregression (Abbildung 9) am residuellen Tumorgewebe klassifiziert und dokumentiert.

Bei der Beurteilung des **T-Level-Downsizings** wurde der im Staging ermittelte cT-Status (resultierend aus rES und CT/MRT) mit dem histopathologisch ermittelten pT-Status verglichen. Ein Downsizing nach neoadjuvanter RT/CTx lag bei einer Tumorregression um  $\geq 1$  T-Level vor (wenn beispielsweise ein im Staging als cT3-Karzinom eingestufte Rektumtumor nach RT/CTx als ypT1-Karzinom<sup>4</sup> klassifiziert wurde).

---

<sup>4</sup> Das Präfix ‚y‘ bezeichnet in der TNM-Klassifikation Tumorgewebe, das vor der Tumoresektion mit einer neoadjuvanten Radio- und/oder Chemotherapie behandelt wurde und damit unter Umständen regressive Veränderungen aufweisen kann (Brierley et al. 2006).

Ein **UICC-Downstaging** lag vor, wenn beim Vergleich des cUICC-Stadiums mit dem postoperativen ypUICC-Stadium eine Tumorregression um  $\geq 1$  UICC-Stadium festgestellt wurde (wenn beispielsweise ein im Staging als **cUICC-II-Stadium** (cT3/4N0M0-Status) eingeschätzter Tumor durch die RT/CTx-induzierte Regression zu einem **ypUICC-0-Stadium** (ypT0N0M0-Status) wurde).

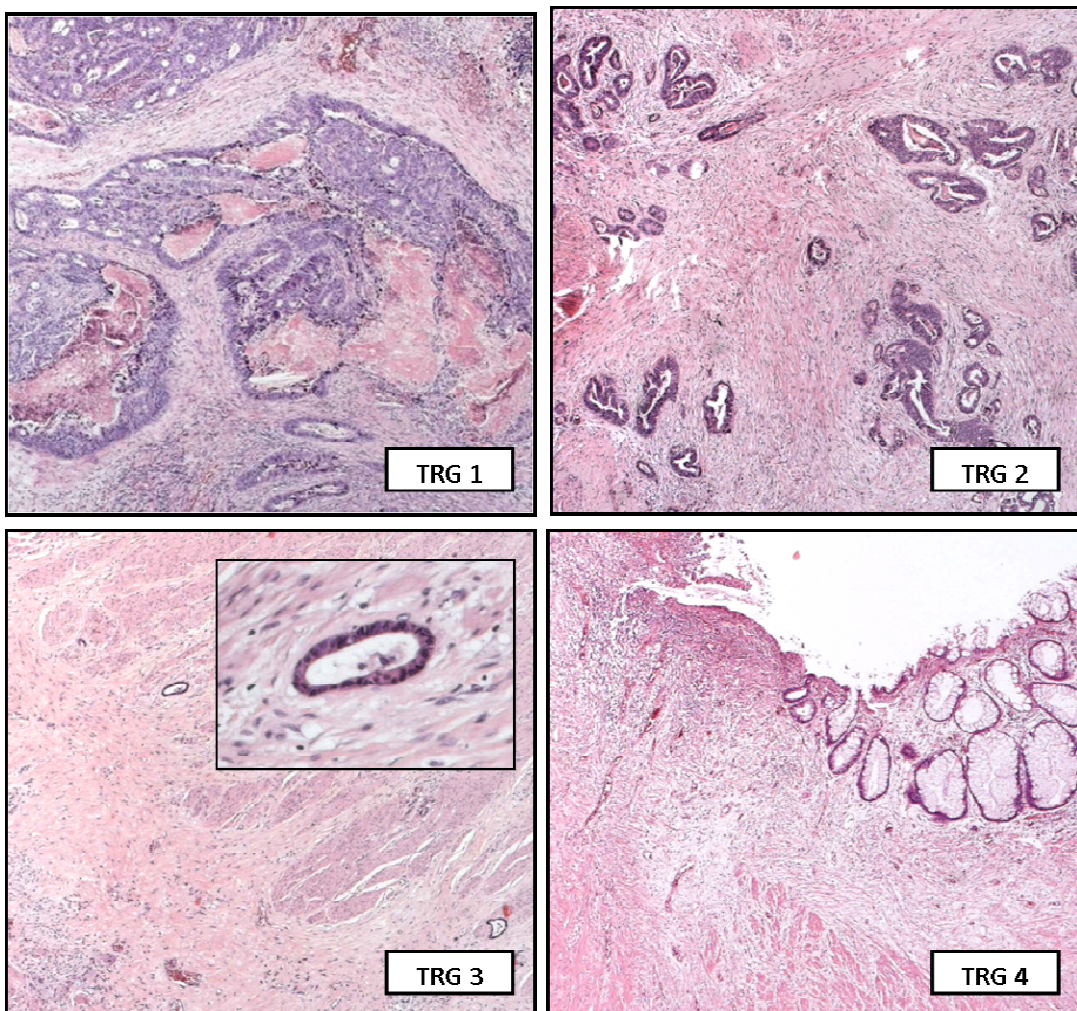
Zur Beurteilung des Nodalstatus wurden nach den Vorgaben der TNM/UICC-Klassifikation grundsätzlich mehr als 12 lokoregionäre Lymphknoten aus dem Mesorektum und Perirektalgewebe identifiziert und histopathomorphologisch untersucht. Über diese Forderung hinausgehende LK-Zahlen wurden sowohl in den Resektaten primär operierter cUICC-II/III-Rektumkarzinome als auch in Resektaten nach neoadjuvanter RT/CTx untersucht. Analysen der eigenen Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass eine neoadjuvante RT/CTx die Anzahl der im mesorektalen Fettgewebe durch den Pathologen detektierbaren Lymphknoten nicht reduziert (Sprenger et al. 2009b). Durch eine möglichst große Anzahl untersuchter Lymphknoten soll eine valide Beurteilung des Nodalstatus erreicht werden (Leibl et al. 2003, Ratto et al. 1999, Wittekind et al. 2002, Wong et al. 1999).

Über die numerische und histopathologische Analyse hinausgehend wurde bei den neoadjuvant behandelten Patienten (n=168) der postoperativ ermittelte Nodalstatus (ypN-Status) mit dem prätherapeutischen klinischen Status (cN-Status) verglichen. Von besonderem Interesse waren dabei der durch die RT/CTx induzierte additive Anteil an nodal-negativen Fällen sowie der Nachweis von verbliebenen, RT/CTx-refraktären (residuellen) Lymphknotenmetastasen.

Eine histopathomorphologisch nachweisbare, RT/CTx-induzierte Tumorregression (TRG) wurde nach einem 5-stufigen, semiquantitativen Tumorregressionsgrading-System (Grad 0 – 4 (Tabelle 2) beurteilt (Dworak et al. 1997, Gavioli et al. 2000, Jakob et al. 2005, Wittekind und Tannapfel 2003).

<b>TRG 0</b>	<b>Keine Regression</b>
<b>TRG 1</b>	<b>verbliebenes Tumolvolumen dominierend, Zeichen der radiogenen Fibrose und/oder Vaskulopathie bei &lt; 25 % der Tumormasse;</b>
<b>TRG 2</b>	<b>Moderate Regression bei 25-50 % der Tumormasse; vorwiegend radiogene fibrotische Veränderungen (&gt; 50 %) mit vereinzelt Tumorzellen oder Tumorzellverbänden (&gt; 3 mm), die leicht nachzuweisen sind;</b>
<b>TRG 3</b>	<b>gute Regression bei &gt; 50 % der Tumormasse; die sehr wenigen, vereinzelt Tumorzellen sind mikroskopisch schwer nachzuweisen bei nahezu vollständig radiogen fibrotischem Gewebe (&gt; 80 %) mit oder ohne Schleimbildung/-seen;</b>
<b>TRG 4</b>	<b>Komplette Tumorregression ohne Nachweis von residuellen Tumorzellen, lediglich Nachweis einer kompletten Fibrose;</b>

**Tabelle 2:** Tumorregressionsgrading-(TRG)-System nach RT/CTx modifiziert nach Dworak et al. (1997) und Gavioli et al. (2000)



**Abbildung 9: Tumor-Regressions-Grading**

(TRG 0 – TRG 4) nach präoperativer RT/CTx. TRG 1: < 25 % Tumorregression (links oben); TRG 2: 25 %-50 % Tumorregression (rechts oben); TRG 3: > 50 % Tumorregression (links unten); TRG 4: komplette (100 %) Tumorregression (rechts unten) (Jakob et al. 2004, S. 565).

## 2.8 Follow-Up-Untersuchungen

Während der Behandlung wurden sämtliche Patienten nach den Vorgaben der Studienprotokolle wöchentlich kontrolliert. Die tatsächlich applizierte Dosis der adjuvanten Therapie wurde dabei ebenso erfasst und dokumentiert, wie Gründe für eine ggf. erforderliche Dosisreduktion oder einen vorzeitigen Abbruch der Therapie. Die weiteren Nachsorgeuntersuchungen nach Abschluss der multimodalen Therapie (Anamnese, klinische Untersuchung, Tumormarkerkontrolle, Rektoskopie, Abdomensonographie, CT-Abdomen und -Becken, Röntgen-Thorax, etc.) erfolgten nach dem Studienprotokoll, den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft und den geltenden S3-Leitlinien (Junginger et al. 2002, Liersch et al. 2007a, Liersch et al. 2005, Schmiegel et al. 2005).

Als krankheitsfreies Überleben (DFS) wurde das Intervall zwischen der Resektion des Rektumkarzinoms und einem erneuten histologisch nachgewiesenen Karzinomrezidiv, sei es lokal und/oder fernmetastatisch, definiert. Das tumorspezifische Gesamtüberleben (OS) ergab sich aus dem Intervall zwischen Operation und dem tumorbedingten Tod des Patienten. Die Nachsorgeuntersuchungen wurden zunächst für die ersten zwei Jahre alle drei Monate durchgeführt, anschließend in halbjährlichen Intervallen über drei Jahre und danach als jährliche Kontrolluntersuchungen.

## 2.9 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip immunhistochemischer Gewebefärbungen basiert auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Epitopen als **Antigen-Antikörper-Reaktion**. Der Antikörper wird dabei mit einem bestimmten Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein auf dem Gewebeschnitt sichtbar macht (Abbildung 10).

Die durchgeführte TS Färbung beruht auf einer indirekten Zwei-Schritt-Methode, bei der das untersuchte Gewebe zunächst mit einem unkonjugierten spezifischen Primärantikörper inkubiert wird. Dieser bindet spezifisch an die TS. Der verwendete

Antikörper ist ein polyklonaler, aus dem Kaninchen gewonnener Antikörper der Firma Rocklands (Pennsylvania, USA).

Im nächsten Schritt folgt die Inkubation mit einem konjugierten Sekundärantikörper, der Enzym-markiert und gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dadurch, dass mehrere polyklonale Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, kommt es zur Amplifikation des Färbesignals und einer Zunahme der AK-Sensitivität (Lang 2006). Bei der durchgeführten Färbung ist der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert (Abbildung 10). Die Markierung der Antikörper-markierten Gewebeabschnitte durch Färbung der gekoppelten AP erfolgt durch Zugabe eines Naphtol-AS-MX-Phosphats. Durch hydrolytische Spaltung von Naphtolen durch die alkalische Phosphatase entstehen Phenolverbindungen und Phosphate. Phenole als primäre Reaktionsprodukte reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogenen). In den vorliegenden Untersuchungen wurde Fast Red als Chromogen verwendet und bildet einen unlöslichen Azofarbstoff. Naphtol-AS-MX-Phosphat bildet als Fast Red TR ein leuchtend rotes Endprodukt.

### **2.9.1 Schnitthanfertigung**

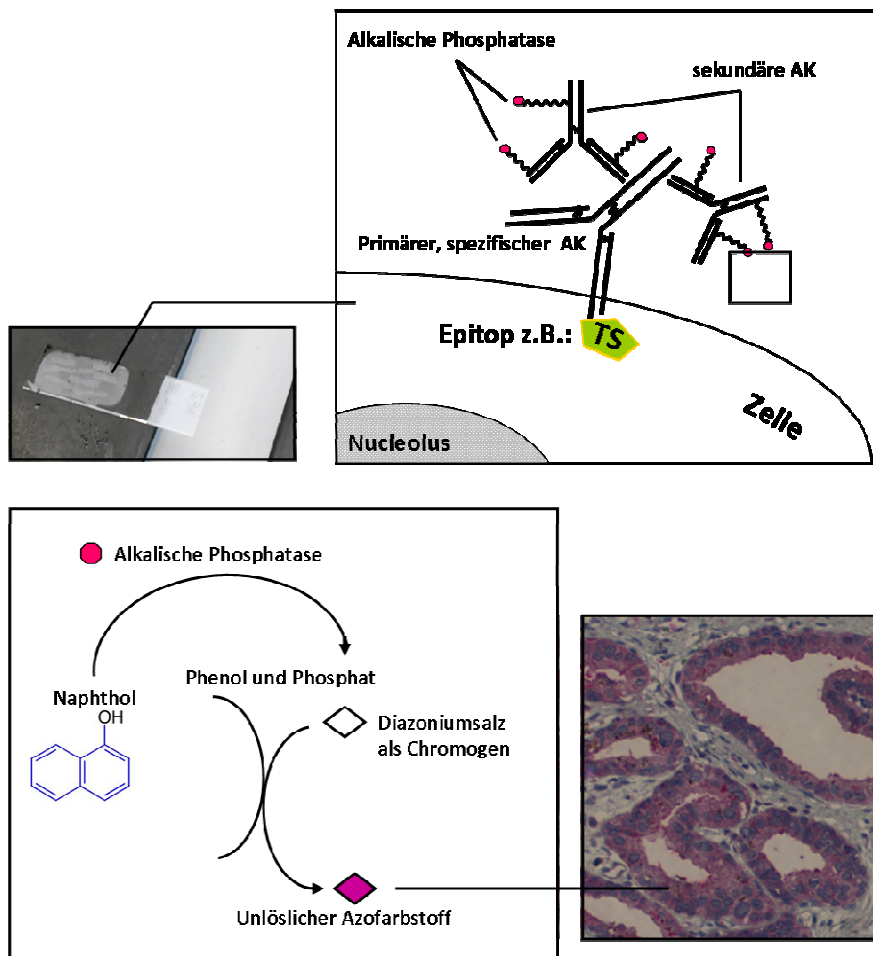
Zunächst wurden aus den über 24 Std. formalinfixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden an einem Schlittenmikrotom (Microm HM 430, MICROM International, Walldorf, Deutschland) in einer Stärke von etwa 2  $\mu\text{m}$  geschnitten und anschließend in einem Wasserbad auf adhäsive Objektträger (Starfrost, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Bielefeld, Deutschland) aufgebracht und bei 37°C für mind. 12 Std. (über Nacht) im Trockenschrank getrocknet.

### **2.9.2 Automatisierte Färbungen**

Die Färbungen wurden unter standardisierten Bedingungen mit dem Färbeautomat Ventana IHC – Färbeautomat BENCHMARK XT System (Ventana, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt.

Die Vorbehandlung zur Antigenfreilegung erfolgte nach vorgegebenem, nicht variablem Gerätestandard unter Verwendung von Cell Conditoner (Ventana, Mannheim, Deutschland) und Erhitzung auf 100°C für 60 min. Der verwendete TS-Antikörper (Anti-Human Thymidylatsynthase [Rabbit] Code: 100-401-199 Rockland, Pennsylvania, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und für 28 min inkubiert (Haqqani et al. 1999). Der Sekundärantikörper wurde unter Verwendung des ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana, Mannheim, Deutschland) aufgetragen. Dieses Detektionssystem ist Multimer-basiert und damit sehr sensitiv zur Detektion von primären Maus- oder Kaninchenantikörpern.

Nach Abschluss des Färbeprogramms wurden die Präparat-tragenden Objektträger gespült und in aufsteigender Alkoholreihe mit Xylol unter dem Abzug entwässert. Mit Hilfe von Cytoseal 60 (MICROM International, Walldorf, Deutschland) wurden die Schnitte eingedeckt und konnten mikroskopisch ausgewertet werden.



**Abbildung 10: Prinzip der immunhistochemischen Färbung**

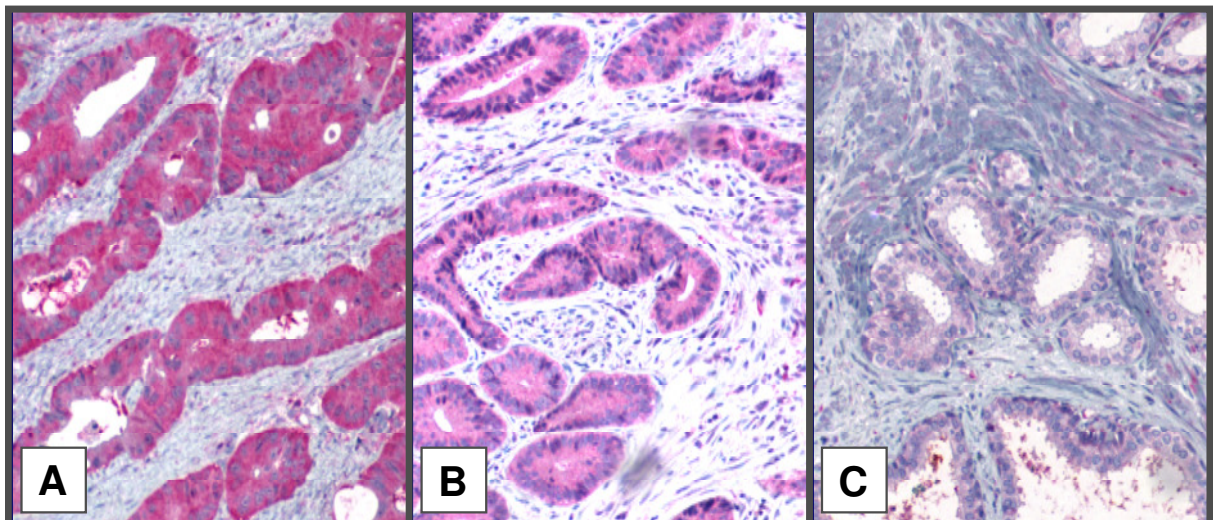
Nach Aufbringen des primären, spezifischen Antikörpers, der gegen die TS gerichtet ist, erfolgt die Inkubation mit dem Farbstoff tragenden Sekundärantikörper. Nach Zugabe von Naphthol erfolgt dann die Farbmarkierung in Bereichen des Antigens. Die TS Färbung ergibt eine intrazytoplasmatische Färbung in TS-positiven Zellen.

### 2.9.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden ohne Kenntnis klinischer Daten verblindet semi-quantitativ ausgewertet. Hierbei wurde der Anteil an positiv gefärbten Tumorzellen berücksichtigt und prozentual dokumentiert sowie die Färbeintensität in drei Graden unterschiedlich starker Anfärbung berücksichtigt (Abbildung 11). Zunächst wurden die Schnitte bei 5-facher Vergrößerung zur Erfassung von Tumorzellverteilung und -

anfärbung durchgemustert. Anschließend wurden bei höheren Vergrößerungen bis 40-fach die Intensitäten negativ (0), schwach, (1), moderat (2), intensiv (3) der Tumorzellverbände beurteilt. Zur Auswertung wurde ein modifizierter Remmele-Score (Remmele und Stegner 1987) verwendet.

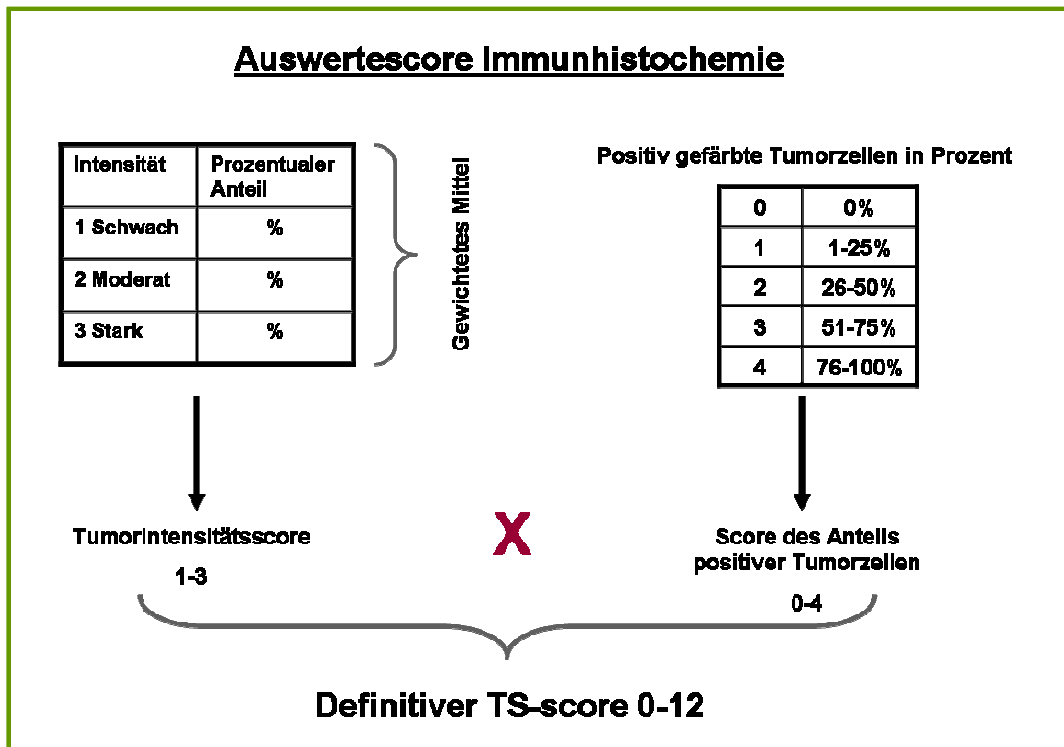
Der Anteil gefärbter Tumorzellen wurde für jede der vier Intensitätskategorien dokumentiert (als  $\rho_0$ ,  $\rho_1$ ,  $\rho_2$ ,  $\rho_3$ ). Der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen wurde bestimmt als der Gesamtanteil positiv gefärbter Tumorzellen ( $\rho_1 + \rho_2 + \rho_3$ ). Der prozentuale Anteil angefärbter Tumorzellen wurde wiederum in fünf Gruppen unterteilt: 0 = 0 %, 1 = (0-25 %), 2 = (25-50 %), 3 = (50-75 %), 4 = (75-100 %) als *Score des Anteils positiver Tumorzellen*. Das gewichtete Mittel der Färbescores  $(1(\rho_1/\tau) + 2(\rho_2/\tau) + 3(\rho_3/\tau))/3$  wurde ermittelt und als definitiver TS-Score für die statistischen Auswertungen verwendet (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Beispiele von residuellen Tumoren nach TS-Färbung.**

A: intensive Anfärbung der Tumorzellen; B: moderat angefärbte Tumorzellen; C: nicht angefärbtes Tumorgewebe





**Abbildung 12: Auswertescore der immunhistochemischen Analyse**

Die Tumor-tragenden, in Paraffin eingebetteten Gewebsblöcke der prätherapeutischen Biopsien der untersuchten Patienten wurden immunhistochemisch gefärbt. Das residuelle Tumorgewebe aller 208 Patienten mit Ausnahme der Komplettresponder (n=16, 7,6 %), bei denen keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren, wurde mit Anti-TS-AK angefärbt. Zur Bildung eines Paares aus prätherapeutischer Biopsie und residuellem Tumor lag für die vorliegende Analyse Biopsiematerial von 174 Patienten vor. Bei den übrigen Biopsien (n=34) konnte eine immunhistochemische Untersuchung aufgrund zu geringer Anteile invasiven Karzinoms (< 50 Tumorzellen) nicht durchgeführt werden. Bei einigen Patienten war die zur Diagnosesicherung durchgeführte Biopsie nicht in der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt worden und die histopathologische Befundung in einem auswärtigen Institut erfolgt, so dass diese Blöcke nicht zur Verfügung standen (Abbildung 5).

## 2.10 Statistische Analysen

Für die Korrelationsanalysen des TS-scores mit klinischen Parametern wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet und auf Signifikanz überprüft. Der Einfluss der TS-Expressionslevel auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) und das erkrankungsspezifische Gesamtüberleben (OS) wurde mit Hilfe eines Cox-Regressions-Modells getestet. Für alle Analysen wurde ein *cut-off* des Expressionslevels entsprechend dem Median in hoch-exprimierende und niedrig-exprimierende Karzinome gewählt, so dass der Wert für die Auswertung der Biopsien bei einem Scorewert von 4 lag. Für die Auswertung des Expressionsmusters aus dem residuellen Tumorgewebe wurde der cut-off-Wert entsprechend dem Median bei 7 gewählt. Die Überlebensdaten in Abhängigkeit der TS-Expression wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für die Analyse des DSF wurden alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Auswertungen ohne Anhalt für ein Lokalrezidiv oder fernmetastatische Rezidive lebten, berücksichtigt. Die Signifikanz für die Assoziation des TS-Scores zum Überleben wurde anhand des kontinuierlichen TS-Wertes (0-12) mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse berechnet. Für die vergleichenden Analysen der klinikopathologischen Charakteristika der einzelnen Subgruppen wurde ein Chi-Quadrat-Test verwendet. Für alle Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

Sämtliche Analysen wurden mit der statistischen Software R, Version 2.11.0 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) durchgeführt, die Überlebensdaten mit dem R-package survival berechnet (R DCT 2010).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Prätherapeutisches klinisches Staging

Die prätherapeutische klinische UICC-Stadieneinteilung (cUICC-Staging) erfolgte aus den Untersuchungsergebnissen der rektalen Endosonographie (uT/uN-Status) unter Berücksichtigung weiterer bildgebender Verfahren (z.B. CT/MRT): War z.B. bei einem lokal weit fortgeschrittenen Rektumkarzinom eine endosonographische Einschätzung aufgrund einer nicht passierbaren, tumorbedingten Stenose unmöglich, so wurden zur Beurteilung der Tiefeninfiltration (cT-Status) und des Nodalstatus (cN-Status) die Befunde der CT und/oder MRT zur Festlegung des klinischen Tumorstadiums (cUICC-Stadium) herangezogen. Das klinische Staging ergab in 184 Fällen (88,5%) ein uT3 Rektumkarzinom und in 13 Fällen (6,3%) einen initial organüberschreitenden uT4-Primärtumor. Bei 149 Patienten (71,6%) bestand der Verdacht auf eine bereits lokoregionär vorliegende lymphogene Metastasierung (positiver Nodalstatus). Lediglich bei 59 Patienten (28,4%) zeigten die Staginguntersuchungen einen negativen Nodalstatus. Wie in Tabelle 3 dargestellt, betrug das Verhältnis der prognostisch als eher günstig einzuschätzenden cUICC-II-Stadien gegenüber den ungünstigeren cUICC-III-Stadien etwa 1:3.

Die per starrer Rektoskopie ermittelte Höhenlokalisierung der Karzinome ergab, dass 115 (55,2%) Malignome im mittleren Rektumdrittel und 82 Tumore (39,4%) im unteren Rektumdrittel lokalisiert waren. Lediglich in 14 Fällen (6,7%) war das Rektumkarzinom im oberen Rektumdrittel (zwischen 12-16 cm ab Anokutanlinie) lokalisiert.

Klinische, prätherapeutische Charakteristika der Patientenkohorten (insgesamt n=208 Pat.)							
Neoadjuvante Therapie:	Keine (primäre OP)		Standard 5-FU-Monotherapie		Intensivierte RT/CTx 5-FU/Oxaliplatin		p-Wert*
Patientenzahl / Parameter	n=41	%	n=103	%	n=64	%	
<b>Alter (Jahre)</b>							
Mittelwert	63.3		62.9		61.8		0.85
Min. - Max.	39-75		35-81		36-81		
<b>Geschlecht</b>							
männlich	28	68	75	73	42	66	0.6
weiblich	13	32	28	27	22	34	
<b>TU-Lokalisation</b>							
0-6 cm ab ano	12	29	39	38	31	48	0.02
>6-12 cm	25	54	59	57	31	48	
>12-16 cm	7	17	5	5	2	3	
<b>cT-Stadium</b>							
2	6	15	3	3	2	3	0.06
3	33	80	92	89	59	92	
4	2	5	8	8	3	5	
<b>cN-Stadium</b>							
positiv	25	61	73	71	51	80	0.11
negativ	16	39	30	29	13	20	
<b>cUICC-Stadium</b>							
II	14	34	31	30	13	20	0.23
III	27	66	72	70	51	80	
<b>Rektumresektion**:</b>							
tiefe anteriore	31	76	64	62	48	75	0.35
abdominoperineale	9	22	37	36	15	23	
nach Hartmann	1	2	2	2	1	2	

**Tabelle 3: Klinische Charakteristika und Stagingergebnisse der Patienten**

\* p-Wert-Berechnung mit Chi-Quadrat Test; für die Altersdifferenz wurde der Kruskal- Wallis rank Test genutzt

\*\* sämtliche Rektumresektionen erfolgten mit qualitätskontrollierter TME

### 3.2 Operationsmethode

Alle 208 untersuchten Patienten wurden je nach Behandlungsregime (Abbildung 5) primär oder nach abgeschlossener neoadjuvanter RT/CTx in kurativer Intention einer Rektumresektion zugeführt. Diese konnte bei 69,8 % der Patienten (n=148) als sphinktererhaltende TARR mit TME durchgeführt werden. Bei 28,8 % der Patienten (n=61) erfolgte zur Wahrung eines chirurgischen Sicherheitsabstandes von 2 cm zum aboralen Tumorrund bei tief sitzendem Rektumkarzinom bzw. bei Verdacht auf eine Sphinkterinfiltration eine abdominoperineale Rektumexstirpation (APE) mit TME (Tabelle 3). Bei insgesamt vier Patienten (1,9%) wurde eine Diskontinuitätsoperation nach Hartmann unter Gewährleistung einer TME bei klinisch bekannter Sphinkterinsuffizienz durchgeführt.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich konnten insgesamt 21 (25,6%) von 82 Patienten mit Karzinom im unteren Rektumdrittel kontinenzerhaltend mit einer Rektumresektion (unter Sphinktererhalt) operiert werden. Während in der Gruppe der primär operierten Patienten sowie in der mit 5-FU-Monotherapie vorbehandelten Gruppe in über 80% der Fälle unter Mitnahme des Sphinkterapparates reseziert werden musste (9 von 12, 75% beziehungsweise 37 von 39, 94,9%; Tabelle 3), lag die APE-Rate in der intensiviert (mit Oxaliplatin) vorbehandelten Gruppe unter 50%. In dieser Kohorte waren 31 Patienten mit einem Tumorsitz im unteren Rektumdrittel. Bei diesen Patienten war nach RT/CTx nur in 15 Fällen (48,4%) eine abdominoperineale Rektumexstirpation unter Mitnahme des Sphinkterapparates erforderlich.

### 3.3 Tumorstadien nach histopathologischem Befund

Nach lokoregionär kurativer R0-Resektion mit histopathologisch gesicherten tumorfreien oralen, aboralen sowie zirkumferentiellen Resektionsrändern ergaben sich nach qualitätskontrollierter Aufarbeitung der Rektumresektate folgende Befunde (Tabelle 4).

Primär operierte Patienten: In zwei Fällen (5%) lag ein Organ-überschreitendes (pT4) Karzinom vor. Bei 71% der Patienten (n=29) war eine Karzinominfiltration durch die Muscularis propria nachweisbar (pT3) und bei 9 Karzinomen wurde die Muscularis propria erreicht (pT2, 22%). Ein Patient (2%) hatte ein pT1 Rektumkarzinom mit Nachweis einer lymphogenen Metastasierung (pUICC-III). Etwa die Hälfte der primär operierten Patienten hatte einen histopathologisch gesicherten positiven Nodalstatus (n=20, 48%). Die histopathologische Diagnose ergab bei 5 Patienten (12%) aus dieser Kohorte mit initialen cUICC-II/III-Karzinomen ein UICC-Stadium-I. Die präoperative Diagnostik hatte somit in 12% der Fälle also zu einem *overstaging* der Patienten geführt.

Patienten nach neoadjuvanter RT/CTx: Der Anteil an ypT4-Karzinomen (n=6 bzw. n=4, jeweils 6%) war vergleichbar mit der Häufigkeit in der primär operierten Gruppe.

Ein ypT3-Karzinom lag bei 55 (53%) Patienten nach 5-FU-Monotherapie und bei 28 (44%) Patienten nach intensivierter RT/CTx vor. Die Verteilung von ypT2 Karzinomen lag bei 24% (n=25) nach 5-FU-Monotherapie und bei 22% (n=14) nach intensiver Vorbehandlung. Ein residueller Tumornachweis, beschränkt auf die Submukosa (ypT1), war bei 8 (8%) Patienten der Gruppe nach 5-FU-Monotherapie und bei 9 (14%) Patienten nach 5-FU- und Oxaliplatin-Therapie nachweisbar.

Eine komplette Tumorremission (pCR) ohne Nachweis vitaler Tumorzellen lag schließlich bei jeweils 9 Patienten (9% bzw. 14%) beider Gruppen vor. Aus diesen Ergebnissen deutet sich ein Trend zu einem stärkeren T-Level-Downsizing unter intensiver RT/CTx an. Zudem lag nach der Vorbehandlung ein negativer Nodalstatus mit 72% (n=46) häufiger nach kombinierter zytostatischer Therapie mit Oxaliplatin als nach Monotherapie mit 5-FU (n=67, 65%) vor.

Die Effekte des T-Level-Downsizings und des UICC-Downstagings durch die neoadjuvante RT/CTx erklären den signifikanten Unterschied im Vergleich der drei Patientengruppen bezogen auf die (y)pUICC-Stadien ( $p=0.01$ ).

Insgesamt wurden 5.417 LK im Rahmen der histopathologischen Resektataufarbeitung detektiert (im Mittel 26 LK pro Patient) und auf eine Karzinominfiltration untersucht. Beim Vergleich der drei Patientengruppen (Tabelle 4), zeigte sich, dass die neoadjuvante RT/CTx nicht zu einer Reduktion der detektierbaren mesorektalen Lymphknoten führt. So lag die Zahl der durchschnittlich untersuchten Lymphknoten in der Gruppe der primär operierten Patienten bei 23,8 LK, und nach Vorbehandlung mit 5-FU-Monotherapie bei 26,7 LK bzw. 26,3 LK nach intensivierter Therapie (mit Oxaliplatin).

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, wurden, bezogen auf die Gesamtgruppe der untersuchten Patienten, in 74 Fällen (35,6%) LK-Metastasen nachgewiesen. Dabei waren insgesamt 315 LK mit Karzinominfiltration nachweisbar, d.h. im Durchschnitt lagen 4,2 LK-Metastasen pro (y)pN+-Patient vor. Die Subgruppenanalyse der drei Patientengruppen nach der jeweiligen Primärtherapie ergab folgendes Ergebnis: Bei den primär operierten Patienten wurden durchschnittlich 5,8 befalle LK pro (y)pN+-Patient nachgewiesen, während nach neoadjuvanter RT/CTx lediglich 3,8 (nach 5-FU-Monotherapie) bzw. 2,7 (nach intensivierter RT/CTx unter Hinzunahme von Oxaliplatin) nachweisbar waren.

Postoperative, klinikopathologische Parameter der Patientenkohorten							
Neoadjuvante Therapie:	Keine (primäre OP)		Standard 5-FU-Monotherapie		Intensivierte RT/CTx 5-FU/Oxaliplatin		p-Wert*
Patientenzahl / Parameter	n=41	%	n=103	%	n=64	%	
<b>R-Status</b>							
R0	41	100	103	100	64	100	
R1/R2	0	0	0	0	0	0	
<b>CRM</b>							
negativ	0	0	0	0	0	0	
positiv	0	0	0	0	0	0	
<b>Tumorregression</b>							
0: keine	-	-	0	0	0	0	
1: gering (<25%)	-	-	14	14	6	9	
2: moderat (<50%)	-	-	26	25	10	16	
3:deutlich (>50%)	-	-	54	52	41	64	
4: totale (100%)	-	-	9	9	7	11	0.33
<b>(y)pT-Status</b>							
0	0	0	9	9	9	14	
1	1	2	8	8	9	14	
2	9	22	25	24	14	22	
3	29	71	55	53	28	44	
4	2	5	6	6	4	6	0.10
<b>(y)pN-Status</b>							
0	21	52	67	65	46	72	
1	10	24	25	24	13	20	
2	10	24	11	11	5	8	0.09
<b>Untersuchte LK</b>	977		2.751		1.689		
Durchschnittliche LK-Zahl pro Patient	23.8	-	26.7	-	26.3		0.9
<b>LK-Metastasen</b>	116		146		53		
Infiltrierte LK pro (y)pN+-Patient	5.8	-	3.8	-	2.7	-	0.5
<b>(y)pUICC-Stadium</b>							
0	0	0	8	8	9	14	
I	5	12	24	23	22	34	
II	16	39	32	31	13	20	
III	19	46	30	29	15	23	
IV	1	2	9	9	5	8	0.01

**Tabelle 4: Histopathologische Befunde nach Rektumresektion und Resektataufarbeitung**

\*p-Wert-Berechnung mit Chi-Quadrat Test



### 3.4 Rezidive und tumorbedingte Todesfälle

Während der medianen Nachbeobachtungszeit von 57 Monaten (2-154 Monate) wurde bei insgesamt 11 Patienten (5,3%) ein lokoregionäres und/oder fernmetastatisches Rezidiv diagnostiziert (Tabelle 5). Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, war die Lokalrezidivrate (LR) in der Gruppe der primär operierten Patienten mit 14,6 % (n=6; 1 isoliertes LR, 5 LR mit Fernmetastasierung) deutlich höher als bei den Patienten nach neoadjuvanter RT/CTx. So wurden in der Gruppe der mit 5-FU-Monotherapie behandelten Patienten insgesamt drei (2,9 %) Lokalrezidive (in Kombination mit FM) beobachtet. Bei den intensiviert (plus Oxaliplatin) therapierten Patienten traten lediglich zwei Lokalrezidive (3,1 %) auf, davon lag in einem Fall ein isoliertes Tumorrezidiv und im zweiten Fall zusätzlich eine Fernmetastasierung vor (Tabelle 5). Hinsichtlich der Fernmetastasierungsrate konnten beim Vergleich der unterschiedlich therapierten Patientengruppen keine derart deutlichen Unterschiede festgestellt werden. So lag die Fernmetastasierungsrate im Kontrollkollektiv bei 22% (n=9). In der Gruppe der mit 5-FU-Monotherapie behandelten Patienten wurden in 25% (n=25) fernmetastatische Rezidive beobachtet gegenüber 21% (n=14) nach intensivierter Vorbehandlung.

Insgesamt zeigte sich auch hier ein leichter Trend zu einer verringerten Fernmetastasierungsrate nach multimodaler Vorbehandlung, allerdings ist die mediane Nachbeobachtungszeit gegenüber der primär operierten Patientenkohorte noch zu gering (Tabelle 3). Die im angegebenen Nachsorgezeitraum diagnostizierten Fernmetastasen waren am häufigsten in der Leber (n=24; 48,9%) und der Lunge (n=24; 48,9 %) lokalisiert (Tabelle 5). Während der Nachbeobachtungszeit verstarben insgesamt 27 Patienten tumorbedingt. Von der letalen Tumorprogression waren 6 (14,6 %) Patienten aus der primär operierten Patientengruppe betroffen, 15 (14,6 %) Patienten nach der multimodalen Therapie mit 5-FU-Monotherapie sowie 6 (9,3 %) Patienten nach Applikation der intensivierten RT/CTx und adjuvanten Therapie (Kombination von 5-FU und Oxaliplatin).

<b>Nachsorgeergebnisse der Patientenkohorten (Nachsorgeintervall: 154 Monate, Median: 57 Monate; letzter Nachbeobachtungsmonat: 01/2010)</b>						
<b>Neoadjuvante Therapie:</b>	<b>Keine (primäre OP)</b>		<b>Standard 5-FU-Monotherapie</b>		<b>Intensivierte RT/CTx 5-FU/Oxaliplatin</b>	
<b>Patientenzahl / Parameter</b>	<b>n=41</b>	<b>%</b>	<b>n=103</b>	<b>%</b>	<b>n=64</b>	<b>%</b>
<b>Rezidive</b>						
Keine	31	68	78	75	49	76
Lokal	1	5	0	0	1	2
Fernmetastasen (FM)	4	11	23	22	13	20
Lokal und FM*	5	16	3	3	1	2
<b>Fernmetastasen</b>	9	22	26	25	14	21
Hepar	4	45	8	31	4	29
Pulmo	3	33	10	39	3	21
Hepar und Pulmo	1	11	4	15	3	21
Peritoneal/ Osseus	1	11	4	15	4	29
<b>Follow-Up-Zeit</b>						
Mittelwert	88		50		33	
Min. – Max.	2-154		3-141		2-82	
<b>Tumorbedingter Tod</b>	6	15	15	15	6	10

**Tabelle 5: Rezidive (LR und FM) im Nachbeobachtungszeitraum**

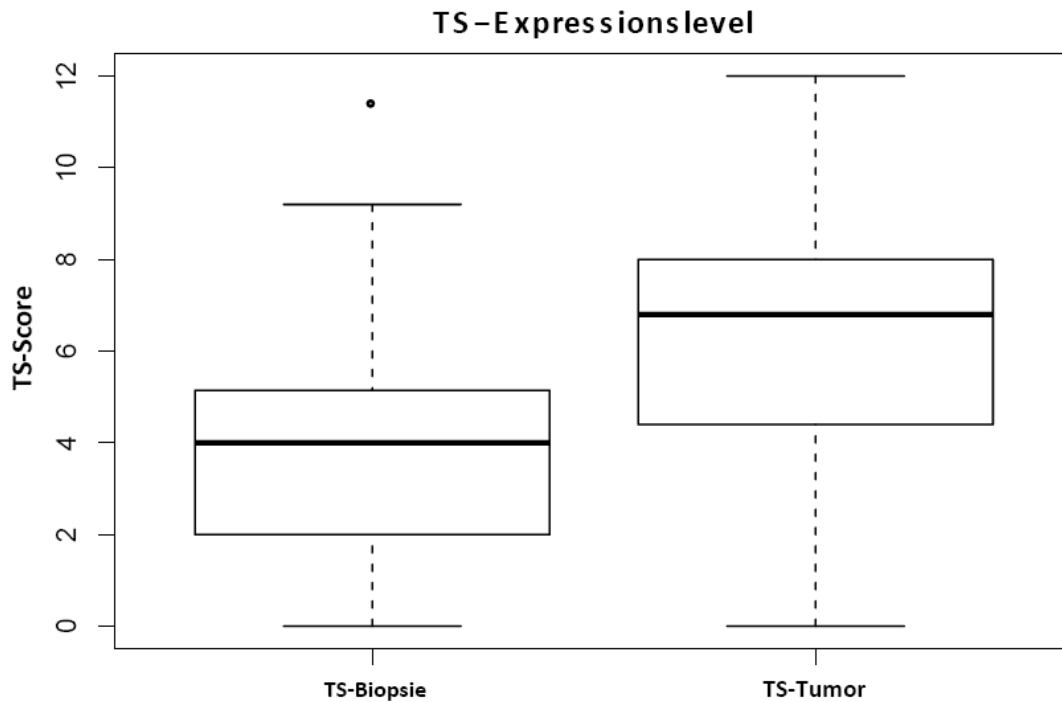
\*synchron vorliegende Lokalrezidive und Fernmetastasen

### 3.5 TS-Expressionslevel aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie und aus dem Rektumkarzinomresektat

Entsprechend der in Kap. 1.10. dargestellten immunhistochemischen Untersuchungsmethode wurden bei allen Patienten mit einem cUICC-II/-III-Rektumkarzinom sowohl aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie (es waren 165 Biopsien mit ausreichend Tumorgewebe zur IHC Auswertung zugänglich) als auch aus dem Tumorresektat nach TME die TS-Level bestimmt (sofern nach Vorbehandlung residuelle Tumorzellen vorhanden waren).

Nach einem modifizierten Remmele-Score wurde die TS-Expressionstärke unter Berücksichtigung der intratumoralen zum Teil heterogenen Verteilung in einen Scorewert von 0-12 eingeteilt (Abbildung 12). In Tabelle 6 sind die Mittelwerte und Min.-Max.-Werte in Abhängigkeit zur durchgeführten Therapie (primäre Operation versus neoadjuvante RT/CTx mit 5-FU-Monotherapie versus RT/CTx mit 5-FU+Oxaliplatin) dargestellt.

Die Expressionslevel in den prätherapeutischen Biopsien waren insgesamt etwas niedriger als die aus den residuellen Tumorzellen bestimmten Expressionswerte (Abbildung 13). So lag der Median der TS-Expressionstärke in den aus den diagnostischen Biopsien gewonnenen Tumorzellen bei einem Score-Wert von 4 (Abbildung 14), während die mediane Expressionsstärke für die residuellen Tumorzellen bei einem Score-Wert von 7 gemessen wurde (Abbildung 15).



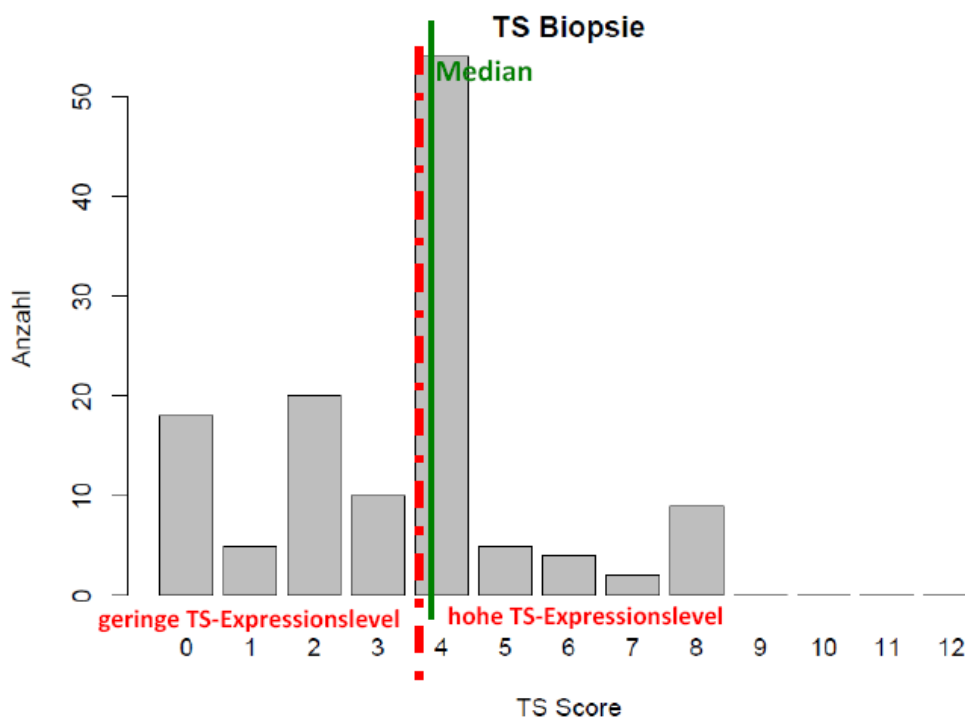
**Abbildung 13: TS-Expressionslevel in Biopsie (TS Biopsie) und Tumor (TS Tumor).**  
Darstellung der Box-Whisker-Plots mit 75% Konfidenzintervall; bei den Biopsien mit einem Ausreißer außerhalb des oberen Whisker. Der Score ergibt sich aus der Intensität und dem Anteil positiver Tumorzellen einer Probe (siehe Abbildung 12).

TS-Expressionslevel in den cUICC-II/-III Rektumkarzinomen der Patientenkohorten				
Therapie:	Kontrollgruppe	Standard 5-FU-Monotherapie	Intensivierte RT/CTx 5-FU/Oxaliplatin	p-Wert*
Patienten / Material	Patienten (n=41)	Patienten (n=103)	Patienten (n=64)	
<b>TS Biopsie**</b>				
Mittelwert	3.85	3.88	4.02	0.82
Min. - Max.	0-8	0-1	0-8	
<b>TS Tumor***</b>				
Mittelwert	6.03	6.90	7.28	0.04
Min. - Max.	1-11	1-12	0-11	

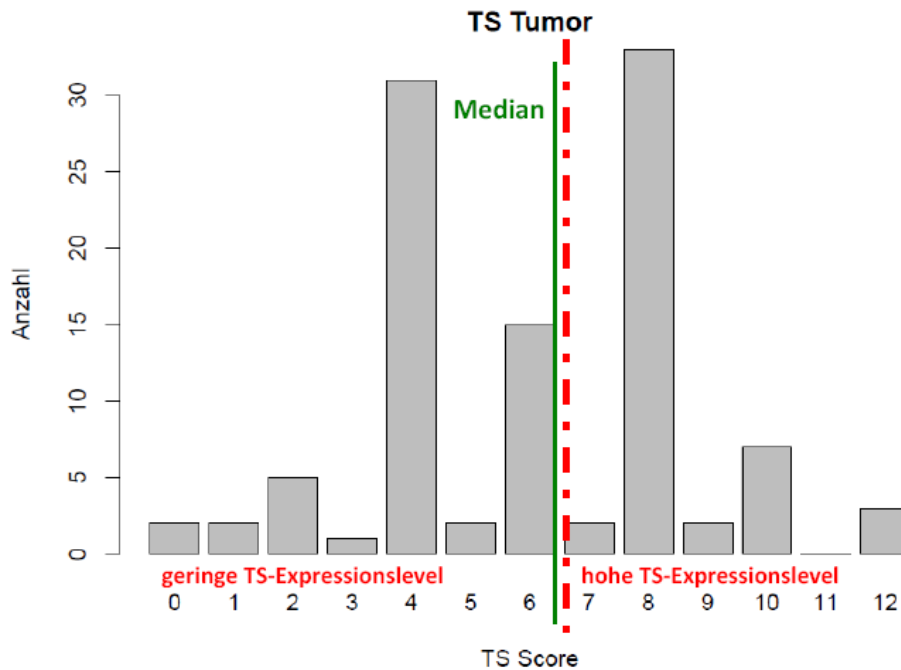
**Tabelle 6: Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung aus Biopsie und Resektat**

\* p-Werte aus Berechnung mit Chi-Quadrat Test; \*\*TS-Expression aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie; \*\*\*TS-Expression aus dem Tumor nach erfolgter Rektumresektion

Zur Diskriminierung der untersuchten Patientenpopulation in Rektumkarzinompatienten mit hoher TS-Expression versus geringer TS-Expression wurde der Median-Wert der gemessenen Expressionslevel als *cut-off* gewählt. Somit lag der *cut-off* für die Rektumkarzinom-Biopsien bei einem Score-Wert von 4 und im postoperativ untersuchten Tumorgewebe bei einem Score von 7. Zusammenfassend ergab die Analyse der vorhandenen Biopsien für 55 (34,3%) Patienten eine niedrige TS-Expression ( $TS < 4$ ) und für 110 Patienten (65,6%) eine hohe TS-Expression ( $TS \geq 4$ , Abbildung 14). Nach erfolgter Rektumresektion wurden aus dem Tumorgewebe bei 94 Patienten (50,8%) TS-Expressionslevel unterhalb des *cut-off*-Grenzwertes von 7 ermittelt. Bei 91 (49,2%) Patienten konnten hohe TS Expressionslevel oberhalb des *cut-off*-Wertes bestimmt werden (Abbildung 15).



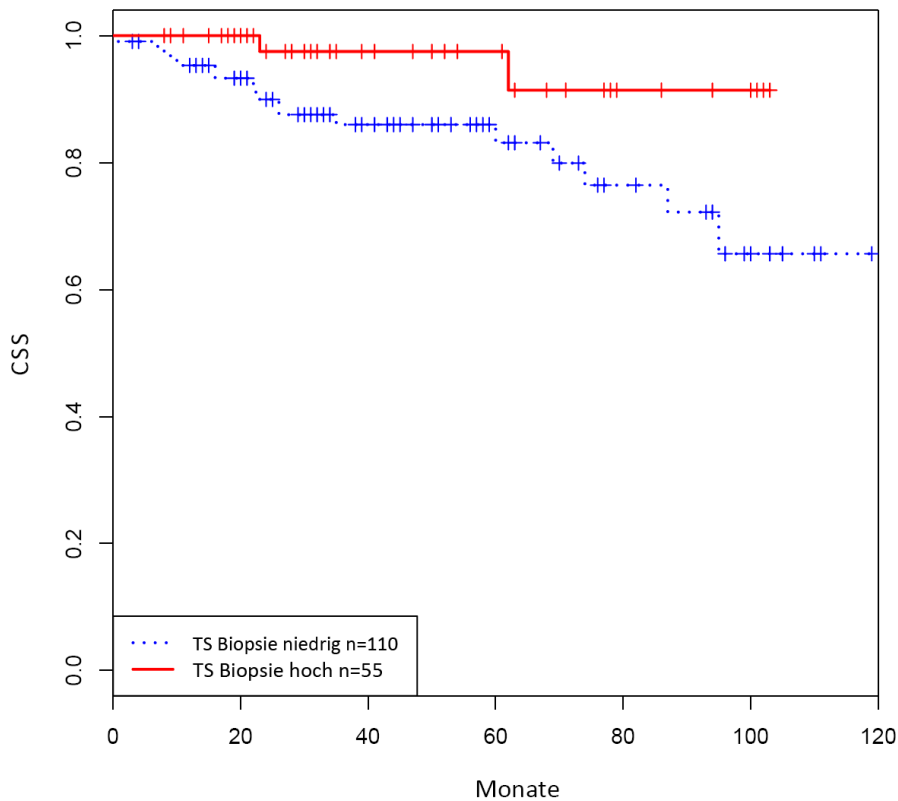
**Abbildung 14: TS-Expressionslevel aus den prätherapeutischen Biopsien**  
 Median der Expressionslevel: 4; <4: geringe TS-Expression,  $\geq 4$ : hohe TS-Expression



**Abbildung 15:** TS-Expressionslevel aus dem postoperativen Tumorgewebe  
Median der Expressionslevel: 7; <7: geringe TS-Expression; ≥7: hohe TS-Expression

### 3.6 Korrelation der TS-Expression aus der prätherapeutischen Biopsie mit dem tumorbedingten Gesamtüberleben

Die in den prätherapeutischen Biopsien gemessene TS-Expression wurde mit dem Malignom-spezifischen Gesamtüberleben (CSS) korreliert, um die prognostische Bedeutung der TS-Expression unabhängig vom jeweiligen Therapieregime zu überprüfen. Dabei zeigte sich eine signifikante ( $p=0,0151$ , Cox-Regressionsmodell) Korrelation (Abbildung 16) zwischen einer niedrigen TS-Expression und einem reduzierten CSS.

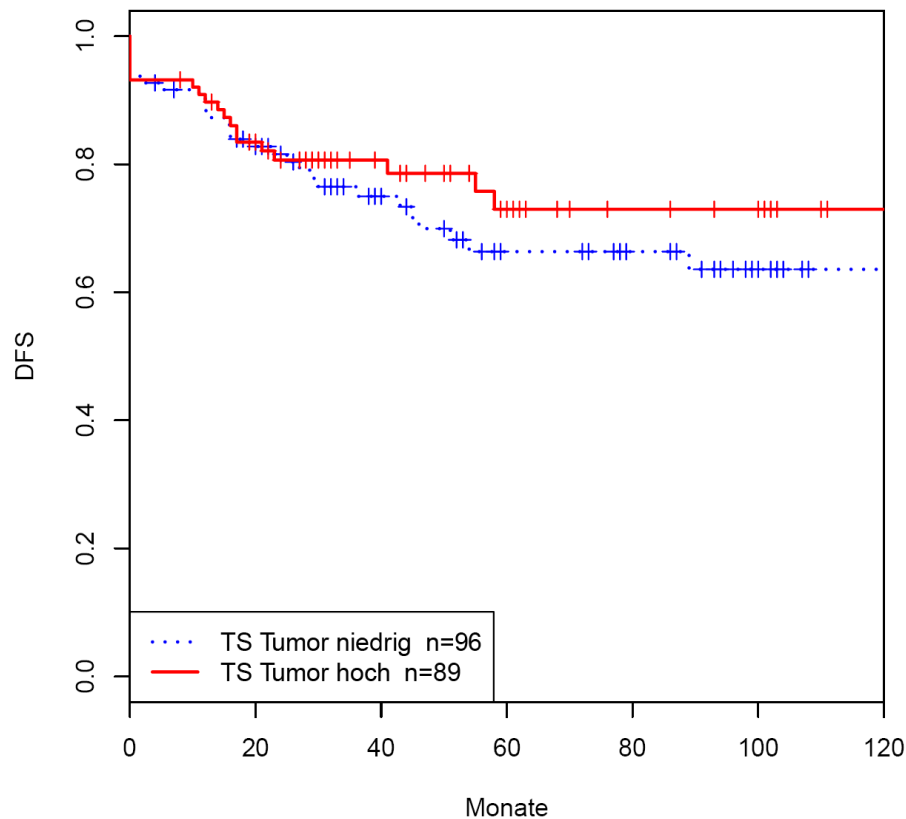


**Abbildung 16: Krankheitsspezifisches Überleben (CSS) in Abhängigkeit der aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie gemessenen TS-Expression**  
 Niedrige TS Expression: n=110 Patienten, hohe TS-Expression: n=55 Patienten; p-Wert aus der COX Regressionsanalyse: **p<0,0151**.

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt interessanterweise in der Zeit von vier bis fünf Jahren nach erfolgter Rektumresektion deutliche Unterschiede im Überleben der Patienten abhängig von der initial aus der Tumorbiopsie bestimmten TS-Expression.

### 3.7 Korrelation der TS-Expressionslevel aus Tumorgewebe nach Rektumresektion mit dem tumorfreien Überleben

Die Bedeutung der TS-Expression im residuellen Tumorgewebe als *prädiktiver/prognostischer* Biomarker wurde anhand einer Korrelationsanalyse zwischen den ermittelten TS-Expressionsleveln und dem aus der Tumornachsorge evaluierten DFS untersucht (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Krankheitsfreies Überleben (DFS) in Abhängigkeit von der aus dem residuellen Tumorgewebe bestimmten TS-Expression**  
 Niedrige TS-Expression: n=96, hohe TS-Expression: n=89; p-Wert aus der COX-Regressionsanalyse: **p=0.213**.

Bei den nodal-negativen Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf der beiden Patientenkohorten aufgeteilt nach TS-Expressionslevel. Für den Nachbeobachtungszeitraum vier bis fünf Jahre nach der Rektumresektion zeigt sich lediglich ein etwas verkürztes DFS für Patienten mit mit niedriger intratumoraler TS-Expression (n=96) im Vergleich zu Patienten mit hoher TS-Expression (n=89).

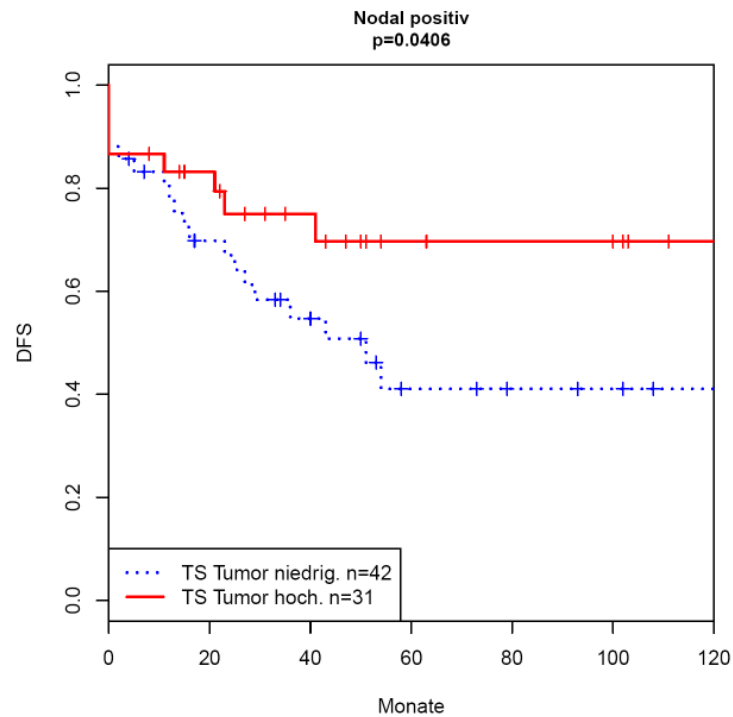
Unter Berücksichtigung des Nodalstatus konnte die TS-Expression Patienten in Gruppen unterschiedlichen Rezidivrisikos diskriminieren. In weiteren Subgruppenanalysen erfolgte eine Aufteilung des Gesamtkollektivs (n=208 bzw. alle Patienten mit auswertbarem Tumor aus dem Resektionspräparat) in Patienten mit postoperativ histologisch nachgewiesenem positiven Nodalstatus (Patientenkohorte A, n= 73, Abbildung 18) und negativen Nodalstatus (Patientenkohorte B, n=112, Abbildung 19). Für beide Patientenkohorten wurden Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier



Überlebensfunktionen durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen residueller TS-Expression und dem DFS zu verdeutlichen.

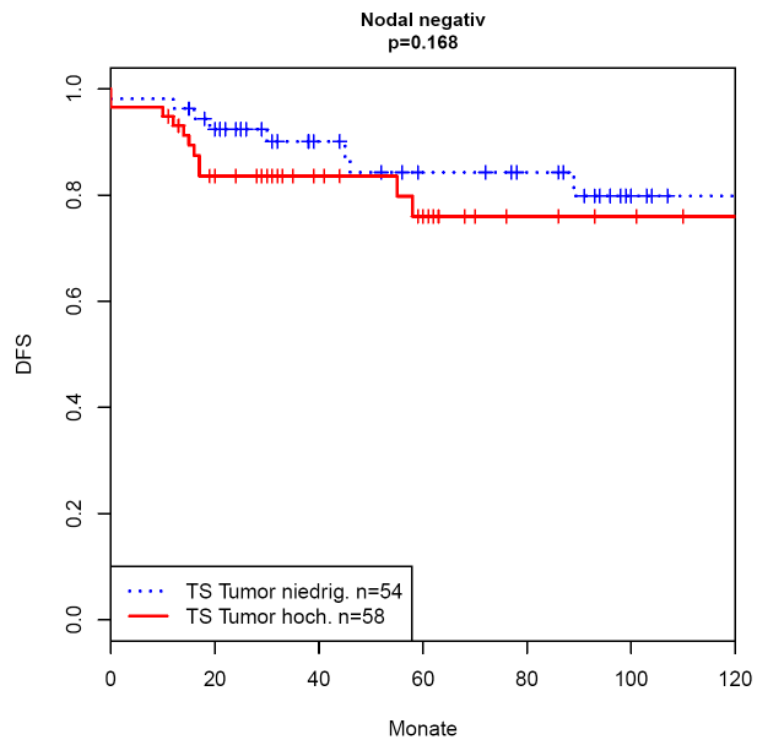
Unter der oben genannten Aufteilung der Patienten zeigte sich im Cox – Regressionsmodell in der Patientenkohorte A ein signifikanter Unterschied im DFS zwischen N+-Patienten mit einer hohen TS-Expression im residuellen Tumor gegenüber Patienten mit einer geringen intratumoralen TS-Expression ( $p=0,0406$ ). Wie in Abbildung 18 dargestellt, lässt sich bei Patienten mit niedriger TS-Expression und lokoregionären Lymphknotenmetastasen ein deutlich reduziertes tumorfreies Überleben nachweisen. Die Wahrscheinlichkeit in dieser Subgruppe tumorfrei zu bleiben beträgt nach einem Nachbeobachtungsintervall von drei Jahren lediglich 40%.

Demgegenüber zeigen Patienten mit positivem Nodalstatus und hoher TS-Expression einen wesentlich günstigeren Krankheitsverlauf mit einem geringeren Risiko für das Auftreten eines Tumorrezidivs. Diese Patienten haben eine Wahrscheinlichkeit von >70% nach drei Jahren noch tumorfrei zu leben.



**Abbildung 18: Patientenkohorte A: Patienten mit histologisch gesicherten lokoregionären Lymphknotenmetastasen nach der Resektion**

Aufteilung in Patienten mit hoher intratumoraler TS-Expression (n=31) und Patienten mit niedriger TS-Expression (n=42). P-Wert aus der COX-Regressionsanalyse:  $p<0.0406$



**Abbildung 19: Patientenkohorte B: Patienten mit histologisch nachgewiesenem negativem Nodalstatus nach der Resektion**

Aufteilung in Patienten mit hoher intratumoraler TS-Expression (n=58) und Patienten mit niedriger TS-Expression (n=54); p-Wert aus der Cox-Regressionsanalyse:  $p=0.168$

Für die Patientenkohorte B, d.h. jene Patienten ohne Nachweis einer lokoregionären Lymphknotenmetastasierung nach umfassender Aufarbeitung des TME-Resektates, ergab sich aus der Cox –Regressionsanalyse kein Unterschied im DFS bezüglich der jeweiligen TS-Expressionslevel aus dem Tumorgewebe.

Bei den durchgeführten Analysen blieben allerdings jeweils die Komplettresponder (pCR) unberücksichtigt, da bei diesen Patienten ohne verbleibende residuelle Karzinomzellen die TS-Expression nicht bestimmbar war. Diese Patienten hatten die beste Langzeitprognose, da keine Rezidivereignisse oder tumorbedingten Todesfälle im Nachbeobachtungszeitraum auftraten (Abbildung 23).

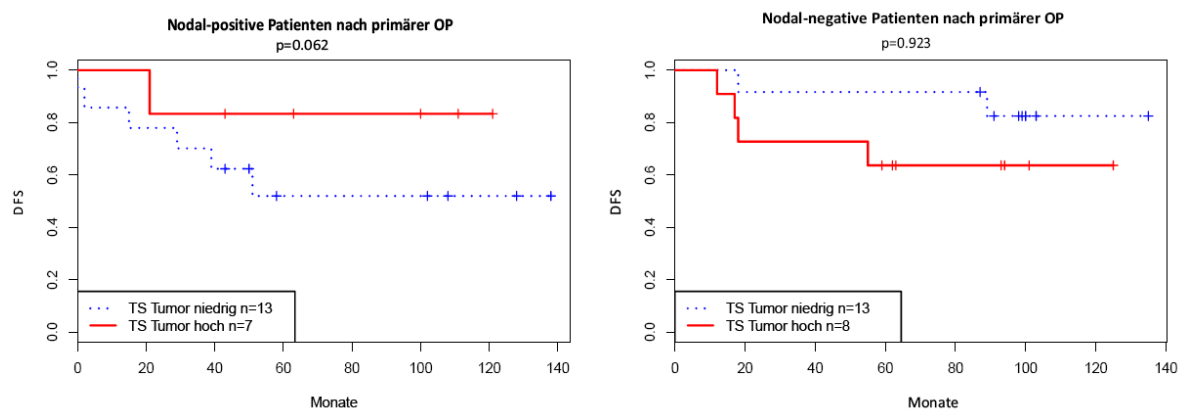
Beim Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven der beiden Patientenkohorten A und B (Abbildung 18 und Abbildung 19) wird deutlich, dass unabhängig vom jeweiligen TS-Expressionslevel Patienten mit einem gesicherten ypN0-Status, einschließlich der durch die präoperativen RT/CTx *down-gestagten* Patienten, ein deutlich besseres tumorfreies Überleben aufwiesen.

Daraus ergibt sich die Frage, ob die durchgeführte multimodale Therapie Einfluß auf die Korrelation zwischen Lymphknotenstatus und TS-Expression mit dem tumorfreien Überleben hat. Demzufolge wurden die bereits beschriebenen Analysen in weiteren Subkohorten durchgeführt:

- Patientenkohorte C: primär operierte Patienten mit nachfolgender RT/CTx,
- Patientenkohorte D: Patienten nach präoperativer RT/CTx, bei denen die angestrebte neoadjuvanten RT/CTx-Dosis (Radiatio und Chemotherapie) zu >80% appliziert werden konnte,
- Patientenkohorte E: Patienten bei denen eine Dosisreduktion von mehr als 20% erfolgen musste.

In der Cox-Regressionsanalyse der primär operierten Patienten (Patientenkohorte C) ergab sich ebenfalls ein deutlicher (Abbildung 20), allerdings nicht signifikanter Unterschied ( $p=0,0692$ ) zwischen Patienten mit pN+ Status und hoher TS Expression aus residuellem Tumor gegenüber pN+-Patienten mit niedrigen TS-Spiegeln. D.h. nodal-positive Patienten mit einer hohen TS-Expression hatten ein längeres DFS gegenüber

Patient mit niedrigen TS-Spiegeln. Bei den nodal-negativen Patienten ließ sich in der Cox-Regressionsanalyse kein Unterschied im DFS bezüglich einer hohen oder niedrigen TS Expression im Tumor feststellen ( $p=0.923$ , Abbildung 20).



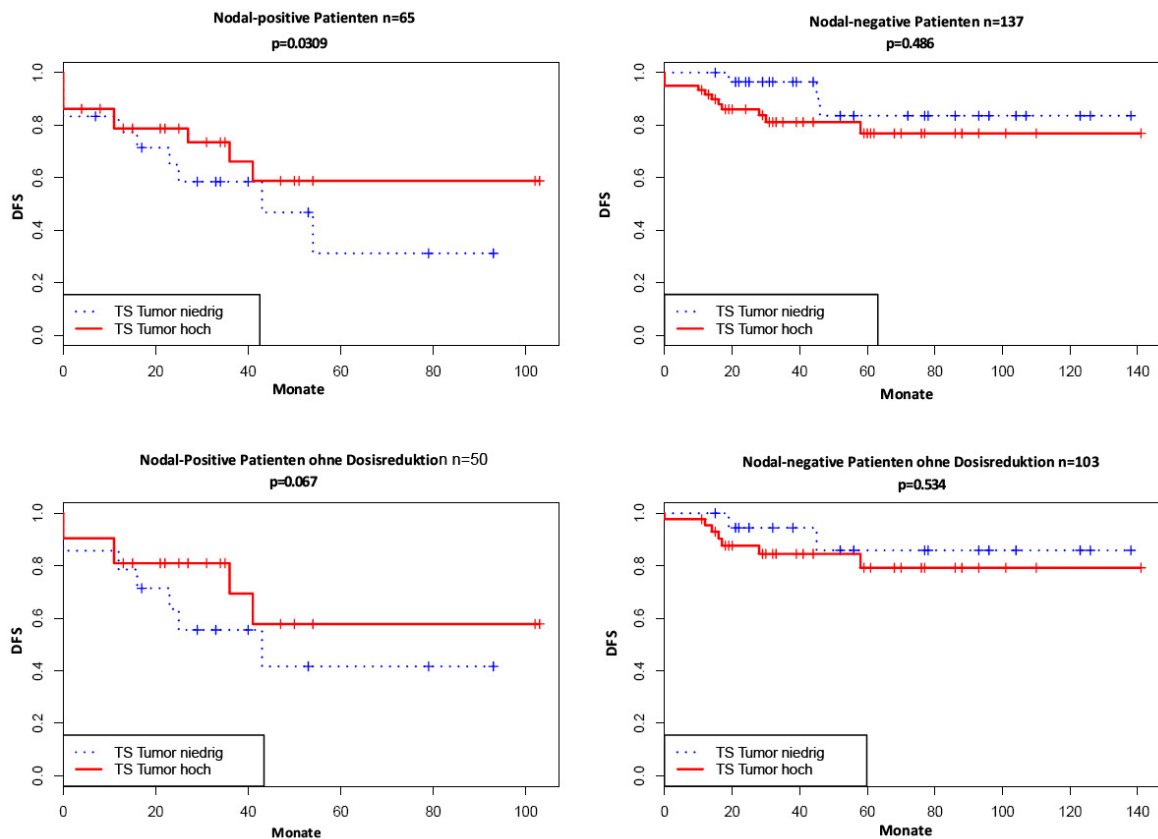
**Abbildung 20:** Kaplan-Meier-Kurven der primär operierten Patienten aufgeteilt in nodal-negative (n=21) und nodal-positive (n=20) Patienten in Abhängigkeit zur TS-Expression.

In der Gruppe der N+ Patienten haben die Patienten mit niedriger TS-Expression (n=13) ein kürzeres (aber noch nicht signifikantes) DFS (Abbildung 19). Für die N-Patienten zeigt sich kein Unterschied im DFS in Abhängigkeit der TS-Expression (niedriger TS: n=13; hohe TS-Expression: n=8) in der Cox-Regressionsanalyse.

Auch für die neoadjuvant vorbehandelten Patienten (5-FU-Monotherapie und intensiviert vorbehandelt mit 5-FU und Oxaliplatin, Patientenkohorte D) zeigte sich ein signifikanter ( $p=0,0219$ ) Unterschied im DFS bei Patienten mit positivem Nodalstatus (Abbildung 21 oben links).

Auch nach Ausschluss der 34 Patienten, bei denen eine Dosisreduktion erforderlich war, zeigte sich in der Cox-Regressionsanalyse (Patientenkohorte E) weiterhin ein eindeutiger Trend für ein verkürztes DFS ( $p=0,067$ ) bei jenen Patienten, bei denen postoperativ sowohl Lymphknotenmetastasen als auch eine niedrige TS-Expression im residuellen Tumor nachweisbar waren. In Abbildung 21 (links unten) wird deutlich; dass bei den nodal-negativen Patienten (Abbildung 21 rechts) die Kaplan-Meier-Kurven annähernd gleich verlaufen. Dies bestätigte sich auch in der Cox-Regressionsanalyse ( $p=0.86$ ).

Zusammenfassend zeigten sich gerade bei der nodal-negativen Patientenkohorte sehr gute DFS-Intervalle mit einer Wahrscheinlichkeit von >80% tumorfreien Überlebens unabhängig von der TS-Expression (Abbildung 21, unten rechts).



**Abbildung 21:**

**Kaplan-Meier-Kurven aller Patienten nach neoadjuvanter RT/CTx (oben, Patientenkohorte D) aufgeteilt nach Nodalstatus (links: ypN+, rechts ypN-) und unter Exklusion aller Patienten (n=34) mit >20%iger CTx-Dosisreduktion (unten, Patientenkohorte E).**

Es zeigt sich auch hier ein verkürztes DFS für N+-Patienten mit niedriger TS-Expression gegenüber einem langen DFS in N--Patienten. Auch eine Dosisreduktion der verabreichten adjuvanten CTx scheint dieses Ergebnis nicht wesentlich zu beeinflussen. Das DFS unterscheidet sich in der Gesamtgruppe der neoadjuvant vorbehandelten Patienten signifikant ( $p=0.0309$ ) in Abhängigkeit der TS-Expression. Dieses Ergebnis zeigt sich auch als starker Trend unter Ausschluss der Patienten mit einer Dosisreduktion um  $\geq 20\%$  ( $p=0.067$ ).

Zusammenfassend scheint die Dosisreduktion keinen wesentlichen Einfluss auf die Dauer des krankheitsfreien Überlebens zu haben.

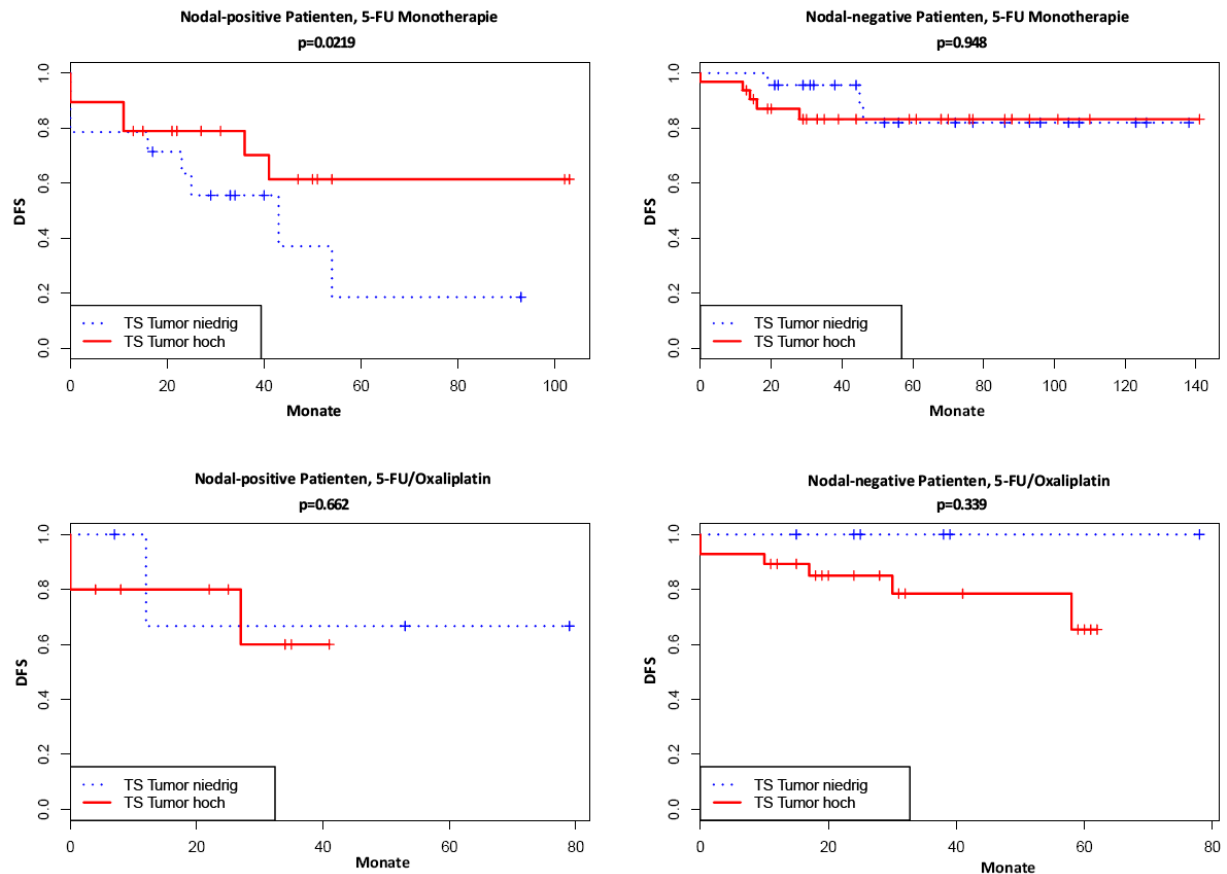
### 3.7.1 Effekt der intensivierten RT/CTx auf die intratumorale TS-Expression und ihre prognostische Bedeutung

Um den Effekt der TS-Expression in der Gruppe der nodal-positiven Patienten unter dem Einfluss unterschiedlicher neoadjuvanter Therapieregime zu klären, wurde in weiteren Subgruppenanalysen nach allein mit 5-FU kombinierter RT/CTx (+ adjuvanter Therapie) und der mit 5-FU und Oxaliplatin intensivierten RT/CTx stratifiziert (Abbildung 22).

Dabei ergab sich folgendes Ergebnis: Die Analyse der Patienten mit 5-FU-Monotherapie zeigte die bekannte Diskriminierung ( $p=0,0219$ ) nodal-positiver Patienten anhand des TS-Expressionslevels (Abbildung 22 oben links) und einen sehr guten DFS-Verlauf für nodal-negative Patienten (Abbildung 22 oben rechts).

In der Subgruppe der intensiviert behandelten Patienten ( $n=64$ ) trat dieser Unterschied nicht auf (Abbildung 22 links unten). Bei den nodal-positiven Patienten war ein vergleichsweise längeres DFS mit einer Wahrscheinlichkeit des tumorfreien Überlebens von etwa 60 % (nach drei Jahren) zu verzeichnen. In dieser Subgruppe ( $n=19$ ) ließen sich keine Unterscheidung nach TS-Expression erkennen ( $p=0,662$ ).

Darüber hinaus zeigte diese Analyse, dass im Nachbeobachtungszeitraum kein Rezidivereignis bei Patienten mit negativem Nodalstatus nach RT/CTx und mit niedriger TS-Expression auftrat. Diese Patientengruppe hatte damit ein vergleichbares DFS wie Patienten mit pCR, die die beste Langzeitprognose aufweisen.



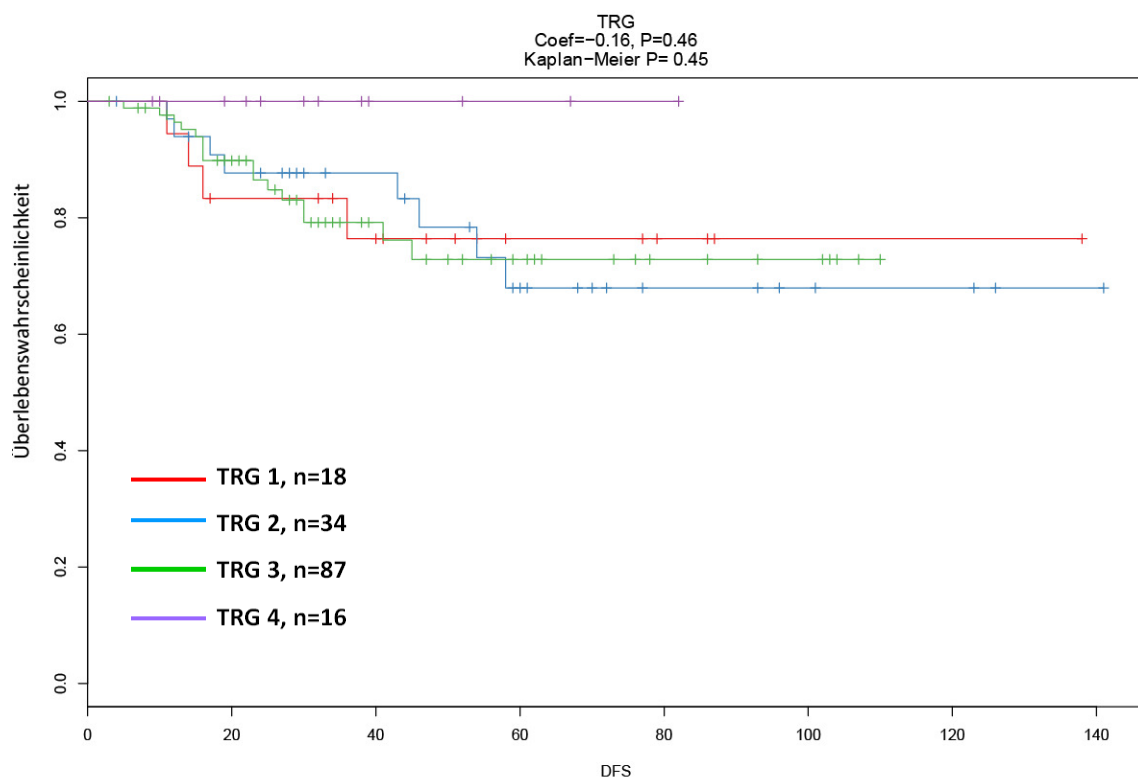
**Abbildung 22:** Kaplan-Meier-Kurven neoadjuvant behandelter Patienten aufgeteilt nach RT/CTx mit 5-FU-Monotherapie (oben, Arm A) und 5-FU und Oxaliplatin (unten, Arm B) sowie unter Berücksichtigung des Lymphknotenstatus (links: ypN+, rechts: ypN-)

### 3.8 Korrelation der prätherapeutischen TS-Expression mit dem Grad der Tumorregression

Es wurde weiterhin untersucht, ob die TS als *prädiktiver* Biomarker den Grad der durch die neoadjuvante RT/CTx induzierten, histomorphologisch nachweisbaren Tumorregression (Abbildung 9) vorhersagen kann. Die Korrelation der prätherapeutischen TS-Expressionslevel zeigte im untersuchten Patientenkollektiv jedoch keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Grad der Tumorregression.

Der Grad der Tumorregression allein zeigt im untersuchten Patientenkollektiv keine Korrelation mit dem DFS. Somit kann dieser Regressionsparameter nur indirekt die langfristige Prognose des Patienten anzeigen (Abbildung 23): Patienten mit kompletter

Tumorregression (pCR) nach neoadjuvanter RT/CTx haben ein DFS von 100 % bis > 80 Monate Nachbeobachtungszeit.



**Abbildung 23: Korrelation des TRG aller neoadjuvant behandelten Patienten mit dem DFS**

In der Gruppe von Patienten mit pCR treten im Nachbeobachtungszeitraum keine Rezidive auf.



### **3.9 Multivariate Analyse der TS-Expression mit kliniko-pathologischen Parametern**

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit, die im univariaten Cox-Regressionsmodell das Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  erreicht hatten, wurden in einer multivariaten Analyse überprüft.

So wurde die prognostische Bedeutung einer niedrigen TS-Expression aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie für ein verkürztes CSS in einem multivariaten Modell unter Berücksichtigung von Geschlecht, Patientenalter, klinischem Staging der Tiefeninfiltration des Primärtumors in die Rektumwandung, des Nodalstatus sowie der neoadjuvanten Therapie getestet (Tabelle 7).

Auch in der multivariaten Analyse zeigte sich der TS-Score aus der prätherapeutischen Biopsie (als einziger Parameter) als prognostisch bedeutsam. So geht im untersuchten Modell eine niedrige TS-Expression mit einem verkürzten CSS ( $p = 0.01$ ) einher.

## Alle Patienten – Biopsie-Score

Patienten Charakteristika	TS-Expression Biopsie-Score		Relation TS	Disease Free Survival			Cancer Specific Survival		
	hoch >4 n=110	niedrig <=4 n=55	M-W Test p-Wert	Univariate Analyse p-Wert	Multivariate Analyse		Univariate Analyse p-Wert	Multivariate Analyse	
					HR (95%CI)	p-Wert		HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			0.39	0.05	2.5 (1.1-5.8)	0.03 *	0.4	1.5 (0.5-4.2)	0.44
männlich (%)	79	33							
weiblich (%)	22	31							
<b>Alter</b>			0.79	0.07	1.0 (0.9-1.0)	0.08	0.24	1.0 (0.9-1.0)	0.43
<=63	25	55							
>63	30	55							
<b>uN</b>			0.44	0.55	1.2 (0.6-2.4)	0.68	0.15	2.3 (0.7-8.3)	0.19
-	18	24							
+	37	86							
<b>uT</b>			0.27	0.89	0.9 (0.4-2.3)	0.83	0.68	2.1 (0.5-8.8)	0.3
1-2	4	6							
3-4	51	104							
<b>TRG</b>			1	0.34			0.35		
0,1,2,3a,	29	52	-	-	-	-	-	-	-
3b, 4	18	39	-	-	-	-	-	-	-
<b>neoadjuvante Therapie</b>									
keine	8	19							
5FU	25	54	0.78	0.43	1.1 (0.5-2.6)	0.81	0.24	0.9 (0.3-3.0)	0.9
5FU+Ox	22	37	0.77	0.45	1.3 (0.5-3.3)	0.54	0.36	1.2 (0.3-4.6)	0.75
<b>TS Biopsie</b>				0.14	0.9 (0.8-1.0)	0.15	<b>0.015 *</b>	0.7 (0.6-0.9)	<b>0.01 *</b>

**Tabelle 7: Multivariate Analyse der TS-Expression aus der prätherapeutischen Tumorbiopsie mit klinikopathologischen Charakteristika**

Alter, Geschlecht, uN, uT und neoadjuvante RT/CTx gingen in die Analyse mit ein. Der TRG wurde nicht berücksichtigt, da er zum Zeitpunkt der prätherapeutischen Biopsie noch nicht bekannt ist und nicht zu einer möglichen Therapiestratifizierung der neoadjuvanten Behandlung dienen kann.

Auch der Befund eines verkürzten DFS bei histologisch gesichertem positiven Nodalstatus und niedriger TS-Expression wurde im multivariaten Modell getestet. In die statistische Analyse der N+ Patienten gingen der (y)pT-Status und die Art der neoadjuvanten Therapie ein. Es zeigte sich hier für den TS-Tumor-Score auch multivariat ein signifikant verkürztes DFS für Patienten mit niedriger TS (p=0.03, Tabelle 8).

**(y)pN+ patients – Tumor-Score**

Patienten Charakteristika	TS-Expression Biopsie-Score		Relation TS	Disease Free Survival			Cancer Specific Survival		
	hoch >7 n=31	niedrig <=7 n=42	M-W Test p-Wert	Univariate Analyse p-Wert	Multivariate Analyse HR (95%CI)	p-Wert	Univariate Analyse p-Wert	Multivariate Analyse HR (95%CI)	p-Wert
			p-Wert						
<b>(y)pT</b>			0.53	0.37	1.2 (0.7-2.0)	0.58	0.04 *	2.3 (0.9-5.7)	0.08
1-2	7	8							
3-4	24	34							
<b>neoadjuvante. Therapie</b>									
keine	7	13							
5-FU	16	19	0.33	0.17	2.1 (0.8-5.6)	0.12	0.04 *	4.0 (1.1-15.3)	0.04 *
5-FU+Ox	8	10	0.21	0.39	1.5 (0.5-4.8)	0.47	0.21	2.7 (0.5-14.4)	0.25
<b>TS Biopsie</b>			0.18						
niedrig <=7	5	24							
hoch >7	11	17							
<b>TS Tumor</b>				0.04 *	0.9 (0.8-1.0)	0.03 *	0.35	0.9 (0.8-1.1)	0.55

**Tabelle 8: Multivariate Analyse der TS-Expression aus dem residuellen Tumorgewebe nodal-positiver Patienten unter Berücksichtigung des (y)pT-Status und der durchgeführten neoadjuvanten Therapie**

Ein niedriger Scorewert der TS aus residuellen Tumorzellen geht signifikant (univariat  $p=0.04$ ; multivariat  $p=0.03$ ) mit einem verkürzten DFS einher.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist die bisher größte Untersuchung der TS-Expression in Tumorzellen lokal fortgeschrittener (cUICC-II/III) Rektumkarzinome.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Analysen (Tabelle 9) sind sehr heterogen im Design und in den resultierenden Aussagen bei unterschiedlicher Methodik und limitierten Fallzahlen. Während größere Analysen an Patientenkollektiven mit KRK durchgeführt wurden, ohne zu berücksichtigen, dass es sich bei Kolon- und Rektumkarzinomen um unterschiedliche Karzinomentitäten handelt, stellt Tabelle 9 die bisher auf das Rektumkarzinom fokussierte Untersuchungen dar. Aus Tabelle 9 geht hervor, dass die Fallzahlen in keiner Analyse >100 betragen und die Methodik sowie ausgewerteten Endpunkte keinen direkten Vergleich zulassen.

Mit der vorliegenden Arbeit können Fragen der prognostischen Bedeutung der TS-Expression beantwortet werden. Zudem untersucht die vorliegende Arbeit zum ersten Mal die Bedeutung der TS-Expression unter der bisherigen Standardtherapie mit 5-FU im direkten Vergleich mit einem intensivierten Therapieregime, wie es derzeit in großen Phase-III-Studien geprüft wird.

### 4.1 Klinikopathologische Parameter des untersuchten Patientenkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde entsprechend der neoadjuvanten Therapie in drei Subgruppen unterteilt. Der Vergleich der klinikopathologischen Parameter (Tabelle 3 und Tabelle 4) stellt eine Vergleichbarkeit der einzelnen Patientenkohorten sicher um Aussagen in Bezug zur TS-Expression ableiten zu können. Hinsichtlich der prätherapeutischen Stagingergebnisse gab es lediglich einen Unterschied in der Höhenlokalisation der Karzinome innerhalb der drei Gruppen ( $p=0.02$ ).

Die ungleiche Verteilung der Karzinome auf die einzelnen Rektumdrittel resultiert aus einem Ausschluss von Patienten mit Karzinomen im oberen Rektumdrittel in der

CAO/ARO/AIO-04-Studie. Dieses Ausschlusskriterium ergab sich unter anderem aus Ergebnissen der holländischen TME-Studie (Kapiteijn et al. 2001), die für das obere Rektumdrittel keine signifikante Verbesserung der Lokalrezidivrate durch eine präoperative RTx zeigen konnte, sowie den Ergebnissen der MRC-CR07-Studie, bei der ein Vorteil der neoadjuvanten RTx für alle Rektumdrittel nur bei positivem CRM herausgestellt werden konnte (Sebag-Montefiore 2006).

Rektumkarzinome des oberen Drittels werden also primär operiert. Derzeit klärt in Deutschland die bereits erwähnte GAST-05-Studie (siehe auch Kapitel 1.6) als *Investigator-initiated* Add-on-Studie zur CAO/ARO/AIO-04-Studie, ob die PME aus onkologischer Sicht ein ausreichendes Resektionsverfahren darstellt.

Hinsichtlich des Operationsverfahrens bei Karzinomen im distalen Rektumdrittel deutet sich aus der Analyse des untersuchten Patientenkollektivs an, dass die Rate an kontinenserhaltenden Resektionen unter Schonung des Sphinkterapparates nach intensivierter RT/CTx (mit Oxaliplatin) deutlich höher ist als nach Standardtherapie mit 5-FU-Monotherapie. Ob die intensivierte Vorbehandlung tatsächlich die Rate an abdominoperinealen Rektumexstirpationen bei Tumorsitz im unteren Rektumdrittel zugunsten einer kontinenserhaltenden Operation reduzieren kann, müssen Subgruppenanalysen an größeren Fallzahlen aus der aktuellen Phase-III-Studie, der CAO/AIO/ARO-04-Studie, zeigen.

Im Vergleich der histopathologischen Befunde der Patientenkohorten zeigt sich durch die intensivierte neoadjuvante RT/CTx ein stärkeres T-Level-Downsizing und UICC-Downstaging (Tabelle 4,  $p=0.01$ ). Zudem wird ein Trend in der erfolgreichen Reduktion von initial diagnostizierten LK-Metastasen deutlich (Tabelle 4,  $p=0.09$ ) und lässt sich auch an den validierten LK-Metastasen pro (y)pN+-Patient ablesen. So fanden sich bei den primär operierten Patienten (s. Kapitel 3.3) im Durchschnitt 5,8 LK-Metastasen. Durch die neoadjuvante RT/CTx mit 5-FU-Monotherapie wurde die Zahl der LK-Metastasen auf 3,8 reduziert und nach intensivierter Vorbehandlung lagen durchschnittlich nur noch 2,7 LK-Metastasen vor. Gleichzeitig bestätigte die vorliegende Untersuchung Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (Sprenger 2009b), die bereits zeigten, dass die neoadjuvante

RT/CTx nicht zu einer Reduktion detektierbarer und damit für die histopathologische Befunderhebung zur Verfügung stehenden LK-Zahlen reduziert.

## 4.2 Korrelation der prätherapeutischen TS-Expression mit dem TRG

In der vorliegenden Untersuchung zeigt die TS-Expression aus der prätherapeutischen Biopsie keine Korrelation mit dem Grad der Tumorregression (Kapitel 3.8). Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt und zeigen heterogene Befunde des lokalen Ansprechens in Bezug zur TS-Expression. Frühere Analysen hatten eine positive Korrelation niedriger TS-Expressionslevel mit einer starken Tumorregression beschrieben (Jakob et al. 2004). Dieses Ergebnis führte dazu, Patienten mit einer hohen intratumoralen TS-Expression als *high-risk*-Gruppe einzustufen unter der Vorstellung, dass bei niedrigen Proteinexpressionsleveln der Antimetabolit 5-FU die intrazellulär vorhandene TS optimal hemmen könne. Es wurde weiterhin abgeleitet, dass möglicherweise Patienten mit einer hohen TS-Expression nicht ausreichend von einer 5-FU-Monotherapie profitieren könnten.

Da allerdings in der vorliegenden Analyse der Grad der Tumorregression nicht mit der Langzeitprognose korreliert, lässt sich aus diesem Befund keine direkte Prognoseabschätzung ableiten. Es bestätigt sich aber die Beobachtung aus früheren Untersuchungen (Rödel et al. 2005), dass Patienten mit Erreichen einer pCR nach neoadjuvanter RT/CTx die beste Langzeitprognose haben. In der vorliegenden monozentrischen Untersuchung zeigt sich bemerkenswerterweise, dass Patienten mit pCR nach einem Nachbeobachtungszeitraum von > 80 Monaten tumorfrei überleben. Die erzielten pCR-Raten in der vorliegenden Analyse sind niedriger als in einigen Phase-II-Studien mit intensivierten Systemtherapien (z.B. 5-FU und Irinotecan oder 5-FU und Oxaliplatin) (Aschele et al. 2005, Gérard et al. 2010).

Allerdings wurden in diesen Untersuchungen auch einige wenige Rezidivereignisse in der pCR-Gruppe dokumentiert. In der vorliegenden monozentrischen Analyse bleibt jedoch diese Subgruppe nach neoadjuvanter RT/CTx rezidivfrei. Es scheint ein Ergebnis der

extensiven histopathologischen Aufarbeitung mit Einbettung und histomorphologischer Untersuchung des gesamten Mesorektums (Kapitel 2.6) sowie Beurteilung einer vergleichsweise hohen Anzahl perirektaler Lymphknoten zu sein, Patienten mit tatsächlich erreichter kompletter Tumorregression sicher zu identifizieren. Eine weniger extensive Standard-Aufarbeitung kann leicht dazu führen, dass residuelle Tumorüberreste übersehen werden. Dadurch liegt in anderen Studien die pCR-Rate möglicherweise etwas höher aber es treten bei diesen Patienten eben im Langzeitverlauf auch vereinzelt Rezidive auf.

Hieraus lässt sich ableiten, dass es das Ziel der (ggf. intensivierten) neoadjuvanten RT/CTx sein muss, eine hohe Rate an Komplettremissionen herbei zu führen, um für die Patienten eine günstige Langzeitprognose zu erreichen. Unter Berücksichtigung des exzellenten Langzeitverlaufes von Patienten mit pCR nach neoadjuvanter RT/CTx bleibt der Stellenwert der adjuvanten CTx ungeklärt. Bisher wurde der Einfluss der adjuvanten CTx auf das DFS und CSS für Patienten mit pCR nicht ausreichend in prospektiv randomisierten klinischen Studien überprüft (Bujko et al. 2010).

### **4.3 Prognostisches Potential der TS-Expression in der prätherapeutischen Biopsie**

Zur Untersuchung der *prognostischen* Bedeutung der TS-Expression aus dem prätherapeutischen Tumorgewebe wurde eine Korrelationsanalyse mit dem tumorspezifischen Überleben durchgeführt (Abbildung 16). Das Ergebnis einer Korrelation niedriger TS-Expressionslevel mit einem verkürzten CSS lässt die Vermutung zu, dass die TS schon aus der diagnostischen Biopsie Patienten mit einem höheren Risiko für ein tumorbedingt verkürztes Gesamtüberleben identifizieren kann. Eine mögliche Schlussfolgerung könnte sein, gerade die Patienten mit niedriger TS-Expression intensiviert vorzubehandeln, da sie vom Erreichen einer pCR profitieren könnten.

Nach prospektiver Validierung innerhalb randomisierter klinischer Studien könnte die TS zukünftig neben anderen Biomarkern erheblich zur Einschätzung des individuellen erkrankungsspezifischen Risikos beitragen.

#### 4.4 Therapiestratifizierung durch Untersuchung des TS-Genotyps

Einige Arbeitsgruppen verfolgen unter der pathophysiologischen Vorstellung, dass bei hohen intrazellulären TS-Leveln eine 5-FU-basierte Therapie nicht ausreichend wirken kann, den Ansatz pharmakogenetischer Untersuchungen zur Therapiestratifizierung (Dotor et al. 2006, Paez et al. 2010, Stoehmacher et al. 2008). Unter der Prämisse, dass die in Tumorzellen exprimierte TS genau wie in übrigen somatischen Zellen vom Genotyp abhängt, postulieren sie eine Stratifizierung von Patienten in *high-risk*- und *low-risk*-Patienten. Bei Untersuchungen dieser Art wird als pharmakogenetisch relevanter Polymorphismus häufig die Anzahl eines 28-bp-repeats im Bereich der TS Promotorregion bestimmt. Es konnte in verschiedenen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Wiederholungen dieser 28-bp-Sequenz und TS-Leveln auf Proteinebene gezeigt werden. In der kaukasischen Bevölkerung haben die Allele \*3/\*2, \*3/\*3 und \*2/\*2 die häufigste Inzidenz. So gibt es eine erste Phase-II-Studie von McLeod et al. (2009), in der Patienten mit dem Genotyp \*3/\*2 und \*2/\*2 (niedrige TS-Expression) gemäß ihrem niedrigeren Risikoprofil mit einer 5-FU-basierten RT/CTx behandelt wurden, während Patienten mit einem vermeintlich höheren Risiko durch Tragen des Alleles \*3/\*3 einer Therapieintensivierung durch Irinotecan zugeführt wurden. Durch diese Therapie wurden vergleichsweise hohe Raten an Komplettremissionen erreicht. Allerdings wurden lediglich die Endpunkte lokales Ansprechen und Toxizität untersucht. Zudem fand der histopathologisch festgestellte Nodalstatus keine Berücksichtigung, obwohl er nach wie vor der bedeutsamste Prognosefaktor hinsichtlich der Langzeitprognose ist. Es ist fraglich, ob die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten die Stratifizierung in unterschiedliche Therapiearme allein



aufgrund des Genotyps rechtfertigen. Zur Klärung dieser Frage gilt es, weitere Untersuchungen zur Genotypisierung des TS-Gens und dessen *prädiktiver/prognostischer* Bedeutung durchzuführen.

#### **4.5 Prognostische Bedeutung der TS-Expression aus dem residuellen Tumor**

Die Auswertungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass aus dem lokalen Ansprechen auf die neoadjuvante RT/CTx, mit Ausnahme der pCR, nicht direkt auf die langfristige Prognose geschlossen werden kann.

Vielmehr scheint sich aus verschiedenen Parametern wie dem Nodalstatus, der pCR und zukünftig möglicherweise weiteren molekularen Markern zum Zeitpunkt der R0-Resektion mit TME eine individuelle Risikostratifizierung für die adjuvante Situation und eine entsprechend angepasste Systemtherapie ableiten zu lassen.

Aus diesem Grund wurde ebenso die TS-Expression im residuellen Tumorgewebe aus dem Resektionspräparat bestimmt und auf ihre Bedeutung in Bezug auf die langfristige Prognose untersucht.

Für die TS-Expression im residuellen Tumor konnte gezeigt werden, dass - ebenso wie für TS-Expressionslevel aus prätherapeutischen Biopsien - niedrige TS-Expressionslevel mit einer schlechteren Prognose (verkürztes DFS) verbunden (Abbildung 19) sind.

Dies zeigt sich besonders deutlich nach Aufteilung der Patientenkohorten nach dem jeweiligen histopathologisch determinierten Nodalstatus: Es zeigt sich dabei erneut, dass der Lymphknotenstatus nach neoadjuvanter RT/CTx der wichtigste Prognosefaktor ist. Die nodal-negativen Patienten haben mit einer tumorfreien Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 80 % unabhängig von der TS-Expression nach drei Jahren einen guten Verlauf.

In der Gruppe von Patienten mit positivem (y)pN-Status kann mit Hilfe der TS-Expression eine Gruppe von Patienten mit besonders ungünstiger Prognose beschrieben werden.

Während Patienten bei positivem Nodalstatus und hoher TS-Expression einen vergleichbaren Verlauf zeigten wie die Patienten ohne LK-Beteiligung, hatten die Patienten mit befallenen LK und niedriger TS-Expression den schlechtesten Langzeit-Überlebensverlauf. Hieraus lässt sich ableiten, dass diese Patienten tatsächlich von einer Therapieintensivierung profitieren könnten, wenn man davon ausgeht, dass durch die Intensivierung der adjuvanten zytostatischen Systemtherapie eine Reduktion von im Verlauf auftretenden fernmetastatischen Rezidiven erreicht werden kann. Unter dieser Voraussetzung ließe sich ein mit einer Therapieintensivierung (z.B. Hinzunahme von Oxaliplatin) assoziiertes stärkeres Toxizitätsprofil gegenüber Patienten rechtfertigen.

#### 4.6 Intratumorale TS-Expressionsmuster unter intensivierter RT/CTx

Der Vergleich der TS-Expressionslevel aus residuellem Tumorgewebe von standardisiert behandelten Patienten (5-FU-Monotherapie) mit intratumoraler TS von Patienten nach intensivierter Vorbehandlung (plus Oxaliplatin) ergab keinen signifikanten Unterschied in der TS-Expressionstärke.

Ein sehr interessantes Ergebnis zeigte sich aber im Vergleich der beiden neoadjuvant behandelten Gruppen bei der Korrelation der TS-Expression im residuellen Tumor mit dem DFS (Abbildung 22): Hier fungiert TS nicht als Diskriminator!

Die Identifikation mittels TS-Expression einer Subgruppe von nodal-positiven Patienten mit dem kürzesten DFS gelingt bei Patienten nach neoadjuvanter RT/CTx mit 5-FU-Monotherapie und qualitätskontrollierter TME. Dies ist als eine der wesentlichen Aussagen der vorliegenden Arbeit zu sehen, lässt sich aber nach intensivierter Vorbehandlung nicht mehr darstellen. Stattdessen scheint der Verlauf nodal-positiver Patienten nach intensivierter Vorbehandlung mit einer Wahrscheinlichkeit für ein tumorfreies Überleben nach etwa 50 Monaten von 60 % insgesamt günstiger zu sein. Die Patientengruppen aufgeteilt nach TS-Expressionsprofil unterschieden sich dabei nicht hinsichtlich des DFS. Hier lässt sich spekulieren, dass die Patienten, die nach den im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen das kürzeste DFS haben, nämlich nodal-positive Patienten nach RT/CTx und niedriger TS-Expression im residuellen Tumor, von der Therapieintensivierung profitieren. So ließen sich durch diese einfache Analyse mit weiteren histopathologischen Tumormerkmalen Patienten stratifizieren, die tatsächlich von einer Therapieintensivierung profitieren könnten und für die das damit einhergehende Toxizitätsprofil zu rechtfertigen wäre. Einschränkend muss dabei angemerkt werden, dass diese Ergebnisse aus einer Subgruppe resultieren und sich aus diesen Fallzahlen (RT/CTx mit Oxaliplatin, ypN+, niedrige TS: n=19) natürlich noch keine allgemeinen Therapieempfehlungen ableiten lassen. Des Weiteren ist die Nachbeobachtungszeit in dieser Subgruppe im Median kürzer als beispielsweise in der Kontrollgruppe (Tabelle 5). Dennoch sollten diese vielversprechenden Ergebnisse in prospektiv randomisierten klinischen Studien unbedingt weiter untersucht werden.

Während bisherige Analysen zu divergenten Ergebnissen hinsichtlich des TS als Zielenzym einer 5-FU-basierten zytostatischen Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms kamen (Tabelle 9), zeigt die vorliegende Arbeit einen *prognostisch* ungünstigen Einfluss geringer intratumoraler TS-Expression sowohl in der prätherapeutischen Biopsie als auch aus dem residuellen Tumorgewebe.

Analysen zur Thymidylatsynthase als Biomarker in der Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms					
Autor	Fallzahl	Methode	Therapie	Untersuchte Endpunkte	Ergebnisse
Okonkwo et al. 2001	n = 25	IHC-Färbung; positive TS-Expression bei > 10 % intrazytoplasmatischer Anfärbung der Tumorzellen	45 Gy und 5-FU	Responder (pCR oder minimale Tumorreste in Mukosa oder Submukosa) vs. Nonresponder (Invasion bis in die Muscularis propria und/oder Lymphknotenmetastasen)	8 Karzinome mit positiver TS Färbung, davon ein Responder und 7 Nonresponder ohne statistische Signifikanz
Negri et al. 2008	n = 19	IHC Färbung mit Kategorisierung in hohes und niedriges TS-Expressionslevel nach visuellem Einteilungssystem: 0 and 1 = geringe Intensität 2 and 3 = hohe Intensität	40-45 Gy und 5-FU + Oxaliplatin	Responder (pCR oder residuelle Microfoci 0,3 bis 0,9 cm) vs. Nonresponder (große residuelle Karzinome) im Resektat	Patienten mit hoher TS-Expression hatten höhere Ansprechraten auf RT/CTx
Saw et al. 2003	n = 35	IHC Färbung, positive Färbung, wenn angefärbte Tumorzellen detektierbar waren	45-50.4 Gy und 5-FU/LV	TRG/OS/T-Stadium, Downstaging	Fehlende TS-Expression korrelierte mit fehlendem T-downsizing.
Bertolini et al. 2007	n = 91	IHC Färbung; positive Färbung wenn > 15 % der Tumorzellen TS Färbung zeigten	50.4 Gy und 5-FU	TRG, T-Level-Downsizing/OS	Keine statistisch signifikante Korrelation
Kikuchi et al. 2009	n = 60	Bewertung der TS-Färbung unter Berücksichtigung von Intensität und prozentualem Anteil gefärbter Tumorzellen in Tumorbiopsien.	45 Gy und S-1 (Tegafur mit Oteracil) und Irinotecan	TRG (nach Dworak)	Hohe TS-Level korrelierten mit Respons auf RT/CTx
Conradi et al. 2010	n = 212	IHC Färbung prätherapeutischer Biopsien und residuellen Tumorgewebes, Bewertung nach modifiziertem Remmele-Score.	Neoadjuvante RT/CTx mit 5-FU (n=168) sowie Oxaliplatin (n=64). Vergleichsgruppe (n=44) mit postoperativer RT/CTx (5-FU).	TRG, pCR Rate, DFS und OS	Korrelation niedriger TS-Expression in prätherapeutischer Biopsie mit verkürztem OS (p=0,012). Korrelation niedriger TS-Expression mit TRG (p=0,004). Korrelation niedriger TS im residuellen Tumor in nodal-positiven Patienten mit verkürztem DFS (p=0,008).

Tabelle 9: Bisherige Analysen zur Bedeutung der TS-Expression beim Rektumkarzinom

#### 4.7 Ableitungen für die klinische Praxis und Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen die prognostische Bedeutung der TS als Biomarker beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom im Stadium cUICC-II/III. Der immunhistochemische Befund der TS-Expression beim Rektumkarzinom ist sicherlich nicht allein ausreichend, um eine differenzierte Therapiestrategie beim Rektumkarzinom festzulegen, allerdings kann die TS als valider Biomarker zur Einschätzung des individuellen Rezidivrisikoprofils eines Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom beitragen.

In Kombination mit weiteren Parametern wie *prognostisch* bedeutsamen Stagingbefunden, den Ergebnissen der standardisierten histopathologischen Resektataufarbeitung sowie anderen tumorspezifischen Biomarkern mit pharmakogenetischen Eigenschaften kann gerade die TS-Expression zur Therapiestratifizierung im klinischen Alltag große Bedeutung erlangen.

Die Methodik des TS-Nachweises per Immunhistochemie hat sich in der vorliegenden Arbeit als geeignetes Verfahren herausgestellt, um auch in der Routinediagnostik Anwendung zu finden.

Zudem kann die genaue Kenntnis des Einflusses der TS auf das Tumorgeschehen (Tumoransprechen, Metastasierungstendenz) zur Etablierung eines Biomarkersets beitragen, auf dessen Grundlage neben einer Risikoabschätzung die Festlegung einer individuell angepassten zytostatischen Systemtherapie vorgenommen werden kann (Liersch et al. 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermutigen dazu, die TS als Biomarker in randomisierten klinischen Studien prospektiv zu validieren und ihren Stellenwert unter dem Fokus intensiverer multimodaler Therapieregime an einem größeren, unabhängigen Patientenkollektiv zu prüfen.

## 5 Zusammenfassung

Seit Einführung der neoadjuvanten Radiochemotherapie als Standard in der multimodalen Behandlung des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (im Stadium cUICC-II/III) konnte die Rate an lokoregionären Rezidiven signifikant gesenkt und das DFS verbessert werden.

In aktuell laufenden Studien wird durch Hinzunahme weiterer zytostatischer Substanzen der Versuch unternommen, die lokale Tumorkontrolle ebenso wie die langfristige Prognose der Patienten (DFS und OS) weiter zu verbessern. Dabei gehen grundsätzlich alle Strategien einer Therapieintensivierung auch mit einer Zunahme der Toxizität einher. Aus der Kenntnis eines sehr heterogenen Ansprechens auf die neoadjuvante RT/CTx, bleibt es dringlich zu klären, welche Patienten von der Therapie tatsächlich profitieren bzw. bei welchen Patienten eine Therapieintensivierung individuell sinnvoll und aus klinischer Sicht zu rechtfertigen ist. Um die schon lang geforderte individualisierte Therapie beim Rektumkarzinom zu realisieren, bleibt es, über die bekannten histopathologischen Prognoseparameter (TNM-Status) hinausgehend notwendig, Biomarker und/oder karzinomspezifische Gensignaturen zu kennen, die möglichst genau das individuelle Rezidivrisikoprofil eines Patienten bestimmen können.

Vor diesem Hintergrund ist die TS als zentraler Angriffspunkt des Antimetaboliten 5-FU - trotz aller Therapiemodifikationen die Basis der Radiochemotherapie - ein sehr vielversprechender Biomarker.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stellenwert des Biomarkers TS hinsichtlich einer *Responsprädiktion* und seiner *prognostischen* Bedeutung in Ergänzung zu den etablierten histomorphologischen TNM-Kriterien unter standardisierten Bedingungen zu überprüfen. Methodisch stellt dabei die Immunhistochemie eine vergleichsweise simple und kostengünstige Nachweismethode dar, um auch die flächendeckende Umsetzung in der klinischen Routine realisierbar zu machen.

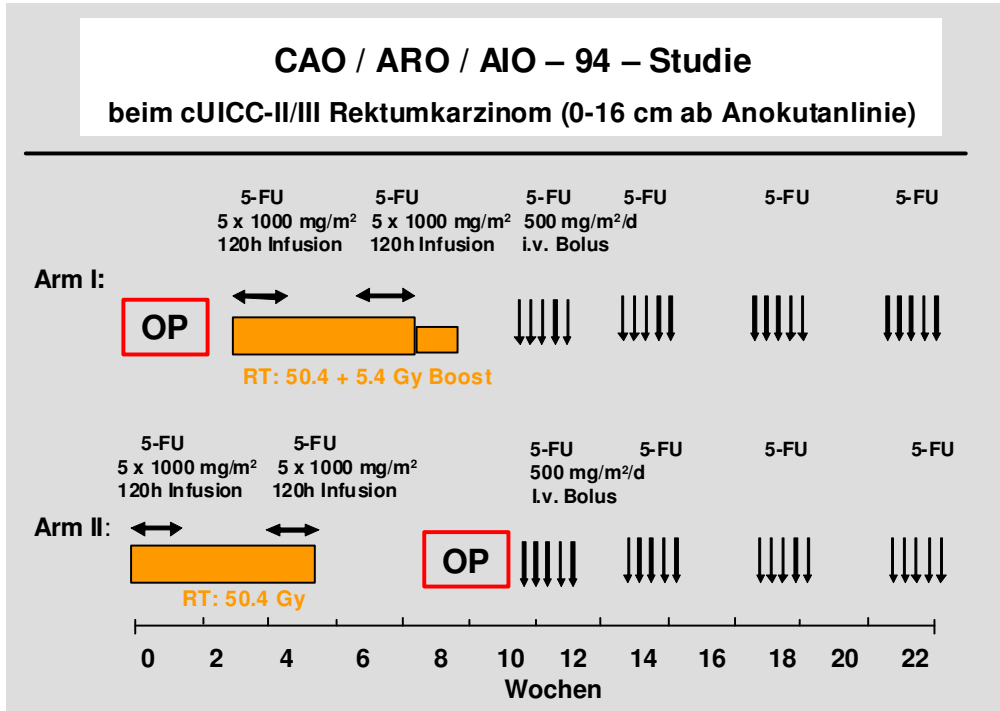
Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass eine geringe TS-Expression aus der prätherapeutischen Biopsie mit einem verkürzten OS korreliert ( $p=0,0151$ ). Weiterhin gelang es, mit der aus dem residuellen Tumorgewebe bestimmten TS-Expression unter Berücksichtigung des wichtigsten histopathologischen Prognoseindikators, des Nodalstatus, eine Subgruppe von Patienten mit besonders ungünstigem Krankheitsverlauf (gemessen am Auftreten von lokal- oder fernmetastatischen Rezidiven) anhand einer niedrigen TS-Expression zu identifizieren ( $p=0,0408$ ). Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass diese Patientensubgruppe tatsächlich von einer intensivierten adjuvanten Therapie (mit 5-FU und Oxaliplatin) profitieren könnten.

Aufgrund der vorliegenden Analyse ist die TS ein valider Biomarker, der nach Möglichkeit in Kombination mit weiteren Markern (z.B. der Apoptoseregulation) oder mit Indikatoren für eine Resistenzentwicklung (gegenüber z.B. Zytostatika) zur Therapieoptimierung/-individualisierung beitragen kann.

Nach prospektiver Revalidierung könnte das verwendete Nachweisverfahren für den Biomarker TS zukünftig zur Therapiestratifizierung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom unter Berücksichtigung individueller Rezidivrisikoprofile in die pathologischen Routinediagnostik implementiert werden.

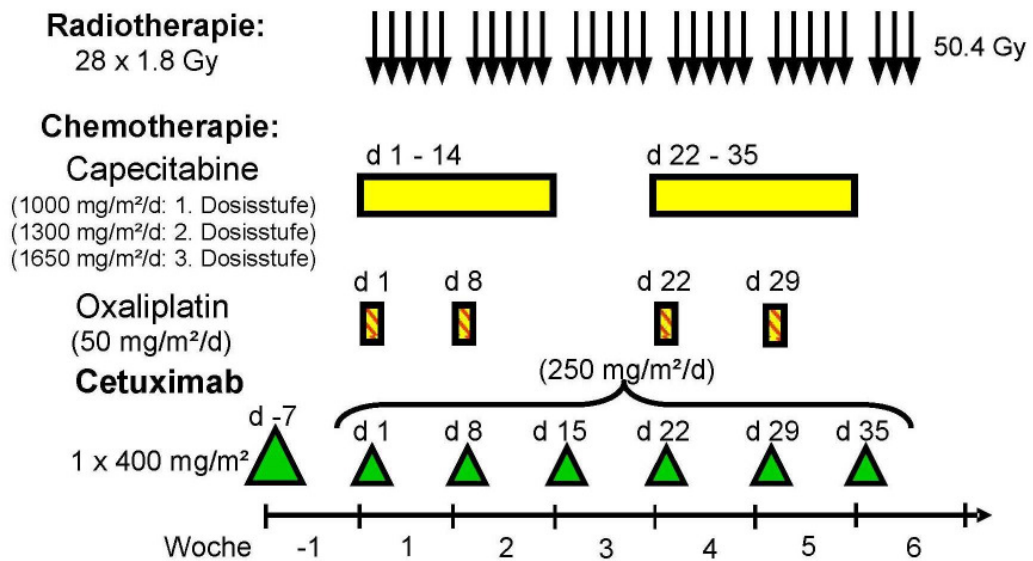
## 6 Anhang: Therapieschemata

### 1. CAO/ARO/AIO-94-Studie



### 2. CetCapOx-Studie

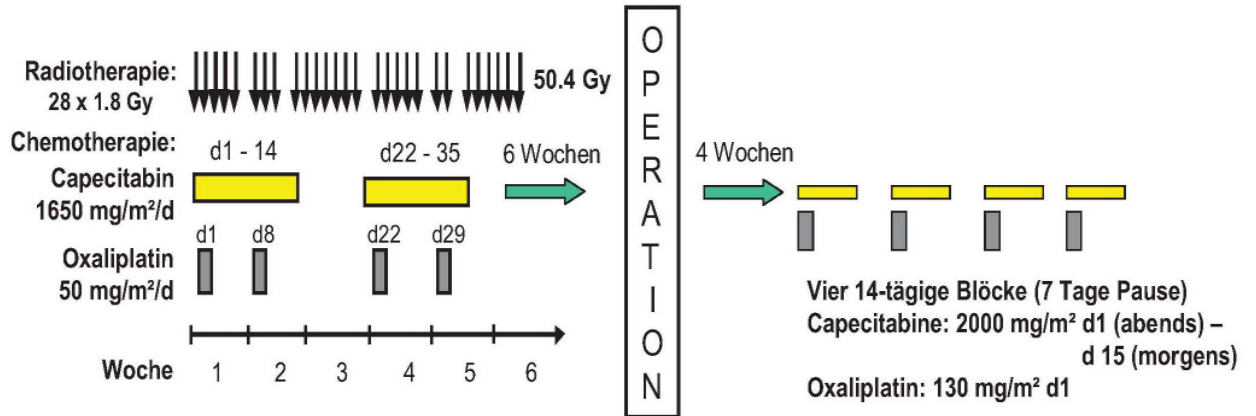
Studienschema





### 3. XelOx-Studie

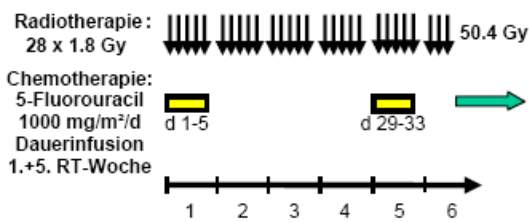
Studienübersicht:



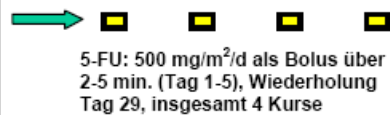
### 4. CAO/ARO/AIO-04

#### Studienschema

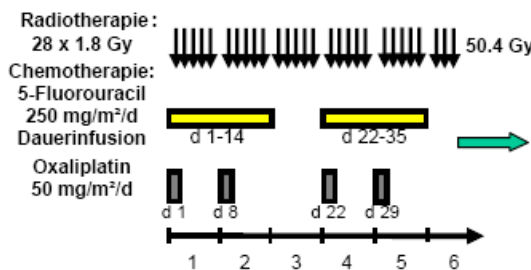
##### KONTROLL-ARM:



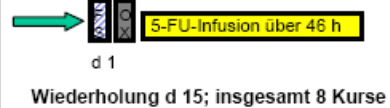
**OPERATION**



##### PRÜF-ARM:



**Folinsäure:** 400mg/m<sup>2</sup>; 2h-Infusion  
**Oxaliplatin:** 100mg/m<sup>2</sup>; 2h-Infusion  
**5-FU Infusion:** 2400 mg/m<sup>2</sup>; 46h-Infusion



## 7 Literaturverzeichnis

Aaltonen LA, Peltomaki P (1994): Genes involved in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 14, 1657-60.

Adam IJ, Mohamdee MO, Martin IG, Scott N, Finan PJ, Johnston D, Dixon MF, Quirke P (1994): Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet* 344, 707-11.

Aschele C, Sobrero A, Faderan MA, Bertino JR (1992): Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules. *Cancer Res* 52, 1855-64.

Aschele C, Friso ML, Pucciarelli S, Lonardi S, Sartor L, Fabris G, Urso ED, Del Bianco P, Sotti G, Lise M et al. (2005): A phase I-II study of weekly oxaliplatin, 5-fluorouracil continuous infusion and preoperative radiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol* 16, 1140-6.

Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, Milano G (1994): A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 30A, 1517-22.

Becker H, Liersch T: *Viszeralchirurgie*, 2. Auflage, Urban & Fischer München 2006, 601-631.

Benson AB, 3rd, Desch CE, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD, Petrelli NJ, Pfister DG, Smith TJ, Somerfield MR (2000): 2000 update of American Society of Clinical Oncology colorectal cancer surveillance guidelines. *J Clin Oncol* 18, 3586-8.

Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Iachetta F, Dealis C, Jovic G, Depenni R, Zironi S, Falchi AM et al. (2007): Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68, 1455-61.

Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons W, Dixon MF, Mapstone NP, Abbott CR, Scott N, Finan PJ, Johnston D et al. (2002): Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg* 235, 449-57.

Brierley JD, Greene FL, Sobin LH, Wittekind C (2006): The "y" symbol: an important classification tool for neoadjuvant cancer treatment. *Cancer* 106, 2526-7.

Bujko K, Glynn-Jones R, Bujko M (2010): Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials. *Ann Oncol.* 21, 1743-50.

Burnett AK, Knapper S: Targeting treatment in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, Washington 2007, 429-34 (URL: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org>; Stand: 23.06.2010).

Chapuis P, Bokey L, Fahrner M, Sinclair G, Bogduk N (2002): Mobilization of the rectum: anatomic concepts and the bookshelf revisited. *Dis Colon Rectum* 45, 1-8; discussion 8-9.

Chua YJ, Barbachano Y, Cunningham D, Oates JR, Brown G, Wotherspoon A, Tait D, Massey A, Tebbutt NC, Chau I (2010): Neoadjuvant capecitabine and oxaliplatin before chemoradiotherapy and total mesorectal excision in MRI-defined poor-risk rectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol* 11, 241-8.

Compton CC (2002): Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2, 149-60.

Crapp AR, Cuthbertson AM (1974): William Waldeyer and the rectosacral fascia. *Surg Gynecol Obstet* 138, 252-6.

Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guino E, Pareja L, Figueras A, Mollevi DG, Serrano T et al. (2006): Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 24, 1603-11.

Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997): Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 12, 19-23.

Enker WE (1997): Total mesorectal excision--the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Ann Med* 29, 127-33.

Fernandez-Martos C, Pericay C, Aparicio J, Salud A, Safont M, Massuti B, Vera R, Escudero P, Maurel J, Marcuello E et al. (2010): Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol* 28, 859-65.

Fey M, Dreyling M (2009): Acute myeloblastic leukemia in adult patients: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 100-1.

Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6, 325-44.

Gavioli M, Bagni A, Piccagli I, Fundaro S, Natalini G (2000): Usefulness of endorectal ultrasound after preoperative radiotherapy in rectal cancer: comparison between sonographic and histopathologic changes. *Dis Colon Rectum* 43, 1075-83.

Gérard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, Vendrely V, Francois E, de La Roche G, Bouche O et al. (2010): Comparison of two neoadjuvant

chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. J Clin Oncol 28, 1638-44.

GITSG (1992): Radiation therapy and fluorouracil with or without semustine for the treatment of patients with surgical adjuvant adenocarcinoma of the rectum. Gastrointestinal Tumor Study Group. J Clin Oncol 10, 549-57.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2009): Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol 20, 1319-29.

Goldstein NS, Sanford W, Coffey M, Layfield LJ (1996): Lymph node recovery from colorectal resection specimens removed for adenocarcinoma. Trends over time and a recommendation for a minimum number of lymph nodes to be recovered. Am J Clin Pathol 106, 209-16.

Haqqani AS, Cowling RT, Maroun JA, Birnboim HC (1999): Characterization of a polyclonal antibody to human thymidylate synthase suitable for the study of colorectal cancer specimens. J Histochem Cytochem 47, 1563-74.

Heald RJ, Husband EM, Ryall RD (1982): The mesorectum in rectal cancer surgery - the clue to pelvic recurrence? Br J Surg 69, 613-6.

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J (1957): Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. Nature 179, 663-6.

Hermanek P (1995): pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. World J Surg 19, 184-90.

Hermanek P, Hermanek P, Hohenberger W, Klimpfinger M, Kockerling F, Papadopoulos T (2003): The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. Int J Colorectal Dis 18, 335-41.

Hermanek P, Jr., Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P (1994): [Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group]. *Chirurg* 65, 287-97.

Ichikawa W, Uetake H, Shiota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, Sugihara K, Hirayama R (2003): Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9, 786-91.

Jakob C, Aust DE, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Becker H, Liersch T (2004): Thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase expression, and histological tumour regression after 5-FU-based neo-adjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *J Pathol* 204, 562-8.

Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Hausler P, Schwabe W, Becker H, Aust DE (2005): Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III): correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil-based long-term neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 29, 1304-9.

Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Kulle B, Becker H, Aust DE (2006): Prognostic value of histologic tumor regression, thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer UICC Stage II/III after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 30, 1169-74.

Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE (2008): Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 14, 1060-6.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009): Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-49.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L (1995): Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55, 1407-12.

Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M: *Klassifikation maligner Tumore des Gastrointestinaltrakts*. 1. Auflage, Springer, Heidelberg 2002, 211-273.

Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH et al. (2001): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 345, 638-46.

Keller R, Bruch H-P, Czymek R (2008): Kolonkarzinom. *Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date* 6, 406-426.

Kikuchi M, Mikami T, Sato T, Tokuyama W, Araki K, Watanabe M, Saigenji K, Okayasu I (2009): High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction. *Br J Cancer* 101, 116-23.

Knudson AG, Jr. (1970): Genetics and cancer. *Postgrad Med* 48, 70-4.

Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL (2009): Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74, 673-88.

Kusters M, Marijnen CA, van de Velde CJ, Rutten HJ, Lahaye MJ, Kim JH, Beets-Tan RG, Beets GL (2010): Patterns of local recurrence in rectal cancer; a study of the Dutch TME trial. *Eur J Surg Oncol*.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1998): Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin 48, 6-29.

Langer C, Liersch T, Suss M, Siemer A, Markus P, Ghadimi BM, Fuzesi L, Becker H (2003): Surgical cure for early rectal carcinoma and large adenoma: transanal endoscopic microsurgery (using ultrasound or electro-surgery) compared to conventional local and radical resection. Int J Colorectal Dis 18, 222-9.

Leibl S, Tsybrovskyy O, Denk H (2003): How many lymph nodes are necessary to stage early and advanced adenocarcinoma of the sigmoid colon and upper rectum? Virchows Arch 443, 133-8.

Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV (1997): Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. J Clin Oncol 15, 3223-9.

Liersch T, Langer C, Jakob C, Müller D, Ghadimi BM, Siemer A, Markus PM, Füzesi L, Becker H (2003): Präoperative Diagnostik beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom ( $\geq T3$  oder N+): Was leistet die Endosonographie gegenüber der Computertomographie im Staging und Restaging (nach neoadjuvanter Radio-/Chemotherapie)? [Preoperative diagnostic procedures in locally advanced rectal carcinoma ( $\geq T3$  oder N+): What does endoluminal ultrasound achieve at staging and restaging (after neoadjuvant radiochemotherapy) in contrast to computed tomography?] Chirurg 74, 224-234.

Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Becker H (2005): Aktuelle Behandlungsstrategien beim Rektumkarzinom. [Present treatment strategies for rectal carcinoma]. Chirurg 76, 309-334.

Liersch T, Langer C, Ghadimi B, Rothe H, Hess C, Becker H (2006a): Technik der mesorektalen Exzision beim Rektumkarzinom - immer noch ein aktuelles Thema? [Technique of mesorectal excision in rectal cancer - still a hot subject?]. Viszeralchirurgie 41, 313-323.



Liersch T, Rothe H, Langer C, Becker H (2006b): Chirurgische und pathologische Qualitätssicherung beim Rektumkarzinom - eine besondere Herausforderung mit Einfluss auf die Therapie? [Surgical and pathological quality assurance in rectal cancer - a particular challenge with impact on therapy?]. *Viszeralchirurgie* 41, 324-332.

Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Kulle B, Aust DE, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Becker H, Jakob C (2006c): Lymph node status and TS gene expression are prognostic markers in stage II/III rectal cancer after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 24, 4062-8.

Liersch T, Becker H, Langer C (2007a): Rektumkarzinom. *Allgemein- und Viszeralchirurgie* up2date 1, 41-72.

Liersch T, Rothe H, Rödel C, Ghadimi B, Becker H, Langer C (2007b): Chirurgie des Rektumkarzinoms - Qualitätssicherung. [Surgery of rectal cancer. Quality management.]. *Viszeralchirurgie* 42, 66-72.

Liersch T, Rothe H, Ghadimi BM, Becker H (2009): Individualizing treatment for locally advanced rectal cancer. *Chirurg* 80, 281-93.

Liersch T, Gaedcke J, Grade M, Sprenger T, Conradi L, Becker H, Ghadimi BM (2010): Molekulare Marker zur Responseprädiktion beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom. Kommt die Individualisierung der Therapie? *Der Onkologe* 16 779-788.

Link KH, Kornmann M, Bittner R, Köckerling F, Arbogast R, Gastinger I, Heltland W, Henne-Bruns D, Lang H, Lippert H, Mann M, Meyer HJ, Polonius MJ, Post S, Raab R, Schiedeck T, Schumpelick V (2010): Qualitätsanforderungen zur Behandlung des Kolon- und Rektumkarzinoms [Quality criteria for treatment of colorectal cancer. From a surgeon's viewpoint]. *Chirurg* 81, 222-230.

Lou Z, Zhang W, Mei ZB, Wang LL, Ji QF, Meng RG, Fu CG (2010): [Integrity evaluation of resected mesentery specimen after total mesorectal excision by methylene blue perfusion via superior rectal artery.]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi 13, 148-50.

Maslekar S, Sharma A, Macdonald A, Gunn J, Monson JR, Hartley JE (2007): Mesorectal grades predict recurrences after curative resection for rectal cancer. Dis Colon Rectum 50, 168-75.

McLeod HL, Myerson RJ, Zehnbauser B, Trinkaus K, Malyapa RS, Mutch MG, Abbey EE, Alyasiry A, Fleshman JW, Tan BR (2009): *TYMS* genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. J Clin Oncol 27:15s, (suppl; abstr 4028).

M.E.R.C.U.R.Y.: M.E.R.C.U.R.Y. Project (Magnetic Resonance Imaging and Rectal Cancer European Equivalence Study) Study Protocol (Study Coordinator I. Daniels, FRCS, Pelican Centre, North Hampshire Hospital, Basingstoke, Hampshire, UK, 2002.

Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV (1998): High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. Clin Cancer Res 4, 2371-6.

Midgley R, Kerr D (1999): Colorectal cancer. Lancet 353, 391-9.

Minoo P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A (2010): Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. Int J Oncol 37, 707-18.

Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, Kelsen DP, Reichman B, Saltz L, Sigurdson ER, Frankel J (1992): Enhancement of radiation-induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. J Clin Oncol 10, 79-84.

Moertel CG (1994): Chemotherapy for colorectal cancer. N Engl J Med 330, 1136-42.

Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-70.

Nagtegaal ID, van Krieken JH (2007): The multidisciplinary treatment of rectal cancer: pathology. *Ann Oncol* 18 Suppl 9, ix122-6.

Negri FV, Campanini N, Camisa R, Pucci F, Bui S, Ceccon G, Martinelli R, Fumagalli M, Losardo PL, Crafa P et al. (2008): Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer* 98, 143-7.

O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Gunderson LL, Rich TA (1994): Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 331, 502-7.

Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M, Benson A, 3rd, Small W, Jr., Stryker SJ, Rao MS (2001): Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep* 8, 497-500.

Paez D, Pare L, Altes A, Sancho-Poch FJ, Petriz L, Garriga J, Monill JM, Salazar J, Rio ED, Barnadas A et al. (2010): Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print].

Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, Rutten H, Pahlman L, Glimelius B, Leer JW et al. (2007): 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* 246, 693-701.

Peters GJ, Laurensse E, Leyva A, Pinedo HM (1987): Purine nucleosides as cell-specific modulators of 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23, 1869-81.

Pinedo HM, Peters GF (1988): Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6, 1653-64.

Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Hearle N, Chandler I, Shao Y, Aherne W, Houlston R (2006): A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer. *Ann Oncol.* 17:1810-7.

Quirke P, Dixon MF (1988): The prediction of local recurrence in rectal adenocarcinoma by histopathological examination. *Int J Colorectal Dis* 3, 127-31.

Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS (1986): Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 2, 996-9.

R Development Core Team (2010): R: Language and Environment for Statistical Computing. URL: <http://www.r-project.org/> (Stand 25.05.2010)

Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vecchio FM, Doglietto GB, Crucitti F (1999): Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. *Dis Colon Rectum* 42, 143-54; discussion 154-8.

Remmele W, Stegner HE (1987): [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8, 138-40.

Robert Koch Inskitut (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin 2010, 36-39.

- Rödel C (2010): Radiotherapy: Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 129-30.
- Rödel C, Sauer R (2007): Integration of novel agents into combined-modality treatment for rectal cancer patients. *Strahlenther Onkol* 183, 227-35.
- Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfing M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R et al. (2005): Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 8688-96.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB et al. (2000): Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6, 1322-7.
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351, 1731-40.
- Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, Clarke S, Chapuis P, Solomon MJ (2003): p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 46, 192-202.
- Schmiegel W, Pox C, Adler G, Fleig W, Folsch UR, Fruhmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Kuhlbacher T et al. (2005): [S3-guideline conference "Colorectal Cancer" 2004]. *Dtsch Med Wochenschr* 130 Suppl 1, S5-53.
- Sebag-Montefiore D (2006): Developments in the use of chemoradiotherapy in rectal cancer. *Colorectal Dis* 8 Suppl 3, 14-7.

Seidensticker P, Schmiegel W (1998): [Colorectal carcinoma. Prevention and early detection]. Internist (Berl) 39, W509-18.

Simons CC, Leurs LJ, Weijenberg MP, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2010): Fluid intake and colorectal cancer risk in the Netherlands cohort study. Nutr Cancer 62, 307-21.

Sobin LH (2003): TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. Semin Surg Oncol 21, 19-22.

Sobin LH, Fleming ID (1997): TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer 80, 1803-4.

Sprenger T, Rothe H, Langer C, Becker H, Liersch T (2009a): Comment on "lymph nodes after preoperative chemoradiotherapy for rectal carcinoma: number, status, and impact on survival". Am J Surg Pathol 33, 1107; author reply 1108.

Sprenger T, Rothe H, Homayounfar K, Beissbarth T, Ghadimi BM, Becker H, Liersch T (2009b): Preoperative chemoradiotherapy does not necessarily reduce lymph node retrieval in rectal cancer specimens--results from a prospective evaluation with extensive pathological work-up. J Gastrointest Surg 14, 96-103.

Sterk P, Kasperk R, Opitz T, Schubert F, Klein P (2000): Vascular organization in the mesorectum: angiography of rectal resection specimens. Int J Colorectal Dis 15, 225-8.

Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, Aust DE, Kramer M, Baretton GB, Liersch T, Ehninger G, Jakob C (2008): Thymidylate synthase genotypes and tumour regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. Cancer Lett 272, 221-5.

Syk E, Torkzad MR, Blomqvist L, Ljungqvist O, Glimelius B (2006): Radiological findings do not support lateral residual tumour as a major cause of local recurrence of rectal cancer. *Br J Surg* 93, 113-9.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-32.

Wibe A, Moller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, Langmark F, Myrvold HE, Soreide O (2002): A national strategic change in treatment policy for rectal cancer--implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum* 45, 857-66.

Wittekind CM, Meyer H.-J.: *TNM Klassifikation maligner Tumore*, 7. Auflage Wiley-Blackwell, Weinheim 2010, 94-99.

Wittekind C, Tannapfel A (2003): Regression grading of colorectal carcinoma after preoperative radiochemotherapy. An inventory. *Pathologe* 24, 61-5.

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002): TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511-6.

Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS (1999): Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 17, 2896-900.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Torsten Liersch! Durch sein großartiges Engagement hat er mich nicht nur für das Fach der Allgemein- und Viszeralchirurgie begeistert, sondern vor allem auch zu der vorliegenden Dissertation ermutigt und die Fertigstellung begleitet.

Birgit Jünemann bin ich zu großem Dank verpflichtet für Ihre Unterstützung im Labor und Ihrer große Expertise auf dem Gebiet der Immunhistochemie und der Anfertigung exzellenter Paraffinschnitte!

Ohne Prof. Dr. Tim Beissbarth und seine unermüdliche Geduld und Bereitschaft mich bei den statistischen Berechnungen zu unterstützen, hätten die Analysen nicht den jetzt vorliegenden Umfang annehmen können – dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Ebenso hat auch Dr. med. Annalen Bleckmann das Vorankommen des Projektes nicht nur in Statistikfragen entscheidend unterstützt.

Nicht vergessen möchte ich Herrn Roland Kaliwe für seine Leidenschaft zu den Bienen und seinen entscheidenden Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit zu danken.

Und schließlich danke ich allen die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und ermutigt haben, im Besonderen auch denjenigen, die das Manuskript mehrfach Korrektur gelesen haben, vor allem meiner Großmutter Dr. Margret Conradi, Dr. Björn Mittag sowie Dres. Christian und Johannes Pfeil.

Für einen außergewöhnlichen IT-support während der Erstellung und Formatierung der Promotion danke ich Tobias Gohla.