

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

(Prof. Dr. M. Ghadimi)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Her2/neu
in Rektumkarzinomen des lokal fortgeschrittenen Stadiums
UICC II / III**

Validierung an Patienten der Phase-III-Studien der German Rectal Cancer Study Group

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

vorgelegt von

Marcus Werner Storch

aus

Hoyerswerda

Göttingen 2016

D e k a n:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. T. Liersch

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. Peter Burfeind

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

28.09.2016

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX

Inhalt

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms (KRK)	1
1.2	Früherkennung des KRK	2
1.3	Die „Adenom-Karzinom-Sequenz“	2
1.4	Ätiopathogenese des Rektumkarzinoms	3
1.5	Anatomie des Rektums und Metastasierungsmuster des Karzinoms	4
1.6	Aktuelle Therapierichtlinien	6
1.6.1	Prätherapeutische Diagnostik	6
1.6.2	(neoadjuvante / adjuvante) (Radio-)Chemotherapie	7
1.6.3	Toxizitäts-Scoring	10
1.6.4	Tumorregression	10
1.6.5	Operative Strategien	12
1.6.6	Rektumresektion und partielle / totale mesorektale Exzision (PME / TME)	12
1.7	Perioperatives Qualitätsmanagement	13
1.8	<i>Follow-Up</i> und <i>Outcome</i>	14
1.9	Der Her2/neu-Rezeptor	15
1.9.1	Intrazelluläre Vernetzung von Her2/neu	15
1.9.2	Her2/neu in Mamma-, Magen- und Rektumkarzinomen	17
1.10	Zielsetzung und Fragestellung	19

2.	Patientenkollektiv und Methoden	20
2.1	Das Patientenkollektiv	20
2.1.1	Die CAO/ARO/AIO-94-Studie.....	20
2.1.2	Die CAO/ARO/AIO-04-Studie.....	23
2.1.3	Ein-/Ausschlusskriterien	25
2.2	Klassifikation	26
2.2.1	Die TNM-Klassifikation	27
2.2.2	Die UICC-Klassifikation.....	28
2.3	Material und Methoden	29
2.3.1	Das untersuchte Material der CAO-94-Studie.....	32
2.3.2	Das untersuchte Material der CAO-04-Studie.....	32
2.3.3	Immunhistochemie.....	32
2.3.4	Her2/neu-spezifische Immunhistochemie	33
2.3.5	Anfertigung der histologischen Schnitte	34
2.3.6	Färbung und Fertigstellung.....	34
2.3.7	IHC-Auswertung.....	35
2.3.8	Prinzip der In-situ-Hybridisierung (ISH)	38
2.3.9	DISH-Färbeprotokoll	39
2.3.10	DISH-Auswertung.....	40
2.4	Statistische Auswertung.....	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Das analysierte Kollektiv	44
3.2	Histopathologisches Tumorstaging	47
3.3	Her2-Expressionsmuster	48
3.4	Korrelation des Her2-Statuses mit klinikopathologischen Parametern	50

3.5	Korrelation des Therapieregimes mit klinikopathologischen Parametern	53
3.6	Klinischer Langzeitverlauf	54
4.	Diskussion	58
4.1	Her2/neu im Rektumkarzinom	58
4.2	Her2/neu - Interaktionen	60
4.3	Her2/neu als Biomarker	61
4.4	Her2/neu – Diagnostik	62
4.5	Prognostische Relevanz einer Her2-Überexpression.....	63
5.	Zusammenfassung	66
6.	Anhang	68
6.1	Beispiele zum Toxizitäts-Scoring.....	68
6.2	Kooperation mit den Zentren der CAO-94.....	68
6.3	Kooperation mit den Zentren der CAO-04.....	69
7.	Literaturverzeichnis.....	71

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
adj.	adjuvant
APC	adenomatöse Polyposis Coli (Tumorsuppressorgen)
APE	OP-Technik: abdominoperineale Rektumexstirpation
APR	OP-Technik: intersphinktere abdominoperineale Rektumresektion
ARR	OP-Technik: anteriore Rektumresektion
ASCO	American Society of Clinical Oncology
c/pCR	clinical / pathological complete remission
CAO/ARO/AIO	Kooperative Studien der Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie, Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie und Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
CAP	College of American Pathologists
CC1	cell conditioner 1
CEA	carcinoembryonal antigen (Tumormarker)
Chr17Z	Chromosom-17-Zentromer
CRM	circumferential resection margin
CSS	cancer specific survival
CT	Computertomographie / -tomogramm
CTC	common toxicity criteria
cTNM	TNM-Klassifikation nach klinischen Stagingergebnissen
DAB	Diaminobenzidin
DFS	disease free survival
DNA / RNA	Desoxy-/ Ribonukleinsäure
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FDG-PET-CT	18F – Fluorodeoxyglukose – Positronenemissionstomographie - Computertomographie – Untersuchung
FOBT	faecal occult blood test
GRCSG	German Rectal Cancer Study Group

Gy	Gray - Einheit der Strahlendosis
Her / ErbB (1-4)	human epidermal growth factor receptor 1-4
HNPC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HRP(-SA)	Horseradish/Peroxidase (-gekoppelte Sekundärantikörper)
IHC	Immunhistochemie
(D/F)ISH	(Dual/Fluoreszenz) In-Situ-Hybridisierung
KFO-179	Klinische Forschergruppe Onkologie 179
KOF	Körperoberfläche
KRK	kolorektales Karzinom
MRT	Magnetresonanztomographie / -tomogramm
neoadj.	neoadjuvant
NSCLC	non-small cell lung cancer
OS	overall survival
PCR	polymerase chain reaction
PME	OP-Technik: partielle mesorektale Resektion
(y)pTNM	TNM-Klassifikation nach pathologischer Aufarbeitung (nach neoadjuvanter Vorbehandlung)
RCT	Radiochemotherapie
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
RKI	Robert Koch-Institut
TARR	OP-Technik: tiefe anteriore Rektumresektion
TEM	OP-Technik: transanale endoskopisch-mikrochirurgische Abtragung
TME	OP-Technik: totale mesorektale Resektion
TNM	Klassifikationssystem maligner Tumore
ToGA	Trastuzumab for gastric cancer (Studie)
TRG	Tumorregressionsgrad
TTR	time to recurrence
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ des KRK.....	3
Abbildung 2: Anatomische Einteilung des Rektums	4
Abbildung 3: Regressionsgrading nach Dworak.....	11
Abbildung 4: Regressionsgrading modifiziert nach Liersch et al. 2005	11
Abbildung 5: Teilhabende Zentren der CAO-94-Studie.....	21
Abbildung 6: Teilhabende Zentren der CAO-04-Studie.....	24
Abbildung 7: Prinzipielle Therapieschemata der CAO94 und CAO04	25
Abbildung 8: UICC-Klassifizierung nach TNM-Stadien	29
Abbildung 9: Kombiniertes Consort-Diagramm der CAO/ARO/AIO-Trials -94 & -04.....	30
Abbildung 10: Mikroskopische IHC-Klassifikation (Objektivregel nach Rüschoff)	37
Abbildung 11: Entscheidungsbaum zur DISH-Auswertung	40
Abbildung 12: ISH-Mikroskopie.....	42
Abbildung 13: Her2-Status in Rektumkarzinomresektaten	49
Abbildung 14: Her2-Status nach (y)pUICC	51
Abbildung 15: Her2-Status nach ypUICC.....	51
Abbildung 16: Her2-Status nach pUICC.....	52
Abbildung 17: TTR und CSS gesamt.....	55
Abbildung 18: TTR und CSS des nicht vorbehandelten Kollektivs.....	55
Abbildung 19: TTR und CSS des mit 5-FU vorbehandelten Kollektivs.....	56
Abbildung 20: TTR und CSS des mit 5-FU und Oxaliplatin vorbehandelten Kollektivs	57
Abbildung 21: TTR und CSS der verschiedenen Therapiearme kombiniert.....	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Subgruppen der Studien: prä- und postoperative Parameter 1	46
Tabelle 2: Die Subgruppen der Studien: prä- und postoperative Parameter 2	47
Tabelle 3: Die Subgruppen der Studien: Positivitätsraten der Her2-Expression	48

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms (KRK)

Mit 30.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei Frauen und 35.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei Männern ist das KRK das zweithäufigste Tumorleiden und auch die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut 2012). Etwa 14.000 Männer und Frauen sterben jeweils in Folge dieser malignen Darmtumoren jährlich, was einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 60 % bei Diagnosestellung zwischen den Jahren 2000 und 2004 entspricht. Die 5-Jahresprävalenz zeigt sich zunehmend bei für das Jahr 2004 vorliegenden Zahlen von 113.000 Frauen und 114.000 Männern (Robert Koch-Institut 2012).

Das KRK ist ein Tumor des höheren Lebensalters, wobei die Wahrscheinlichkeit zu erkranken ab dem 50. Lebensjahr deutlich zunimmt. Der Neuerkrankungsgipfel liegt um das 85. Lebensjahr bei Frauen, bei Männern zwischen dem 80. und 84. Lebensjahr.

Die 1-, 5- und 10- Jahresprävalenzen steigen bei Frauen kontinuierlich bis über das 80. Lebensjahr hinaus an, wobei bei Männern der Gipfel zwischen dem 60. und 69. Lebensjahr liegt und danach wieder abfällt (Robert Koch-Institut 2012).

Das Rektumkarzinom wurde lange Zeit nicht als eigene Entität betrachtet, sondern mit den malignen Tumoren des Kolons zu der Gruppe der kolorektalen Karzinome (KRK) zusammengefasst, mittlerweile unterscheiden sich aber die etablierten therapeutischen Optionen. Das Rektumkarzinom gilt als solches, solange der aborale Tumorbeginn in der starren Rektoskopie bei weniger oder gleich 16 cm vom anokutanen Übergang entfernt liegt (Schmiegel et al. 2005). Über 16 cm hinaus gelten die Tumoren als Kolonkarzinom.

1.2 Früherkennung des KRK

Die Früherkennung maligner Neoplasien ist einer der wichtigsten Faktoren, um eine Therapie mit kurativem Ansatz zu ermöglichen. Dementsprechend wird entsprechend zum Inzidenzanstieg des KRK ab dem 50. Lebensjahr die Vorsorge gesetzlich unterstützt. Versicherte zwischen 50 und 54 Jahren haben Anspruch auf ärztliche Beratung sowie einen jährlichen Stuhltest auf okkultes Blut (FOB-Test). Laut der Deutschen Krebshilfe fallen bis zu 25 % der Darmtumoren hierdurch auf. Ab dem 55. Lebensjahr stehen Frauen und Männern eine Koloskopie und bei unauffälligem Befund Folgekoloskopien nach 10 Jahren zu. Alternativ werden von den gesetzlichen Krankenkassen jährlich Stuhltests auf okkultes Blut angeboten. In jedem Fall ist aber die Koloskopie der Sigmoidoskopie und diese dem FOB-Test überlegen (Geißler und Graeven 2005; Schmiegel et al. 2010).

Die Darmspiegelung weist die höchste Sensitivität und Spezifität zur Früherkennung des Darmkrebses auf und ist als Standardverfahren zur Detektion kolorektaler Polypen und Karzinome etabliert (Schmiegel et al. 2008). Bei der Darmspiegelung sollten Polypen grundsätzlich in toto entfernt werden, da diese auch bei gutartiger Dignität mit der Zeit entarten können (siehe Kapitel 1.3). Je nach endoskopischem und histologischem Befund sind dann Folgekoloskopien in zeitlich verschiedenen Abständen zwischen 6 Monaten und 5 Jahren indiziert (Schmiegel et al. 2008). Auch hier verdeutlicht sich die Überlegenheit der Koloskopie gegenüber den anderen Screeningverfahren, da gezeigt werden konnte, dass die Inzidenz von malignen Tumoren allein durch koloskopische Polypektomie um 66-90 % gesenkt werden konnte (Winawer et al. 1993; Citarda et al. 2001).

1.3 Die „Adenom-Karzinom-Sequenz“

Die WHO definiert das Adenom als meist sporadisch entstehende „benigne Neoplasie des Drüsenepithels mit Dysplasien verschiedenen Grades“. Es wird eine Häufigkeit von 50-60 % in der Allgemeinbevölkerung angenommen mit einem Gipfel im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Adenome sind intraepitheliale Neoplasien mit verschiedenen Dysplasiegraden. Dabei gilt es die verschiedenen Typen des tubulären (bis 85 %), tubulo-villösen (bis 27 %) und villösen (bis

9 %) Adenoms zu unterscheiden, in ca. einem Viertel der Fälle treten sie multipel auf. Adenome können maligne entarten und stellen damit fakultative Präkanzerosen dar. Einflussfaktoren auf das Entartungsrisiko bestehen in der Adenomgröße, Entdifferenzierungsgrad, Dysplasiegrad und Wuchsform. Das Risiko, das sich aus der Wuchsform ergibt, ist bei den breitbasig aufsitzenden Adenomen größer als bei den gestielten (Böcker et al. 2004). Man geht davon aus, dass bei der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ das Tumorprogressionsmodell im Sinne der Anhäufung diverser gentischer Veränderungen über die Zeit ursächlich für die Karzinomentstehung ist (Vogelstein et al. 1988). In Abbildung 1 sei die Sequenz für das KRK schematisch dargestellt, wobei noch nicht alle Faktoren bekannt sind, die letztendlich zum Karzinom führen.

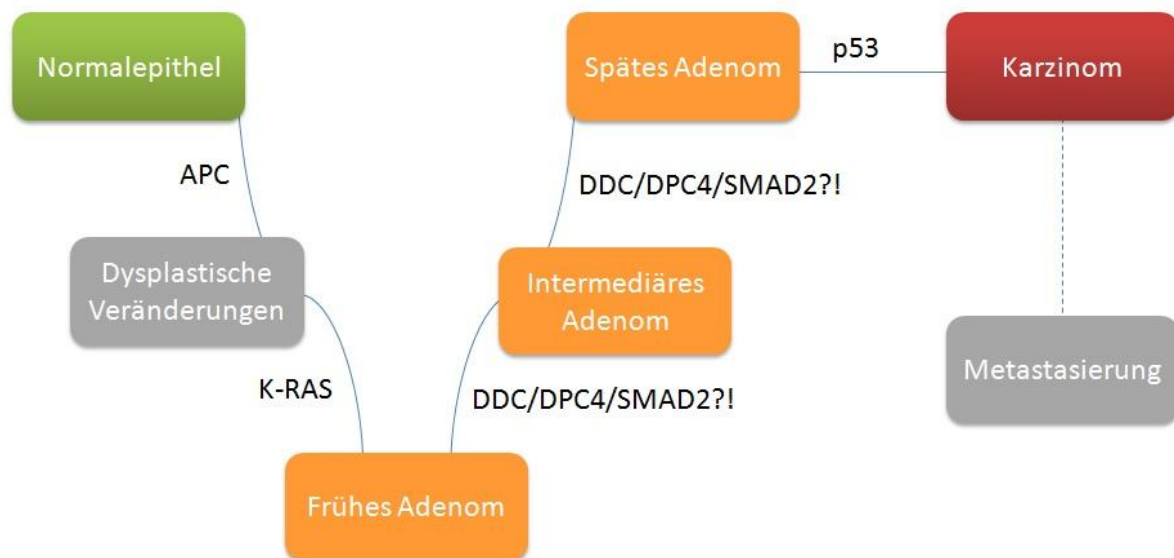


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ des KRK.

(modifiziert nach Schmoll et al. 2006) - Zeigt den Ablauf der Entwicklung eines Karzinoms aus einem Adenom mit (einigen) beteiligten Genen bzw. Genmutationen, die für den jeweiligen Schritt notwendig sind.

1.4 Ätiopathogenese des Rektumkarzinoms

Die Ätiologie des Rektumkarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden ethnische, endogen-metabolische Prozesse sowie weitere ernährungsbedingte Ursachen diskutiert.

Zu unterscheiden sind genetische von sporadischen Formen. Genetische Veranlagungen, wie z.B. die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) erhöhen das Risiko für eine Karzinomentstehung drastisch, da

beispielsweise Veränderungen im APC-Gen (wie es bei FAP der Fall ist) zu den kanzerogenen Läsionen gehören (Soravia et al. 1997; Lynch 2007).

In der Akkumulation von Genstörungen, die zum KRK führen, spielen Übergewicht und Bewegungsmangel, vor allem in Kombination mit ballaststoffarmer Ernährung eine große Rolle. Der genaue Mechanismus ist noch nicht gefunden, vermutet wird aber die (co-) kanzerogene Wirkung von Stoffwechselprodukten in Verbindung mit langer Verweildauer im Darm. Laut dem Krebsregister des RKI (2012) summieren sich die negativen Effekte in Verbindung mit fettreicher Nahrung, viel rotem Fleisch, geringem Gemüseanteil sowie regelmäßigem Alkohol- und Tabakkonsum. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen spielen nach den o.g. Faktoren aber eine eher untergeordnete Rolle, obwohl auch diese das Risiko für einen Darmtumor erhöhen.

Statistiken von 2004 besagen, dass sich ca. 60 % der KRK im Rektum und 20-25 % im Sigmoid (Böcker et al. 2004) finden. Neuere Angaben besagen, dass ca. 30 % der KRK auf das Rektum entfallen, etwa zwei Drittel auf das Kolon und der Rest auf den Analkanal sowie den rektosigmoidalen Übergang (Robert Koch-Institut 2012; Siegel et al. 2012). Die Mehrheit dieser Neoplasien (etwa 90 %) entwickelt sich über die „Adenom-Karzinom-Sequenz“.

1.5 Anatomie des Rektums und Metastasierungsmuster des Karzinoms

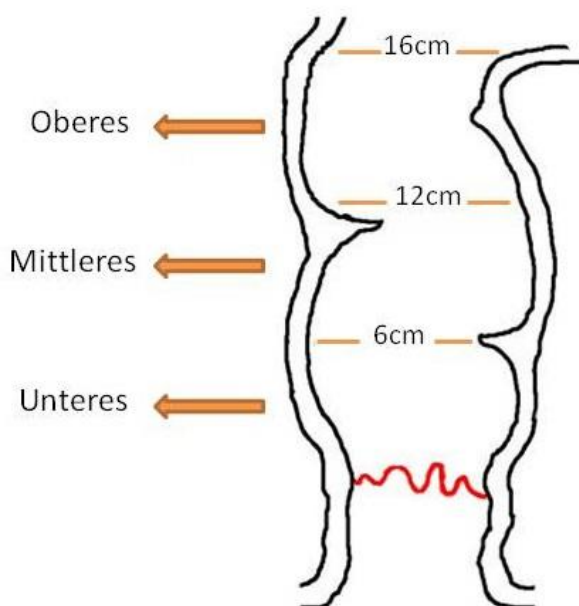


Abbildung 2: Anatomische Einteilung des Rektums

Das Rektum wird anatomisch in Drittel unterteilt. Dies erfolgt über den Abstand von der Anokutanlinie (rot): das untere Drittel erstreckt sich von 0 bis <6 cm, das mittlere Drittel von 6 bis <12 cm, das obere Drittel von 12 bis 16 cm ab ano.

Die Früherkennung des (Rektum-) Karzinoms ist wichtig, da bei bereits metastasierten Tumoren von einer schlechteren Prognose auszugehen ist und auch andere therapeutische Optionen einbezogen werden müssen (Rödel et al. 2012; Sauer et al. 2012).

Die Metastasierung hängt dabei unter Anderem von der Invasionsstiefe und der metastatischen Potenz (bei noch nicht vollständig geklärten Mechanismen) des Primärtumors ab, jedoch auch maßgeblich von den befallenen umgebenden Strukturen. Je weiter der Tumor fortschreitet, desto höher ist auch das Risiko einer Aussaat. Primär werden bei Rektumkarzinomen vor allem die Lymphwege befallen, wobei die Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit von 4 % im pT1-Stadium auf bis zu 60 % in pT3-Stadien ansteigt (Böcker et al. 2004).

Neben der Lymphgefäßinvasion trägt aber vor allem auch die Blutgefäßinvasion zur Metastasierung bei. Je weiter die lymphogene Metastasierung fortschreitet, desto wahrscheinlicher wird auch eine hämatogene Streuung des Primarius, eine primär hämatogene Metastasierung ohne Befall des Lymphsystems ist allerdings auch möglich. Hierbei gilt es zu beachten, in welcher Höhe sich der Tumor befindet, da der Mastdarm über 2 venöse Abflussgebiete verfügt und somit in 2 verschiedene Typen unterteilt werden kann (Böcker et al. 2004).

- Pfortadertyp
 - Der kraniale Teil des Rektums wird über die Vena rectalis superior drainiert, welche über die Pfortader in die Leber abfließt.
- Cavatyp
 - Der mittlere und untere Teil des Mastdarms drainiert über die Venae rectales mediae und Vena rectalis inferior. Das von hier aus primär befallene Organ ist die Lunge.

Die angegebenen Venen anastomosieren im Venengeflecht Plexus venosus rectalis, daher ist eine exakte Voraussage des Metastasierungsweges nur auf Grund der bekannten Tumorhöhe nicht möglich. Bevorzugtes Zielorgan der Metastasierung ist die Leber (Pfortadertyp), tiefsitzende Rektumkarzinome können aber auch in die Lunge oder selten auch z.B. über persistente Herzvitien in Gehirn und andere Organe gelangen (Cavatyp).

Dementsprechend sind Leber und Lunge auch prätherapeutisch im Rahmen des Stagings vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien obligat diagnostisch mitzubeurteilen.

1.6 Aktuelle Therapierichtlinien

1.6.1 Prätherapeutische Diagnostik

Stützfeiler einer individualisierten Therapieentscheidung im Sinne des *informed consent* ist die umfangreiche Aufklärung über die bestehenden Therapieoptionen. Hierbei sind in kurativem Ansatz derzeit mehrere Wege möglich, wobei Zeitpunkt und Art der Operation sowie der Einsatz von (neo-)adjuvanter (R)CT im Besonderen von der Tumorrhöhe bestimmt werden.

Zum Standard des interdisziplinären Stagings gehören heute eine umfassende Anamnese, Ultraschall des Abdomens, Labor inklusive Tumormarkerbestimmung (CEA), eine vollständige Koloskopie des gesamten Dickdarms sowie ein Röntgen-Thorax. Die komplette Beurteilung des Kolons und Rektums ist insofern wichtig, als in bis zu 5 % der Fälle weitere Tumoren synchron auftreten können (Chen und Sheen-Chen 2000).

Das diagnostische Vorgehen mit dem Ziel eines möglichst genauen klinischen Stagings besteht zum einen aus digital-rektaler Untersuchung zur Lokalisation der Höhe des Tumors (30-40 % der Tumoren können digital ertastet werden, also in einer Höhe bis 9 cm ab Anokutanlinie), zum anderen aus starrer Rektoskopie und nachfolgend rektaler Endosonographie zur Bestimmung der Tumorinfiltration uT und des Nodalstatus uN. Die Biopsiegewinnung (meist bei starrer Rektoskopie) dient der histologischen Bestätigung des Karzinomverdachts, der Bestimmung des Tumortyps und des Differenzierungsgrades. Zudem kann auch eine Goldclipmarkierung am unteren Tumorrand gesetzt werden, um in Zusammenarbeit mit dem Strahlentherapeuten möglichst viel gesundes Gewebe aus dem Bestrahlungsfeld bei neoadjuvanter RCT auszuschließen und auch gegebenenfalls eine sphinktererhaltende Therapie zu ermöglichen. Eine Sphinktermanometrie zur Erfassung der analen Schliessfunktion ist ebenfalls durchzuführen.

Zur Komplettierung der Umfelddiagnostik kann ein Kontrastmittelgestütztes Computertomogramm von Abdomen und Becken sowie ein Magnetresonanztomogramm des kleinen Beckens erstellt werden.

Ergeben sich bei der Sonografie Anhalte für weitere suspektere Raumforderungen intraabdominell oder intrahepatisch, so ist die sinnvolle Erweiterung der Diagnostik erforderlich. (Gaedcke et al. 2011)

Die S3-Leitlinien empfehlen bei Verdacht auf Befall umgebender Strukturen weiterhin auch eine Zystoskopie oder eine gynäkologische Untersuchung. (FDG-)PET-CT wird nicht empfohlen und auch von den Krankenkassen nicht bezahlt, da der Effektivitätsnachweis bisher fehlt (Schmiegel et al. 2005).

1.6.2 (neoadjuvante / adjuvante) (Radio-)Chemotherapie

Die alleinige oder in Kombination mit einer Strahlentherapie erfolgende Verabreichung von Chemotherapeutika verfolgt diverse Ziele. Die Entscheidung fällt dabei jeweils im Rahmen des Multidisziplinären Tumorboards; es muss individuell abgewogen werden, ob es sich um eine kurative oder palliative Situation handelt. Auch im Falle einer palliativen Situation können zytoreduktive Operationen, Anlage eines Anus praeter, eine tumorwachstumsbegrenzende RCT, etc. sinnvoll sein um Lebensqualität weitestgehend zu erhalten. Dies sollte individuell mit dem Patienten besprochen werden. In einigen Fällen kann sogar durch die RCT eine primär palliative Situation in eine kurative Situation überführt werden.

Die RCT in primär kurativem Ansatz dient dem sogenannten *Downsizing* bzw. *Downstaging* sowie dem Ermöglichen einer sicheren R0-Resektion. Dabei wird angestrebt, durch Zytostatika und/oder Bestrahlung des Tumorgebietes das Wachstum zu stoppen und eine Reduktion der Tumormasse zu induzieren (*Downsizing*, evtl. sogar T-Status-Senkung), oder das UICC-Stadium zu senken (*Downstaging*). Dies hat zum Einen die Möglichkeit einer schonenderen Operationstechnik zur Folge, zum Anderen werden dadurch aber auch erst primär nicht Organ- und vor allem Sphinkter- (und damit Kontinenz-) erhaltende Operationen in –erhaltende überführt, was die posttherapeutische Lebensqualität enorm steigert. Dementsprechend muss der Operateur erfahren genug sein, um eventuell die initiale OP-Methode nochmals zu überdenken. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der

CAO/ARO/AIO-94-Studie wieder, bei der eine initial für nicht möglich erachtete sphinktererhaltende OP in 19% der Fälle nach erfolgter RCT doch durchgeführt werden konnte (Gaedcke et al. 2011).

2004 wurden erstmals die Resultate der CAO/ARO/AIO-94 Studie vorgestellt (Sauer et al. 2004), deren Langzeitergebnisse 2012 veröffentlicht wurden (Sauer et al. 2012). Hier wurde gezeigt, dass beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom UICC II / III eine präoperative RCT mit 5-FU der postoperativen RCT mit 5-FU deutlich überlegen ist, was die lokale Kontrolle belangt. Leider konnte nicht gezeigt werden, dass Gesamtüberlebensrate oder Fernmetastasierung positiv beeinflusst werden. Um diese Faktoren zusätzlich günstig verändern zu können, wurde die Folgestudie CAO/ARO/AIO-04 initiiert, in der das Therapieregime im experimentellen Arm um Oxaliplatin ergänzt wurde. Zeitlich synchron liefen ebenfalls Studien mit Oxaliplatin bei Rektumkarzinomen (ACCORD-12, STAR-01, NSAPB R-04), welche jedoch bisher widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Einzig in der CAO/ARO/AIO-04 zeigten sich Hinweise, dass die lokale Kontrolle weiterhin verbessert und auch die Fernmetastasierung beeinflusst werden könne (Rödel et al. 2012). Jüngst wurden die vorläufigen Ergebnisse beim ASCO präsentiert, wo mit der Addition von Oxaliplatin in die (neo)adjuvante Therapie eine signifikant verbesserte pCR aufgezeigt werden konnte (Rödel et al. 2014). DFS-/OS-Analysen benötigen eine längere Beobachtungszeit und stehen noch aus.

Die S3-Leitlinien empfehlen unter Einbeziehung der Ergebnisse der CAO-94-Studie eine multimodale Therapie, bestehend aus neoadjuvanter RCT (50,4 Gy und 5-FU) und totaler mesorektaler Exzision (TME) gefolgt von adjuvanter Chemotherapie. Dies ist mittlerweile zum Standard in der Therapie des Rektumkarzinoms UICC II / III geworden.

Die ebenfalls derzeit durchgeführte verkürzte Variante der multimodalen Therapie in Form von 5 x 5 Gy über eine Woche und folgender TME in der Folgewoche (bimodal) sei hier der Vollständigkeit halber genannt (Kapiteijn et al. 2001), jedoch zeigte sich zum Teil in verschiedenen Phase-III-Studien die Unterlegenheit gegenüber der Langzeit-RCT (Gaedcke et al. 2011). Bujiko et al. konnten sogar zeigen, dass die RCT gegenüber der Kurzzeitradiatio eine stärkere Tumorreduktion bewirkt, höhere pCR-Raten erzielt (16% vs. 1%) sowie CRM-

positive Fälle von 12,9% auf 4,4% senken kann. Überleben, Lokalrezidive und Sphinktererhalt sowie Spättoxizitäten konnten nicht beeinflusst werden (Bujko et al. 2006).

Eine adjuvante RCT ist derzeit nur für Patienten nach Understaging, Patienten mit postoperativem R1-Status oder ohne präoperative RCT bei Rektumkarzinomen des mittleren oder unteren Drittels im Stadium II oder III vorgesehen, eine reine präoperative Langzeit-Radiotherapie scheint in den meisten Fällen unterlegen (Frykholm et al. 2001; Roh et al. 2009).

Meist korreliert ein durch die neoadjuvante RCT mit 5-FU induzierter Tumorregressionsgrad (TRG) 2 bis 4 positiv mit besserem DFS, Gesamtüberleben und verringerter Fernmetastasierung (Rödel et al. 2005). Umstritten ist zurzeit das weitere chirurgische Vorgehen bei klinischer Komplettremission nach neoadjuvanter RCT.

In Frage gestellt wird auch der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie nach erfolgter neoadjuvanter Therapie und Chirurgie. Der Stellenwert der bislang empfohlenen und anzuwendenden adjuvanten Chemotherapie muss noch analysiert werden. Dahingehend läuft derzeit die EORTC-22921-Studie, deren Ergebnisse aber noch abzuwarten sind.

Erste Anzeichen, dass die adjuvante Therapie bei Patienten nach präoperativer RCT keine Vorteile bringt oder gar eine Übertherapie darstellen könnte (bei Patienten, die ein *Downstaging* auf ypT0-2 ypN0 erfuhren), wurden bereits aufgezeigt (Bujko et al. 2010).

Rektumkarzinome des UICC-Stadiums I werden meist primär der Operation unterzogen und erhalten auch danach keine adjuvante Chemotherapie, da gezeigt wurde, dass bei alleiniger En-Bloc-Lymphknotendisektion mit TME (Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels) bzw. PME (Tumoren des oberen Drittels) generell ausreichend niedrige Lokalrezidiv- und Fernmetastasierungsraten bestehen und von einer (neo-)adjuvanten Therapie nicht profitieren (Kapiteijn et al. 2001).

1.6.3 Toxizitäts-Scoring

Für die posttherapeutische Einschätzung der Radiochemotherapie gibt es diverse Systeme, die Nebenwirkungen quantifizieren. Der WHO/ECOG-Index und der Karnofsky-Index sind Tools zur Einschätzung des Allgemeinzustandes von Patienten, welche aber auch an der Universität Göttingen durch den 1988 in den USA eingeführten und mehrfach überarbeiteten CTC-Score (*common toxicity criteria*) ersetzt wurden. Im Juni 2003 wurde dann nach Einführung der sogenannten *adverse events* (AE; unerwünschte Ereignisse, die danach eventuell dem Therapiekonzept kausal zugeordnet werden können) die dritte Version des CTC-Scorings herausgegeben (CTCAE). Die Untergliederung erfolgt hier wie bereits erwähnt auf Grund der AEs, welche dann in Schweregrade 1-5 unterteilt werden, wobei 1 die geringgradigste Ausprägung darstellt und 5 den Tod durch das jeweilige AE. Hierfür stehen Listen und Kodierungen zur Dokumentation auch in vereinfachter Form zur Verfügung. Ein ähnliches Verfahren zeigt sich mit der WHO-Quantifizierung, die erstmals 1979 aufgestellt und 2000 durch das RECIST (*response evaluation criteria in solid tumors*) erweitert bzw. ersetzt werden sollte. Die WHO nutzt hierbei die Einteilung der Grade 0-5, wobei 0 den Normalzustand und 5 den Tod des Patienten darstellt. Die Einschätzung ist allerdings nicht symptombezogen, sondern am Allgemeinzustand des Patienten orientiert (Franklin et al. 1994; Shimizu und Saijo 2003; Schmoll et al. 2006).

Ein Beispiel findet sich im Anhang unter 6.1 Beispiele zum Toxizitäts-Scoring.

1.6.4 Tumorregression

Die Angabe der Tumorregression kann wieder klinisch (cCR) oder pathologisch (pCR) erfolgen. Dabei bestehen vielfache Klassifikationen, die beiden gebräuchlichsten Einteilungen der pCR erfolgen nach Dworak (Dworak et al. 1997) oder Ryan (Ryan et al. 2005). Beschrieben sei hier das Regressionsgrading nach Dworak. Dabei wird zwischen den Graden 0-4 unterschieden, die in aufsteigender Nummerierung eine stärkere Regression bis hin zur Vollremission darstellen. Zudem existiert seit 2005 eine nach Liersch et al. modifizierte Variante (Liersch et al. 2005). Die Einzelkriterien sind in folgender Grafik dargestellt.

Grad 0	Keine Regression
Grad 1	Tumor mit Fibrose und/oder Vaskulopathie
Grad 2	Fibrose mit wenigen restlichen Tumorzellen
Grad 3	Kaum nachzuweisende Tumorzellen in fibrotischem Gewebe
Grad 4	Keine Tumorzellen nachweisbar

Abbildung 3: Regressionsgrading nach Dworak

Grad 0	Keine Veränderung
Grad 1	<25% Regression
Grad 2	25-50% Regression
Grad 3	>50% Regression
Grad 4	100% Komplettremission

Abbildung 4: Regressionsgrading modifiziert nach Liersch et al. 2005

Die cCR wird per digital-rektalem Tastbefund, Rektoskopie und rektaler Endosonographie erhoben, stellt allerdings nur ein grobes Maß für den Regressionsgrad dar, da auch wenige verbliebene, nicht erfassbare Tumorzellen zu einem Rezidiv oder einer Fernmetastasierung führen können. Die histopathologisch erhobene Komplettremission (pCR) (ypTONOMO) im Sinne der feingeweblichen Untersuchung des entnommenen Resektates und der Lymphknoten ist hier klar überlegen. 2002 wurde bei Hiotis et al. mit 488 Patienten eindrücklich dargestellt, dass nur bis zu 25% der klinisch eingeschätzten Komplettremissionen pathologisch bestätigt werden konnten! Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass circa 75 % der cCR residuelle Tumorreste aufwiesen und damit für Rezidive oder Aussaat prädisponiert waren (Hiotis et al. 2002).

Auch der ypT0-Status sei aber in über 5 % der Fälle noch mit verbliebenen mesorektalen Lymphknotenmetastasen vergesellschaftet. Vereinzelt gibt es Zentren, die bei klinischer Vollremission die sogenannte „watch and wait“-Methode favorisieren und in zeitlich sehr kurzen Abständen Kontrolluntersuchungen durchführen. Inwiefern diese Methode auf lange Sicht vergleichbare Ergebnisse liefert, bleibt abzuwarten, die Nachsorge zeigt nach einem medianen *Follow-Up* von 57 Monaten aber 3 % Lokalrezidive und 4 % Fernmetastasierung (Habr-Gama et al. 2010). Der ypT0-Status wurde hier aber durch TEM erhoben

(endoskopische mikrochirurgische Vollwandexzision), was als Kritikpunkt verbleibt, da nur die vermeintlich ehemalige Tumorlokalisierung entfernt wird ohne Umgebungssicherheit.

Ein weiteres Problem der cCR ist die fehlende Möglichkeit der mikroskopischen Evaluation der lokoregionären Lymphknoten. 2010 wurden Daten veröffentlicht, die den histologisch untersuchten Nodalstatus in die Remissionsbeurteilung einbezogen. Um den ypT und ypN Status erheben zu können, wurden die Patienten nach neoadjuvanter RCT der Chirurgie unterzogen und nach histopathologischer Begutachtung ergab sich ein signifikanter Unterschied in 5-Jahres-DFS und OS zugunsten des ypN0-Statuses mit 88.5 % bzw. 94.8 % zu 45.2 % bzw. 72.8 % (Vergleich ypN0 mit ypN+) (Yeo et al. 2010).

1.6.5 Operative Strategien

Für die Resektion der Tumoren des Rektums stehen derzeit diverse operative Möglichkeiten zur Verfügung. Diese reichen von der transanal lokalen Exzision (TEM) bis hin zur totalen mesorektalen Exzision. Welche Methode dabei zum Einsatz kommt, entscheidet sich nach klinischem Staging und Lokalisation des Tumors.

Die transanale endoskopisch-mikrochirurgische Abtragung (TEM) kommt bei Low-risk UICC I Tumoren (cT1 G1-2 N0M0) zum Einsatz. Für High-risk Karzinome cT1 G3-4 N0M0 und cT2 ist meist die transabdominelle PME/TME ein Erfordernis. Sobald klinisch der Verdacht auf T3 oder T4 besteht, der Tumor also das Stadium UICC II oder III erlangt, wird eine PME oder TME durchgeführt.

1.6.6 Rektumresektion und partielle / totale mesorektale Exzision (PME / TME)

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren im oberen Rektumdrittel (12-16 cm) ist möglicherweise eine partielle mesorektale Exzision (PME) einer totalen mesorektalen Exzision (TME) bis zum Beckenboden nicht unterlegen. Dies wird durch die GAST-05 Studie geprüft, deren Rekrutierung abgeschlossen ist.

Generell sollte eine R0-Situation angestrebt werden. In Analogie zu den Kolontumoren wird dies durch einen Sicherheitsabstand von ca. 1 cm vom makroskopischen Tumorrand angestrebt. Das Mesorektum wird horizontal zur Achse des Darmes abgetrennt, um ein *Coning* (konisch zusammen verlaufende Resektionsränder) zu vermeiden, welches in einigen Fällen dazu führt, dass kleinste Metastasen hinterlassen werden können (Leong 2000).

Bei Tumoren, die nicht sphinktererhaltend reseziert werden können, wird die radikalste Technik, die abdominoperineale Rektumexstirpation (APE), durchgeführt, wobei Sphinkterapparat und partiell die Levatormuskulatur ebenfalls entfernt werden (Becker et al. 2006).

1.7 Perioperatives Qualitätsmanagement

Die S3-Leitlinien für das kolorektale Karzinom sehen im Grundsatz keine Schnellschnittuntersuchungen während der Operation vor. Dennoch gibt es diverse Indikationen wie z.B. die Untersuchung metastasensupekter Strukturen (Peritoneum, Leber, paraaortale Lymphknoten). Hinzu kommt in Einzelfällen auch die intraoperative Abklärung des R0-Status am aboralen Rand des Resektates, um eventuell die Resektionsgrenzen zu erweitern. Lokalexzisionen stellen ebenfalls einen Grund für die Schnellschnittuntersuchung, um Sicherheit der Exzision im Gesunden zu erlangen. Eine Kontraindikation für die Schnellschnittuntersuchung oder Biopsieentnahme stellt die Infiltration von Nachbarorganen dar, wobei geklärt werden soll, ob es sich um Tumorinvasion oder um tumorumgebendes Entzündungsgeschehen mit Adhärenz der Strukturen handelt. Hierbei wurde gezeigt, dass die Möglichkeit der Streuung von Tumorzellen massiv gesteigert wurde und somit Lokalrezidivraten erhöht, DFS und 5-Jahres-Überlebensraten signifikant gesenkt wurden. Daher ist unbedingt die En-Bloc-Resektion und No-Touch-Methodik empfohlen (Zirngibl et al. 1990).

Direkt postoperativ kann schon durch den Chirurgen eine Qualitätsbeurteilung der TME erfolgen. Dies geschieht durch Kanülierung der A. mesenterica inferior oder der A. rectalis superior und Injektion von verdünnter Methylenblaulösung zur Darstellung des

Mesorektums. Anhand des Farbaustritts aus dem Resektat können dessen Intaktheit und die Qualitätsklasse der TME erfolgen:

- Klasse 1 - komplette TME:
 - kein Farbaustritt während und nach der Injektion,
- Klasse 2 - makroskopisch kaum/nicht erfassbare Einrisse im Mesorektum:
 - punktförmiger Farbaustritt
- Klasse 3 - makroskopisch unvollständige TME:
 - Flächenhafter Farbaustritt

Im Anschluss erhält der Pathologe das frische Resektat und beurteilt aus pathologischer Sicht, ob das Ausmaß der Resektion die Kriterien der TME bzw. PME erfüllt und inwieweit makroskopische Defekte im Präparat vorhanden sind. Es kann auch eine Einschätzung nach Mercury-Kriterien erfolgen. Zusätzlich wird das Präparat auf Perforationen oder sichtbare Tumoreale untersucht, ober- und unterhalb des Tumors eröffnet und der Abstand des distalen Tumorrands vom aboralen Resektionsrand bestimmt. Es folgen Längenbestimmung des Präparates (inklusive größter longitudinaler und transversaler Diameter des Tumors), Tumorstadium, Lage zur peritonealen Umschlagfalte sowie die Suche nach weiteren Polypen oder Läsionen im Präparat und Aufspannen des Präparates auf Kork zur weiteren Formalinfixierung (Liersch et al. 2005).

Feingeweblich erfolgt dann die zirkumferentielle Evaluierung der Resektionsränder inklusive der Angabe des mikro- und makroskopischen Abstands zum Tumorrand. Anschließend wird eine Untersuchung von mehr als 12 mesorektalen/perirektalen/periaortalen Lymphknoten gefordert.

1.8 Follow-Up und Outcome

Die Nachuntersuchungen (*Follow-Up*) der beiden zugrunde liegenden Studienkollektive wurden gemäß den S3-Leitlinien sowie Empfehlungen der deutschen Krebsgesellschaft 5

Jahre nach Studienprotokoll durchgeführt und die Patienten dann in die weitere Nachsorge nach S3-Leitlinien übergeben.

Die posttherapeutische Überwachung beinhaltete nach festgelegten Kriterien Anamnese, klinische Untersuchungen, Kontrolle der tumorspezifischen Marker, Abdomensonographie, Rektoskopie sowie bei Rezidivverdacht CT des Abdomens, des Beckens und Röntgen-Thorax. Dies geschah jeweils im Abstand von 3 Monaten in den ersten 2 Jahren, dann halbjährlich und nach dem 5. Jahr einmal jährlich bis zum 10. Jahr (Schmiegel et al. 2008; Schmiegel et al. 2010) .

Das Lokalrezidivrisiko konnte mit dem präoperativen RCT-Therapieregime der CAO-94-Studie nach 5 bzw. 10 Jahren auf unter 10 % gesenkt werden. Weiterhin prognoselimitierend ist jedoch die Entwicklung von fernmetastastischen Rezidiven in ca. 30-40 % der Fälle (Sauer et al. 2012). Hier bleibt es aktuell abzuwarten, ob die Langzeit-Ergebnisse der CAO-04-Studie durch Hinzunahme von Oxaliplatin in die Chemotherapie eine Reduktion zeigen werden.

1.9 Der Her2/neu-Rezeptor

Her2/neu ist ein Rezeptor der EGFR-Familie. Der *human epidermal growth factor receptor* Subtyp 2, auch als erb-B2 oder c-erbB2 bezeichnet, ist also *Target* der epidermalen Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) oder NRG (Neuregulin).

Er führt über intrazelluläre Signalkaskaden zu Zellproliferation und Apoptosehemmung. Dies geschieht zum einen über den RAS-MAP-Kinase-Pathway, zum anderen über den mTOR-Pathway. Hieran erkennt man bereits das aggressiv-karzinogene Potential dieses Rezeptors.

1.9.1 Intrazelluläre Vernetzung von Her2/neu

Bindet ein Ligand an die externe Domäne der ErbB-Familie, kommt es zur Dimerisierung und in Folge dessen zur Aktivierung interner Kinasefunktionen, was wiederum eine Phosphorylierung der internen Tyrosine des Rezeptors bedingt. Diese phosphorylierten Tyrosinreste bilden ihrerseits Startpunkte für die cytosolische Weiterleitung der Kaskade bis in den Zellkern. Dort folgt die Aktivierung oder Hemmung von Genen mit konsekutiver

Hemmung oder Aktivierung von Zellprozessen wie Proliferation, Apoptose, Variation des Expressionsmusters auf der Zellmembran u.v.m.

Die Ligandenfamilie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) bindet im Fall von Her2/neu nicht direkt an den Rezeptor. Daher spricht man hier auch von ErbB2 als *Orphan*-(Waisen) Rezeptor. Zudem scheint es, dass ErbB2 eher Co-Rezeptor-Funktionen aufweist, bzw. dass die Familie der ErbB-Rezeptoren allgemein vorwiegend in Kooperation agiert. In Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass bei Nutzung eines intrazellulären Antikörpers gegen ErbB2 die Zellen in der G1-Phase arretierten. Diese Beobachtung ging einher mit einem Phosphorylierungsverlust von ErbB3. Daraus resultiert die Erkenntnis, dass die funktionelle Einheit hier aus dem Heterodimer von ErbB2/ErbB3 bestand (Neve et al. 2000). Zudem wird beschrieben, dass beispielsweise das Heterodimer aus ErbB1 und ErbB2 nicht nur die Rezeptoraktivität steigert und verlängert, sondern anscheinend auch Einfluss auf den Rezeptorkreislauf (Internalisierung, Recycling, Neubildung etc.) nimmt (Olayioye 2001).

Allen ErbB ist gemeinsam, dass sie über den MAP-Kinase-Pathway intrazellulär fungieren. Offenbar ist für die MAPK-Aktivierung zumindest in der Initialphase die cytoplasmatische Kinase Src nötig, während dies in späteren Phasen auch direkt durch den Rezeptor selbst bewerkstelligt werden kann. Interessant ist auch, dass ein Stimulationsversuch mit NRG1 und NRG2 zwar intrazellulär die gleiche Signalkaskade in Gang setzt, jedoch zu unterschiedlichen Antworten auf Transkriptionsebene führt (Yarwood und Woodgett 2001).

Es wird also deutlich, dass nicht nur die Menge der exprimierten Her2/neu-Rezeptoren maßgeblich für die zelluläre Antwort ist, sondern vielmehr die Bildung von Homo- und Heterodimeren gleicher oder verschiedener Subtypen der ErbB-Familie (ErbB1-4).

Wie bereits erwähnt, stört Her2/neu zusätzlich die Apoptosefähigkeit der Zelle. Dies geschieht über das mTOR-Enzym (*mammalian target of Rapamycin* - mTOR), welches für Überleben, Wachstum, Proliferation und Motilität von Zellen von Bedeutung ist. Es konnte (in Mäusen) gezeigt werden, dass das YB-1-Protein in Her2-überexprimierenden Tumorzellen ebenfalls hochreguliert ist und über den mTOR/STAT3-Weg eine Blockade der Apoptose

bewirkt. Die Hemmung des YB-1-Proteins führte zur Re-Induktion der Apoptose bzw. zum Stopp des Tumorwachstums. (Fujii et al. 2009).

1.9.2 Her2/neu in Mamma-, Magen- und Rektumkarzinomen

Her2/neu hat erstmals im Mammakarzinom klinische Relevanz erlangt, als 1987 gezeigt wurde, dass die Überexpression von Her2/neu das Rezidivrisiko erhöht und mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate einhergeht (Slamon et al. 1987). Als therapeutisches Mittel hat sich hier der Antikörper Herceptin (Trastuzumab) durchgesetzt, der, bei frühzeitiger Gabe, das Risiko für Lokalrezidive um bis zu 20% und Metastasierungen auf bis zu 50% senken kann. Zum genauen Wirkmechanismus von Herceptin gibt es bislang noch keine belastbare Aussage (Wagener und Müller 2010):

1. Verhinderung der intrazellulären Pathway-Aktivierung durch Tyrosinkinase-Dimerisierung
2. Verminderung der Rezeptordichte durch Bindung und Internalisierung des Rezeptor-Herceptin-Komplexes
3. Immunreaktion und Zerstörung der Zelle
4. supportiver/additiver Effekt zu anderen Chemotherapeutika

Trastuzumab ist derzeit nur für Mamma- und Magenkarzinome mit Überexpressionsstatus zugelassen und in Verwendung, so zeigte es seine Wirkung bereits in der ToGA-Studie (Trastuzumab for Gastric Cancer), in der signifikant das mediane Überleben von 11,1 Monaten auf 13,8 Monate gesteigert werden konnte (Bang et al. 2010).

Nachfolgesubstanzen wie Lapatinib, Pertuzumab (welches seine Wirkung beim Her2/neu-positiven nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) bereits gezeigt hat (Johnson und Janne 2006)) und TDM-1 sind in Erprobung, jedoch zeigten sich in der Therapie mit Lapatinib (im Vergleich zu Trastuzumab) signifikant weniger pathologische Komplettremissionen (pCR) und kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben. Zudem zeigte sich ein anderes und leicht verstärktes Nebenwirkungsspektrum (Untch et al. 2012; Berghoff et al. 2013). Es bleibt zu untersuchen, inwiefern sich diese oder weitere Substanzen auch für das Magen- und Rektumkarzinom als wirksam erweisen. Erst kürzlich wurde ein Fall publiziert, bei dem ein

Patient mit metastasiertem, Her2-überexprimierendem Rektumkarzinom erfolgreich mit Trastuzumab behandelt wurde. Dort wurde von einer ausgeprägten Regression berichtet (Sorscher 2011). In Kombination mit Daten unserer Forschergruppe (Conradi et al. 2013), die zeigen, dass Her2/neu in bis zu 26,7% der Resektate und 12,4% der prätherapeutischen Biopsien überexprimiert wird, ergibt sich ein dringlicher Forschungsbedarf in Richtung *Her2-targeted therapy* des Rektumkarzinoms. Eine Validierung der Erkenntnisse soll an einem großen Kollektiv in dieser Studie gelingen.

Voraussetzung für ein Ansprechen ist immer, dass das Gen auch wirklich amplifiziert und die Rezeptoren auf der Zelloberfläche überexprimiert sind. Im klinischen Alltag sind von der ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) und vom CAP (*College of American Pathologists*) folgende Tests empfohlen:

Immunhistochemischer Nachweis des Her2-Proteins: Ist in mehr als 30 % der Tumorzellen das Protein nachweisbar, gilt eine Antikörpertherapie als indiziert. Dies dient meist als Primärtest.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH): Fällt der Primärtest mittels IHC mit geringer als 30 % gefärbtem Anteil aus, ist die FISH indiziert. Sie dient der Darstellung von DNA (und RNA) und kann somit intranukleäre Vervielfältigungen des Genmaterials per Fluoreszenz darstellen. Für Positivität sind hier im Durchschnitt mehr als 6 Kopien des Her2-Gens bzw. eine Ratio von über 2,2 (Her2-Gene zu Chromosom-17-Zentromeren) pro Zellkern gefordert.

Für die Bestimmung des Her2/neu-Status gelten beim Rektumkarzinom die gleichen, für das Magenkarzinom leicht modifizierte Kriterien (siehe Kapitel 2.3.7, Kap. 2.3.8, Kap. 2.3.10). Zudem wird dort zumeist die Dual-ISH eingesetzt, die mindestens gleichwertig, wenn nicht sogar überlegen und mit geringerem Aufwand und damit niedrigeren Kosten verbunden ist (Rüschoff et al. 2010a).

1.10 Zielsetzung und Fragestellung

Diese Studie sollte die Ergebnisse aus unserer Forschergruppe prüfen und an einem größeren, multizentrischen Kollektiv validieren. Das Primärziel besteht daher in der Auswertung des Anteils an Her2-positiven Rektumkarzinomen an der Gesamtkohorte in einem großen multizentrischen Kollektiv.

Daher sollten hier folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie häufig ist Her2 in den untersuchten Resektaten immunhistochemisch positiv?
- Wie häufig ist Her2 tatsächlich auf Genebene amplifiziert?
- Inwieweit sind die Ergebnisse mit denen von Conradi et al. 2013 reproduzierbar bzw. können validiert werden?
- Lassen sich die Ergebnisse mit klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Rektumdrittel etc. korrelieren?
- Könnte Her2 einen Indikator für erhöhte Tumoraggressivität im Sinne des UICC-Stadiums (Invasionstiefe / Nodalstatus / Metastasierung) darstellen?
- Lässt sich ein Zusammenhang zwischen Her2-Positivität und Rezidivverhalten, CSS und TTR herstellen und eine Prognoseabschätzung ableiten?
- Eignet sich Her2 als potentielles Therapie-*target*?

2. Patientenkollektiv und Methoden

2.1 Das Patientenkollektiv

Das analysierte Material stammt von Patienten der beiden multizentrischen, prospektiven und randomisierten Phase-III-Studien der *German Rectal Cancer Study Group* (GRCSG). Die Gesamtzahl der in beiden Studien gescreenten Patienten beläuft sich auf **2088**, wobei hiervon **1265** auf die CAO/ARO/AIO-04-Studie und **823** auf die CAO/ARO/AIO-94-Studie entfallen.

2.1.1 Die CAO/ARO/AIO-94-Studie

Die multizentrische, prospektive und randomisierte Phase-III-„CAO/ARO/AIO-94“-Studie wurde initiiert, um den Effekt einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf das *Outcome*, lokale Kontrolle und Metastasierung, DFS und OS von Rektumkarzinomen der lokal fortgeschrittenen Stadien nach UICC II und III zu untersuchen. Bis Juli 2002 wurden 799 Patienten in diese Studie eingeschlossen, welche sich aus 26 deutschen Zentren rekrutierten (Sauer et al. 2012).



Abbildung 5: Teilhabende Zentren der CAO-94-Studie

Quelle: www.mixmaps.de AD 12.02.2014 – für eine vollständige Liste siehe Anhang.

Bis zu diesem Zeitpunkt war die Standardtherapie bei operierbaren, lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen (T3/4 N+) die primäre Operation sowie adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU). Die CAO/ARO/AIO-94-Studie sollte nun den Effekt einer kombinierten Radiochemotherapie untersuchen und gleichzeitig evaluieren, ob eine prä- oder postoperative Applikation bessere Ergebnisse erzielte.

Hierzu wurden 2 Studienarme gebildet, in die die Patienten randomisiert wurden. Operationstechniken waren standardisiert und beinhalteten die TME. Der RCT-Therapie teil

bestand aus einer 5-wöchigen Radiochemotherapie mit Verabreichung von 5-FU in der ersten und fünften Woche. Insgesamt wurden im Zeitraum dieser 5 Wochen 50,4 Gy Strahlendosis und 10.000 mg/m² Körperoberfläche (KOF) 5-FU Chemotherapie appliziert. Die Einzeldosen betragen 1,8 Gy bzw. 1000 mg/m²/d. Die Radiotherapie konzentrierte sich dabei auf den Bereich des Tumors und der pelvinen Lymphknoten und war in beiden Armen gleich, bis auf einen 5,4 Gy Boost im postoperativen RCT-Arm (B), die Chemotherapie wurde systemisch als 120 h -Infusion verabreicht.

Dem RCT-Teil ging im Arm A die Operation voraus, im Arm B folgte sie danach, in jedem Falle aber mit einem zeitlichen Abstand von 4-6 Wochen. Waren RCT und Operation abgeschlossen, folgte in beiden Armen eine adjuvante Weiterbehandlung mit 5-FU als Monotherapie in 4 Zyklen zu jeweils 5 x 500 mg/m²/d als i.v. Bolus.

Als Primärendpunkte wurden 5-Jahres-Überleben und lokale sowie Metastasierungskontrolle gesetzt. Sekundäre Endpunkte bestanden in der Analyse des Anteils der R0-Resektion, sphinktererhaltende Operationsmöglichkeiten, Toxizitäten, OP-Komplikationen und der Lebensqualität. Einen Vorteil im Gesamtüberleben zeigte keiner der beiden Arme (76 % präoperativ vs. 74 % postoperativ), jedoch verbesserte sich bei präoperativer RCT signifikant die lokale Kontrolle (Rezidive in 6 % präoperativ vs. 13 % postoperativ) und zeigte zudem eine reduzierte Toxizität (Sauer et al. 2004).

Kürzlich wurden auch die Langzeitergebnisse mit einem medianen *Follow-Up* von 134 Monaten veröffentlicht, welche ebenfalls zeigten, dass sich das Gesamtüberleben durch Änderung der Reihenfolge im Therapieschema nicht ändert. Jedoch wurde nochmals bestätigt, dass auch nach 11 Jahren weiterhin im präoperativen RCT-Arm die Lokalrezidivrate signifikant gesenkt werden konnte (10,1% im postoperativen vs. 7,1% im präoperativen Arm). Weiterführende Versuche das DFS, OS und die posttherapeutischen Fernmetastasierungsrate zu senken, wurden dann in der nachfolgenden CAO/ARO/AIO-04-Studie aufgenommen (Rödel et al. 2012; Sauer et al. 2012).

Die Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie führten mit den verbesserten therapeutischen Ergebnissen (geringere Toxizitäten bei verbesserter lokaler Kontrolle) zur Durchsetzung der präoperativen RCT als Standardtherapie beim Rektumkarzinom UICC II / III.

2.1.2 Die CAO/ARO/AIO-04-Studie

Die CAO/ARO/AIO-04-Studie (Studiennummer NCT 00349076) wurde als multizentrische, prospektive und randomisierte Phase-III-Studie initiiert, um die Wirkung von beim Kolonkarzinom bewährten Oxaliplatin in der Therapie des Rektumkarzinoms auszuloten. Oxaliplatin wird bereits im adjuvanten Therapiesetting des Kolonkarzinoms eingesetzt und soll nun sein Potential in Kombination mit der bereits bestehenden neoadjuvanten RCT mit 5-FU bei Rektumkarzinomen zeigen. Hierfür wurden 1265 Patienten initial in die CAO/ARO/AIO-04-Studie aufgenommen und in die 2 Arme randomisiert. Beide Arme wurden entsprechend aktueller Therapieempfehlungen behandelt (siehe Kapitel 2.1.1 CAO-94 Arm B) und der Prüfarm um Oxaliplatin ergänzt.

Primärer Endpunkt war hier vor allem die Verbesserung des DFS. Analog der CAO/ARO/AIO-94-Studie wurden ebenfalls Patienten mit histologisch (bioptisch) gesichertem Rektumkarzinom T3/4 oder N+ eingeschlossen. Die RCT im Prüfarm enthielt eine kumulative Gesamt-Radiatio von 50,4 Gy (in Einzeldosen von 28 x 1,8 Gy) und 7000 mg/m²KOF 5-FU (Einzeldosis 250 mg/m²/d) sowie Oxaliplatin 200 mg/m² (Einzeldosis 50 mg/m²/d). Auch postoperativ wurde Oxaliplatin zusätzlich zum 5-FU verabreicht (2 x 100 mg/m²/d).

Sekundäre Endpunkte bestanden in Toxizität, Compliance und histopathologischem *Response*. Erste Analysen zeigen, dass die mit Oxaliplatin intensivierte Therapie zu einer Verbesserung der histopathologischen Antwort führt und somit öfter (17% vs. 13%, odds ratio 1.40, 95% CI 1.02-1.92; p=0.038) eine pCR erreicht werden konnte (Rödel et al. 2012).



Abbildung 6: Teilhabende Zentren der CAO-04-Studie

Quelle: www.mixmaps.de AD 12.02.2014 – für eine vollständige Liste siehe Anhang.

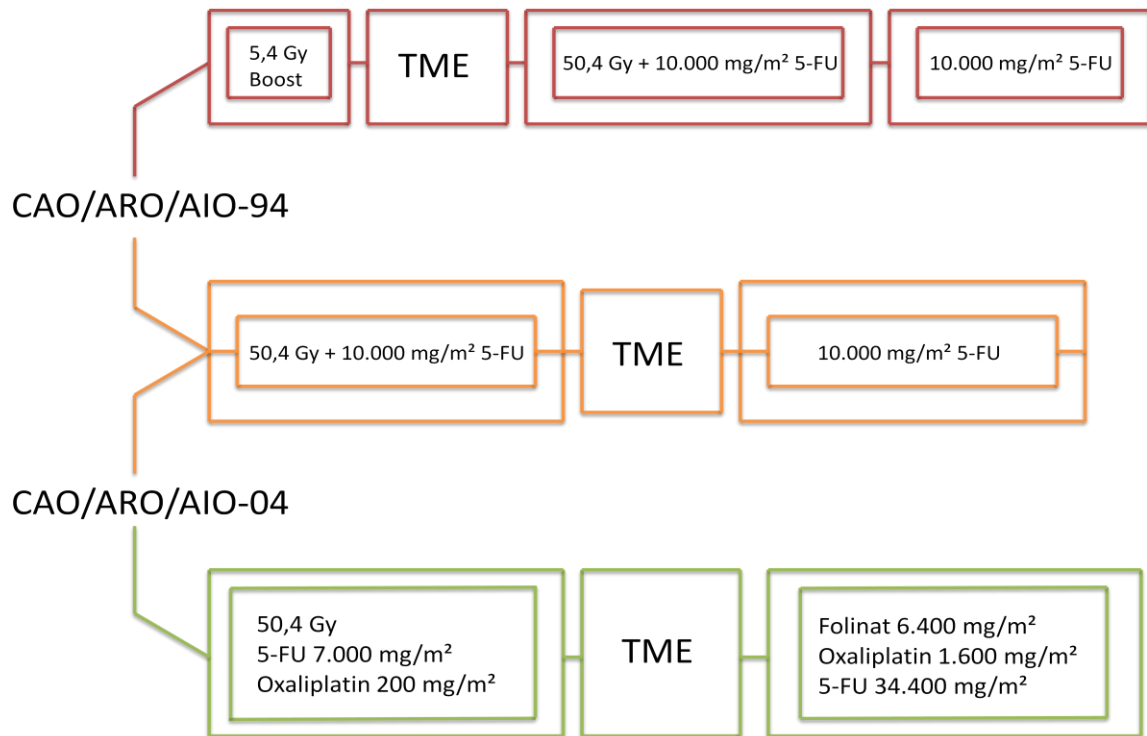


Abbildung 7: Prinzipielle Therapieschemata der CAO94 und CAO04

Die beiden Studien gleichen sich prinzipiell im gelb gefärbten Therapiearm. Für die CAO/ARO/AIO-94 ist der rot gefärbte Therapiearm der Kontrollarm während der gelbe Arm den Prüfarm darstellt. In der CAO/ARO/AIO-04 ist der gelbe Arm der Kontrollarm, während der grüne Arm den Prüfarm darstellt.

2.1.3 Ein-/Ausschlusskriterien

Die Untersuchungen fanden am akquirierten Material aus den Studien der CAO/ARO/AIO-94 und -04 statt und es bedurfte keiner weiteren Modifizierung der Ein- bzw. Ausschlusskriterien.

2.2 Klassifikation

Für die Entscheidung für oder gegen eine (neo-)adjuvante Therapie wird ein Tool benötigt, mit dem Prognosen abgeschätzt werden können. Zugleich sollte es einen Grenzwert liefern, der es im klinischen Alltag ermöglicht, zwischen Patienten zu unterscheiden, die von einer (R)CT profitieren, und solchen, die damit übertherapiert würden. Die Patienten der beiden hier analysierten Studien wurden daher nach den etablierten Klassifikationssystemen cTNM und cUICC, wie im Folgenden beschrieben, klassifiziert:

Die WHO-Klassifikation von 2000 für das KRK unterscheidet verschiedene histologische Grundtypen des KRK:

- Adenokarzinome
- muzinöse Adenokarzinome
- Siegelringzellkarzinome
- adenosquamöse Karzinome
- Plattenepithelkarzinome
- kleinzellige Karzinome
- undifferenzierte Karzinome

In über 90% der Fälle liegt ein Adenokarzinom vor. Hier ist weiter die histologische Unterscheidung nach Differenzierungsgrad nötig, wobei niedrigmaligne (gut differenziert G1 und mäßig differenziert G2) und hochmaligne (schlecht differenziert G3 und undifferenziert G4) Karzinome unterschieden werden (Böcker et al. 2004).

Die UICC (Union Internationale Contre le Cancer) stellt 2 Klassifikationssysteme zur Verfügung: das TNM-Staging und die Einteilung nach UICC, die das TNM-Staging klinisch vereinfachen und eine Prognoseabschätzung ermöglichen soll.

2.2.1 Die TNM-Klassifikation

Diese Einteilung wurde 1943-1952 von Pierre Denoix entwickelt und seit 1950 von der UICC weiterverwendet. Die aktuelle TNM-Klassifikation von 2010 sieht dabei folgende Kriterien vor, welche stets vom Pathologen evaluiert und angegeben werden sollten:

- Primärtumorausdehnung T (0,1,2,3,4)
- Lymphknotenmetastasen N (0-3)
- Fernmetastasen M (0,1)
- Grading G (1-4, s.o.)
- Residualtumor nach operativer Entfernung R (0-2)
- Lymphgefäßbeteiligung L (0,1)
- Venenbeteiligung V (0-2)
- Perineuralbeteiligung Pn (0,1)

Diese Klassifikation kann durch geeignete Präfixe ergänzt werden, die die Art der Erhebung der Befunde darstellen. Beispielsweise seien hier die klinisch relevanten cTNM (prätherapeutisch, klinisch), uTNM (sonografisch, teil des cTNM) und pTNM (postoperativ, pathologisch) genannt. Zur Beurteilung von Resektaten nach neoadjuvanter Therapie ist das Präfix „py“ vorgesehen.

Anhand des TNM-Stagings lassen sich Aussagen über die Prognose eines Befundes ableiten und auch therapeutische Entscheidungen werden hieran orientiert.

Postoperativ sollten Operateur bzw. Pathologe die Qualität der Resektion angeben. Hierfür wird nach UICC der R-Status (R für Residualtumor) geführt, bei dem zwischen R0 (Resektion im Gesunden = kein Residualtumor), R1 (mikroskopischer Residualtumor) und R2 (makroskopischer Residualtumor) differenziert wird. Anzustreben ist immer ein R0-Status ohne Tumorverbleib im Körper.

2.2.2 Die UICC-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation von 2002 wurde mittlerweile aktualisiert und ist nun in 7. Auflage aus dem Jahr 2010 verfügbar (Wittekind 2010). Die UICC-Klassifikation des Rektumkarzinoms richtet sich dabei nach den TNM-Stadien, wichtet die Kriterien und erstellt die Stadien 0-IV, aus denen sich prognostische Aussagen ableiten lassen. Dieses vereinfachte System gliedert sich folgendermaßen:

- Jede Fernmetastase führt automatisch zur Klassifizierung **UICC IV**
- Jeder nodal-positive Status ohne Fernmetastasen ergibt **UICC III**
- fortgeschrittene Tumoren T3/4, N0, M0 ergeben **UICC II**
- Tumoren T1/2, N0, M0 ergeben **UICC I**
- Intraepitheliale Tumoren Tis (ehemals carcinoma in situ) ergeben **UICC 0**

		T						
		is	1	2	3	4a	4b	1-4, M1
N	0	0	I	I	IIA	IIB	IIC	IV
	1a		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	1b		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	1c		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	
	2a		IIIA	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	
	2b		IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	
	2c							

Abbildung 8: UICC-Klassifizierung nach TNM-Stadien

Die UICC-Klassifizierung ergibt sich nach den TNM-Stadien. Die rote Linie verdeutlicht die Trennung des therapeutischen Vorgehens für den Tumor: oberhalb der Linie kann auf neoadjuvante Vorbehandlung verzichtet werden, unterhalb der Linie ist diese durchzuführen.

T4a: Tumorbefall im viszeralen Peritoneum; **T4b:** Tumorbefall anderer Organe oder Strukturen

N1a: Metastase in 1 regionärem Lymphknoten (reg. LK); **N1b:** Metastasen in 2-3 reg. LK; **N1c:** Satelliten ohne reg. Lymphknotenmetastase; **N2a:** Metastasen in 4-5 reg. LK; **N2b:** Metastasen in 7 oder mehr reg. LK

2.3 Material und Methoden

Das in dieser Analyse untersuchte Material entstammt den zwei Phase-III-Studien der GRCSG, die bereits ausführlich in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben wurden. Im folgenden Consort-Diagramm (Abbildung 9) sind beide jeweils mit ihren Kontroll- und Prüfarmen dargestellt, wobei sich der Prüfarm der CAO-94 und der Kontrollarm der CAO-04 im Therapieprotokoll gleichen. Dargestellt sind die Patientenzahlen für den jeweiligen Therapiearm in schwarzen Zahlen und das in dieser Arbeit ausgewertete Material in gelben Zahlen.

CAO/ARO/AIO-04

CAO/ARO/AIO-94

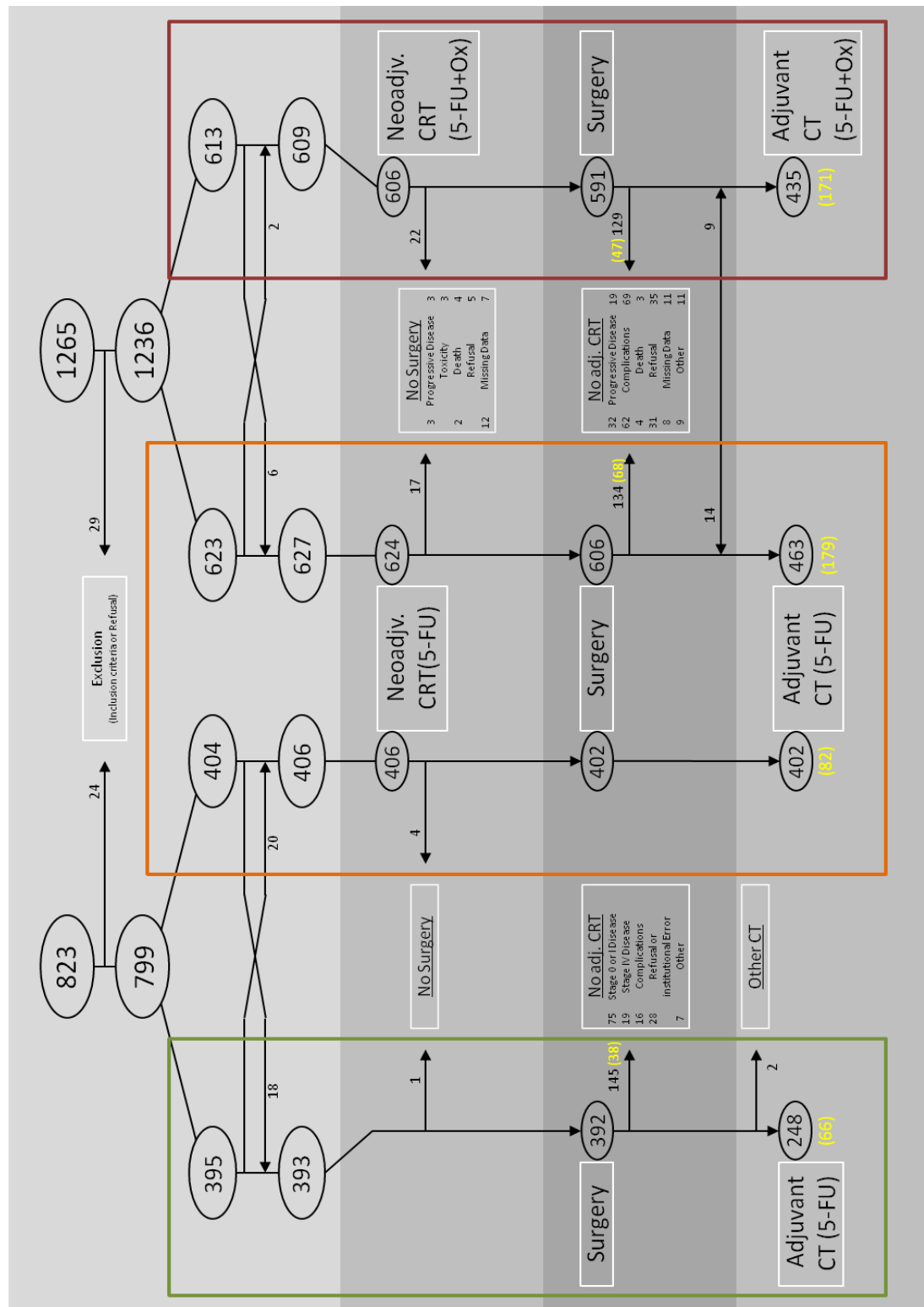


Abbildung 9: Kombiniertes Consort-Diagramm der CAO/ARO/AIO-Trials -94 & -04

Die Patientenzahlen in schwarz und die in dieser Studie untersuchten Resektatzahlen in gelb. Die drei farbigen Rahmen gruppieren die drei prinzipiell verschiedenen Therapiegruppen (Kontrollarm CAO-94 grün, Prüfarm CAO-94 & Kontrollarm CAO-04 orange, Prüfarm CAO-04 dunkelrot). Entsprechende Farben finden sich auch in folgenden Tabellen wieder.

Aus dieser Grafik lässt sich ebenfalls erkennen, dass die hier eingeschlossenen Patienten nicht alle entsprechend ihrer Randomisierung therapiert wurden. Einige wurden im Verlauf in den anderen Arm gewechselt und ein recht großer Anteil wurde nicht adjuvant nachbehandelt. Genaue Zahlen und Gründe hierfür finden sich auch in Abbildung 9. Hierunter zählen beispielsweise:

- *Downstaging* nach erfolgter neoadjuvanter RCT auf ein Stadium UICC 0 oder 1,
- Hochstufung auf einen höhergradigen Tumor nach UICC (Progress, Metastasierung, etc.),
- Unverträglichkeiten und Nebenwirkungen der (neo-) adjuvanten (Radio-) Chemotherapie sowie perioperative Komplikationen,
- Tod.

Dies bedingt jedoch auch, dass Analysen bezüglich einiger klinikopathologischer Variablen (wie z.B. die Überlebensdaten zum Zeitpunkt des *Follow-Ups*) nicht einfach anhand des *Enrollments* korreliert werden dürfen, da eine fehlende adjuvante Therapie großen Einfluss ausüben kann. Daher werden im Folgenden neue, der tatsächlichen Therapie (*as treated*) angepasste und über beide Studien (sofern möglich) zusammenfassende Subgruppen erstellt:

- | | | | | |
|------------|------------------------|-------------------|----|-----------------|
| - A | CAO/ARO/AIO-94-Arm A = | | OP | adj. 5-FU |
| - B | CAO/ARO/AIO-94-Arm A = | | OP | |
| - C | CAO/ARO/AIO-94-Arm B = | neoadj. 5-FU | OP | adj. 5-FU |
| | CAO/ARO/AIO-04-Arm A = | neoadj. 5-FU | OP | adj. 5-FU |
| - D | CAO/ARO/AIO-04-Arm A = | neoadj. 5-FU | OP | |
| - E | CAO/ARO/AIO-04-Arm B = | neoadj. 5-FU + Ox | OP | |
| - F | CAO/ARO/AIO-04-Arm B = | neoadj. 5-FU + Ox | OP | adj. 5-FU + Ox. |

2.3.1 Das untersuchte Material der CAO-94-Studie

Das untersuchte Material stammt einerseits aus der multizentrischen Studie CAO/ARO/AIO-94 zum Rektumkarzinom. Von den über 800 ursprünglich vorgesehenen Patienten lag deutschlandweit Material von insgesamt 794 Patienten vor. Zu Analysezwecken forderten wir von den jeweiligen Zentren pro Patient einen tumortragenden Block an und erhielten Resektatblöcke zu 229 Patienten aus 5 Zentren (inklusive der bereits in Göttingen vorliegenden Fälle). Der geringe erhaltene Anteil begründet sich zum einen darin, dass Patientenmaterial bereits vernichtet wurde (nach Einhaltung der Archivierungsfrist von 10 Jahren). Zum anderen wurde teilweise durch die einzelnen Zentren vorselektiert, d.h. leere Paraffinblöcke oder TRG4-Material wurden nicht versandt. Zudem waren einige Zentren leider nicht zu einer Kooperation bereit oder das Material fiel höherer Gewalt zum Opfer (Elbehochwasser in Dresden). Eine Auflistung der beteiligten Zentren findet sich im Anhang unter 6.2 Kooperation mit den Zentren der CAO-94.

2.3.2 Das untersuchte Material der CAO-04-Studie

Andererseits wurde aus der multizentrischen Studie CAO/ARO/AIO-04 Material rekrutiert. Von den vorgesehenen Patienten lag deutschlandweit auf 88 Zentren verteilt Material von 1197 Patienten vor. Wir erhielten davon 609 Tumorresektatblöcke aus 58 Zentren (inklusive der bereits in Göttingen vorliegenden Fälle). Eine Liste der beteiligten Zentren findet sich auch hier im Anhang bei 6.3 Kooperation mit den Zentren der CAO-04.

2.3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine spezielle Form der Färbung von Schnittpräparaten, bei der über einen Zwischenschritt Proteine oder Peptide nachgewiesen werden können. Der Vorteil liegt in der großen Spezifität der verwendeten Antikörper, was eine genauere Erkennung der (eventuell in geringen Mengen vorliegenden) Epitope (Antigene) ermöglicht. Die speziell zur Erkennung der ausgewählten Epitope verwendeten Antikörper (Primärantikörper) binden an

das jeweilige Antigen und werden dann über weitere Schritte selbst nachgewiesen. Dies kann auf folgende Weisen geschehen:

- direkt: Der Primärantikörper ist selbst markiert und kann histochemisch lokalisiert werden
- indirekt: Hierbei wird der Primärantikörper nicht selbst beobachtet, sondern das (verstärkte) Signal, das durch die Bindung eines Sekundärantikörpers an den Primärantikörper ermöglicht wird

Die häufiger verwendete Form ist die indirekte. Der Vorteil liegt hier vor allem in der Möglichkeit der Amplifikation des Signals und somit der Darstellbarkeit auch weniger Moleküle im Präparat. Die Idee dahinter ist, dass immer nur ein Primärantikörper an das gesuchte Epitop binden kann, man diesen aber so konfigurieren kann, dass an ihm mehrere Sekundärantikörper haften und somit das Signal deutlich verstärken können (Junqueira et al. 2004; Plattner und Hentschel 2011).

2.3.4 Her2/neu-spezifische Immunhistochemie

Die für die Identifizierung des Her2-Rezeptors genutzten Primärantikörper sind monoklonale Kaninchen-Antikörper, die speziell für die Färbung von formalinfixierten, paraffingebetteten, normalen und neoplastisch veränderten Geweben entwickelt wurden und gegen die interne Domäne des c-erbB 2 Onkoproteins (HER2) gerichtet sind. Die Zwei-Schritt-Polymer-Methode besteht dann weiter in der Zugabe des Detektionssystems, bei dem Horseradish/Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (HRP-SA) aufgebracht werden, danach folgt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sowie Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Der HRP-SA ist gegen den Primärantikörper gerichtet, bindet extrem spezifisch und bietet durch die vielfach konjugierten HRP-Moleküle gute Reaktionsmöglichkeiten für die weiteren Reagenzien.

Das DAB wird durch die antikörpergekoppelte Peroxidase unter Oxidation des Wasserstoffperoxids braun ausgefällt. Diese Färbung wird dann lichtmikroskopisch erfasst und evaluiert.

Da DAB und H₂O₂ mit jeder Peroxidase reagieren können, also auch mit solcher in Normalgewebe (z.B. in Lysosomen, etc.), muss jede Peroxidase vor Zugabe des sekundären Färbekomplexes gehemmt werden, so dass am Ende auch spezifisch nur die gebundene Peroxidase zur Färbereaktion genutzt werden kann. Dies geschieht hier über den UltraView Peroxidase Inhibitor.

Die indirekte Zwei-Schritt-Polymer-Methode ist hochsensitiv und markiert auch geringe Mengen des Her2 Rezeptors durch Amplifikation des Signals. Dies geschieht hier, wie bereits beschrieben, durch die mehrfach mit HRP konjugierten Sekundärantikörper, die multipel DAB umsetzen und somit färben können.

2.3.5 Anfertigung der histologischen Schnitte

Von den paraffingebetteten Resektatblöcken wurden unter Nutzung des Schlittenmikrotoms Microm HM 430 (MICROM International, Walldorf, Deutschland) in Schichtdicken von 2 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden im Wasserbad auf die Wasseroberfläche gelegt und mit Glasobjektträgern (STAR FROST Microscope slides, Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Ebermünde, Deutschland) herausgehoben, danach folgte eine kurze Expansionsphase auf einer Wärmeplatte und die Trocknung über Nacht im 40° Celsius - Wärmeschrank (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland).

2.3.6 Färbung und Fertigstellung

(Die im Folgenden beschriebenen Chemikalien entstammen mit Ausnahme des Ethanol und Xylols der Firma Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Die Färbung erfolgte nicht manuell, sondern automatisiert unter standardisierten Bedingungen. Hierfür kam der Färbeautomat Ventana IHC Benchmark XT (Ventana, Tuscon - Arizona, USA) zum Einsatz. Die Verwendung einer automatisierten Färbung liefert den Vorteil des gleichbleibend guten und weniger fehleranfälligen Ergebnisses in Qualität und Quantität in und auch zwischen den verschiedenen Schnitten.

Auf Entparaffinierung folgte die Antigendemaskierung mit einem *Cell Conditioner* (Cell Conditioning 1 (CC1)), welcher die verbesserte Antigenpräsentation durch Lösung der durch das Paraffin verursachten Bindungen im Gewebe ermöglicht.

Im nächsten Schritt wurde dann der Primärantikörper (PATHWAY HER2/neu (4B5)) appliziert und für 32 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der Detektionskomponenten (ultraView Universal DAB Detection Kit) erfolgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (Hämatoxylin II) über 12 Minuten und anschließend das *Bluing* (Bluing Reagent) über 4 Min. Danach wurden die Objektträger mit Waschlösung gespült, in aufsteigender Alkoholreihe mit Xylol (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande) entwässert und abschließend mit Vitro Clud (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) und Deckgläsern (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) eingedeckt.

2.3.7 IHC-Auswertung

Die Auswertung der angefertigten Gewebeschnitte wurde nun anhand eines etablierten *Scoring*-Systems durchgeführt, das für Mamma- und Magenkarzinome entwickelt und durch Rüschoff et al. modifiziert wurde (Rüschoff et al. 2010a). Anwendung hat dieses *Scoring* bereits in Nachuntersuchungen zur ToGA-Studie gefunden, in der die Positivitätsrate des Her2-Status erhöht werden konnte (Bang et al. 2010). Zudem wurde es auch in der Auswertung der Rektumkarzinome in unserer Forschergruppe (Conradi et al. 2013) genutzt.

Die genauen Kriterien für die Nutzung dieses Scorings beim Rektumkarzinom differieren leicht von denen bei Mammakarzinomen und entsprechen denen für das Magenkarzinom.

Um die Gewebeschnitte überhaupt auswerten zu können, ist für gewonnene Biopsien eine Mindestzahl von ≥ 5 Tumorzellen im Verband und im Resektat nicht weniger als 10 % der Tumorzellen als membrangefärbt gefordert (sog. *Area-Cut-Off*).

Desweiteren ist vorgesehen, dass nur Zellen einbezogen werden dürfen, die an den Interzellularkontakten Membranfärbung aufweisen. Zirkularität der Färbung ist kein Kriterium, da Drüsenzellen am luminalen Pol keine Rezeptorexpression aufweisen. Rein basale, luminale, nukleäre, cytoplasmatische oder granuläre Anfärbungen dürfen nicht einbezogen werden, diese kommen ebenfalls bei intestinalen Metaplasien vor.

Dies ist nun Voraussetzung für das folgende, von Rüschoff et al. (2010) als „Objektivregel“ eingeführte Verfahren (mit Bildbeispielen in Abbildung 10):

1. Die **IHC 3+** - Wertung erhalten all diejenigen gefärbten Gewebe, die im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 2,5x bis 5x gut als lineare Membranfärbung erkennbar sind im Sinne einer starken Färbung **(d)**.
2. Für die **IHC 2+** - Wertung gilt dies bei einer Objektivvergrößerung von 10x bis 20x **(c)**.
3. Als **IHC 1+** wird derjenige Gewebeschnitt klassifiziert, der erst bei einer Objektivvergrößerung von 40x als gefärbt identifiziert werden kann und sehr schwache Färbungen aufweist **(b)**.
4. **IHC 0** gilt für alle nicht gefärbten Präparate, Biopsien mit weniger als 5 Tumorzellen und Resektate mit < 10 % gefärbtem Tumoranteil **(a)**.

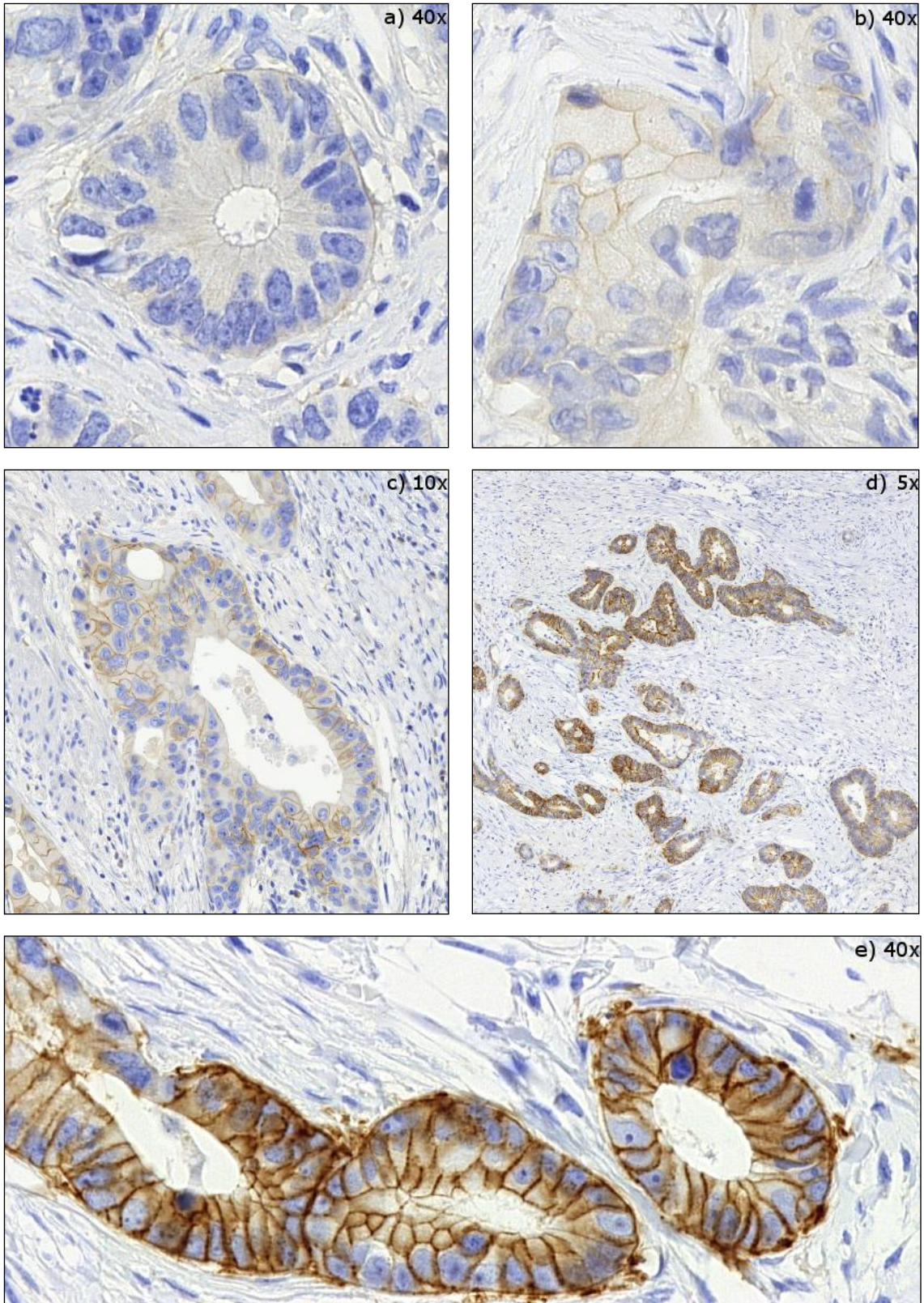


Abbildung 10: Mikroskopische IHC-Klassifikation (Objektivregel nach Rüschoff)

a) keine Färbung bei 40x Objektiv = IHC 0; b) gefärbte Membranen bei 40x Objektiv in >10% der Tumorzellen = IHC 1; c) gefärbte Membranen bei 10x Objektiv in >10% der Tumorzellen = IHC 2; d) gefärbte Membranen bei 5x Objektiv in >10% der Tumorzellen = IHC 3; e) 40x Vergrößerung des in d) gezeigten IHC3-Beispiels.

2.3.8 Prinzip der In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine Methode, die molekularbiologisch den Nachweis von RNA und DNA in Geweben, Zellen oder Metaphasechromosomen erlaubt. Dies geschieht durch spezifisch für den jeweiligen Zweck erstellte Sonden, die an das korrespondierende Basenpaar im DNA- oder RNA-Strang binden können. Da dies direkt an Gewebeschnitten der Präparate erfolgen kann, spricht man von In-situ-Hybridisierung.

Gene bestehen aus vielen (hundert) Nukleotiden in festgelegter Aufreihung. Das Verfahren setzt also voraus, dass die Nukleotidreihenfolge des gesuchten DNA-Abschnittes bekannt ist, in diesem Fall speziell das Her2-Gen. Hierfür liegen von der Firma Ventana bereits spezifische Sonden vor. Nach Auswaschung der nicht gebundenen Sonden liegen dann nur noch Sonden vor, die mit dem DNA-Strang hybridisiert sind. Um diese dann darzustellen, werden weitere Detektionskomponenten benötigt, so z.B. antikörpergekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Nukleotide oder andere Moleküle. Der Nachweis erfolgt also indirekt.

In Magenkarzinomen fand die Darstellung des Her2-Gens mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) statt. Jedoch zeigte sich, dass die Dual-in-situ-Hybridisierung (DISH) dieser Variante überlegen war (Rüschoff et al. 2010a). Conradi et al. nutzten 2013 bereits diese neue Form für Ihre Analysen. Der Vorteil liegt insbesondere in der besseren Vergleichbarkeit der IHC- und ISH-Gewebeschnitte. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da die IHC-Färbung und auch die Genamplifikation in solchen Tumoren extrem heterogen sein können. Ein direkter Vergleich ist also wichtig, um im jeweiligen Präparat die per IHC angefärbten Areale zu identifizieren und dann im ISH-gefärbten Präparat gezielt ansteuern zu können. Wie beschrieben nutzt die IHC-Auswertung Objektivvergrößerungen zwischen 2,5-fach und 40-fach. Für die FISH ist allerdings eine 100-fache Vergrößerung nötig. Hier zeigt sich der Vorteil einer lichtmikroskopischen DISH-Auswertung, da hier Objektive mit 20-, 40- oder 60-facher Vergrößerung genutzt werden können.

Die hier verwendete DISH fußt auf der Markierung des Her2-Gens und des Zentromers des 17. Chromosoms (Chr17Z). Die Sondierung fand mittels INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Ventana Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) statt, der spezifisch jeweils

diese beiden *Targets* ansteuert. Die korrekte Zuordnung der Signale ermöglichte dann je ein anderer Farbstoff:

- Her2-Gen: - ultraView SISH DNP Detection Kit (Ventana Roche
 Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
 - Dinitrophenyl-gekoppelte Sonde
 - ergibt lichtmikroskopisch ein isoliert schwarzes Signal

- Chr-17-Zentromer: - ultraView Red ISH DIG Detection Kit (Ventana Roche
 Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
 - Digoxigenin-gekoppelte Sonde
 - ergibt lichtmikroskopisch ein isoliert rotes Signal

Die Auswertung geschieht dann durch Relationierung der Anzahl der beiden farbigen Signale pro Zelle zueinander.

2.3.9 DISH-Färbeprotokoll

Die Gewebeschnitte wurden wieder analog zu dem bereits in 2.3.5 beschriebenen Verfahren angefertigt. Die weiteren Färbeschritte übernahm wieder der Ventana Benchmark XT vollautomatisch:

Citrat und eine Protease bereiten antigendemaskierend die Gewebeschnitte u.a. durch Denaturierung der DNA-Stränge vor. Danach folgt die Aufbringung des Sondengemisches und Inkubation zur Markierung der *Targets*. Nach Auswaschung der überzähligen Sonden wird dann zuerst das Detektionskit für das Her2-Gen aufgebracht und 20 min inkubiert, danach das Kit für das Chromosom-17-Zentromer für 32 min. Zuletzt erfolgt auch hier wieder eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (8 min) und im Anschluss das *Bluing* (4 min).

2.3.10 DISH-Auswertung

Die Auswertung der Dual-in-situ-Hybridisierung orientiert sich analog den IHC-Auswertungen ebenfalls an den Kriterien, die auch für das Mamma- und Magenkarzinom Anwendung fanden.

Um ein besser einschätzbares Ergebnis zu erreichen, bildet man aus der Summe der schwarzen (Her2-) Signale S und der Summe der roten (Chr17Z-) Signale R einen Quotienten Q. Diese Ratio lässt sich in folgender Formel darstellen:

$$Q = \frac{\sum S}{\sum R}$$

Die Zählung erfolgt dabei so, dass alle schwarzen und roten Signale aus 20 repräsentativen Zellen eines Tumorzellverbandes subsummiert werden.

Nach Berechnung mit oben stehender Formel ergibt sich ein Quotient, der dann nach folgendem schematischen Ablauf qualifiziert werden kann:

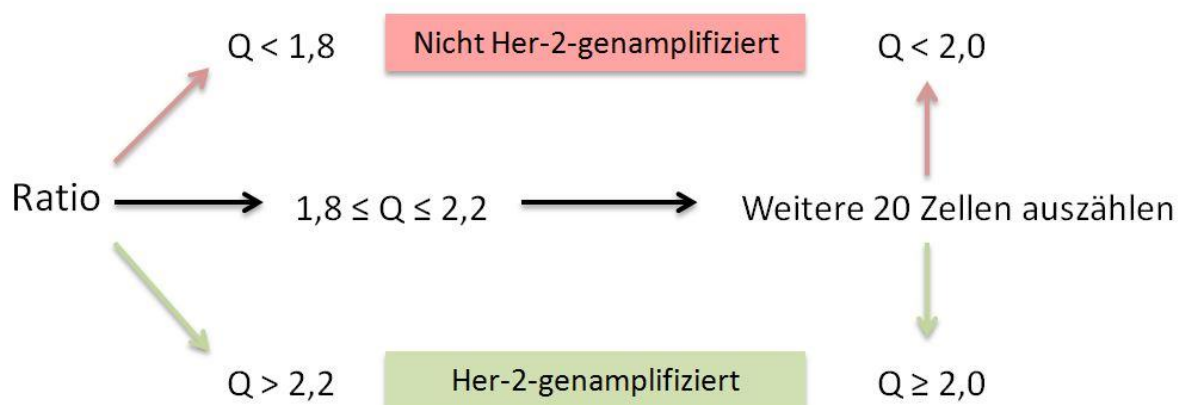


Abbildung 11: Entscheidungsbaum zur DISH-Auswertung

Werte zwischen 1,8 und 2,2 ergeben primär kein eindeutiges Ergebnis, daher müssen hier 20 weitere Zellen nach denselben Kriterien ausgezählt werden. Liegt die Ratio dann unter 2,0, gilt das Gen als nicht amplifiziert. Für Werte $\geq 2,0$ ist das Her2-Gen als amplifiziert anzusehen.

Nebst den bereits genannten Kriterien gelten noch weitere Regeln für die Auswertung der DISH-Analysen:

Es sollte immer eine Positivkontrolle erfolgen, bei der eine normale Zelle begutachtet und ausgezählt wird. Diese nicht entarteten Zellen weisen zumeist 1 oder 2 Signale des Her2-Gens bzw. des Chr17Z auf.

Die zu analysierenden Zellkerne dürfen keine sogenannten *Bubbles* enthalten, wie sie bei Unterfixierung des Gewebes auftreten können. Färbefehler oder Fixierungsanomalien bedürfen einer Neufärbung des Präparates.

Im Gewebeschnitt muss ein Tumorareal mit mindestens 20, besser 40 oder mehr Tumorzellen gefärbt und frei sichtbar sein. Überlagerungen durch andere Zellen oder Artefakte, die zu Verzerrungen führen, dürfen das Blickfeld nicht stören. Dieses Areal ist idealerweise im korrespondierenden IHC-2-Präparat auszuwählen und im ISH-Präparat dann erneut aufzusuchen.

Die Qualität der Tumorzellen wird wie folgt beurteilt: Red-ISH- und Silver-ISH-Signale sollen in der Mehrzahl der Tumorzellen im Zielbereich vorhanden und gut erkennbar sein. Überlappungen unter den Zellkernen führen zum Ausschluss dieser Zellen. Es ist zudem zu beachten, dass die Signale alle in etwa gleich groß sind. Größenvariationen können Färbungsanomalien darstellen oder auch durch Verunreinigungen hervorgerufen werden, solche Zellkerne sind ebenfalls nicht einzubeziehen (Conradi et al. 2013).

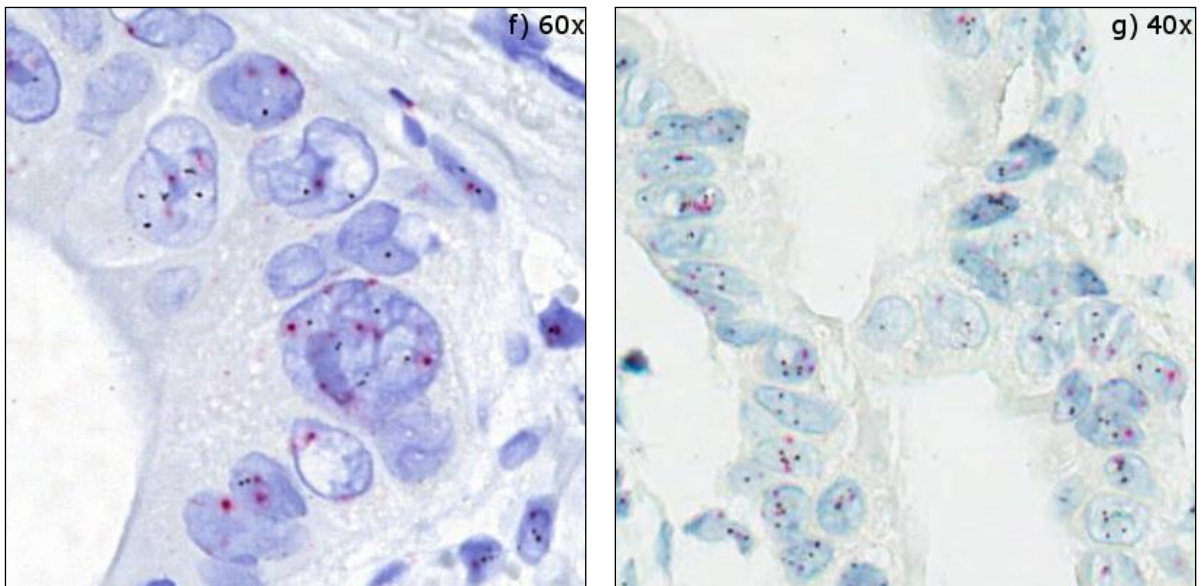


Abbildung 12: ISH-Mikroskopie

f) ISH-Mikroskopie bei 60x Vergrößerung, hier ein nicht Her2-amplifiziertes Präparat (z.B. großer Zellkern in der Bildmitte: mind. 5 schwarze Signale & mind. 6 rote Signale = Ratio 0,83).

g) ISH-Mikroskopie bei 40x Vergrößerung, hier ein Beispiel aus einem Her2-amplifizierten Präparat (z.B. Zellkern unten rechts: mind. 3 schwarze Signale & 1 rotes Signal = Ratio 3,0).

Bei der Färbung kann es in einigen Fällen auch zu Färbeartefakten der Chromosom-17-Sonde kommen, was dazu führt, dass in den meisten Zellen eines Präparates nur ein rotes Signal vorhanden ist. Dies führt letztendlich dazu, dass in der Auswertung nach Ratio zu viele Präparate positiv gezählt werden.

Daher wurden in dieser Arbeit alle als positiv gewerteten Präparate nochmals auf ihren *Gencount* (Anzahl der schwarzen Her2-Sonden) überprüft. Geht man davon aus, dass jede nach Ratio positive Zelle 2 rote und mindestens 4 schwarze Signale aufweist (Ratio >2,0), so ist jede schwarze Signalvermehrung (>4) unabhängig von der Anzahl der roten Signale als Amplifikation zu verstehen (Beispiel 2 Rote & 5 Schwarze = Ratio 2,5).

Alternativ könnte man sich auch entscheiden, für alle Zellen die Anzahl der roten Signale auf 2 festzulegen, was automatisch alle Präparate mit 4 oder weniger schwarzen Signalen als per Ratio negativ klassifiziert.

Der Sinn der Gencount-Analyse liegt primär im Ausschluss von Präparaten, die auf Grund von Färbeanomalien (fälschlicherweise) nur ein rotes Signal aufweisen. Solche Zellen enthalten weiterhin die normale Anzahl an schwarzen Signalen, werden in der Ratio aber (fälschlicherweise) positiv dargestellt.

Angenommen eine Zelle hätte bei korrektem Färbeverhalten 3 schwarze und 2 rote Signale = Ratio 1,5 = negativ. Ein Färbeartefakt mit nur einem roten Signal würde hier allerdings zum Verhältnis 3 zu 1 führen = Ratio 3,0 = positiv).

Wir entschieden uns daher, alle untersuchten und Ratio-positiven Fälle per Gencount nochmals zu selektieren. Bei einem Durchschnittswert von 4 oder größer erfolgte die endgültige Positiv-Wertung. Alle initial Ratio-positiv gezählten Fälle, die einen Gencount von unter 4 aufwiesen, wurden endgültig negativ gewertet. Alle angegebenen Positivitäten sind durch diesen Algorithmus entstanden.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Bearbeitung erfolgte in freundlicher Kollaboration mit Prof. Dr. Tim Beißbarth aus der medizinischen Statistik der Universitätsmedizin Göttingen.

Die Korrelationen des Her2-Status mit kliniko-pathologischen Parametern erfolgten mittels Chi-Quadrat-Test (WAENT 2008) und Exact-Fisher-Test (Fisher 1922).

TTR und CSS in Korrelation zum Her2-Status wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte hierbei mittels Logrank-Test.

Das Signifikanzniveau aller statistischen Auswertungen wurde auf 5% festgesetzt ($p < 0,05$). Als Software zur Durchführung der Analysen kam „R“ in der Version 3.1.1 zum Einsatz und Überlebensdaten wurden mittels R-package-Survival berechnet (RDC 2008).

3. Ergebnisse

3.1 Das analysierte Kollektiv

In **Subgruppe A** untersuchten wir also Material von 66 **nach OP adjuvant** (RCT, 5-FU) behandelten Patienten mit einem Durchschnittsalter von 60,2 Jahren. Von diesen waren 40 männlich, 26 weiblich. Der Großteil der Tumoren war mit 80,3 % im unteren und mittleren Rektumdrittel lokalisiert. Die Resektion fand in Abhängigkeit von der Tumorphöhe in 19 Fällen (28,8 %) mittels abdomino-perinealer Exstirpation (APE) statt. Sechs mal (9,1 %) wurde intersphinkitär abdomino-perineal (APR) reseziert und in 41 Fällen (62,1 %) wurde eine tiefe anteriore Rektumresektion (TARR) durchgeführt.

Nach einer mittleren *Follow-Up*-Zeit von 110 Monaten (9,2 Jahre) lebten noch 39 Patienten (59,1 %), 27 verstarben (40,9 %). Unter den verstorbenen Patienten fand sich in 17 Fällen (63,0 %) ein Rezidiv des Tumorleidens als Ursache.

Rein operativ versorgt (Subgruppe B) blieben 38 Patienten eines durchschnittlichen Alters von 64,2 Jahren, 23 davon männlich und 15 weiblich. Eine adjuvante Nachbehandlung war beispielweise im Rahmen eines niedrigen Tumorstadiums (im OP-Präparat) nicht indiziert. Der Großteil (89,5 %) der Tumoren war dabei im unteren oder mittleren Rektumdrittel lokalisiert und wurde in 11 Fällen (28,9 %) mittels APE, in einem Fall (2,6 %) mittels APR und bei 25 Patienten (65,8 %) durch TARR reseziert.

Die mittlere *Follow-Up*-Zeit betrug hier 92 Monate (7,7 Jahre) und zum Zeitpunkt der Erhebung lebten noch 20 Patienten (52,6 %). Bei 7 der 17 verstorbenen Patienten war ein Rezidiv ursächlich.

In **Gruppe C** fassten wir hier 261 Patienten zusammen, die eine **neoadjuvante RCT erhielten und nach Operation adjuvant** (jeweils mit 5-FU) nachbehandelt wurden. Der Altersdurchschnitt der 188 männlichen und 73 weiblichen Patienten lag bei 63,0 Jahren. 86,2 % der Tumoren konnten dem unteren oder mittleren Rektumdrittel zugeordnet werden. 75 Patienten (28,7 %) wurden einer APE, 14 (5,4 %) einer APR und 165 (63,2 %) einer TARR zugeführt. Sechs mal (2,3 %) wurde mittels anteriorer Rektumresektion (ARR) operiert.

Nach einer mittleren *Follow-Up*-Zeit von 4,6 Jahren waren 68 Patienten verstorben, wovon 67,7 % auf Grund eines Rezidivs verstarben.

Gruppe D umfasst nur Patienten, die eine **neoadjuvante RCT mit 5-FU** erhielten und dann einer **OP** unterzogen wurden. Die adjuvante Therapie wurde ausgesetzt (Abbruch auf Patientenwunsch, wegen Nebenwirkungen, bei ausgeprägtem *Downstaging*). Diese Subgruppe enthält 68 Patienten eines mittleren Alters von 66,4 Jahren, davon 47 männliche und 21 weibliche. 85,3 % der Tumoren fanden sich im mittleren und unteren Rektumdrittel, wobei auch hier wieder nach Tumorlokalisation verschiedene OP-Techniken zum Einsatz kamen. 18 Patienten (26,5 %) erhielten eine APE, 3 eine APR (4,4 %), 45 eine TARR (66,2 %), 1 Patient eine ARR (1,5 %).

Nach durchschnittlich 2,9 Jahren Nachsorge lebten noch 41 Patienten (60,3 %), bei den 22 Verstorbenen (32,4 %) lag bei 15 (68,2 %) ein Rezidiv zugrunde.

Gruppe E: 47 Patienten (29 männlich, 19 weiblich) mit einem mittleren Alter von 66,6 Jahren wurden **neoadjuvant mit 5-FU und Oxaliplatin** vorbehandelt und dann einer **OP** unterzogen. Auch hier blieb die adjuvante Therapie wegen o.g. Gründe aus. 93,6 % der Tumoren fanden sich im mittleren und unteren Rektumdrittel, die Resektion wurde mittels APE (13 Fälle, 27,7 %) und TARR (33 Fälle, 70,2 %) durchgeführt.

Nach durchschnittlich 2,8 Jahren Nachsorge waren 9 Patienten (19,1 %) verstorben, 4 davon (44,4 %) durch ein Rezidiv.

Zuletzt lässt sich noch eine **Gruppe F** abgrenzen, in der sich 171 Patienten (125 männlich, 46 weiblich) eines mittleren Alters von 62,5 Jahren fanden, welche mit **neoadjuvanter RCT und adjuvanter Chemotherapie mit 5-FU und Oxaliplatin** behandelt wurden. 90,6 % der Patienten hatten einen Tumor des unteren oder mittleren Rektumdrittels, die Resektion fand in 40 Fällen (23,4 %) mittels APE, in 3 Fällen (1,8 %) mittels APR, in 122 Fällen mittels TARR (71,3 %) und in 4 Fällen (2,3 %) mittels ARR statt.

Die mittlere *Follow-Up*-Zeit lag hier bei 3,3 Jahren, wonach noch 137 Patienten (80,1 %) lebten. Ursächlich bei 17 (58,6 %) der 29 Todesfälle war ein Rezidiv.

	CAO/ARO/AIO-94				CAO/ARO/AIO-04			
	Adjuvante RCT (Arm A) N = 66	Keine Adjuvante RCT N = 38	Neoadjuvante RCT (Arm B) N = 82	Neoadjuvante RCT (Arm A) N = 179	Keine Adjuvante CT N = 68	Keine Adjuvante CT N = 47	Neoadjuvante RCT (Arm B) N = 171	
<u>Therapie</u> - neoadjuvant - OP - adjuvant	- OP 5-FU + RT	- OP -	5-FU + RT OP 5-FU	5-FU + RT OP 5-FU	5-FU + RT OP -	5-FU + Ox + RT OP -	5-FU + Ox + RT OP 5-FU + Ox	
<u>Alter (Jahre)</u> avg min – max	60,2 38,6 – 75,4	64,2 39,8 – 74,9	60,4 39,0 – 75,4	64,4 39,7 – 82,5	66,4 54,0 – 79,6	66,6 52,6 – 80,1	62,5 38,8 – 80,4	
<u>Geschlecht</u> weiblich männlich	26 (39,4%) 40 (60,6%)	15 (39,5%) 23 (60,5%)	21 (25,6%) 61 (74,4%)	52 (29,1%) 127 (70,9%)	21 (30,9%) 47 (69,1%)	18 (38,3%) 29 (61,7%)	46 (26,9%) 125 (73,1%)	
<u>Rektumdrittel</u> 0 - <6 cm 6 - <12 cm 12 - 16 cm N/A	23 (40,9%) 30 (47,0%) 13 (12,1%) 0	14 (47,4%) 20 (47,4%) 3 (2,6%) 1 (2,6%)	37 (53,7%) 34 (36,6%) 7 (4,9%) 4 (4,9%)	56 (31,1%) 98 (54,7%) 9 (5,0%) 16 (8,9%)	20 (29,4%) 38 (55,9%) 6 (8,8%) 4 (5,9%)	21 (44,7%) 23 (48,9%) 0 3 (6,4%)	55 (32,2%) 100 (58,5%) 6 (3,5%) 10 (5,8%)	
<u>OP-Methode</u> APE APR TARR ARR N/A	19 (28,8%) 6 (9,1%) 41 (62,1%) 0 0	11 (28,9%) 1 (2,6%) 25 (65,8%) 0 1 (2,6%)	30 (36,6%) 9 (11,0%) 42 (51,2%) 0 1 (1,2%)	45 (25,1%) 5 (2,8%) 123 (68,7%) 6 (3,4%) 0	18 (26,5%) 3 (4,4%) 45 (66,2%) 1 (1,5%) 1 (1,5%)	13 (27,7%) 0 33 (70,2%) 0 1 (2,1%)	40 (23,4%) 3 (1,8%) 122 (71,3%) 4 (2,3%) 2 (1,2%)	
<u>Follow-Up-Zeit (Jahre)</u> avg min – max	9,2 0,6 – 15,0	7,7 0,0 – 14,3	7,2 0,5 – 14,4	3,4 0,2 – 5,3	2,9 0,2 – 5,3	2,8 0,4 – 5,1	3,3 0,2 – 5,3	
<u>Follow-Up-Status</u> Lebt Tot Lost od. N/A	39 (59,1%) 27 (40,9%) 0	20 (52,6%) 17 (44,7%) 1 (2,6%)	44 (52,7%) 38 (46,3%) 0	146 (81,6%) 30 (16,8%) 3 (1,7%)	41 (60,3%) 22 (32,4%) 5 (7,4%)	37 (78,7%) 9 (19,1%) 1 (2,1%)	137 (80,1%) 29 (17,0%) 5 (2,9%)	
<u>Follow-Up Todesursache</u> Rezidiv/Metastasen Andere	17 (63,0%) 10 (37,0%)	7 (41,2%) 10 (58,8%)	27 (71,1%) 11 (28,9%)	17 (63,0%) 10 (37,0%)	15 (68,2%) 7 (31,8%)	4 (44,4%) 5 (55,6%)	17 (58,6%) 12 (41,4%)	

Tabelle 1: Die Subgruppen der Studien: prä- und postoperative Parameter 1

Die Tabelle zeigt die einzelnen Subgruppen aufgeschlüsselt nach Therapieregime, Alter, Geschlecht, Rektumdrittel, OP-Methode, *Follow-Up*-Zeit sowie –Status und Todesursachen.

3.2 Histopathologisches Tumorstaging

Bei allen operierten Patienten wurde nachfolgend das Resektat histopathologisch aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet.

	CAO/ARO/AIO-94				CAO/ARO/AIO-04			
	Adjuvante RCT (Arm A)	Keine Adjuvante RCT	Neoadjuvante RCT (Arm B)	Neoadjuvante RCT (Arm A)	Keine Adjuvante CT	Neoadjuvante RCT (Arm A)	Neoadjuvante RCT (Arm B)	
<u>Präop. TNM</u>								
cT1	0	1 (2,6%)	0	0	0	0	0	
cT2	7 (10,6%)	1 (2,6%)	2 (2,6%)	7 (3,9%)	3 (4,4%)	0	6 (3,5%)	
cT3	32 (48,5%)	22 (57,9%)	46 (59,7%)	162 (90,5%)	57 (83,8%)	41 (87,2%)	157 (91,8%)	
cT4	0	0	4 (5,2%)	9 (5,0%)	8 (11,8%)	6 (12,8%)	8 (4,7%)	
cTX bzw. N/A	27 (40,9%)	14 (36,8%)	25 (32,5%)	1 (0,6%)	0	0	0	
cN+	13 (19,7%)	3 (7,9%)	12 (14,6%)	134 (74,9%)	45 (66,2%)	32 (68,1%)	134 (78,4%)	
cN -	38 (57,6%)	30 (78,9%)	63 (76,8%)	44 (24,6%)	23 (33,8%)	15 (31,9%)	36 (21,1%)	
cN N/A	15 (22,7%)	5 (13,2%)	7 (8,5%)	1 (0,6%)	0	0	1 (0,6%)	
<u>Postop. TNM</u>								
pT1	0	1 (2,6%)	6 (7,3%)	8 (4,5%)	4 (5,9%)	4 (8,5%)	8 (4,7%)	
pT2	8 (12,1%)	22 (57,9%)	25 (30,5%)	63 (35,2%)	15 (22,1%)	7 (14,9%)	52 (30,4%)	
pT3	54 (81,8%)	13 (34,2%)	47 (57,3%)	100 (55,9%)	41 (60,3%)	30 (63,8%)	103 (60,2%)	
pT4	4 (6,0%)	1 (2,6%)	3 (3,7%)	8 (4,5%)	8 (11,8%)	4 (8,5%)	6 (3,5%)	
pTX bzw. N/A	0	1 (2,6%)	1 (1,2%)	0	0	2 (4,3%)	2 (1,2%)	
pN0	18 (27,3%)	31 (81,6%)	47 (57,3%)	114 (63,7%)	37 (54,4%)	31 (66,0%)	109 (63,7%)	
pN1	22 (33,3%)	1 (2,6%)	21 (25,6%)	44 (24,6%)	20 (29,4%)	9 (19,1%)	47 (27,5%)	
pN2	26 (39,4%)	5 (13,2%)	13 (15,9%)	21 (11,7%)	11 (16,2%)	5 (10,6%)	13 (7,6%)	
pNX bzw. N/A	0	1 (2,6%)	1 (1,2%)	0	0	2 (4,3%)	2 (1,2%)	
<u>Lymphknoten:</u>								
untersucht (avg.)	27,8	22,5	18,0	18,4	16,4	17,4	17,8	
befallen (avg.)	5,6	6,8	3,0	1,2	1,9	1,5	0,9	
Ratio b./u.	0,20	0,30	0,17	0,06	0,11	0,09	0,05	
<u>pUICC</u>								
pM0	64 (97,0%)	32 (84,2%)	77 (93,9%)	170 (95,0%)	58 (85,3%)	40 (85,1%)	160 (93,6%)	
pM1	2 (3,0%)	5 (13,2%)	4 (4,9%)	6 (3,4%)	10 (14,7%)	4 (8,5%)	6 (3,5%)	
N/A	0	1 (2,6%)	1 (1,2%)	3 (1,7%)	0	3 (6,4%)	5 (2,9%)	
<u>pUICC</u>								
I	0	22 (57,9%)	22 (26,8%)	55 (30,7%)	16 (23,5%)	7 (14,9%)	48 (28,1%)	
II	18 (27,3%)	8 (21,1%)	25 (30,5%)	56 (31,3%)	20 (29,4%)	23 (48,9%)	59 (34,5%)	
III	46 (69,7%)	2 (5,3%)	30 (36,6%)	62 (34,6%)	22 (32,4%)	11 (23,4%)	56 (32,7%)	
IV	2 (3,0%)	5 (13,2%)	4 (4,9%)	6 (3,4%)	10 (14,7%)	4 (8,5%)	6 (3,5%)	
N/A	0	1 (2,6%)	1 (1,2%)	0	0	2 (4,3%)	2 (1,2%)	
<u>R-Status</u>								
R0	63 (95,5%)	34 (89,5%)	76 (92,7%)	172 (96,1%)	61 (89,7%)	41 (87,2%)	155 (90,6%)	
R1	3 (4,5%)	0	1 (1,2%)	2 (1,1%)	3 (4,4%)	3 (6,4%)	8 (4,7%)	
R2	0	3 (7,9%)	4 (4,9%)	0	3 (4,4%)	2 (4,3%)	4 (2,3%)	
N/A	0	1 (2,6%)	1 (1,2%)	5 (2,8%)	1 (1,5%)	1 (2,1%)	4 (2,3%)	

Tabelle 2: Die Subgruppen der Studien: prä- und postoperative Parameter 2

Die Tabelle zeigt die einzelnen Subgruppen aufgeschlüsselt nach (histo-pathologischen) Tumorstadien prä- und postoperativ sowie den Resektionsstatus.

3.3 Her2-Expressionsmuster

Die Initiative zu dieser Studie war die Annahme, dass ein relevanter Anteil der Rektumkarzinome (im Stadium UICC II und III) Her2-Rezeptoren überexprimiert und dementsprechend theoretisch zugänglich für neue Therapiemöglichkeiten wäre.

Conradi et al. bewiesen dies 2013 bereits an einer kleineren Kohorte und hiermit soll nun die Validierung der Ergebnisse an einem sehr großen Kollektiv erfolgen.

Über die Kriterien für eine Her2-Amplifikation wurde bereits in den Kapiteln 2.3.7 und 2.3.10 eingegangen: Immunhistochemisch mit IHC Klasse 3 eingestufte Präparate sowie solche der IHC Klasse 2, die in der nachfolgenden SISH als amplifiziert bestätigt wurden, gelten als auf Genebene Her2-amplifiziert.

IHC Klasse 0 und 1 sowie Klasse 2 mit nachfolgend bestätigt negativer SISH gelten dementsprechend als nicht Her2-genamplifiziert. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 3 aufgestellt.

	CAO/ARO/AIO-94			CAO/ARO/AIO-04			
	Adjuvante RCT (Arm A)	Keine Adjuvante RCT	Neoadjuvante RCT (Arm B)	Neoadjuvante RCT (Arm A)	Keine Adjuvante CT		Neoadjuvante RCT (Arm B)
Her2 – Klassifizierung							
0	37 (56,1%)	16 (42,1%)	29 (35,4%)	82 (45,8%)	30 (44,1%)	21 (44,7%)	75 (43,9%)
1	5 (7,6%)	5 (13,2%)	10 (12,2%)	15 (8,4%)	2 (2,9%)	3 (6,4%)	10 (5,8%)
2-	16 (24,2%)	13 (34,2%)	35 (42,7%)	59 (33,0%)	24 (35,3%)	14 (29,8%)	60 (35,1%)
2+	4 (6,1%)	1 (2,6%)	5 (6,1%)	16 (8,9%)	7 (10,3%)	5 (10,6%)	17 (9,9%)
3	4 (6,1%)	3 (7,9%)	3 (3,7%)	7 (3,9%)	5 (7,4%)	4 (8,5%)	9 (5,3%)
= Her2-Positivitätsrate	= 8 (12,1%)	= 4 (10,5%)	= 8 (9,8%)	23 (12,8%)	12 (17,6%)	9 (19,1%)	26 (15,2%)

Tabelle 3: Die Subgruppen der Studien: Positivitätsraten der Her2-Expression

Die Tabelle zeigt die einzelnen Subgruppen und die jeweiligen endgültigen Positivitätsraten (rot).

Für die CAO-94 ließ sich in **20 der 186 (10,75%)** untersuchten Materialien eine Überexpression des Her2-Gens bestätigen. Für die Proben aus der CAO-04 war dies bei **70 von 465 (15,05%)** der Fall. Somit ergibt sich eine Gesamtpositivität von **13,82%**!

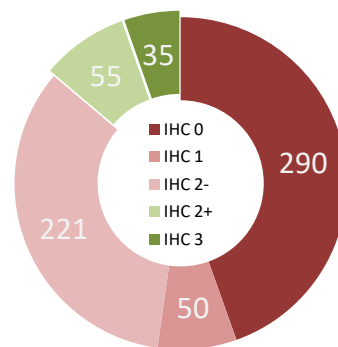
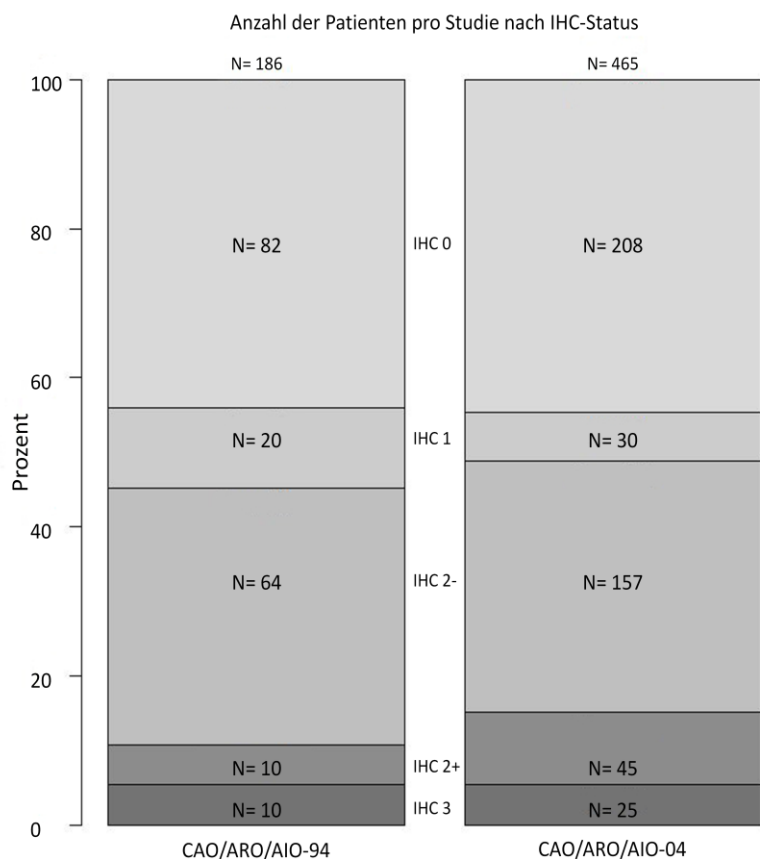


Abbildung 13: Her2-Status in Rektumkarzinomresektaten

Darstellung des Her2-Status aus 651 analysierten Rektumkarzinom-Resektaten nach Studie (links) und gesamt (oben).

3.4 Korrelation des Her2-Statuses mit klinikopathologischen Parametern

Betrachtet man die Ergebnisse aufgeteilt nach Her2-Amplifikation, so zeigen sich Geschlecht (männlich vs. weiblich: **p-Wert 0,906**) und Tumorhöhe (oberes vs. mittleres vs. unteres Rektumdrittel: **p-Wert 0,584**) in den Armen gleich verteilt.

Ebenso wenig konnten signifikante Unterschiede in Her2-Positivität oder -Negativität bezüglich des prätherapeutischen TNM (cT, cN) oder des postoperativen TNM (pT, pN, pM, pUICC) aufgezeigt werden:

- cT 1 vs. 2 vs. 3 vs. 4	p-Wert:	0,975
- cN + vs. -		0,504
- (y)pT 1 vs. 2 vs. 3 vs. 4		0,298
- (y)pN + vs. -		0,673
- (y)pM + vs. -		0,606
- (y)pUICC 1 vs. 2 vs. 3 vs. 4		0,499

Auch der Resektionsstatus blieb losgelöst von der Her2-Amplifikation, wobei in über 90% der Fälle ein R0-Status ermöglicht werden konnte (R0 vs. R1 vs. R2: **p-Wert 0,1**).

In Subgruppenanalysen der CAO/ARO/AIO-94-Studie war eine Her2-Positivität tendenziell mit prätherapeutisch positivem Nodalstatus vergesellschaftet (59 cN+ von 140 (Her2-negativ) versus 13 cN+ von 20 (Her2-positiv); **p-Wert 0,055**).

Abbildung 14 bis Abbildung 16 zeigen die Korrelation des (y)pUICC mit dem Expressionsstatus. Dabei zeigt sich weder für die Kombination der vorbehandelten bzw. nicht vorbehandelten Patienten ((y)pUICC, **p=0,335**), noch für die beiden Kohorten selbst (vorbehandelt ypUICC, **p=0,232** und nicht vorbehandelt pUICC, **p=0,823**) eine signifikante Korrelation. Demzufolge lässt sich vom Her2-Status nicht auf ein niedrigeres oder höheres (y)pUICC-Stadium schließen oder umgekehrt.

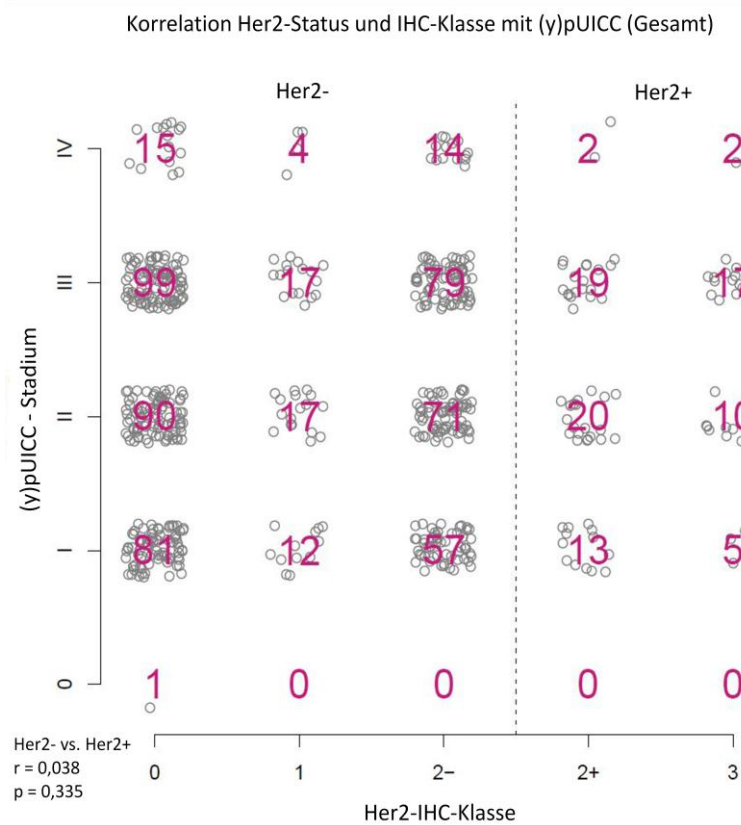


Abbildung 14: Her2-Status nach (y)pUICC

Die Abbildung zeigt den Her2-Status der gesamten Analysen in Korrelation zur postoperativen UICC-Klasse.

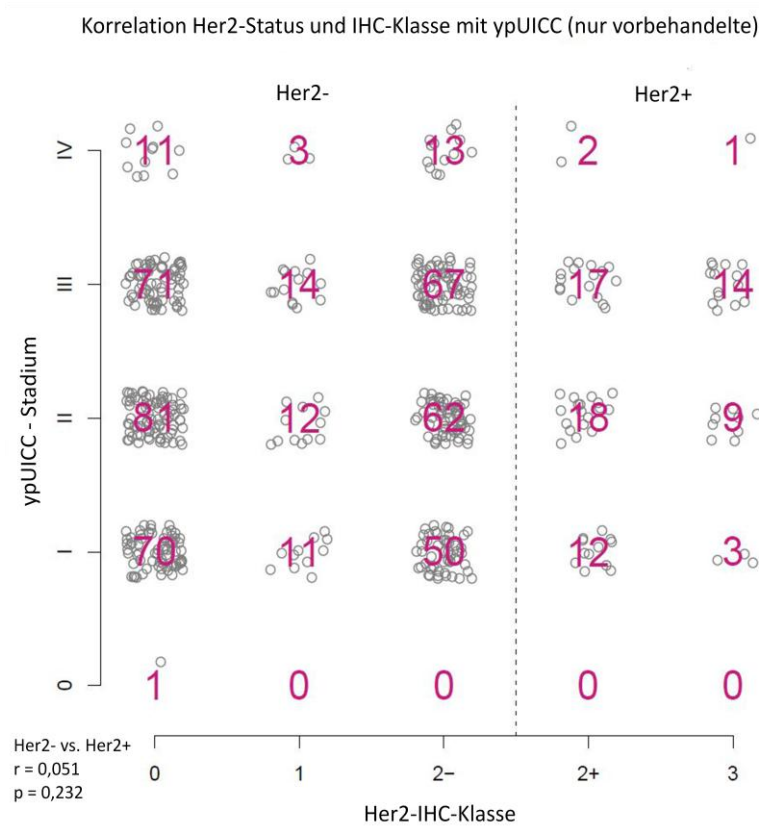


Abbildung 15: Her2-Status nach ypUICC

Die Abbildung zeigt den Her2-Status der vorbehandelten Patienten (5-FU und 5-FU+Ox) in Korrelation zur postoperativen UICC-Klasse.

Korrelation Her2-Status und IHC-Klasse mit pUICC (nur nicht vorbehandelte)

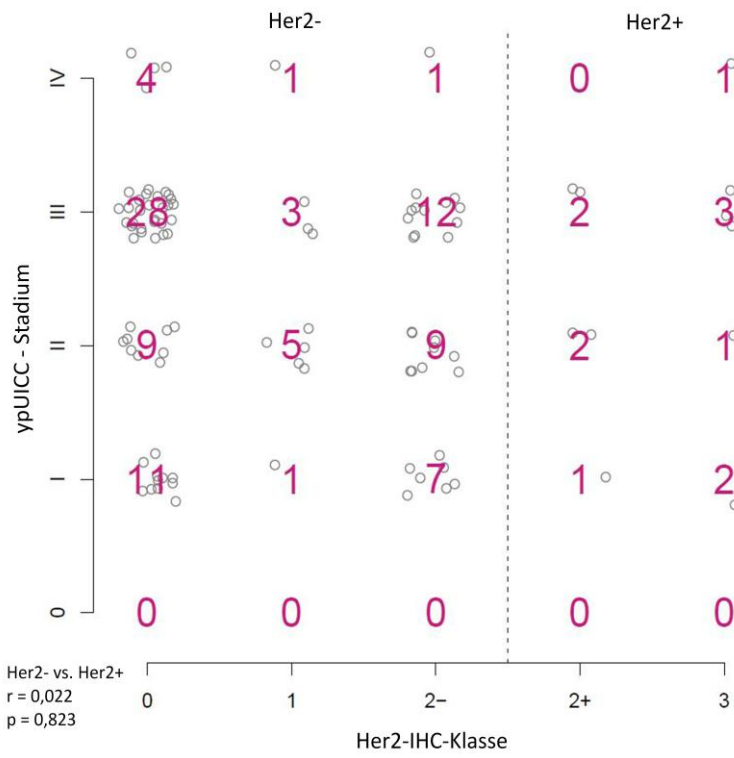


Abbildung 16: Her2-Status nach pUICC

Die Abbildung zeigt den Her2-Status der nicht vorbehandelten Patienten in Korrelation zur postoperativen UICC-Klasse.

3.5 Korrelation des Therapieregimes mit klinikopathologischen Parametern

Umfassende Analysen über die Effektivität einer neoadjuvanten Therapie wurden bereits in der CAO/ARO/AIO-94-Studie durchgeführt.

Auch die vorliegende Arbeit soll ein paar der relevanten Parameter dem Therapieregime gegenüberstellen. Dafür wurden die o.g. Subgruppen A und B (ohne neoadjuvante Therapie), C und D (neoadjuvante Therapie mit 5-FU) sowie E und F (neoadjuvante Therapie mit 5-FU und Oxaliplatin) zusammengefasst. Im Folgenden sind die erhaltenen p-Werte angegeben:

- APE vs. APR vs. ARR vs. TARR	p-Wert:	0,095
- pT1 vs. 2 vs. 3 vs. 4		0,452
- pN+ vs. pN-		<u>0,010</u>
o hier zusätzlich Unterscheidung der vorbehandelten (C+D+E+F) vs. nicht vorbehandelten (A+B) Subgruppen		<u>0,005</u>
- pM+ vs. pM-		0,713
- pUICC 1 vs. 2 vs. 3 vs. 4		0,086
- pUICC (1+2) vs. (3+4)		<u>0,013</u>
- Todesursache Rezidiv vs. Andere		0,224
- Her2-Status + vs. -		0,467

Die Ergebnisse zeigen, dass eine neoadjuvante Therapie signifikant Einfluss auf den Nodalstatus nimmt. Dabei scheint es vermutlich keine Rolle zu spielen, ob eine Therapie mit 5-FU oder 5-FU mit Oxaliplatin durchgeführt wurde (Nodal-negativ in der Gruppe 5-FU 60,4 % versus 65,4 % in der 5-FU + Oxaliplatin Gruppe; **p-Wert 0,235**).

Weiterhin konnte bestätigt werden, dass eine neoadjuvante Therapie signifikant Einfluss auf das postoperativ erhobene pUICC-Stadium nimmt, was im Einklang zum Nodalstatus steht. UICC I und II umfassen Tumorstadien, die weder nodal-positiv sind, noch Metastasierung vorweisen. Dem entsprechend geht eine signifikante Korrelation des Nodalstatus auch mit

einer signifikanten Korrelation im pUICC einher, was sich mit einem **p-Wert** von **0,013** ausdrückt.

3.6 Klinischer Langzeitverlauf

Ein wichtiger Faktor für den Patienten ist die Auskunft über die Prognose seiner Erkrankung. Ziel der Korrelationen ist die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem Her2-Status und der TTR (*time to recurrence*) sowie dem CSS (*cancer specific survival*). Beides ist in den folgenden Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

CSS steht dabei für die Überlebensrate (im Zeitverlauf), wobei nur krankheitsbedingte Sterbefälle als Ereignis berücksichtigt werden. Andere Todesursachen werden nicht einbezogen. Ein Absinken der Kurve bedeutet also den tumorbedingten Tod eines Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt.

TTR bezeichnet den Zeitraum bis zum Rezidiv; das bedeutet, die Kurve repräsentiert den Anteil an Patienten, die (im Zeitverlauf) rezidivfrei bleiben. Ein Absinken des Graphen bedeutet also ein Rezidiv eines Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Die beiden nachstehenden Kaplan-Meier-Graphen (Abbildung 17) veranschaulichen den zeitlichen Verlauf von TTR und CSS unter Einbeziehung des gesamten analysierten Kollektivs (651 Patienten), gesplittet in Her2-positive und –negative Patienten. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p= 0,658 / 0,516$).

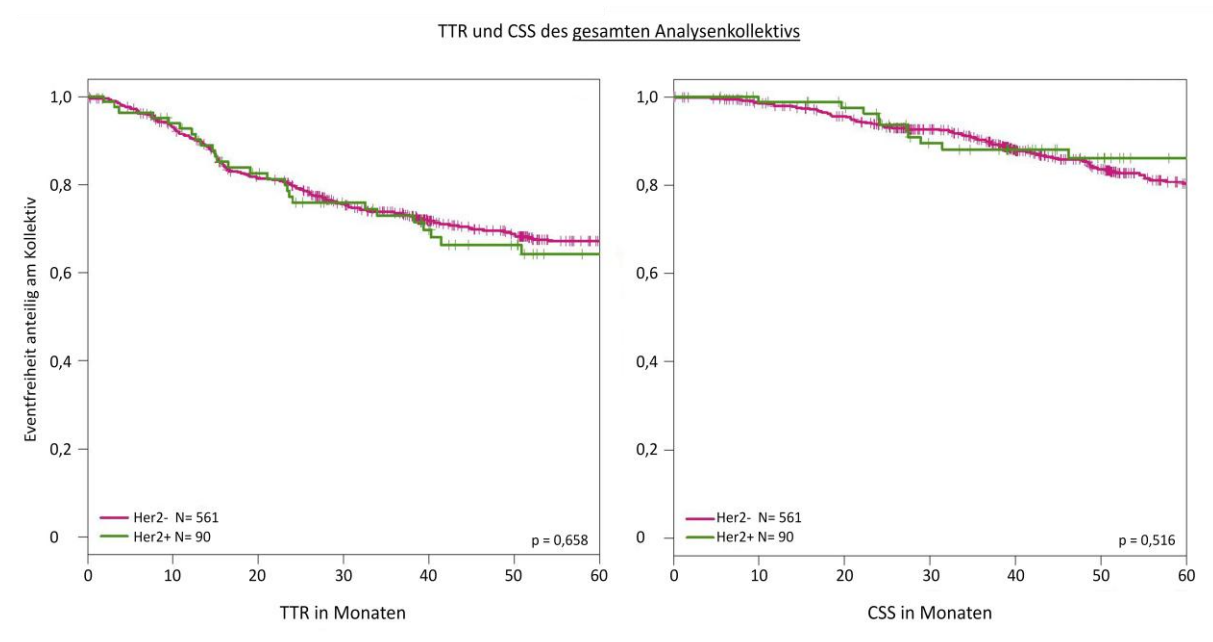


Abbildung 17: TTR und CSS gesamt

Die Abbildung stellt die Kaplan-Meier-Kurven für TTR und CSS des gesamten Analysenkollektivs dar. Es ist ersichtlich, dass die beiden Graphen für Her2-Positivität und –Negativität kaum auseinanderweichen.

Ebenfalls nicht signifikant stellt sich der Her2-Status als Parameter in TTR und CSS für die Subgruppe ohne neoadjuvante Therapie dar (Abbildung 18; $p = 0,446/0,368$).

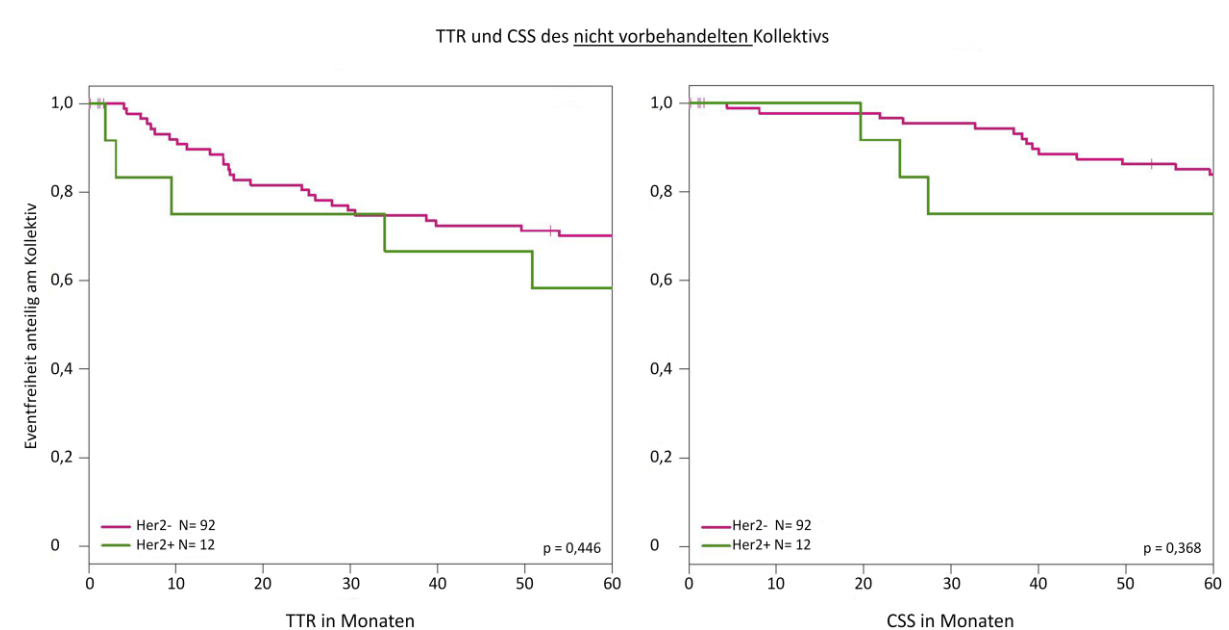


Abbildung 18: TTR und CSS des nicht vorbehandelten Kollektivs

Die Graphen zeigen für das nicht neoadjuvant behandelte Subkollektiv keinen signifikanten Unterschied. Jedoch stellt sich Her2-Positivität (grün) fast durchweg schlechter dar und bleibt unterhalb des roten Graphen (Her2-Negativität).

Für die neoadjuvant mit 5-FU vorbehandelten Patienten stellt sich auch die Rezidivfreiheit (TTR) nur leicht verbessert dar. Jedoch zeigte sich das CSS signifikant erhöht, wenn Her2-Positivität vorlag. Nach 55 Monaten lebten hier ca. 20% mehr Patienten als bei negativem Her2-Befund (Abbildung 19; $p=0,214$ / **0,046**):

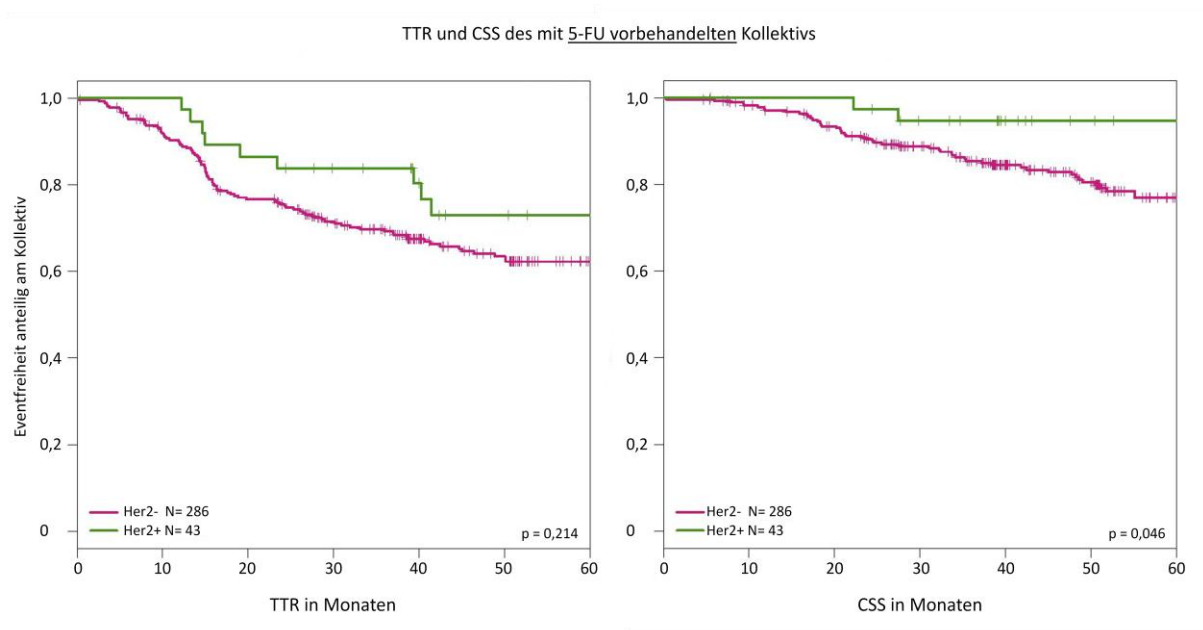


Abbildung 19: TTR und CSS des mit 5-FU vorbehandelten Kollektivs

Hier stellen sich die Graphen (der mit 5-FU neoadjuvant behandelten Patienten) für Her2-Positivität durchweg günstiger dar und verbleiben stets oberhalb des roten Graphen für Her2-Negativität. In der Grafik für CSS findet sich zudem ein signifikanter Unterschied ($p=0,046$).

Ein genau umgekehrtes Bild stellt sich bei Betrachtung der Gruppe mit intensiviertem neoadjuvanten Regime dar. Hier ist die Her2-Positivität in TTR und CSS der –Negativität sogar unterlegen. Signifikant zeigt sich dabei aber nur die TTR, die nach 55 Monaten ca. 15% weniger Rezidive bei Her2-Negativität aufzeigt (Abbildung 20; $p=0,025$ / 0,265).

TTR und CSS des mit 5-FU und Oxaliplatin vorbehandelten Kollektivs

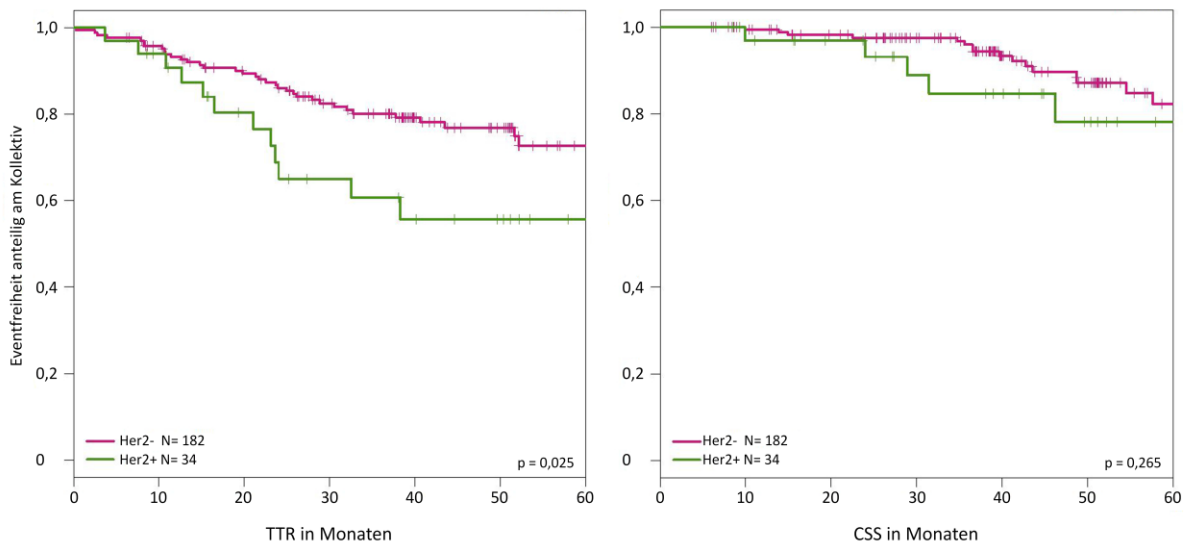


Abbildung 20: TTR und CSS des mit 5-FU und Oxaliplatin vorbehandelten Kollektivs

Die Kaplan-Meier-Kurven für die neoadjuvant mit 5-FU und Oxaliplatin vorbehandelten Patienten zeigen eine Signifikanz im TTR. In beiden Grafiken ist die Her2-Negativität stets oberhalb der Graphen für Her2-Positivität.

Zuletzt zeigt auch die Gegenüberstellung der 3 Therapieregime (je Her2-positiv und – negativ) keine signifikanten Zusammenhänge (Abbildung 21; $p = 0,249 / 0,278$):

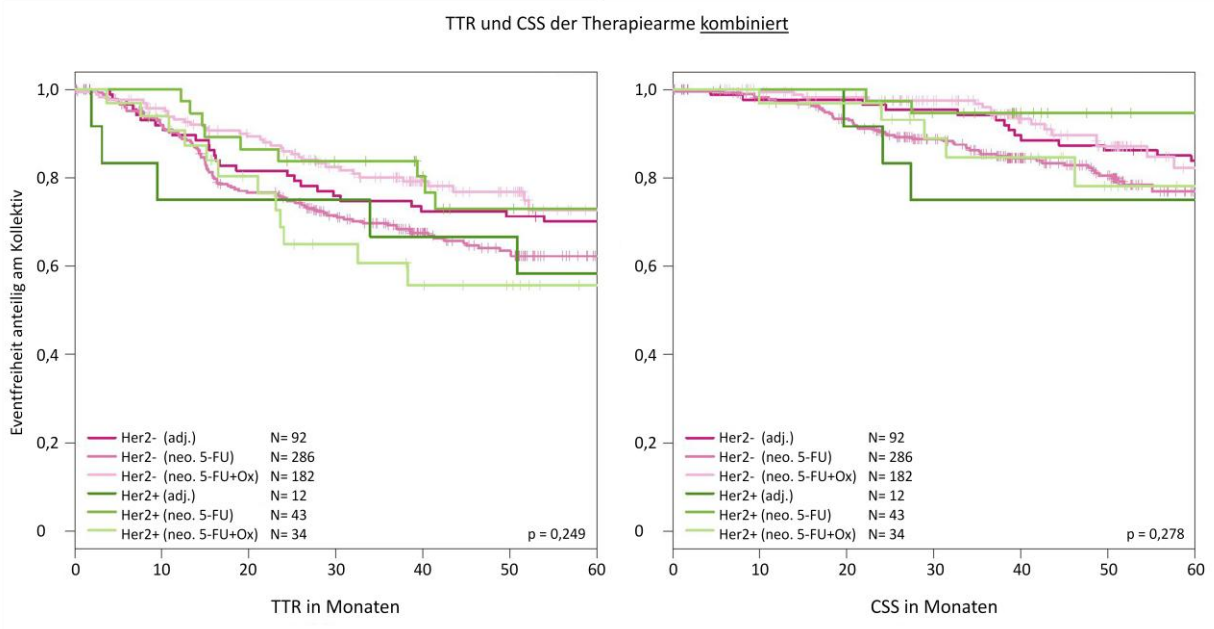


Abbildung 21: TTR und CSS der verschiedenen Therapiearme kombiniert

4. Diskussion

Her2-neu ist Mitglied der transmembranären Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren und wird als solcher bereits bei Mamma- und Gastrointestinaltumoren erkannt und als therapeutisches *Target* genutzt. Die vorliegende Arbeit soll nun die präliminären Ergebnisse unserer Forschergruppe an einem großen Kollektiv von Rektumkarzinomen validieren. Ziel war dabei die Etablierung von Her2-neu als individuell relevanten Biomarker, welcher prognostischen und/oder therapeutischen Wert besitzen kann, vor allem aber auch als therapeutisches *Target* mit der Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie.

4.1 Her2/neu im Rektumkarzinom

Die in dieser Arbeit untersuchten Biomaterialien sind alle im Rahmen der beiden Studien CAO/ARO/AIO-94 und -04 nach einheitlichen Richtlinien gesammelt worden. Angefordert wurden tumortragende Blöcke, wobei zu den meisten Patienten nur je ein Tumorblock vorlag. Inwiefern dieser kleine Ausschnitt bei bekannter Her2-neu-Heterogenität für den eventuell sehr großen Tumor repräsentativ sein kann, ist fraglich (Yang et al. 2012). So lag auch in unseren Analysen der durchschnittlich gefärbte Tumoranteil bei nur 33,02%.

Das größte Problem der Erhebung eines zuverlässigen und einheitlichen Positivitätsstatus (im Rektumkarzinom) liegt vermutlich an der Vielzahl an Analysemethoden und der differierenden Expertise der Untersucher. Daher liegt es nahe, dass bisherige Untersuchungen eine große Varianz in der Angabe um die Positivitätsraten des Her2-neu-Status eröffnen. Zudem wird meist vom kolorektalen Karzinom berichtet, was die Vergleichbarkeit weiter einschränkt.

In der bisherigen Forschung finden sich zumeist eher geringfügige Amplifikationsraten für Her2 sowohl im kolorektalen Karzinom als auch im Rektumkarzinom. Beispielsweise berichteten Marx et al. bei 1439 Patienten eine Amplifikationsrate von nur 2,5 % in

kolorektalen Karzinomen. Reduziert auf Rektum/Sigmoid gaben sie eine Positivitätsrate von rund 1,9 % an. Hier wurde mittels HercepTest™ gearbeitet und in der Unterscheidung der IHC 2+ eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung genutzt (Marx et al. 2010).

Liming et al. berichteten von einer Her2-Überexpression in 10,3 % der Rektumkarzinome (Fallzahl 54). Bei diesen Analysen wurde nur immunhistochemisch ausgewertet und keine Genamplifikation überprüft (Liming et al. 2011). Der höchste Wert findet sich bei Kluftringer et al mit 38% (Kluftringer et al. 1992).

Unsere eigene Forschergruppe hat bereits für 264 Rektumkarzinome eine Amplifikationsrate von 26,7 % nachgewiesen. Hierbei kamen dieselben Analysetechniken und Reagenzien zum Einsatz wie in der vorliegenden Arbeit sowie der etablierte Algorithmus wie beim Magenkarzinom (Conradi et al. 2013).

Die jetzt erhobenen Daten wurden von einer für Her2-Immunhistochemie und –DISH erfahrenen Pathologin überprüft. Zusätzlich wurden alle hiernach positiven Fälle (IHC 3 und IHC 2/DISH+) durch einen zweiten erfahrenen Pathologen nochmals kontrolliert.

Mit dieser Studie bestätigen wir an einem großen Kollektiv die Annahme, dass Rektumkarzinome in circa einem Siebtel der Fälle Her2-amplifiziert sind (13,82 %). Expressionsheterogenität und Gesamtamplifikationsrate zeigen sich mit der des Adenokarzinoms des Magens (Rüschoff et al. 2010a) und Ösophagus (Yoon et al. 2012) vergleichbar. Yoon et al. werteten 675 Ösophaguskarzinome aus und fanden eine Gesamtpositivitätsrate von 17 %. Daher wäre zu empfehlen, diese Variante des Her2-Scorings weiterhin anzuwenden. Die Ähnlichkeit legt zudem nahe, das *Scoring*-System auf andere Adenokarzinome des Gastrointestinaltraktes wie zum Beispiel im Kolon (und eventuell Pankreas) auszuweiten. Auswertungen nach den modifizierten ToGA-Kriterien liegen hier noch nicht vor, jedoch ergaben sich für das Kolon beispielsweise 15,5 % (Li et al. 2011) oder auch 12,5 % (Park et al. 2004) Her2-Überexpression bei alleiniger immunhistochemischer Analyse.

4.2 Her2/neu - Interaktionen

Wie bereits in 1.9.1 beschrieben, agiert der Her2-Rezeptor nicht allein. Vielmehr stellt die Interaktion mit anderen Rezeptoren der EGFR-Familie den aktiven Komplex dar, der dann zu intrazellulären Reaktionen führt. Hierbei sind besonders EGFR (Her1) und Her3 hervorzuheben. Her4 wurde bislang noch unzureichend untersucht, jedoch zeigte sich in kleinen Analysen zum kolorektalen Karzinom bereits ein recht aggressives Potential mit Tendenz zur Metastasierung (Kountourakis et al. 2006).

Untersuchungen zur Abhängigkeit der einzelnen EGFR-Mitglieder voneinander zeigten, dass beispielsweise die Tumorentstehung und -Progredienz von Her2-positiven Mammakarzinomen stark vom Vorhandensein des Her3 abhängt. In Zelllinien, in denen Her3 ausgeschaltet wurde, entstanden seltener (und weniger aggressive) Tumoren, auch wenn eine Her2-Überexpression vorlag. Zudem sprachen solche Tumoren auch besser auf Anti-EGFR-Therapie mit Lapatinib an. Nach Re-Expression des Her3-Rezeptors entwickelten die Zellen dann wieder ihr ursprüngliches Verhalten mit erhöhter Neigung zur Karzinombildung und Anti-EGFR-Therapie-Resistenz (Vaught et al. 2012).

Die Betrachtungen legen nahe, dass ein vermehrtes Vorhandensein der Rezeptoren der EGFR-Familie mit erhöhter Tumoraggressivität und schlechteren *Outcomes* einherzugehen scheint. Dabei ist nicht zwangsweise die gleichzeitige Überexpression zweier EGFR-Subtypen gefordert, eine zeitgleiche Überexpression ist sogar sehr selten. So fand sich in einer Her2/Her3-Studie zum Magenkarzinom zwar in 18,6% der Proben eine Her2- und in 13,7% eine Her3-Überexpression, jedoch gab es keinen einzigen Fall, in dem die beiden Rezeptoren synchron hochreguliert waren (Zhang et al. 2009). Sicher scheint jedoch zu sein, dass vermehrte Her2- oder Her3-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Begnami et al. 2011).

Es zeigt sich also, dass die isolierte Betrachtung von Her2 (oder einem der anderen Mitglieder der EGFR-Familie) nicht ausreichend erscheint. Die Interaktionen der Rezeptoren stellen die entscheidenden Schlüsselstellen dar und die Hemmung dieser Synergien ist ein vielversprechendes Gebiet zukünftiger Tumorthherapie. Banappagari et al. gingen hierbei

einen ersten Schritt und designten „Compound 5“. Dies ist ein Molekül, das die Dimerisierung von Her2 mit Her1 und Her3 verhindern kann. Es bindet dabei an die extrazelluläre Matrix von Her2 und inhibiert die Phosphorylierung der Kinase-Domäne, womit auch die Dimerisierung unterdrückt wird (Banappagari et al. 2012; Banappagari et al. 2013).

4.3 Her2/neu als Biomarker

Die EGFR-Familie präsentiert sich als durchaus geeignetes *Target* für eine zielgerichtete Anti-EGFR-Therapie. Hierfür muss der Her-Status aber am besten prätherapeutisch erhebbar sein, was momentan auf Grund der Heterogenität im Tumor schwierig erscheint. Conradi et al. bewiesen 2013, dass der Her2-Status in der (einen) prätherapeutischen Biopsie in etwa einem Fünftel der Fälle falsch negativ ausfällt. Es sollten also, ähnlich der Verfahrensweise beim Magenkarzinom, mehrere Biopsien aus dem Tumor entnommen und untersucht werden. Dort empfiehlt die S3-Leitlinie 6-8 Biopsien, um entsprechende Aussagekraft zu erreichen (Rüschoff et al. 2010b). Auch und vor allem bei negativem Her2-Status der Biopsien, sollte eine Aufarbeitung des Resektates erfolgen. Hier liegt ausreichend Material für endgültige Aussagen vor, so dass, im Falle einer Biopsie-Negativität aber Resektat-Positivität, eine adjuvante Therapie entsprechend angepasst werden kann.

Weiterhin ist bekannt, dass auch im Blutkreislauf freie (extrazelluläre) Her2-Domänen zirkulieren. Es zeigte sich leider keine Eignung als repräsentativer Screening-Marker für den Her2-Status des Primärtumors. Jedoch eröffnete sich, dass der plasmatische Her2-Spiegel einen frühen Indikator für Tumorprogress darstellt. Dabei korreliert der Anstieg/Abfall des Serumlevels mit dem Progress/Regress des Tumors unabhängig von der Therapie. Selbst wenn der Primarius Her2-negativ war, ist es möglich, dass ein Rezidiv bzw. eine (unentdeckte) Fernmetastase Her2-positiv ist. Besonders in solchen Fällen scheint die Überwachung des Serumlevels auf freie Her2-Domänen sinnvoll und könnte frühzeitig auf ein Rezidiv schließen lassen (Carney et al. 2013).

4.4 Her2/neu – Diagnostik

Es empfiehlt sich, für die Auswertungen die in dieser Arbeit angewandte Methodik zu nutzen. Die immunhistochemische Auswertung nach der Objektivregel analog zur ToGA-Studie stellt ein valides Tool zur Erhebung des IHC-Status dar (siehe auch Kapitel 2.3.7). Im Falle einer intermediären Färbung IHC 2 muss zur Positivitätsentscheidung eine Genanalyse erfolgen. FISH und DISH scheinen dabei gleichwertig zu sein (Jacquemier et al. 2013; Gao et al. 2014), solange bestimmte Qualitätskriterien gewahrt werden. Die FISH (als Goldstandard) wurde zwar in einigen Vergleichen als sensitiver dargestellt (Mansfield et al. 2013), jedoch ist das von uns verwendete Testsystem von Roche (Dual SISH) ebenbürtig. Neueren Erkenntnissen nach wäre auch eine PCR-Analyse (Polymerase-Kettenreaktion) zukünftig denkbar. Diese Art der Gen-Status-Ermittlung wäre einfach, kostengünstig, Untersucher-unabhängig und zuverlässig (Jacquemier et al. 2013).

Bei der ISH muss nun nach Auszählung der Signale entschieden werden, ob ein Präparat als positiv oder negativ zu werten ist. Dabei befinden sich diverse Algorithmen in der klinischen Praxis. Am meisten genutzt ist wohl derzeit die Bildung einer Ratio (Her2/Chr17) nach Auszählung einer bestimmten Anzahl von Zellen (20+) und Evaluierung in positiv/negativ anhand eines Cut-off-Wertes (bspw. 2,0). Derzeit wird auch diskutiert, ob nicht in bestimmten Fällen eine Entscheidung allein anhand oder in Kombination mit der durchschnittlichen Her2-Genkopiezahl der Tumorzellen getroffen werden kann. Die Genkopiezahl gibt dabei an, wie oft das Her2-Gen in der Zelle vorhanden ist, ohne dies ins Verhältnis der eventuell vorhandenen Polysomie zu setzen. Daraus ergibt sich, dass auch polysome Zellen mit multiplen Chr17- und Her2-Signalen zwar per Ratio negativ gezählt würden, anhand der Genkopiezahl aber durchaus als Her2-positiv zu werten wären. Erst kürzlich wurde aufgezeigt, dass die Differenzierung der IHC-Klassifizierung mittels Genkopiezahl teils besser möglich ist, vor allem in der Trennung der IHC0/1 von IHC2/3 sei die Genkopiezahl sensitiver (Kumarasinghe et al. 2014).

Zusammenfassend betrachtet besteht in Anlehnung an das Verfahren beim Magenkarzinom zurzeit die Empfehlung für ein auf Her2-Status zu beurteilendes histologisches Präparat:

1. Immunhistochemische Klassifizierung in negative (IHC 0/1), positive (IHC 3) und intermediäre (IHC 2) Fälle. Hierfür gilt die Objektivregel nach Rüschoff.

2. Weitere Aufbereitung der IHC 2 - Fälle mittels (FISH oder) DISH und Auszählung von mindestens 20 zusammenhängenden und auswertbaren Tumorzellen.

- Dabei Trennung in negativ ($R < 1,8$), positiv ($R > 2,2$) und intermediär ($1,8 \leq R \leq 2,2$).
- Im Falle eines wiederum intermediären Befundes Auszählung 20 weiterer Zellen und Bildung der Gesamtratio. Dabei Trennung in negativ ($R < 2,0$) und positiv ($R \geq 2,0$)

Letztlich erhält man 2 Gruppen: Her2-negativ (IHC 0, 1, 2-) und Her2-positiv (IHC 2+, 3). Dabei ist zu beachten, dass hier eine gewisse Expertise für die korrekte Auszählung und das Erkennen von Färbeartefakten notwendig ist.

4.5 Prognostische Relevanz einer Her2-Überexpression

Die Daten dieser vorliegenden Studie lassen zum Teil gegensätzliche Schlussfolgerungen zu. Es konnte gezeigt werden, dass im Subkollektiv der neoadjuvant vorbehandelten Patienten signifikante Unterschiede in TTR und CSS bestehen.

So stellte sich Her2-Positivität nach 5 Jahren Beobachtungszeitraum (60 Monate; 5-Jahres-Überleben = CSS) als signifikant prognostisch günstiger heraus (ca. 75 % Her2-negativ gegenüber 95 % Her2-positiv). Beim TTR (auch DFS, *disease free survival*) wurde nur ein Trend ersichtlich (ca. 70 % der Her2-Positiven gegenüber 60 % der Her2-Negativen). Letztendlich verbleibt die Kurve der Her2-Positiven Patienten in CSS und TTR stets oberhalb derer der Her2-Negativen. Das bisher Genannte bezog sich auf die Gruppe der mit 5-FU vorbehandelten Patienten.

Genau Gegenteiliges zeigte sich erstaunlicherweise für die 5-Jahres-Daten mit 5-FU und Oxaliplatin vorbehandelten Patienten. Hier war die TTR der Her2-Positiven (55 %) signifikant schlechter als die der Her2-Negativen (70 %). Ein gleichgerichteter Trend zeigte sich auch für das CSS, ohne dass sich jedoch ein signifikantes Ergebnis zeigte. Auffallend in dieser Subgruppe war, dass über die 5 Jahre Beobachtungszeitraum eine Her2-Positivität stets ein schlechteres TTR und CSS aufwies. Analog verhielt es sich in der nicht neoadjuvant vorbehandelten Gruppe.

Conradi et al. zeigten 2013 bereits, dass Her2-Positivität im Rektumkarzinom mit einem signifikant verbesserten CSS vergesellschaftet war. Die Ergebnisse waren mit 96 % und 80 % sogar denen der neoadjuvanten 5-FU Gruppe aus der vorliegenden Studie annähernd deckungsgleich (Conradi et al. 2013).

Ungeklärt bleibt, warum sich dieses Phänomen (hier) nur in der Gruppe der neoadjuvant mit 5-FU vorbehandelten Patienten zeigt, nicht jedoch in der um Oxaliplatin erweiterten Chemotherapie. Es bleibt dabei allein in dieser Gruppe ein verbessertes CSS mit einer Hazard Ratio (Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines bestimmten Ereignisses im Vergleich mit einer anderen Gruppe, hier der tumorbedingte Tod) von 0,4 (95 %-Konfidenzintervall = 0.16 – 0.99).

Andere Studien bezüglich der prognostischen Relevanz sind bislang sehr divergierend und zumeist auf das kolorektale Karzinom generell bezogen, so zeigten sich aber zumeist Ergebnisse, die bei Her2-Positivität mit einem schlechteren *Outcome* bzw. DFS und CSS einhergehen (Lim et al. 2013).

Zusammenfassend könnte man annehmen, dass Her2-Positivität im Grunde eine schlechtere Prognose aufweist, aber speziell von einer neoadjuvanten 5-FU-basierten Radiochemotherapie stark zu profitieren scheint. Warum sich der Effekt bei Erweiterung der Therapie um Oxaliplatin verliert, ist fraglich.

Geht man allerdings von einem unwesentlichen Einfluss der Her2-Positivität aus (wie die nicht signifikanten Werte der nicht vorbehandelten Gruppe zeigen), so bleiben 2 Effekte: Einerseits könnten Her2-überexprimierende Rektumkarzinome stark von 5-FU-basierter neoadjuvanter Therapie profitieren. Andererseits wäre es möglich, dass Her2-negative Rektumkarzinome stark von der um Oxaliplatin erweiterten neoadjuvanten Therapie profitieren.

Weiterhin stellte sich dar, dass Her2-Überexpression tendenziell mit positivem prätherapeutischen Nodalstatus einhergeht ($p=0,055$). Dieses Phänomen zeigte sich allerdings nur im Kollektiv der CAO/ARO/AIO-94. Im Kollektiv der CAO/ARO/AIO-04 glichen sich der Nodalstatus für Her2-Positivität und –Negativität. Worauf dieser Unterschied beruht, bleibt offen. Spekulativ könnte man verbesserte und effizientere präoperative Staging-Untersuchungen postulieren, da zwischen den beiden untersuchten Studien circa 10

Jahre medizinische Entwicklung liegen. Ausgehend davon müsste man aber ebenso veranschlagen, dass die Her2-positiven Nodalbefunde größer/ausgedehnter waren und demnach besser auch mit den älteren Methoden erfasst werden konnten.

5. Zusammenfassung

Die Recherchen für diese Studie zeigen eindrücklich die Bemühungen, Tumoren besser zu verstehen und die Therapie zu optimieren. Die CAO/ARO/ARIO-94-Studie führte bei Rektumkarzinomen des lokal fortgeschrittenen Stadiums UICC II und III zur Umstellung der Standardtherapie mit hochgradigem Einfluss auf die Lokalrezidivrate. Die CAO/ARO/AIO-04-Studie beschäftigt sich nun mit der Addition von Oxaliplatin in die Therapie, wobei die endgültigen Langzeit-Ergebnisse noch ausstehen. Zudem laufen viele andere Forschungsbemühungen darauf hinaus, weitere Ansatzpunkte in der Therapie des Rektumkarzinoms zu finden, um das *Outcome* weiterhin zu verbessern. Zu solchen *Targets* gehört auch der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor des Subtyps 2 „Her2“, dessen Expressions- bzw. Amplifikationsstatus in der vorliegenden einzigartig großen Studie erfasst werden sollte.

Es lag Material von insgesamt 838 Patienten mit Rektumkarzinomen des lokal fortgeschrittenen Stadiums UICC II und III vor, wobei 651 Proben bezüglich des Her2-Status ausgewertet werden konnten (186 aus der CAO/ARO/AIO-94-Studie sowie 465 aus der CAO/ARO/AIO-04-Studie). Es erfolgte eine immunhistochemische Aufbereitung und ein *Scoring* (IHC 0-3) nach Kriterien, die bereits für das Magenkarzinom klinische Anwendung finden. Interpretiert wird hierbei die Membranfärbung nach der Rüschoff'schen Objektivregel. Ergab sich ein intermediäres Scoring von IHC 2, so war zwecks der Positivitätsentscheidung eine Genamplifikation gefordert. Dies wurde mittels Dual-ISH untersucht und nach einer Ratio getrennt (nicht amplifiziert bei $R < 1,8$; amplifiziert bei $R > 2,2$; bei intermediären Werten: Auszählung weiterer 20 Zellen und Entscheidung nach $R \geq 2,0$ amplifiziert bzw. $R < 2,0$ nicht amplifiziert). Ein IHC 3 - Score sowie ein DISH-positiver IHC 2 - Score führten zur Klassifizierung als Her2-positiv, alle anderen Fälle gelten als Her2-negativ.

Es zeigte sich, dass 13,82 % der untersuchten Rektumkarzinome nachweislich Her2-amplifiziert sind.

Wir konnten zudem aufzeigen, dass die Her2-Expression einen wie auch beim Mamma- und Magenkarzinom relevanten Anteil im Rektumkarzinom darstellt und hier mit kontroversen

Ergebnissen des prognostischen Wertes einhergeht. Während Her2-positivite Karzinome vorwiegend von der 5-FU-basierten neoadjuvanten RCT zu profitieren scheinen (CSS $p=0,046$), so ist die um Oxaliplatin erweiterte RCT primär bei Her2-Negativität im Vorteil (TTR $p=0,025$).

Zudem konnten wir bereits bekannte Phänomene bestätigen. So zeigte sich auch hier der eindrückliche Effekt des *Downstaging*s bei neoadjuvanter Therapie vor allem in der Reduktion des Nodalstatus ((y)pN+ versus (y)pN-: $p=0,005$; (y)pUICC 1+2 versus 3+4: 0,013).

Ob die bisher vorhandenen Anti-Her2-Therapien mit beispielsweise Trastuzumab oder Folgesubstanzen (Lapatinib, Pertuzumab, TDM-1) ebenfalls auf das Her2-positive Rektumkarzinom sinnvoll anwendbar wären, bleibt offen. Einzelfallberichte zeigten jedoch bereits die Effektivität von Trastuzumab bei metastasierten Her2-positiven Rektumkarzinomen. Es besteht also dringender Forschungsbedarf im Rahmen prospektiv klinischer Studien zur Erforschung der Effektivität einer zielgerichteten Anti-Her2-Therapie des Rektumkarzinoms. Weiterhin sollte auch unbedingt die Koinzidenz und Interaktion von Her2 mit anderen Rezeptoren der EGFR-Familie (im besonderen Her3) erforscht werden.

6. Anhang

6.1 Beispiele zum Toxizitäts-Scoring

a) Klassifikation nach **WHO/ECOG** „Übelkeit/Erbrechen“

- 0 keine Übelkeit vorhanden, Normalzustand
- 1 Übelkeit
- 2 Übelkeit mit temporärem Erbrechen
- 3 Erbrechen mit Therapiebedarf
- 4 therapierefraktäres Erbrechen
- 5 -

b) Das **CTCAE** nutzt hier für Übelkeit und Erbrechen jeweils einen eigenen Score:

am Beispiel des Adverse Events „Übelkeit“

- 1 Appetitsverlust ohne Änderung der Essgewohnheiten
- 2 Nahrungsaufnahme reduziert ohne relevanten Gewichtsverlust oder Unterernährung
- 3 Inadäquate Aufnahme von Nahrung/Flüssigkeit
- 4 Lebensbedrohliche Mangelernährung
- 5 Tod

6.2 Kooperation mit den Zentren der CAO-94

Material erhalten von: Augsburg , Klinikum
Dresden, Universitätsklinik
Erlangen, Universitätsklinik (bereits vorhanden)
Hannover, Medizinische Hochschule

Kein Material vorhanden: Dessau, Städtisches Klinikum
Dresden, Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt
Frankfurt, KH Nordwest

Halle, Universitätsklinik

Hannover, KRH Klinikum Nordstadt

Leipzig, Institut für Pathologie am Elsapark

Rotenburg, Diakoniekrankenhaus (Wümme)

Trier, MVZ für für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik

6.3 Kooperation mit den Zentren der CAO-04

Material erhalten von:

Altötting-Burghausen / Bad Trissen, Pathologie Rosenheim

Bad Kreuznach, Krankenhaus St. Marienwörth

Bad Mergentheim, Caritas-Krankenhaus

Berlin, Vivantes Humboldt-Klinikum - Ärzteforum Henningsdorf

Bielefeld, Klinikum Bielefeld Mitte

Bocholt, St. Agnes-Hospital

Buchholz, Krankenhaus Winsen

Dresden, Universitätsklinik

Donauwörth, Praxis für Pathologie München

Essen, Universitätsklinik

Esslingen, Klinikum

Frankfurt a.M., Senckenbergisches Institut für Pathologie

Freiburg, Universitätsklinik

Fulda, Klinikum

Göppingen, Klinik am Eichert

Halle, Universitätsklinik

Hamburg, Asklepios Klinik Altona

Hamburg-Harburg, MVZ Hanse Histologikum

Kassel, Pathologie Nordhessen

Köln, Universitätsklinik

Landshut, Klinikum

Lübeck, Universitätsklinikum S-H in Lübeck

Mainz, Universitätsklinik
Marburg, Universitätsklinik
Mönchengladbach, Krankenhaus Maria Hilf
München, Städtisches Klinikum – Pathologie Bogenhausen
München, Universitätsklinik
Münster, Clemenshospital
Münster, Universitätsklinik
Offenburg, Ortenau Klinikum Lahr-Ettenheim
Oldenburg, Klinikum
Paderborn, Johannisstift
Passau, Klinikum
Regensburg, Gemeinschaftspraxis für Pathologie
Rosenheim, Pathologie Rosenheim
Rottweil, Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen
Saalfeld-Rudolstadt, Thüringen-Kliniken Standort Saalfeld
Saarland, Universitätsklinikum des Saarlandes
Singen, Hegau-Bodensee-Klinikum
Stade, Elbe Kliniken Stade – Buxtehude
Traunstein, Kliniken Südostbayern AG
Trier, MVZ Für Histologie
Ulm, Universitätsklinik
Völklingen, Klinikum Saarbrücken
Wetzlar-Braunfels, Überregionale Gemeinschaftspraxis
Wiesbaden, Praxis für Pathologie Fisseler-Eckhoff
Würzburg, Universitätsklinik

7. Literaturverzeichnis

- Banappagari S, Corti M, Pincus S, Satyanarayanajois S (2012): Inhibition of protein-protein interaction of HER2-EGFR and HER2-HER3 by a rationally designed peptidomimetic J Biomol Struct Dyn 30(5), 594-606
- Banappagari S, McCall A, Fontenot K, Vicente MG, Gujar A, Satyanarayanajois S (2013): Design, synthesis and characterization of peptidomimetic conjugate of BODIPY targeting HER2 protein extracellular domain Eur J Med Chem 65, 60-69
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T et al. (2010): Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial Lancet 376(9742), 687-697
- Becker H, Encke A, Röher HD: Viszeralchirurgie. 3. Auflage; Urban & Fischer / Elsevier Verlag, München 2006
- Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, Nonogaki S, Montagnini AL, da Costa WL, Jr., Soares FA (2011): Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome J Clin Oncol 29(22), 3030-3036
- Berghoff AS, Bago-Horvath Z, Dubsy P, Rudas M, Pluschnig U, Wiltshcke C, Gnant M, Steger GG, Zielinski CC, Bartsch R (2013): Impact of HER-2-targeted therapy on overall survival in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer Breast J 19(2), 149-155
- Böcker W, Denk H, Heitz P: Pathologie. 3. Auflage; Urban & Fischer / Elsevier Verlag, München 2004
- Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M (2006): Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer Br J Surg 93(10), 1215-1223

-
- Bujko K, Glynne-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(9), 1743-1750
- Carney WP, Bernhardt D, Jasani B (2013): Circulating HER2 Extracellular Domain: A Specific and Quantitative Biomarker of Prognostic Value in all Breast Cancer Patients? *Biomark Cancer* 5, 31-39
- Chen HS, Sheen-Chen SM (2000): Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends *Dis Colon Rectum* 43(8), 1093-1099
- Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M (2001): Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence *Gut* 48(6), 812-815
- Conradi LC, Styczen H, Sprenger T, Wolff HA, Rodel C, Nietert M, Homayounfar K, Gaedcke J, Kitz J, Talaulicar R et al. (2013): Frequency of HER-2 positivity in rectal cancer and prognosis *Am J Surg Pathol* 37(4), 522-531
- Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997): Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy *Int J Colorectal Dis* 12(1), 19-23
- Fisher RA (1922): On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P *Journal of the Royal Statistical Society* 85(1), 87-94
- Franklin HR, Simonetti GP, Dubbelman AC, ten Bokkel Huinink WW, Taal BG, Wigbout G, Mandjes IA, Dalesio OB, Aaronson NK (1994): Toxicity grading systems. A comparison between the WHO scoring system and the Common Toxicity Criteria when used for nausea and vomiting *Ann Oncol* 5(2), 113-117
- Frykholm GJ, Pahlman L, Glimelius B (2001): Combined chemo- and radiotherapy vs. radiotherapy alone in the treatment of primary, nonresectable adenocarcinoma of the rectum *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50(2), 427-434
- Fujii T, Seki N, Namoto-Matsubayashi R, Takahashi H, Inoue Y, Toh U, Kage M, Shirouzu K (2009): YB-1 prevents apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway in HER-2-overexpressing breast cancer cells *Future Oncol* 5(2), 153-156
- Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rodel C, Ghadimi BM (2011): Rectal cancer: current status of multimodal therapy--when and how? *Zentralbl Chir* 136(4), 334-342

-
- Gao FF, Dabbs DJ, Cooper KL, Bhargava R (2014): Bright-field HER2 dual in situ hybridization (DISH) assay vs fluorescence in situ hybridization (FISH): focused study of immunohistochemical 2+ cases *Am J Clin Pathol* 141(1), 102-110
- Geißler M, Graeven U: *Das kolorektale Karzinom*. Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- Habr-Gama A, Perez R, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J (2010): Complete clinical response after neoadjuvant chemoradiation for distal rectal cancer *Surg Oncol Clin N Am* 19(4), 829-845
- Hiotis SP, Weber SM, Cohen AM, Minsky BD, Paty PB, Guillem JG, Wagman R, Saltz LB, Wong WD (2002): Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: an analysis of 488 patients *J Am Coll Surg* 194(2), 131-135; discussion 135-136
- Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, Mozziconacci MJ, Antoine M, Arnould L, Lizard S, Bertheau P, Lehmann-Che J, Fournier CB et al. (2013): SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases *BMC Cancer* 13, 351
- Johnson BE, Janne PA (2006): Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 2), 4436s-4440s
- Junqueira L, Carneiro J, Gratzl M: *Histologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2004
- 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(9), 638-646
- Kluftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL (1992): Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer *Surg Oncol* 1(1), 97-105
- Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, Pectasides D, Economopoulos T (2006): Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas *BMC Cancer* 6, 46
- Kumarasinghe MP, de Boer WB, Khor TS, Ooi EM, Jene N, Jayasinghe S, Fox SB (2014): HER2 status in gastric/gastro-oesophageal junctional cancers: should determination of

-
- gene amplification by SISH use HER2 copy number or HER2: CEP17 ratio? *Pathology* 46(3), 184-187
- Leong AF (2000): Selective total mesorectal excision for rectal cancer *Dis Colon Rectum* 43(9), 1237-1240
- Li Q, Wang D, Li J, Chen P (2011): Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas *BMC Cancer* 11, 277
- Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Becker H (2005): Present treatment strategies for rectal carcinoma *Chirurg* 76(3), 309-332; quiz 333-304
- Lim SW, Kim HR, Kim HY, Huh JW, Kim YJ, Shin JH, Suh SP, Ryang DW, Shin MG (2013): Over-expression of Her-2 in colorectal cancer tissue, but not in serum, constitutes an independent worse prognostic factor *Cell Oncol (Dordr)* 36(4), 311-321
- Liming S, Yuan Z, Qinghua D, Lei W, Qifeng J, Haojie L (2011): Human epidermal growth factor receptor-2 and topoisomerase II alpha expressions in rectal cancer *Hepatogastroenterology* 58(106), 359-363
- Lynch PM (2007): Prevention of colorectal cancer in high-risk populations: the increasing role for endoscopy and chemoprevention in FAP and HNPCC *Digestion* 76(1), 68-76
- Mansfield AS, Sukov WR, Eckel-Passow JE, Sakai Y, Walsh FJ, Lonzo M, Wiktor AE, Dogan A, Jenkins RB (2013): Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and dual-ISH (DISH) in the determination of HER2 status in breast cancer *Am J Clin Pathol* 139(2), 144-150
- Marx AH, Burandt EC, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Atanackovic D, Bokemeyer C, Fiedler W et al. (2010): Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers *Hum Pathol* 41(11), 1577-1585
- Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE (2000): Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells *Oncogene* 19(13), 1647-1656
- Olayioye MA (2001): Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members *Breast Cancer Res* 3(6), 385-389
- Park DI, Oh SJ, Park SH, Yun JW, Kim HJ, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI et al. (2004): [Clinical significance of HER-2/neu expression in colon cancer] *Korean J Gastroenterol* 44(3), 147-152
- Plattner H, Hentschel J: *Zellbiologie*. 4. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2011

-
- RDC (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Robert Koch-Institut: Darmkrebs. In: GBE-Kompakt 04/2012, 3 (4), Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, Berlin 2012, 4-5
- Robert Koch-Institut: Darm. In: Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, Berlin 2012, 37-44
- Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger 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(34), 8688-8696
- Rödel C, Liersch T, Becker H, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Graeven U, Arnold D, Lang-Welzenbach M, Raab HR et al. (2012): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial Lancet Oncol 13(7), 679-687
- Rödel C, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Graeven U, Hothorn T, Arnold CA, Raab HR, Wittekind C, Hess C et al. (2014): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. J Clin Oncol 32:5s(supplement, abstr 3500)
- Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, Kahlenberg MS, Baez-Diaz L, Ursiny CS, Petrelli NJ et al. (2009): Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03 J Clin Oncol 27(31), 5124-5130
- Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W et al. (2010a): HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing Virchows Arch 457(3), 299-307

-
- Rüschoff J, Nagelmeier I, Baretton G, Dietel M, Hofler H, Schildhaus HU, Buttner R, Schlake W, Stoss O, Kreipe HH (2010b): Her2-Diagnostik beim Magenkarzinom - Was ist anders im Vergleich zum Mammakarzinom? *Der Pathologe* 31(3), 208-217
- Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Moriarty M, Fennelly D, Sheahan K (2005): Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer *Histopathology* 47(2), 141-146
- Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rodel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H et al. (2003): Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94 *Colorectal Dis* 5(5), 406-415
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer *N Engl J Med* 351(17), 1731-1740
- Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years *J Clin Oncol* 30(16), 1926-1933
- 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
- Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M et al. (2008): Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008 *Z Gastroenterol* 46(8), 799-840
- Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Folsch UR, Fruhmorgen P, Graeven U, Heinemann V et al. (2010): S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII) *Z Gastroenterol* 48(1), 65-136
- Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*. 4. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006

-
- Shimizu T, Saijo N (2003): Common toxicity criteria: version 2.0, an improved reference for grading the adverse reaction of cancer treatment *Nihon Rinsho* 61(6), 937-942
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012): Cancer statistics, 2012 *CA Cancer J Clin* 62(1), 10-29
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene *Science* 235(4785), 177-182
- Soravia C, Bapat B, Cohen Z (1997): Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): a review of clinical, genetic and therapeutic aspects *Schweiz Med Wochenschr* 127(16), 682-690
- Sorscher SM (2011): Marked response to single agent trastuzumab in a patient with metastatic HER-2 gene amplified rectal cancer *Cancer Invest* 29(7), 456-459
- Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer JU, Hilfrich J, Strumberg D, Fasching PA, Kreienberg R et al. (2012): Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial *Lancet Oncol* 13(2), 135-144
- Vaught DB, Stanford JC, Young C, Hicks DJ, Wheeler F, Rinehart C, Sanchez V, Koland J, Muller WJ, Arteaga CL et al. (2012): HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation *Cancer Res* 72(10), 2672-2682
- 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(9), 525-532
- WAENT (2008). World Articles in Ear, Nose and Throat - Chi-Square Test. <http://www.waent.org/Chi-Square-Test.htm>
- Wagener C, Müller O: *Molekulare Onkologie*. 3. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2010
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF et al. (1993): Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup *N Engl J Med* 329(27), 1977-1981
- Wittekind C (2010): [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors] *Pathologe* 31(5), 331-332
- Yang J, Luo H, Li Y, Li J, Cai Z, Su X, Dai D, Du W, Chen T, Chen M (2012): Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal

-
- growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens *Cell Biochem Biophys* 62(1), 221-228
- Yarwood SJ, Woodgett JR (2001): Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8), 4472-4477
- Yeo SG, Kim DY, Kim TH, Chang HJ, Oh JH, Park W, Choi DH, Nam H, Kim JS, Cho MJ et al. (2010): Pathologic complete response of primary tumor following preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: long-term outcomes and prognostic significance of pathologic nodal status (KROG 09-01) *Ann Surg* 252(6), 998-1004
- Yoon HH, Shi Q, Sukov WR, Lewis MA, Sattler CA, Wiktor AE, Wu TT, Diasio RB, Jenkins RB, Sinicrpe FA (2012): Adverse prognostic impact of intratumor heterogeneous HER2 gene amplification in patients with esophageal adenocarcinoma *J Clin Oncol* 30(32), 3932-3938
- Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J (2009): Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer *World J Surg* 33(10), 2112-2118
- Zirngibl H, Husemann B, Hermanek P (1990): Intraoperative spillage of tumor cells in surgery for rectal cancer *Dis Colon Rectum* 33(7), 610-614