Aus der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. Clemens Schafmayer

5-FU Dosisfindungsstudie an Mäusen des Stammes NSG (NOD-scid IL2Rgamma^{null})

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgestellt von:
Philipp Leon Fruh | Geb. am 10.05.1994 in Heidelberg
Aus Heidelberg

Rostock den 20.02.20

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003267

Gutachter:

PD. Dr. rer. nat. Michael Linnebacher
Universität Rostock, Molekulare Onkologie und Immuntherapie

Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen
Universität Rostock, pädiatrische Onkologie und Palliativmedizin

PD. Dr. Dr. med. Lena-Christin Conradi
Universität Göttingen, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

Jahr der Einreichung: 2020
Jahr der Verteidigung: 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Zielsetzung der Arbeit 1

1.2 Kolorektales Karzinom 2

1.2.1 Ätiologie 2

1.2.2 Molekulare Pathogenese des KRK 3

1.2.3 Tumoreinteilung (TNM und UICC-Klassifikation) 5

1.2.4 Therapie des KRK UICC Stadien I-III 7

1.2.5 Therapie des KRK bei Metastasierung und in palliativer Situation 8

1.3 Chemotherapie mit 5-Fluorouracil 10

1.3.1 Wirkungsmechanismus 10

1.3.2 Thymidilat-Synthase 11

1.3.3 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase 12

1.3.4 Nebenwirkungen von 5-FU 12

1.3.5 Capecitabine 13

1.3.6 Leucovorin 14

1.4 Laborwerte 14

1.4.1 Kreatinin 14

1.4.2 Aspartat- und Alaninaminotransferase 15

1.4.3 Gamma-Glutamyltransferase 15

1.5 Mausstamm NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} 15

1.6 Patienten abgeleitetes Xenograft 16

2. Material und Methoden 17

2.1 Materialien 17

2.1.1 Labor-/ Versuchsgeräte 17

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 18

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 19

2.1.4 Therapeutika 20
2.1.5 Primer der murinen TS 20
2.1.6 Primer der murinen GAPDH 20
2.1.7 Humane kolorektale PDX 21
2.1.8. *In vivo* verwendeter Mausstamm 22
2.2 Methoden 23
2.2.1 Übersicht Methoden 23
2.2.2 Kryokonservierung 23
2.2.3 *In Vivo* Tumorimplantation 24
2.2.4 *In Vivo* Therapie 25
2.2.5 *In Vivo* murine Probengewinnung 26
2.2.6 *Ex vivo* Versuchsaufbau 27
2.2.7 RNA Isolation 27
2.2.8 cDNA- Synthese 28
2.2.9 *In Vitro* qPCR mit CT 29
2.2.10 *In Vitro* DPD Analyse 30
2.2.11 Histologische Auswertung 30
3. Ergebnisse 31
3.1 Erhebung des Gewichtsverlaufes 31
3.1.1 Gewichtsverlauf unter Therapie 31
3.1.2 Gewichtsverlaufskurven der Kontrollgruppe 33
3.2 Überlebenskurve 35
3.3 Tumorwachstumskurven 37
3.3.1 Tumorwachstumskurven der verschiedenen Tumorsubtypen 37
3.3.2 Tumorwachstumskurven der verwendeten Therapieschemata 38
3.4 Tumorgewichte 41
3.5 Blutplasmaanalyse 42
3.5.2 Einfluss auf Kreatinin 43

3.5.3 Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) Analyse 44
3.6 DPD Nachweis....46
3.7 Thymidylat-Synthase Expression....48
3.8 Histologie....49
4. Diskussion....51
4.1 Studiendesign....51
4.1.1 Grundlagen....51
4.1.2 Versuchsaufbau....53
4.2 Pharmakon Toleranz....54
4.3 Therapieschemata....57
4.4 PDX....58
4.5 Fazit....59
5. Zusammenfassung....60
6. Thesen....63
7. Abkürzungsverzeichnis....65
8. Abbildungsverzeichnis....68
9. Tabellenverzeichnis....71
10. Literaturverzeichnis....72
11. Anhang....82
11.1 Publikation....82
11.2 Schaubilder....82
11.3 Eidesstattliche Versicherung....86
11.4 Danksagung....87

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Um Patienten mit kolorektalen Karzinom (KRK) effektiver therapieren zu können, werden aktuell gängige Therapieschemata durch individuelle Therapiekonzepte ergänzt und optimiert.
Hierbei werden Patienten auf das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren und gestörter Signalwege in deren Tumorgewebe getestet. Im Anschluss kann eine zielgerichtete Therapie erfolgen.
Um die Wirksamkeit dieser personalisierten Medizin zu testen, sind auch neue Studientypen und Modelle notwendig.
Ein Studientyp zur Darstellung der individualisierten Medizin ist die präklinische PCT- Studie (PDX clinical trial) mit einem „one animal per model per treatment“ Design. Im Rahmen dieser Studie werden jedem zu untersuchendem Parameter, n=1 Versuchstiere zugeordnet. Dies soll möglichst präzise den klinischen Alltag wiedergeben (ein Patient mit einem spezifischen Tumor).
Das vom Patienten abgeleitete Xenograft-Modell (PDX), ist ein Modell zur Testung von Therapeutika an Versuchstieren. Hierbei werden humane Tumorzellen beispielsweise in immun defiziente Mäuse implantiert und im Anschluss mit verschiedenen Pharmaka therapiert.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es eine Dosisoptimierung des Standardzytostatikums 5-FU bei NSG Mäusen im Rahmen einer PCT-Studie zu finden. Hierzu wurden sechs verschiedene Dosen und Therapieschemata experimentell evaluiert. Die verwendeten PDX stammten von vier unterschiedlichen KRK. Die Dosisoptimierung fand unter Berücksichtigung folgender Parameter statt:

- Einfluss auf Allgemeinbefinden und Gewichtsverlauf
- Einfluss auf Tumorwachstum und Tumornassgewicht
- Veränderungen im Blutbild/-plasma
- Molekulare Unterschiede hinsichtlich basaler und therapiebedingter Veränderungen zwischen dem untersuchten Mausstamm NSG und den spezifisch für diese Fragestellung zusätzlich untersuchten Mausstämme: C57Bl/6J und NMRI Foxn1^{nu}

Die gewonnenen Daten sollen eine Basis für weiterführende Studien schaffen, in denen neben 5-FU auch andere potentiell relevante Testsubstanzen und Substanzkombinationen, *in vivo* präklinisch validiert werden können.

1.2 Kolorektales Karzinom

1.2.1 Ätiologie

Das kolorektale Karzinom beschreibt alle Tumoren des Dickdarms (Kolon) und des Enddarms (Rektum). Knapp zwei Drittel der Erkrankungen treten im Dickdarm auf, weitere 30% sind im Rektum zu finden. Die restlichen Tumoren verteilen sich auf das Rektosigmoid, den Analkanal, sowie auf die Übergangszone zwischen Dick- und Enddarm.
Die Anzahl der Neuerkrankungen belief sich im Jahr 2012 in Deutschland auf insgesamt 62.240 registrierte Fälle (Männer= 33.740, Frauen= 28.500). [1]
Bei Frauen stellte das KRK, nach dem Brustdrüsenkarzinom, die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Bei Männern lag es auf Platz drei der häufigsten Tumorerkrankungen.
Mit 13.772 Todesfällen, stellte das KRK in Deutschland bei Männern den zweit tödlichsten Tumortyp und mit 12.200 Todesfällen bei Frauen den dritt tödlichsten Tumortyp dar.
Die relative fünf- Jahresüberlebensrate belief sich auf 63%.
Die meisten Menschen erkranken erst im späteren Lebensverlauf, so lag das mittlere Erkrankungsalter zwischen 72 und 75 Jahren (Männer, Frauen). Das Lebenszeitrisiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, belief sich 2012 in Deutschland auf 5,7% (Männer und Frauen). [1]
In den meisten Fällen treten kolorektale Karzinome sporadisch auf (88-94%). Weitere Entstehungsursachen sind neben inflammatorischen Prozessen im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (1-2%), auch verschiedene Erbkrankheiten (5-10%). Hauptformen dieser erblich bedingten Erkrankungen stellen das Hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) bzw. Lynch-Syndrom und die Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) dar. [2]

1.2.2 Molekulare Pathogenese des KRK

Es werden mehrere Stadien in der Entstehung des KRK durchlaufen. Im Rahmen dieser Entwicklung entsteht aus physiologischer Darmschleimhaut ein Adenom, welches sich im weiteren Verlauf zu einem invasiven Karzinom weiterentwickelt.
Dieser Entstehungsprozess des KRK wird mit der Adenom- Karzinom- Sequenz nach Fearon und Vogelstein beschrieben. So entstehen KRK durch die Anhäufung verschiedener genetischer und epigenetischer Mutationen im Rahmen eines klonalen Selektionsprozesses. Die Reihenfolge in der diese Mutationen stattfinden ist nicht von Bedeutung, lediglich die Summe dieser Veränderungen entscheidet über die Entstehung eines KRK.
Die genannten Mutationen beschreiben die Aktivierungen von Onkogenen bei gleichzeitiger Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Weiter kommt es bei der Akkumulation dieser genomischen Mutationen zu Verlusten bzw. in seltenen Fällen auch zum Gewinn von Chromosomenstücken. [3]

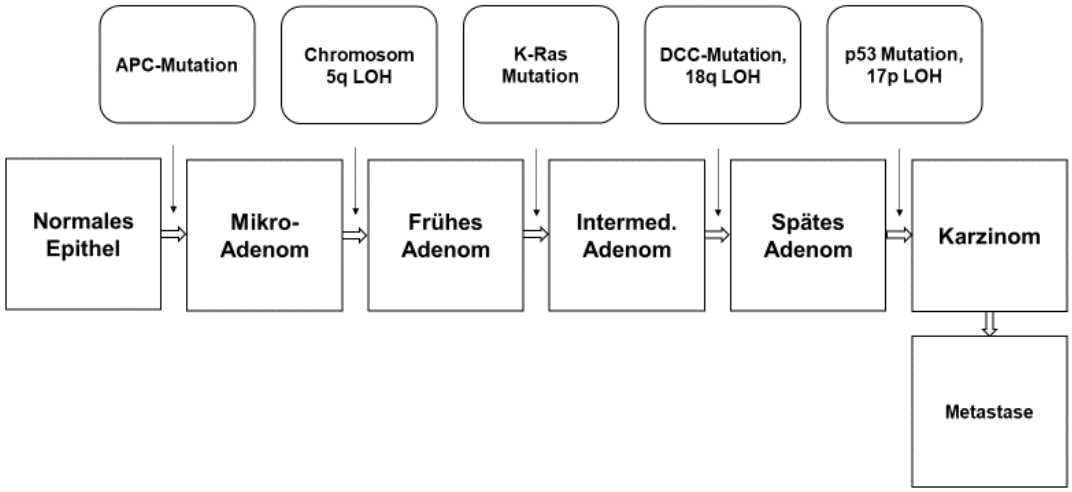

Abbildung 1: molekularbiologischen Veränderungen der Adenom/Dysplasie Karzinom-Sequenz im Suppressor Pathway [4].

Dieser Entstehungsweg des KRK wird als chromosomale Instabilität (CIN, in 70-85% als Ursache) bezeichnet und stellt neben der Mikrosatelliteninstabilität (MSI, etwa 15% als Ursache) und dem CpG (Cytosin-Guanin-Dinukleotid) island methylator phenotype (CIMP, in ca. 10% als Ursache), einen von drei bisher bekannten Hauptmechanismen der Entstehung des KRK dar [5, 6].

Tumoren des CIN Typs entstehen auf der Grundlage verschiedener Mutationen des Genoms. Allerdings konnten bis jetzt noch nicht alle dieser Mutationen identifiziert werden. Es werden über 100 verschiedene mögliche Mutationen des Genoms diskutiert. [7]
Zu den bisher bekannten Schlüsselmutationen gehört eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC (Adenomatous polyposis coli, Chromosom 5q21).
Das APC-Protein nimmt durch die Bindung von β-Catenin eine zentrale Funktion in Zelladhäsions- und intrazellulären Signalvermittlungsprozessen ein [8]. Nach funktionellem Verlust durch APC-Mutation kann β-Catenin vermehrt in den Zellkern translozieren, wo es als Ko-Aktivator die Transkription von Genen fördert, die den Zellzyklus beeinflussen (z.B. c-Myc, cyclin D1) und somit die Tumorprogression vorantreiben [8].
Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entstehung des KRK sind Mutationen im Protoonkogen K-Ras (Chromosom 12p12). K-Ras sind GTP spaltende Proteine welche in Folge von Mutationen dauerhaft aktiviert werden können. Im Falle einer solchen Mutation verursachen sie vielfältige Veränderungen innerhalb der betroffenen Zellen. Sie fördern unter anderem proliferationsstimulierende Prozesse (u.a. MAP-Kinase Signalweg), die Entstehung von hyperplastischen Geweben und die Unterdrückung der Differenzierung von Kolonepithel in zusätzlich APC mutierten Zellen [9–11].
Weitere wichtige Mutationen findet man in den Proteinen PIK3CA, SMAD4 und TP53 [12]. Mutationen des PIK3CA-Signalwegs (an Rezeptortyrosinkinasen) führen zu Veränderungen in intrazellulären Signalprozessen wie Proliferation, Wachstum, Apoptose und Zellskelett-Neuanordnungen [13]. Einflüsse auf Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese der Tumorzellen werden über das Signalprotein SMAD4 vermittelt, welches auf dem Chromosom 18q21 lokalisiert ist und als Signalmediator im TGF-β-Signalweg fungiert [14, 15]. Die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 wirkt sich auf die Regulation des Zellzyklusses aus. Im Falle von Erbgutschäden werden diese weder erkannt, repariert, noch wird die Apoptose der Zelle eingeleitet [16].
Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Tumorgenese stellt die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar. Mikrosatelliten stellen kurze repetitive DNA-Sequenzen in kodierenden und nicht kodierenden Bereichen von 2-6 Basenpaaren Länge dar. MSI-Tumoren entstehen durch Längenänderungen dieser DNA-Sequenzen, welche nach misslungener Reparatur des DNA-Mismatch-Reparatur-System (MMR) zu „frameshift“ Mutationen und somit zu funktionellen Ausfällen führen [12, 17]. Die Aufgabe des MMR-Systems ist es nach erfolgter DNA-Synthese, Basenfehlpaarungen zu erkennen und zu beseitigen [18]. Bei Fehlfunktionen dieses Systems kommt es zu Anhäufungen von Punktmutationen in der DNA. Ursachen für den Ausfall dieses Systems, können unter anderem Mutationen in den Genen der MMR-Proteine MSH2, MSH6 und MLH1 sein. Wichtige durch den Ausfall/ Fehlfunktion des MMR-Systems mutierte Gene, die in der Entstehung des KRK ein Rolle spielen sind TGFBR2 und

IGF2R (Rezeptorinaktivierung hebt Wachstumssuppression durch TGF-β1 auf), BAX und BCL2 (Inhibierung des programmierten Zelltodes), sowie MSH3 (gestörte intrazelluläre Level von MutSα and MutSβ führen zu Ausfall von DNA-Reparaturen) [19–22].
Lediglich 15-20% der KRK mit MSI werden durch Mutationen in den Genen des MMR Systems verursacht, wohingegen der Großteil durch den sporadischen Verlust des MLH1-Proteins zustande kommt (bedingt durch Methylierung CpG reicher Sequenzen der verantwortlichen Promotorregionen) [23].
Für die Entstehung des Lynch-Syndroms, welches durch den vererbten Ausfall des MMR-Systems gekennzeichnet ist, sind meist erbliche Mutationen in den Genen MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 verantwortlich [24–27].
Der dritte große Mechanismus zur Entstehung des KRK ist der CpG island methylator pathway (CIMP). CIMP-Tumoren sind durch Hypermethylierungen von CpG-Sequenzen in Promotorregionen verschiedener Gene charakterisiert. Methylierungen dieser Genabschnitte können die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken [28, 29].
Häufige Mutationen der CIMP-Tumoren sind in den Genen von p53, p16, KRAS und BRAF zu finden [30, 31].
Durch Einbeziehung der CIMP-assoziierten kolorektalen Karzinome wurden vier verschiedene Formen der sporadischen Tumoren etabliert: CIMP+MSI+, CIMP+MSI-, CIMP-MSI+ und CIMP-MSI- [32].

1.2.3 Tumoreinteilung (TNM und UICC-Klassifikation)

Es wurden das TNM- und UICC (Union for International Cancer Control) Klassifikationssystem entwickelt um KRKs entsprechend ihrer Ausbreitung einzuteilen. Dabei bezieht sich die UICC-Klassifikation auf das TNM-System, welches sich aus den Faktoren der lokalen Tumorausbreitung (T), des Lymphknotenbefalls (Nodus bzw. N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zusammensetzt. Anhand der Klassifikationen werden in der Klinik die anzuwendende Therapie und die voraussichtliche Prognose von Patienten mit KRK eingeteilt und abgeschätzt [33].

Tabelle 1: T-Kategorie: Stadieneinteilung nach histologischer Ausdehnung des Primärtumors

T	Ausdehnung des Primärtumors
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor vorhanden
Tis	Carcinoma in situ; Infiltration von Lamina Propria + evt. Muscularis mucosae
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa, Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes
T4	Infiltration des viszeralen Peritoneums oder anderer Organe/ Strukturen
T4a	Tumor infiltriert das viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert andere Organe/Strukturen

Tabelle 2: N-Kategorie: histologische Einteilung von regionären Lymphknotenmetastasen nach deren Anzahl

N	Regionäre befallene Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	Befall von 1-3 regionärer Lymphknoten
N1a	Ein Lymphknoten befallen
N1b	2-3 Lymphknoten befallen
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Befall von vier oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	4-6 regionäre Lymphknoten befallen
N2b	7 oder mehr befallene regionäre Lymphknoten

Tabelle 3: M-Kategorie: Vorhandensein und Anzahl von Fernmetastasen

M	Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen

M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Fernmetastasen in einem Organ
M1b	Fernmetastasen in mehreren Organen

Tabelle 4: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms mit Hilfe der TNM-Klassifikation

Stadiengruppierung nach UICC			
Stadium	TNM-Klassifikation		
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIa	T1-2	N1	M0
IIIb	T3/4	N1	M0
	T2/3	N2a	M0
	T1/2	N2b	M0
IIIc	T4b	N1/2	M0
	T4a	N2a	M0
	T3/4a	N2b	M0
IVa	Jedes T	Jedes N	M1a
IVb	Jedes T	Jedes N	M1b

1.2.4 Therapie des KRK UICC Stadien I-III

Therapien von KRK der Stadien I-III werden in kurativer Absicht durchgeführt. Das zentrale Verfahren der Tumortherapie entspricht der kompletten chirurgischen Resektion des Primärtumors in Form einer en-bloc-Resektion von tumoradhärenten Organen, kombiniert mit einer totalen mesokolischen Exzision (Entfernung des regionären Lymphabflussgebiets von ≥12 Lymphknoten) und einem ausreichenden Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe (min. 10cm vom mikroskopischen Tumorrand). Die chirurgische Vorgehensweise ist

dabei von der Tumorlokalisation und gesundheitlichem Zustand (Alter, Allgemeinzustand etc.) des Patienten abhängig [34, 35].
Im Anschluss an die chirurgische Entfernung des Primärtumors wird bei Tumoren des Stadiums II eine adjuvante Chemotherapie im Falle von Risikofaktoren (T4 Stadium, intraoperative Komplikationen, histopatholog. Lymph- und Blufgefäßinfiltrationen) erwogen, wohingegen bei Tumoren des Stadiums III nach Möglichkeit immer eine adjuvante Chemotherapie indiziert ist. Eine alleinige Chemotherapie mit 5-FU führt im Schnitt zu einer Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate um 10-15% [36, 37].
Empfohlene gleichwertige Chemotherapien sind die Schemata FOLFIRI (Folsäure+5-FU+Irinotecan), FOLFOX4 und das modifizierte FOLFOX6-Schema (Folsäure+5-FU+Oxaliplatin) sowie das XELOX-Schema (Oxaliplatin+Capecitabine) [35]. Durch Anwendung der empfohlenen Therapieschemata steigert sich signifikant die Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überleben nach 5 Jahren von 61 auf 67%, das rezidiv freie Überleben von 62 auf 69% und auch die Wahrscheinlichkeit des Gesamtüberlebens wird von 74 auf 77% (XELOX Therapie vs. 5-FU + Folsäure Therapie). Langzeitstudien des FOLFOX4 Therapieschemas vs. 5-FU + Folsäure Therapie, erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die des XELOX-Therapieschemas [38, 39]. Im Falle von Kontraindikationen gegen Oxaliplatin-haltige Schemata, wird nach der S3-Leitlinie eine Monotherapie mit Fluoropyrimidinen, wie z.B. dem 5-FU Prodrug Capecitabin empfohlen [35].
Bei Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels im UICC Stadium II oder III soll neben der primären operativen Versorgung auch eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder eine Kurzzeit-Radiotherapie erfolgen [35]. Diese zusätzlichen Verfahren führen zu einer signifikanten Reduzierung der Lokalrezidivrate, ohne einhergehende Steigerung an postoperativen Komplikationen. Weiter kann so die Rate der sphinktererhaltenden Operationsverfahren nahezu verdoppelt werden. [40, 41]. Aktuell wird die Kombination von oralem Capecitabin / infusionalem 5-FU zusammen mit einer konventionell-fraktionierten präoperativen Radiotherapie (1.8-2 Gy Einzeldosis bis 45-50.4 Gy Gesamtdosis) empfohlen [42, 43].

1.2.5 Therapie des KRK bei Metastasierung und in palliativer Situation

Im Falle des metastasierten Stadiums des KRK und/oder der palliativen Therapie, stehen viele verschiedene Therapiekonzepte zur Verfügung. Diese Konzepte werden individuell

anhand von Faktoren des Allgemeinzustands des Patienten und des Tumorrezeptorstatus festgelegt. Bei resektablen Tumormanifestationen und günstiger Risikokonstellation, soll primär die Metastasenresektion angestrebt werden. Falls eine operative Behandlung nicht in Frage kommt, gilt als oberstes Ziel die maximale Tumorreduktion, oder aber das Erreichen einer sekundären Resektabilität. Dies wird mit Hilfe von systemischen Chemotherapien erreicht, welche sich nach dem molekularpathologischen Profil und auch der Lage des Tumors im Menschen richten [35].

Als Erstlinientherapie wird eine Behandlung mit Fluoropyrimidin-haltigen Kombinationsschemata mit infusionaler Verabreichung von 5-FU wie beispielsweise FOLFIRI, FOLFOX oder FOLFOXIRI empfohlen. Alternativ können auch orale Fluoropyrimidine wie Capecitabin (z.B. mit Oxaliplatin, CAPOX) eingesetzt werden [44, 45].

Im Falle einer monochromen Therapie mit einem Fluoropyrimidin, führt die Zugabe des therapeutischen Antikörpers (AK) Bevacizumab (gerichtet gegen vascular endothelial growth factor, VEGF) zu einer signifikanten Steigerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) und des Gesamtüberlebens (OS). Bei der Zugabe von Bevacizumab zu einer infusionalen Kombinationstherapie, erhöht sich lediglich das PFS, das OS bleibt hingegen unverändert [46–48].

Um prognostische Einschätzungen treffen zu können, wird vor Beginn der Tumortherapie eine molekularpathologische Untersuchung der Karzinome empfohlen. Diese Analyse umfasst die Mutationsstände der RAS-Gene KRAS und NRAS, des BRAF-Gens und den Status der Mikrosatteliteninstabilität.

Patienten mit einem RAS-Wildtyp und einer linksseitigen Lokalisation des Primärtumors, sollen zur Behandlung des metastasierten KRK eine Chemotherapie-Doublette (FOLFOX oder FOLFIRI) plus anti-EGFR AK-Therapie (Cetuximab oder Panitumumab) erhalten. Als nebenwirkungsreichere Alternative kann auch eine Chemotherapie-Triplett aus FOLFOXIRI plus anti-EGFR Antikörper verwendet werden [49, 50]. Tumoren mit RAS-Mutation zeigen hingegen kein Ansprechen auf anti-EGFR Antikörper, welches in einer Metaanalyse von neun verschiedenen Studien bestätigt wurde [51]. Die Therapie dieser Tumoren beschränkt sich auf den primären Einsatz einer Chemotherapie-Doublette. Ob eine Chemotherapie-Triplette oder der kombinierte Einsatz mit Bevacizumab bessere therapeutische Wirkungen zeigen, wurde noch nicht sicher belegt [52].

Gleichzeitige Mutationen von RAS- und BRAF Genen sind sehr selten und werden dementsprechend als sich gegenseitig ausschließend betrachtet [53]. Obwohl die klinische Relevanz des BRAF-Mutationsstatus noch nicht vollständig geklärt ist, kann durch die damit verbundene schlechte Prognose eine frühzeitige intensivierte Chemotherapie angewandt werden (z.B. mit FOLFOXIRI + Bevacizumab) [35]. Eine weitere therapeutische Empfehlung stellt das Chemotherapie-Triplet FOLFOXIRI plus Bevacizumab, dar. Diese Empfehlung

gründet allerdings aus Studien mit relativ geringen Fallzahlen und ist so noch Gegenstand weiterer Untersuchungen [54, 55].
Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand werden in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit und ohne resektable Metastasierung. Im Falle der resektablen Metastasierung besteht das primäre Ziel aus der Wiederherstellung eines Allgemeinzustandes, in welchem eine operative Therapie möglich ist. Bei nicht vorhandener Operabilität soll diese in darauffolgenden Untersuchungen, mit einem Abstand von 8 Wochen erneut geprüft werden. Weiterhin sollte die Option von nebenwirkungsarmen „Bridging“-Therapien geprüft werden. Diese Therapien können beispielsweise mit Fluorpyrimidin und Bevacizumab eingeleitet werden. So soll ein Zustand erreicht werden, in dem die Behandlung mit einer intensivierten Kombinationschemotherapie möglich ist.
Im Fall von nicht primär resektablen Metastasen bei reduziertem Allgemeinzustand, steht eine primär palliative, symptomatische Therapie im Vordergrund. Es kann ebenfalls eine initiale Therapie mit Fluorpyrimidinen und Bevacizumab erfolgen. Neben der Tumortherapie steht allerdings auch die Sicherstellung einer adäquaten Schmerztherapie, psychosozialen und psychoonkologischen Therapie, supportiven Therapien und Ernährungsberatung im Vordergrund. Das primäre Therapieziel stellt die Verlängerung des Gesamtüberlebens bei möglichst guter Lebensqualität dar [35] [56].

1.3 Chemotherapie mit 5-Fluorouracil

1.3.1 Wirkungsmechanismus

5-FU ist ein Derivat der Nukleinsäure Uracil. Im Gegensatz zu Uracil befindet sich bei 5-FU an der Position C-5 ein Fluor- anstatt eines Wasserstoffatoms.
Der Wirkstoff gelangt über Uracil-Transporter in die Zelle. Intrazellulär wird 5-FU in folgende aktive Metabolite umgewandelt: Fluorodeoxyuridinmonophosphat (FdUMP), Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) und Fluorouridintriphosphat (FUTP) [57].
Diese Metabolite stören die Funktion der Thymidilat-Synthase (TS) und inhibieren die Synthese von RNA.
Die Inhibierung der TS führt zur Hemmung der de-novo-Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) aus Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) unter Verwendung des Co-Faktors 5,10-Methylentetrahydrofolat (CH2THF). Dies geschieht durch

die Bindung des Metaboliten FdUMP an die nukleotidischen Bindungstelle der TS, welche anschließend einen stabilen Ternärkomplex zusammen mit CH2THF bildet. Dieser Komplex verhindert die Bindung von dUMP an die TS und inhibiert so die dTMP Synthese [58, 59].
Der daraus resultierende Mangel an dTMP, führt zu einem Mangel von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) und induziert ein Ungleichgewicht der intrazellulären Konzentrationen der restlichen Desoxynukleotide (dATP, dGTP und dCTP) durch verschiedene Rückkopplungsmechanismen [60]. Daraus resultiert final eine schwer gestörte DNA-Synthese, sowie eine gestörte DNA-Reparatur, welche schließlich zum Zelluntergang führen [61, 62].
Ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus des 5-FU ist die intrazelluläre Akkumulierung von Desoxyuridintriphosophat (dUTP) und FdUTP. Beide Substanzen werden fälschlicherweise in die DNA eingebaut und führen über einen Zyklus aus Fehleinbau, Exzision und Reparatur zu DNA-Strangbrüchen und folglich zum Zelltod [63, 64].
Zusätzlich führt FUTP zu Funktionsstörungen verschiedener RNA-Prozesse. So wird die Prozessierung von unreifer pre-rRNA zu reifer rRNA, aber auch die post transkriptionelle Modifikation von tRNA inhibiert [65–68].
In der Leber wird 5-FU durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) zu Dihydrofluorouracil (DHFU) abgebaut und somit deaktiviert [69].

1.3.2 Thymidilat-Synthase

Die TS ist das Schlüsselenzym der intrazellulären dTMP Synthese und wird aus dem menschlichen Thymidilat-Synthase-Gen (hTS) transkribiert und translatiert. Das hTS weist Polymorphismen im Bereich des Promotors, in Form von entweder zwei- oder dreifachen 28 Basenpaar Tandem-Wiederholungen auf [70].
Es wurde festgestellt, dass 5-FU-Therapien bei Patienten mit homozygoter TSER*3/TSER*3 Sequenz weniger wirksam sind, als bei Patienten mit heterozygoter TSER*3/TSER*2 bzw. homozygoter TSER*2/TSER*2 Sequenz [71]. Es konnten im Vergleich zu TSER*2-Sequenzen, fast dreifach erhöhte TS-mRNA-Spiegel in Zelllinien der homozygoten TSER*3-Sequenz nachgewiesen werden [72]. Es wird angenommen, dass diese erhöhten intrazellulären TS-Spiegel zu einer geringeren Wirksamkeit von 5-FU führen [57].
Weiter konnte die Behandlung mit 5-FU als Ursache für eine gesteigerte TS-Expression in Zelllinien und Tumorgewebe identifiziert werden [73]. Diese Induktion der TS-Expression lässt sich auf einen negativen Feedbackmechanismus zurückführen. Hierbei binden

Liganden-freie TS-Proteine an die mRNA73 und inhibieren so die Translation der TS. Der negative Feedbackmechanismus entfällt im Falle einer 5-FU-Therapie, da der freigesetzte Metabolit FdUMP die TS bindet und diese nicht weiter die mRNA und so die Translation inhibieren kann. Die Folge ist eine gesteigerte TS-Expression [57].

1.3.3 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

DPD ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des 5-FU-Abbaus. Über 80% des zugeführten Zytostatikums werden über dieses Enzym inaktiviert und eliminiert. Dies wird durch die Umwandlung von 5-FU in Dihydrofluorouracil erreicht. Dihydrofluorouracil wird weiter zu Fluoro-β-Ureidoproprionat und Fluoro-β-Alanin umgewandelt. Beide Stoffe werden über den Urin ausgeschieden [74].
Kodiert wird das Enzym durch das DPD-Gen. Dieses besitzt eine Größe von 4399 Nukleotiden in 23 kodierenden Exons und kodiert viele Varianten der DPD. Diese sind Gegenstand aktueller Forschung [75].
DPD-Mangel ist eine klinisch relevante heterogene, autosomal rezessiv vererbte Störung des Pyrimidin-Stoffwechsels [76]. Eine reduzierte DPD-Aktivität führt zu verringerter Clearence und verlängerter Halbwertszeit von 5-FU im Organismus. Dies wiederum erhöht das Risiko für dosisabhängige Nebenwirkungen [77, 78].

1.3.4 Nebenwirkungen von 5-FU

Zytostatika wirken auf alle Zellen des Organismus toxisch und nicht ausschließlich auf Zellen von Tumoren. Besonders davon betroffen sind Gewebe mit hohen Teilungsraten wie Knochenmark, das Epithel des Gastrointestinaltrakts und Haarfollikel. Folglich bestehen die häufigsten Nebenwirkungen von Zytostatika aus Myelosuppression, Stomatitis, Mukositis und Diarrhöe, Haarausfall, sowie Übelkeit und Erbrechen.
Die Wahrscheinlichkeit des 5-FU-induzierten Erbrechens liegt bei 10-30%. Damit gehört das Therapeutikum zur Gruppe der Zytostatika mit niedrigem Risiko für therapieinduziertes Erbrechen. Im Gegensatz dazu induziert 5-FU häufig Stomatitiden und Mukositiden. Bei einer Mukositis kommt es zur Entzündung von Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt. Wenn sich die Entzündungen nur auf den Mund- und Rachenraum beschränken, werden sie

Stomatitis genannt. Allerdings betreffen sie meist den gesamten Gastrointestinaltrakt. Die durch die Entzündungen hervorgerufenen Läsionen sind in der Regel schmerzhaft und behindern so die Nahrungsaufnahme. Weiter bilden die Schleimhautdefekte Eintrittspforten für Bakterien in den Kreislauf. Im Falle einer Immunsuppression kann dies schnell zu Infektionen bis hin zur Sepsis führen.
Zusätzlich kann es bei der 5-FU Gabe zu neuro- und kardiotoxischen Nebenwirkungen wie Sensibilitätsstörungen an Händen und Füßen, sowie ausgeprägten Koronarspasmen kommen.
Sehr spezifisch für die 5-FU-Therapie ist das Hand-Fuß-Syndrom. Bei diesem kommt es zur schmerzhaften Ablösung der Haut an Hand- und Fußinnenflächen. Dies ist besonders beim sonst nebenwirkungsärmeren Capecitabine stark ausgeprägt [79].

1.3.5 Capecitabine

Capecitabine ist ein Prodrug des Pyrimidinanalogon 5-FU. Es wird primär zur Therapie des metastasierten Mamma- und kolorektalen Karzinoms verwendet.
Der Wirkstoff wird oral verabreicht, über den Darm aufgenommen und über das Blut zur Leber transportiert. Dort wandelt die hepatische Carboxylesterase Capecitabine zu 5'-Desoxy-5-Fluorocytidin (5'-DFCR) um. Im nächsten Schritt metabolisiert das ubiquitär vorkommende Enzym Cytidin-Desaminase 5'-DFCR zu 5'-Desoxy-5-Fluorouridin (5'-DFUR).
Dieser Prozess findet überwiegend in Leber, Plasma und Tumorzellen statt. Ursächlich dafür sind die hohen Konzentrationen von Cytidin-Desaminase in diesen Geweben.
Im letzten Schritt, katalysiert durch das Enzym Thymidin-Phosphorylase, wird 5‘-DFUR in den aktiven Metaboliten 5-FU umgewandelt [80]. Auch hier finden sich die höchsten Konzentrationen des Enzyms (3-10fach erhöht) im Tumorgewebe, was zu einer zielgerichteten intratumoralen 5-FU-Freisetzung führt [81–83].
Die orale Bioverfügbarkeit von Capecitabine liegt bei fast 100%. Dosissteigerungen führen zu einem linearen Anstieg der maximalen Serumkonzentration (C_{max}) und der area under the curve (AUC) [84]. Die gleichzeitige (oder unmittelbar vorhergehende/ darauffolgende) Nahrungsaufnahme mit Capecitabine, führt zu einer reduzierten intestinalen Resorption des Prodrug, welche zu einer 60% Reduktion der C_{max} und 31% Reduktion der AUC führt.
Diese Reduktion wirkt sich jedoch nur unwesentlich auf die AUC des cytotoxisch wirksamen Metaboliten 5-FU aus. Daraus resultiert eine zu vernachlässigende Signifikanz der kombinierten Nahrungsaufnahme mit Capecitabine [85].

Das Nebenwirkungsprofil von Capecitabine unterscheidet sich von dem des regulär verabreichten 5-FU. So treten die Nebenwirkungen Diarrhö (47.7% vs 58.2%), Stomatitis (24.3% vs 61.6%), Übelkeit(37.9% vs 47.6%), Alopezie (6.0% vs 20.6%), Neutropenie Grad 3-4 (2.3% vs 22.8%) und dementsprechend auch die des neutropenischen Fiebers (0,2% vs 3,4%), bei einer Therapie mit Capecitabine seltener auf, als bei einer vergleichbaren Therapie mit 5-FU. Lediglich das Hand-Fuß-Syndrom weist eine höhere Inzidenz bei einer Capecitabine-Therapie auf (53.5% vs 6.2%) [86].

1.3.6 Leucovorin

Um die therapeutische Wirkung von 5-FU weiter zu steigern, wird in vielen Chemotherapien zusätzlich das Folsäurederivat Leucovorin (LV) verabreicht.
Das Co-Therapeutikum erhöht die intrazelluläre Konzentration von CH2THF wodurch die Bindung von FdUMP an TS optimiert wird und so die Toxizität von 5-FU steigt [87–89].
Leucovorin (5‘-Formyltetrahydrofolat) wird über Folsäuretransporter in die Zelle aufgenommen, zu CH2THF umgewandelt und anschließend durch die Folylpolyglutamat-Synthetase polyglutamatisiert. Dies erhöht die intrazelluläre Verweildauer von CH2THF und verstärkt die Stabilisierung des ternären Komplexes mit TS und FdUMP [90, 91].

1.4 Laborwerte

1.4.1 Kreatinin

Kreatinin (Krea) entsteht aus muskulärem Kreatin. Die Serum-Kreatinin-Konzentration ist sowohl von Muskelmasse als auch vom Lebensalter abhängig und wird fast vollständig über den glomerulären Filtrationsapparat der Niere ausgeschieden.
Ab einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate von über 50% (davor sog. kreatininblinder Bereich), steigt das Serum-Kreatinin messbar an und erlaubt so Rückschlüsse auf die Filtrationsfunktion der Nieren. Ein erhöhtes Serumkreatinin zeigt eine Niereninsuffizienz an und kann die Folge von akuten/chronischen Nierenerkrankungen, Kreislaufversagen, Nierenschädigungen durch Gifte oder Therapien mit nephrotoxischen bzw. nierengängigen Medikamenten sein. Ein reduziertes Serumkreatinin zeigt im Gegensatz dazu Untergewicht und Muskelatrophie an [92, 93].

1.4.2 Aspartat- und Alaninaminotransferase

Sowohl die Aspartataminotransferase (AST/ ASAT), als auch die Alaninaminotransferase (ALT/ALAT) sind Enzyme die primär in Leber, sekundär auch in Herz- und Skelettmuskeln vorkommen. Auf Grund der hohen Aktivität der Enzyme in Hepatozyten werden sie zur Diagnostik von Leberzellschäden verwendet. In Zellen des Leberparenchyms ist die AST zu ca. 70% an Mitochondrien gebunden und liegt zu etwa 30% gelöst im Zytoplasma vor. Die ALT befindet sich hingegen mit etwa 85% im Zytoplasma und mit 15% in den Mitochondrien.
Da der Großteil der AST an die Mitochondrien der Hepatozyten gebunden ist, treten erhöhte Konzentrationen des Enzyms erst bei schweren Leberzellschädigungen im Blutplasma auf. Im Gegensatz dazu wird die ALT bereits frühzeitig bei leichten Schäden der Hepatozyten in das Blutplasma freigesetzt. Dies liegt daran, dass frühe Nekrosen zu Membranpermeabilitätsstörungen der Zellen führen, durch welche wiederum ALT in das Blutserum austritt.
Es finden sich erhöhte Werte der Enzyme im Blutplasma bei Leberzellschäden, beispielsweise ausgelöst durch Leberzirrhose oder toxische Leberschädigungen [92, 93].

1.4.3 Gamma-Glutamyltransferase

Die Gamma-Glutamyltransferase (Gamma-GT) ist ein membranständiges Enzym und kommt in Leber (größter Anteil), Niere, Dünndarm, Pankreas und Milz vor. Im Blutserum nachweisbares Gamma-GT stammt fast vollständig aus Gewebe der Leber und Gallenwege. Bereits geringe Schädigungen der Leber führen zu nachweisbar gesteigerten Konzentrationen von Gamma-GT. Dies macht den Parameter zum empfindlichsten Wert für Erkrankungen der Leber und Gallenwege [94].

1.5 Mausstamm NOD-*scid* IL2Rgamma^{null}

Mäuse des Stammes NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NSG) besitzen eine Reihe verschiedener Gendefekte, welche kombiniert zu einer schweren Immundefizienz führen. Die severe combined immune deficiency-Mutation (scid-Mutation), befindet sich im DNA-Reparatur-

Komplex-Protein Prkdc und führt zu einer geringen Anzahl funktionsfähiger T- und B-Lymphozyten in den Tieren. Eine weitere wichtige Mutation ist die IL2rg^{null}- Mutation. Diese stört den intramuralen Zytokin-Signalweg und führt dadurch zu einem Mangel an funktionsfähigen natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen). Weiter besitzen die Mäuse einen funktionslosen Thymus, da sich in diesem keine lymphatischen Zellen, sondern nur noch zystische Strukturen befinden. Im Gegensatz zu Mäusen des Stammes Non-Obese Diabetic, Severe Combined Immunodeficiency (NOD SCID), sind NSG-Mäuse resistent gegen die Entwicklung von Lymphomen. Diese Zusammenstellung kombinierter Gendefekte, erlaubt es diesen Mäusen menschliches Gewebe zu implantieren, welches von diesen weder abgestoßen noch abgetötet wird [95].

1.6 Patienten abgeleitetes Xenograft

Die Übertragung von Zellen bzw. Zellverbänden zwischen verschieden Spezies, wird Xenotransplantation genannt. Wenn funktions- und lebensfähige Zellen eines Menschen auf eine andere Spezies übertragen werden, nennt man dies: Patienten abgeleitetes Xenograft (PDX). Die Übertragung erfolgt direkt postoperativ nach Exzision des Gewebes beispielsweise auf immundefiziente Mäuse. Angelegte PDX werden durch Transplantation von Maus zu Maus über mehrere Passagen erhalten [96]. In dieser Studie wurde humanes Tumorgewebe in immundefiziente Mäuse des Stammes NSG, als heterotope PDX, subkutan in die Flanken implantiert. Diese Methode der Transplantation erlaubt einen einfachen Gewebetransfer, sowie präzises Überwachen des Tumorwachstums [97].
Tumorart, Tumorqualität, Mausstamm, Alter und Zustand der verwendeten Maus, sowie der Prozess der Transplantation von PDX haben Einfluss auf die Proliferation und genetische Variabilität des implantierten Tumorgewebes in immundefizienten Mäusen [98–100].
Unterschiede der Variabilität implantierter PDX im Vergleich zum Ursprungsgewebe entstehen vor allem durch die Aktivität von Stroma assoziierten Genen; sie kommen wahrscheinlich durch den Kontaktverlust mit dem menschlichen Stroma und Interaktionen mit der murinen stromaassoziierten Mikroumgebung zustande [100–102].

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Labor-/ Versuchsgeräte

Produkt	**Hersteller**
In vivo	
Kühl- und Gefrierschrank -80 °C Gefrierschrank	Liebherr Deutschland GmbH, Bieberach Kryotec-Kryosafe GmbH; Hamburg
Pipetten (Pipetman) 0−2µl, 2−20µl, 20−100µl, 50−200µl; 200−1000µ	Gilson; Frankreich, Villiers-le-Bel
Mehrkanalpipette 0−10µl	Eppendorf; Hamburg
Heizplatte	Thermolux, Witte+ Sutor GmbH; Murrhardt
Mauskäfige + Belüftungssystem	Tecniplast Deutschland GmbH; Hohenpeißenberg
Digitaler Messschieber	Burg-Wächter KG; Wetter-Volmarstein
Messwaage UW/UX	Shimadzu-Deutschland-GmbH; Duisburg
OP-Besteck	B.Braun; Melsungen
GES3S Reader (Transponder Reader)	DATAMARS; Essen
Heizlampe	Electric Petra, Burgau
Eismaschine	Manitowoc; USA Wisconsin Manitowoc
Isolierbehälter	Isotherm; Karlsruhe
PowerShot A2100 IS (Kamera)	Canon; Krefeld
In vitro	
PCR UV3/ HEPA Cabinet (Bench)	Analytic Jena; Jena
Thermal Cycler MyCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Thermo Plate Sealer	Thermo Fisher; USA, MA, Waltham
Vortex- Genie 2	Scientic Industries; USA, New York
Zentrifuge 2K15 Multifuge 3S-R	Sigma; Osterode am Harz Heraeus; Hanau
C1000 Touch Thermal Cycler real time PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH; München

ViiA 7 real time PCR	Thermo Fisher; USA, MA, Waltham
Precellys Homogenisator	Bertin; Frankfurt am Main
Nanodrop 1000	Thermo Scientic; USA, Massachusett

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkte	**Hersteller**
In vivo	
Peha-soft nitrile Handschuhe	Hartmann; Heidenheim
Medical Face Mask	Mölnlycke; Düsseldorf
Baretthauben	Winsen/Luhe
Vlies-Besucherkittel	Winsen/Luhe
Überschuhe	Dahlhausen; Dahlhausen
Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht
Krankenhausfertigrasierer	Wilkinson; Solingen
Einmalspritzen	BRAUN, Melsungen
Cellstar Tubes	Greiner Bio-one; Frickenhausen
Microvetten	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht
Insulinspritzen	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg
Sterile Surgical Blades	BRAUN, Melsungen
Nahtmaterial Resopren	Resorba Clinicare GmbH; Nürnberg
Petrischalen	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht
Tissue-Tek Cryomold Intermediate	Sakura; Staufen
Tissue-Tek Compound Containing	Sakura; Staufen
Kohlendioxid mediAL	Air- Liquide Healthcare; France Paris
In vitro	
RNA Isolationskit	peqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen
96 fast PCR- Platte Halbrand 96 PCR- Platte randlos	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht
Thermosprint Alu Heat Seal	BILATEC AG; Viernheim
Klebefolie optisch klar	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkte	**Hersteller**
In vivo	
Flüssiger Stickstoff	Cryotherm GmbH & Co. KG; Kirchen/Sieg
Matrigel	Corning; Niederlande, Amsterdam
DMSO	AppliChem GmbH; Darmstadt
Formafix 4% gepuffert	Grimm MED Logistik; Torgelow
DPBS	Pan Biotech; Aidenbach
NaCl	BRAUN; Melsungen
Bacillol Flächendesinfektion	Hartmann; Heidenheim
Freezer Medium: FBS 10% DMSO	 PAN-Biotech GmbH; Aidenbach AppliChem GmbH; Darmstadt
In vitro	
RNase-Exitus Plus	AppliChem GmbH; Darmstadt
Ethanol 100%	ZAP Universitätsmedizin Rostock; Rostock
RNA Isolationskit	peqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Nuclease freies Wasser	EURx; Poland, Gdansk
Oligo-TT Primer, Random Primer	Metabion international Ag; Planegg
DEPC Wasser	Carl Roth GMBH & Co. KG; Karlsruhe
Reverase, 5x RT Buffer complete	Bioron; Ludwigshafen
dNTP Mix	Promega; USA, Wisconsin, Madison
Taq Man Master Mix	Bioron; Ludwigshafen
ROX	EURX; Poland; Gebnsk
Sonden	Metabion

2.1.4 Therapeutika

Produkte	**Hersteller**
Cotrimoxazol	Ratiopharm GmbH; Ulm
Ketamin 10%	Bela-pharm GmbH & Co. KG; Vechta
Rompun 2%	Bayer AG; Leverkusen
Bepanthen Augen& Nasensalbe	Bayer AG; Leverkusen
Xeloda 150mg Capecitabin	Roche Deutschland Holding GmbH; Freiburg
Povidon-Iod 7,5%	BRAUN; Melsungen
5- FU	ZAP Universitätsmedizin Rostock; Rostock
Leucovorin	ZAP Universitätsmedizin Rostock; Rostock

2.1.5 Primer der murinen TS

murine Thymidilate Synthase	**Sequenz**
forward	5‘ TGTCTTGCCAGCTTTACCAG-3‘
reverse	5‘ TGCAATCATGTAGGTGAGCA-3‘
Hybridisierungssonde	5‘-6-Fam-TCTGGGCGTGCCCTTCAACA-3‘

2.1.6 Primer der murinen GAPDH

murine GAPDH	**Sequenz**
forward	5‘ CTCCACTTCCACATCCACTG-3‘
reverse	5‘ GCGTGAGAGAAGGACCAGAT-3‘
Hybridisierungssonde	5‘-HEX-TCTCCTCGTCGACCCGCTTCAT-BHQ-3‘

2.1.7 Humane kolorektale PDX

Zunächst wurden PDX von vier individuellen KRK-Fällen in NSG-Mäuse implantiert.
Bei den verwendeten Xenografts handelt es sich um in Mäusen angezüchtete Abkömmlinge von KRK. Diese Karzinome wurden menschlichen Patienten der Universität Rostock entnommen und stammten aus einer KRK Biobank des Arbeitsbereiches MOI (Aus der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie Chirurgische Klinik und Poliklinik Universitätsmedizin Rostock). Die verwendeten Tumoren wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie, gewonnen, aufbereitet und expandiert.

Tabelle 5: Hintergrundinformationen zu den verwendeten PDX- Modellen. Dargestellt sind die verwendeten Tumoren mit den dazugehörigen Patientendaten: Geschlecht, Alter, Histologie, Subtyp, Lokalisation und TNM- Klassifikation. Nomenklatur: HRO= Hansestadt Rostock, C= Kolorektales Karzinom, Nummer= spezifischer Tumorfall

PDX	**Geschlecht und Alter des Patienten zur OP**	**Histologie, Subtyp und Lokalisation**	**TNM-Klassifikation**
HROC29	M, 59	Adenokarzinom, rechte Kolonflexur, Lynch, HNPCC	T3, N2, M1, G3, R0, L0, V1, 8/30 LK+
HROC40	M, 69	Adenokarzinom, Kolon descendens, CIMP-H, non MSI	T3, N1, M0, G3, R0, L1, V1, 2/18 LK+
HROC46	M, 66	Adenokarzinom, Kolon ascendens, chromosomal instabil	T3, N0, M1, G3, R2, L0, V1, 0/34
HROC222	M, 79	Adenokarzinom, Kolon transversum, chromosomal instabil	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0, 0/13

2.1.8. *In vivo* verwendeter Mausstamm

Bei den für die Versuche verwendeten Tieren handelte es sich um männliche und weibliche NSG Mäuse. Vor der Tumorimplantation besaßen die Tiere durchschnittlich ein Körpergewicht von 20g und waren mindestens 6 Wochen alt.
Die Mäuse stammten aus der Versuchstierhaltung der Universität Rostock.
Die fachgerechte Ernährung und Pflege der Tiere erfolgte in der Core Facility der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock. Diese ist im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar untergebracht. Als Nahrung erhielten die Tiere eingeweichtes Futter (Trockenpellets).
Die Haltung erfolgte mit einer maximalen Anzahl von sechs Mäusen pro Käfig und unter kontrollierten Lebensbedingungen (konstante Temperatur, geregelter Lichtrhythmus, konstante Luftfeuchtigkeit und Lärmfreiheit).
Um potentiellen Infektionen vorzubeugen, wurde den Mäusen 30 Tage lang postoperativ ein Antibiotikum-Gemisch Cotrimoxazol (Dosis: 8 mg Trimethoprim und 40 mg Sulfamethoxazol pro kg KG; gemäß GV-Solas; entspricht 11,5 ml/l Trinkwasser) über das Trinkwasser verabreicht. Im Anschluss an diesen Zeitraum erhielten die Mäuse autoklaviertes Wasser *ad libitum*.

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht Methoden

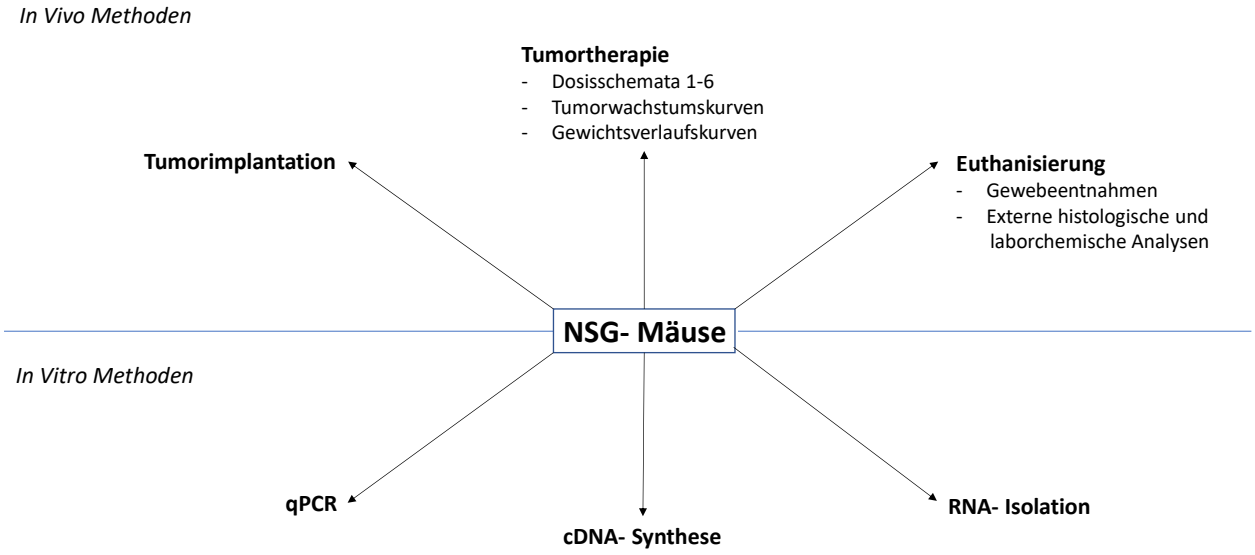

Abbildung 2: Übersicht der verwendeten Methoden.

2.2.2 Kryokonservierung

Die in dieser Studie verwendeten PDX wurden langfristig in der Gasphase über flüssigem Stickstoff, bei etwa -160 °C gelagert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung stand ein -80 °C kalter Gefrierschrank zur Verfügung.

Um die Proben sicher über lange Zeit lagern zu können, mussten sie in ein Medium aus FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) überführt werden.

DMSO eignet sich besonders gut für die Kryokonservierung. Es verhindert beim Einfrieren des vitalen Tumorgewebes die intrazelluläre Kristallbildung und somit auch die Zellzerstörung.

Die zur Implantation genutzten Tumorstücke wurden schonend aufgetaut. Im Anschluss daran mussten sie ausgewaschen werden, um das unter Raumtemperatur zelltoxisch wirkende DMSO zu entfernen. Dies erfolgte durch wiederholte Spülungen der Proben mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung).

Auch im weiteren Verlauf der Studie kam es wiederholt zu Phasen der Krykonservierung verschiedener Versuchsmaterialien. Die Materialien wurden dabei zuerst in flüssigen Stickstoff überführt und im Anschluss daran bei -80 °C eingelagert.
Es wurden entweder Nativproben oder aber Präparate, eingebettet in Tissue Tek Compound Gel, eingefroren.

2.2.3 *In Vivo* Tumorimplantation

Für die *in vivo* Tumorimplantation wurden 3 x 3 x 3 mm große kryokonservierte Tumorstücke in Matrigel auf einer Petrischale überführt. Diese wurde anschließend zur Schonung des Tumormaterials in Nasseis eingebettet.

Für jeden der vier verschiedenen Tumoren wurden je 12 NSG Mäuse benötigt (6 Mäuse pro Versuchsreihe bei n=2, Gesamtzahl der Mäuse= 48).
Die Mäuse wurden mit einem Ketamin/ Rompun-Gemisch (Ketamin/ Xylazinnarkose intraperitoneal, i.p. 90/6 mg/kg KG) anästhesiert und erhielten im Anschluss eine Lid-Salbe zur Befeuchtung und Schonung der Augen während der OP.
Nach erfolgreicher Anästhesie konnten die Tumorstücke subkutan, in die rechte hintere Flanke der jeweiligen NSG-Mäuse implantiert und mit zwei Einzelknopfnähten gesichert werden.
Nach dem die Tumoren auf eine Größe von 6mm angewachsen waren, wurden sie randomisiert einem Therapieschema zugeteilt und entsprechend behandelt.
Die durchschnittliche Anwachsdauer der Tumor betrug im Mittel 6 Wochen.

2.2.4 *In Vivo* Therapie

Im Rahmen der Studie wurde ermittelt wie NSG-Mäuse auf das Chemotherapeutikum 5- FU in verschiedenen Darreichungsformen und Therapieschemata reagieren. Die Schemata unterschieden sich in Darreichungsform, Konzentration und Applikationsart von 5-FU. Untersucht wurden die zytostatische und toxische Wirkung des Therapeutikums.
Es wurden 6 verschiedene Dosisschemata mit drei verschiedenen Therapeutika erstellt. Die verwendeten Therapeutika waren 5-FU, Xeloda (Capecitabin) und Leucovorin.
Daraus resultieren folgende Versuchsgruppen:

Dosis1:	5-FU Bolusgabe	(80 mg/kg KG i.p.)
Dosis2:	5-FU Dauergabe	(30 mg/kg KG i.p.)
Dosis3:	5-FU + Leucovorin 1	(20 mg/kg KG 5-FU + 10 mg/kg KG Leucovorin i.p.)
Dosis4:	5-FU + Leucovorin 2	(10 mg/kg KG 5-FU + 20 mg/kg KG Leucovorin i.p.)
Dosis5:	Xeloda Bolusgabe	(800 mg/kg KG per oral)
Dosis6:	Xeloda Dauergabe	(350 mg/kg KG per oral)

Die Therapieintervalle richteten sich nach Folgendem Schema:

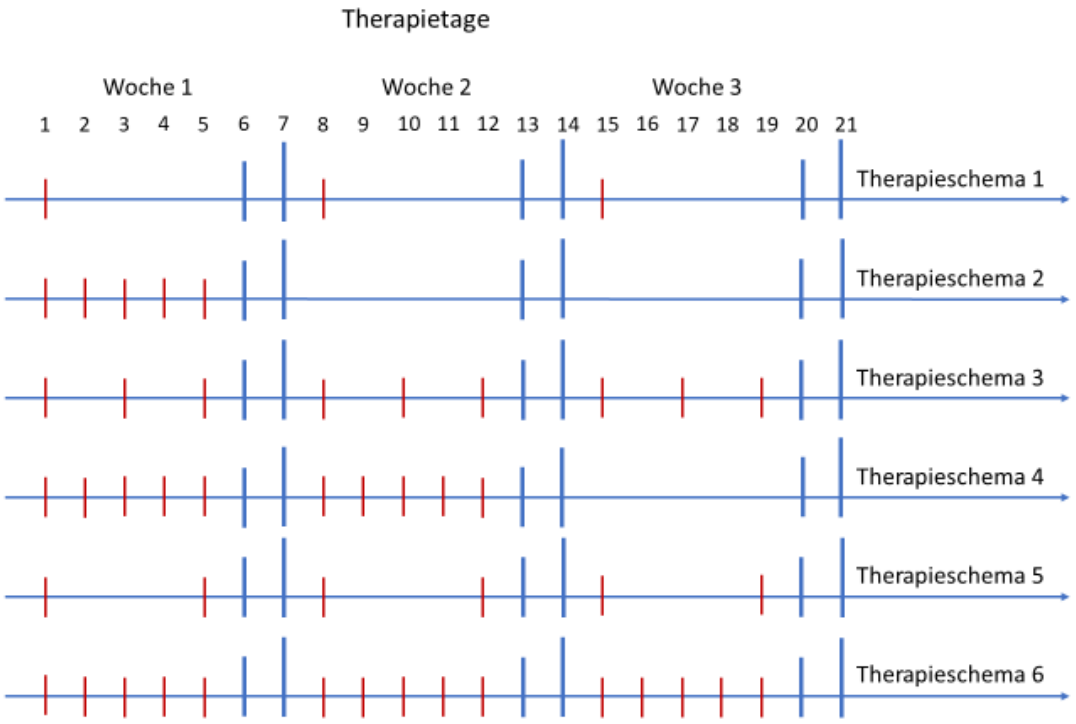

Abbildung 3: Dargestellt sind die unterschiedlichen Therapieschemata. Therapietage sind in Rot dargestellt.

Der untersuchte Therapiezeitraum umfasste maximal 21 Tage. Die Dauer des Beobachtungszeitraums hingegen 91 Tage.
Therapiekontrollen erfolgten an 3 Tagen pro Woche. Die Kontrollen bestanden aus Ermittlung des aktuellen Körpergewichts und des durchschnittlichen Tumordurchmessers der NSG-Mäuse. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines digitalen Messschiebers und einer Laborwaage. Abschließend wurden die Ergebnisse in Tabellen und Kurven des Programms Microsoft Excel festgehalten.

2.2.5 *In Vivo* murine Probengewinnung

Die Tötung der Tiere erfolgte durch CO_2 -Begasung und wurde nach Erfüllung bestimmter tierethischer Kriterien eingeleitet:
- errechnetes Tumorvolumen von 1.500 mm^3
- schwer auffälliges Verhalten
- ersichtliche/s Schwäche/ Leiden
- Ablauf der gesetzten Beobachtungszeit

Das Tumorvolumen wurde mit folgender Formel berechnet:
Volumen = Länge x $Breite^2$ x 0,5

Im Anschluss an die CO_2-Begasung erfolgte die Durchführung eines sachgemäßen Genickbruches an den Tieren. Den getöteten Mäusen wurden die Proben über einen Medianschnitt der Bauchdecke entnommen. Es erfolgte zusätzlich ein Schnitt der Haut im Bereich des implantierten Tumors zur Exzision des selbigen.
Die benötigten Gewebestücke, bestehend aus Tumor, Leber, Niere, Blut, Dünn- und Dickdarm wurden vorsichtig und unter möglichst aseptischen Bedingungen aus den Mäusen entfernt.
Das gewonnene Blut aus den *Venae Cava inferiores* wurde in EDTA Röhrchen überführt.
Alle weiteren Gewebestücke mussten zum Erhalt für spätere Versuche kryokonserviert werden. Dies geschah direkt nach Extraktion durch Überführung der Proben in flüssigen Stickstoff. Ein weiteres Stück des gewonnenen Tumors wurde in 4% Formalin fixiert.
Neben den nativ asservierten Präparaten des Dünn- und Dickdarms, wurden weitere Proben exzidiert, längs aufgeschnitten, gereinigt, aufgerollt und abschließend in Formalin bzw. alternativ im Tissue Tek Compound Containing Gel zur weiteren histologischen Untersuchung fixiert.

2.2.6 *Ex vivo* Versuchsaufbau

Die Expression der Thymidylat-Synthase (als Marker für 5-FU Toleranzentwicklung) und des GAPDH (als Housekeeping-Gen) wurde in den Leber-Resektaten behandelter und unbehandelter Tiere erfasst.
Hierzu musste erst die RNA aus den gewonnenen Proben isoliert werden. Anschließend wurde diese in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels qPCR quantifiziert und ausgewertet.
Ein weiterer Bestandteil der Analysen war die Auswertung des gewonnenen Blutplasmas. Dieses wurde auf die Blutplasmakonzentrationen von Kreatinin, Gamma-GT, ASAT und ALAT untersucht. Die Analysen des Blutplasmas wurden vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock angefertigt.
Zusätzlich wurden Tumor- und Gewebeproben histologisch aufbereitet und begutachtet. Diese Arbeiten erfolgten durch das Institut für Pathologie der Universität Rostock unter der Anleitung von Prof. Prall.

2.2.7 RNA Isolation

Nach Extraktion und Kryokonservierung der Tumorproben wurden diese zum gegebenen Zeitpunkt mit einem Hammer zerkleinert. Dies geschah im gefrorenen Zustand, steril umwickelt in einer Mullkompresse.
Folgende Versuche der RNA-Isolation wurden mit Hilfe des RNA-Isolationskit von peqLab durchgeführt. Um möglichst fehlerfreie Ergebnisse zu generieren, wurden alle verwendeten Materialien dem Isolationskit entnommen und die Versuche nach Herstellerangaben durchgeführt.
Die zerkleinerten Tumorstücke wurden in Lysegefäße des RNA- Isolierungskits von peqLab überführt und anschließend durch Hinzugabe von RNA Lysepuffer homogenisiert.
Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten und der parallelen Vorbereitung der weiteren Versuche, wurden die Proben zuerst anzentrifugiert. Im Anschluss daran konnten die am Boden des Lysegefäßes befindlichen Puffer- Gewebe- Gemische, in DNA- Removing Säulen überführt werden.
Durch die anschließende Zentrifugation über 2 Minuten wurde die DNA aus den entsprechenden Proben isoliert und bei -80 °C kryokonserviert.

Um auch die RNA extrahieren zu können, mussten zuerst die verbliebenen Proben mit unvergälltem Ethanol (70 %) vermischt werden.
Die so gewonnenen Substanzgemische wurden daraufhin auf PerfectBind-RNA Säulen überführt. Nach anschließender Zentrifugation und Verwurf des Säulendurchflusses folgte die erste Waschung der Proben mit RNA Wash Buffer I, mit angebundener Abzentrifugation des Säulendurchflusses.
Es folgte der DNase Verdau der Proben. Bei diesem Schritt wurde DNase im Mix mit einem DNase- Puffer und Nuclease- freiem Wasser, auf die Säulen geladen.
Nach zwei weiteren Inkubationsintervallen und der Hinzugabe von Wash Buffer I, wurden die Proben erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die zweite Waschung mit Hinzugabe des RNA Wash Buffer II und erneuter Zentrifugation. Daraufhin wurden weitere Zentrifugationen zur Trocknung der Säulen durchgeführt.
Der letzte Schritt der RNA- Isolation erfolgte durch die zweifache Elution der Proben mit Hinzugabe und Abzentrifugation von RNase freiem Wasser (70°C).
Der dadurch entstandene Säulendurchfluss samt gelöster RNA stand somit für weitere Analysen zur Verfügung.
Die Bestimmung der RNA- Konzentrationen der Proben, wurde über eine photometrische Analyse mit Hilfe des Nanodrops 1000 durchgeführt.
Abschließend erfolgte die Verdünnung der unterschiedlichen RNA-Proben auf eine Konzentration von 200ng/µl.

2.2.8 cDNA- Synthese

Die cDNA Synthese wurde mithilfe des cDNA Synthese Kits von Bioron durchgeführt. Hierzu wurden je 1 µg RNA aus jeder Probe in eine 96-Wellplatte überführt.
Die übertragenen Proben wurden mit Oligo (dT)15 Primern und Nuklease freiem Wasser versetzt und bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert.
Anschließend wurde ein Mastermix in die verwendeten Wells gegeben. Dieser Mix setzte sich aus einem fünffachen reverse Transkriptase Puffer, 1µl dNTP Mix, Wasser und 200 Einheiten Reverase zusammen.
Die somit ergänzten Wells mussten im nächsten Schritt erneut versiegelt und im MyCycler für 120 Minuten auf 45 °C und direkt im Anschluss für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt werden.
Abschließend konnte die gewonnene cDNA im Verhältnis 1:4 auf eine Konzentration von 12,5 ng/µl verdünnt werden (20 µl Probe + 60 µl RNase freies Wasser).

2.2.9 *In Vitro* qPCR mit CT

Die vorbereiteten cDNA Proben wurden auf weitere 96-Wellplatten überführt und anschließend mit 12,5 µl eines Mastermixes pro Well ergänzt. Der Mastermix setzte sich ausfolgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 6: Zusammensetzung des qPCR Mastermixes von Taqman

Reagenzien	**Volumen (1x)**
2x MasterMix	6,25 µl
Wasser	3,475 µl
ROX 10 fach verdünnt	0,15 µl
Primer- und Sondenmix + Probe	0,625 µl

Nach Herstellung des Mastermixes und der Vorbereitung der Proben als Duplikate, sowie der Fertigstellung von 2 Non-Template Control Wells (NTC = Mastermix ohne Hinzugabe der Probe), wurde die Wellplatte mit einer optisch klaren Klebefolie luftdicht versiegelt und restliche Luftblasen in den Proben über eine Zentrifugation herausgelöst.
Die somit fertig präparierten Platten konnten im Anschluss für die qPCR im Viia 7 Lightcycler verwendet werden. Hierfür wurde folgendes Programm verwendet:

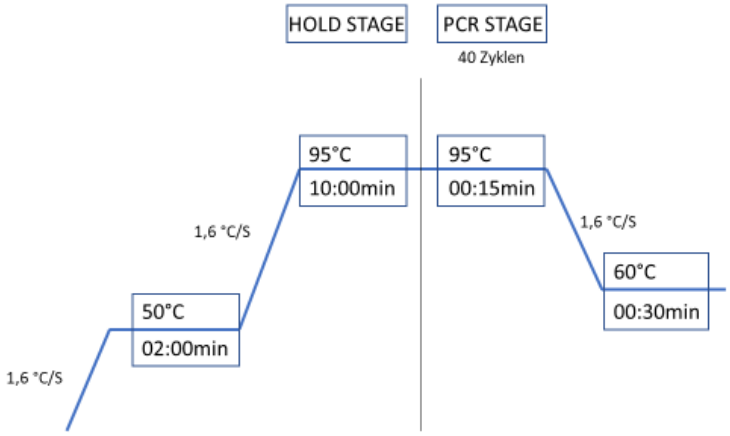

Abbildung 4: Zyklusdarstellung der qPCR mit TaqMan- System.

2.2.10 *In Vitro* DPD Analyse

Die DPD-Plasmaspiegel verschiedener Mausstämme (Foxn1^{nu}, C57Bl/6J und NSG) wurden über das gewonnene Blutplasma der Versuchstiere bestimmt.
Die Versuchsgruppen setzten sich aus NSG-Mäusen vor 5-FU Therapie (n=9), NSG-Mäusen nach 5-FU Therapie (n=3), C57Bl/6J- Mäusen (n=3) und Foxn1^{nu}- Mäusen (n=2) zusammen. Nach Extraktion des murinen Blutes und der Gewinnung des Blutplasmas, wurden die DPD-Blutplasmaspiegel mit Hilfe eines klassischen Sandwich ELISA bestimmt. Die Durchführung des Sandwich ELISA erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers (Abbexa, Cambridge, United Kingdom).

2.2.11 Histologische Auswertung

Die pathologische Analyse der Tumor- und Gewebeproben wurde vom Institut für Pathologie der Universität Rostock unter der Anleitung von Prof. Prall durchgeführt.
Hierbei wurden unter anderem die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten, subkutanen PDX Tumoren mit einer H&E Färbungen bearbeitet und in 4 µm dicke Schnitte prozessiert.
Diese wurden abschließend unter dem Lichtmikroskop auf morphologische Auffälligkeiten der therapieinduzierten Tumorregression untersucht (Nekroszeichen, Fibrosierungen und dystrophe Kalzifizierung). Die restlichen Analysen erfolgten abhängig vom Gewebetyp im Institut für Pathologie der Universität Rostock.

3. Ergebnisse

3.1 Erhebung des Gewichtsverlaufes

Um den Einfluss der einzelnen 5-FU Therapieschemata auf Allgemeinbefinden (u.a. Fell struppig bzw. fällt aus; verändertes (Sozial-) Verhalten; Gesteigerte Abwehrreaktion/Lautäußerungen beim Ergreifen) und Gewicht zu untersuchen, wurden die Versuchstiere regelmäßig untersucht und gewogen.
Ein Gewichtsverlust von über 20% gegenüber dem Ausgangsgewicht wurde als Studienabbruchkriterium definiert. Die Routineuntersuchungen während des Therapiezeitraums erfolgten 3x/Woche. Hierbei wurden die Mäuse gewogen und die Tumorgröße an den Flanken bestimmt. Nach Abschluss der Therapiephase, wurde das Intervall auf eine Messung pro Woche reduziert. Die Routineuntersuchungen erfolgten unabhängig vom jeweiligen Therapieschema.
Anhand des Gewichtsverlaufs sollte die Toxizität der verschiedenen Therapieformen eruiert werden.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchstieren unter Berücksichtigung der individuellen Ausgangsgewichte zu gewährleisten, wurden diese auf 100 % gesetzt und der unter der Therapie erhobene Gewichtsverlust bzw. Zugewinn prozentual errechnet.
Pro Tumorfall und Therapieschema wurde eine Kontrollmaus als Vergleich herangezogen.

3.1.1 Gewichtsverlauf unter Therapie

Im Folgenden sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewichtsänderungen aller Versuchstiere der sechs verschiedenen Therapieschemata dargestellt (Abb. 5). Tiere, die jeweils die gleiche Therapie erhielten, sind unabhängig vom individuellen PDX in der Therapiegruppe 1-6 zusammengefasst.
Jeder Graph stellt alle therapierten Mäuse der vier verschiedenen untersuchten Tumoren, sortiert nach ihrem Therapieschema, dar.

In Abb. 5 ist erkennbar, dass alle Therapieschemata einen negativen Einfluss auf das Gewicht der Tiere hatten. Dieser Einfluss war insbesondere in den Therapiegruppen 2 und 6 stark ausgeprägt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wiesen alle Versuchsmäuse zu Beginn der Therapie einen hohen Gewichtsverlust auf. In den meisten Fällen stellte sich nach mehreren Messtagen ein konstanter Gewichtsverlauf ein.

Gewichtszunahmen sind bei den Therapiegruppe 1 und 2 zu erkennen. Diese Zunahmen waren immer zum Ende des jeweiligen Therapieintervalls und/ oder kurz vor Gabe der nächsten Therapiedosis zu erkennen. So erholten sich beispielsweise die Mäuse des Therapieschemas 2 nach Abschluss der angewandten Therapie nach 7 Tagen. Die Versuchstiere des Schemas 1 hingegen erholten sich immer zum Ende des Therapieintervalls (1x Therapie zum Anfang von n=3 Wochen). Bei den restlichen Therapiegruppen, stellte sich eine Gewichtsstabilisierung nach 9 Tagen ein.

Die deutlichsten Unterschiede der verschiedenen Graphen sind in den anfänglichen Gewichtsverlusten nach Therapiestart zu erkennen und besonders bei den Schemata 2 und 6 stark ausgeprägt. Hier zeigten sich Gewichtsverluste von bis zu 20 % des körpereigenen Ausgangsgewichtes.

Auch die Gewichtskurven der Therapieschemata 1 und 5 zeigen einen anderen Verlauf als die Kurve der Kontrolle. Allerdings kam es bei diesen Mäusen zu Gewichtsverlusten von maximal 10 % des Ausgangsgewichtes.

Nicht aufgeführt sind in der Abb. 5 die unter der Therapie verstorbenen Tiere. Diese werden zusätzlich in einer eigenen Abb. 7 aufgeführt.

Zusammenfassend können die toxischsten Dosisschemata (höchster Gewichtsverlust) wie folgt zusammengefasst werden:

Tabelle 7: Gewichtsverluste der Versuchstiere unter Therapie

Gewichtsverlust in %	**Therapieschemata**
0-5 %	Schemata 3 und 4
5-11 %	Schema 1 und 5
10-22 %	Schema 2 und 6

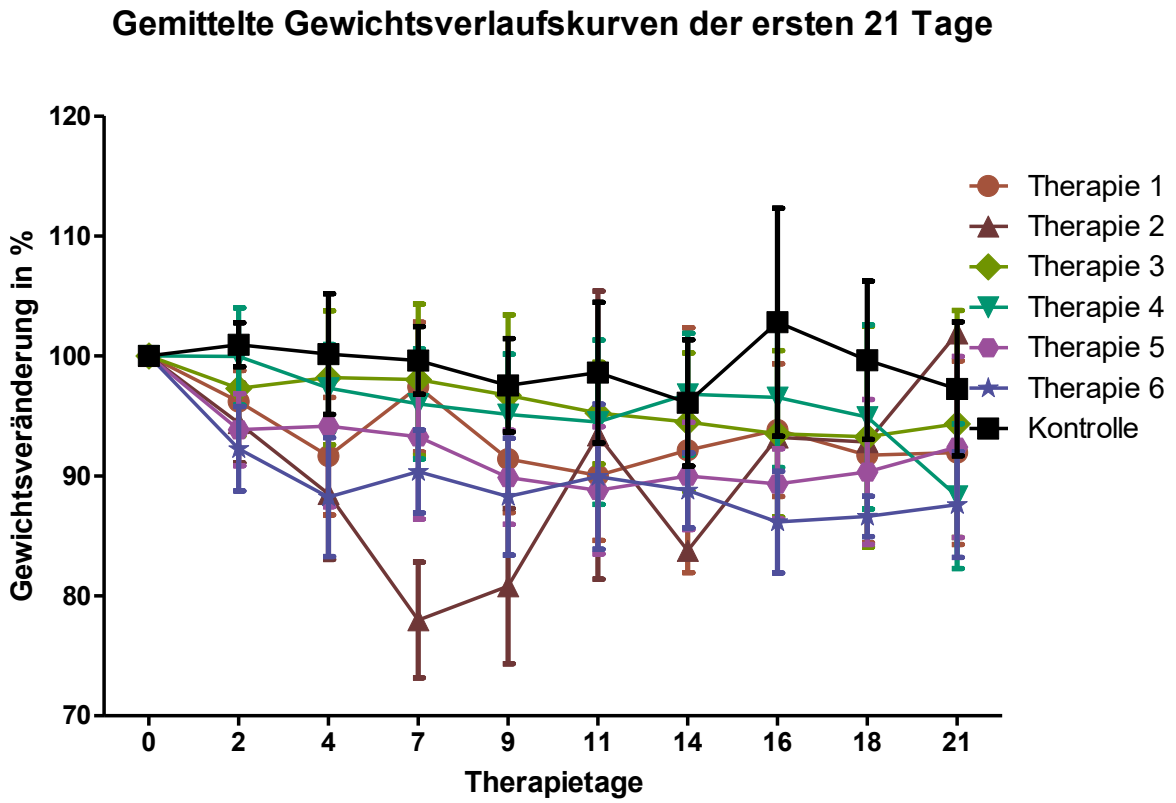

Abbildung 5: Dargestellt sind die Gewichtsverläufe der unterschiedlich behandelten NSG-Mäuse, gemittelt und sortiert nach dem jeweiligen verwendeten Therapieschema. (MW mit STABW, Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n=4).

3.1.2 Gewichtsverlaufskurven der Kontrollgruppe

Es wurde parallel zur Therapie das Gewicht der Kontrolltiere erfasst, um mögliche stressinduzierte Nebenwirkungen, bedingt durch die Tumorlast und die Applikationsart der Therapeutika (intraperitoneal) auszuschließen. Benutzt wurden die Kontrollverlaufskurven von Mäusen, deren transplantierte Tumoren den gleichen Spendern entstammten wie die in dieser Studie verwendeten Tumoren (Abb. 6).

Die aufgeführten Kurven zeigen in 3/4 Fällen einen nahezu unveränderten Gewichtsverlauf während des Therapiezeitraumes (21 Tage). Lediglich die Kurve der Kontrollmaus HROC29 fT4 M5 weist einen initialen Gewichtsverlust von über 5 % nach Start der Therapie und einen maximalen Gewichtsverlust nach Ende der Therapie von über 10% auf.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Kurve HROC46 fT2 M5 bereits nach 16 Tagen und somit vor Abschluss des Therapiezeitraums endete. In diesem Fall war bereits nach kurzer Zeit die maximale Tumorgröße erreicht und das Versuchstier wurde entsprechend der Versuchsabbruchkriterien getötet.

Der Abb. 6 ist zu entnehmen, dass die alleinige intraperitoneale Injektion zu keinen starken Gewichtsveränderungen geführt hat.
Folglich wurden alle weiteren Gewichtsreduktionen von über 5% des Startgewichts, auf das jeweilige Therapeutikum und/ oder Therapieschema zurückgeführt.

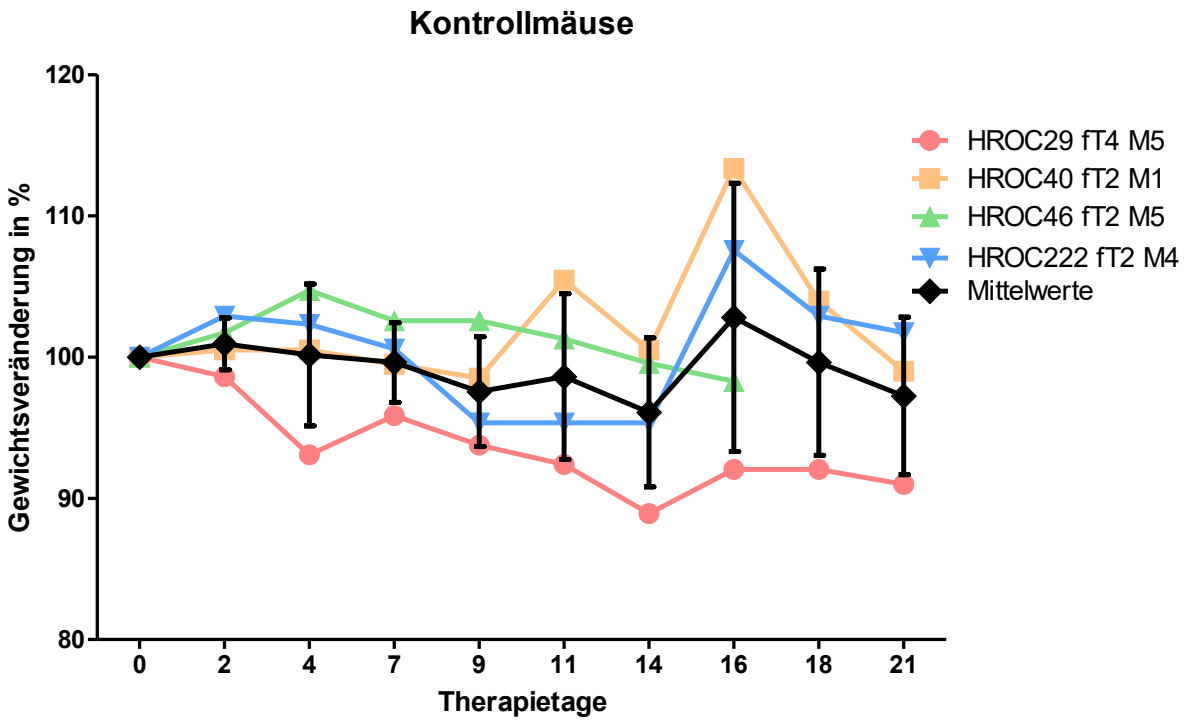

Abbildung 6: Dargestellt sich die Gewichtsverlaufe der Kontrollmäuse unter Placebobehandlung mit intraperitonealer PBS Injektion (n=4, MW mit STABW).

3.2 Überlebenskurve

Es verstarben einzelne Versuchstiere bereits vor dem definierten Versuchsende aufgrund der hohen Toxizität verschiedener Therapieschemata. Darüber hinaus gab es auch Methoden bedingte Todesfälle. Die häufigste Ursache der „geplanten“ Euthanisierung hingegen, war das Erreichen der maximal festgelegten Tumorgröße von 1.500 mm^3.

In der Abb. 7 sind die Überlebenskurven aller sechs Therapiegruppen, sowie der Graph der Kontrollgruppe aufgeführt. Um die Graphen übersichtlicher zu gestalten wurden gleich verlaufende Kurven leicht voneinander abgesetzt.
Zu sehen ist der prozentuale Anteil der Mäuse, der im Verlauf des Therapiezeitraums bzw. innerhalb der ersten drei Wochen unerwartet gestorbenen Tiere oder die nach Erreichen der Abbruchkriterien getötet wurden. In wenigen Fällen mussten Mäuse bedingt durch schwere Nebenwirkungen der Therapie vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

Wie in der Abb. 7 deutlich zu erkennen ist, gab es unter allen Therapieschemata mit Ausnahme des Schemas sechs Todesfälle innerhalb der ersten 3 Wochen. Tiere der Therapiegruppen 1-5 verstarben innerhalb des jeweiligen Therapiezeitraumes. In den meisten Fällen ereigneten sich diese Tode in der zweiten Behandlungshälfte der entsprechenden Therapieschemata.
Wichtig sind hier vor allem die Versuchstiere des Therapieschemas 4. Hier wurden 50% der NSG-Mäuse nach Erreichen der maximalen Tumorgröße planmäßig euthanasiert und verstarben nicht vorzeitig an den Auswirkungen der Chemotherapie. Die Anzahl der therapiebedingten Todesfälle sind ergänzend in Tabelle 8 aufgelistet.
Bei Betrachtung der Abb. 7 fällt besonders die Therapiegruppe 2 auf. Bei dieser Gruppe kam es ausschließlich zu therapieinduzierten, vorzeitigen Todesfällen. Es verstarben rund 50% der Mäuse am siebten Tag nach Therapiebeginn an den Folgen der akuten Toxizität, sowie weitere Tiere bis zum Tag 11 (Σ 87 % der Tiere, entspricht 7/8).
Unter der Annahme, dass alle nicht geplanten Todesfälle von der zugeführten Chemotherapie verursacht wurden, konnten die Dosisschemata nach ihrer Letalität aufgelistet werden:

Tabelle 8: Übersicht der therapieinduzierten Todesfälle

Anzahl der ungeplant verstorbenen Tiere während der ersten 21 Tage der Studie	**Therapieschemata**
0/7 bzw. 0/4	Schema 6 und Kontrollgruppe
1/8 bzw. 1/7	Schema 3 und Schema 5
2/8	Schema 1 und Schema 4
7/8	Schema 2

Eine mögliche Ursache für das vorzeitige Ableben wurde anfänglich im Gewichtsverlust der Versuchstiere gesucht. Wenn allerdings die Abbildungen 5 und 7 miteinander verglichen werden, scheint der Gewichtsverlust unter der Tumortherapie nur begrenzt mit den erfolgten Todesfällen zusammen zu hängen.

Lediglich das Dosisschema 2 weist einen deutliche Korrelation zwischen dem therapieinduzierten Gewichtsverlust und einer hohen Sterblichkeit auf. Ein Vergleich der Gewichtskurven unter Therapieschema 6 hingegen lässt keinen direkten Zusammenhang zwischen Gewichtsverlust und letaler Toxizität erkennen.

Wie bereits zuvor erwähnt, kam es neben den therapieinduzierten Todesfällen auch zum methodenbedingten Ableben von drei Tieren (orale Applikation).

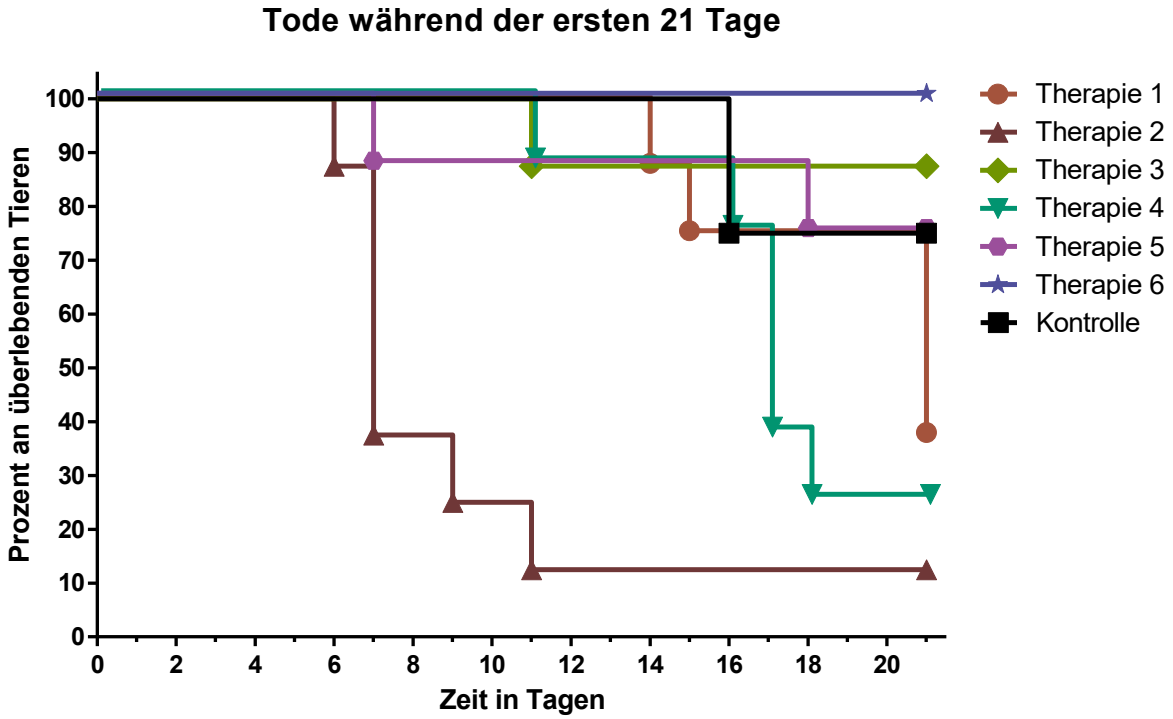

Abbildung 7: Dargestellt ist das prozentuale Überleben der verschiedenen Therapiegruppen innerhalb der ersten 21 Tage der Studie (Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n= 4).

3.3 Tumorwachstumskurven

Neben den Körpergewichtskontrollen zur Bestimmung der Toxizität wurde auch regelmäßig der Progress des Tumorwachstums kontrolliert. Die Messungen erfolgten in den gleichen Intervallen wie die Gewichtserhebungen und wurden ebenfalls als Mittelwerte mit Standardabweichung zusammengefasst. Auch hier wurden die Messkurven der Kontrolltiere verwendet, deren transplantierte Tumoren den gleichen Spendern entstammten, wie die in dieser Studie verwendeten Tumoren.

3.3.1 Tumorwachstumskurven der verschiedenen Tumorsubtypen

Da es sich bei den transplantierten Tumoren um unterschiedliche Subtypen variabler Aggressivität handelte, wurden in der Abb. 8 die Tumorwachstumskurven der verwendeten Kontrollmäuse aufgeführt (n=1 pro Tumortyp). Die so erstellte Kontrollkurve wurde auch in den Abb. 9-11 verwendet.
Wie in der Abb. 8 deutlich zu erkennen ist, kam es trotz gleicher Versuchsbedingungen zu unterschiedlich schnellen Tumorwachstumsgeschwindigkeiten bei den verschiedenen Tumoren. Somit haben nicht nur die verschiedenen Therapieschemata Einfluss auf das Tumorwachstum, sondern auch der individuelle Tumorfall.
Bereits am vierten Tag der Kontrollphase wuchs der Tumor HROC46 wesentlich schneller als die restlichen Tumoren. Dieses schnelle Wachstum blieb auch im weiteren Verlauf erhalten und bedingte die früheste Entnahme des Tumors im Vergleich zu den restlichen Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu wuchsen die Tumoren HROC222 und HROC29 relativ konstant und langsam. Erst ab Tag 18 ist ein deutlicher Unterschied im Anstieg der beiden Kurven zu erkennen. Die Tumorwachstumsgeschwindigkeit des HROC29 PDX nahm ab diesem Tag wesentlich schneller zu, als die des Tumors HROC222.
Die Wachstumskurve des Tumors HROC40 zeigt einen intermediären Verlauf, analog der ermittelten Kontrollkurve.

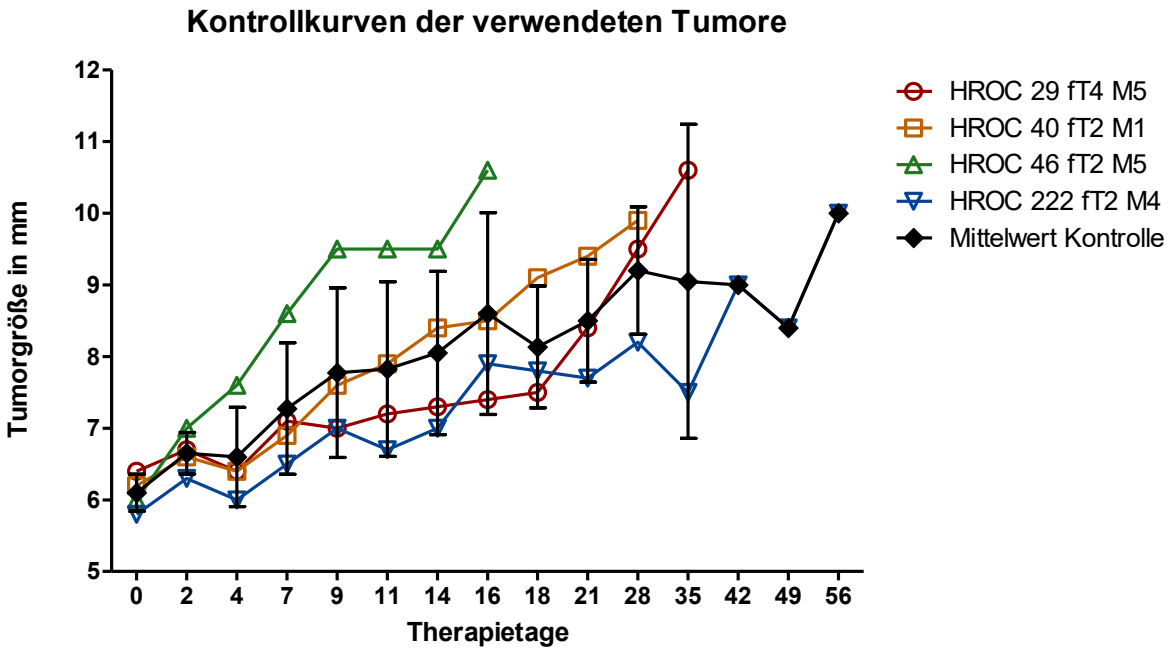

Abbildung 8: Dargestellt sind die Wachstumskurven der verschiedenen Tumorsubtypen (n=1 für jeden einzelne Kontrollkurve). Für weitere Vergleiche wurden die 4 Kurven in einer Kurve gemittelt und mit der Standardabweichung versehen (Mittelwert Kontrolle n=4).

3.3.2 Tumorwachstumskurven der verwendeten Therapieschemata

Es wurden alle Versuchstiere mittels Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung zusammengefasst, welche mit dem gleichen Therapieschema behandelt wurden. Der verwendete Kontrollgraph stellt erneut die gemittelte Tumorwachstumsrate aller Kontrollmäuse dar. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurden die Tumorwachstumsraten in 3 Abbildungen dargestellt. Jede Abbildung zeigt zwei ähnliche Therapieschemata und die Kontrollgruppe.

In den Abb. 9-11 ist deutlich zu erkennen, dass es zu unterschiedlich ausgeprägten Hemmungen des Tumorwachstums zwischen den verschiedenen Therapieschemata kam.
Tumoren der Therapiegruppe 2 wuchsen innerhalb des Therapiezeitraumes am langsamsten.
Allerdings muss beachtet werden, dass nur noch eine von acht Mäusen des Schemas 2 nach Therapietag 11 in der Studie war. Die Versuchstiere der Therapieschemata 1 und 6

wiesen ebenfalls ein reduziertes Tumorwachstum auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Therapiegruppen 3, 4 und 5 kaum veränderte Wachstumsgeschwindigkeiten.
Alle Versuchsgruppen wiesen eine verstärkte Tumorwachstumsgeschwindigkeit nach dem Therapietag 21 auf (Therapieende und Beginn der Nachbeobachtungszeit). Im Gegensatz dazu blieb die Tumorwachstumsgeschwindigkeit der Kontrollgruppe auch nach Tag 21 konstant.

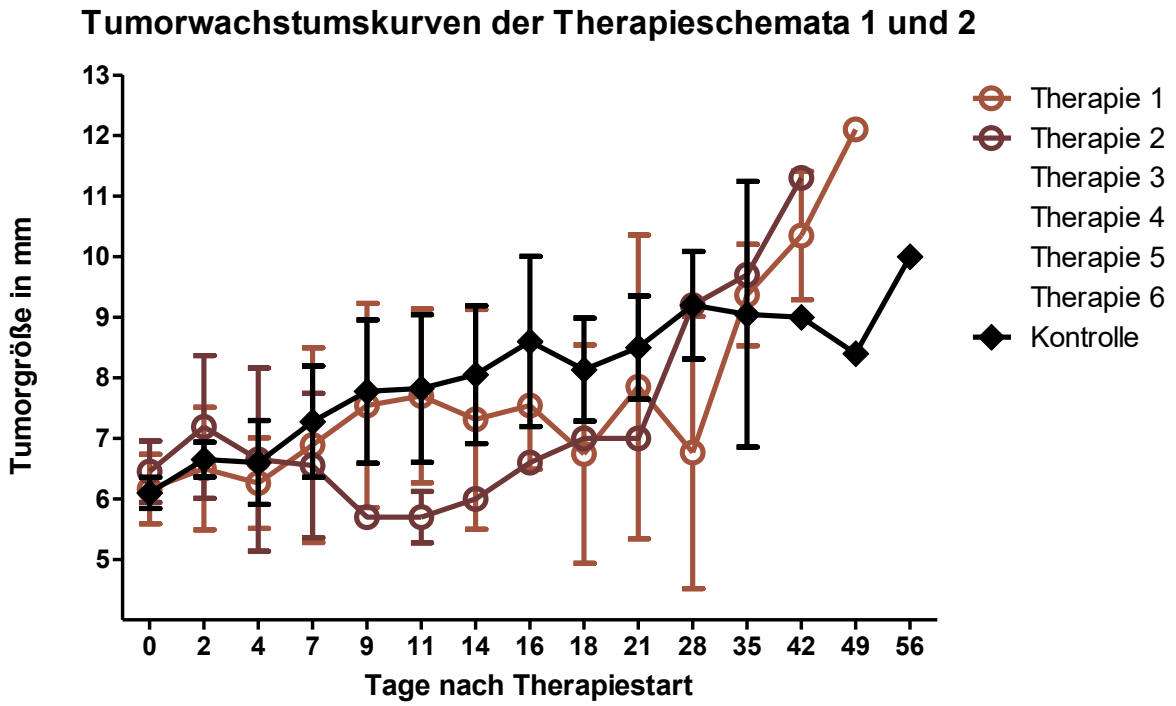

Abbildung 9: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata eins, zwei und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Kontrolle n=4).

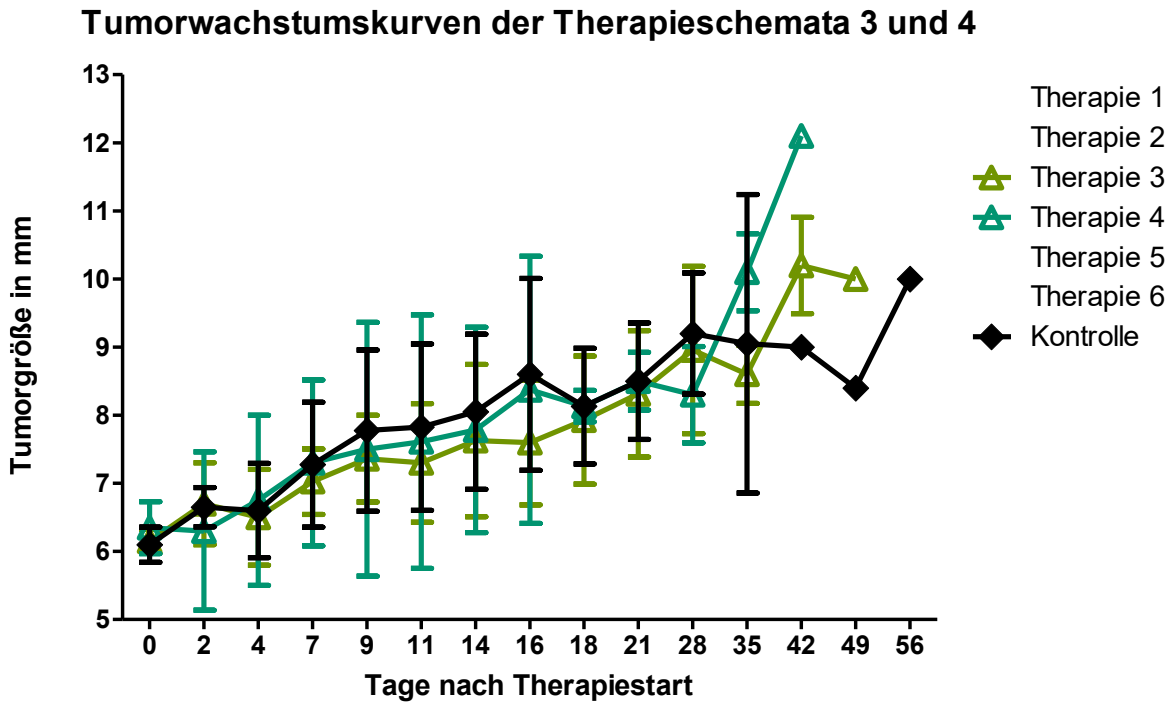

Abbildung 10: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata drei, vier und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Kontrolle n=4).

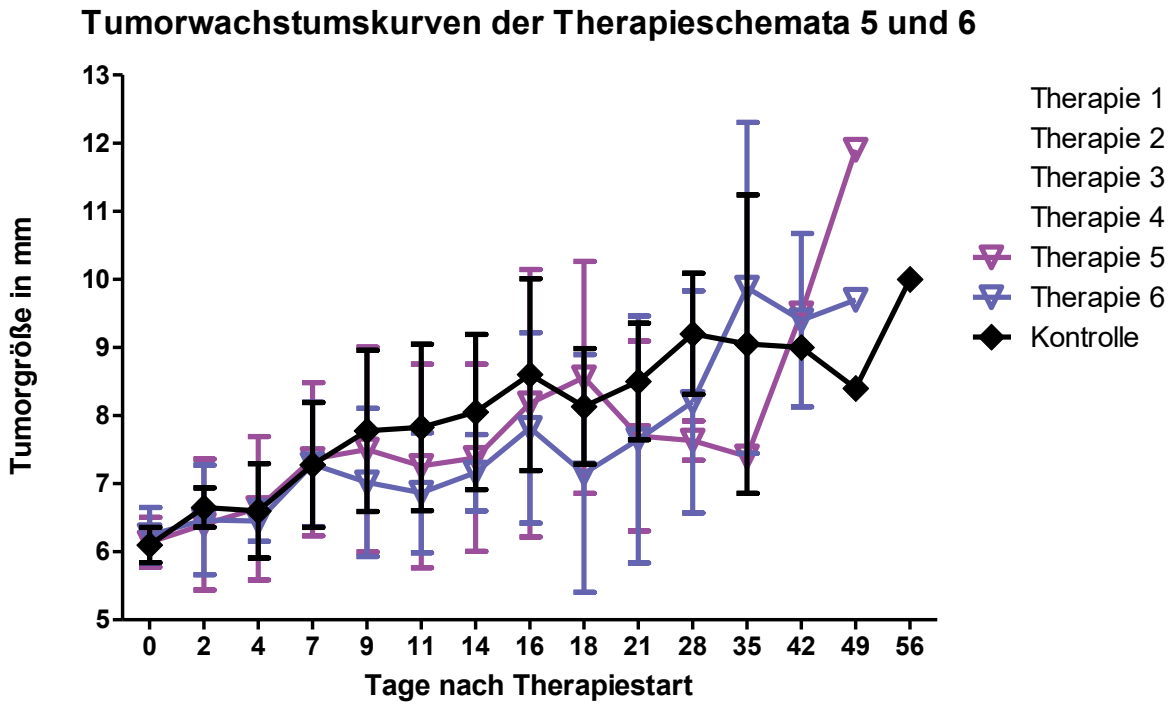

Abbildung 11: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata fünf, sechs und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n=4).

3.4 Tumorgewichte

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens stellt das Tumornassgewicht dar. So konnte nicht nur die Wirkung der verschiedenen Therapieschemata auf die Tumorgröße, sondern auch auf das Tumorgewicht ermittelt werden. Je leichter Tumoren ähnlichen Volumens waren, desto effektiver wurde die Therapie gewertet.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 12 als Boxplot mit Medianwert dargestellt.

Jeder einzelne Graph stellt die Tumorgewichte dar, welche mit dem gleichen Therapieschema behandelt und nach Therapieabschluss bzw. dem Erreichen einer Größe von 10 bis 12 mm im Durchmesser entnommen wurden.

Die Tumorgewichte der Therapieschemata 3, 4 und 5 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe am leichtesten. Besonders die Tumoren des Therapieschemas 4 wiesen die besten Therapieergebnisse mit dem niedrigsten Median von 0,42 g auf (Median der Kontrollgruppe= 0,59 g).

Im Gegensatz dazu wiesen die Tumoren der restlichen Therapiegruppen untereinander sowie im Vergleich zur Kontrolle ähnlich hohe Gewichte auf.

Tabelle 9: Dargestellt sind die errechneten Durchschnittsgewichte der aus den verschieden therapierten NSG-Mäusen extrahierten Tumoren (Therapie 1 n=4, Therapie 2 n=1, Therapie 3 n= 4, Therapie 4 n=6, Therapie 5 n= 3, Therapie 6 n= 5, Kontrolle n= 4).

Therapieschema	**Durchschnittsgewicht [in g]**
Therapie 1	0,66
Therapie 2	0,75
Therapie 3	0,63
Therapie 4	0,50
Therapie 5	0,64
Therapie 6	0,71
Kontrolle	0,67

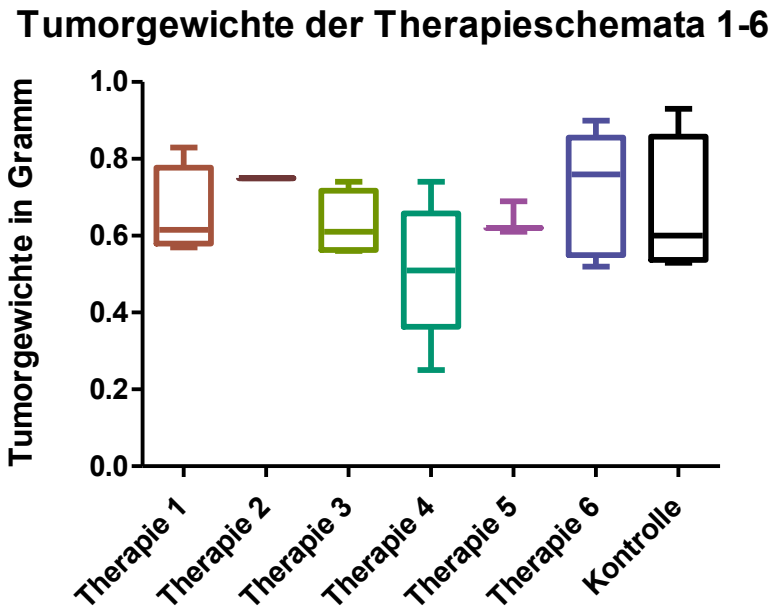

Abbildung 12: Dargestellt sind die gemessenen Tumorgewichte nach Extraktion der Tumoren aus den entsprechenden Mäusen. Die Gewichte wurden als Boxplot in den jeweiligen Therapieschemata samt Medianwert zusammengefasst (Therapie 1 n=4, Therapie 2 n=1, Therapie 3 n= 4, Therapie 4 n=6, Therapie 5 n= 3, Therapie 6 n= 5). Zum Vergleich wurden auch die Tumorgewichte der Kontrollgruppe dargestellt (n=4).

3.5 Blutplasmaanalyse

Zum Versuchsende wurde den Mäusen Blut entnommen und dass daraus prozessierte Plasma für weiterführende Analysen asserviert. Neben Kreatinin wurden auch die Enzyme ASAT, ALAT und Gamma-GT untersucht. In vielen Fällen konnten nur geringe Mengen an Blutplasma isoliert werden. Dementsprechend kam es laborchemisch oft zu keinen verwertbaren Resultaten. Dies gilt insbesondere für Gamma- GT, weshalb diese Werte im Folgenden nicht aufgeführt werden.

Als Kontrollgruppe wurde das Blutplasma der Mausstämme NSG, C57Bl/6J und NMRI Foxn1^{nu} verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Mittelwerte ausgewählter Laborparameter verschiedener Mausstämme

Mausstamm	**ASAT [U/l]**	**ALAT [U/l]**	**Kreatinin [µmol/l]**
NSG	59,43	26,70	14,45
B6	51,40	27,18	15,08
NMRI Foxn1^{nu}	52,58	30,35	10,43
Kontrolle Gesamt	54,47	28,08	13,32

3.5.2 Einfluss auf Kreatinin

In den Abb. 13 und 14 sind die ermittelten Laborparameter Kreatinin, ASAT und ALAT der NSG Mäuse, als Boxplot mit dazugehörigem Median, entsprechend der angewandten Therapie dargestellt.

Hinsichtlich der Kreatinin-Analysen zeigten sich unterschiedlich hohe Konzentrationen zwischen den einzelnen Therapiegruppen. Die höchsten Blutplasmaspiegel wiesen die Mäuse der Therapiegruppen 3, 5 und 6 auf. Allerdings lagen lediglich 2 Messwerte der Mäuse des Therapieschemas 6 vor.

Das Therapieschema 5 zeigte sehr starke Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchstieren, mit tendenziell höheren Messwerten gegenüber den Kontrollen. Die höchsten Kreatinin-Plasmaspiegel wurden in der Therapiegruppe 3 nachgewiesen. Die verbliebenen Therapiegruppen 1, 2 und 4 zeigten hingegen nahezu identisch hohe bzw. im Falle der Therapiegruppe 2 sogar niedrigere Kreatinin-Plasmaspiegel als die Kontrollgruppe.

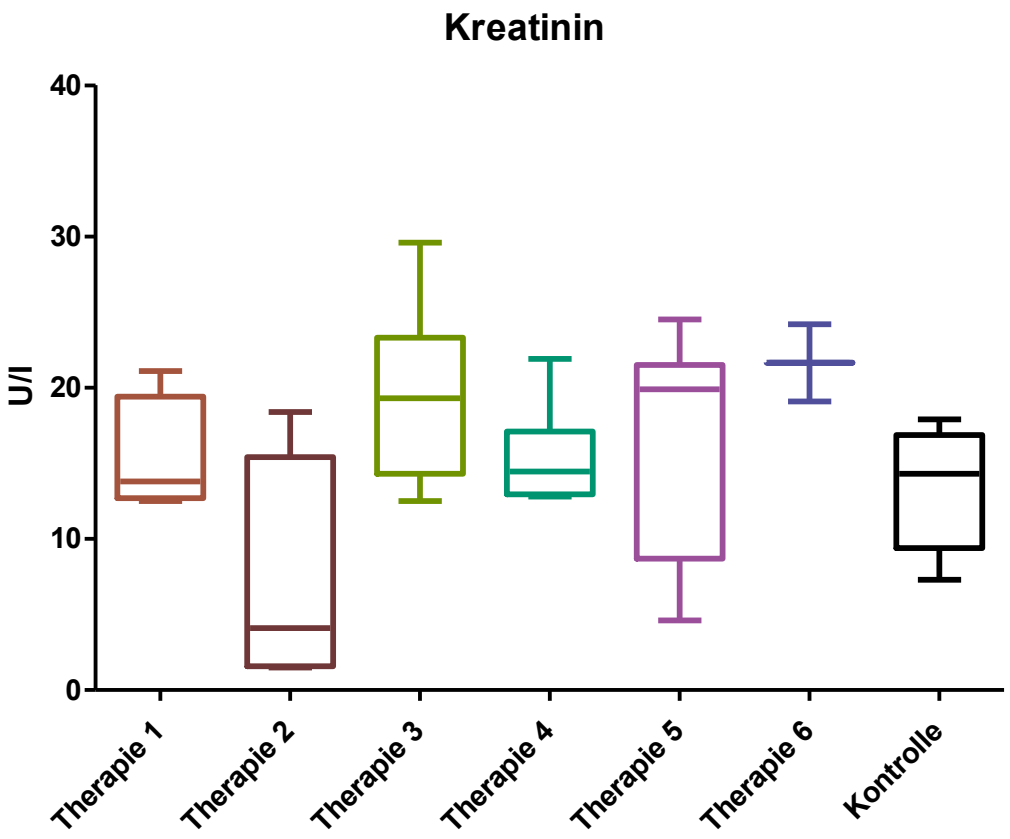

Abbildung 13: Dargestellt sind die ermittelten Kreatininwerte des murinen Blutplasmas. Die dargestellten Proben wurden entsprechend des Therapieschemas aufgelistet und mit dem Medianwert sowie der STABW versehen (Therapie 1 (n= 4), Therapie 2 (n= 4), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 6), Therapie 5 (n=7), Therapie 6 (n= 2), Kontrolle (n= 12)).

3.5.3 Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) Analyse

Wie der Abb. 14 entnommen werden kann, wiesen alle therapierten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höhere ASAT- und nahezu identische ALAT Blutplasmaspiegel auf. Da allerdings in den Therapiegruppen 1, 2 und 5 der ASAT-Analyse, sowie den Therapiegruppen 1 und 2 der ALAT-Analyse nur sehr wenige Messwerte vorlagen, wird auf diese im Folgenden nicht näher eingegangen.

Die Ergebnisse der ALAT Analyse wiesen ähnlich hohe Medianwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Es sind lediglich einzelne erhöhte Messwerte in den Therapiegruppen 1,

3, 4, 5 und 6 aufgetreten. Die Therapiegruppe 1 wies mit einer Blutplasmakonzentration von über 250 U/l die höchste gemessene ALAT Konzentration auf. Leichte Blutplasmaspiegelerhöhungen wurden bei den Therapieschemata 4 und 6 nachgewiesen, mit teilweise sehr hoher interindividueller Varianz.

Im Rahmen der ASAT-Analyse zeigten sich die größten Abweichungen zur Kontrollgruppe bei dem Therapieschema 6. Ähnlich hohe Messwerte zeigten die Therapiegruppen 3 und 4. Folglich kann grundsätzlich von einer Erhöhung der ASAT Konzentrationen im Plasma unter Therapie ausgegangen werden (Therapieschemata 2-6 wiesen signifikant erhöhte ASAT-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf).

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanztest der ASAT-Plasmakonzentrationen der Therapieschemata 1 (n=1), 2 (n=2), 3 (n=7), 4 (n=4), 5 (n=2) und 6 (n=5)

Therapieschemata	Mittelwerte der ASAT-Plasmakonzentration in U/l	Standardabweichung in U/l	Mann-Whitney Test
Dosis 1	107	0	Nicht auswertbar
Dosis 2	100	38,2	p=0,0440
Dosis 3	122,1	61,8	p=0,0003
Dosis 4	115,7	50,7	p=0,0022
Dosis 5	238,5	74,2	p=0,0220
Dosis 6	143,3	104,6	p=0,0013
Kontrolle	54,5	12,8	

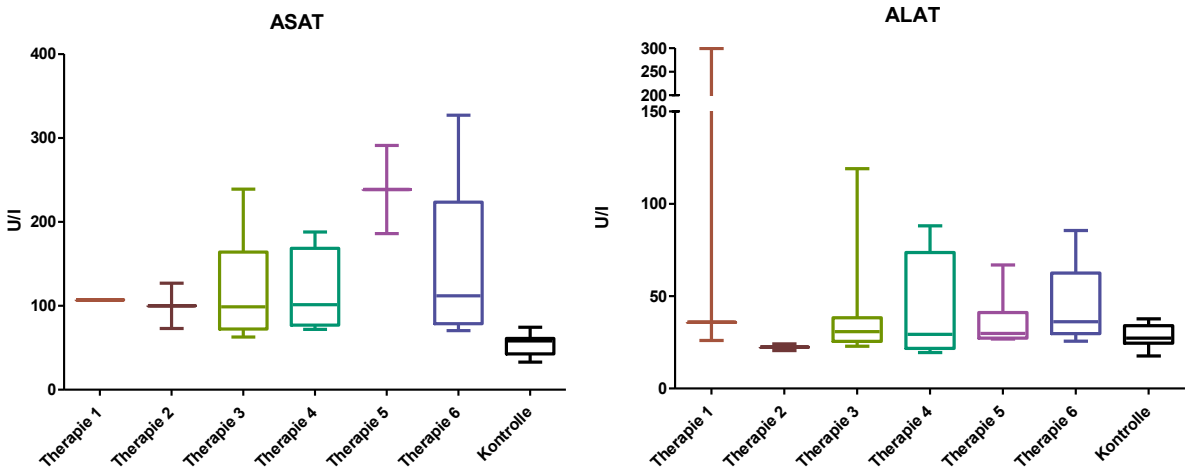

Abbildung 14: Dargestellt sind die ermittelten ASAT- und ALAT Werte nach Analyse des entnommenen Blutplasmas. Die Werte wurden entsprechend des verwendeten Therapieschemas mit Medianwert und STABWS dargestellt. ASAT: (Therapie 1 (n= 1), Therapie 2 (n= 2), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 4), Therapie 5 (n=2), Therapie 6 (n= 5), Kontrolle (n= 12)). ALAT: (Therapie 1 (n= 3), Therapie 2 (n=2), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 4), Therapie 5 (n= 7), Therapie 6 (n= 6), Kontrolle (n= 12)).

3.6 DPD Nachweis

DPD spielt eine entscheidende Rolle in der Metabolisierung von Pyrimidinanaloga wie 5-FU. Bei reduzierter DPD Aktivität kommt es beim Menschen zu verstärkten toxischen Nebenwirkungen im Rahmen der Chemotherapie. Um diese Wirkungen zu reduzieren, müssen besondere Therapieschemata beim Patienten angewandt werden.

Da es im Verlauf der experimentellen Therapie immer wieder zu starken Nebenwirkungen an den Versuchstieren kam, wurde eine Ursache für die hohe Empfindlichkeit der NSG-Mäuse gegenüber dem 5-FU gesucht. Als mögliche Ursache wurde ein reduzierter DPD-Plasmaspiegel vermutet.

Folglich wurden die basalen DPD Konzentrationen unterschiedlicher Labor-Mausstämme (C57Bl/6J (n=3), NMRI Foxn1^{nu} (n=2) und NSG (n=9)) untersucht. Die Ergebnisse dieser

Auswertung sind in der Abb. 15 dargestellt. Zusätzlich wurden die DPD-Spiegel von NSG Mäusen nach Therapie (n=2) erfasst.

Besonders hohe Konzentrationen an DPD und damit verbunden eine hohe Toleranz gegenüber 5-FU, wiesen die Tiere des Stammes NMRI Foxn1^{nu} auf, welche gegenüber den NSG- Mäusen sogar signifikant war ($p<0.01$). Die C57Bl/6J-Tiere wiesen leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte Enzymspiegel im Vergleich zu den NSG-Mäusen auf.

Beim Vergleich vor und nach der Therapie zeigten sich hingegen keine relevanten Unterschiede im DPD-Spiegel. Somit waren NSG-Mäuse die Versuchstiere mit den niedrigsten basalen DPD-Spiegeln.

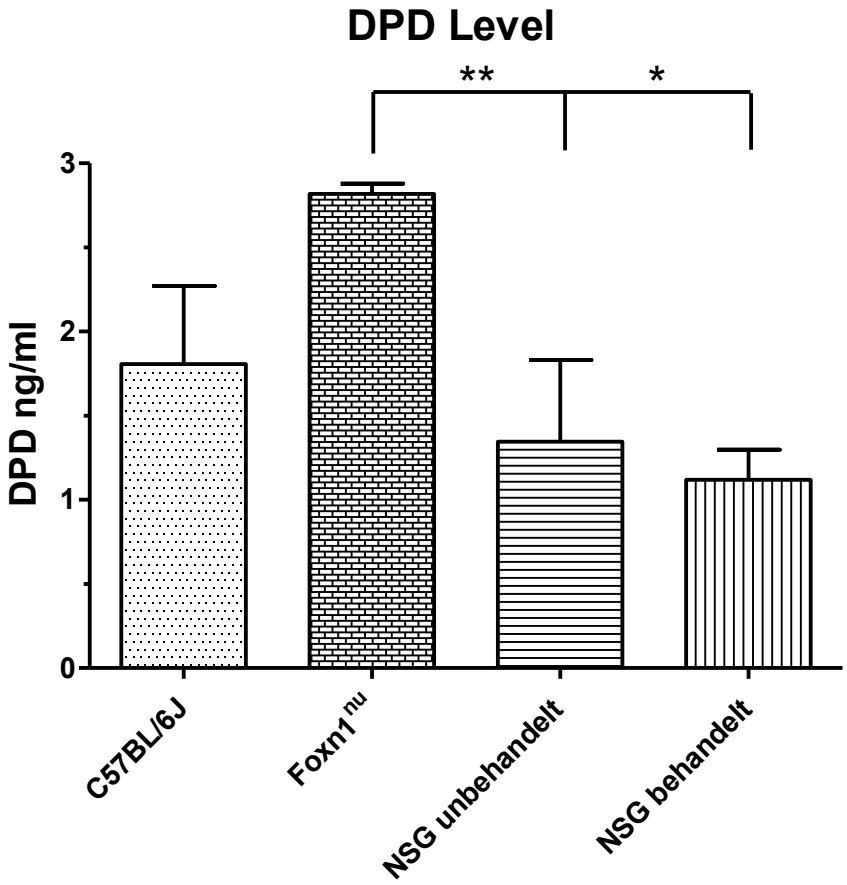

Abbildung 15: Dargestellt sind die analysierten DPD Konzentrationen verschiedener Mausstämme (Foxn1^{nu} n=2, C57Bl/6J (n=3)). Weiter wurden die Konzentrationen der Spiegel von NSG- Mäusen, vor und nach der 5- FU Therapie bestimmt (n=9 und n=2).

3.7 Thymidylat-Synthase Expression

Unter Therapie zeigten sich unterschiedlich stark ausgeprägte tumorwachstumshemmende Effekte. Als mögliche Ursache für das schlechte Ansprechen individueller PDX Modelle auf die Chemotherapie, wurde eine erhöhte Expression der TS vermutet. Folglich wurde die Expression dieses Gens in hepatischen Gewebestücken quantitativ mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse der TS-Expression sind in der Abb. 16 dargestellt.
Aufgrund therapiebedingter Todesfälle konnten in einigen Versuchsgruppen nur wenige Proben analysiert werden (z.B. n=3 (Therapieschema 2) und n=8 (Therapieschema 4)). Kontrollgewebsproben wurden aus tumortragenden,- sowie tumorfreien Tieren gewonnen (Tab. 12).

Tabelle 12: Delta CT-Werte der Kontrollmäuse

Kontrollmaus	**2^- Delta CT- Wert**
HROC384 Met2 fT0 M1	7,15
HROC85 fT1 M2	6,66
HROC85 fT1 M3	3,68
HROC405 fT0 M2	20,51
NSG weiblich	13,51
NSG männlich	14,70

Die Ergebnisse der TS- Analyse wurden in der Abb. 16 als Säulendiagramm mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt.
Es konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei keiner Therapiegruppe eine erhöhte Expression von TS festgestellt werden (mit Ausnahme von wenigen Ausreißern).
Bedingt durch die geringe Probenanzahl der Therapiegruppe 2, ist deren Standardabweichung sehr hoch. Generell konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen detektiert werden.

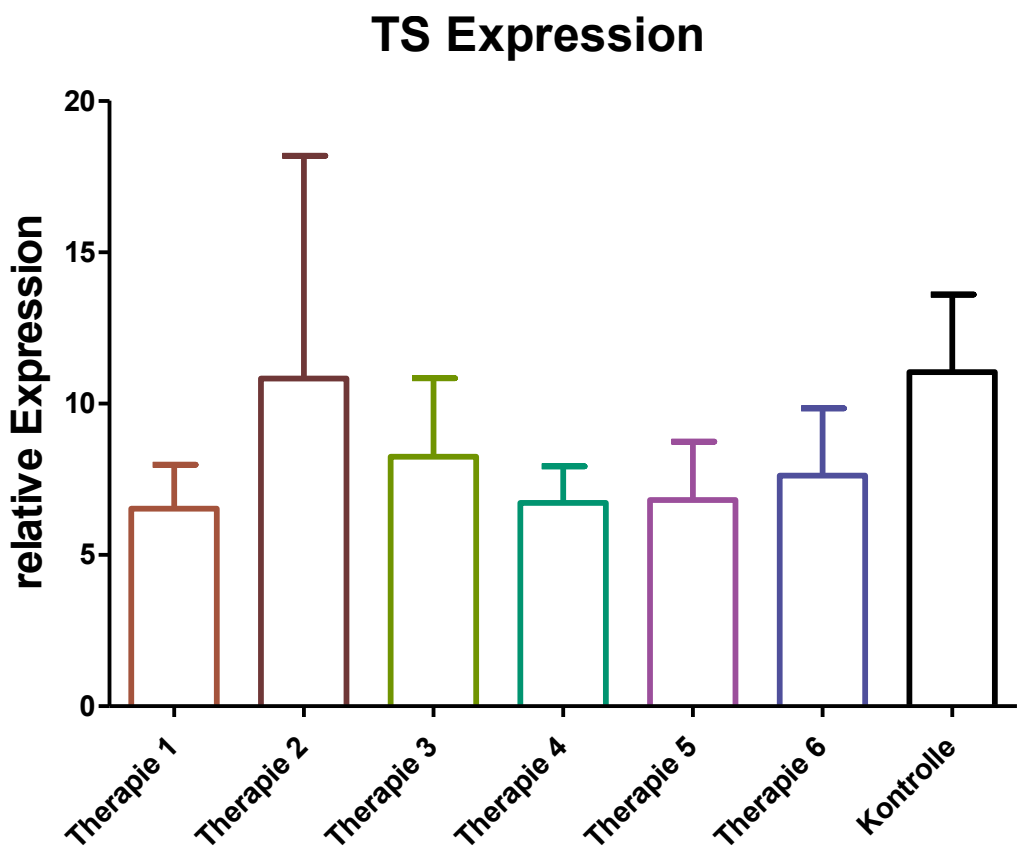

Abbildung 16: Dargestellt sind die Resultate der quantitativen qPCR von murinen, hepatischen Gewebestücken (Therapie 1 (n= 6), Therapie 2 (n= 3), Therapie 3 (n=7), Therapie 4 (n= 8), Therapie 5 (n=5), Therapie 6 (n=6), Kontrolle (n= 6)). Die Ergebnisse wurden nach der verwendeten Therapie sortiert und mit einer Standardabweichung versehen.

3.8 Histologie

Die pathologische Auswertung der Tumor- und Gewebeproben wurde vom Institut für Pathologie der Universität Rostock unter der Anleitung von Prof. Prall durchgeführt.
Nach genauer pathologischer Begutachtung der Tumorproben konnten keine histologischen Effekte der angewandten Therapieschemata im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Weiter konnten anhand der entnommenen Gewebeproben (Leber, Niere, Dünn- und Dickdarm) keine unterschiedlichen therapiespezifischen Effekte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachgewiesen werden.
Bilder der bearbeiteten PDX Modelle sind in der Abb.17 dargestellt.

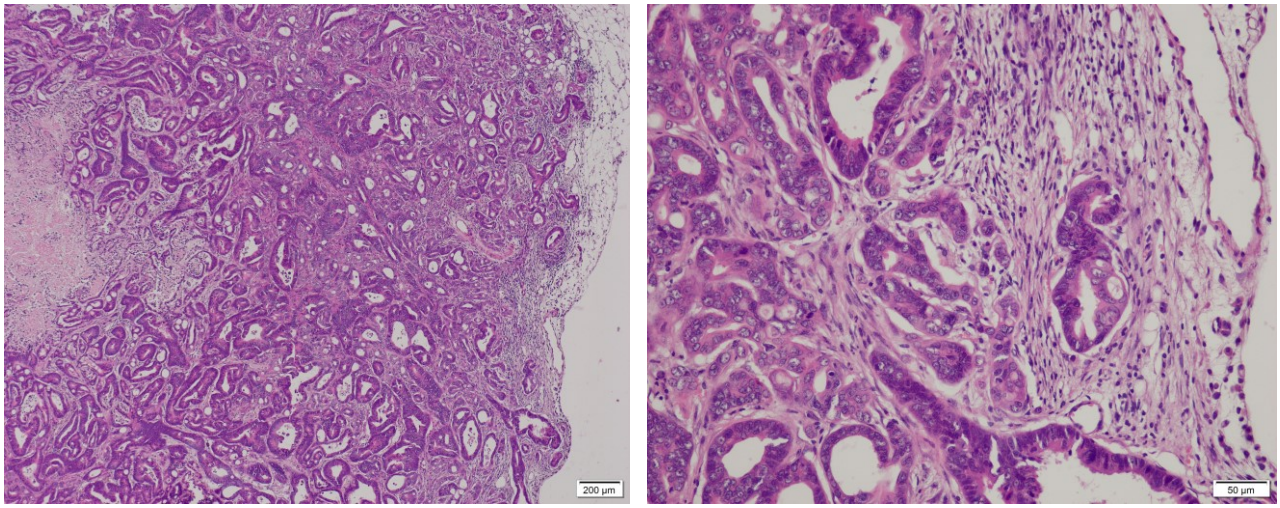

Abbildung 17: Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen des PDX HROC46 in verschiedenen Vergrößerungen. Es sind keine therapiespezifischen Effekte zu erkennen.

4. Diskussion

4.1 Studiendesign

4.1.1 Grundlagen

Im Rahmen dieser Studie entschieden wir uns für die Verwendung eines PDX-Modells zur Darstellung und Untersuchung einer 5-FU basierten Therapie des KRK und deren Auswirkungen auf den Mausstamm NSG. Das PDX-Modell wurde in diesem Fall gewählt, um möglichst genau die klinische Situation eines Patienten auf ein Mausmodell übertragen zu können. So wurden von Patienten gewonnene Tumoren in die Flanken von Mäusen des Stammes NSG implantiert, welche nach erfolgreichem Anwachsen therapiert und untersucht wurden. Der Erfolg einer solchen Studie ist maßgeblich von der Anwachsrate des verwendeten Xenografts abhängig.
Folgende Faktoren beeinflussen das *in vivo* Engraftment von Tumorgewebe: Die Qualität und Sterilität des verwendeten Tumorgewebes, dessen Ursprung (solide vs. hämatologisch; Biopsie vs. OP-Präparat) und auch der verwendete Mausstamm. Dieser muss eine ausgeprägte Immundefizienz aufweisen, damit der tumorbekämpfende Effekt des mauseigenen Immunsystems minimal ist.
Weitere wichtige Faktoren des Spendermaterials für das erfolgreiche Anwachsen von PDX sind das Patientenalter, Tumorlokalisation, hoher M-Status (nach TNM-Klassifikation), molekularer Subtyp (besonders hoch bei MSI-Tumoren), Mutationen in K-Ras und B-Raf, sowie die Verwendung von aus Metastasen gewonnenen Materials [103].
Die maximale Tumoranwachsrate für Gewebe des KRK liegt in NMRI Foxn1^{nu}-Mäusen bei etwa 70% und in NSG-Mäusen bei etwa 80% [104]. Auf Grund der höheren Anwachsrate von Tumoren in NSG-Mäusen, wurden dieses als Versuchstiere im Rahmen dieser Studie verwendet. Das Labor der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Rostock verfügt über eine große Kollektion von niedrig passagierten PDX-KRK-Modellen. Diese Modelle umfassen alle bis dato bekannten molekularen Subtypen des KRK [104–109]. Auf Grund dieser vielfältigen Tumorbank lassen sich der klinischen Realität nahe PCT-Studien mit einem „one animal per model per treatment“ Design durchführen. Der Vorteil dieses Studiendesigns liegt in der präzisen Tumorbehandlung von einer vergleichbar geringen Anzahl von Versuchstieren.

Durch das „eine Maus, eine Behandlung pro Versuch“ Konzept wird versucht den klinischen Alltag zu reproduzieren. Jedes Versuchstier stellt einen individuellen Patienten mit entsprechender Tumortherapie dar.
Die Rationale, dass „one animal per model per treatment“ Design zu verwenden begründet sich aus der statistischen Auswertung zahlreicher Versuchstierstudien. Diese hatten ergeben, dass das individuelle Ansprechen / Nicht-Ansprechen einzelner Versuchstiere auf ein definiertes Behandlungskonzept in etwa 95% mit den gemittelten Ergebnissen großer Versuchstierstudien des gleichen Behandlungskonzepts übereinstimmt. Das heißt, der Behandlungserfolg eines einzelnen Tieres stimmt mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 95% mit dem Behandlungserfolg eines großen Versuchstierkollektivs überein (2138 Versuchstiere aus 440 individuellen Behandlungskonzepten).
Hierbei werden das vollständige und teilweise Ansprechen auf die Therapie, sowie die SD (stable disease) als therapeutisches Ansprechen zusammengefasst. Lediglich die Krankheitsprogression, in diesem Fall das weitere Zunehmen des Tumorvolumens, wird als Nichtansprechen gewertet [110]. Der Nachteil dieses Studiendesign liegt darin, dass sich bezüglich der Qualität des Behandlungserfolges keine Aussage treffen lässt. Da alle verschiedenen Ansprechraten auf die Therapie zusammengefasst wurden, kann lediglich mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen Ansprechen und Nicht-Ansprechen unterschieden werden. Wie gut ein Behandlungskonzept im Vergleich zu einem anderen wirkt, kann so nicht beurteilt werden.

In der Literatur finden sich lediglich Hinweise auf variierende Tolerierbarkeit verschiedener Mausstämme gegenüber unterschiedlichen zytostatischen Pharmaka. Da diese Problematik noch nicht spezifisch eruiert wurde, haben wir die hier beschriebene Studie durchgeführt [111–113].
Das Ziel war es ein effektives und tolerierbar toxisches Behandlungsschema von 5-FU für NSG-Mäuse zu identifizieren und zu etablieren.
Das untersuchte Chemotherapeutikum 5-FU wurde aus folgenden Gründen ausgewählt:

1. Guter klinischer Nutzen für adjuvante und palliative Therapie verschiedener Tumorentitäten, insbesondere für das KRK
2. Niedrige Rate an unerwünschten Nebenwirkungen in der klinischen Applikation, vor allem im Rahmen der Gabe als orales Prodrug Capecitabine
3. Synergismen mit anderen Therapeutika als Kombinationstherapien (Irinotecan, Oxaliplatin etc.)

Die Anpassung der 5-FU Dosierung erfolgte nach Abstimmung mit den Leitlinien für klinische Studien der Phase eins. Es wurden sechs verschiedene Behandlungsschemata entworfen und angewandt. Vorangegangene Studien mit NMRI Foxn1^{nu}-Mäusen beschreiben bereits

häufig Nebenwirkungen wie ausgeprägten Gewichtsverlust, dezente Myelosuppression und gastrointestinale Toxizität im Rahmen von 5-FU haltigen Therapien [111–114]. Allerdings sind diese Studien auf Grund folgender variierender Faktoren in ihren Ergebnissen nur schwer vergleichbar:

1. Unterschiedliche Mausstämme (NMRI Foxn1^{nu}-Mäuse vs. NSG-Mäuse)
2. Unterschiedliche Tumormodelle (ectope vs. orthotope sowie syngeneic vs. Xenograft)
3. Unterschiedliche Therapeutika
4. Unterschiedliche Behandlungskonzepte (wöchentlich vs. täglich, lokale vs. systemische Applikation)

Die hier durchgeführte Dosisvergleichsstudie zeigte heterogene Ergebnisse in Bezug auf Wirksamkeit und Toxizität der Therapeutika mit unerwartet geringer Toleranz der Versuchstiere gegenüber der Hälfte der angewandten Therapieschemata.

4.1.2 Versuchsaufbau

In der Literatur sind verschiedene Therapieschemata mit unterschiedlichen Therapeutika, Dosierungen, Therapieintervallen und Versuchsrahmenbedingungen für 5-FU haltige PDX-Studien an Mäusen beschrieben. So ist der Therapie- und Studienstart meist von der Tumorgröße (dem gemessenen Tumordurchmesser) des angewachsenen PDX abhängig. Die definierte Größe für den Therapiestart der zu behandelnden PDX variiert allerdings dramatisch zwischen einem Durchmesser von wenigen Millimetern bis zu einem Durchmesser von über 6-7mm. Studien welche einen Therapiestart bei einem Durchmesser von 1-2mm wählten, konnten zum Teil beeindruckende Therapieerfolge im Sinne einer dramatischen Tumorvolumenreduktion nachweisen [115, 116]. Diese große Diskrepanz zwischen den initialen Tumorgrößen führt zu vielfältigen Problemen. So ist das Messen der Tumorgröße mit einem Messschieber bereits bei relativ großen Tumordurchmessern fehlerbehaftet und variiert stark zwischen verschiedenen Untersuchern. Dies erklärt sich durch das individuelle Anlegen des Messschiebers (Komprimierung des Tumors, sowie Mitmessung von Haut und Fell). Das Messen von sehr kleinen Durchmessern führt so zu noch größeren Abweichungen zwischen der gemessenen und der realen Tumorgröße.

Weiter muss bedacht werden, dass größere Tumoren einen anderen Metabolismus aufweisen als Kleinere. Kleine Tumoren zeigen bei gleicher Therapie schnell eine Größenreduktion, wohingegen große Tumoren eher ein verlangsamtes Wachstum bzw. einen Wachstumsstopp zeigen. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte die

sinkende Blutversorgung von Tumorgewebe bei steigendem Tumorwachstum sein [117]. Diese reduzierte Blutversorgung größerer Tumoren könnte ebenfalls erklären, wieso bei gleichen Therapiedosen von 5-FU Mäuse mit einem größeren Tumor mehr Nebenwirkungen und weniger Therapieerfolg zeigen, als Versuchstiere mit vergleichsweise kleineren Tumoren.

Das KRK wird in der Klinik am häufigsten im Tumorstadium T3 diagnostiziert [1]. Hierbei handelt es sich um ein fortgeschrittenes Tumorstadium, welches anhand der Infiltrationstiefe und nicht alleine durch die Gesamtgröße diagnostiziert wird. Wie sich in der Auswertung großer Patientenkollektive gezeigt hat ist die Tumorgröße nur in spezifischen KRK-Variationen ein prognostischer Marker für das OS [118]. Die Definition des Tumorstadiums T3 lässt sich nicht auf das hier angewendete Modell übertragen (Tumor subkutan in Flanke implantiert). Um dennoch eine möglichst gute Vergleichbarkeit zur klinischen Situation zu schaffen, haben wir uns für einen Therapiestart ab einer Tumorgröße von 6-7mm Durchmesser (solider, gut tastbarer Tumor) entschieden. Diese Größe soll das fortgeschrittene Tumorstadium der klinischen Situation wiederspiegeln und gleichzeitig gut durchführbare Wachstumskontrollen ermöglichen. Für das Erreichen dieser Tumorgröße war eine Anwachszeit von über 40 Tagen notwendig. Im Gegensatz dazu wurde die Therapie vergleichbarer PDX-Modelle in der Literatur meist wesentlich früher begonnen. Der späte Therapiestart und die bereits fortgeschrittenen Tumorgrößen unserer Studie könnten eine Ursache für das relativ schlechte Ansprechen der angewandten Therapieschemata im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Studien darstellen.

4.2 Pharmakon Toleranz

5-FU basierte Chemotherapien können zu vielfältigen und teils gravierenden Nebenwirkungen bei Patienten führen. Um die toxischen Wirkungen der verschiedenen Therapieschemata orientierend einschätzen zu können, wurden Leber und Nieren der Mäuse als zentrale Stoffwechsel- und Ausscheidungsorgane laborchemisch untersucht.

Die laborchemische Untersuchung der Leber erfolgte durch Isolation und Auswertung der Serumparameter AST, ALT und Gamma-GT. Alle drei Enzyme stellen unspezifische, aber gut nachweisbare Parameter hepatischer Schädigungen dar. Nach Auswertung der Blutplasmakonzentrationen zeigten sich signifikant erhöhte Serumplasmaspiegel für AST, nicht aber für ALT und Gamma-GT. Die erhöhten AST-Werte weisen auf ausgeprägte Leberzellschäden hin. Diese Werte müssen jedoch kritisch hinterfragt werden, da im

Gegensatz dazu die ALT-Plasmaspiegel kaum Abweichungen von der Kontrollgruppe aufwiesen. In der Regel kommt es im Rahmen von Leberzellschäden zu Erhöhungen von AST und ALT. Isolierte Erhöhungen von AST sind eher als untypisch zu bewerten. Auch befanden sich die Konzentrationen des sensiblen Leberenzyms Gamma-GT in fast allen Fällen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Ursachen für isolierte AST-Erhöhung variieren stark. So können isolierte Anstiege durch virale Hepatitiden, Einwirkungen von Pharmaka, autoimmunologische Prozesse, Rhabdomyolyse (Muskelzelluntergang) oder aber macro-AST (Immunkomplexbildung mit dem Leberenzym AST zu Makromolekülen) hervorgerufen werden [119–121].

Der Isolierprozess des murinen Blutes könnte eine weitere mögliche Ursache für diese laborchemische Konstellation darstellen. Im Rahmen der Probengewinnung ließen sich häufig nur sehr geringe Mengen an Blut isolieren. Auf Grund dieses Probenmangels mussten häufig einzelne Blutplasmaparameter priorisiert werden, welches fehlerhafte bzw. nicht durchführbare Blutplasmaanalysen weiterer Parameter zur Folge hatte. Weiter könnte eine Hämolyse bei Probengewinnung zu falsch hohen AST-Werten geführt haben.

Die orientierende Interpretation der Leberenzyme AST und ALT erfolgte mit Hilfe des De-Ritis Quotienten, welcher beide Parameter in Relation zueinander setzt. Der Quotient wird als prognostischer Wert für Leberzellschädigungen des Menschen verwendet und setzt sich wie folgt zusammen: AST/ALT= 0,6-0,8

Bei Werten des De-Ritis Quotienten >1 können starke Leberschädigungen angenommen werden [121].

Die Berechnung des De-Ritis-Quotienten der in dieser Studie erhobenen Werte ergaben fast ausschließlich Quotienten >1 und weisen folglich auf schwere Leberschädigungen der Versuchstiere unter Therapie hin. Allerdings handelt es sich bei den hier erhobenen Laborparametern um unspezifische Marker für Leberschädigungen. Folglich können keine präzisen Aussagen über den Charakter der hepatischen Toxizität getroffen werden. Weiter ist es nicht möglich die Auswirkungen dieser Leberschäden am murinen Organismus genauer beurteilen zu können. Dies müsste durch präzisere Untersuchungen unter dem Gesichtspunkt der Hepatotoxizität von 5-FU an NSG-Mäusen weiter erforscht werden.

Die Beurteilung der Nieren erfolgte über den Blutserumparameter Kreatinin. Kreatinin als Stoffwechselprodukt der Muskulatur gibt zum einen Einblick über die Muskelmasse des Individuums, zum anderen über die Filterfunktion der Nieren. So führen sowohl Nierenschäden, Durchblutungsstörungen der Nieren, als auch ein rapider Muskelabbau zu erhöhten Kreatininwerten im Blutplasma. Folglich kann aus einer Auffälligkeit des Kreatininwertes im Blutplasma nicht auf die genaue Ursache der Pathologie rückgeschlossen werden. In der hier durchgeführten Studie zeigten sich vor allem erhöhte Kreatinin-Werte bei Versuchstieren des Therapieschemas 5 und 6. Beide Therapiegruppen wurden per oral mit

Capecitabine behandelt und gehörten zu den Therapiegruppen mit dem längsten Überleben. Im Gegensatz dazu zeigte die Therapiegruppe mit den meisten vorzeitigen Todesfällen, die Therapiegruppe 2 keine erhöhten Kreatininwerte. Daraus folgt, dass Nierenschädigungen bzw. ein rapider Muskelabbau höchstwahrscheinlich nicht ursächlich für das plötzliche Versterben von Versuchstieren waren. Allerdings könnten die leicht erhöhten Kreatininwerte der Versuchsgruppen 5 und 6 auf spät einsetzende Nierenschädigungen durch 5-FU oder aber einen spät einsetzenden Muskelabbau, beispielsweise durch Schäden im GIT hinweisen.

Keimbahn Polymorphismen stellen eine mögliche Ursache für die erhöhte 5-FU assoziierte Toxizität bei NSG-Mäusen dar. Im Rahmen von Keimbahnvariationen kann es zu Modulationen von relevanten Stoffwechselprozessen kommen, welche eine wichtige Rolle beim Abbau von Pharmaka spielen. So führen beispielsweise Polymorphismen des Enzyms DPD im Menschen zu stark variierender Verstoffwechslung von 5-FU. Die veränderte enzymatische Aktivität reicht von einer geminderten Funktion bis hin zum kompletten Funktionsverlust des Enzyms bei ca. 3-5% der Bevölkerung [122]. Ein solcher DPD-Polymorphismus stellt eine Kontraindikation für die 5-FU-Therapie dar. Dies liegt am stark erhöhten Risiko für lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression und Neurotoxizität [122–125].
Auch in den untersuchten Mäusen ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe des basalen DPD-Levels feststellen. Mäuse des Stammes NMRI Foxn1^{nu} wiesen signifikant höhere DPD-Plasmaspiegel auf, als Mäuse des Stammes NSG. Weiter resultierte die Therapie mit 5-FU in leicht reduzierten DPD-Plasmaspielgen bei NSG-Mäusen. Der basale DPD-Plasmaspiegel der NMRI Foxn1^{nu} Mäuse übertraf zusätzlich die basalen Plasmaspiegel des häufig im Labor verwendeten Stammes C57Bl/6J. In Zusammenschau der Ergebnisse bieten die unterschiedlich stark ausgeprägten DPD-Plasmaspiegel der verschiedenen Mausstämme eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Toxizität von 5-FU bei NSG-Mäusen (eine gesteigerte Toxizität von 5-FU ist bei NMRI Foxn1^{nu} Mäusen nicht bekannt). Wahrscheinlich ist der komplexe Immundefekt der NSG-Mäuse für die erhöhte 5-FU-Sensibilität verantwortlich. Diese verstärkte Sensibilität könnte allerdings auch für eine generell erhöhte Pharmakon Sensibilität sprechen.
In einer weiteren Studie wurden leukämische NSG-Mäuse in niedriger Dosierung mit dem Anthrazyklin-Topoisomerase-Hemmer Doxorubicin behandelt (PDX verschiedener akuter lymphoblastischer Leukämien [126]). Im Verlauf von sieben Tagen Therapie verstarben alle behandelten NSG-Mäuse (einfach oder zweifache i.p. Applikation von 8 bzw. 4mg/kg Körpergewicht, Auszug eigener unveröffentlichter Daten). Die Ergebnisse beider Studien bestärken die Hypothese das der Metabolismus von Labortieren starke interindividuelle

Unterschiede aufweist. Weiter könnte die variierende Pharmakogenetik verschiedener Mausstämme neben dem ausgeprägten Immundefekt eine alternative Ursache für gesteigerte 5-FU Sensibilität darstellen.
Verschiedene Studien beschreiben lediglich geschlechtsspezifische, nicht aber mausstammspezifische Variationen in der Metabolisierung von Pharmaka. Somit könnten die Ergebnisse dieser Studie der Grundstein für weitere Phase 1 Studien darstellen. Studien welche sich vorwiegend mit neuen, potentiell toxischen Tumortherapeutika beschäftigen.
Damit auch in Zukunft vermeidbare, teure und tierverbrauchende PCT-Studien verhindert werden können, sollten weitere Dosisfindungsstudien vor groß angelegten Studien der Phase eins erfolgen.

4.3 Therapieschemata

Die effektivsten Behandlungsschemata der hier durchgeführten Studie stellen die Dosierungsintervalle 2,5 und 6 dar. Da das Dosierungsschema 2 eine hohe Toxizität und Letalität aufwies, kann es nicht für weitere Studien empfohlen werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass das Therapieschema 2 das einzige Therapieschema war, bei dem es nachweislich zu einer Reduktion des Tumorvolumens kam. Wie der Abb.9 entnommen werden kann, kam es zu einer deutlichen Tumorvolumenreduktion bis zum Versuchstag 11. An diesem Tag war nur noch ein Versuchstier der Therapiegruppe am Leben. Diese Maus erholte sich in den kommenden Tagen und mit dieser Erholung stieg auch das Tumorvolumen wieder an. Nach Anwendung und Modulation der RECIST, moduliert: mRECIST Kriterien (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), welche in der Auswertung und Interpretation von PCT-Studien eine wichtige Rolle spielen, stellt das Therapieschema 2 durch die nachweisbare Tumorvolumenreduktion das einzige effektive Therapieschema in dieser Studie dar [110, 127].
Versuchsmäuse der Therapieschemata 5 und 6 erhielten das orale 5-FU Prodrug Capecitabine. Die Chemotherapie mit Capecitabine führte in NSG-Mäusen zu einer eindeutigen Inhibition des Tumorwachstums bei moderatem Nebenwirkungsprofil.
Die erhöhten Plasmakonzentrationen der Leberenzyme ASAT und ALAT der Therapiegruppen 5 und 6 lassen sich wahrscheinlich durch die verstärkte lokale Therapeutika-Konzentration erklären. Weiter korrelierten die hohen ASAT und ALAT-Werte dieser Versuchsgruppen nicht mit einem reduzierten Allgemeinbefinden der NSG-Mäuse.

Die Therapieschemata 3 und 4 zeichneten sich durch die zusätzliche Gabe von LV zu 5-FU aus. Allerdings ließ sich keine gesteigerte Wirkung von 5-FU *in vivo* nachweisen. Im klinischen Alltag wird Patienten LV nach 5-FU-Infusionen gegeben um die Effektivität bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen zu erhöhen. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass die simultane Injektion beider Substanzen eine bessere Wirksamkeit aufweist als die sequentielle Injektion [128].
Das Ziel der 5-FU basierten Chemotherapie stellt die Inhibition der TS dar. Eine mögliche Erklärung für das Therapieversagen mehrerer Therapieschemata der Tiere, stellt eine gesteigerte, anstatt einer reduzierten TS Produktion dar. Diese Schlussfolgerung beruht auf Ergebnissen von *in vitro* Versuchen, welche eine Hochregulation der TS nach 5-FU-Therapie in KRK-Zellen zeigten. Diese Ergebnisse ließen sich allerdings nicht im Rahmen dieser Studie reproduzieren. Keine der untersuchten Versuchsgruppen wies erhöhte TS-Spiegel im extrahieren hepatischen Gewebe auf.

4.4 PDX

Eine weitere Schwierigkeit in der Durchführung von PCT-Studien ist das individuelle Wachstumsverhalten von PDX. Im Falle dieser Studie wurden PDX ausgewählt, welche eine Anwachsrate von 100% und eine vergleichbare Wachstumskinetik aufwiesen. Trotz dieser Vorselektion ließ sich ein Tumorfall identifizieren, welcher eine stark reduzierte intrinsische Wachstumsgeschwindigkeit im Gegensatz zu seinem entsprechenden Vergleichstumor aufwies und folglich Ergebnisse negativ beeinflusste. Weiter zeigten sich sehr differente Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen PDX des Tumorfalls HROC40 mit gegensätzlichen Ergebnissen (langsames vs. schnelles Tumorwachstum bei gleicher Therapie). Diese unbeeinflussbaren Variationen des PDX-Tumormodells müssen im Rahmen von PCT-Studien bedacht und berücksichtigt werden, damit spätere Ergebnisse nicht nur analysiert, sondern auch korrekt interpretiert werden können.

Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit den klinischen Verläufen der Patienten, von denen die PDX generiert wurden, erhält man sehr variable Ergebnisse. Alle PDX Modelle wurden von primären KRK generiert. Stellvertretend für die einzelnen Subtypen wurden folgende Tumoren etabliert [129]:

- Hereditäres KRK (Lynchsyndrom; HROC29)
- Chromosomal instabiles KRK (HROC46 und HROC222)

- CpG island methylator Phänotyp (HROC40)

Zwei der Patienten wiesen zum Zeitpunkt der operativen Therapie bereits synchrone Lebermetastasen auf. Einer der beiden Patienten verstarb direkt nach Operation (HROC29; UICC IV). Der andere Patient erhielt noch eine weiterführende palliative Chemotherapie mit Capecitabine, verstarb allerdings kurz darauf (HROC46; UICC IV).
Die beiden verbliebenen Patienten wurden anhand des UICC Systems in niedrigere Stadien eingeteilt und leitliniengerecht therapiert. Einer dieser beiden erhielt eine 5-FU basierte Chemotherapie (HROC40; UICC IIIa) wohingegen der andere nicht adjuvant mittels Chemotherapie behandelt wurde (HROC222; UICC IIa).
Beide Patienten sind noch am Leben bei einem follow-up von über 142 und 81 Monaten (Stand 06/2019).
Nach Zusammenschau der unterschiedlichen Tumorwachstumsraten dieser Studie, ließ sich keine Korrelation zwischen den klinisch aggressiveren Tumoren und einem besseren oder schlechterem Ansprechen auf ein hier angewendetes Therapieschema feststellen.

4.5 Fazit

Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass 5-FU haltige Therapien zur Behandlung des KRK in Form des PDX-Modells an NSG-Mäusen zu keiner Reduktion des Tumorvolumens bei verträglichem Nebenwirkungsprofil führen. Als mögliche Ursachen konnten die vergleichsweise niedrige DPD-Konzentration der NSG-Mäuse und der späte Therapiestart bei ca. 6-7mm Tumordurchmesser identifiziert werden.
Mit der hier durchgeführten Studie kann keine endgültige Aussage bezüglich der Ursache des Therapieversagens getroffen werden. Dies müssen zukünftige Studien nachweisen. Empfehlenswert ist ein entsprechendes Studiendesign mit einem anderen Labormausstamm, beispielsweise NMRI Foxn1^{nu}.
Ebenso sollte das obige Studiendesign erneut, allerdings mit kleineren und variierenden Tumordurchmessern zum Therapiestart durchgeführt werden.
Der Grund der hohen Letalität unter der Therapie konnte mit dieser Studie ebenfalls nicht geklärt werden. Auch hier sind noch weitere Studien mit präziseren Nachweismethoden zur Letalitätsursache notwendig.

5. Zusammenfassung

Trotz neuer Erkenntnisse in den Bereichen Forschung, Diagnostik und Therapie, bleibt das KRK weiterhin eine der tödlichsten Tumorerkrankungen des Menschen weltweit. Damit diese Erkrankung in Zukunft besser behandelt werden kann, müssen neue Möglichkeiten der Therapie erforscht und getestet werden. In den letzten Jahren konnte das KRK in verschiedene molekulargenetische Gruppen unterteilt werden. Anhand dieser Gruppen ist es möglich die Tumortherapie zu präzisieren und individuell zu erweitern. So weicht die allgemein gehaltene Chemotherapie des KRK zunehmend einer individuell auf Patienten und Tumorleiden zugeschnittenen spezifischen Therapie.

Um möglichst gute Therapieergebnisse bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen zu erzielen, ist es notwendig, die zu behandelnde Tumorentität, sowie den zu therapierenden Organismus möglichst genau zu kennen und zu verstehen.

Da die Testung neuer Therapieschemata in der Regel an Versuchstieren durchgeführt wird, müssen diese ebenfalls genau verstanden werden. Daraus folgt, dass Versuchsmäuse nicht nur als Gesamtheit betrachtet und untersucht werden, sondern auch die individuelle Reaktion verschiedener Mausstämme auf eine spezifische Therapie.

Es muss festgestellt werden, wie neue Therapien auf ihren Organismus wirken, um möglichst viele Vergleiche zum menschlichen Organismus ziehen zu können. Dementsprechend ist es notwendig, auch im Rahmen der Tierversuche Standards zu entwickeln, die eine gute Vergleichbarkeit verschiedener Therapieschemata an Versuchstieren erlauben und den Vergleich unterschiedlicher Tierstudien erleichtern. Es ist wichtig Therapiestandards für einzelne Mausstämme aufzustellen und zu präziseren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung eines solchen Therapiestandards für den Mausstamm NSG, im Rahmen der 5-FU basierten Therapie und am Beispiel des KRK.

Es wurden sechs verschiedene Therapieschemata an NSG-Mäusen getestet. Die Versuchstiere wurden nach der erfolgreichen Implantation von unterschiedlichen kolorektalen PDX (HROC 29, 40, 46, 222) randomisiert und nachfolgenden Therapieschemata behandelt:

Dosis1:	5-FU Bolusgabe	(80 mg/kg KG i.p.)
Dosis2:	5-FU Dauergabe	(30 mg/kg KG i.p.)
Dosis3:	5-FU + Leucovorin 1	(20 mg/kg KG 5-FU + 10 mg/kg KG Leucovorin i.p.)
Dosis4:	5-FU + Leucovorin 2	(10 mg/kg KG 5-FU + 20 mg/kg KG Leucovorin i.p.)
Dosis5:	Xeloda Bolusgabe	(800 mg/kg KG per oral)
Dosis6:	Xeloda Dauergabe	(350 mg/kg KG per oral)

Die Therapieschemata wurden in ihrer Auswirkung auf folgende Parameter untersucht: Tumorwachstum, Gewichtsverlust der Versuchstiere, Tumornassgewicht nach Studienende, histologische Veränderungen in Tumor, Leber, Dick- und Dünndarm, sowie die Auswirkung auf verschiedene im Blutserum gemessene Werte (ASAT, ALAT, Gamma-GT, Kreatinin, DPD und TS).

Anhand des Gewichtsverlaufs ließ sich das besonders nebenwirkungsreiche Therapieschema 2 als das Auffälligste identifizieren. Hier kam es zu den ausgeprägtesten Gewichtsverlusten. Es verstarben 7 von 8 Mäusen unter dieser Therapie. Allerdings zeigte auch das Therapieschema 6 großen Einfluss auf das Versuchstiergewicht, ohne zu nebenwirkungsassoziierten Todesfällen zu führen. Die therapieinduzierten Todesfälle ereigneten sich primär innerhalb der ersten Therapiewoche. Die Therapieschemata 1 und 2 ergaben sehr gute Ergebnisse bei der Tumorwachstumsinhibierung. Allerdings wurde gleichzeitig eine sehr hohe Letalität dieser beiden Versuchsgruppen nachgewiesen.

Die Therapieschemata 5 und 6 ergaben eine messbare Tumorwachstumsinhibierung bei verträglicher Toxizität, wohingegen die Therapieschemata 3 und 4 kaum Wirkung zeigten. Im Rahmen dieser Studie waren die Therapieschemata 5 und 6, bezogen auf Tumorwachstumsinhibierung und Gesamtüberleben am erfolgreichsten.

Die Parameter Tumorhistologie und Tumornassgewicht nach Therapie zeigten keine Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu ergaben sich Unterschiede der Gewebshistologie von Leber, Dick- und Dünndarm der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings konnten keine histologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Folglich konnte auf Grund dieser Ergebnisse keine Ursache für die hohe Letalität einzelner Versuchsgruppen identifiziert werden.

In der Auswertung der Laborparameter ergaben sich keine Unterschiede der Kreatininplasmaspiegel und der Gamma-GT-Spiegel der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Vergleich der ALAT-Blutplasmaspiegel aller Versuchsgruppen zeigte keine nennenswerte Erhöhung im Vergleich zu den Spiegeln der Kontrollgruppe. Die ASAT-Blutplasmaspiegel wiesen hingegen signifikant höhere Werte der Versuchsgruppen 2 bis 6 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Der Vergleich der DPD-Plasmaspiegel der Labormausgruppen: C57Bl/6J, NMRI Foxn1^{nu} und NSG zeigte einen signifikant niedrigeren DPD-Plasmaspiegel der NSG-Mäuse im Vergleich zu den Mäusen des Stammes NMRI Foxn1^{nu}. Weiter wiesen NSG-Mäuse den niedrigsten durchschnittlichen DPD-Plasmaspeigel aller untersuchten Mausstämme auf.

Die gemessenen Expressionsraten der TS zeigten unter den verschiedenen Therapiegruppen und der Kontrollgruppe keine wesentlichen Unterschiede.

Zusammenfassend ist es mit dieser Arbeit gelungen, verschiedene Auswirkungen der 5-FU-haltigen Therapie an NSG-Mäusen zu untersuchen und unterschiedliche Therapieschemata miteinander zu vergleichen. Therapieschemata mit Capecitabine zeigten die besten Ergebnisse in Tumorwachstumshemmung, bei gleichzeitig geringer Toxizität. Das vergleichsweise hohe Tumorvolumen zu Beginn der Therapie, könnte eine potentielle Ursache für das schlechte Therapieansprechen insgesamt darstellen.
Weiter konnte der niedrige DPD-Plasmaspiegel als mögliche Ursache für die starke Sensibilität der NSG-Mäuse gegenüber 5-FU identifiziert werden. Woran die therapierten Versuchstiere genau verstorben sind, konnte mit dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Weiter ist noch ungewiss, wieso die angewandten Therapieschemata zum Teil stark unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen. PCT-Studien mit „one animal per model per treatment“ Design können lediglich zwischen Therapieansprechen (Reduktion bzw. Wachstumsstopp des Tumorvolumens) und Nicht-Ansprechen (Tumorvolumenzunahme) mit hoher Wahrscheinlichkeit unterscheiden. Daraus folgt, dass das Therapieschema 2 das einzige wirksame Therapieschema war, bei dem allerdings 7 von 8 Mäusen verstarben. Ob die Therapieschemata 5 und 6 tatsächlich zu einer Reduktion des Tumorwachstums bei geringer Toxizität führen, muss in weiteren Studien mit hoher Versuchstierzahl überprüft werden.
Wir konnten zeigen, dass es zwingend notwendig ist, Dosisvergleichsstudien gängiger Chemotherapeutika an verschiedenen Versuchstierstämmen durchzuführen. Damit könnten in Zukunft die besten Therapieschemata individuell für einzelne Tierstämme, bei niederer Toxizität identifiziert werden. Diese würden weitere qualitativ hochwertige Versuchstierstudien ermöglichen, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu verbessern. Das Ziel ist, die Therapie des menschlichen KRK weiter zu optimieren.

6. Thesen

1. Die Verstoffwechslung von 5-FU, sowie dessen Toxizität variiert zwischen verschiedenen Labormausstämmen. Mäuse des Stammes NSG weisen eine hohe Sensibilität gegenüber 5-FU auf, welche schnell zu toxischen Nebenwirkungen führt.

2. Eine wahrscheinliche Ursache für die gesteigerte Toxizität von 5-FU bei NSG-Mäusen ist der niedrige DPD-Blutplasmaspiegel.

3. Die orale Gabe von Capecitabine wirkt im Rahmen der 5-FU haltigen Therapie des KRK in NSG-Mäusen besser als eine reine i.p. 5-FU Therapie oder eine kombinierte 5-FU/LV-Therapie. Sie führt im Vergleich zu den anderen Therapieschemata zu einer relativ guten Tumorwachstumshemmung bei gleichzeitig wenigen Nebenwirkungen.

4. Die hochdosierte, kontinuierliche i.p. Therapie mit 5-FU (30 mg/kg KG i.p. 3x/Woche) führt zu sehr guten Ergebnissen in der Tumorwachstumsinhibierung bei gleichzeitig stark erhöhter Toxizität und Letalität der Versuchstiere.

5. Die kombinierte i.p. Therapie von 5-FU/LV zeigt keine Vorteile gegenüber den anderen Therapieansätzen im Bereich der Tumorwachstumsinhibierung und Verträglichkeit.

6. PCT-Studien stellen die klinische Situation mit verschiedenen Individuen gut dar und eignen sich für die Erforschung der spezialisierten/individuellen Therapie von Tumorleiden in Bezug auf Therapieansprechen und Nichtansprechen.

7. Die verschiedenen Therapieschemata zeigten keine spezifische Auswirkung auf die histologisch untersuchten Gewebeproben von Tumor, Leber, sowie Dünn- und Dickdarm der Versuchstiere.

8. Die Blutplasmaanalyse der behandelten NSG-Mäuse zeigte eine signifikant erhöhte Konzentration von ASAT im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die restlichen untersuchten Parameter ALAT, Kreatinin und TS zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen.

9. Die Ursache für das Versterben der NSG-Mäuse unter 5-FU-Therapie ist weiterhin unbekannt. Die zum Teil drastische Gewichtsabnahme des KG unter Therapie stellt die

wahrscheinlichste Ursache für die Letalität dar. Allerdings zeigten sich auch hier starke Gewichtsreduktion unter Therapie ohne gesteigerte Letalität (Mäuse des Therapieschema 6).

10. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Tumornassgewichten der verschiedenen Therapieschemata und den Kontrolltumoren.

11. Es sind weitere Dosisvergleichsstudien notwendig, um den optimalen Labormausstamm für 5-FU basierte Studien zu finden. Weiter sollten Dosisvergleichsstudien mit gängigen Standardtherapeutika an verschiedenen Labormausstämmen durchgeführt werden. Somit könnten Standardtherapien individuell für jeden Mausstamm erstellt und die Vergleichbarkeit von Studien verbessert werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	engl.: Adenomatous polyposis coli
ALT/ALAT	Alaninaminotransferase
AST/ASAT	Aspartataminotransferase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
AUC	engl.: Area under the curve
BAX	Bcl-2 assoziiertes X Protein
BCL2	B-cell-lymphoma-Protein 2
°C	Grad Celsius
CAPOX	Chemotherapieschema mit Capecitabine und Oxaliplatin
CH2THF	5,10-Methylentetrahydrofolat
CIMP	engl.: CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
5‘-DFCR	5'-Desoxy-5-Fluorocytidin
5‘-DFUR	5'-Desoxy-5-Fluorouridin
DHFU	Dihydrofluorouracil
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	engl.: complementary DNA
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EGFR	engl.: epidermal growth factor receptor
5-FU	5-Fluorouracil
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FUTP	Fluorouridintriphosphat
FOLFIRI	Chemotherapieschema mit Folsäure, 5-FU und Irinotecan
FOLFOX	Chemotherapieschema mit Folsäure, 5-FU und Oxaliplatin
Geb.	Geboren
GTP	Guanosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
HNPCC	Hereditäres nichtpolypösis Kolonkarzinom-Syndrom

IGF2R	engl.: Insulin-like growth factor 2 receptor
IU	engl.: International Units
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRAS	Rat sarcoma K
Krea	Kreatinin
KRK	Kolorektales Karzinomm
LK	Lymphknoten
M	Metastase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MAP	engl.: Mitogen-activated protein
MLH	engl.: MutL protein homolog 2
MMR-System	DNA-Mismatch-Reparatur System
MOI	Molekulare Onkologie und Immuntherapie Rostock
MSH	MutS-Homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Mittelwert
N	Lymphknoten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD SCID	engl.: Non-Obese Diabetic severe combined immune deficiency
NRAS	Rat sarcoma N
NSG	NOD^{scid} IL2Rgamma^{null}
NTC	engl.: Non-Template Control
dNTP	Desoxynukleodistriphosphat
OS	engl.: Overall survivability
OP	Operation
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
qPCR	engl.: Realtime Polymerase chain reaction
PCT	engl.: PDX clinical trial
PDX	engl.: Patient derived Xenograft
PFS	engl.: progression free survival
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
RAS	engl.: Rat sarcoma
RECIST	engl.: Response evaluation criteria in solid tumors
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	engl.: Messenger RNA

rRNA	ribosomale RNA
Scid-Mutation	engl.: severe combined immune deficiency mutation
SD	engl.: stable disease
STABW	Standardabweichung
spSTD	engl.: sporadic standard type
T	Tumor
TGF	engl.: Transforming growth factor
TS	Thymidilat-Synthase
hTS	humane Thymidilat-Synthase
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
UICC	engl.: Union for International Cancer Control
FdUMP	Fluorodeoxyuridinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
FdUTP	Fluorodesoxyuridintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosophat
VEGF	engl.: Vascular endothelial growth factor
XELOX	Chemotherapieschema mit Oxaliplatin+Capecitabine
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: molekularbiologischen Veränderungen der Adenom/Dysplasie Karzinom-Sequenz im Suppressor Pathway [4]. 3

Abbildung 2: Übersicht der verwendeten Methoden. 23

Abbildung 3: Dargestellt sind die unterschiedlichen Therapieschemata. Therapietage sind in Rot dargestellt. 25

Abbildung 4: Zyklusdarstellung der qPCR mit TaqMan- System. 29

Abbildung 5: Dargestellt sind die Gewichtsverläufe der unterschiedlich behandelten NSG-Mäuse, gemittelt und sortiert nach dem jeweiligen verwendeten Therapieschema. (MW mit STABW, Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n=4). 33

Abbildung 6: Dargestellt sich die Gewichtsverlaufe der Kontrollmäuse unter Placebobehandlung mit intraperitonealer PBS Injektion (n=4, MW mit STABW). 34

Abbildung 7: Dargestellt ist das prozentuale Überleben der verschiedenen Therapiegruppen innerhalb der ersten 21 Tage der Studie (Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n= 4). 36

Abbildung 8: Dargestellt sind die Wachstumskurven der verschiedenen Tumorsubtypen (n=1 für jeden einzelne Kontrollkurve). Für weitere Vergleiche wurden die 4 Kurven in einer Kurve gemittelt und mit der Standardabweichung versehen (Mittelwert Kontrolle n=4). 38

Abbildung 9: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata eins, zwei und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 1 n=8, Therapie 2 n=8, Kontrolle n=4). 39

Abbildung 10: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata drei, vier und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den

errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 3 n=8, Therapie 4 n=8, Kontrolle n=4). 40

Abbildung 11: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der Therapieschemata fünf, sechs und die Kontrollgruppe (samt Standardabweichungen). Die Kurven setzen sich aus den errechneten Mittelwerten samt Standardabweichung zusammen (Therapie 5 n=8, Therapie 6 n=7, Kontrolle n=4). 40

Abbildung 12: Dargestellt sind die gemessenen Tumorgewichte nach Extraktion der Tumoren aus den entsprechenden Mäusen. Die Gewichte wurden als Boxplot in den jeweiligen Therapieschemata samt Medianwert zusammengefasst (Therapie 1 n=4, Therapie 2 n=1, Therapie 3 n= 4, Therapie 4 n=6, Therapie 5 n= 3, Therapie 6 n= 5). Zum Vergleich wurden auch die Tumorgewichte der Kontrollgruppe dargestellt (n=4). 42

Abbildung 13: Dargestellt sind die ermittelten Kreatininwerte des murinen Blutplasmas. Die dargestellten Proben wurden entsprechend des Therapieschemas aufgelistet und mit dem Medianwert sowie der STABW versehen (Therapie 1 (n= 4), Therapie 2 (n= 4), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 6), Therapie 5 (n=7), Therapie 6 (n= 2), Kontrolle (n= 12)). 44

Abbildung 14: Dargestellt sind die ermittelten ASAT- und ALAT Werte nach Analyse des entnommenen Blutplasmas. Die Werte wurden entsprechend des verwendeten Therapieschemas mit Medianwert und STABWS dargestellt. ASAT: (Therapie 1 (n= 1), Therapie 2 (n= 1), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 4), Therapie 5 (n=2), Therapie 6 (n= 5), Kontrolle (n= 12)). ALAT: (Therapie 1 (n= 3), Therapie 2 (n=2), Therapie 3 (n= 7), Therapie 4 (n= 4), Therapie 5 (n= 7), Therapie 6 (n= 6), Kontrolle (n= 12)). 46

Abbildung 15: Dargestellt sind die analysierten DPD Konzentrationen verschiedener Mausstämme (Foxn1^{nu} n=2, C57Bl/6J (n=3)). Weiter wurden die Konzentrationen der Spiegel von NSG- Mäusen, vor und nach der 5- FU Therapie bestimmt (n=9 und n=2). 47

Abbildung 16: Dargestellt sind die Resultate der quantitativen qPCR von murinen, hepatischen Gewebestücken (Therapie 1 (n= 6), Therapie 2 (n= 3), Therapie 3 (n=7), Therapie 4 (n= 8), Therapie 5 (n=5), Therapie 6 (n=6), Kontrolle (n= 6)). Die Ergebnisse wurden nach der verwendeten Therapie sortiert und mit einer Standardabweichung versehen. 49

Abbildung 17: Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen des PDX HROC46 in verschiedenen Vergrößerungen. Es sind keine therapiespezifischen Effekte zu erkennen...50

Abbildung 18: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 1 (Bolusgabe 5-FU 80mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 82

Abbildung 19: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 2 (Dauergabe 5-FU 30mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 83

Abbildung 20: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 3 (Bolusgabe Capecitabine 800mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 83

Abbildung 21: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 4 (Dauergabe Capecitabine 350mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 84

Abbildung 22: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 5 (Dauergabe 5-FU/LV 20/10mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 84

Abbildung 23: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 6 (Dauergabe 5-FU/LV 10/20mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen. 85

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Kategorie: Stadieneinteilung nach histologischer Ausdehnung des Primärtumors 6

Tabelle 2: N-Kategorie: histologische Einteilung von regionären Lymphknotenmetastasen nach deren Anzahl 6

Tabelle 3: M-Kategorie: Vorhandensein und Anzahl von Fernmetastasen 6

Tabelle 4: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms mit Hilfe der TNM-Klassifikation 7

Tabelle 5: Hintergrundinformationen zu den verwendeten PDX- Modellen. Dargestellt sind die verwendeten Tumoren mit den dazugehörigen Patientendaten: Geschlecht, Alter, Histologie, Subtyp, Lokalisation und TNM- Klassifikation. Nomenklatur: HRO= Hansestadt Rostock, C= Kolorektales Karzinom, Nummer= spezifischer Tumorfall 21

Tabelle 6: Zusammensetzung des qPCR Mastermixes von Taqman 29

Tabelle 7: Gewichtsverluste der Versuchstiere unter Therapie 32

Tabelle 8: Übersicht der therapieinduzierten Todesfälle 36

Tabelle 9: Dargestellt sind die errechneten Durchschnittsgewichte der aus den verschieden therapierten NSG-Mäusen extrahierten Tumoren (Therapie 1 n=4, Therapie 2 n=1, Therapie 3 n= 4, Therapie 4 n=6, Therapie 5 n= 3, Therapie 6 n= 5, Kontrolle n= 4). 41

Tabelle 10: Mittelwerte ausgewählter Laborparameter verschiedener Mausstämme 43

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanztest der ASAT-Plasmakonzentrationen der Therapieschemata 1 (n=1), 2 (n=2), 3 (n=7), 4 (n=4), 5 (n=2) und 6 (n=5).....45

Tabelle 12: Delta CT-Werte der Kontrollmäuse 48

10. Literaturverzeichnis

[1] Kaatsch, P. et al. (2015) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut. Berlin.
[2] Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R. and Büchler, M.W. (2005) Colorectal cancer. The Lancet 365, 153–165.
[3] Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759–767.
[4] Morán, A. et al. (2010) Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. World journal of gastrointestinal oncology 2, 151.
[5] Gyeong Hoon Kang, M.D. Four Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Precursor Lesions.
[6] Grady, W.M. (2004) Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev 23, 11–27.
[7] Jallepalli, P.V. and Lengauer, C. (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. Nature reviews. Cancer 1, 109–117.
[8] Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. and Polakis, P. (1995) Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 3046–3050.
[9] Castagnola, P. and Giaretti, W. (2005) Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. Biochimica et biophysica acta 1756, 115–125.
[10] Ettrich, T.J. (2012) KRAS und weitere Signalmoleküle für die Therapieentscheidung beim metastasierten Kolonkarzinom. Gastroenterologe 7, 24–29.
[11] Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N. and Russo, A. (2002) Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. Journal of cellular physiology 192, 125–130.
[12] Grady, W.M. and Carethers, J.M. (2008) Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology 135, 1079–1099.
[13] Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nature reviews. Cancer 2, 489–501.
[14] Irmgard Schwarte-Waldhoff*†, Olga V. Volpert‡, Noe ¨l P. Bouck‡, Bence Sipos§, Stephan A. Hahn*, Susanne Klein-Scory*, Jutta Lu ¨ttges§, Gu ¨nter Klo ¨ppel§, Ulrich Graeven*, Christina Eilert-Micus*, Annette Hintelmann*, and Wolff Schmiegel* Smad4yDPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis.

[15] Papageorgis, P. et al. (2011) Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. Cancer research 71, 998–1008.
[16] Kastan, M.B., Canman, C.E. and Leonard, C.J. (1995) P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. Cancer Metast Rev 14, 3–15.
[17] Butler, J.M. (2005) Forensic DNA typing. Biology, technology, and genetics of STR markers. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Boston.
[18] Fishel, R. (1998) Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. Genes & Development 12, 2096–2101.
[19] Ramon Pasons Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene in Colorectal CancerReceptor Gene in Colorectal Cancer.
[20] Souza RF Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours.
[21] Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M. (1997) Somatic Frameshift Mutations in the BAX Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype. Science 275, 967–969.
[22] Hiroyuki Yamamoto Frameshift Somatic Mutations in Gastrointestinal Cancer of the Microsatellite Mutator Phenotype.
[23] Herman, J.G. et al. (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 6870–6875.
[24] C. Eric Bronner Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer.
[25] Nicholas C. Nicolaides Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer.
[26] Richard Fishel The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and Its Association with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer.
[27] Yoshimitsu Akiyama Germ-Line Mutation of the hMSH6/GTBP Gene in an Atypical Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Kindred1.
[28] Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. The New England journal of medicine 349, 2042–2054.
[29] Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature reviews. Genetics 3, 415–428.
[30] Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Ahuja, N. and Issa, J.-P.J. (2000) Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 710–715.

[31] Michael F. Kane Methylation of the hMLHJ Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch Repair-defective Human Tumor Cell Lines, 808–811.
[32] Issa, J.-P. (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. Nature reviews. Cancer 4, 988–993.
[33] Wittekind, C., Ed (2017) TNM. Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH. Weinheim.
[34] Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie Kolonkarzinom.
[35] Schmiegel, W. et al. (2017) S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom. Zeitschrift fur Gastroenterologie 55, 1344–1498.
[36] Gill, S. et al. (2004) Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 22, 1797–1806.
[37] Sargent, D.J. et al. (2001) A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. The New England journal of medicine 345, 1091–1097.
[38] Schmoll, H.-J. et al. (2015) Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 33, 3733–3740.
[39] André, T. et al. (2015) Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 33, 4176–4187.
[40] Sauer, R. et al. (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. New England Journal of Medicine 351, 1731–1740.
[41] Sauer, R. 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. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 30, 1926–1933.
[42] Bosset, J.-F.o. et al. (2014) Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. The lancet oncology 15, 184–190.
[43] Fiorica, F., Cartei, F., Licata, A., Enea, M., Ursino, S., Colosimo, C. and Camm, C. (2010) Can chemotherapy concomitantly delivered with radiotherapy improve survival of patients with resectable rectal cancer? A meta-analysis of literature data. Cancer treatment reviews 36, 539–549.

[44] Cunningham, D. et al. (2013) Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. The lancet oncology 14, 1077–1085.
[45] Kabbinavar, F.F. et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial.
[46] Kabbinavar, F.F. et al. (2005) Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23, 3697–3705.
[47] Passardi, A. et al. (2015) Effectiveness of bevacizumab added to standard chemotherapy in metastatic colorectal cancer: final results for first-line treatment from the ITACa randomized clinical trial. Annals of Oncology 26, 1201–1207.
[48] Stathopoulos, G.P. et al. (2010) Treatment of colorectal cancer with and without bevacizumab: a phase III study. Oncology 78, 376–381.
[49] Loupakis, F. et al. (2014) Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. New England Journal of Medicine 371, 1609–1618.
[50] Heinemann, V., Rivera, F., O'Neil, B.H., Stintzing, S., Koukakis, R., Terwey, J.-H. and Douillard, J.-Y. (2016) A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer. European journal of cancer 67, 11–20.
[51] Sorich, M.J., Wiese, M.D., Rowland, A., Kichenadasse, G., McKinnon, R.A. and Karapetis, C.S. (2014) Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Annals of Oncology 26, 13–21.
[52] Cremolini, C. et al. (2015) FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. The lancet oncology 16, 1306–1315.
[53] Pietrantonio, F. et al. (2015) Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. European journal of cancer 51, 587–594.
[54] Loupakis, F. et al. (2014) FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. European journal of cancer 50, 57–63.
[55] Cremolini, C. et al. (2015) BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. Annals of Oncology 26, 2092–2097.
[56] Pralong, A. S3-Leitlinie Palliativmedizin.

[57] Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature reviews cancer 3, 330.
[58] Santi, D.V., McHenry, C.S. and Sommer, H. (1974) Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry 13, 471–481.
[59] Sommer, H. and Santi, D.V. (1974) Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. Biochemical and biophysical research communications 57, 689–695.
[60] Jackson, R.C. and Grindley, G.B. (1984) The Biochemical Basis for Methotrexate Cytotoxicity (eds Sirotnak, FM, Burchall, J. J., Ensminger, WD & Montgomery, JA) 289-315. Academic, New York.
[61] Houghton, J.A., Tillman, D.M. and Harwood, F.G. (1995) Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. Clinical cancer research 1, 723–730.
[62] Yoshioka, A. et al. (1987) Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. Journal of Biological Chemistry 262, 8235–8241.
[63] Webley, S.D., Hardcastle, A., Ladner, R.D., Jackman, A.L. and Aherne, G.W. (2000) Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to the thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331. British journal of cancer 83, 792.
[64] Ladner, R.D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. Current Protein and Peptide Science 2, 361–370.
[65] Ghoshal, K. and Jacob, S.T. (1994) Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. Cancer research 54, 632–636.
[66] Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C. and Wakui, A. (1986) The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. Cancer chemotherapy and pharmacology 17, 43–46.
[67] Randerath, K., Tseng, W.-C., Harris, J.S. and Lu, L.-J. (1983) Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. In: Modified Nucleosides and Cancer, pp. 283–297. Springer.
[68] Santi, D.V. and Hardy, L.W. (1987) Catalytic mechanism and inhibition of trna (uracil-5-) methyltransferase: evidence for convalent catalysis. Biochemistry 26, 8599–8606.
[69] BE, H. (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet 16, 215–237.

[70] Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H. and Takeishi, K. (1995) Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. Cell structure and function 20, 191–197.
[71] Pullarkat, S.T. et al. (2001) Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. The pharmacogenomics journal 1, 65.
[72] Kawakami, K., Omura, K., Kanehira, E. and Watanabe, Y. (1999) Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. Anticancer research 19, 3249–3252.
[73] Chu, E., Koeller, D.M., Johnston, P.G., Zinn, S. and Allegra, C.J. (1993) Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. Molecular pharmacology 43, 527–533.
[74] Thorn, C.F., Marsh, S., Carrillo, M.W., McLeod, H.L., Klein, T.E. and Altman, R.B. (2011) PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. Pharmacogenetics and genomics 21, 237.
[75] Wei, X., Elizondo, G., Sapone, A., McLeod, H.L., Raunio, H., Fernandez-Salguero, P. and Gonzalez, F.J. (1998) Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. Genomics 51, 391–400.
[76] van Gennip, A.H., Abeling, N., Vreken, P. and van Kuilenburg, A.B.P. (1997) Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. Journal of inherited metabolic disease 20, 203–213.
[77] Boisdron-Celle, M., Remaud, G., Traore, S., Poirier, A.L., Gamelin, L., Morel, A. and Gamelin, E. (2007) 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Cancer letters 249, 271–282.
[78] Diasio, R.B., Beavers, T.L. and Carpenter, J.T. (1988) Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. The Journal of clinical investigation 81, 47–51.
[79] Aktories, K. and Forth, W. (2013) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer. München.
[80] Miwa, M. et al. (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. European journal of cancer 34, 1274–1281.
[81] Hoff, P.M. et al. (2001) Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. Journal of Clinical Oncology 19, 2282–2292.
[82] Schüller, J. et al. (2000) Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. Cancer chemotherapy and pharmacology 45, 291–297.

[83] van Cutsem, E. et al. (2001) Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. Journal of Clinical Oncology 19, 4097–4106.
[84] Ishikawa, T., Fukase, Y., Yamamoto, T., SEKIGUCHI, F. and ISHITSUKA, H. (1998) Antitumor activities of a novel fluoropyrimidine, N4-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine (capecitabine). Biological and Pharmaceutical Bulletin 21, 713–717.
[85] Reigner, B. et al. (1998) Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites following oral administration in cancer patients. Clinical cancer research 4, 941–948.
[86] van Cutsem, E. et al. (2004) Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. British journal of cancer 90, 1190.
[87] Nadal, J.C., Pinedo, H.M., van Groeningen, C.J. and Peters, G.J. (1988) In vivo potentiation of 5 fluorouracil by leucovorin in murine colon carcinoma.
[88] Park, J.-G., Collins, J.M., Gazdar, A.F., Allegra, C.J., Steinberg, S.M., Greene, R.F. and Kramer, B.S. (1988) Enhancement of fluorinated pyrimidine-induced cytotoxicity by leucovorin in human colorectal carcinoma cell lines. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 80, 1560–1564.
[89] Wright, J.E. et al. (1989) Selective expansion of 5, 10-methylenetetrahydrofolate pools and modulation of 5-fluorouracil antitumor activity by leucovorin in vivo. Cancer research 49, 2592–2596.
[90] Dolnick, B.J. and Cheng, Y.C. (1978) Human thymidylate synthetase. II. Derivatives of pteroylmono-and-polyglutamates as substrates and inhibitors. Journal of Biological Chemistry 253, 3563–3567.
[91] Radparvar, S., Houghton, P.J. and Houghton, J.A. (1989) Effect of polyglutamylation of 5, 10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. Biochemical pharmacology 38, 335–342.
[92] Neumeister, B. and Böhm, B.O., Eds (2018) Klinikleitfaden Labordiagnostik. Elsevier. München, Deutschland.
[93] Guder, W.G. and Nolte, J., Eds (2011) Das Laborbuch. Für Klinik und Praxis. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. München.
[94] Ohata, M. and Toda, G. (2001) Gamma-glutamyltranspeptidase (gamma-GT). Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology, 62–71.
[95] Shultz, L.D. et al. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2Rγnull mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. The Journal of Immunology 174, 6477–6489.

[96] Siolas, D. and Hannon, G.J. (2013) Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. Cancer research 73, 5315–5319.
[97] Kim, M.P., Evans, D.B., Wang, H., Abbruzzese, J.L., Fleming, J.B. and Gallick, G.E. (2009) Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. Nature protocols 4, 1670.
[98] Bergamaschi, A. et al. (2009) Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. Molecular oncology 3, 469–482.
[99] Sharkey, F.E. and Fogh, J.-r. (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. Cancer Metast Rev 3, 341–360.
[100] Ding, L.I. et al. (2010) Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. Nature 464, 999.
[101] Reyal, F. et al. (2012) Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. Breast cancer research 14, R11.
[102] Zhao, X. et al. (2012) Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma. Neuro-oncology 14, 574–583.
[103] Mullins, C.S. et al. (2019) Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research. Cancers 11, 1520.
[104] Linnebacher, M., Maletzki, C., Ostwald, C., Klier, U., Krohn, M., Klar, E. and Prall, F. (2010) Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting. BMC cancer 10, 362.
[105] Kuehn, F. et al. (2016) Establishment and characterization of HROC69-a Crohn' s related colonic carcinoma cell line and its matched patient-derived xenograft. Scientific reports 6, 24671.
[106] Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K. and Arends, M.J. (2016) Molecular pathological classification of colorectal cancer. Virchows Archiv 469, 125–134.
[107] Maletzki, C., Huehns, M., Knapp, P., Waukosin, N., Klar, E., Prall, F. and Linnebacher, M. (2015) Functional characterization and drug response of freshly established patient-derived tumor models with CpG island methylator phenotype. PloS one 10, e0143194.
[108] Maletzki, C., Stier, S., Gruenert, U., Gock, M., Ostwald, C., Prall, F. and Linnebacher, M. (2012) Establishment, characterization and chemosensitivity of three mismatch repair deficient cell lines from sporadic and inherited colorectal carcinomas. PloS one 7, e52485.
[109] Rohde, S. et al. (2017) Application of in vivo imaging techniques to monitor therapeutic efficiency of PLX4720 in an experimental model of microsatellite instable colorectal cancer. Oncotarget 8, 69756.

[110] Gao, H. et al. (2015) High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. Nature medicine 21, 1318.
[111] Dorsey, J.F. et al. (2009) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and paclitaxel have cooperative in vivo effects against glioblastoma multiforme cells. Molecular cancer therapeutics 8, 3285–3295.
[112] El-Salhy, M., Hilding, L., Royson, H. and Tjomsland, V. (2005) Comparison between triple therapy with octreotide, galanin and serotonin vs. irinotecan or oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil/leukovorin in human colon cancer. International journal of oncology 27, 687–691.
[113] Kang, H.J., Lee, S.H., Price, J.E. and Kim, L.S. (2009) Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-κB in breast cancer cells and potentiates the growth inhibitory effect of paclitaxel in a breast cancer nude mice model. The breast journal 15, 223–229.
[114] Chang, C.-W. et al. (2018) Lactobacillus casei variety rhamnosus probiotic preventively attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. Frontiers in microbiology 9, 983.
[115] Linnekamp, J.F. et al. (2018) Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. Cell Death & Differentiation 25, 616.
[116] Ryu, W.-J. et al. (2019) A therapeutic strategy for chemotherapy-resistant gastric cancer via destabilization of both β-catenin and ras. Cancers 11, 496.
[117] Kallinowski, F., Schlenger, K.H., Runkel, S., Kloes, M., Stohrer, M., Okunieff, P. and Vaupel, P. (1989) Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. Cancer research 49, 3759–3764.
[118] Dai, W., Li, Y., Meng, X., Cai, S., Li, Q. and Cai, G. (2017) Does tumor size have its prognostic role in colorectal cancer? Re-evaluating its value in colorectal adenocarcinoma with different macroscopic growth pattern. International journal of surgery 45, 105–112.
[119] González Raya, A., Coca Zúñiga, Ramón. and Martín Salido, E. (2019) Isolated elevation of aspartate aminotransferase (AST) in an asymptomatic patient due to macro-AST. Journal of clinical laboratory analysis 33, e22690.
[120] Kwo, P.Y., Cohen, S.M. and Lim, J.K. (2017) ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. The American journal of gastroenterology 112, 18.
[121] Botros, M. and Sikaris, K.A. (2013) The de ritis ratio: the test of time. The Clinical Biochemist Reviews 34, 117.
[122] Papanastasopoulos, P. and Stebbing, J. (2014) Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. Anticancer research 34, 1531–1535.
[123] Dean, L. (2016) Fluorouracil therapy and DPYD genotype. In: Medical Genetics Summaries Internet. National Center for Biotechnology Information (US).

[124] Gross, E. et al. (2003) Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. Human mutation 22, 498.
[125] Kleibl, Z. et al. (2009) Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. Neoplasma 56, 303.
[126] Roolf, C. et al. (2018) Decitabine demonstrates antileukemic activity in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. Journal of hematology & oncology 11, 62.
[127] Therasse, P. et al. (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. Journal of the National Cancer Institute 92, 205–216.
[128] Di Paolo, A., Orlandi, P., Di Desidero, T., Danesi, R. and Bocci, G. (2017) Simultaneous, but not consecutive, combination with folinate salts potentiates 5-fluorouracil antitumor activity in vitro and in vivo. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics 25, 1129–1140.
[129] Ostwald, C., Linnebacher, M., Weirich, V. and Prall, F. (2009) Chromosomally and microsatellite stable colorectal carcinomas without the CpG island methylator phenotype in a molecular classification. International journal of oncology 35, 321–327.

11. Anhang

11.1 Publikation

Im Rahmen dieser Dissertation wurde auch ein Manuskript erarbeitet und erfolgreich veröffentlicht. Dieses trägt den Titel: „NSG mice as hosts for oncological precision medicine“, und ist unter folgendem Link zu finden:

https://www.nature.com/articles/s41374-019-0298-6

11.2 Schaubilder

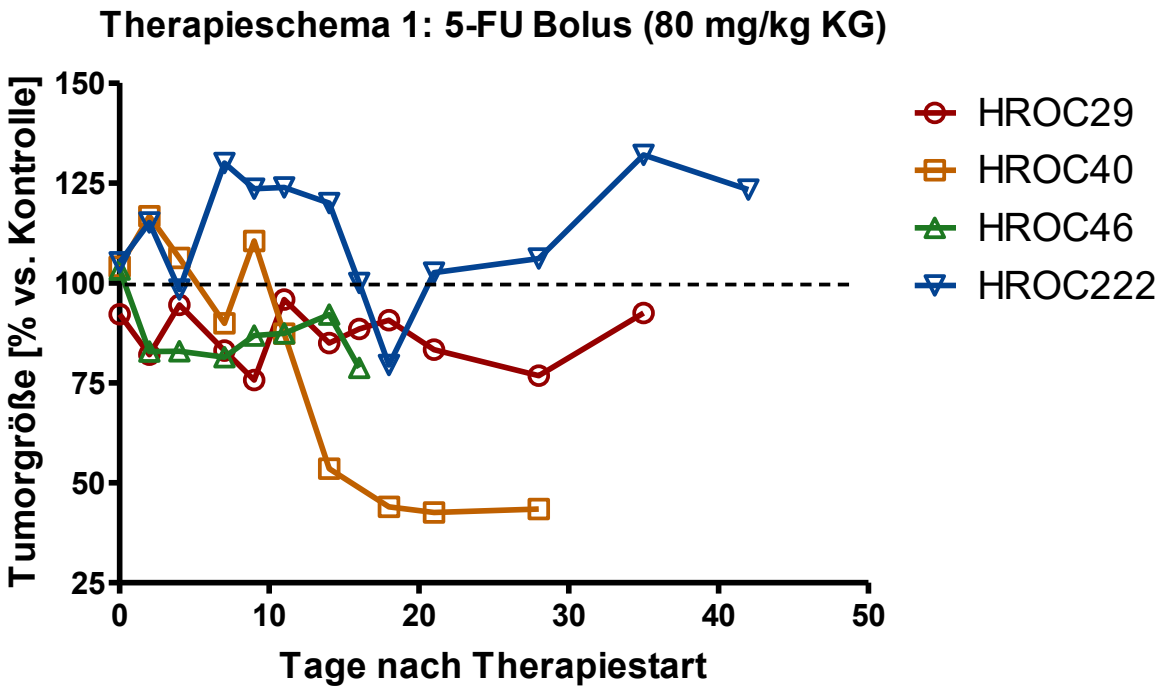

Abbildung 18: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 1 (Bolusgabe 5-FU 80mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

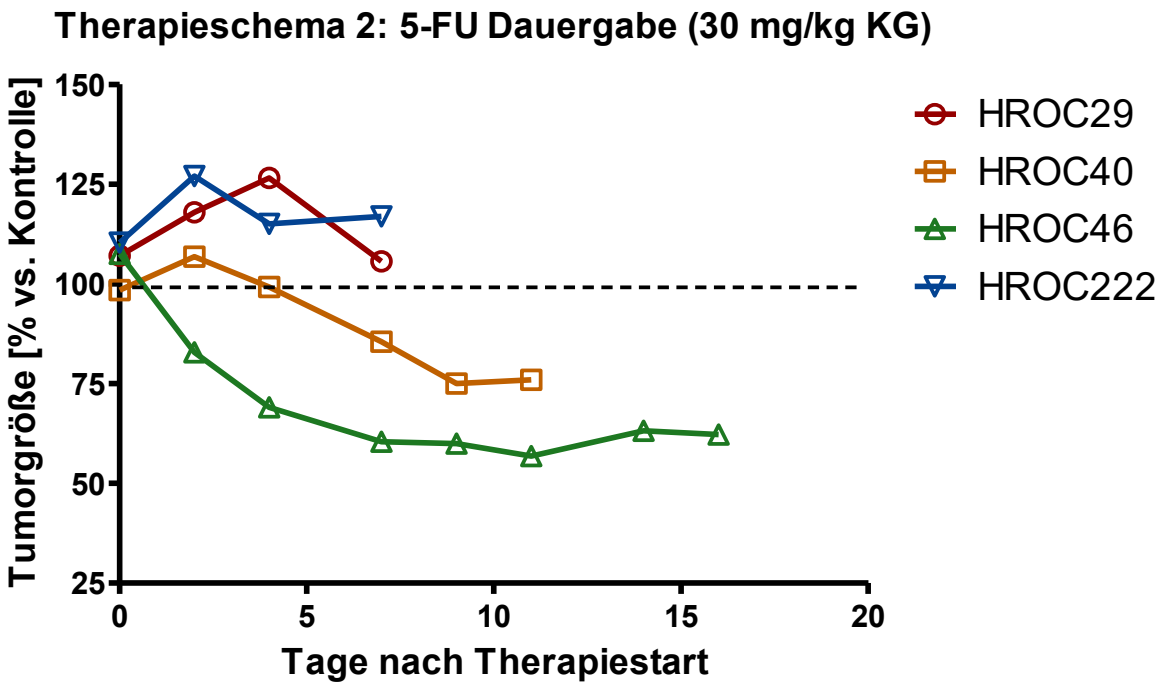

Abbildung 19: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 2 (Dauergabe 5-FU 30mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

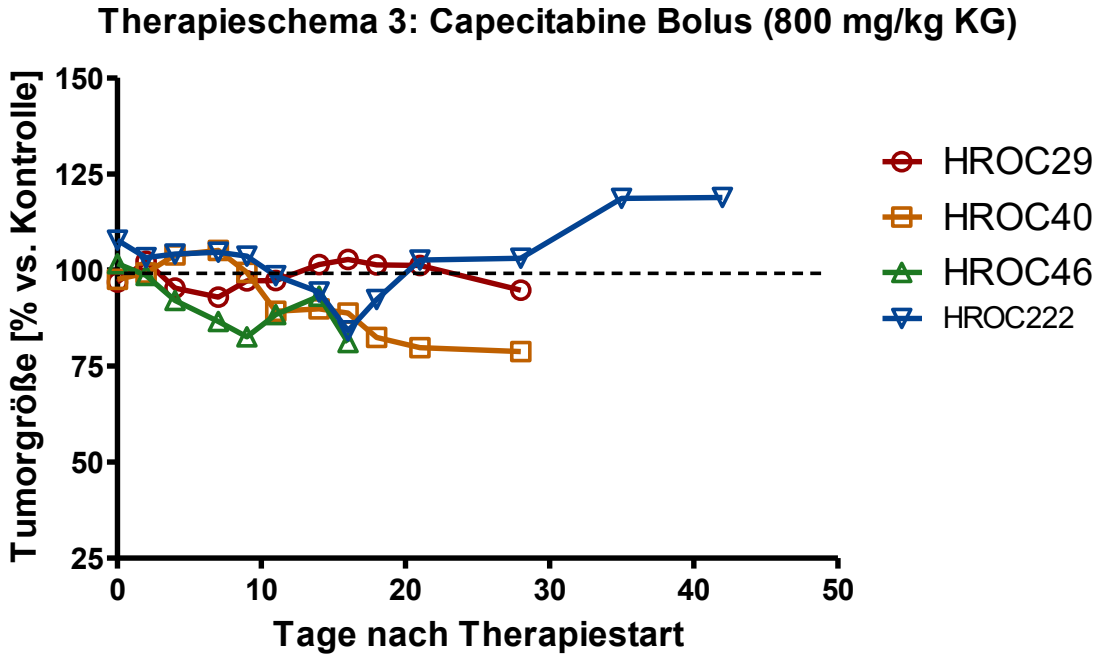

Abbildung 20: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 3 (Bolusgabe Capecitabine 800mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

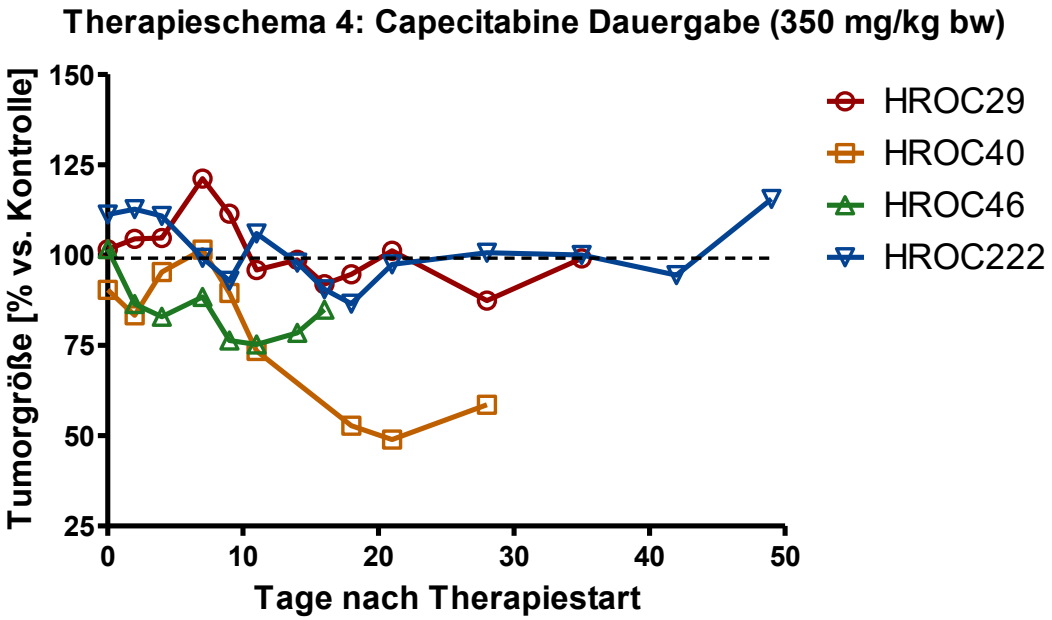

Abbildung 21: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 4 (Dauergabe Capecitabine 350mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

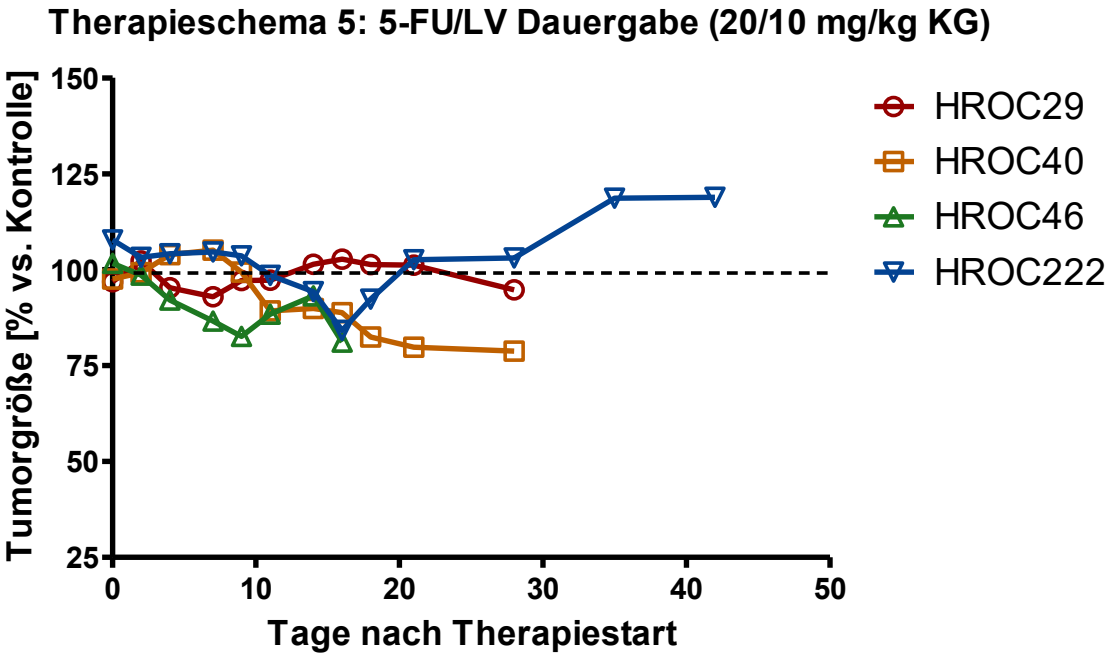

Abbildung 22: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 5 (Dauergabe 5-FU/LV 20/10mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

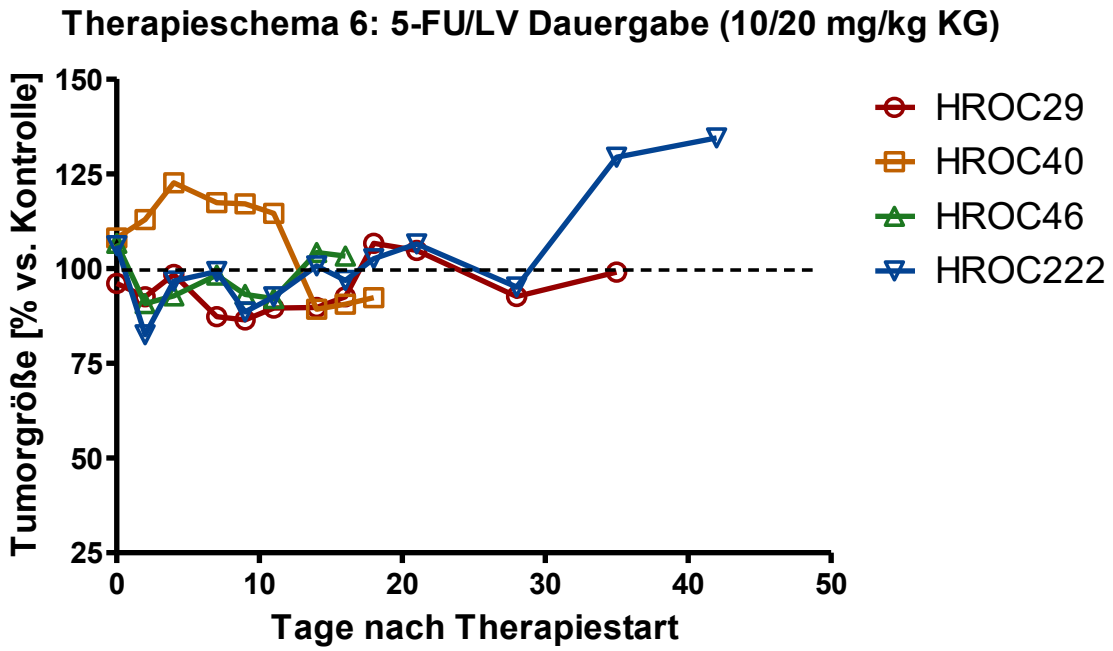

Abbildung 23: Dargestellt sind die Tumorwachstumskurven der verschiedenen PDX Tumore (HROC29, 40, 46 und 222, jeweils n=2) unter dem Therapieschema 6 (Dauergabe 5-FU/LV 10/20mg/kg KG). Sie wurden gegen die korrespondierende Kontrollgruppe (100% Linie) in % aufgetragen.

11.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock _____ _____

(Abgabedatum) (Vollständige Unterschrift)

11.4 Danksagung

Anfangs möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Linnebrache für die Bereitstellung des Themas und die umfangreiche Betreuung während der gesamten Zeit als Doktorand bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank insbesondere meinen beiden Betreuerinnen, Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki und Frau Stephanie Bock, welche mich beide sehr engagiert und motiviert durch die wissenschaftliche Arbeit begleiteten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch möchte ich mich bei Carolis Macius für die ständige Unterstützung und Mitarbeit bedanken.

Weiter danke ich Prof. Dr. med. Friedrich Prall aus dem Institut für Pathologie der Universität Rostock für die histologischen Analysen der gewonnen Gewebeproben.

Ich danke Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar aus dem Institut für experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung für die Möglichkeit der Experimente in ihrem Institut.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie bin ich sehr dankbar für die gute Arbeitsatmosphäre und andauernde Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Mathias Krohn, welcher mich im Rahmen der laboratorischen Arbeiten gut betreute und sicher durch eine Vielzahl von Versuchen führte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meiner Mutter, für die andauernde Unterstützung während des gesamten Promotionsprozesses bedanken.