Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-, und Transplantationschirurgie, Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer

Evaluation der Wirkung von 5-FU allein sowie in Kombination mit dem HDAC-Paninhibitor Panobinostat im NSG-Modell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Karolis Macius | geb. am 09.05.1996 in Vilnius

Rostock | 19.07.2023

Doktorarbeit

Universitätsmedizin Rostock

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005024

Gutachter:

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

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Udo Schumacher, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Publikation:

1. Maletzki C, Bock S, Fruh P**,** Macius K, Witt A, Prall F, Linnebacher M. NSG mice as hosts for oncological precision medicine. Lab Invest. 2020 Jan;100(1):27-37. doi: 10.1038/s41374-019-0298-6. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31409886.

„Habe nun, ach! Philosophie,
Juristerei und Medizin
Und leider auch Theologie
Durchaus studiert, mit heißem Bemühn.
Da steh‘ ich nun, ich armer Tor,
Und bin [fast] so klug als wie zuvor!“

- Johann Wolfgang von Goethe, Faust: Tragödie Erster Teil

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 1
2 Abkürzungsverzeichnis 3
3 Einleitung 6
3.1 Das kolorektale Karzinom (CRC) 6
3.2 Molekulare Subtypen 6
3.3 Prävention und Diagnostik 9
3.4 Therapie 11
3.5 Individuelle Therapie und das PDX-Modell 12
3.6 HDACs und der HDAC-Inhibitor Panobinostat 14
3.7 Biomarker 16
4 Zielstellung 17
5 Material und Methoden 18
5.1 Material 18
5.1.1 Laborgeräte 18
5.1.2 Verbrauchsmaterialien 19
5.1.3 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien 20
5.1.4 Kits 21
5.1.5 Pharmazeutika 21
5.1.6 Primer 21
5.1.7 Software 22
5.1.8 Versuchstiere 22
5.2 Methoden 23
5.2.1 Erzeugung der PDX-Modelle 23
5.2.2 Therapie und Messung des Tumorwachstums 24
5.2.3 Explantation 25
5.2.4 RNA- und DNA-Isolation 26
5.2.5 Genexpressionsanalyse 27
5.2.6 cDNA-Synthese 27
5.2.7 qPCR mit TaqMan-Sonden 27
5.2.8 Histopathologische Untersuchung 28
6 Ergebnisse 29
6.1 Initiale biometrische Planung 30
6.2 Auswertung des PDX-Erfolgs 31
6.3 Tumorwachstum 33
6.4 Tumorgewichte 46
6.5 Gewichtsverlauf 46
6.6 Überlebensanalyse 47
6.7 Expressionsbestimmung ausgewählter Biomarker 49
7 Diskussion 51
7.1 Beurteilung des PDX-Erfolgs im NSG-Mausmodell 51
7.2 Analyse des Therapieansprechens und der Toxizität im NSG-PDX-Modell 54

7.3 Expressionsanalyse der Biomarker 59
8 Zusammenfassung 63
9 Thesen 64
10 Abbildungsverzeichnis 65
11 Tabellenverzeichnis 66
12 Literaturverzeichnis 67
13 Danksagung 80
14 Eidesstattliche Versicherung 81
15 Anhang 82
15.1 HROC-Xenoliste 82
15.2 Score Sheet Mausbefinden 83
15.3 Flussdiagramm Ergebnisse 84
15.4 Avatare Expressionsanalyse 85
15.5 Ergänzende Auswertung der Biomarker-Expression 88

2 Abkürzungsverzeichnis

ACS	Adenoma-carcinoma sequence
ACVR2A	Activin receptor type-2A
AG M.O.I	Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie
AKT	Protein kinase B
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
APC	Adenomatous polyposis coli
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
AXIN2	Axis inhibition protein 2
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaar
BSA	Body surface area
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCND1	Cyclin D1 protein gene
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRC	Colorectal cancer (kolorektales Karzinom)
CT	Computertomographie
CTGF	Connective tissue growth factor
CT-Wert	Cycle threshold
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
DCC	Deleted in colorectal cancer
dMMR	Mismatch repair deficient
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
DS	Dermatansulfat
DS-epi1	Dermatan sulfate epimerase 1
DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase gene
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	The European Medicines Agency
et al.	et alii (und andere)
FBS	Filtrated bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FGF9	Fibroblast growth factor 9
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FOBT	Fecal occult blood test
Foxn1	Forkhead box N1
g	Fallbeschleunigung
GTP	Guanosine triphosphate
h	Stunde(n)
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histon deacetylase
HDACi	Histone deacetylase inhibitor(s)
hMSH	Human MutS-homologues
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer

hPMS2	human postmeiotic segregation 2
HROC	Hansestadt Rostock kolorektales Karzinom
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7
IL2	Interleukin-2
Il2rg^{tm1}Wjl	IL2 receptor gamma chain, targeted mutation 1 Warren J. Leonard
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LOH	Loss of heterozygosity
LS	Lynch Syndrom
LV	Leucovorin (Folinsäure)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mCRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
Mek	Mitogen-activated protein kinase kinase
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
min	Minute(n)
MMR	Mismatch repair system
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSI	Microsatellite instability
MSS	Microsatellite stable
MUTYH	mutY DNA glycosylase
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMRI	Naval Medical Research Institute
NOD	Non-obese diabetic
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NRP1	Neuropilin-1
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NSG	NOD scid gamma mouse
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCT	PDX clinical trial
PDX	Patient-derived xenograft
PD1	Programmed cell death protein 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
qPCR	Real-time quantitative PCR
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RFID	Radio-frequency identification
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
s	Sekunde(n)
SAHA	Soruberoylanilide hydroxamic acid
SART-2	Homo sapiens squamous cell carcinoma antigen recognized by T cell 2
s. c.	Subcutan
SCID	Severe combined immunodeficiency
SLE	Systemischer Lupus erythematodes

SMAD	Suppressor of mothers against decapentaplegic
sog.	sogenannt
SPF	Specific-Pathogen-Free
STRs	Short tandem repeats
T-ALL	T-akute lymphoblastische Leukämie
TGFβ	Transforming growth factor beta
TS	Thymidylate synthase
TTR	Tumor take rate
UICC	Union internationale contre le cancer
UMR	Universitätsmedizin Rostock
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless Int
5-FU	5-Fluorouracil
5-F-dUMP	2‘-Desoxy-Uridinmonophosphat

3 Einleitung

3.1 Das kolorektale Karzinom (CRC)

Die weltweit steigende Inzidenz von Krebserkrankungen stellt sowohl unsere Gesellschaft als auch die Medizin vor große Herausforderungen. Das kolorektale Karzinom (CRC) gehört global zu den häufigsten Krebserkrankungen, wobei die altersstandardisierte Inzidenz mit steigendem Entwicklungsstand eines Landes zunimmt und damit unter anderem in Europa, Australien, Neuseeland, Nordamerika sowie Teilen Ostasiens am höchsten ist [1, 2].
In Deutschland erkranken jährlich etwa 60.000 Personen an CRC. Im Jahr 2016 war es die dritthäufigste Tumorlokalisation aller Krebssterbefälle. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung vorwiegend älterer Menschen, mit einem mittleren Erkrankungsalter von 76 Jahren bei der Frau bzw. 72 Jahren beim Mann [3]. Ätiologisch sind Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum sowie Übergewicht von wesentlicher Bedeutung. Ebenfalls steigern eine ballaststoffarme Ernährung, der Verzehr von rotem bzw. verarbeitetem Fleisch, genetische Vorbelastung und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, wohingegen körperliche Bewegung sowie der Verzehr von Obst und Gemüse protektive Faktoren sind [4, 5].
Präventivmaßnahmen, wie die Koloskopie und der Stuhltest auf okkultes Blut, sind feste Bestandteile der gesetzlichen Darmkrebsvorsorge und dienen der frühzeitigen Erkennung sowie Behandlung von malignen Prozessen. Vermutlich ist dies einer der Gründe für die seit über einer Dekade sinkenden altersstandardisierten Sterberaten in Deutschland [3].
In Hinblick auf die Histopathologie ist das Adenokarzinom mit etwa 80–90 % der weitaus häufigste Phänotyp des CRC [6]. Die Lokalisationshäufigkeit nimmt nach aboral hin zu, sodass zu 50 % das Rektum, 30 % das Sigma und zu jeweils 10 % das Colon transversum/ descendens und Coecum/Colon ascendens betroffen sind [7]. In den meisten Fällen tritt das CRC sporadisch auf. Obwohl in 20–30 % der Fälle eine familiäre Prädisposition vermutet wird, sind lediglich 5 % aufgrund von Keimbahnmutationen auf hereditäre Syndrome zurückzuführen [8, 9]. Im Zuge der Erforschung von molekularen Prozessen in der Onkogenese erwies sich das CRC als ein heterogenes Krankheitsbild mit daraus resultierenden Konsequenzen für den Verlauf und die Therapie.

3.2 Molekulare Subtypen

Bei der malignen Entartung von intaktem Gewebe ist eine Veränderung von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen von entscheidender Relevanz. Diese sind grundlegender Bestandteil des von Fearon et al. [10] im Jahre 1990 publizierten Modells der Adenom-Karzinom-Sequenz (adenoma-carcinoma sequence, ACS), das die Transformation von gesundem Epithel über adenomatöse Zwischenstufen bis hin zum Karzinom beschreibt. In dieser konventionellen Abfolge sind die Inaktivierung von APC, gefolgt von einer Mutation von KRAS und dem Funktionsverlust von TP53, als Schlüsselereignisse aufgeführt. Eine ganzheitliche Erklärung stellt dieses Modell jedoch nicht dar, zumal eine solche, zufällige Akkumulation von Mutationen ohne weitere Mechanismen mit der Lebensdauer einer Epithelzelle kaum vereinbar wäre [11]. Tatsächlich sind eine genetische Instabilität und epigenetische Modifikation Antworten auf die Frage nach deren Vereinbarkeit.

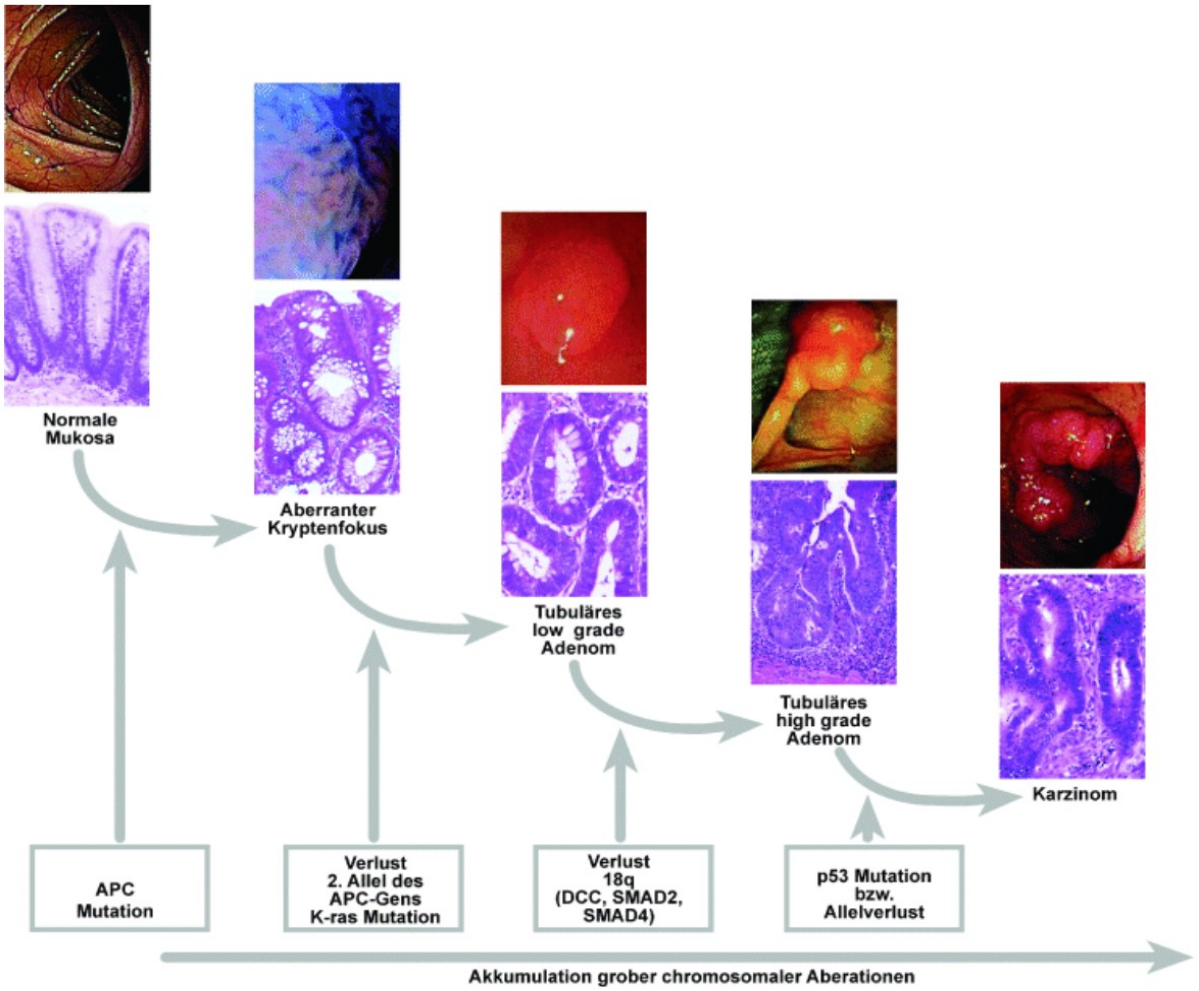


Abbildung 1 *Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein modifiziert, Quelle: [6]*

Auf molekularer Ebene sind es die folgenden Mechanismen, die eine Unterteilung des CRC in drei Hauptsubgruppen ermöglichen:

1. Suppressor pathway mit chromosomaler Instabilität (CIN)
2. Mutator pathway, der mit Mikrosatelliteninstabilität einhergeht (MSI) und
3. Methylator pathway, als CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) [12].

Diese Einteilung dient keiner strikten Abgrenzung untereinander, sondern einer molekularen Charakterisierung, die auch ein simultanes Auftreten der genannten Mechanismen zulässt.
Ungefähr 80 % der sporadisch auftretenden CRCs weisen eine CIN auf [9]. Dieser liegen Defekte, wie die der Kinetochore, DNA-Reparatur und Telomerfunktion zugrunde [13]. Charakteristisches Merkmal von CIN-Tumoren sind das Vorliegen von numerischen Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) und der Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH). LOH beschreibt den Untergang des einen, noch funktionsfähigen elterlichen Allels bei bereits vorausgegangenem Funktionsverlust des anderen. Betrifft der Verlust Bereiche, die an der Teilung und Differenzierung einer Zelle beteiligt sind, kann dieser Umstand eine maligne Entartung und Progression bedeuten.
Das kolorektale Karzinom ist häufig mit solch spezifischen, partiellen oder ganzheitlichen Verlusten von Chromosomen assoziiert [14]. So ist beispielshalber der lange Arm des Chromosom 18, auf dem die Gene SMAD2, SMAD4, DCC und cables lokalisiert sind, sehr oft betroffen [15]. Bei Verlust oder Mutation sind diese überwiegend beim fortgeschrittenen CRC von Bedeutung.
Im Zusammenspiel mit diesen Gegebenheiten geht der Suppressor pathway, wie eingangs erwähnt, mit Mutationen in bestimmten Onko- und Tumorsuppressorgenen einher. Als

frühestes und damit wahrscheinlich initiierendes Ereignis in der Karzinogenese wird die Inaktivierung des APC-Gens infolge einer Mutation oder Hypermethylierung der Promotorregion beschrieben [10, 15]. Eine Keimbahnmutation führt zum namensgebenden, hereditären Krankheitsbild der familiären adenomatösen Polyposis coli. Das APC-Protein ist an Bindung und Abbau von β-Catenin beteiligt und interagiert mit dem Wnt-Signalweg. Ein Funktionsausfall führt folglich zur Akkumulation von β-Catenin im Cytosol. Nach der Translokation in den Nukleus bewirkt es wiederum eine gesteigerte Transkription von tumorfördernden Genen (c-myc, AXIN2, CCND1) [16]. Ein mutiertes KRAS-Onkogen liegt bei 30 bis 40 % der CRCs vor [17, 18]. Durch den mutationsbedingten Defekt seiner GTPase-Aktivität begünstigt es über Signalwege, wie der MAPK- (Raf, Mek, MAPK) oder PI3K-AKT-Kaskade, die Transkription von entscheidenden Faktoren in der Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung [19].
Das Tumorsuppressorgen TP53 codiert das Phosphorprotein p53, das wegen seiner Funktion als Kontrollinstanz im Zellzyklus auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird. Bei DNA-Schäden fungiert es als Transkriptionsfaktor. Über den Cdk-Inhibitor p21 kann p53 sowohl den Übergang in die S-Phase stoppen als auch proapoptotische Vorgänge durch beispielsweise BAX, PUMA und NOXA einleiten [20]. Die Inaktivierung von TP53 ist ein häufig vorkommendes Phänomen in menschlichen Tumoren und bei 50 bis 70 % der sporadischen CRCs nachzuweisen [21, 22]. Grundsätzlich ist das CRC meist von einer Vielzahl von Mutationen betroffen. Eine Schlüsselrolle beim Fortschreiten und der Aufrechterhaltung des Tumors wird jedoch weniger als 15 von ihnen zugeschrieben [23].
In gegenseitiger Interaktion treiben die beschriebenen Veränderungen eine maligne Transformation an und resultieren letztlich im Krankheitsbild des CRC. Auch wenn die CIN hierfür ein opportunes Umfeld zu sein scheint, gilt es allerdings zu klären, ob es sich dabei um die Ursache oder Folge der Karzinogenese handelt.

Der Mutator pathway wird auf molekularer Ebene durch die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) charakterisiert und betrifft etwa 15 % aller CRCs [11]. Bei Mikrosatelliten, auch short tandem repeats (STR) genannt, handelt es sich um repetitive, meist ein bis sechs Basen lange DNA-Sequenzen, die über kodierende und nichtkodierende Bereiche des menschlichen Genoms verteilt sind. Sie sind besonders anfällig für Basenfehlpaarungen im Zuge der DNA-Replikation. So kommt es bei Schäden im DNA-Mismatch-Reparatursystem (MMR) zu Längenveränderungen [20]. Ein defizientes MMR (dMMR) mit den sich daraus ergebenden Folgen definieren den MSI-Subtypen.
Die im Reparatursystem agierenden Proteine MutS, MutL und MutH wurden erstmals im Bakterium *Escherichia coli* beschrieben. Das menschliche Pendant sind die hMLH- und hMSH-Proteine (human MutL- bzw. MutS-homologues). In MSI-positiven Tumoren sind die hierfür codierenden Gene hMSH2, hMLH1, hMSH6 und hPMS2 am häufigsten betroffen [24, 25, 26]. MMR-Proteine sind als Heterodimer-Paare organisiert, sodass hMSH2 mit hMSH6 und hMLH1 mit hPMS2 interagiert. Für hMSH6 und hPMS2 ist die jeweilige Paarung exklusiv, wodurch ein funktioneller Ausfall ihres Interaktionspartners gleichzeitig die eigene Defizienz bedeutet [27]. Ein insuffizientes MMR erhöht konsequenterweise die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten und Akkumulieren von Mutationen sowie Längenveränderungen mit resultierendem *frameshift* in tumorgenetisch relevanten Bereichen. So sind Defekte in Genen, die an Vorgängen in der Apoptose (BAX, Caspase-5), Signaltransduktion (TGFβ-Rezeptor II, ACVR2A) und epigenetischer Regulation (HDAC2, ARID1A) beteiligt sind, bei MSI-Subtypen häufig anzutreffen. Darüber hinaus ist es möglich, dass weitere Gene des MMR inaktiviert werden (insbesondere hMSH3 und hMSH6), woraus sich eine Art selbstverstärkender Prozess ergibt [28, 29, 30].
Um das Ausmaß der jeweiligen Charakteristika zu beschreiben, wird innerhalb der Subtypen oft eine Gewichtung vorgenommen. Anhand des standardisierten Bethesda-Panels werden fünf Mikrosatellitenmarker hinsichtlich vorliegender Instabilität untersucht. Man unterscheidet zwischen MSI-H (high) bei mindestens zwei und MSI-L (low) bei lediglich einem auffälligen Marker.
Bis zu 80 % der MSI-Tumore sind Folge sporadischer Ereignisse. Demgegenüber sind Keimbahnmutationen des MMR mit etwa 3 bis 5 % unter den CRCs vertreten. Sie sind

ursächlich für das Lynch-Syndrom (oft als HNPCC bezeichnet) als häufigste vererbbare Form des Darmkrebs, benannt nach Henry T. Lynch, einem der Wegbereiter für Diagnose und Prävention von erblichen Krebserkrankungen [26, 31]. MSI-H-Karzinome sind häufiger im proximalen Kolon lokalisiert [12] und zeigen eine hohe Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten [32]. Die hereditäre Form betrifft meist jüngere (durchschnittliches Erkrankungsalter 45 Jahre) und die sporadische eher ältere Patienten, womit sich eine bimodale Altersverteilung ergibt [33]. Bei einem Großteil der sporadischen MSI-Tumoren ist ein *silencing* des hMLH1-Promotors durch Hypermethylierung nachzuweisen [34]. Es stellt zugleich eine Überschneidung mit Tumoren des Methylator pathways dar, was eine initial gemeinsame Entwicklung vermuten lässt [35].

Das Prinzip des *gene silencing* durch Methylierung von CpG-Inseln ist namensgebend für den CIMP. CpG-Inseln sind Bereiche des eukaryotischen Genoms, die eine vergleichsweise hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden aufweisen und oft in Promotorregionen lokalisiert sind [36]. Die Methylierung des Cytosins in den Sequenzmustern kann eine verminderte Transkription oder gar eine komplette Abschaltung betroffener Gene bewirken. Auf diese Weise wird häufig die Synthese der DNA-Reparaturproteine hMLH1 und MGMT beim CIMP-Typen eingeschränkt [11]. Allgemein lassen sich beim CRC, gegensätzlich zu gesundem Darmgewebe, zahlreiche Gene mit unterschiedlich stark ausgeprägter Methylierung nachweisen. Bei einigen Genen gilt bereits das Vorliegen von Methylierung als Spezifikum, weil es ausschließlich in Zellen des CRC vorkommt [37]. Bei ganzheitlicher Betrachtung führen solche Modifikationen zu einer desorganisierten Genexpression und genomischen Instabilität [9]. Analog zur MSI-Gruppe kann bei CIMP-Tumoren eine Gewichtung mithilfe von Panels erfolgen, die gruppenspezifische Marker umfassen. Der Anteil der CIMP-positiven Karzinome beläuft sich auf ungefähr 40 %, die sich etwa zu gleichen Teilen auf die Untergruppen CIMP-H und CIMP-L verteilen. Neben der epigenetischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sind auch genetische Veränderungen im Methylator pathway bedeutend. Bei CIMP-H-Tumoren liegt häufig eine BRAF-Mutation vor, wohingegen die CIMP-L-Untergruppe mit einer Mutation von KRAS assoziiert ist [11]. Beide Onkogene interagieren mit dem bereits erwähnten MAPK-Signalweg und sind maßgeblich an der malignen Transformation beteiligt [19, 38]. Klinische Aspekte des CIMP-H sind ein häufiges rechtsseitiges Auftreten und eine histologisch eher niedrige Differenzierung. Des Weiteren haben betroffene Patienten zum Diagnosezeitpunkt ein vergleichbar hohes Lebensalter [39].

3.3 Prävention und Diagnostik

Maligne Raumforderungen im Darm können sich klinisch durch vielfältige Symptome äußern. Veränderungen des Stuhlgangs, wie Obstipation und Diarrhoe, sowie Blutablagerungen gehen neben der für die konsumierende Erkrankung typischen Begleitsymptomatik häufig mit dem CRC einher. Gleichwohl fehlt es an spezifischen Symptomen, die insbesondere auf Tumore im Frühstadium hinweisen. Nach Etablierung von Screeningprogrammen konnte eine Senkung der Inzidenz und Mortalität des CRC beobachtet werden, sodass der Prävention umso mehr Bedeutung zukommt [40].
Unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischer Untersuchung gilt die komplette Koloskopie im Rahmen der gesetzlichen Darmkrebsvorsorge als Goldstandard [41]. Vorteile hierbei sind die frühzeitige Erkennung von CRC-Vorstufen sowie die Möglichkeit der endoskopischen Biopsie und Intervention. Das Risiko, an einem CRC zu versterben, kann dadurch bis zu 66 % reduziert werden [42]. Fachgesellschaften empfehlen, gemäß aktueller S3-Leitlinie (2019) [41], Frauen ab 55 und Männern ab 50 Jahren mit auffälliger Familienanamnese, an einem Früherkennungsprogramm teilzunehmen. Eine Koloskopie ist bei unauffälligem Befund alle zehn Jahre zu wiederholen. Wenn diese abgelehnt wird, kann alternativ eine Sigmoidoskopie alle fünf Jahre in Kombination mit einem jährlichen Stuhltest auf okkultes Blut (FOBT) angeboten werden. Leitliniengerecht sollte der FOBT auch dann im jährlichen Rhythmus erfolgen, falls die endoskopische Vorsorge gänzlich abgelehnt wird. Bei Personen mit erhöhtem Risiko werden intensivierte Vorsorgeprogramme entsprechend frühzeitig

angeboten. Besteht der Verdacht einer erblichen Form, sind die Amsterdam-I- und -II- bzw. Bethesda-Kriterien wegweisend für das weitere Vorgehen. Sie dienen der HNPCC-Abklärung und umfassen anamnestische Fragen zur familiären Häufung, zum Erkrankungsalter und zum Vorliegen von extrakolischen Malignomen. Werden die Kriterien erfüllt, bestätigen molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich Mutationen im MMR die Diagnose HNPCC bzw. das Lynch-Syndrom im Falle einer Keimbahnmutation. In diesem Zusammenhang werden seltenere, hereditäre Formen, wie die FAP und die MUTYH-assoziierte Polyposis, abgeklärt.
Die auf der TNM-Klassifikation beruhende Stadieneinteilung der Union internationale contre le cancer (UICC) bildet die Grundlage in Bezug auf Therapie und Prognose des kolorektalen Karzinoms. Dementsprechend spielt die histopathologische Bewertung von verdächtigen Läsionen eine entscheidende Rolle. Wird die Diagnose CRC bestätigt, schließen sich weitere Untersuchungen im Zuge des Stagings an. Um die Sphinkterfunktion und Tiefeninfiltration besser einschätzen zu können, ist die digital-rektale Untersuchung ratsam [41]. Mittels kompletter Koloskopie sollte das Vorliegen von synchronen CRCs ausgeschlossen werden, die bei etwa 5 % der Fälle zu finden sind [43]. Bildgebende Verfahren können Aufschluss über Tumorausbreitung und potenzielle Fernmetastasierung geben. Sie sind überdies hilfreich bei der Planung operativer Eingriffe. Ferner wird anhand der Höhenlokalisation die Unterscheidung zwischen Kolon- und Rektumkarzinom vorgenommen. Tumore, die unter 16 Zentimeter oral der Anokutanlinie auftreten, werden laut UICC als Rektumkarzinome definiert. Mittels starrer Koloskopie lässt sich diese Höhenlokalisation vornehmen. Die Unterteilung in oberes (12–16 cm), mittleres (6–12 cm) und unteres (< 6 cm) Rektumdrittel ist ebenfalls für das therapeutische Vorgehen beim Rektumkarzinom bestimmend [41].
Eine präoperative Bestimmung des Tumormarkers CEA (carcinoembryonales Antigen) birgt die Chance, Rezidive in der Tumornachsorge oder eine mögliche Lebermetastasierung frühzeitig zu erkennen sowie prognostische Aussagen zu treffen [44].

Tabelle 1 *TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2020* [45]

TNM-Klassifikation des CRC

Abkürzung		Beschreibung
T	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria (intramukös)
	T1	Infiltration der Submukosa
	T2	Infiltration der Muscularis propria
	T3	Infiltration der Subserosa oder des nichtperitonealisierten perikolischen oder perirektalen Gewebes
	T4a	Perforation des viszeralen Peritoneums
	T4b	Infiltration anderer Organe oder Strukturen
N	NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1a	Metastase in einem regionären Lymphknoten
	N1b	Metastasen in zwei bis drei regionären Lymphknoten
	N1c	Infiltration des Fettgewebes der Subserosa oder des nichtperitonealisierten perikolischen oder perirektalen Fettgewebes ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
	N2a	vier bis sechs regionäre Lymphknoten
	N2b	≥ 7 regionäre Lymphknoten
M	M0	keine Fernmetastasen
	M1a	Fernmetastasen: nur ein Organ betroffen
	M1b	Fernmetastasen: mehr als ein Organ betroffen
	M1c	Fernmetastasen im Peritoneum mit oder ohne Befall anderer Organe

Tabelle 2 *Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2020* [45]

UICC-Stadieneinteilung des CRC

Stadium		TNM
0		Tis (Carcinoma in situ)
I		bis T2, N0, M0
II	IIA	T3, N0, M0
	IIB	T4a, N0, M0
	IIC	T4b, N0, M0
III	IIIA	bis T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
	IIIB	T1/T2, N2b, M0 oder T2/T3, N2a, M0 oder T3/T4a, N1, M0
	IIIC	T3/T4a, N2b, M0 oder T4a, N2a, M0 oder T4b, N1/N2, M0
IV	IVA	jedes T, jedes N, M1a
	IVB	jedes T, jedes N, M1b
	IVC	jedes T, jedes N, M1c

3.4 Therapie

Die Erstlinientherapie richtet sich nach der obigen UICC-Stadieneinteilung. Bei der zugrunde liegenden Klassifikation werden die histopathologischen Hauptkriterien Tumorinfiltrationstiefe (T), Metastasierung der Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) herangezogen. Im Vorfeld werden auch patientenbezogene Aspekte, wie individueller Wunsch, biologisches Alter und Operabilität, in der Therapieentscheidung mitberücksichtigt. Als wichtigster Teil des Behandlungskonzepts hat die chirurgische Intervention einen maßgeblichen Einfluss auf den Therapieerfolg.
Die radikale chirurgische Resektion steht im Mittelpunkt beim kurativen Therapieansatz im UICC-Stadium I, wobei je nach Risiko auch minimalinvasive Verfahren zur Verfügung stehen [41]. Patienten im Stadium III profitieren durch die zusätzliche adjuvante Chemotherapie von einem verbesserten Fünf-Jahres-Gesamtüberleben und einem geringeren Rezidivrisiko [46]. Allerdings haben nur 20 % dieser Patienten einen wirklichen Benefit aufgrund der Chemotherapie, wodurch 80 % der Patienten einer unnötigen Toxizität ausgesetzt sind [47]. Bei einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (mittleres und unteres Drittel) im Stadium II und III wird eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder Kurzzeitradiotherapie empfohlen [41]. Damit lässt sich ein besseres Ergebnis durch eine geringere Lokalrezidivrate und ein Downstaging mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für den Sphinktererhalt erzielen [48]. Der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium II ist Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Es wird versucht, Risikogruppen zu identifizieren, die in diesem Stadium eindeutig hiervon profitieren [49]. Bei Patienten mit weit fortgeschrittenem CRC (Stadium IV) entscheiden individuelle Faktoren über das therapeutische Vorgehen mit kurativer oder palliativer Intention. Je nach Zielsetzung können chirurgische Maßnahmen (Tumor- bzw. Metastasenresektion) oder eine systemische Chemotherapie erwogen werden, um die Tumorlast zu verringern. Auch haben molekularpathologische Faktoren und die Tumorlokalisation beim metastasierten CRC (mCRC) einen deutlichen Einfluss auf die Wahl der systemischen Therapie, sodass zunächst eine molekularbiologische Diagnostik erfolgen sollte [41]. In einer Metaanalyse konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei linksseitigen Kolonkarzinomen ohne Ras-Mutation (Wildtyp) die Hinzunahme eines anti-EGFR-Antikörpers der alleinigen Standardchemotherapie überlegen ist [50]. Insgesamt konnte aufgrund des kombinierten Einsatzes von zytotoxischen Wirkstoffen und zielgerichteten Medikamenten die mittlere Überlebenszeit von mCRC-Patienten von acht bis zwölf auf 24 Monate mehr als verdoppelt werden [51, 52, 53].

Die Grundsäule der konventionellen Chemotherapie bildet das Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU) bzw. sein Prodrug Capecitabin. Nach der intrazellulären Konvertierung zu 2′-Desoxy-Uridinmonophosphat (5-F-dUMP) wirkt es in erster Linie durch die Hemmung der Thymidylatsynthase. Die dadurch gestörte DNA-Replikation sowie -Reparatur vermitteln den antiproliferativen Effekt. Als Co-Substrat fungiert Folinsäure (Leucovorin, LV) synergistisch in dieser Reaktion. Ferner können abgeleitete Fluoronukleotide in DNA und RNA eingebaut werden. Beim Einbau in die RNA interferieren sie auf diese Weise mit der RNA-Prozessierung [54].
Das konventionelle Therapieprotokoll beim nichtmetastasierten CRC sieht eine Kombination von 5-FU mit Folinsäure und dem Platinderivat Oxaliplatin im sogenannten FOLFOX-Schema vor. Alternativ wird Capecitabin mit Oxaliplatin kombiniert (XELOX-Schema) [41]. Als Platinkomplexverbindung wirkt Oxaliplatin durch die Bildung von Quervernetzungen in der zellulären DNA [54]. In der adjuvanten Therapie verbessert die Addition von Oxaliplatin unter anderem das Drei-Jahres-krankheitsfreie-Überleben im Stadium III [55]. Dass auch Patienten im Stadium II davon profitieren, konnte bislang nicht eindeutig belegt werden [56]. Demnach begrenzt sich die Leitlinienempfehlung im Falle einer adjuvanten Behandlung im Stadium II lediglich auf eine Monotherapie mit Fluoropyrimindinen. Im metastasierten Krankheitsstadium gehören neben den genannten Doubletten Kombinationsregime mit Irinotecan (FOLFIRI, FOLFOXIRI) zum therapeutischen Portfolio [41]. Irinotecan wird in der Leber zum aktiven Metaboliten SN38 umgewandelt. Die zytotoxische Wirkung von SN38 beruht auf der Inhibition von Topoisomerase I, was zu s-Phase-abhängigen DNA-Strangbrüchen führt [54, 57]. Das FOLFOXIRI-Schema erzielt höhere Ansprechraten und ein längeres Gesamtüberleben als das FOLFIRI-Regime [58, 59], ist aber mit einer höheren Toxizität verbunden.
Zu den klinisch häufigsten, unerwünschten Arzneimittelwirkungen von 5-FU zählen Myelosuppression, Übelkeit, Neutropenie, Mukositis und Diarrhoe [60]. Die Kombination mit Oxaliplatin und Irinotecan verändert das Toxizitätsprofil nachteilig. In diesem Zusammenhang wird auch ein vermehrtes Auftreten von schwerer peripherer Neuropathie und Neutropenie beschrieben [55, 61]. Wenngleich die behandlungsbedingte Toxizität durch Optimierung von Dosis und Applikation gesenkt werden konnte [62], sind auch individuelle Faktoren für die Verträglichkeit zu berücksichtigen. Als Schlüsselenzym im 5-FU-Metabolismus weist die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) seltene, aber pharmakokinetisch relevante Polymorphismen auf [54]. Pathogene Genvarianten, die eine DPD-Defizienz bewirken, können unter 5-FU-Anwendung zu schweren bis letalen Komplikationen führen [63, 64]. Als Bestandteil der individualisierten Medizin trägt die genetische Abklärung dieser Polymorphismen vor Beginn der Erstlinientherapie zur Patientensicherheit bei.

3.5 Individuelle Therapie und das PDX-Modell

Mit den neuen Erkenntnissen auf dem Gebiet der molekularen Krebsforschung eröffnen sich neue Möglichkeiten für individuelle Behandlungen. In der Klinik nehmen zielgerichtete Ansätze und die Immuntherapie einen immer höheren Stellenwert ein. Im Zentrum dieser Entwicklung steht die Identifizierung von Subtypen, die aufgrund ihres molekularbiologischen Profils eine neue und im Idealfall eine hoch effektive Therapie ermöglichen. In bestimmten Patientengruppen des CRC-Stadiums IV konnte, wie zuvor erwähnt, durch den Einsatz von anti-EGFR- und anti-VEGF-Antikörpern ein besseres Ergebnis erreicht werden [50, 65]. Neue klinische Studien [66, 67] liefern überdies vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von MSI-H-Tumoren mit PD1-Rezeptor-Antikörpern aus der Klasse der Immun-Checkpoint-Inhibitoren. In diesem Kontext stellt sich auch die Frage, ob die molekulare Heterogenität eine ebenfalls unterschiedliche Sensitivität gegenüber der konventionellen Chemotherapie bedingt. In der Fachwelt finden sich kontroverse Aussagen zur Wirkung von 5-FU auf den MSI-Subtypen [32].

Mit dem Anspruch der personalisierten Krebstherapie ergibt sich die Notwendigkeit von experimentellen Studien an geeigneten Tumormodellen. Der Zugriff auf qualitatives Tumorgewebe von standardisierten Biobanken ist dabei essentiell. Die über Jahre hinweg aufgebaute HROC-Kollektion (Nomenklatur: HRO = Hansestadt Rostock, C = CRC) der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie (AG M.O.I) aus der Klinik für Allgemeine, Thorax-, Gefäß-

und Transplantationschirurgie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der UMR umfasst über 125 (Stand 2021) individuelle CRC-Xenografts. Sie ist zentraler Bestandteil einer der Forschungsschwerpunkte im Rahmen der Norddeutschen Tumorbank des CRC [68]. Das entwickelte Kryokonservierungsverfahren bietet einen idealen Ausgangspunkt für erfolgreiche Xenotransplantationen bei vergleichsweise einfacher Umsetzung [69].
Anhand des etablierten Xenograft-Modells lassen sich kliniknahe Therapiestudien verwirklichen [70]. Aufgrund der subkutanen Implantation von humanem Tumorgewebe in Mäuse mit modifiziertem Immunsystem kann eine realistische In-vivo-Simulation des Primärtumors erreicht werden. Herausragender Vorteil dabei ist die Tatsache, dass histologische, genetische sowie stromale Eigenschaften des humanen Tumors auch über mehrere Passagen hinweg erhalten bleiben [71, 72].

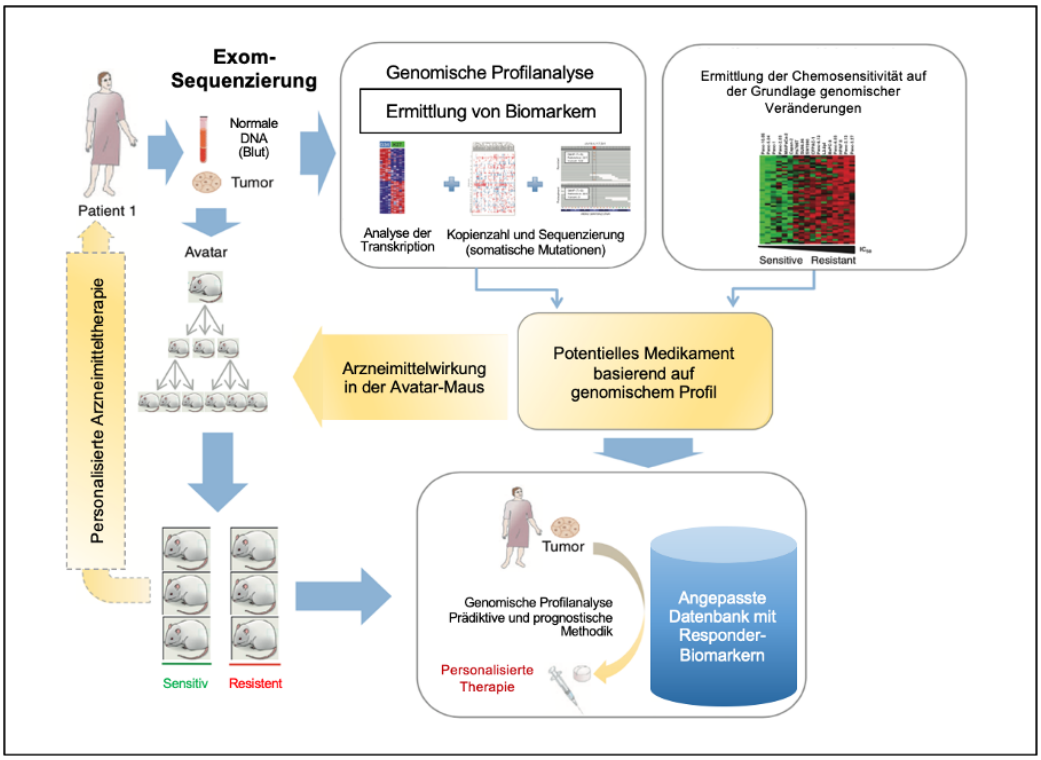


Abbildung 2 *Strategie der personalisierten Medizin nach Hidalgo et al. [73]. In Verbindung mit der genomischen Analyse des Patiententumors können erfolgversprechende Therapeutika an Avatarmäusen erprobt werden, um dem Patienten eine individualisierte Therapie zu ermöglichen.*

Für den effektiven Transfer von xenogenem Tumorgewebe hat sich eine Vielzahl von Mausstämmen bewährt. Sie weisen jeweils Vor- und Nachteile in ihrer Anwendung auf, was bei der Wahl des passenden Stamms vor Beginn einer Studie berücksichtigt werden muss. Auch das Ausmaß der genetischen Immundefizienz variiert unter den etablierten Stämmen und kann ein Hindernis für das Engraftment (Anwachsen) des Transplantats bedeuten. Dem Stamm der NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}Wjl/SzJ-(NSG)-Mäuse fehlen T-, B- und funktionsfähige NK-Zellen. Zudem führt die fehlende Expression der IL2-Rezeptor-γ-Kette zu weitreichenden Einschränkungen der Zytokin-Signalwege [74]. NSG-Mäuse haben sich als ein zuverlässiger Stamm erwiesen, weil sie einerseits ein gutes Engraftment gewährleisten und im Gegensatz zu anderen immundefizienten Stämmen resistenter gegenüber spontanen Lymphomen sind [75]. Die starke Immundefizienz bleibt aber weiterhin ein einschränkender Faktor in der realitätstreuen Nachbildung der Tumormikroumgebung. Um dem zu begegnen, können durch das Einbringen von Schlüsselelementen des humanen Immunsystems humanisierte NSG-Modelle etabliert werden [76]. Ito et al. [77] beispielsweise gelang es, eine immunvermittelte, antitumorale Wirkung durch die Transplantation von humanen Immunzellen zu rekonstruieren.
Mithilfe der patientenabgeleiteten Xenotransplantate (Patient-derived xenografts, PDX) können artifizielle Populationen aus „Xenopatienten“ (sogenannte Avatarmäuse) erstellt werden, die sich für Studiendesigns nach klinischem Vorbild eignen [78]. Klinische PDX-

Studien (PDX clinical trial, PCT) repräsentieren unter Verwendung von nur einem Tier pro Behandlungsarm die Heterogenität der Patientenpopulation. In einer umfangreichen PCT konnten Gao et al. [79] das Ansprechen von Patienten auf zielgerichtete Antineoplastika mit klinischer Übereinstimmung voraussagen. PDX-Modelle stellen demzufolge ein geeignetes und wertvolles Instrument dar, um konventionelle und neue Chemotherapeutika im präklinischen Setting zu untersuchen und zugleich eine hohe klinische Aussagekraft zu erzielen [80].

3.6 HDACs und der HDAC-Inhibitor Panobinostat

Analog zur Modulierung der Transkription mittels Hyper- bzw. Hypomethylierung ist die Modifikation von Histonen ein weiterer epigenetischer Mechanismus, der das Genexpressionsmuster in eukaryotischen Zellen beeinflussen kann.
Die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 sowie das Verbindungshiston H1 sind wesentliche Proteine der DNA-Kondensation. Ein H3-H4-Tetramer organisiert sich mit zwei H2A-H2B-Heterodimeren zu einem Histonoktamer. Dieses wiederum bildet den Nucleosomenkern, um den sich die DNA windet. Der Komplex wird als Nucleosom bezeichnet. Die am Nucleosom außen liegenden N- und C-terminalen Enden („Schwanzdomänen“) der Kernhistone sind für enzymatische Vorgange zugänglich. Als Verbindungsstück (deshalb auch als „linker Histon“ bezeichnet) interagiert H1 mit DNA-Abschnitten, die sich zwischen den Nucleosomen befinden, und ist demzufolge in der darüberliegenden Organisationsebene des Chromatins von Bedeutung [20].
Zu den wichtigsten Modifizierungen der Schwanzdomänen gehören die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Den beiden Erstgenannten wird eine bedeutende Funktion in der epigenetischen Genregulation zugeschrieben. Das Anheften von Acetylgruppen an Lysinreste der Schwanzdomänen, „neutralisiert“ die positiven Ladungen der Histonproteine, sodass die Affinität zum polyanionischen DNA-Rückgrat sinkt und der Kondensationsgrad abnimmt. Es erleichtert das Binden der RNA-Polymerase II zu Transkriptionsbeginn und wirkt folglich aktivierend auf die Genexpression. Das Gleichgewicht zwischen Histon-Acetyltransferasen (HATs) und -Deacetylasen (HDACs) reguliert diese reversible Reaktion [20, 81]. Eine Lysinrest-Methylierung hingegen kann sowohl eine aktivierende als auch eine unterdrückende Wirkung entfalten, wobei Lokalisation und Methylierungsgrad entscheidend sind [82]. Im Folgenden soll besonderes Augenmerk auf den Effekt von HDACs gerichtet werden.

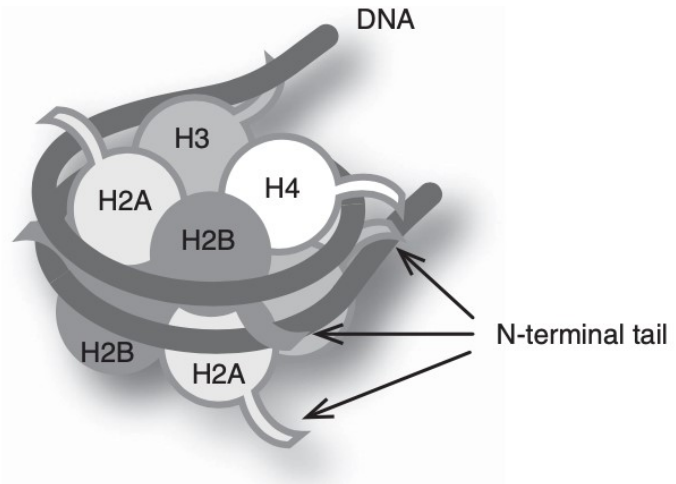


Abbildung 3 *Schematische Darstellung nach Kimura [82]. Nucleosom bestehend aus jeweils zwei Kernhistonen und DNA von ca. 150 bp Länge. Aminoterminale Schwanzdomänen (N-terminal tail) ragen heraus.*

In humanen Zellen sind 18 verschiedene HDACs bekannt. Sie lassen sich anhand ihrer molekularen Ähnlichkeit in zwei Familien und vier Klassen unterteilen. Mit ihrem Einfluss auf die Genregulierung sind sie in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt. Funktionsausfälle und veränderte Expressionslevel von HDACs konnten in diversen Tumorentitäten nachgewiesen werden [83]. Auch in Zellen des CRCs sind solche Pathologien zu finden. Zahlreiche Studien belegen übereistimmend eine Überexpression von HDAC1 bis 3 und HDAC8 in kolorektalem Tumorgewebe. Versuche an entsprechenden Knockout-Maus-Modellen bekräftigen die Hypothese einer Beteiligung an der Tumorprogression. Einen Erklärungsansatz dafür liefert die Erkenntnis, dass HDACs einerseits histonabhängig oder als Komponente von „Co-Repressor-Komplexen“ an der Expression von Tumorsuppressoren beteiligt sind und diese andererseits direkt inaktiveren können [84]. HDAC1 etwa kann den Abbau des bedeutenden Anti-Onkogens p53 bewirken [85]. Andere Untersuchungen legen wiederum nahe, dass der Ausfall bestimmter HDACs bei der Karzinogenese eine Rolle spielt. Ropero et al. [86] wiesen in sporadischen MSI-positiven und HNPCC-Tumoren einen Defekt der HDAC2 nach. Auch hier scheint die intra-tumorale Heterogenität des CRC wegweisend zu sein, weil MSI-Karzinomzellen sowohl mit als auch ohne HDAC2-Defizienz existieren [30].
Epigenetische Veränderungen sind grundsätzlich reversibel. Sie stellen damit einen Ansatzpunkt für Medikamente dar, die die Fähigkeit besitzen, eine rückläufige Entwicklung einzuleiten. Substanzen, die HDACs hemmen, werden seit Dekaden in der Forschung eigesetzt. Ihre Hauptwirkung besteht darin, die fehlregulierte Acetylierung von Histonen und anderen Substraten wiederherzustellen, indem das regulatorische Gleichgewicht in Richtung der HATs verschoben wird. Dabei sind sie in ihrer Selektivität unterschiedlich: HADAC-Inhibitoren (HDACi), wie die Valproinsäure, wirken spezifisch auf einzelne HDAC-Klassen, während sogenannte Pan-HDAC-Inhibitoren auf alle HDAC-Isoformen abzielen [87]. In der Vielseitigkeit ihres Wirkspektrums liegt das Potenzial der HDACi. Es konnten mitunter anti-inflammatorische Effekte nachgewiesen werden, die auf eine erfolgreiche Anwendung bei autoimmunvermittelten Erkrankungen, wie SLE oder MS, hoffen lassen. Dank ihrer antitumoralen Eigenschaften in den Bereichen Zellzyklusarrest, Zelldifferenzierung und Angiogenese hielten die ersten HDACi bereits Einzug in die moderne Krebstherapie [88]. Seit 2006 wird SAHA (Vorinostat) bei der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms in den USA eingesetzt [84]. Panobinostat (LBH589) ist ein Derivat der Hydroxylamino-Zimtsäure und wurde 2015 von der EMA für die Drittlinientherapie des Multiplen Myeloms zugelassen [54, 89]. Als Pan-HDACi verlängert es in Kombination mit dem Proteosom-Inhibitor Bortezomib und Dexamethason das progressionsfreie Überleben im rezidivierten bzw. rezidivierten und therapierefraktären Krankheitsstadium [90]. Präklinische Studien deuten darauf hin, dass HDACi auch in Zellen des CRC Tumorrepressoren aktivieren können [9, 13]. LaBonte und Kollegen [91] bestätigen die antiproliferative Wirkung von Panobinostat auf das kolorektale Karzinom. Sie haben zahlreiche Gene identifizieren können, deren Expression nach der Behandlung verändert war, darunter die Hochregulation von Genen, einschließlich CTGF, das mit Antiangiogenese in Verbindung gebracht wird, und eine verminderte Expression von FGF19, das über den β-Catenin-Signalweg tumorfördernd wirkt. Bemerkenswerterweise zeigte sich zudem eine verminderte Expression der Thymidylatsynthase (TS). Die Chemoresistenz von Patienten gegenüber 5-FU ist mit erhöhten intrinsischen Werten der TS assoziiert [92]. In-vivo-Studien belegen einen synergistischen Effekt von Panobinostat und 5-FU, was vermutlich auf diese Interaktion zurückzuführen ist [93]. Es stellt einen potenziell wertvollen Ansatz dar, um diesem klinisch hochrelevanten Resistenzmechanismus entgegenzuwirken. Gleichwohl sollte die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Toxizität bei einer Kombinationstherapie mit Pan-HDACi nicht außer Acht gelassen werden. Diesbezüglich sind im Rahmen von Xenograft-Studien Diarrhoe und Gewichtsverlust ebenso wie toxische Todesfälle dokumentiert [94]. Es gibt außerdem Hinweise, dass die molekularen Subtypen eine verschiedene Sensitivität gegenüber HDACi aufweisen. In Untersuchungen von Shin et al. [95] war eine HDACi-vermittelte Induktion der Zelldifferenzierung bei Zelllinien des CIMP weniger erfolgreich. Zwar lieferten die aufgeführten Arbeiten vielversprechende Ergebnisse, doch macht die Verwendung von nur insgesamt wenigen Zelllinien weitere Studien notwendig. Insbesondere jene, in denen die molekulare Heterogenität in einem klinischen Setting Beachtung findet.

3.7 Biomarker

Biomarker sind meist biologische Moleküle und stellen Indikatoren dar, die dabei helfen sollen, bestimmte Aussagen über Diagnose, Prognose oder Therapieansprechen zu treffen. Einige dieser Marker sind aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Wie im Falle eines Troponinanstiegs beim akuten Myokardinfarkt sind sie elementar für die Diagnosestellung. Auch beim CRC sind einige Marker als prädiktive und prognostische Faktoren etabliert. Während CEA bei der Erkennung von Rezidiven in der Nachsorge von Bedeutung ist und der Ras-Wildtyp eine personalisierte Anti-EGFR-Therapie zulässt, gibt es eine Reihe von weiteren Tumor- und Biomarkern mit stark variierender Sensitivität und Spezifität, deren Mehrwert nicht eindeutig geklärt ist [96]. Die Expression des DPD-Gens (DPYD) kann als prädiktiver Marker für die Verträglichkeit einer 5-FU-basierten Therapie verstanden werden. Eine genetisch bedingte Defizienz führt zu einer schweren 5-FU-Toxizität, die mit der prätherapeutischen Genotypisierung verhindert werden kann. Dagegen fehlt es an prädiktiven Biomarkern, die die Sensitivität der Tumore gegenüber der Standardtherapie voraussagen können. Wünschenswert wären diese nicht zuletzt deshalb, weil ein Großteil der Patienten im Stadium III ohne wirklichen Nutzen mit den unerwünschten Wirkungen der Standardtherapie konfrontiert wird [47]. So ist es ein ständiges Bestreben der Forschung, neue Marker zu identifizieren, die zuverlässig in der Früherkennung und Therapieplanung eingesetzt werden können. In dieser Arbeit werden neben DPYD die Expression der Biomarker CXCR4, DSE, FGF9, IGFBP7 und NRP1 im PDX-Tumorgewebe untersucht und verglichen. Diesen Biomarkern wird eine bedeutende Funktion in der Onkogenese des CRC und die Beteiligung an Arzneimittelresistenzen zugeschrieben [52, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113].

4 Zielstellung

In der Erprobung von bewährten und experimentellen Chemotherapeutika sind Tumormodelle unerlässlich. Sie sind Grundpfeiler der translationalen Krebsforschung und die Voraussetzung dafür, dass die Errungenschaften der Grundlagenforschung in Prävention, Diagnostik und Therapie Anwendung finden. Das heterogene Krankheitsbild CRC birgt das Potenzial, die individuellen molekularen Aspekte als Angriffspunkte für eine effektive Therapie zu nutzen. Das übergeordnete Ziel ist ein größtmöglicher Gewinn durch eine individualisierte Behandlung zu einem möglichst günstigen Nebenwirkungsprofil. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Schwerpunkte gesetzt: Zunächst wird der Engraftment-Erfolg individueller CRC-Tumore der HROC-Kollektion in NSG-Mäusen nach Kryokonservierung analysiert. Anschließend sollen nach dem Vorbild einer PCT-Studie das Standardtherapeutikum 5-FU und der Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat auf ihre Wirkung auf das Tumorwachstum hin untersucht werden. In Mono- und Kombinationstherapie sollen die Effekte dieser Präparate auf die CRC-Subklassen verglichen und mögliche Biomarker für die Chemosensitivität ermittelt werden. Der besondere Fokus liegt hierbei auf der Beurteilung von potenziellen Unterschieden, die sich durch das molekulare Profil ergeben.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
chirurgisches Besteck Aesculap®	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Dewar-Transportgefäß	KGW-Isotherm (Karlsruhe, Deutschland)
Digitalkamera	Canon Deutschland GmbH (Krefeld, Deutschland)
Eiswürfelbereiter	Manitowoc (Milwaukee, WI, USA)
Etikettendrucker	Brady GmbH (Egelsbach, Deutschland)
Flüssigstickstoffanlage	Cryotherm GmbH & Co. KG (Kirchen, Deutschland)
Heizplatte	Harry Gestigkeit GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Homogenisator Precellys®	Bertin GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
Infrarotlampe	Electric Petra (Burgau, Deutschland)
Käfigsystem	Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpeißenberg, Deutschland)
Kühlgeräte:	
• Kühlschrank (4 °C)	Liebherr Hausgeräte (Ochsenhausen, Deutschland)
• Tiefkühlschrank (-20 °C)	Bosch Hausgeräte (München, Deutschland)
• Tiefkühltruhe (-80 °C)	Kryotec-Kryosafe GmbH (Hamburg, Deutschland)
Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Messschieber digital	Burg-Wächter KG (Wetter-Volmarstein, Deutschland)
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Pipetten	Gilson (Villiers-le-Bel, Frankreich)
RFID-Chip-Lesegerät GES3S Reader	Datamars GmbH (Essen, Deutschland)
Schüttler:	
• MS2 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
• Rocker 3D	IKA (Staufen, Deutschland)

• Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
• Vortex-Genie® 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Thermal Cycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Thermal Cycler MyCycler™	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Waage	Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland)
Wärmematte ThermoLux®	Witte + Sutor GmbH (Murrhardt, Deutschland)
Werkbank UVP PCR UV³ HEPA Cabinet	Analytik Jena GmbH + Co. KG (Jena, Deutschland)
Zentrifugen:	
• Laborzentrifuge 2K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
• Multifuge® 3S-R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Augen- und Nasensalbe Bepanthen®	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, Deutschland)
Baretthauben	AMPri Handelsgesellschaft mbH (Winsen, Deutschland)
Einbettkassetten	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Einmalhandschuhe	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Einwegrasierer	Wilkinson Sword GmbH (Solingen, Deutschland)
Einwegvlieskittel	AMPri Handelsgesellschaft mbH (Winsen, Deutschland)
Insulinspritzen	BD GmbH (Heidelberg, Deutschland)
medizinische Gesichtsmasken	Mölnlycke Health Care GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Mullkompressen	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Nahtmaterial	Ethicon (Raritan,USA)
OP-Abdecktücher	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)

PCR-Folie	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
PCR-Platten 96 Well	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
RFID-Transponder PICO-ID ISO	Uno (Zevenaar, Niederlande)
Skalpellklingen Aesculap®	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Überschuhe	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH (Köln, Deutschland)
Wattestäbchen	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)

5.1.3 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	**Hersteller**
Dekontaminationslösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DNase	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
dNTP-Mix	Bioron GmbH (Römerberg, Deutschland)
Ethanol 100 %	Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock
FBS (filtriertes Rinderserum)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Flächendesinfektionsmittel	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Formaldehyd 4 % gepuffert	Formafix GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Matrigel®	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
nukleasefreies Wasser	EURx (Gdańsk, Polen)
PBS (steril, ohne Calcium und Magnesium)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Povidon-Iod-Lösung Braunol®	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Primer (Oligo-dT + Random)	metabion GmbH (Planegg-Steinkirchen, Deutschland)
Reverase™ Reverase Transcriptase	Bioron GmbH (Römerberg, Deutschland)

ROX	Bioron GmbH (Römerberg, Deutschland)
Sonden	metabion GmbH (Planegg-Steinkirchen, Deutschland)
5 x RT buffer complete	Bioron GmbH (Römerberg, Deutschland)

5.1.4 Kits

Produktname	Hersteller
Peqlab® peqGOLD Total RNA Kit®	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Precellys® Lysing Kit „Hard Tissue Homogenizing CK28-R“	Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
TaqMan Master Mix	Bioron GmbH (Römerberg, Deutschland)

5.1.5 Pharmazeutika

Substanz	Hersteller
Cotrimoxazol	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Ketamin 10 %	Bela-pharm GmbH & Co. KG (Vechta, Deutschland)
Panobinostat (LBH589)	MedChemExpress LLC (Monmouth Junction, NJ, USA)
Xylazin 2 %	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
5-Fluorouracil	Zentralapotheke des Universitätsklinikums Rostock

5.1.6 Primer

Gen	Primer-Sequenz	Produktgröße [bp]
CXCR4	F: 5’-CGCGGCCAGAAACTTCAG-3’	118
	R: 5’-TGATCCCCTCCATGGTAACC-3’	
DPYD	F: 5’-AGACTCGAGACTGTAGGCAC-3’	102
	R: 5’-TGCATGAGTTTGTGTTCGAGG-3’	
DSE	F: 5’-TGCACACAGTCATGAGCTTC-3’	132
	R: 5’-AAGATCCTCACAGTGCAGGG-3’	
FGF9	F: 5’-ACTGCAGGACTGGATTTCAC-3’	150
	R: 5’-CGAGGTAGAGTCCACTGTCC-3’	
IGFBP7	F: 5’-GCATGAAGTAACTGGCTGGG-3’	98
	R: 5’-CTGAAGCCTGTCCTTGGGA-3’	
NRP1	F: 5’-AACGGGGAAGACTGGATCAC-3’	139
	R: 5’-AAGTTGCAGGCTTGATTCGG-3’	
GAPDH	F: 5’-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3’	105
	R: 5’-GGGTGGAATCATATTGGAACA-3’	
Hybridisierungssonde	5’-HEX-TGCCATCAATGACCCCTTCATTG-BHQ-3’	

5.1.7 Software

Brady LabelMark® 6
GraphPad Prism® 5
Microsoft Office® 2019

5.1.8 Versuchstiere

Mausstamm	Zucht und Hersteller
NSG: NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}Wjl/SzJ	Zentrale Versuchstierhaltung der Universität Rostock Hersteller: The Jackson Laboratory (JAX), Bar Harbor, USA

Die Versuchstiere wurden von der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie (Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar) der Universität Rostock bezogen. Alle Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Genehmigungsnummer: LALLF M-V/TSD/7221.3-1-005/17). Die SPF-nahe Haltung erfolgte in einzelbelüfteten Käfigsystemen (IVCs) mit maximal sechs Tieren pro Käfig unter freiem Zugang zu Wasser (autoklaviert) und Standardfutter (autoklavierte Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland), in einem zwölfstündigen Tag-/Nachtzyklus bis zu Ende des Nachbeobachtungzeitraums (maximal drei Monate). Für das Wohlbefinden der Tiere enthielten die Käfige Tiereinstreu, Nage- und Nistmaterial. Zudem erfolgte eine einwöchige Adaptation an die Haltungs- und Versuchsbedingungen vor Studienbeginn. Es wurden weibliche und männliche, vier bis sechs Wochen alte NSG-Mäuse verwendet.

5.2 Methoden

5.2.1 Erzeugung der PDX-Modelle

Der Ablauf bei der Erzeugung von PDX-Modellen richtete sich nach dem von Mullins et al. [114] beschriebenen inkrementellen Vorgehen. Die Implantation erfolgte parallel in vier NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}Wjl/SzJ-Mäusen. Dafür wurde jeweils ein Tumorstück von 3 × 3 × 3 mm Größe verwendet. Sie entstammen der HROC-Kollektion und wurden, entsprechend des erwähnten Verfahrens von Linnebacher et al. [69], aus zuvor xenotransplantierten Patiententumoren und anschließender Kryokonservierung gewonnen. Während des Auftauens wurden die Tumorstücke mehrmals mit PBS gespült, um das im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Im Anschluss daran wurden die Tumorfragmente für über zehn Minuten in Matrigel® eingeweicht, das Bestandteile der extrazellulären Matrix enthält und das Engraftment in vorangegangenen Untersuchungen verbessert hat [115, 116]. Vor Beginn des Eingriffs wurden die postoperativen Käfige vorbereitet sowie Futter und Nistmaterial aufgefüllt. Das Trinkwasser wurde postoperativ für einen Zeitraum von vier Wochen prophylaktisch mit Antibiotika versetzt (Cotrim, Dosis: 8 mg Trimethoprim und 40 mg Sulfamethoxazol pro kg KG; gemäß GV-Solas; entspricht 11,55 ml pro Liter Trinkwasser). Die benötigten Materialien wurden griffbereit sortiert und die elektrischen Geräte angeschlossen. Zur Bestimmung der Narkotikadosis wurden die Mäuse gewogen. Nach gründlicher Desinfektion von Arbeitsflächen und Instrumentarium erfolgte die Allgemeinanästhesie mit Ketamin/Xylazin (Dosis: 90/6 mg/kg KG i. p.). Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz gesetzt, indem die Haut eines Hinterbeins mit einer anatomischen Pinzette behutsam komprimiert wurde. Das Ausbleiben einer muskulären Kontraktion bestätige eine ausreichende Allgemeinanästhesie.

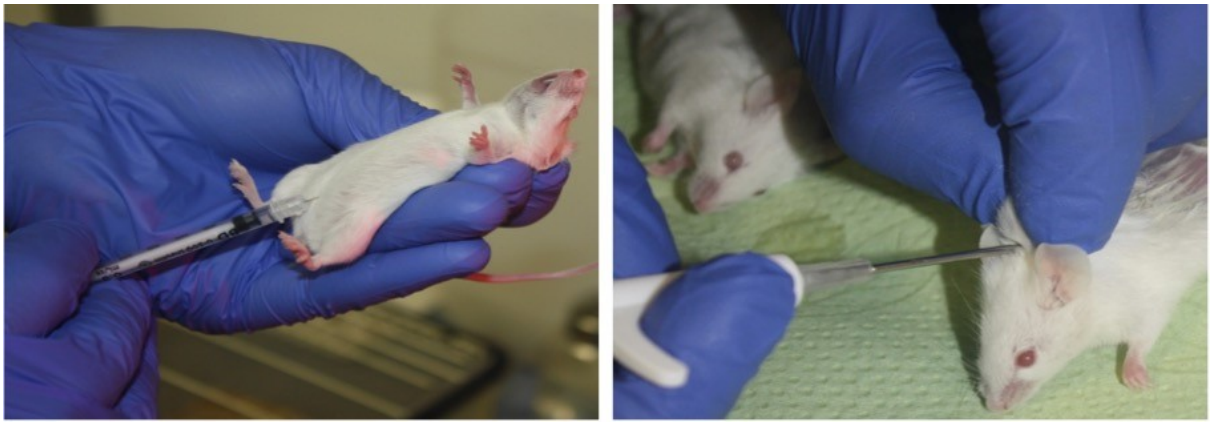


Abbildung 4 *Intraperitoneale Applikation der Anästhetika (l.) und Injektion des RFID-Responders in die Nackenfalte (r.)*

Unter möglichst sterilen Bedingungen folgten die invasiven Schritte. Für die eindeutige Identifikation der Tiere wurde ein RFID-Transponder subkutan in die Nackenfalte injiziert. Die Funktion des Responders wurde mittels Lesegerät kontrolliert und das jeweilige Tier mit einer PDX-ID versehen. Anschließend wurden die Augen mit einer Salbe bedeckt, um ein Austrocken zu verhindern. Mit einem Einwegrasierer wurde das Fell der rechten Flanke entfernt und die darunterliegende Haut mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert. Es folgte ein ca. 5 mm langer Schnitt mittels gerader Irisschere und die stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche. Um den Zugang zu dieser offen zu halten, wurde der Wundrand mit einer Pinzette angehoben. Zeitgleich wurde ein mit Matrigel® getränktes Tumorstück mit einer atraumatischen Pinzette vorsichtig eingeführt. Der Wundverschluss erfolgte mit einem bis zwei chirurgischen Knoten (resorbierbares Nahtmaterial: PDS II monofil, USP 5-0). Abschließend wurde der Wundbereich erneut mit Povidon-Iod-Lösung behandelt und das Tier in den vorbereiteten Käfig gelegt. Während des gesamten Eingriffs lagen die Tiere auf einem sterilen OP-Tuch mit einer darunter befindlichen Wärmematte, um einer perioperativen Hypothermie entgegenzuwirken. In der Aufwachphase wurden die Mäuse durch eine Infrarotlampe gewärmt. Die ausgewählten

Tumore der HROC-Sammlung wurden, bis auf eine Ausnahme (HROC50), jeweils in vier Mäuse implantiert, mit je einem Tumorstück pro Tier.
Die tabellarische Auflistung der verwendeten HROC-Tumore mit ihren klinischen Charakteristiken ist dem Anhang zu entnehmen.

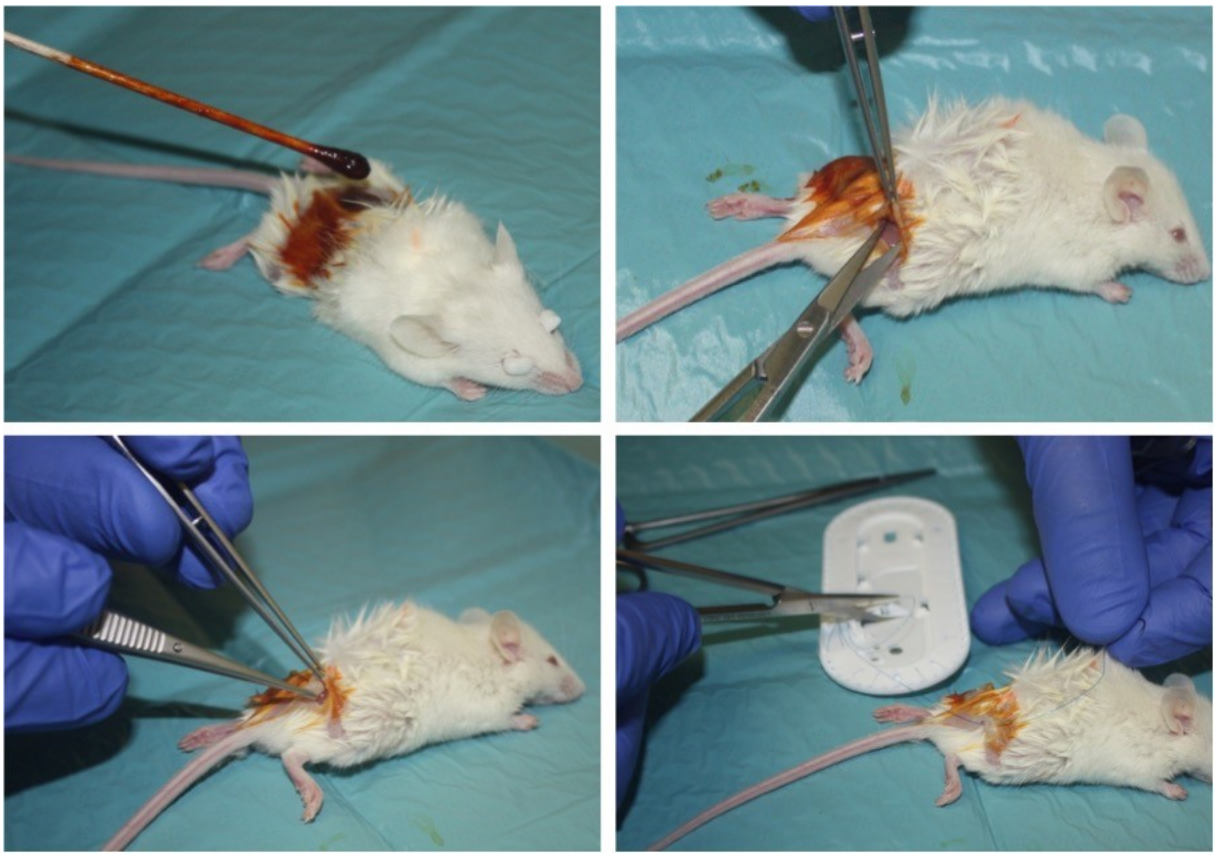


Abbildung 5 *Tumorimplantation: Desinfektion der rasierten rechten Flanke (o. l.), stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche (o. r.), Einführen des Tumors (u. l.) und Wundverschluss (u. r.)*

5.2.2 Therapie und Messung des Tumorwachstums

Nach Implantation wurde die Tumorgröße mehrfach wöchentlich mit einem digitalen Messschieber bestimmt. Sobald der Tumor nach erfolgreichem Engraftment einen Durchmesser von ungefähr 6 mm (≈ 100 mm^3) erreicht hatte, wurden die Mäuse randomisiert und einem der vier Therapiearme zugeteilt (Tabelle 3). In den Therapiearmen 1 und 2 wurde in Monotherapie mit 5-FU bzw. Panobinostat, im Therapiearm 3 in Kombinationstherapie aus beidem und in der Kontrollgruppe mit einer 0,9 %-NaCl-Lösung behandelt. Das verabreichte Gesamtvolumen belief sich in allen Therapiearmen auf 100 µl.

Tabelle 3 *Therapiearme*

Therapiearm n = 1 Tier/Tumor	Therapieschema
1	Monotherapie **5-FU** (20 mg/kg KG, i. p.)
2	Monotherapie **Panobinostat** (10 mg/kg KG, i. p.)
3	Kombinationstherapie **5-FU** (20 mg/kg KG, i. p.) **+** **Panobinostat** (10m mg/kg KG, i. p.)
4	Kontrollgruppe 0,9 % NaCl Lösung i. p.

Basierend auf Vorerfahrungen sah die initiale Studienplanung eine 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG vor. Aufgrund von starken unerwünschten Wirkungen und toxischen Todesfällen bei der Behandlung der ersten Tiere in der 5-FU- und der Kombinationsgruppe (siehe Ergebnisteil) wurde die Dosis in beiden Gruppen auf 20 mg/kg KG angepasst. Für Panobinostat wurde, in Anlehnung an die zu diesem Zeitpunkt verfügbare Literatur [93, 117, 118], eine Dosis von 10 mg/kg KG festgelegt. Je Behandlungsarm und HROC-Tumor wurde folglich ein Tier (n = 1) einbezogen, analog zum Ansatz von Gao et al. [79]. Das Therapieschema sah insgesamt neun Applikationen pro Behandlungsarm vor (Abb. 6). Die Applikation der Chemotherapeutika und der Kontrolllösung erfolgte dreimal wöchentlich intraperitoneal mit der ersten Gabe an Tag 0 und der letzten an Tag 18. An jedem Behandlungstag wurden die Tiere für die Dosisbestimmung gewogen, außerdem wurde die Größe des Tumors gemessen. Die Werte wurden dokumentiert und die Tiere hinsichtlich Auffälligkeiten wie Aussehen, Sozialverhalten, Schmerzsymptomatik und Stuhlunregelmäßigkeiten anhand eines Score Sheets (siehe Anhang) begutachtet. Nach erfolgreichem Abschluss der Therapiephase schloss sich die Nachbeobachtungszeit an. Dazu wurden das Gewicht und die Tumorgröße zunächst drei Tage nach der letzten Applikation (Tag 21) bestimmt und nachfolgend in einem wöchentlichen Intervall für maximal zehn Wochen (Tag 91) dokumentiert. Tiere, die über sechs Monate nach Implantation kein Engraftment aufwiesen, wurden aus der Studie ausgeschlossen und für die studentische Aus- und Weiterbildung verwendet.

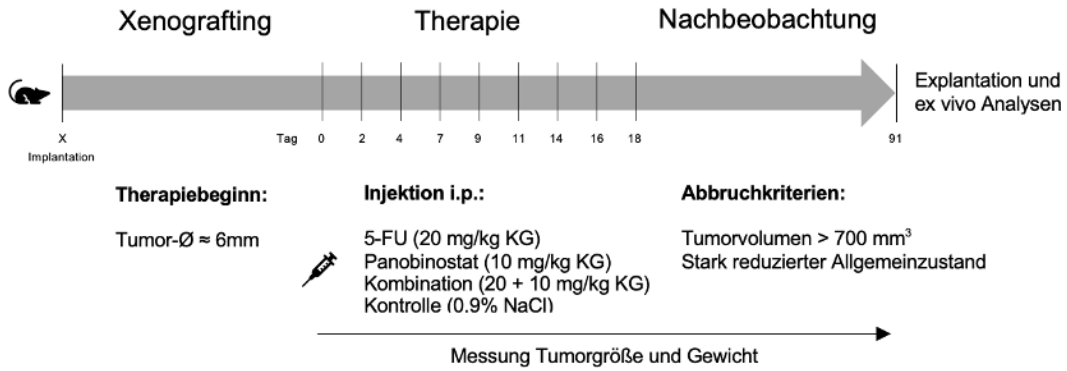


Abbildung 6 *Therapieschema*

Bei Auftreten von milden bis moderaten unerwünschten Wirkungen (Gewichtsverlust, Diarrhoe) wurde den Tieren eingeweichtes Futter zur Verfügung gestellt. Falls sich der Allgemeinzustand weiterhin therapiebedingt verschlechtert haben sollte, wurde die Therapie pausiert oder entsprechend der Abbruchkriterien beendet. Dies geschah ebenso, wenn der Tumor ein errechnetes Volumen von über 700 mm^3 erreichte. Durch die häufig annähernd kugelige Form der Tumore wurde das ungefähre Tumorvolumen V_T, in Anlehnung an die Volumenbestimmung einer Kugel $V = {}^4/_3 \times \pi \times ({}^D/_2)^3$ anhand der Formel $V_T = 0{,}52 \times D^3$ berechnet, wobei D der Tumordurchmesser ist. Die Tötung erfolgte durch CO_2-Begasung und zervikale Dislokation. Es folgten Tumorexplantation und Ex-vivo-Analysen.

5.2.3 Explantation

Für die Explantation erfolgte zunächst eine Inzision an der Tumorbasis. Der Wundrand wurde mittels chirurgischer Pinzette offen gehalten und eine Irisschere geschlossen zwischen Tumor und Haut eingeführt. Durch wiederholtes Öffnen der Schere konnte der meist solide Tumor vom subkutanen Gewebe getrennt werden. War der Tumor durch derbe Bindegewebsbrücken mit der Haut oder dem subkutanen Gewebe verwachsen, wurden diese durchtrennt und der Tumor, wie beschrieben, herausgeschält. Die stumpfe Dissektion ermöglichte es, den Tumor intakt zu entnehmen, sofern dessen Beschaffenheit dies zuließ. Nach Entnahme wurde der Tumor auf eine zuvor beschriftete, sterile Petrischale gelegt, gewogen und fotografiert. Im Anschluss wurde der Tumor mit einem Skalpell, abhängig von der Ausgangsgröße, halbiert

oder geviertelt, sodass die Schnittstücke sowohl periphere als auch zentrale Anteile des Tumors enthielten. Ein solches Stück wurde mittig in eine Einbettkassette platziert, die daraufhin verschlossen und in ein mit Formaldehydlösung gefülltes Gefäß gegeben wurde. Das restliche Tumorgewebe wurde in etwa 3 × 3 × 3 mm große Stücke geschnitten, mit einer Tumorpinzette in ein entsprechend beschriftetes Kryoröhrchen und zuletzt in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewartransportgefäß gegeben. Die Lagerung der Tumorstücke erfolgte in einem Tiefkühlschrank bei -80 °C.

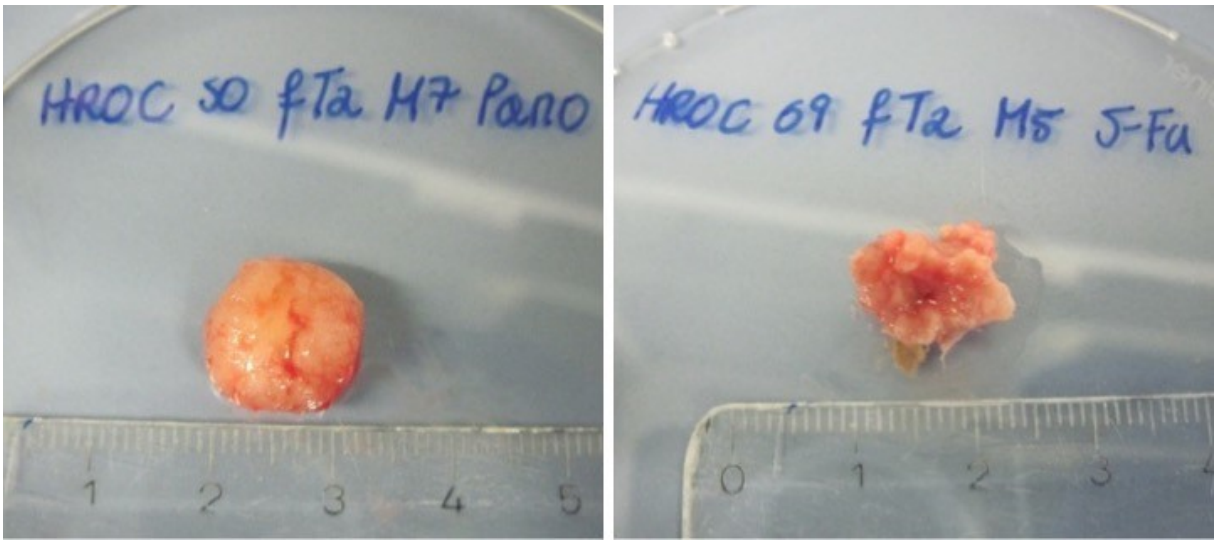


Abbildung 7 *Beispielhafte Fotografien explantierter Tumore, links: solider Tumor mit rundlicher Form, rechts: Tumor mit soliden und diffusen Anteilen*

5.2.4 RNA- und DNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden das Gesamt-RNA-Kit von Peqlab® in Kombination mit dem Precellys®-Lyse-Kit verwendet. Das Vorgehen richtete sich nach einem leicht modifizierten Herstellerprotokoll. Es wurde stets unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet. Der erste Schritt beinhaltete die Homogenisierung und Lyse des Tumorgewebes. Die im Tiefkühlschrank gelagerten Kryoröhrchen mit den darin enthaltenen Tumorstücken wurden in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewargefäß überführt. Anschließend wurden jeweils etwa 20 mg Tumorgewebe mit einer sterilen Pinzette in die zuvor beschrifteten Lysegefäße gegeben. Zu große Tumorstückchen wurden auf eine sterile Kompresse gelegt, mit einer weiteren überdeckt und mit einem Hammer vorsichtig zertrümmert. Zwecks der Vermeidung einer Kreuzkontamination wurden Pinzette und Hammer vor jedem Kontakt mit neuem Tumorgewebe mit Ethanol desinfiziert, außerdem wurde für jedes Tumorstück eigene sterile Kompressen verwendet. Nicht verwendetes Tumorgewebe wurde sofort zurück überführt und in den flüssigen Stickstoff gegeben. In die Lysegfäße wurden 100 µl des RNA-Lysis-Buffer T pipettiert. Die Lysegefäße wurden in die Probenhalter gestellt und im Homogenisator für 2 × 20 s bei 6500 rpm mit einer Pause von 10 s homogenisiert. Nach Abschütteln des oberflächlichen Schaums wurden nochmals 350 µl des RNA-Lysis-Buffer T zugegeben und danach sorgfältig 5 s lang mit einem Vortexmischer vermengt. Hiernach inkubierten die Proben für 60 min unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden Etiketten vorbereitet, mit denen die nachfolgenden Gefäße (Collection Tubes, RNA und DNA Columns) beklebt wurden. Nach der Inkubation wurden die Lysegefäße kurz anzentrifugiert. Ausgenommen der Elution, erfolgten die nachfolgenden Zentrifugationsschritte bei 10.000 × g. Die DNA Removing Columns wurden in die Collection Tubes (2 ml) gesteckt und das Puffer-Gewebe-Gemisch auf die Säule pipettiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 2 min zentrifugiert. Die etikettierten DNA Removing Columns wurden entfernt und bei -20 °C eingefroren. Im nächsten Schritt erfolgten das Laden und Binden. Hierbei wurden zunächst 400 µl Ethanol (70 %, unvergällt) zum Filtrat gegeben und der Ansatz durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vermischt. Die PerfectBind RNA Columns wurden in die Collection Tubes gesteckt und jeweils 750 µl des Ansatzes auf die Säule geladen. Es wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Falls der Inhalt eines Ansatzes über

750 µl betrug, wurde die Säule mehrmals beladen und zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde auch wiederholt, wenn die Probe nicht vollständig über die Säule gedrückt worden war. Der Säulendurchfluss wurde vor dem nächsten Arbeitsschritt verworfen. Nun erfolgte das erste Waschen. Dazu wurden 500 µl RNA Wash Buffer I auf die Säulen gegeben, danach wurden die Säulen samt Collection Tubes für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen, und es folgte der DNase-Verdau. Hierfür wurde eine DNase-Lösung angesetzt, bestehend aus zuvor aufgetauter DNase (0,1 µl pro Säule) und DNAse-Puffer, 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Auf jede Säule wurden 50 µl der DNase-Lösung pipettiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl des RNA Wash Buffer I zugegeben und erneut für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 5 min lang zentrifugiert und die Collection Tubes wieder geleert. Es folgte das zweite Waschen. Dabei wurden 650 µl des RNA Wash Buffer II auf die Säulen gegeben und diese für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Säulendurchflusses erfolgte das Trocknen durch Zentrifugieren der Collection Tubes mit den eingesteckten Säulen für 2 min. Für den letzten Schritt, der Elution, wurden die Säulen in sterile Reaktionsgefäße von 1,5 ml überführt und jeweils 40,5 µl RNase-freies Wasser, das zuvor auf 70 °C erhitzt worden war, auf die Säulenmatrix pipettiert. Nachdem sie 3 min lang inkubiert haben, wurden die eingesteckten Säulen für 1 min bei 6.000 × g zentrifugiert. Zuletzt wurden nochmals 40,5 µl des Wassers dazugegeben und wieder 1 min bei 6.000 × g zentrifugiert. Die Säulen wurden verworfen und die etikettierten Reaktionsgefäße mit der isolierten RNA bei -80 °C eingefroren.

5.2.5 Genexpressionsanalyse

In Vorbereitung auf die Bestimmung der Expressionslevel mittels qPCR erfolgten zunächst die quantitative Analyse der RNA-Proben mit nachfolgender cDNA-Synthese. Dafür wurde die RNA-Konzentration mit einem NanoDrop® Spektrophotometer bestimmt und die Proben anschließend in cDNA-Aliquotes auf 200 ng/µl verdünnt.

5.2.6 cDNA-Synthese

Die Durchführung der cDNA-Synthese richtete sich nach dem Reverase™-Protokoll des Herstellers Bioron. Im ersten Schritt wurde aus jeder Probe jeweils 1 µg RNA in eine 96-Wellplatte pipettiert. Die verwendeten Kavitäten wurden um je 1 µl Oligo-dT 15 Primer ergänzt und mit nukleasefreiem Wasser auf insgesamt 8 µl aufgefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer PCR-Folie luftdicht verschlossen, und es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 70 °C. Nachfolgend wurde die Platte für 10 min auf Eis gekühlt und parallel dazu ein Mastermix, bestehend aus 4 µl 5 × RT buffer complete, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl Reverase™ (200 Einheiten) und 6 µl nukleasefreiem Wasser, vorbereitet. Nach Hinzugeben von jeweils 12 µl des Mastermixes zu jeder Probe wurde die Platte anzentrifugiert und erneut mittels Folie versiegelt. Im Anschluss daran wurden die Mikrotierplatte in den Thermal Cycler gegeben und das cDNA-Synthese Programm gestartet. Dabei erfolgte eine Inkubation für 120 min bei 45 °C und danach für 10 min bei 70 °C. Nach einem kurzen Abkühlen auf Eis wurde in jede Kavität 60 µl nukleasefreies Wasser gegeben, womit die cDNA-Proben im Verhältnis von 1:4 verdünnt wurden.

5.2.7 qPCR mit TaqMan-Sonden

Die Transkription der Gene CXCR4, DPYD, DSE, FGF9, IGFBP7 und NRP1 wurde mittels qPCR analysiert. Als Housekeeping-Gen wurde die humane GAPDH gewählt. Es wurde der TaqMan Master Mix des Herstellers Bioron verwendet. Die Durchführung richtete sich nach dem Herstellerprotokoll. Als Reporterfluoreszenzfarbstoffe wurden FAM und VIC eingesetzt.
Zuerst wurde der Sondenmix vorbereitet. Dazu wurden jeweils 10 µl des Forward und Revers Primers, 2 µl der jeweiligen Sondenlösung sowie 78 µl nukleasefreies Wasser in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurde ein Mastermix angesetzt. Dieser setzte sich aus den in Tabelle 4 aufgeführten Komponenten zusammen. Nun wurden in jede Kavität der 96-Wellplatten 10,5 µl des Mastermixes pipettiert und jeweils 2 µl der cDNA-Proben hinzugefügt. Zudem wurden NTC-Proben (No Template Control) erstellt, indem anstelle

einer cDNA-Probe 2 µl nukleasefreies Wasser zum Mastermix gegeben wurden. Für jede Probe wurden Duplikate verwendet.

Tabelle 4 *Mastermix qPCR*

Komponente	Volumen [µl]
TaqMan Master Mix	6,25
Sondenmix	0,625
ROX-Lösung (1:10 verdünnt)	0,15
nukleasefreies Wasser	3,475

Anschließend wurden die Mikrotierplatten mit einer optisch klaren Folie luftdicht versiegelt, anzentrifugiert und in das ViiA™ 7 Real-Time PCR System gegeben. Für die Analyse wurde das in Abbildung 9 dargestellte Zyklusprogramm verwendet.

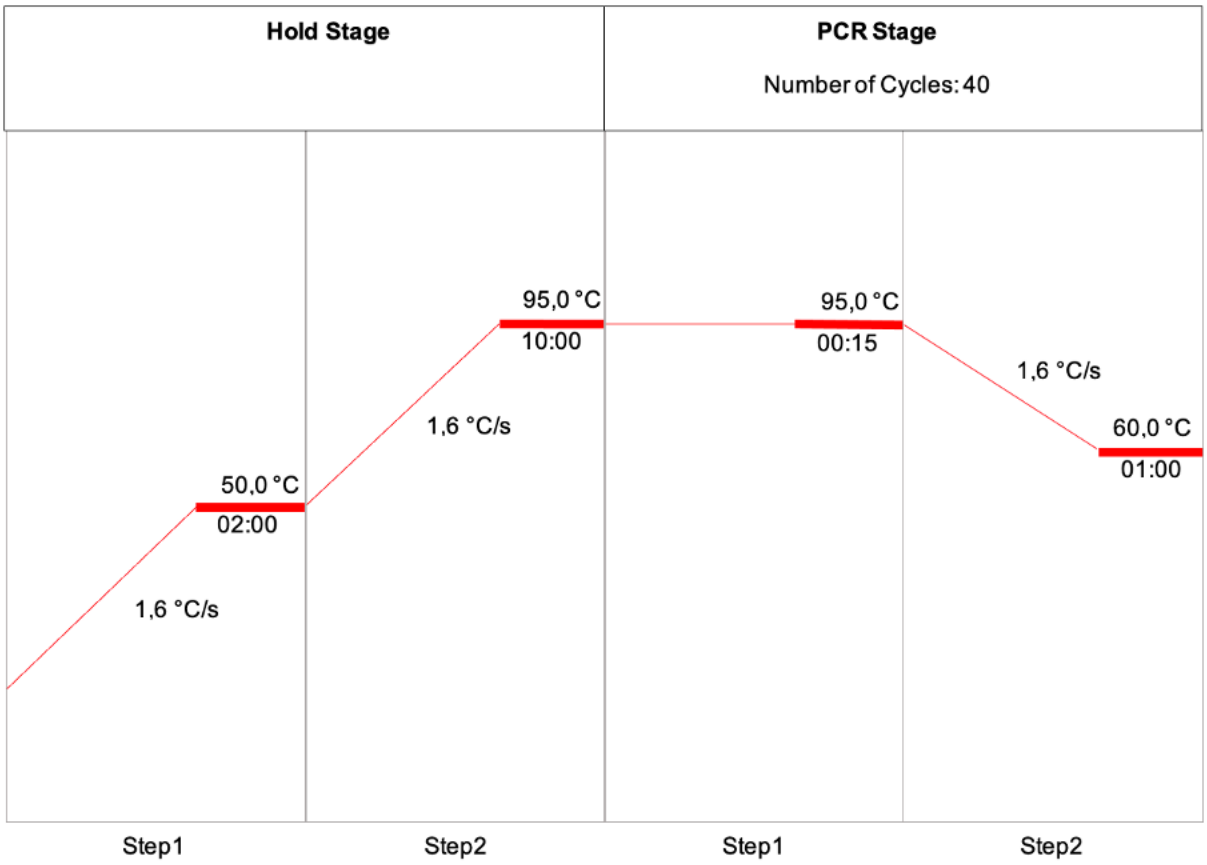


Abbildung 8 *Zyklusdiagramm der qPCR. In der Haltephase (Hold Stage) erfolgten eine Inkubation (50 °C, 2 min) und die erste Denaturierung (95 °C, 10 min). Die Amplifikation fand in der PCR-Phase statt, bei der die Schritte Denaturierung (95 °C, 15 s) und Hybridisierung (60 °C, 1 min) für 40 Zyklen abwechselnd wiederholt wurden.*

5.2.8 Histopathologische Untersuchung

Die Anfertigung der Gewebeschnitte nach Standardverfahren (4–5 µm Dicke) und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit nachfolgender histopathologischer Beurteilung am Lichtmikroskop erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. med. Friedrich Prall am Institut für Pathologie der Universität Rostock.

6 Ergebnisse

Die sukzessive Erzeugung der PDX-Modelle konnte zunächst planmäßig durchgeführt werden. Nach Anlaufen der Therapiephase wurden bei einigen Avatarmäusen der 5-FU- und der Kombinationsgruppe starke unerwünschte Wirkungen und toxische Todesfälle dokumentiert. Die initial gewählte 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG orientierte sich an den bisherigen Erfahrungen der Arbeitsgruppe. Um eine bessere Verträglichkeit zu erreichen, erfolgte für beide Therapiearme eine Dosisanpassung auf 20 mg/kg KG. Die Dosisreduktion bewirkte zwar eine Abnahme, jedoch kein gänzliches Ausbleiben von toxischen Nebenwirkungen und Todesfällen. Zudem kam es im Panobinostat-Monotherapiearm wiederholt zu unerwünschten Nebenwirkungen, die sich insbesondere durch ein verändertes Verhalten und gastrointestinale Störungen (Diarrhoe) der behandelten Tiere zeigten. Bei gleichzeitig marginalem Therapieansprechen sowohl im Kombinationstherapiearm als auch in den beiden Monotherapiegruppen wurde eine detaillierte Zwischenauswertung vorgenommen, um über das Fortführen der geplanten Studie zu entscheiden. Bis dahin war die Implantation von 39 Tumoren (37 Patienten) aus der HROC-Sammlung (Tabelle 5) in insgesamt 159 NSG-Mäuse erfolgt (siehe Anhang, Flussdiagramm). Mit einer Engraftmentrate (tumor take rate) von 82,4 % konnten 130 Avatartiere (35 HROC-Tumore) dem Therapieteil zugeführt werden. Vor der Dosisreduktion sind die entsprechenden Avatare von HROC54, HROC62 und HROC80 ausnahmslos mit der höheren 5-FU-Dosis behandelt worden. Diejenigen von HROC92, HROC285 und HROC324 befanden sich zum Zeitpunkt der Umstellung bereits in der Therapiephase, sodass die Behandlung in diesen Fällen an den Tagen 0, 2 und 4 mit der höheren und ab Tag 7 (bei HROC285 ab Tag 11) mit der angepassten 5-FU-Dosis erfolgte. Die nachfolgenden Tiere der 29 weiteren HROC-Fälle wurden ausschließlich mit der reduzierten 5-FU-Dosis von 20 mg/kg KG therapiert.

Tabelle 5 *Übersicht implantierter HROC-Tumore*

HROC ID	Subtyp	HROC ID	Subtyp	HROC ID	Subtyp
24 fT3	MSI-H	62 fT2	CIN	112Met1 fT3	CIMP-H
29 fT4	LS	69 fT2	CIN	113 fT2	LS
32 fT3	CIN	70 fT1	CIN	150 fT2	CIN
39 fT2	CIN	71 fT2	LS	161 fT3	CIMP-H
40 fT2	CIMP-H	72Met1 fT2	CIN	170 fT3	MSI-H
46 fT2	CIN	80 fT3	CIN	183 fT2	CIMP-H
48 fT2	MSI-H	82 fT1	CIN	222 fT2	CIN
48Met1 fT2	MSI-H	86 fT2	CIN	239 fT2	CIN
50 fT2	MSI-H	92 fT2	CIMP-H	245 fT2	n. d.
53 fT3	MSI-H	100 fT1	CIN	250 fT3	CIN
54 fT2	CIMP-H	103 fT2	CIN	260 fT2	CIN
59 fT2	CIN	103Met1 fT2	CIN	285 fT1	LS
60 fT2	CIMP-H	107 fT2	CIN	324 fT2	LS

Met: Metastase, fTx: Transfergeneration, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, LS: Lynch Syndrom, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, n. d.: nicht determiniert

Weil die Analyse der Wachstumskurven eine überwiegend schwache bis fehlende Wirkung der Therapeutika im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte, wurde in Kooperation mit Friedrich Prall (Pathologisches Institut der Universität Rostock) eine histopathologische Begutachtung von 30 explantierten Tumoren aus den Monotherapiegruppen und dem Kombinationstherapiearm initiiert (Tabelle 6). Die ausgewählten Tumore umfassten 19 unterschiedliche HROC-Fälle, unter denen die vier definierten molekularen Subtypen vertreten waren. In keinem der begutachteten Tumorpräparate ließen sich Anhaltspunkte für ein Therapieansprechen feststellen. Dies galt bemerkenswerterweise auch für die Tumore von Avatarmäusen, die anfänglich oder ganzheitlich die höhere 5-FU-Dosis erhalten hatten.

Tabelle 6 *Auflistung histopathologisch untersuchter Tumore*

HROC Avatar	Therapie	HROC Avatar	Therapie	HROC Avatar	Therapie
24 fT3 M10	5-FU	48 fT2 M5	5-FU	103Met1 fT2 M4	P
24 fT3 M9	P	50 fT2 M8	K	103Met1 fT2 M5	K
29 fT4 M7	5-FU	62* fT2 M4	5-FU	113 fT2 M4	5-FU
39 fT2 M1	5-FU	62 fT2 M5	P	222 fT2 M1	P
40 fT2 M2	K	62* fT2 M6	K	222 fT2 M3	K
40 fT2 M3	P	69 fT2 M3	P	239 fT2 M1	K
46 fT2 M6	5-FU	71 fT2 M5	5-FU	250 fT3 M3	5-FU
46 fT2 M7	P	71 fT2 M7	P	285 fT1 M1	K
48 fT2 M6	P	80* fT3 M19	5-FU	324** fT2 M2	5-FU
48 fT2 M7	K	92** fT2 M2	5-FU	324** fT2 M3	K

Met: Metastase, fTx: Transfergeneration, Mx: Nummerierung der Maus, P: Panobinostat, K: Kombination, ganzheitliche (*) oder nur anfängliche (**) Behandlung mit 30 mg/kg KG 5-FU

Die Aspekte des fehlenden Therapieansprechens veranlassten in Zusammenschau mit den beobachteten Unverträglichkeiten zum Abbruch der Studie. Anschließende Überlegungen, die sich aus der Frage ableiteten, ob alternative Therapieschemata und Applikationsformen eine Zunahme des therapeutischen Effekts, bei gleichzeitig guter Verträglichkeit in diesem Setting bewirken, führten schließlich zur Umsetzung einer 5-FU-Dosis-Vergleichsstudie [74].
Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf jene Daten, die bis zur vorzeitigen Beendigung der Studie erhoben wurden. Weil nur ein Teil des im Vorfeld berechneten Umfangs realisiert wurde, konnte die statistische Auswertung nicht wie geplant erfolgen. Mit dem Vorhaben, eine PCT umzusetzen, richtete sich das Studiendesign nach dem Vorbild klinischer Studien. Aus Gründen der besseren Nachvollziehbarkeit wird die initial vorgesehene biometrische Planung im nächsten Abschnitt beschrieben.

6.1 Initiale biometrische Planung

In Anlehnung an vorausgegangene Arbeiten [78, 79] wurde mit einem Tier pro Therapiearm die absolute Mindestzahl (n = 1) verwendet. Bei diesem Ansatz, bei dem jede Avatarmaus einen Patientenfall repräsentiert, orientierte sich die geplante Größe der Studienarme an klinischen Studien. Zur Bestimmung der benötigten Gruppengröße wurden die Berechnungen von Sakpal [119] herangezogen:

$$n = [(Z_{\alpha/2}+Z_{\beta})^2 \times \{(p1\ (1-p1)+(p2\ (1-p2))\}] / (p1-p2)^2$$

wobei
n = benötigte Gruppengröße pro Therapiearm,
p1 = Anteil der erfolgreich behandelten Fälle pro Substanz = 0,2,
p2 = Anteil der erfolgreich behandelten Fälle in der Kontrolle, entspricht also der Nichtanwachsrate der PDX-Modelle und ist erfahrungsgemäß mit 10 % festzulegen = 0,1,
p1-p2 = klinisch signifikante Differenz = 0,1,
$Z_{\alpha/2}$: abhängig vom Signifikanzniveau, für 5 % also 1,96,
Z_{β}: abhängig von der Power, für 80 % also 0,84.

Auf dieser Grundlage ergibt sich eine erforderliche Gruppengröße von mindestens 196 PDX pro Behandlungsarm. Entsprechend des Umfangs der HROC-Kollektion sah die Planung zunächst 125 Tiere vor. Im Zuge der Studienvorbereitung wurde die Re-Engraftmentrate ab der ersten Transfergeneration und nach transienter Kryokonservierung bestimmt. Sie betrug im verwendeten NSG-Stamm 80,2 %. Folglich ergibt sich ein Mehrbedarf von 20 %, sodass für die Implantation 236 Tiere pro Behandlungsarm eingeplant wurden.

Für den Vergleich der Wirksamkeit von 5-FU auf die verschiedenen molekularen Subtypen sollte der ANOVA-Test verwendet werden. Mögliche Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den Therapiearmen sollten mit dem t-Test untersucht werden. Dabei wurde im Vorfeld ein Signifikanzniveau von jeweils 5 % ($p < 0,05$) festgesetzt.

6.2 Auswertung des PDX-Erfolgs

Von den in Tabelle 5 aufgeführten 39 individuellen HROC-Tumoren konnte bei den Avatartieren von HROC59, HROC70, HROC150 und HROC161 (siehe Tabelle 7) nach über sechs Monaten kein palpabler Tumor festgestellt werden. Damit werden in der Auswertung die Avatare der verbleibenden 35 HROC-Tumore berücksichtigt. In acht von 35 HROC-Gruppen zeigten lediglich zwei bis drei Tiere ein positives Engraftment, sodass in diesen Fällen neben dem Kontrollarm dementsprechend ein bis zwei Therapiearme realisiert wurden. Es wurde eine kumulative „tumor take rate“ (TTR) von 82,4 % erzielt.

Tabelle 7 *Engraftment der implantierten HROC-Tumore. Die „tumor take rate“ (TTR) gibt die Anzahl der Tiere an, die nach Implantation einen palpablen Tumor entwickelt haben.*

HROC ID	TTR	HROC ID	TTR	HROC ID	TTR
24 fT3	4/4	62 fT2	4/4	112Met1 fT3	4/4
29 fT4	4/4	69 fT2	3/4	113 fT2	4/4
32 fT3	4/4	70 fT1	0/4	150 fT2	0/4
39 fT2	4/4	71 fT2	4/4	161 fT3	0/4
40 fT2	4/4	72Met1 fT2	4/4	170 fT3	3/4
46 fT2	4/4	80 fT3	3/4	183 fT2	4/4
48 fT2	4/4	82 fT1	4/4	222 fT2	4/4
48Met1 fT2	4/4	86 fT2	4/4	239 fT2	4/4
50 fT2	5/7	92 fT2	4/4	245 fT2	3/4
53 fT3	3/4	100 fT1	3/4	250 fT3	4/4
54 fT2	4/4	103 fT2	2/4	260 fT2	4/4
59 fT2	0/4	103Met1 fT2	4/4	285 fT1	4/4
60 fT2	4/4	107 fT2	2/4	324 fT2	4/4

Met: Metastase, fTx: Transfergeneration

Von den 80 NSG-Mäusen, die einen sporadischen CIN-Tumor (MSS) erhielten, entwickelten 76,3 % (61) einen palpablen Tumor. Dagegen lag die TTR bei Avataren mit MSI-H-Tumor mit 85,2 % über der kumulativen TTR. In der Lynch-Syndrom-Subgruppe zeigten sogar alle 20 Tiere ein positives Engraftment nach Xenotransplantation. Im Gegensatz dazu wurde in den vier Avatargruppen, bei denen keines der Tiere einen palpablen Tumor entwickelt hatte (Tabelle 7), in drei Fällen ein sporadischer CIN-Tumor transplantiert. Mit 24 von 28 (85,7 %) erfolgreich angewachsenen Tumoren entsprach der PDX-Erfolg von CIMP-H-Tumoren ungefähr der MSI-H Gruppe, wobei mit HROC161 in einem Fall keine der NSG-Mäuse einen tastbaren Tumor entwickelt hatte. Von HROC50 wurden Tumorfragmente in drei zusätzliche Tiere transplantiert, um einen PDX-Avatar zu ersetzen, der aufgrund einer Hautläsion über dem Tumor vorzeitig verstorben war. In der Engraftment-Analyse wurden alle sieben Tiere berücksichtigt.
In Tabelle 8 sind Angaben über den Engraftment-Erfolg, molekulare Gruppenzugehörigkeit und den MSI-Status von 155 der 159 (HROC245 exkludiert) transplantierten Tumorfragmente zusammengefasst. Darüber hinaus wurde eine statistische Analyse der Korrelation durchgeführt. Beim Abschnitt MSI-Status findet eine Zuordnung der jeweiligen Tumore zur Kategorie MSS (mikrosatelliten-stabil) oder MSI statt. Definitionsgemäß sind Tumore der Subgruppen MSI-H und Lynch Syndrom mikrosatelliten-instabil und bilden die MSI-Gruppe. Bei den transplantierten CIN- und CIMP-H Tumorfragmenten handelt es sich um MSS-Tumore der HROC-

Sammlung [12, 120]. Es vergingen durchschnittlich 55 ± 35 Tage, bis ein Tumor nach der Transplantation einen Durchmesser von etwa 6 mm erreicht hatte und das Tier damit in die Therapiephase übergehen konnte. Die Engraftmentzeiten (Abb. 11) zwischen den HROC-Tumoren und molekularen Klassen variierten teils stark und werden in Tabelle 9 statistisch analysiert. In Bezug auf das molekulare Profil und den MSI-Status zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede. LS-Tumore hatten mit 29 ± 10 Tagen die durchschnittlich kürzeste Engraftmentzeit. Überdies war der Unterschied zwischen den Engraftmentzeiten von LS und CIN-Tumoren hoch signifikant ($p < 0{,}0001$).

Tabelle 8 Korrelationen zwischen Engraftment-Erfolg und den molekularen Subtypen sowie dem MSI-Status.

	XT	**PDX-Erfolg**		**p-Wert**
n (%)		**ja**	**nein**	
molekularer Subtyp				0,080[a]
CIN	80 (51,6)	61 (76,3)	19 (23,7)	
CIMP-H	28 (18,1)	24 (85,7)	4 (14,3)	
MSI-H	27 (17,4)	23 (85,2)	4 (14,8)	
LS	20 (12,9)	20 (100)	0 (0)	
MSI-Status				0,066[b]
MSS	108 (69,7)	85 (78,7)	23 (21,3)	
MSI	47 (30,3)	43 (91,5)	4 (8,5)	

XT: xenotransplantierte HROC-Tumore, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, LS: Lynch Syndrom, MSS: mikrosatellitenstabil, MSI: mikrosatelliteninstabil, [a] χ^2, [b] exakter Fisher-Test

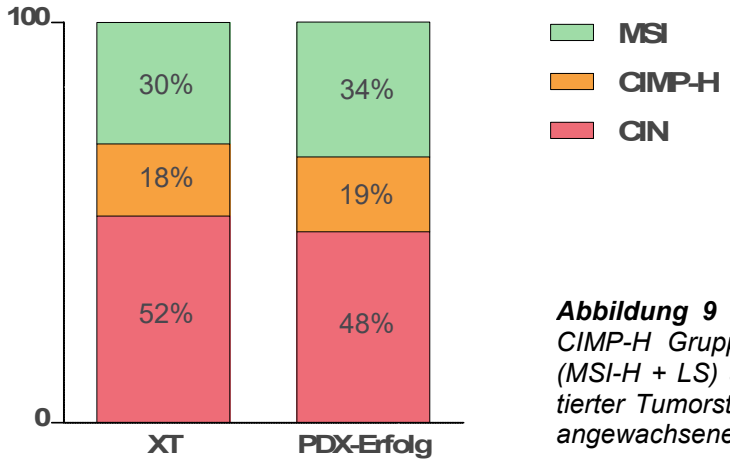


Abbildung 9 *Prozentuale Anteile der CIN- und CIMP-H Gruppe (MSS) sowie der MSI-Gruppe (MSI-H + LS) an der Gesamtzahl xenotransplantierter Tumorstücke (XT, n = 155) und erfolgreich angewachsener PDX-Tumore (n = 128).*

Tabelle 9 Engraftmentzeit (t_E) erfolgreich angewachsener PDX-Tumore (n = 128, HROC245 exkludiert). Sie entspricht der Zeitspanne vom Tag der Xenotransplantation bis zum Tag des Therapiebeginns (nicht eingeschlossen).

t_E [Tage]	M	SD	p-Wert
molekularer Subtyp			0,0007[c] ***
CIN	65	40	
CIMP-H	51	23	[d] ***
MSI-H	54	35	
LS	29	10	
MSI-Status			0,002[e] **
MSS	61	36	
MSI	42	29	
Gesamt	55	35	

M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, LS: Lynch Syndrom, MSS: mikrosatellitenstabil, MSI: mikrosatelliteninstabil, [c] einfaktorielle ANOVA und [d] Bonferronis Multiple Comparison Test, [e] t-Test, * = p < 0,01, ** = p < 0,001, *** = p < 0,0001

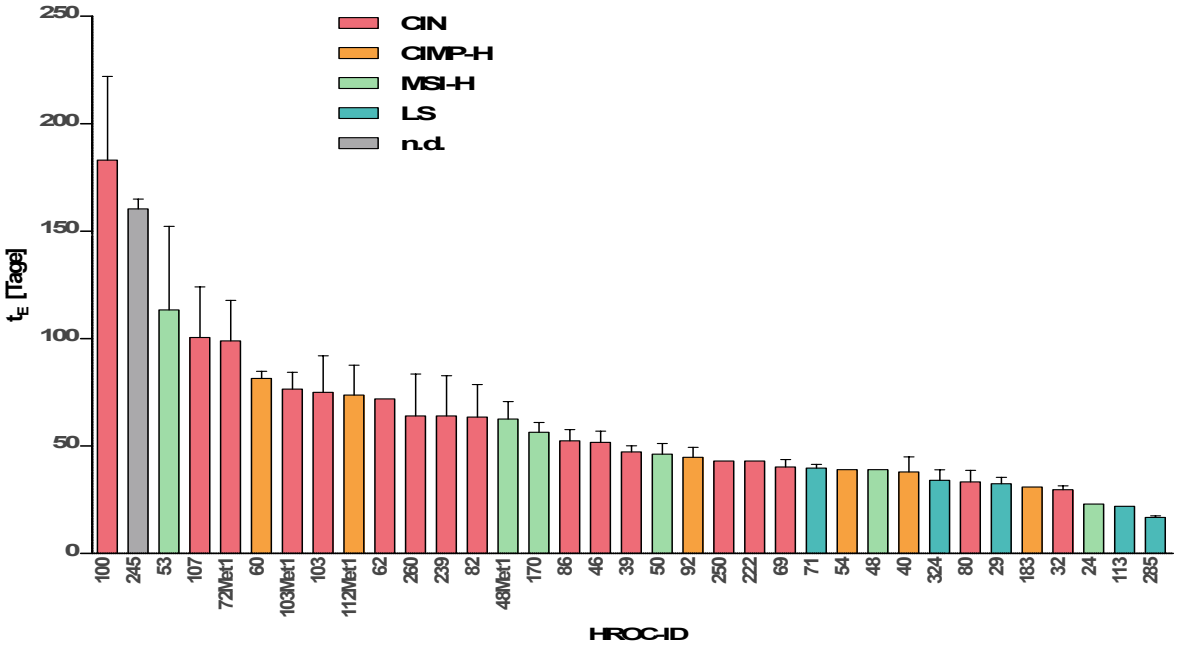


Abbildung 10 *Engraftmentzeit (t_E) der jeweiligen HROC-Tumorgruppe (n = 35). Sie entspricht der Zeitspanne vom Tag der Xenotransplantation bis zum Tag des Therapiebeginns (nicht eingeschlossen). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.*

6.3 Tumorwachstum

Die Tumorvolumina der 35 HROC-Avatargruppen (Tiere n = 130) werden relativ zum jeweiligen Ausgangsvolumen (100 %, horizontale Markierung) zu Beginn der Therapiephase an Tag 0 dargestellt. Die Abszissenachse ist unterteilt in ein Therapiesegment von Tag 0 bis 18 und ein Nachbeobachtungssegment von Tag 21 bis maximal 91. Größtenteils weisen die Therapiearme innerhalb einer HROC-Avatargruppe eine unterschiedliche Menge an Werten auf.

Dies ist der Tatsache geschuldet, dass oft bereits vor Abschluss der Therapie- bzw. Nachbeobachtungsphase eines der definierten Abbruchkriterien erfüllt worden oder der betroffene Avatar vorzeitig verstorben ist. Die Sortierung wurde nach molekularem Subtyp vorgenommen.

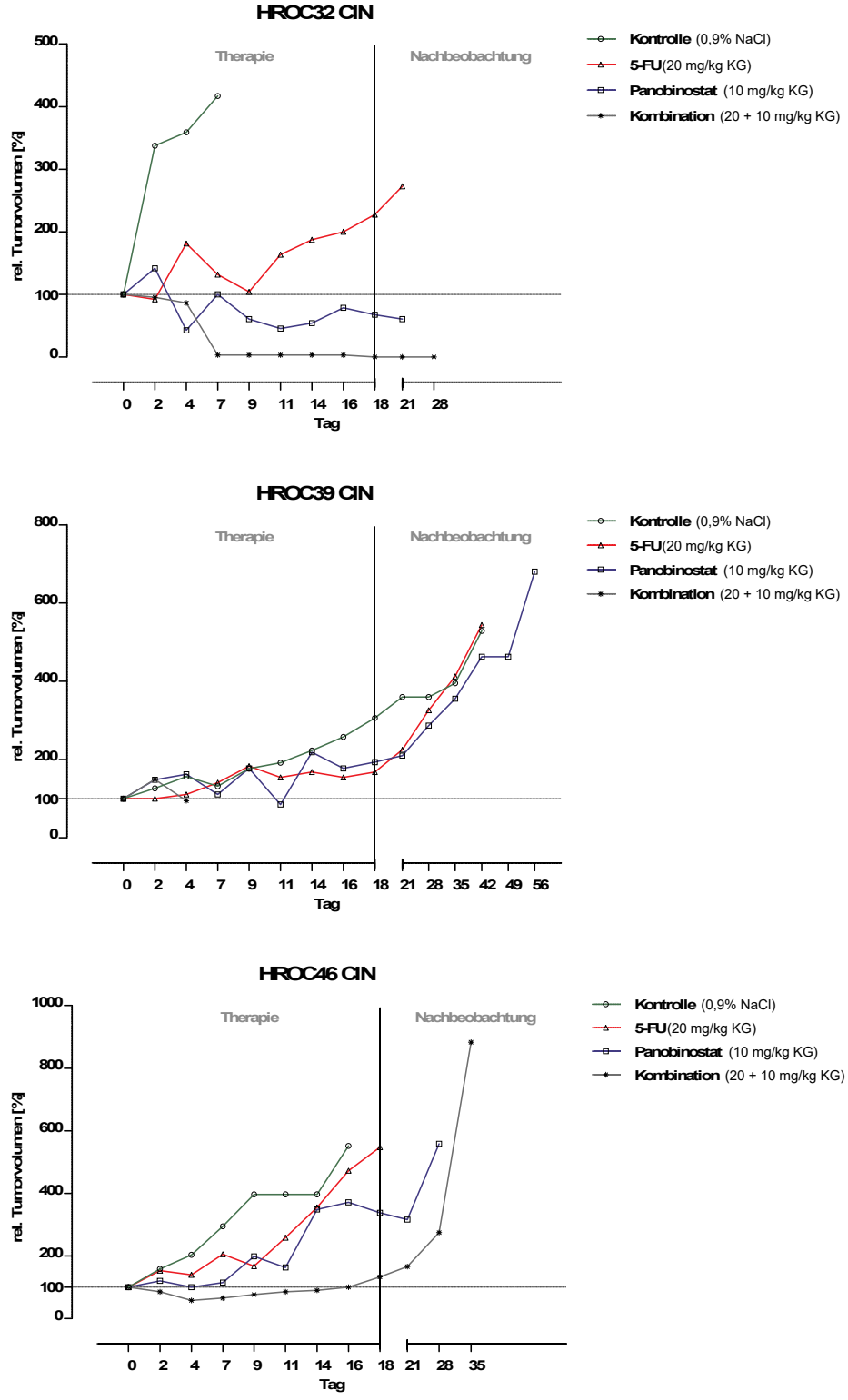


Abbildung 11 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC32, HROC39 und HROC46. Der HROC32-Avatar in Panobinostat-Monotherapie und der HROC39-Avatar im Kombinationstherapiearm verstarben vorzeitig.*

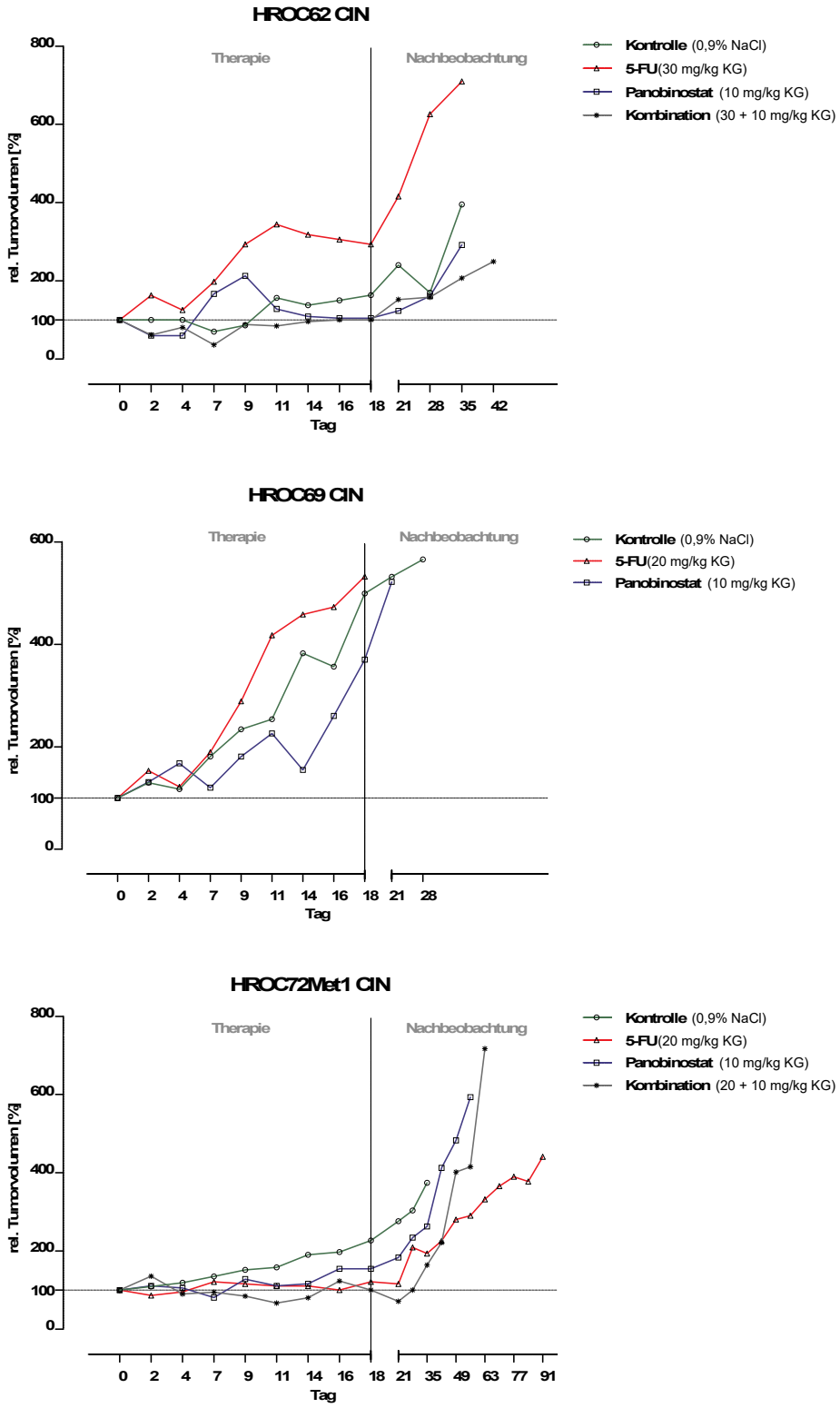


Abbildung 12 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC62, HROC69 und HROC72Met1. Die Behandlung der betreffenden HROC62-Avatare erfolgte mit der höheren 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG. Aufgrund des fehlenden Engraftments einer Maus wurde bei HROC69 kein Kombinationstherapiearm umgesetzt.*

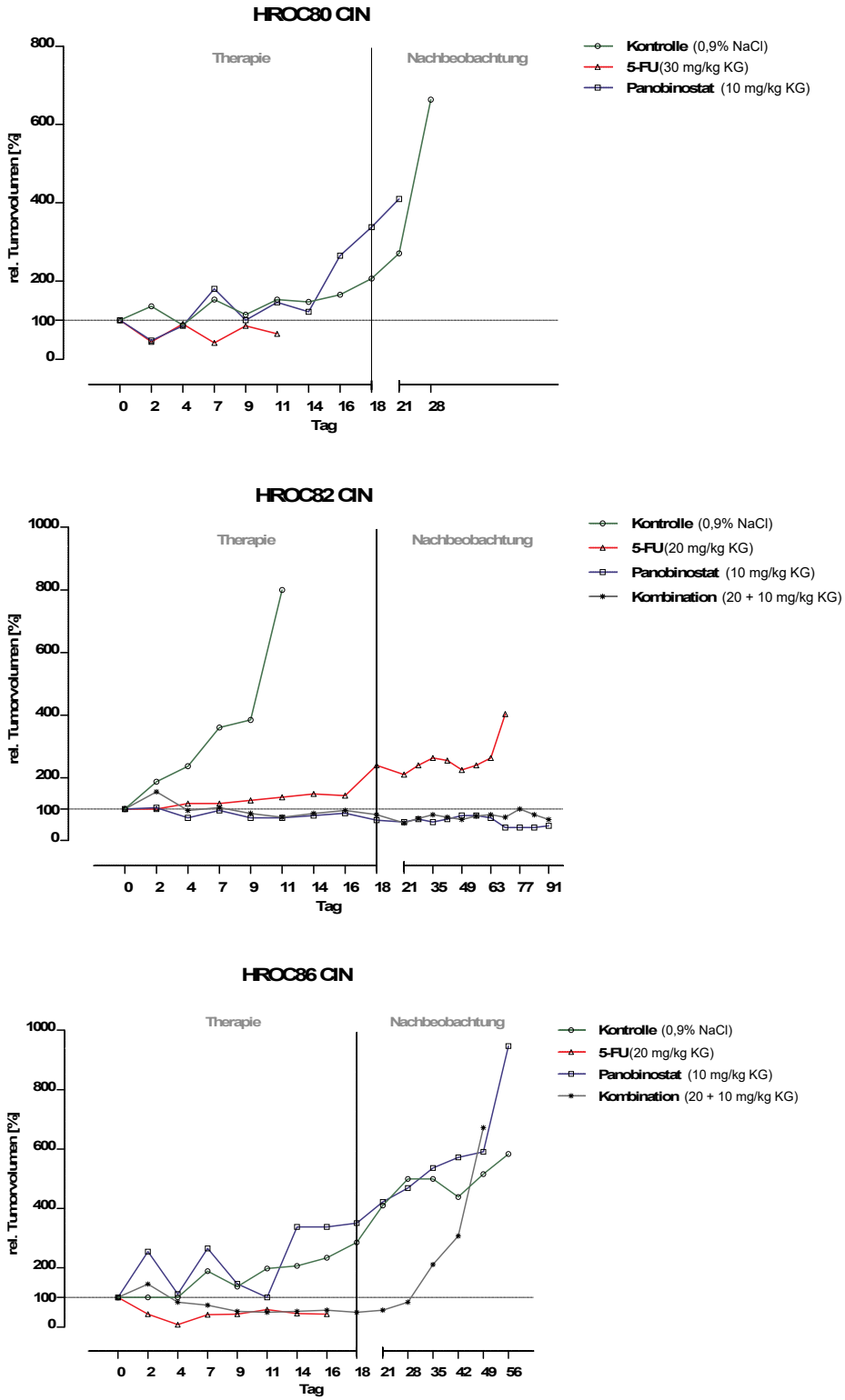


Abbildung 13 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC80, HROC82 und HROC86. Aufgrund des fehlenden Engraftments einer Maus wurde bei HROC80 kein Kombinationstherapiearm umgesetzt. Im 5-FU-Monotherapiearm von HROC80 wurde die höhere Dosis von 30 mg/kg KG verwendet. Der HROC80- und der HROC86-Avatar in 5-FU-Monotherapie verstarben vorzeitig.*

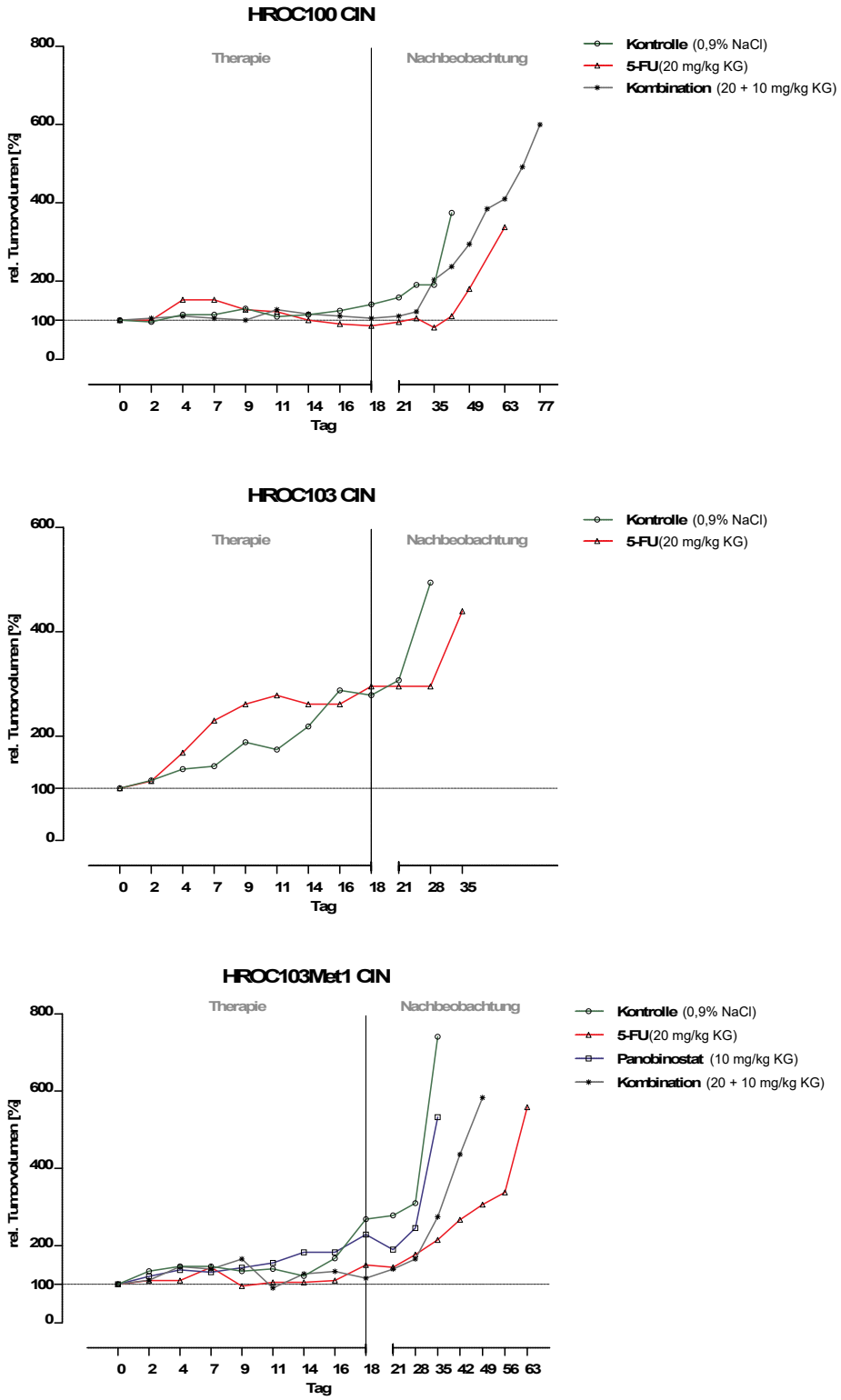


Abbildung 14 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC100, HROC103 und HROC103Met1. Aufgrund fehlender Engraftments wurden bei HROC100 drei und bei HROC103 zwei Therapiearme realisiert.*

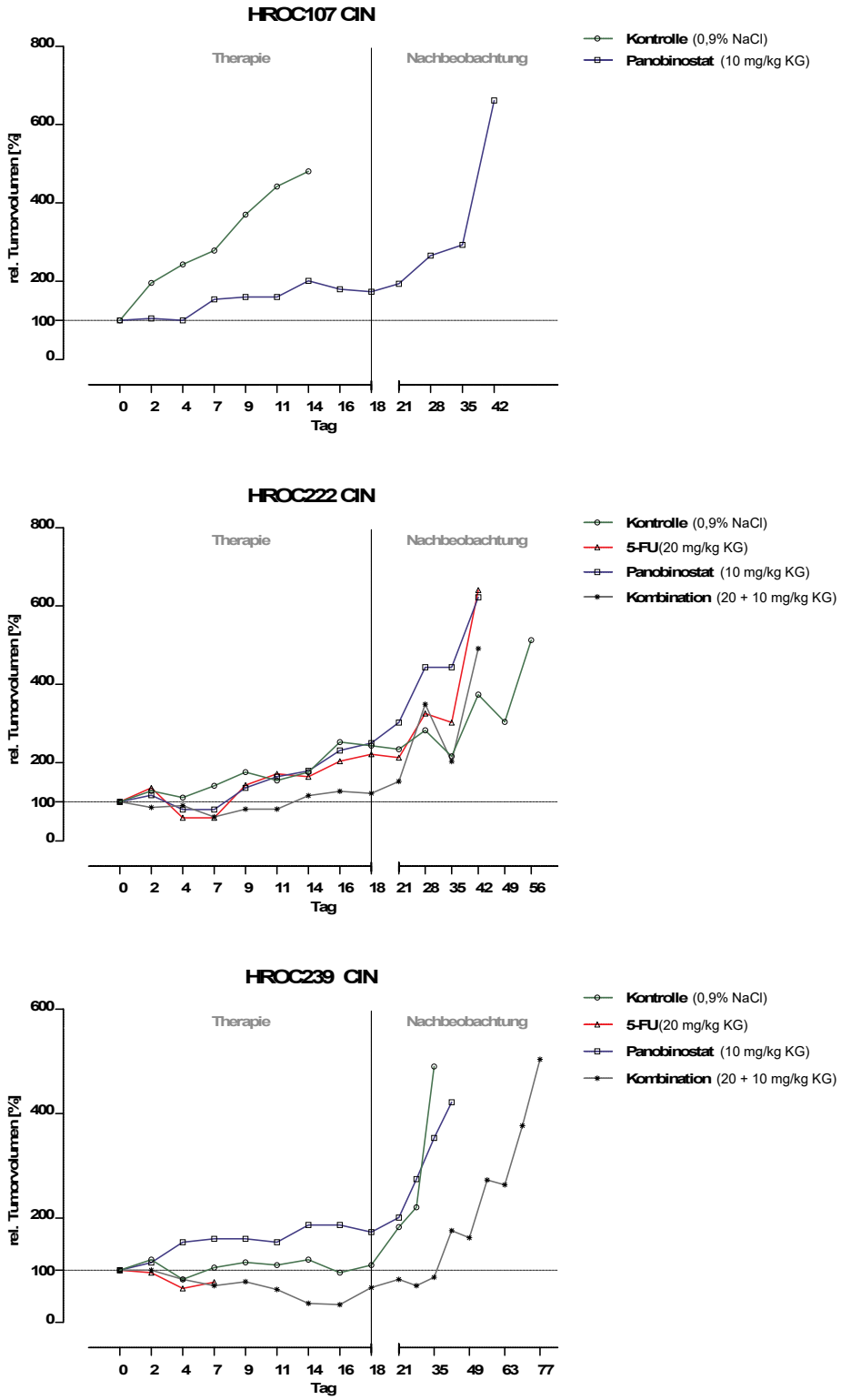


Abbildung 15 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC107, HROC222 und HROC239. Aufgrund fehlender Engraftments wurden bei HROC107 lediglich zwei Therapiearme umgesetzt. Bei HROC239 verstarb ein Avatar während der 5-FU-Monotherapie vorzeitig.*

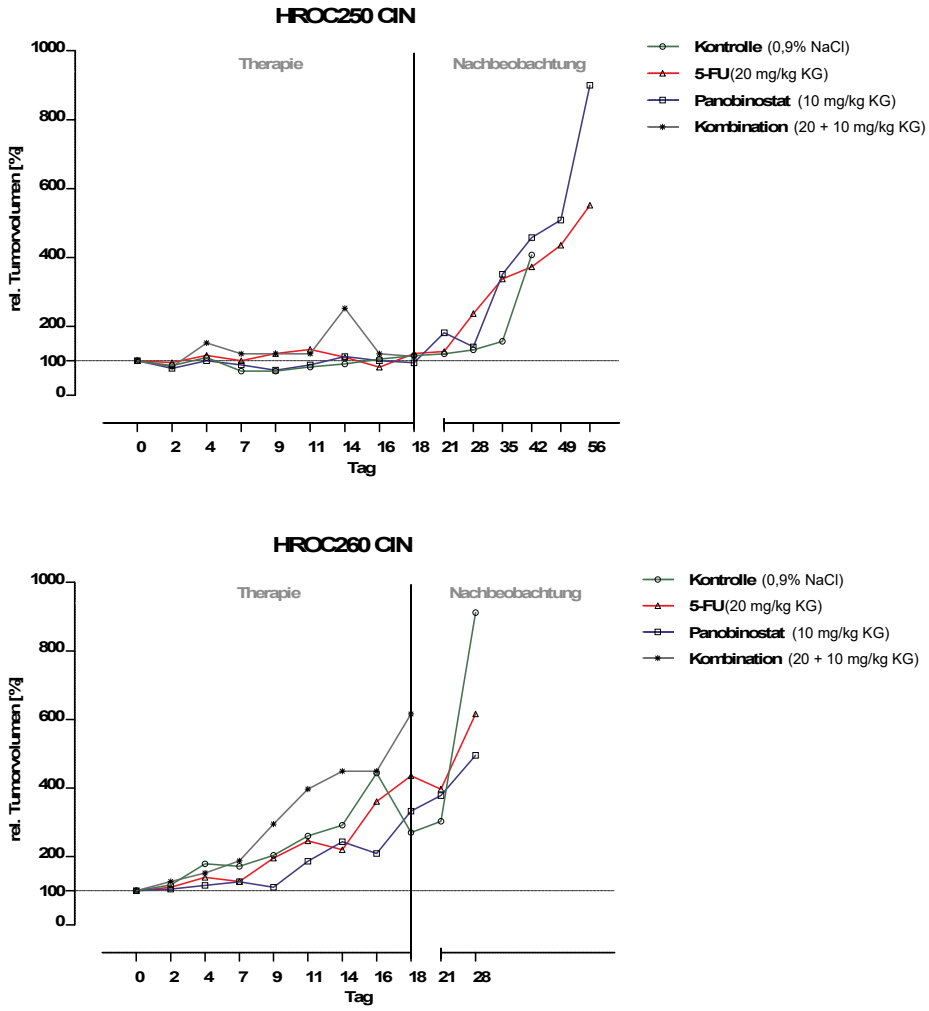


Abbildung 16 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC250 und HROC260. Bei HROC250 verstarb der Avatar in Kombinationstherapie vorzeitig.*

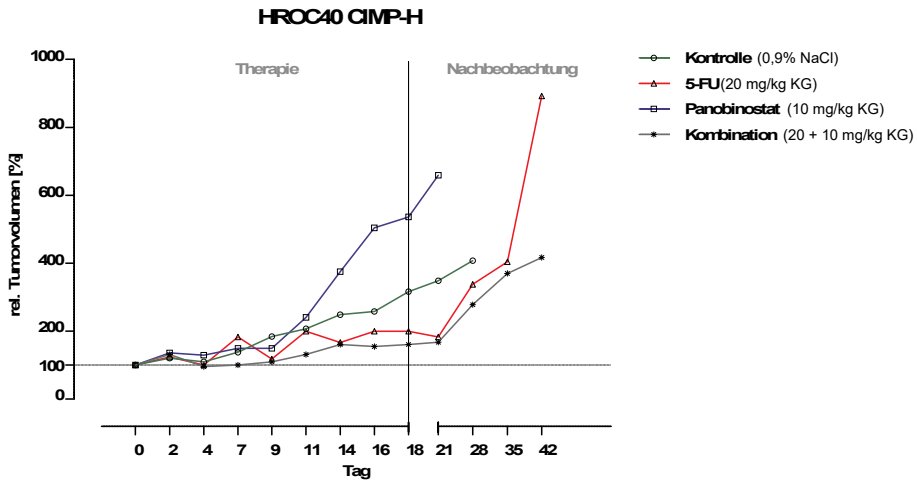


Abbildung 17 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC40.*

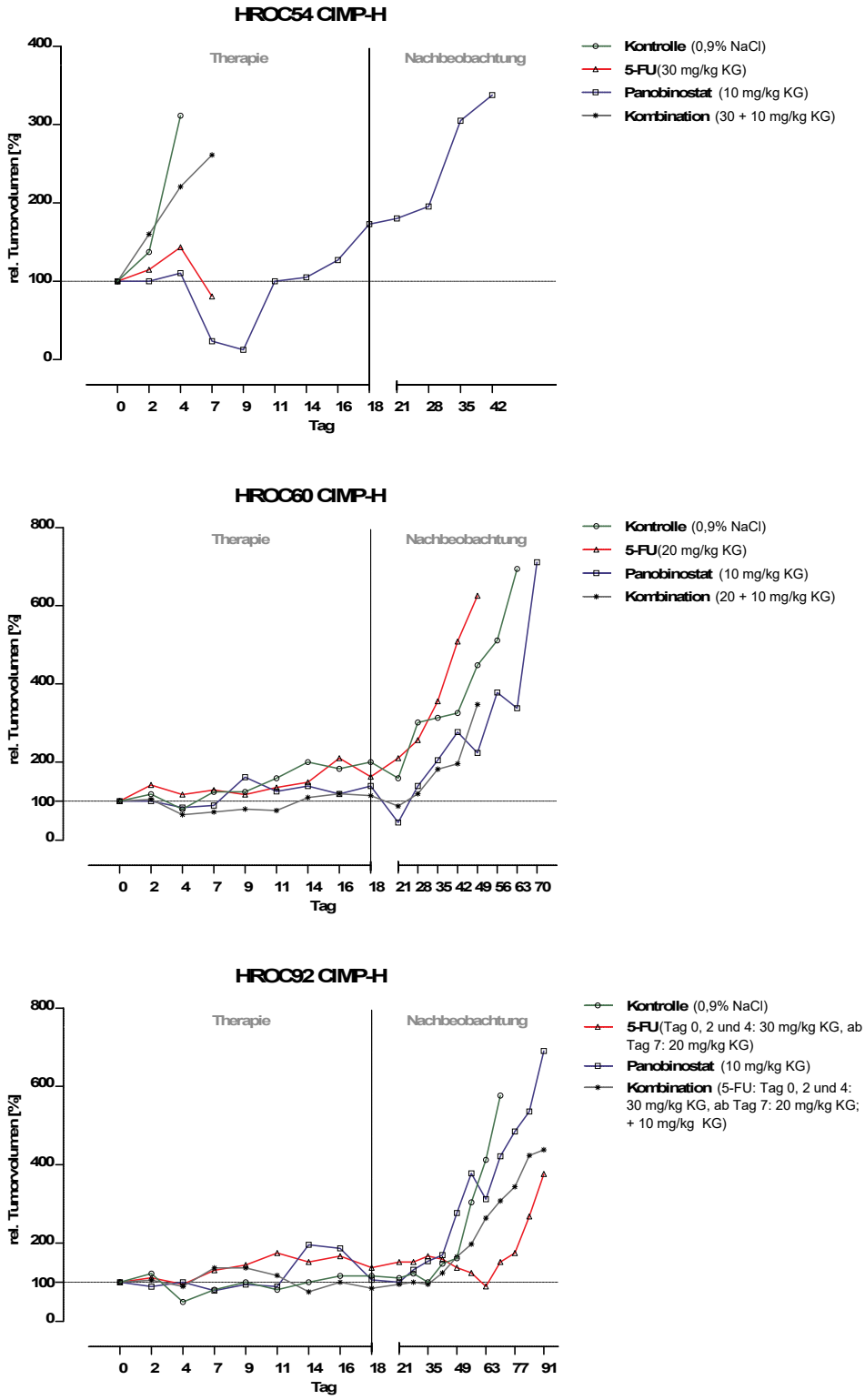


Abbildung 18 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC54, HROC60 und HROC92. Die Avatare aller vier Therapiearme von HROC54 verstarben vorzeitig. Im 5-FU-Monotherapie- und Kombinations-therapie-arm von HROC54 wurde die höhere 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG verwendet und bei HROC92 eine 5-FU-Dosisanpassung von 30 auf 20 mg/kg KG ab Tag 7 vorgenommen.*

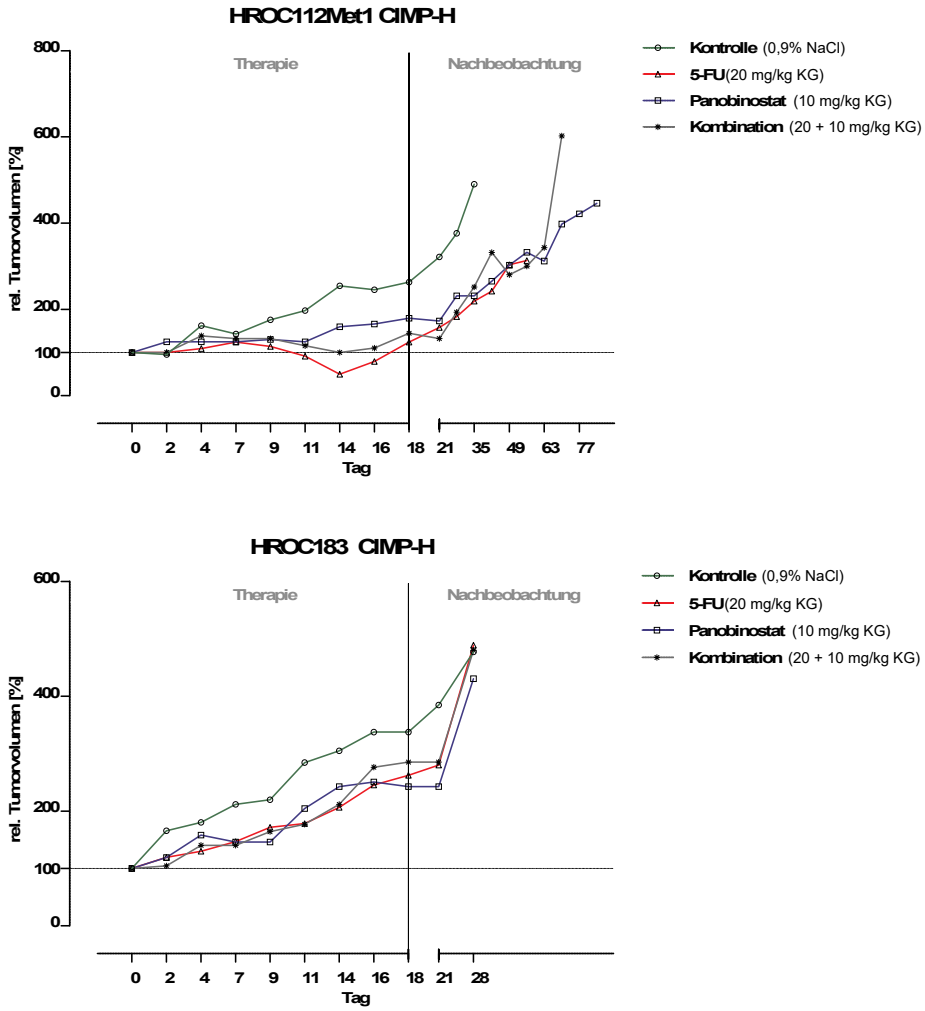


Abbildung 19 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC112Met1 und HROC183.*

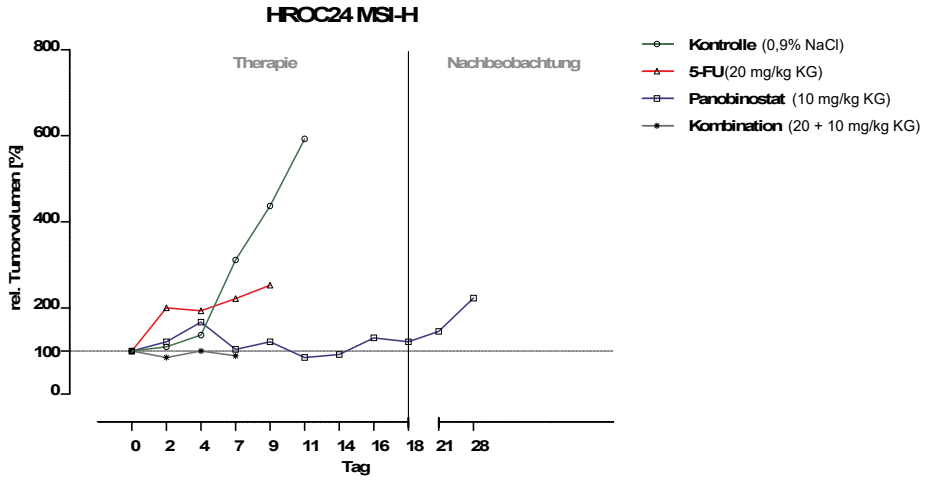


Abbildung 20 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC24. Der Avatar in Kombinationstherapie verstarb vorzeitig.*

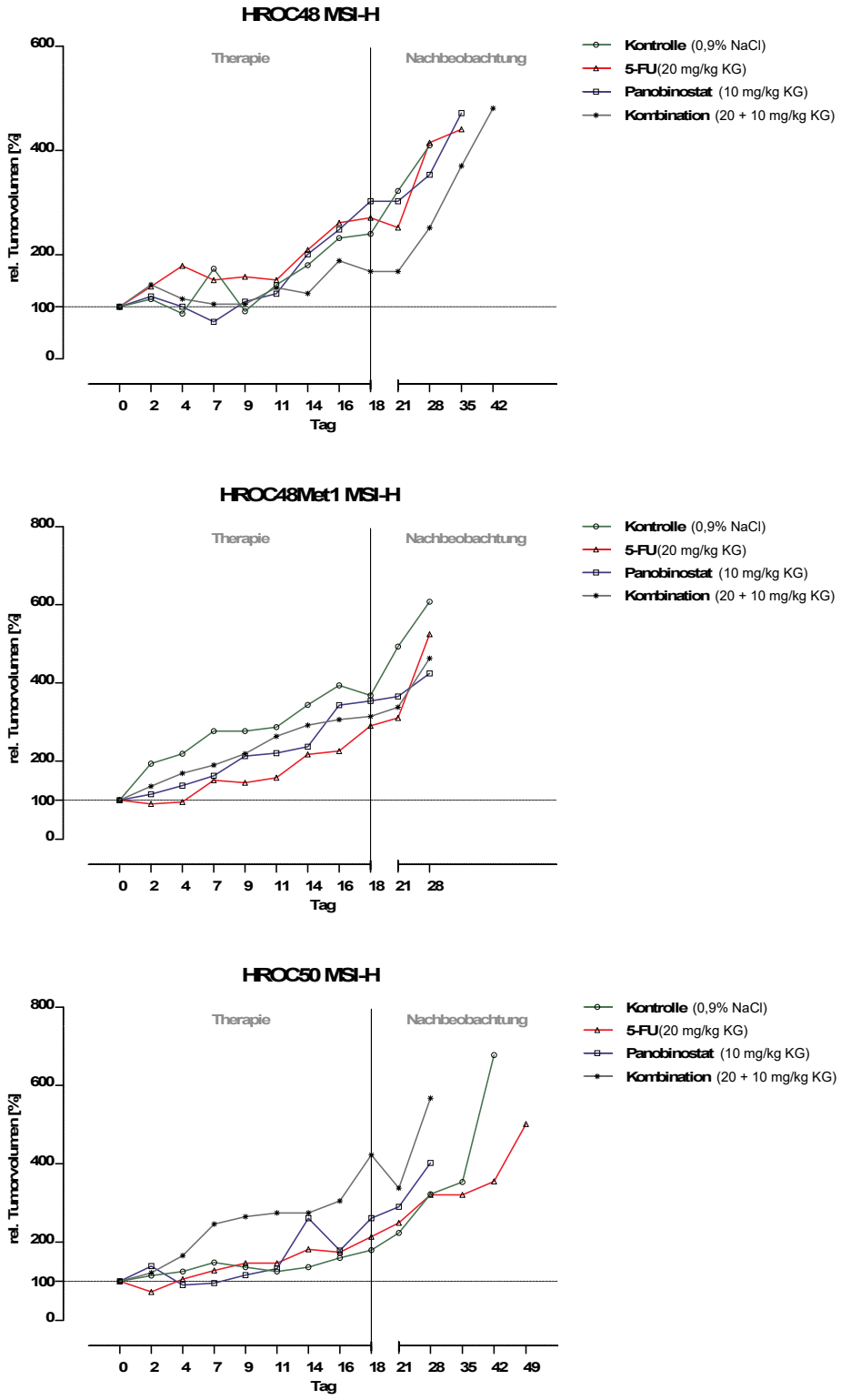


Abbildung 21 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC48, HROC48Met1 und HROC50.*

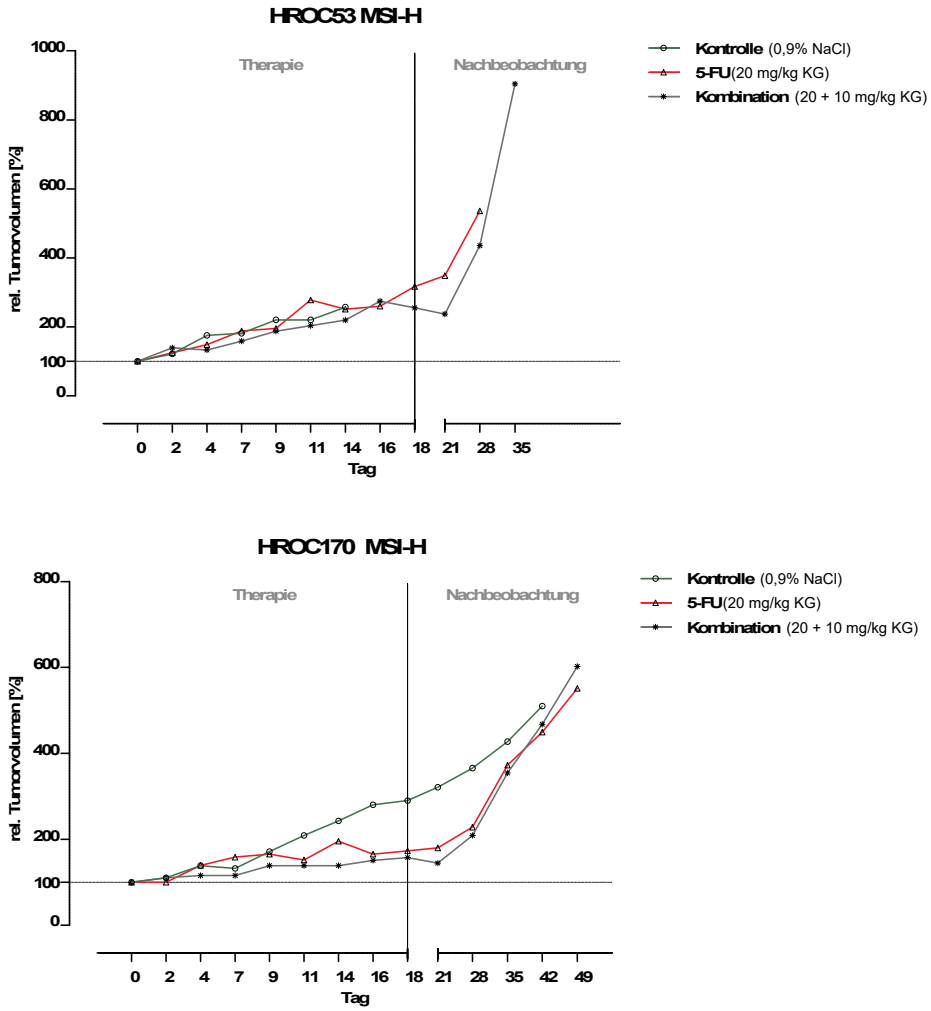


Abbildung 22 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC53 und HROC170. Aufgrund des fehlenden Engraftments einer Maus wurden jeweils drei Therapiearme umgesetzt.*

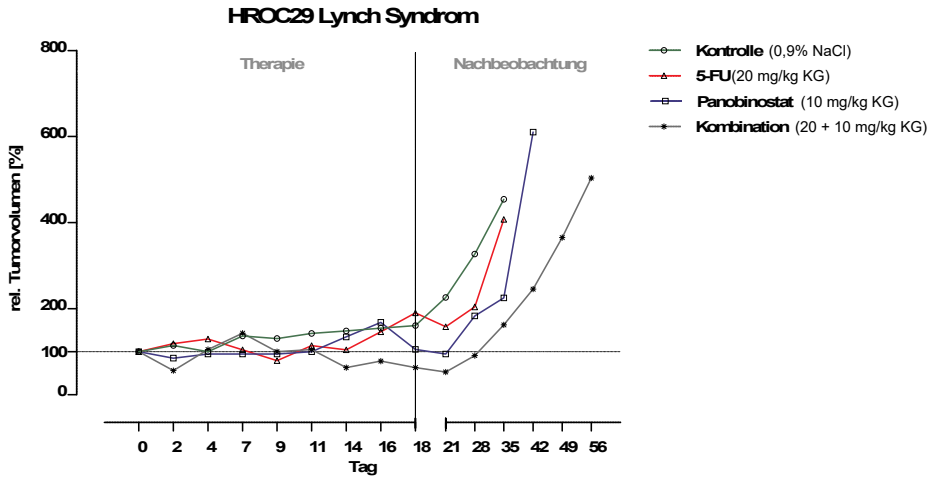


Abbildung 23 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC29.*

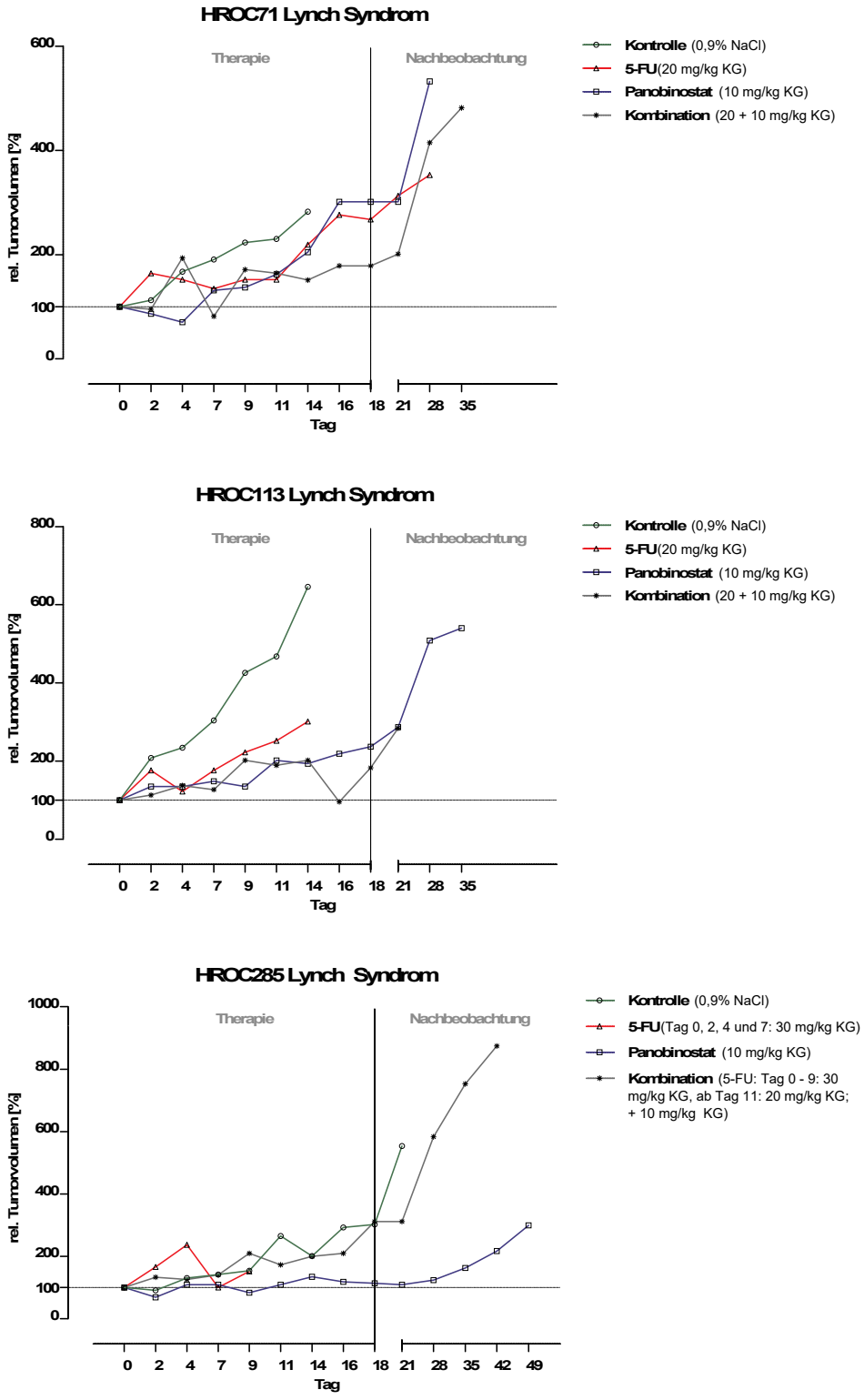


Abbildung 24 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC71, HROC113 und HROC285. Im Kombinationstherapiearm von HROC285 wurde eine 5-FU-Dosisanpassung von 30 auf 20 mg/kg KG ab Tag 11 vorgenommen. Der Avatar in 5-FU-Monotherapie verstarb vorzeitig.*

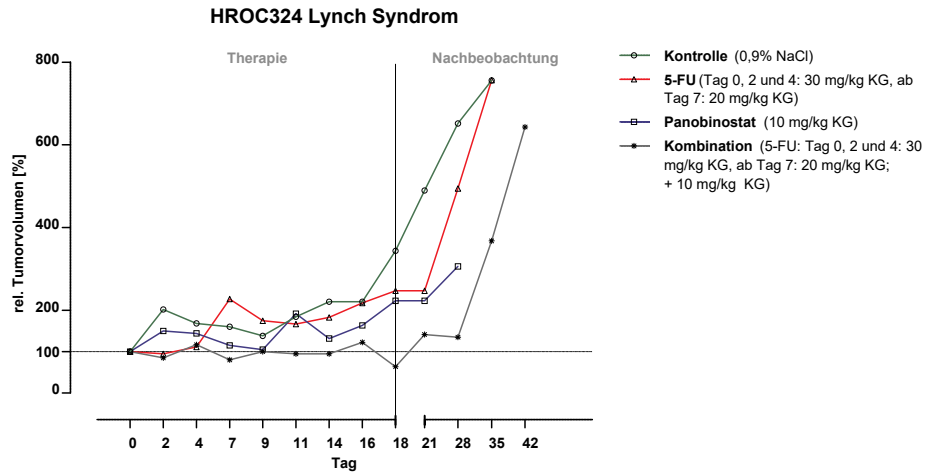


Abbildung 25 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC324. Es erfolgte im 5-FU-Monotherapie- und Kombinationstherapiearm eine 5-FU-Dosisanpassung von 30 auf 20 mg/kg KG ab Tag 7.*

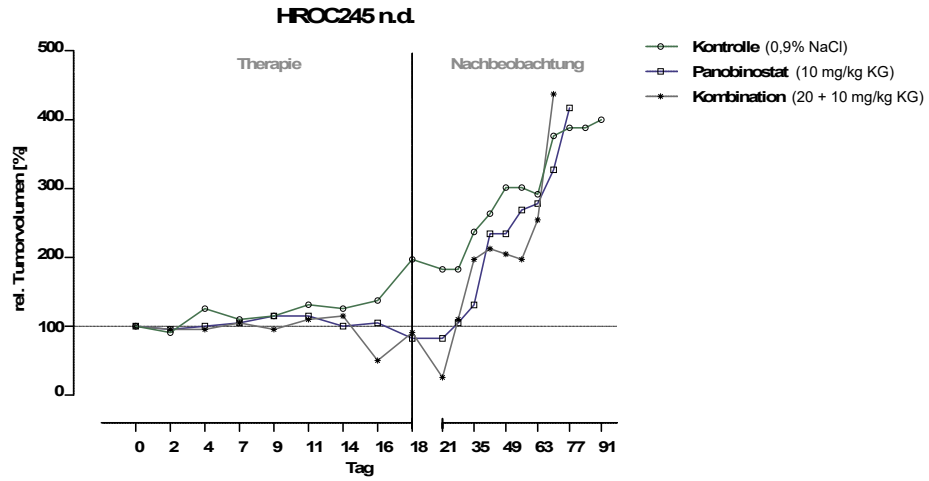


Abbildung 26 *Verlauf der Tumorvolumina von HROC245. Aufgrund fehlenden Engraftments wurden drei Therapiearme realisiert.*

Ein Großteil der HROC-Avatargruppen zeigte kein oder nur ein geringes Therapieansprechen. Demgemäß sind bei HROC48 und HROC48Met1 (beide MSI-H), HROC53 (MSI-H), HROC100 (CIN), HROC183 (CIMP-H), HROC250 (CIN) sowie HROC260 (CIN) keine Unterschiede zwischen den Volumenverläufen in den realisierten Therapiearmen und dem Verlauf in der Kontrollgruppe zu erkennen. Aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustands wurde die Therapie bei Avataren von HROC40 (Kombinationstherapie, Tag 11), HROC239 (5-FU-Monotherapie, Tag 7) und HROC285 (5-FU-Monotherapie, Tag 9) pausiert. Zudem verstarben zwölf Tiere unerwartet.
In manchen Fällen deutete sich zumindest in der Kombinationstherapie ein gewisser Behandlungseffekt an. Die Avatare von HROC239 (CIN) und HROC29 (LS) zeigten eine Tumorvolumenabnahme und die von HROC222 (CIN) sowie HROC324 (LS) eine Stagnation des Tumorvolumens unter Kombinationstherapie. Auf eine Therapie mit 5-FU (Mono- und Kombinationstherapie) reagierten die Tiere von HROC72Met1 (CIN), HROC103Met1 (CIN), HROC112Met1 (CIMP-H) und HROC170 (MSI-H) gegenüber der Kontrolle mit einem verlangsamten Tumorwachstum oder einer Stabilisierung des Volumens. Eine Stagnation innerhalb der Behandlungsphase ist auch im Panobinostat-Monotherapiearm von HROC24 (MSI-H), HROC245 (n. d.) und HROC285 (LS) zu sehen. Die Volumenverläufe der mit Panobinostat in Mono- und Kombinationstherapie behandelten Avatare von HROC32 (CIN) und HROC82 (CIN) zeigten eine Abnahme unter der Therapie, wobei im Fall von HROC82 die Tumorvolumina während

des gesamten Beobachtungszeitraums (bis Tag 91) auf dem Ausgangsniveau blieben. In allen anderen HROC-Gruppen wurde im Allgemeinen ein starkes Tumorwachstum nach Ende der Therapie verzeichnet.

6.4 Tumorgewichte

Aus den 131 Avataren mit erfolgreichem Engraftment wurden 117 Tumore explantiert. Bei den 13 vorzeitig verstorbenen Mäusen (inkl. HROC50-Avatar) erfolgte keine Explantation. Insgesamt wurde das Gewicht von 108 explantierten Tumoren erfasst. Die Tumorexplantation aus den Mäusen innerhalb einer HROC-Gruppe erfolgte oftmals an verschiedenen Tagen in der Therapie- oder Nachbeobachtungsphase. Aus Gründen der Vergleichbarkeit werden in Abbildung 28 die Gewichte derjenigen Tumore abgebildet, die innerhalb einer HROC-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt explantiert wurden.

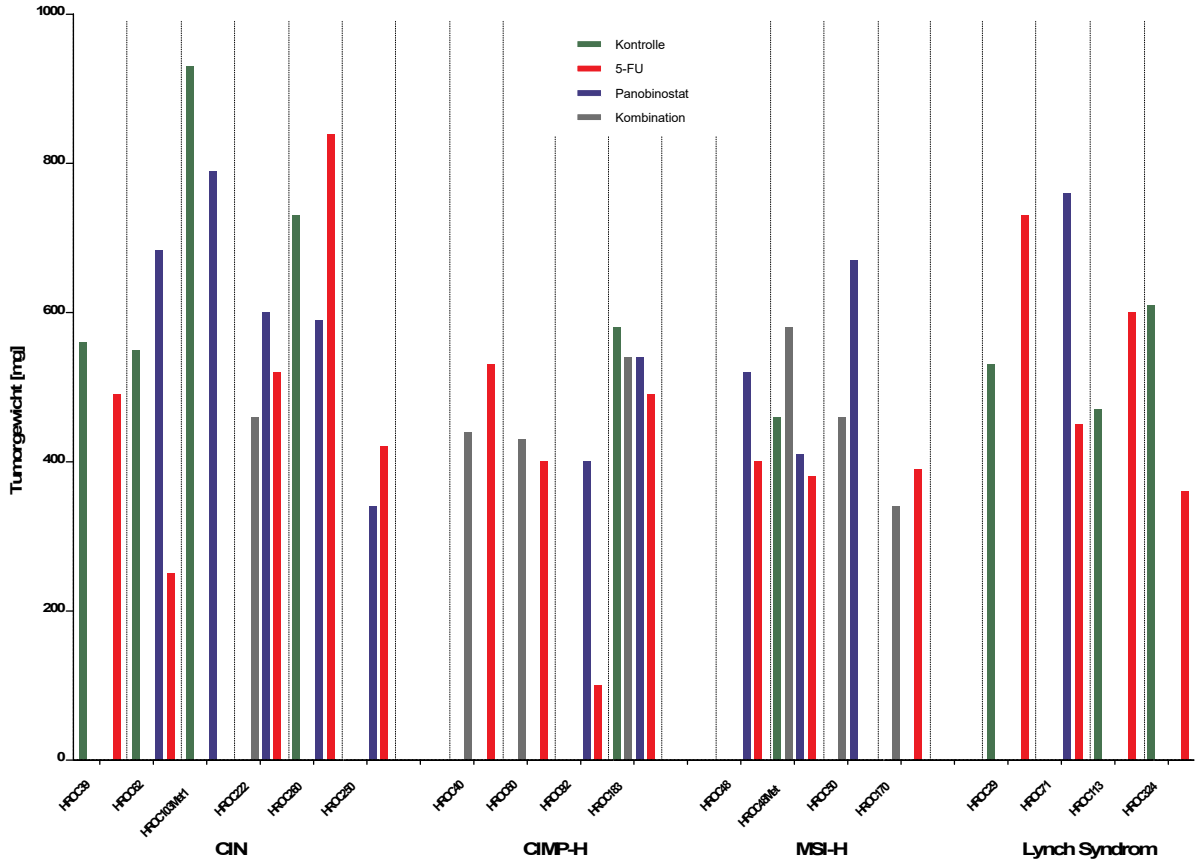


Abbildung 27 *Tumorgewichte der Tumore einer HROC-Gruppe, die zum gleichen Zeitpunkt explantiert wurden. HROC-Gruppen n = 18, Kontrolle n = 9, 5-FU n = 16, Panobinostat n = 11, Kombination n = 7.*

6.5 Gewichtsverlauf

Die Köpergewichte der Mausavatare (n = 130) wurden relativ zum jeweiligen Ausgangsgewicht (100 %) zu Beginn der Therapiephase an Tag 0 berechnet. Die Gewichtsverläufe sämtlicher Tiere eines Therapiearms (Kontrolle n = 35, 5-FU n = 33, Panobinostat n = 31, Kombination n = 31) wurden zusammengefasst und sind in Abbildung 29 mit Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Dabei ist die Abszissenachse in ein Therapiesegment von Tag 0 bis 18 und ein Nachbeobachtungssegment von Tag 21 bis maximal 91 unterteilt.
In allen vier Therapiearmen war ein Gewichtsverlust innerhalb der Therapiephase zu verzeichnen. Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied bei der behandlungsbedingten Gewichtsabnahme (Tag 2 bis 21). Die Gewichtsreduktion in der Kontrollgruppe war während der Therapie sehr gering und nahm in der Nachbeobachtungsphase ab Tag 28 stark zu. Im

Vergleich dazu war der therapieassoziierte Gewichtsverlust im 5-FU- sowie Panobinostat-Therapiearm deutlich ausgeprägter. Die Avatare in der Kombinationsgruppe zeigten unter der Therapie die stärkste Gewichtsabnahme. Während der Nachbeobachtung nahmen die Tiere in Mono- und Kombinationstherapie wieder an Gewicht zu und erreichten etwa vier Wochen nach Therapieende (Tag 49) das ungefähre Ausgangsgewicht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur annähernd die Hälfte der Avatare aus den Mono- bzw. der Kombinationstherapiegruppe den Tag 42 erreichten (5-FU: 13/33, Panobinostat: 15/31, Kombination: 17/31). Bei der Kontrollgruppe waren es lediglich zehn der 35 Tiere. Dies erklärt auch die große Streubreite der Werte in der Nachbeobachtung.

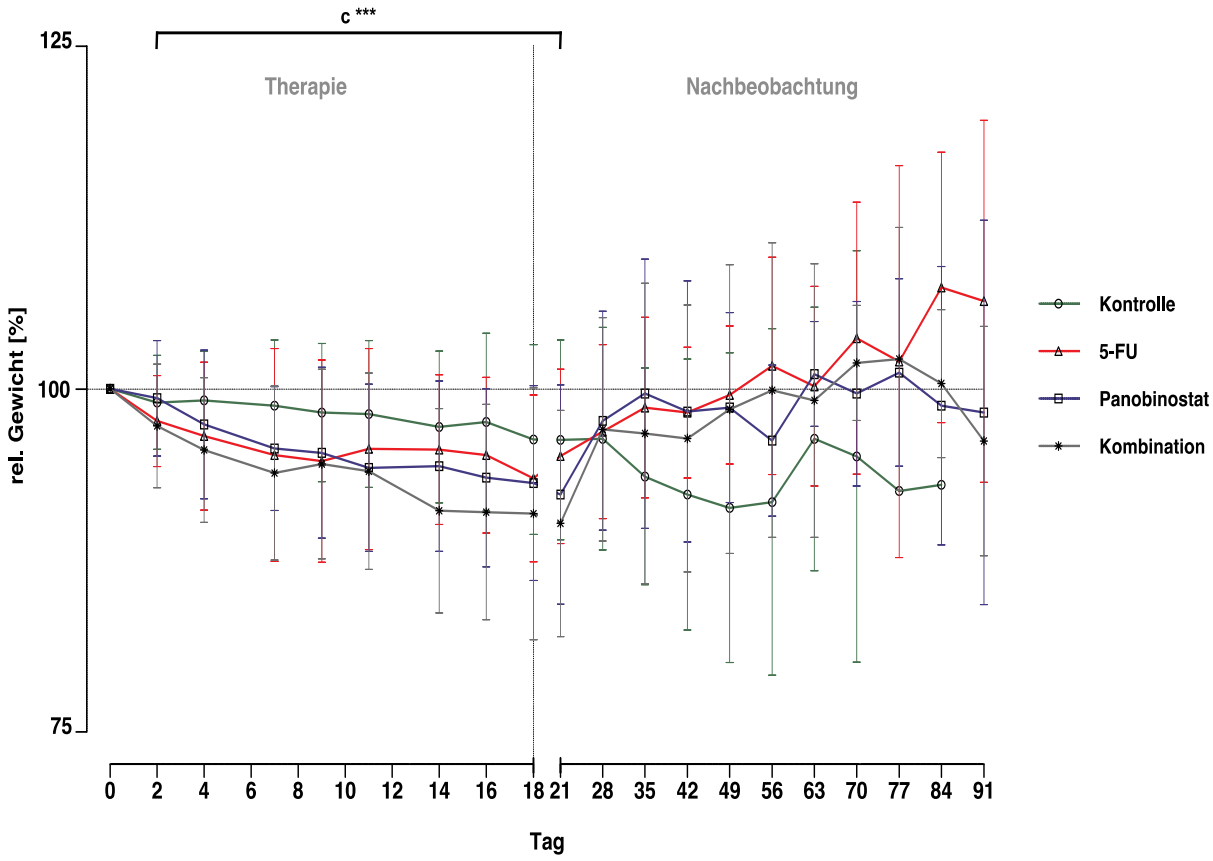


Abbildung 28 *Gewichtsverlauf der Tiere im jeweiligen Therapiearm. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Kontrolle n = 35, 5-FU n = 33, Panobinostat n = 31, Kombination n = 31, c einfaktorielle ANOVA, *** = p < 0,0001*

6.6 Überlebensanalyse

In Abbildung 30 werden die Überlebensraten nach Kaplan-Meier dargestellt. Dabei wurden 130 Tiere berücksichtigt, die in die Therapiephase übergegangen sind. Die Avatare der 5-FU-Mono- und Kombinationstherapiegruppe werden unabhängig der erhaltenen 5-FU-Dosis zusammengefasst. In Abbildung 31 wurden die 5-FU-Monotherapie- und Kombinationstherapie-Avatare exkludiert, die entweder initial (HROC92, HROC285, HROC324) oder ganzheitlich (HROC54, HROC62, HROC80) mit der höheren 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG behandelt wurden.
Den beiden Abbildungen ist zu entnehmen, dass das kumulative Gesamtüberleben im 5-FU-Monotherapiearm auch nach Ende der Therapiephase (bis Tag 28) etwa dem der Kontrolle entspricht. Ein Überlebensvorteil ist bei den Tieren, die mit der angepassten 5-FU-Dosis von 20 mg/kg KG therapiert wurden (Abb. 31), nicht zu erkennen.
Im Panobinostat-Therapiearm überlebten alle Versuchstiere die Therapiephase. Während der Nachbeobachtung zeigen die Avatare im Kombinations- und Panobinostat-Monotherapiearm

ähnliche und im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell bessere Überlebensraten. In beiden Überlebensanalysen waren die Unterschiede im Gruppenvergleich (Log-Rang-Test) jedoch nicht signifikant.

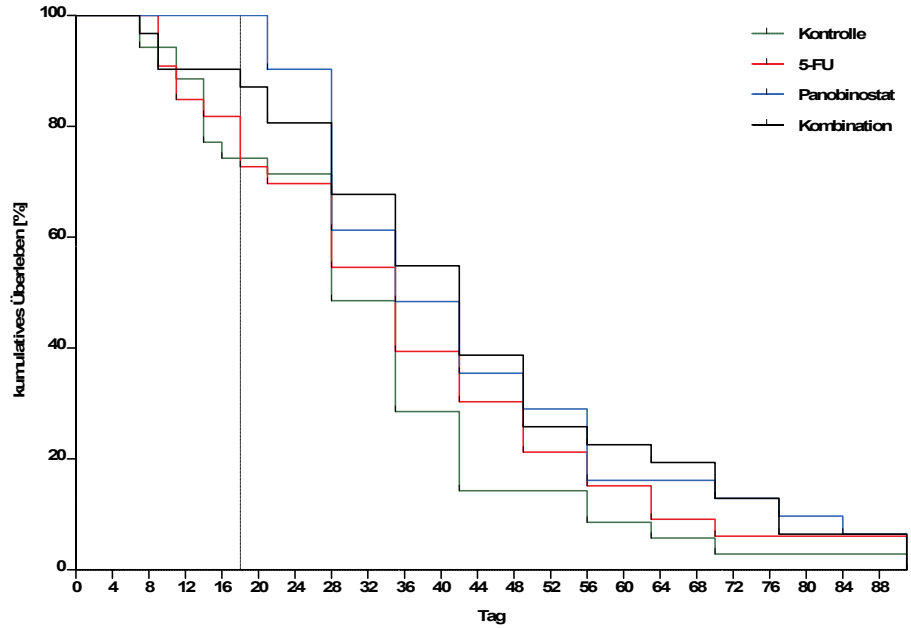


Abbildung 29 *Gesamtüberlebensanalyse nach Kaplan-Meier. Kontrolle n = 35, 5-FU n = 33, Panobinostat n = 31, Kombination n = 31. Log-Rang-Test: p = 0,25.*

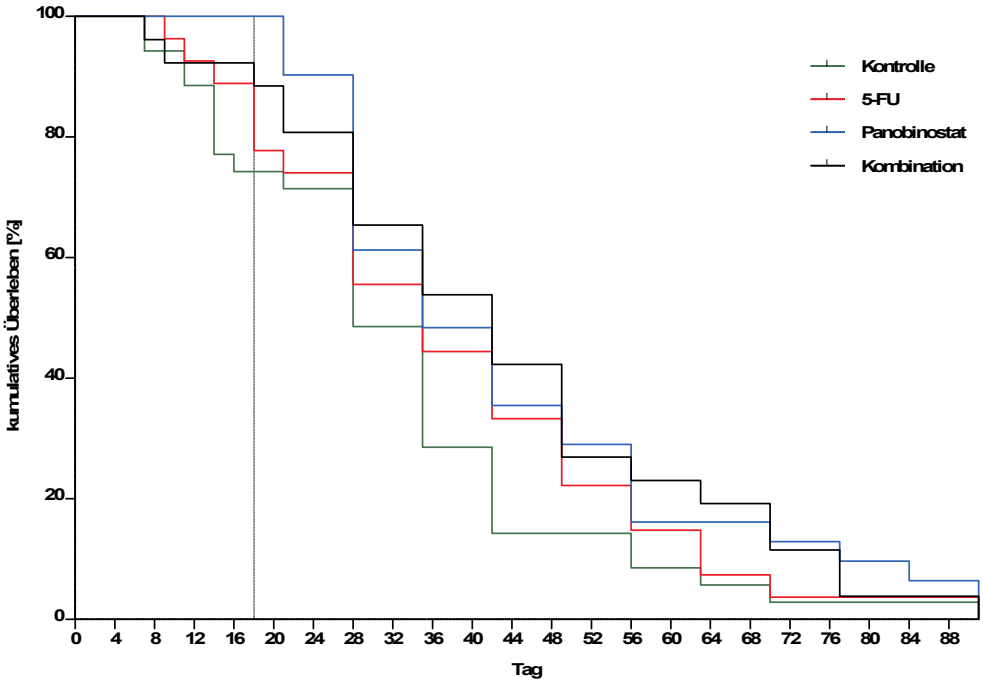


Abbildung 30 *Überlebensanalyse Kaplan-Meier mit Exklusion der 5-FU-Monotherapie- und Kombinationstherapie-Avatare, die mit der höheren 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG therapiert wurden. Kontrolle n = 35, 5-FU n = 27, Panobinostat n = 31, Kombination n = 26. Log-Rang-Test: p = 0,26.*

6.7 Expressionsbestimmung ausgewählter Biomarker

Für die RNA-Isolation wurde das Material von den 117 explantierten PDX-Tumoren verwendet. Nach Abschluss der Isolation wurde in 19 Proben (16 %) eine RNA-Konzentration von < 100 ng/µl gemessen, sodass diese für die cDNA-Synthese ausgeschlossen wurden (siehe Anhang, Flussdiagramm). In der Expressionsanalyse wurde folglich das Gewebe von 98 Avataren untersucht. Darunter waren 32 Proben aus der Kontrollgruppe, 23 aus dem 5-FU-Therapiearm, 22 aus dem Panobinostat-Therapiearm und 21 Proben aus der Kombinationsgruppe. Die entsprechenden Avatare werden im Anhang tabellarisch aufgeführt. Aufgrund einer zu geringen Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (CT-Wert > 26) wurden die Proben dreier Avatare (HROC32 M6, HROC32 M7, HROC82 M1) bei der Auswertung gänzlich ausgeschlossen. Des Weiteren konnten bei der Expressionsbestimmung von DPYD in neun Proben sowie von NRP1 in zwei Proben keine CT-Werte bestimmt werden (im Anhang gekennzeichnet). Diese wurden in der nachfolgenden Auswertung ebenfalls exkludiert.
In Abbildung 32 sind die Expressionslevel (dCT) der sechs Biomarker in den vier Therapiearmen mit Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. In der statistischen Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA wurden bei keinem der sechs Biomarker signifikant unterschiedliche Expressionslevel zwischen den Therapiearmen festgestellt.
Der Darstellung ist ebenfalls zu entnehmen, dass bei den Biomarkern CXCR4, DPYD, FGF9 und NRP1 im Vergleich zu DSE sowie IGFBP7 im Mittel deutlich höhere dCT-Werte bestimmt wurden.

Ergänzend wurde eine weitere Auswertung vorgenommen, bei der die Expressionsergebnisse ungeachtet der Therapiegruppe in Abhängigkeit vom molekularen Subtyp analysiert wurden. Neben den oben genannten Proben wurden hierbei auch die Proben von HROC245 (molekularer Subtyp n. d.) ausgeschlossen. Bei vier der sechs Biomarker konnten signifikante (FGF9) bzw. hoch signifikante Unterschiede (DPYD, DSE, IGFBP7) zwischen den molekularen Subtypen ermittelt werden (Anhang).

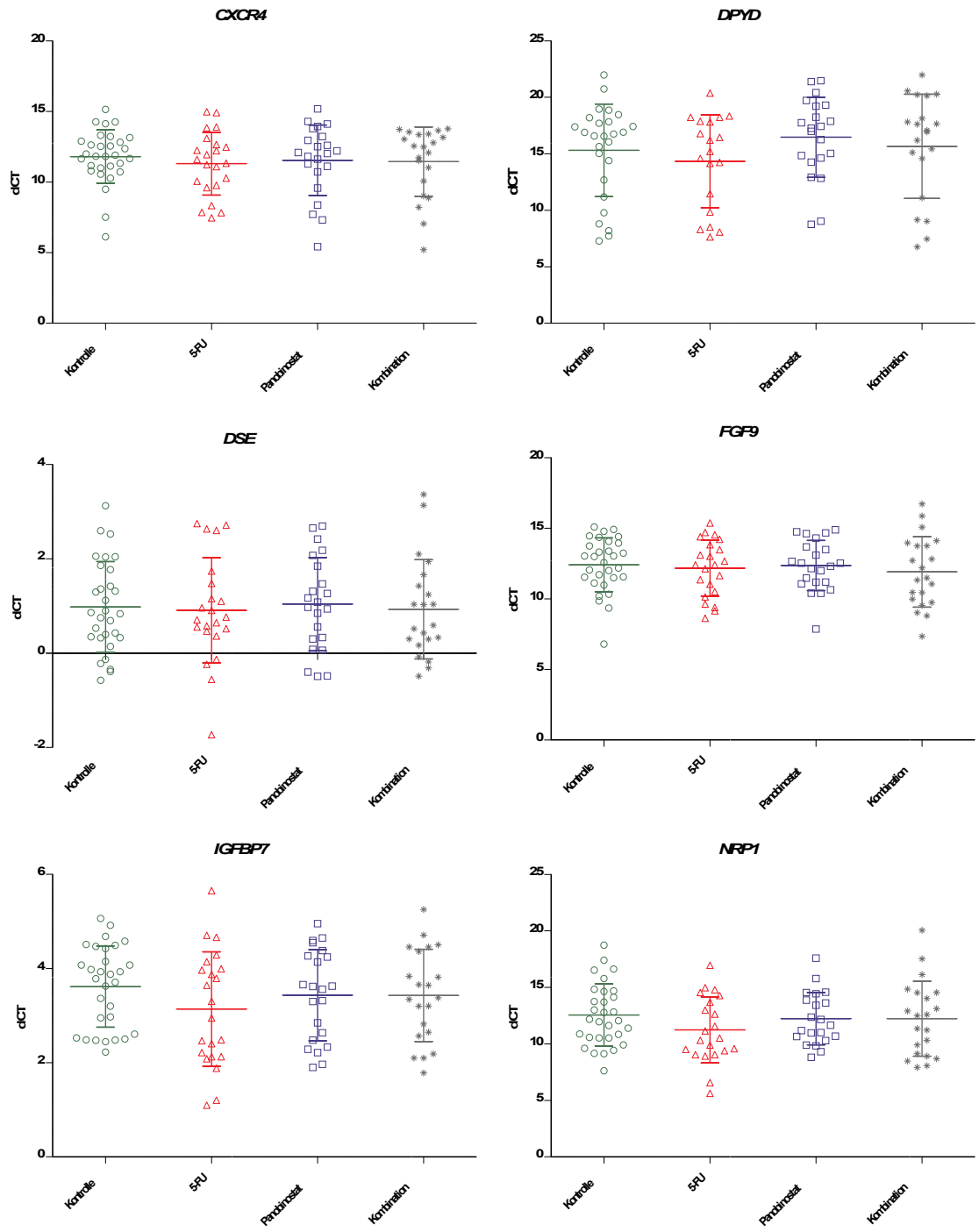


Abbildung 31 *Expressionsbestimmung der Biomarker CXCR4, DPYD, DSE, FGF9, IGFBP7 und NRP1. Dargestellt sind die Expressionslevel (dCT-Werte) im Tumorgewebe der vier Therapiearme. Eine Normalisierung der Expression wurde mittels GAPDH (Housekeeping-Gen) vorgenommen. CXCR4: Kontrolle n = 30, 5-FU n = 22, Panobinostat n = 22, Kombination n = 21, DPYD: Kontrolle n = 26, 5-FU n = 19, Panobinostat n = 21, Kombination n = 20, DSE: Kontrolle n = 30, 5-FU n = 22, Panobinostat n = 22, Kombination n = 21, FGF9: Kontrolle n = 30, 5-FU n = 22, Panobinostat n = 22, Kombination n = 21, IGFBP7: Kontrolle n = 30, 5-FU n = 22, Panobinostat n = 22, Kombination n = 21, NRP1: Kontrolle n = 30, 5-FU n = 21, Panobinostat n = 21, Kombination n = 21.*

7 Diskussion

Das Verständnis über die molekularen Abläufe in der Pathogenese ist die Grundlage für Fortschritte in der Behandlung des CRC. Nach der Identifikation von beteiligten Signalwegen erweitern bereits zielgerichtete Ansätze die therapeutischen Optionen im metastasierten Krankheitsstadium. Ein eindeutiger Benefit ist daraus bislang jedoch nur einer kleinen Patientengruppe vorbehalten [121]. Auch wenn es durch die Etablierung von Screeningprogrammen gelungen ist, Inzidenz und Mortalität zu senken [40, 42], war das CRC im Jahr 2020 dennoch die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [1].

Präklinische Tumormodelle bilden eine bewährte Grundlage sowohl für die Erforschung molekularbiologischer Mechanismen als auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Das PDX-Modell ist aktuell eines der führenden Tumormodelle, weil zum einen die histopathologische Architektur und das genetische Profil des humanen Primärtumors erhalten bleiben [71] und sich zum anderen Aussagen zum klinischen Verlauf [122] und Therapieansprechen ableiten lassen [79, 123, 124, 125]. Für die erfolgreiche Erzeugung von Xenografts ist die Wahl eines geeigneten Tiermodels und Transplantationsverfahrens essenziell, sodass in der vorliegenden Arbeit das Engraftment nach einem etablierten Kryokonservierungsverfahren [69] im NSG-Mausmodell beurteilt werden sollte. Mit dem Ansatz, das PDX-Modell im Rahmen einer PCT als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zu nutzen [73], war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, den Effekt von Panobinostat allein und in Kombination mit 5-FU auf das CRC zu untersuchen. Dabei sollten mitunter PDX-Tumore identifiziert werden, bei denen die Kombinationstherapie eine synergistische Wirkung zeigt, vergleichbar mit den Ergebnissen von Fazzone et al. [91, 93] an CRC-Zelllinien. Gleichzeitig sollte die kontrovers diskutierte Frage geklärt werden, welchen Effekt 5-FU auf den MSI-Subtyp hat.
Die toxischen Nebenwirkungen, die während der Behandlung der Mausavatare auftraten und auch nach der Dosisreduktion von 5-FU zu verzeichnen waren, führten bei nur begrenztem Therapieerfolg schließlich zum Abbruch der geplanten Studie. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die im Vorfeld berechnete Mindestgröße der Tierpopulation (Kapitel 5.1) nicht erreicht, sodass das Studiendesign nach klinischem Vorbild nicht realisiert werden konnte. Demzufolge konnte auch die statistische Auswertung nicht wie geplant erfolgen.
In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse diskutiert, wobei der Fokus insbesondere auf die Aspekte gelegt wird, die den Studienabbruch bedingten.

7.1 Beurteilung des PDX-Erfolgs im NSG-Mausmodell

In diesem Projekt wurden kryokonservierte CRC-Tumore von 37 Patienten (39 HROC Proben) in 159 NSG-Mäuse implantiert. Davon entwickelten 131 einen palpablen Tumor nach maximal sechs Monaten. Damit beläuft sich die kumulative „tumor take rate“ (TTR), also der Anteil der Tiere, die nach Implantation einen palpablen Tumor entwickelten, auf 82,4 %. Es bestätigt den in Vorbereitung dieser Studie bestimmten Wert von 80,2 % ab der ersten Passage nach transienter Kryokonservierung [74].
In der Literatur variieren die Werte für Transplantationsraten erheblich und erlauben nur unter Berücksichtigung bestimmter Umstände einen direkten Vergleich. Zunächst einmal muss beachtet werden, dass sich die Definition der Engraftmentrate bei verschiedenen Autoren unterscheidet. Chou et al. [126] beispielsweise beziehen die Erfolgsquote der Xenotransplantation auf den Anteil der Patienten, deren Tumor erfolgreich als Xenograft etabliert worden ist. Demgegenüber wird in dieser Arbeit, analog zu Linnebacher et al. [69] und weiteren Autoren [124, 127], die beschriebene TTR verwendet. In einem systematischen Review untersuchten Brown und Kollegen [128] 13 Studien mit PDX-Modellen vom CRC und bezifferten eine mittlere Transplantationsrate von 70 %. Allerdings zeigten die berücksichtigten Studien deutliche Unterschiede in der Methodik der Xenotransplantation. Demnach haben neben den tumorspezifischen Eigenschaften, vor allem die Wahl des Mausstamms, die

Gewebeverarbeitung, der Transplantationsort und die Anzahl der transplantierten Tumorfragmente einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg der Xenotransplantation [75, 80, 128]. Gemäß der Annahme, dass die Erfolgsquote mit dem Ausmaß der Immunsuppression des eingesetzten Mausmodells korreliert [129], konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass unter Verwendung des NSG-Mausmodells eine höhere TTR als mit dem Nacktmausmodell NMRI-Foxn1$^{nu/nu}$ (ca. 70 %) bei vergleichbarer Methodik [69, 116] erzielt werden kann. Die für PDX-Modelle häufig verwendeten NMRI-Foxn1$^{nu/nu}$-Nacktmäuse weisen aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation im Foxn1-Gen eine Thymusaplasie auf, die zu einem Mangel an funktionellen T-Zellen führt. Die Einschränkungen ihres Immunsystems sind somit vergleichsweise weniger weitreichend, was den Engraftment-Vorteil des NSG-Stamms erklären könnte [73, 130]. Darüber hinaus wurden die Tumorfragmente vor Transplantation in Matrigel® inkubiert, was übereinstimmend mit Gock et al. [116] gewiss dazu beigetragen hat, eine hohe TTR zu erreichen. Maykel und Kollegen [131] erzielten mit NSG-Mäusen sogar eine Engraftmentquote von 90 %, was darin begründet liegen könnte, dass frisches Tumorgewebe transplantiert wurde. Obwohl in vorherigen Untersuchungen der AG M.O.I [69] ein Unterschied in der TTR zwischen frischem und kryokonserviertem Gewebe (74 % gegenüber 71 %) festgestellt wurde, war dieser statistisch nicht signifikant. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Transplantation von frischem PDX-Gewebe zu einer signifikant kürzeren Zeit bis zum Erreichen einer definierten Tumorgröße führt [71].
Bedeutend ist auch die Wahl der Transfergeneration. Tumorgewebe, das durch den primären Transfer von humanem Material ins immunmodifizierte Tier gewonnen wird, wurde hierbei anlog zu anderen Kollegen [132] als nullte Generation (fT0) definiert. Nach dem Prinzip „so niedrig wie möglich und so hoch wie nötig“ wurden Transfergenerationen von fT1 bis fT4 verwendet. Damit wurde einerseits sichergestellt, dass mindestens eine erfolgreiche Maus-zu-Maus-Transplantation dieser PDX-Erzeugung vorausging. Andererseits wurde durch eine niedrige Passagenanzahl die Aufrechterhaltung der biologischen Eigenschaften des humanen Primarius garantiert, wie es bis zu 14 Transfergenerationen beschrieben wird [72].
Der Engraftment-Erfolg kann überdies mit einem orthotopen Ansatz oder durch eine heterotope Transplantation in die Nierenkapsel gesteigert werden [133]. Auch wenn dieses Vorgehen angesichts höherer Erfolgsraten [75] vielversprechend erscheint, liegen die offensichtlichen Nachteile gegenüber der subkutanen Transplantation in der erschwerten Überwachung des Tumorwachstums, im höheren praktischen Aufwand sowie in der Gewährleistung des Tierwohls [80, 131]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Lokalisation von PDX-Tumoren auf die Wachstumskinetik und Chemosensitivität auswirken kann. Erstad und Kollegen [134] beobachteten im PDX-Mausmodell, dass orthotope Pankreastumore schneller wuchsen und signifikant besser auf eine intravenöse Chemotherapie ansprachen als heterotope Tumore, was in präklinischen Arzneimittelstudien bedacht werden sollte.
Der im Rahmen dieser Arbeit erzielte Engraftment-Erfolg ist nicht zuletzt ein Resultat der langjährigen Erfahrung und optimierten Methodik der AG M.O.I. Auch andere Arbeitsgruppen stellten fest, dass der Erfolg bei der Etablierung von Xenografts mit zunehmender Erfahrung des Teams wächst [126].

Neben methodischen Faktoren beeinflussen tumorspezifische Aspekte den Erfolg von Xenotransplantationen. Bei der Erzeugung von Xenografts zeigen Studien zu verschiedenen Tumorentitäten, dass Tumore, die klinisch mit einem fortgeschrittenen Stadium und einer geringeren Überlebensrate einhergehen, im Mausmodell besser anwachsen [122, 135, 136]. Auf diesem Wege ist von einer Selektion auszugehen, die dazu führt, dass aggressivere Tumore in PDX-Sammlungen häufiger vertreten sind [73, 123]. Verstärkend kommt hinzu, dass bei der chirurgischen Resektion von kleineren und damit tendenziell prognostisch günstigeren Tumoren kein Gewebe für diese Zwecke übrig bleibt. Bei der Betrachtung des molekularen Profils lassen sich ebenfalls Korrelationen zum Engraftment ableiten. Interessanterweise wirkt sich der molekulare Subtyp des transplantierten Gewebes auf den PDX-Erfolg aus. Es konnte beobachtet werden, dass Xenotransplantationen von MSI- gegenüber MSS-Tumoren beim Magenkarzinom [137] und beim CRC [71] häufiger erfolgreich sind und die Mutationen von KRAS sowie BRAF positiv mit dem Engraftment korrelieren [120, 125]. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass bei der zitierten Studie [120] der kumulative PDX-Erfolg von

vier verschiedenen Mausstämmen ausgewertet wurde. Ein entsprechender Trend zwischen Anwachsen und Mikrosatellitenstatus lässt sich auch hier feststellen. Im Vergleich zu den MSS-Tumoren zeigte die Gruppe der MSI-Tumore (MSI-H und Lynch Syndrom) eine höhere Engraftmentrate (78,7 % gegenüber 91,5 %, p = 0,066). MSI-positive Tumore ließen sich generell am besten transplantieren. Dieser Trend wird in Abbildung 10 besonders deutlich. Es konnte festgestellt werden, dass die relative Häufigkeit der MSI-Tumore zunahm. Das beobachtete Phänomen des besseren Engraftments von MSI-Tumoren kann somit zu einem nicht zu vernachlässigenden selektiven Faktor für den Aufbau von PDX-Sammlungen werden.
Als Grund für das fehlende Engraftment bei allen vier Tieren einer Avatargruppe ist neben methodischen Fehlern eine nicht ausreichende Vitalität des transplantierten Gewebes denkbar. Im Zuge der Fragmentierung zeigten makroskopisch eher CIN-Tumore ein nekrotisches Areal im Zentrum des Tumors. Die nichtvitalen Gewebebereiche sind für weitere Transfergenerationen ungeeignet und stellen eine Fehlerquelle bei der Erstellung von Tumorfragmenten dar. Um weitere Ursachen für ein Engraftmentversagen zu identifizieren, kann eine Analyse des Mutationsprofils wegweisend sein. Wie im Falle einer KRAS-, BRAF- oder PIK3CA-Genmutation können sich veränderte Signalwege auf das Engraftment im Mausmodell auswirken [120, 124, 125]. Eine dahingehende Untersuchung der insgesamt 28 Engraftmentversager aus 13 HROC-Fällen ist in Hinblick auf zukünftige PDX-Studien sinnvoll.
Konträr zu den neueren Ergebnissen der AG M.O.I [120] waren die Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen bezüglich des PDX-Erfolgs nicht signifikant. Es ist nicht auszuschließen, dass die fehlende Signifikanz ein Resultat der partiellen Umsetzung des geplanten Gesamtvorhabens ist. Bei der Analyse der Engraftmentzeit hingegen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den molekularen Subgruppen ($p < 0,0001$) und dem MSS-/MSI-Status ($p < 0,01$) deutlich. MSI-Tumore benötigten weniger Zeit, um die festgelegte Tumorgröße für den Therapiestart zu erreichen. Bei den Tumoren des Lynch Syndroms wurde die kürzeste Anwachszeit von 29 ± 10 Tagen beobachtet. Im Post-hoc-Vergleich zeigten sie gegenüber den CIN-Tumoren ein schnelleres Engraftment ($p < 0,0001$), was bemerkenswerterweise für die MSI-H-Gruppe nicht galt. Der Grund für die unterschiedlichen Engraftmentzeiten und die Varianz innerhalb der molekularen Gruppen könnten ebenjene genannten Faktoren sein, die Einfluss auf den PDX-Erfolg haben. Zudem kann ein möglicher Einfluss der verwendeten Transfergenerationen nicht ausgeschlossen werden. Schon zuvor konnten die AG M.O.I [71, 114] und andere [137] beobachten, dass sich die Zeit bis zur Entwicklung eines palpablen Tumors mit steigender Passagenanzahl tendenziell verkürzt.

In Zusammenschau mit den Engraftmentraten kann von einer biologischen Überlegenheit der MSI-Tumore im Xenograftkontext ausgegangen werden, die mit einer entsprechenden Konsequenz für das Biobanking einhergeht. Aus klinischer Perspektive betrachtet, haben MSI-H-Tumore dagegen eine günstigere Prognose und zeigen seltener Lymph- und Fernmetastasierung als MSS-Karzinome [32, 41]. Es wird ein Zusammenhang mit der starken antitumoralen Immunantwort angenommen, die typischerweise bei HNPCC- und sporadischen MSI-H-Karzinome zu finden ist [11, 28]. Diese wird unter anderem auf die dMMR-induzierte Expression von sogenannten Frameshift-Peptiden zurückgeführt, die als Antigene von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden [138]. Inwiefern der Überlebensvorteil dabei vom Tumorstadium abhängt, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden [139]. Bei der MSI-L-Gruppe ist die Abgrenzung zu den MSS-Tumoren umstritten, womit eine klinische Relevanz fraglich bleibt [26]. Im Vergleich dazu sind CIMP-H-CRCs mit einer schlechten Prognose assoziiert [13, 140]. Die Tatsache, dass dieser Subtyp in den meisten Fällen mit einer BRAF-Mutation einhergeht [35], unterstreicht das Phänomen eines besseren Engraftments von Tumoren mit prognostisch ungünstigen Merkmalen.

Nach durchschnittlich zwei Monaten (55 ± 35 Tage) erreichten die NSG-Mäuse die für den Therapiestart definierte Tumorgröße. Vor allem vor dem Hintergrund der vier bis acht Monate [73], die zur PDX-Etablierung üblicherweise benötigt werden, kann eine optimierte Latenzzeit die Hürde für eine Echtzeitanwendung nehmen. Ausgehend davon, dass eine adjuvante Chemotherapie beim CRC idealerweise innerhalb von acht Wochen eingeleitet werden sollte,

weil Verzögerungen ein schlechteres Überleben bedeuten [41], ist die rechtzeitige Verfügbarkeit einer denkbar maßgeschneiderten Strategie entscheidend. Mit dem Zugriff auf „biologische Zwillinge“ von kolorektalen Patiententumoren aus der PDX-Biobank und einer optimierten Engraftmentzeit besteht die Möglichkeit einer vorausgehenden oder simultanen individualisierten Arzneimitteltestung unter Einhaltung des engen Zeitrahmens. In dieser Arbeit wird deutlich, dass die beschriebene Methodik eine reelle Chance bietet, um dieses Ziel zu erreichen.
Aufgrund der Bildung von Partnerschaften und multiinstitutionellen Netzwerken kann der Fortschritt in den Bereichen Charakterisierung von Karzinomen und Entwicklung neuer Therapeutika intensiver vorangetrieben werden. Die Vernetzung verschiedener Zentren mit PDX-Biobank ermöglicht den Austausch von Gewebe und Erfahrungswerten. Dadurch wird den Arbeitsgruppen der Zugang zu einem weitaus breiteren PDX-Spektrum gewährleistet. Die Zusammenarbeit der AG M.O.I mit dem privaten Unternehmen EPO (Experimentelle Pharmakologie und Onkologie Berlin-Buch GmbH) ist ein Beitrag für diesen Prozess. In Kooperation mit EPO wurden bereits PDX-Therapiestudien mit verschiedenen Tumorentitäten erfolgreich realisiert [141, 142, 143, 144].
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es trotz der unvollständigen Studienrealisierung gelungen ist, mit dem NSG-Mausmodell einen überdurchschnittlich hohen PDX-Engraftment-Erfolg zu erzielen und Tumorgewebe in größerem Umfang zu generieren. Eine effiziente Engraftment-Strategie ist von entscheidender Bedeutung beim Aufbau von PDX-Biobanken. Es wurde gezeigt, dass mit einer optimierten Methodik [69, 114, 116] die Etablierung einer umfangreichen PDX-Sammlung umgesetzt werden kann. Die HROC-Xenobank reproduziert die biologischen Merkmale der ursprünglichen Patiententumore und repräsentiert, unter Beachtung der genannten Selektionseinflüsse, die Heterogenität der deutschen CRC-Population [71]. Der NSG-Mausstamm kann dabei als wertvoller Ausgangspunkt fungieren, um vom Patienten stammendes Gewebe zu vervielfachen und nachfolgend genomische Analysen und präklinische Therapiestudien zu realisieren. Ferner kann in Anbetracht der hohen Anwachsrate und der daraus resultierenden Minimierung des Tierbedarfs der kostenintensive Aspekt dieses Modells relativiert werden.

7.2 Analyse des Therapieansprechens und der Toxizität im NSG-PDX-Modell

Die Zulassungsquoten in der onkologischen Arzneimittelentwicklung sind miserabel. Laut einer Auswertung der pharmazeutischen Industrie bestanden zwischen 2011 und 2020 nur 5,3 % der onkologischen Wirkstoffkandidaten ab Phase I das FDA-Zulassungsverfahren – bei einer durchschnittlichen Entwicklungsdauer von 10,3 Jahren [145]. Die Integration von PDX-Modellen in klinische Studien bietet eine Plattform, um diesen Prozess zu optimieren [73, 79, 130]. Im Mittelpunkt steht die Identifizierung von Respondern und Non-Respondern, auf deren Grundlage im Nachgang eine rationale Anwendung am Menschen abgeleitet werden kann. Demgemäß sollte das Monitoring des PDX-Tumorwachstums in dieser Studie Aufschluss darüber geben, ob und welche HROC-Fälle eine Sensitivität gengenüber den eingesetzten Substanzen aufweisen. Betrachtet man die Verlaufskurven der Tumorvolumina, zeigt sich ein Bild, das mit der histopathologischen Einschätzung aus der Zwischenauswertung annähernd übereinstimmt: In der überwiegenden Mehrheit der Fälle war keine eindeutige Wirksamkeit der verwendeten Chemotherapeutika zu erkennen. Die Behandlungsgruppen von HROC48 (MSI-H), HROC183 (CIMP-H), HROC250 (CIN) und HROC260 (CIN) sind mustergültig für die beobachtete Chemoresistenz. In diesen Fällen zeigen die Tumorvolumina in den drei Therapiearmen annähernd den gleichen Verlauf wie das Kontrolltier. Dies gilt auch für HROC53 (MSI-H) und HROC100 (CIN), bei denen lediglich eine 5-FU-Monotherapie- und eine Kombinationstherapiegruppe realisiert wurde.
Allerdings kann zumindest anhand der Verlaufskurven einzelner HROC-Avatargruppen ein gewisser Therapieeffekt abgeleitet werden. So zeigten die mit 5-FU (Mono- und Kombinationstherapie) behandelten Avatare von unter anderem HROC72Met1 (CIN), HROC112Met1 (CIMP-H) und HROC170 (MSI-H) ein gegenüber der Kontrolle verlangsamtes Tumorwachstum oder eine Stagnation des Tumorvolumens innerhalb der Therapiephase. Bei HROC86

(CIN) waren diese Effekte sogar von einer initialen Abnahme des Tumorvolumens begleitet. Des Weiteren konnte mit HROC82 (CIN) ein HDACi-Responder identifiziert werden. Unter der Behandlung mit Panobinostat verblieben hierbei die Tumorvolumina während der gesamten Therapie- und Nachbeobachtungsphase nahezu auf ihrem Ausgansniveau. Demgegenüber war bei dem ausschließlich mit 5-FU therapierten Tier lediglich ein verlangsamtes Tumorwachstum in der Behandlungsphase mit anschließender Progression zu verzeichnen.
Um weitere Anhaltspunkte für das Therapieansprechen zu erhalten, wurde eine Bestimmung der Tumorgewichte nach Explantation vorgenommen. Doch aufgrund des Umstandes, dass die Explantationen innerhalb einer HROC-Gruppe mehrheitlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie- oder Nachbeobachtungsphase erfolgten, ist ein Vergleich der Tumorgewichte in diesen Fällen nicht zielführend. Eine gleichzeitige Explantation aller Tumore einer Avatargruppe wurde nur bei HROC48Met (MSI-H) und HROC183 (CIMP-H) durchgeführt. In beiden Fällen hatten die Tumore aus dem 5-FU-Monotherapiearm das geringste Gewicht. Bei Gegenüberstellung der Gewichte muss allerdings auch die Tumorgröße zum Zeitpunkt der Explantation beachtet werden. So kann das relativ hohe Gewicht des Kombinationstherapietumors von HROC48Met damit erklärt werden, dass dieser zum Zeitpunkt der Entnahme bereits ein vergleichbar großes Volumen erreicht hatte (1427 mm^3 vs. 585 mm^3 bei Kontrolle, 619 mm^3 im 5-FU- und 552 mm^3 im Panobinostat-Therapiearm). An diesem Beispiel lässt sich ein weiterer Schwachpunkt bezüglich der Vergleichbarkeit ableiten: Der Zeitpunkt der Tötung und damit der Tumorentnahme wurde zumeist durch das Abbruchkriterium Tumorgröße bestimmt. Infolge der wöchentlichen Messintervalle in der Nachbeobachtungsphase wurden einige Tumore entsprechend spät (> 900 mm^3 Durchmesser) explantiert.
Überraschenderweise zeigte sich bei den Tumorgewichten von HROC62 (CIN) und HROC324 (LS), dass die Tumore des 5-FU-Monotherapiearms gegenüber den Kontrolltumoren, trotz etwa gleicher Explantationsgröße, wesentlich leichter waren. Die Tiere wurden in diesen Fällen teilweise (HROC324 bis einschließlich Therapietag 7) oder ganzheitlich (HROC62) mit der höheren 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG behandelt. Den Verlaufskurven und der histologischen Untersuchung war eine entsprechende 5-FU-Wirkung jedoch nicht zu entnehmen.
Angesichts der eingeschränkten Vergleichbarkeit ist der Erkenntnisgewinn durch die Tumorgewichtsbestimmung bei der vorliegenden Planung als gering zu bewerten. Für zukünftige Studien stellt der Ansatz von Janakiraman et al. [125] eine geeignete Alternative dar. Nach der Behandlung von Rektumkarzinom-PDX-Modellen mit einer kombinierten Radiochemotherapie erfolgten Euthanasie und die anschließende Tumorgewichtsbestimmung zu einem festgelegten Zeitpunkt. Sie konnten damit anhand von Tumorwachstum und Tumorgewicht das heterogene klinische Therapieansprechen von Patienten reproduzieren.
Perspektivisch könnte den chemosensitiven HROC-Fällen bei der Planung künftiger PDX-Arzneimittelstudien Bedeutung zukommen, vorausgesetzt, dass die festgestellte Wirksamkeit auch auf histopathologischer Ebene bestätigt werden kann. Die genomische Charakterisierung der Responder und Non-Responder kann im nächsten Schritt bei der Ermittlung beteiligter Wirk- und Resistenzmechanismen hilfreich sein. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse lassen sich mit Daten aus parallel laufenden, klinischen Studien kombinieren („co-clinical trial“), mit dem Ziel, die Patientenversorgung zu optimieren und zu individualisieren [75, 123]. Mit diesem Ansatz leisteten Pandolfi et al. Pionierarbeit bei der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie und konnten beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom neue Behandlungsstrategien entwickeln [70, 146].
Die Beobachtungen im vorliegenden Projekt legen nahe, dass mit dem vorliegenden Setting eine wachstumshemmende Wirkung des Standardtherapeutikums 5-FU erzielt werden kann und, wie im Fall von HROC82, eine Identifikation von HDACi-Respondern grundsätzlich möglich ist. Dennoch erwiesen sich die toxischen Nebenwirkungen zum Kernproblem der Studie. In der nachfolgenden Ursachenanalyse sollen mögliche Gründe hierfür näher beleuchtet werden.
Bei retrospektiver Betrachtung lassen sich im Wesentlichen drei Faktoren konkretisieren, die sich nachteilig auf die Durchführung der geplanten Studie ausgewirkt haben.
(I) Erstens waren die gewählten Dosierungen von 5-FU und Panobinostat ungeeignet, um die angestrebte Wirkung bei gleichzeitig annehmbarer Verträglichkeit zu erzielen. Bei den Tieren in Monotherapie oder im Kombinationstherapiearm wurden oftmals Diarrhoe, Gewichtsverlust

und Verhaltensstörungen als unerwünschte Wirkungen beobachtet. Diese können auf die sich stark überschneidenden Toxizitätsprofile beider Wirkstoffe zurückgeführt werden. Sowohl bei der Behandlung mit 5-FU als auch mit Panobinostat treten vermehrt Myelosuppression mit den damit verbundenen Konsequenzen (Blutungen und Infektionen) auf. Gleiches gilt für nicht-hämatologische Ereignisse, wie Durchfall, Übelkeit und Erbrechen [54, 90, 147]. Eine 5-FU-assoziierte Diarrhoe als Ausdruck einer Mukositis wird in der Literatur ausführlich beschrieben [55, 60, 74]. Auch erhöht Panobinostat die Inzidenz gastrointestinaler Beschwerden. In der Phase-III-Studie PANORAMA 1 waren schwere Durchfälle sogar einer der häufigsten Gründe für den Abbruch einer Kombinationstherapie mit Panobinostat bei Patienten mit rezidiviertem oder rezidiviertem und therapierefraktärem multiplen Myelom [148]. Die Ähnlichkeit der Nebenwirkungsprofile erklärt das häufige Auftreten von Diarrhoe und den damit einhergehenden Gewichtsverlust bei den Tieren dieser Studie.
Die Kombination beider Therapeutika führte dazu, dass unerwünschte Ereignisse an Ausmaß und Häufigkeit zunahmen. Übereinstimmend war der behandlungsbedingte Gewichtsverlust bei den Avataren im Kombinationstherapiearm am stärksten (Abb. 29). Die Symptome ließen sich durch das Bereitstellen von eingeweichtem Futter nur begrenzt kompensieren. Als Begründung für das gestörte Verhalten (Aggressivität, sozialer Rückzug, Bewegungsstörungen) einiger Tiere sind zum einen 5-FU- [55, 60] oder Panobinostat-vermittelte [148, 149], neurotoxische Effekte und zum anderen eine Schmerzsymptomatik denkbar. Darüber hinaus konnten stereotype Bewegungen (Kreisen um sich selbst) von mehreren Tieren festgestellt werden, die in Panobinostat-Monotherapie behandelt wurden.
Betrachtet man die vorzeitig verstorbenen Mausavatare, wird die starke Toxizität besonders deutlich (Tabelle 10). Von den zwölf gelisteten Tieren verstarben zehn noch innerhalb der Therapiephase. Unter den toxischen Todesfällen waren nur zwei Tiere, die ausschließlich mit Panobinostat behandelt wurden, sodass 5-FU diesbezüglich ein größerer Stellenwert beigemessen werden kann. Die Avatare im 5-FU-Monotherapiearm von HROC239 und HROC285 verstarben trotz einer Therapiepause, die aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustands vorgenommen wurde.

Tabelle 10 *Auflistung vorzeitig verstorbener Mausavatare*

HROC-Avatar	Subtyp	Therapie	5-FU-Dosierung
24 fT3 M11	MSI-H	K	B
32 fT3 M4	CIN	P	B
39 fT2 M2	CIN	K	B
54 fT2 M1-M4	CIMP-H	5-FU, P, K, Kontrolle	A
80 fT3 M19	CIN	5-FU	A
86 fT2 M2	CIN	5-FU	B
239 fT2 M1	CIN	5-FU	B
250 fT3 M4	CIN	K	B
285 fT1 M2	LS	5-FU	A

fTx: Transfergeneration, Mx: Nummerierung der Maus, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, LS: Lynch Syndrom, K: Kombination, P: Panobinostat, A: Behandlung mit 30 mg/kg KG 5-FU, B: Behandlung mit 20 mg/kg KG 5-FU

Auffallend ist dabei, dass die Dosisreduktion von 5-FU nicht den gewünschten Erfolg gezeigt hat. Im Fall von HROC54 verstarben alle vier Avatare mitsamt Kontrollmaus. Die Tiere wurden in einem gemeinsamen Käfig gehalten, was vermuten lässt, dass neben therapie-assoziierten Faktoren auch eine Infektion als Ursache infrage kommen könnte.
Die Summe aus starker Toxizität und geringer wachstumshemmender Wirkung spiegelt sich in den Kaplan-Meier-Kurven wider. In den Monotherapiearmen und dem Kombinations-therapiearm konnten gegenüber der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben festgestellt werden. Darüber hinaus konnte durch die Dosisreduktion kein Vorteil im Gesamtüberleben erzielt werden (Abb. 31). Überraschenderweise wurden in der

Panobinostat-Gruppe keine unerwarteten Todesfälle während der Therapiephase verzeichnet, obwohl der durchschnittliche Gewichtsverlust in etwa dem der 5-FU-Monotherapiegruppe entsprach (Abb. 29). Diese Tatsache wird insbesondere durch eine anfängliche Überlegenheit des Panobinostat-Therapiearms in der Überlebensanalyse repräsentiert. Im Zeitraum der Nachbeobachtung (ab Tag 28) lässt sich in den Mono- und Kombinationstherapiegruppen ein positiver Überlebenstrend gegenüber dem Kontrollarm erkennen. Dies kann mit einer Erholung der Tiere nach Abschluss der Therapie begründet werden, was sich ebenfalls im Gewichtsverlauf widerspiegelt. Hier scheint der wachstumshemmende Aspekt der Therapeutika die Toxizität zu überwiegen. Bei den Avataren des 5-FU-Therapiearms kam es bereits drei Tage nach der letzten Applikation zu einer Gewichtszunahme, während das Gewicht der Panobinostat- und Kombinationstiere von Tag 18 auf 21 weiter abnahm. Vermutlich ist diese Beobachtung auf die unterschiedlichen Halbwertszeiten von 5-FU mit 10–15 min [60] und Panobinostat mit 37 h [54] zurückzuführen, sodass die Erholung der Tiere, die Panobinostat erhielten, folglich später einsetzte. Beim Gewichtsverlauf der Kontrolltiere zeigte sich wiederum eine zunehmende Gewichtsreduktion in der Nachbeobachtung (Tag 28 bis 49), die als ein Ausdruck für das rasante Tumorwachstum gedeutet werden kann, analog zum Gewichtsverlust bei konsumierender Erkrankung.

In anderen PDX-Therapiestudien [125, 131] wird dagegen von guter Verträglichkeit und Wirksamkeit bei der Behandlung von NSG-Mäusen mit 5-FU berichtet, wobei andere Therapieschemata verwendet und geringere kumulative Dosen verabreicht wurden. In Kombination mit einem Pan-HDACi (Belinostat) dokumentierten auch Tumber et al. [94] toxische Reaktionen bei der Therapie von PDX-Modellen. Ergebnisse von Maschauer et al. [118] lassen die Vermutung zu, dass NMRI-Foxn1$^{nu/nu}$ für eine Panobinostat-Anwendung der geeignetere Stamm ist. Sie verabreichten den PDX-Avataren eine tägliche Dosis von 10 mg/kg KG für bis zu vier Wochen. Jedoch ließ sich bei den Tieren mit einem CRC-Tumor weder eine wachstumshemmende noch eine antiangiogenetische Wirkung nachweisen. Mäuse mit hepatozellulärem Karzinom zeigten hingegen eine gewisse Sensitivität gegenüber Panobinostat. Die PDX-Tumore wurden aber in beiden Fällen nur aus einer Zellkultur generiert, was die Übertragbarkeit erheblich einschränkt.
An dieser Stelle wird zugleich ein grundsätzliches Problem von PDX-Therapiestudien deutlich. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist aufgrund der Verwendung verschiedener Tumormodelle, Mausstämme und Therapieschemata nur bedingt möglich. Dieser Umstand verleitete zur Durchführung einer PDX-Dosisfindungsstudie [74], in der verschiedene 5-FU-Therapieprotokolle hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Toxizität im NSG-Modell verglichen wurden. Dabei wurde festgestellt, dass orale Dosierungsschemata mit dem Prodrug Capecitabin von den NSG-Mäusen besser als Therapieregime mit intraperitonealer Applikation vertragen wurden. Die orale Therapie ging zwar mit einem höheren Applikationsaufwand einher, doch war sie in Hinblick auf die Balance zwischen antitumoraler Wirksamkeit und Toxizität den anderen Protokollen überlegen.
In der adjuvanten Therapie von CRC-Patienten konnte gezeigt werden, dass Capecitabin im Vergleich zum infusionalen 5-FU/LV eine gleichwertige Wirksamkeit hat, aber mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist [150]. In Kombination mit Oxaliplatin (XELOX vs. FOLFOX), liegen die Unterschiede eher im Toxizitätsspektrum. Während beim XELOX-Schema häufiger Diarrhoe, Thrombozytopenien und das Hand-Fuß-Syndrom auftreten, werden beim FOLFOX-Regime vermehrt Neutropenien und Neuropathien beobachtet [151, 152]. Unter den infusionalen Therapieprotokollen weisen Bolus-Applikationen ein schlechteres Toxizitätsprofil auf und sind den Dauerinfusionen diesbezüglich deutlich unterlegen [41]. Langsame, intravenöse oder intraperitoneale Infusionen über Stunden lassen sich im Mausmodell kaum realisieren. Mit der Gabe von niedrigdosiertem 5-FU/LV bei verkürzten Applikationsintervallen wurde in der Dosisfindungsstudie versucht, ein solches Regime nachzubilden. Tatsächlich hatte dies eine bessere Verträglichkeit zur Folge. Das Tumorwachstum wurde dagegen nur geringfügig beeinflusst.
Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NSG- gegenüber NMRI-Foxn1$^{nu/nu}$-Mäusen signifikant niedrigere DPYD-Spiegel aufweisen, die sich nach der Behandlung sogar weiter verringerten. Die beobachtete stammspezifische Arzneimittelempfindlichkeit stellt folglich eine

überzeugende Erklärung für die starke 5-FU-Toxizität dar, die sich in dieser Arbeit präsentierte. Auch ist es wahrscheinlich, dass die weitreichende Immundefizienz der NSG-Mäuse zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber anderen Chemotherapeutika führt. Die dokumentierten Panobinostat-assoziierten Nebenwirkungen bekräftigen diese Annahme.
Demnach ist (II) zweitens der NSG-Stamm als weiterer hauptsächlicher Problemfaktor in diesem Projekt zu bewerten. Der Engraftment-Vorteil dieses Stamms muss gegen die eingeschränkte Eignung für experimentelle Chemotherapieansätze abgewogen werden. Demzufolge sollten in der Vorbereitung künftiger Studien im PCT-Format mögliche pharmakogenetische Unterschiede zwischen den Mausstämmen berücksichtigt werden.

Die Dosierung von Chemotherapeutika erfolgt in der Klinik anhand der Körperoberfläche (BSA) des Patienten. Obwohl die pharmakokinetische Begründung und Zuverlässigkeit dieser Methode angezweifelt wird, ist die BSA-basierte Berechnung nach DuBois und DuBois aus dem Jahr 1916 am weitesten verbreitet [153, 154]. Für die klinische Einordnung der in diesem Projekt verwendeten Dosierungen erscheint ein Vergleich zwischen den Spezies naheliegend. Der Größenunterschied zwischen Mensch und Maus lässt sich allerdings nicht proportional in physiologische Parameter übersetzen, weil häufig eine allometrische Beziehung vorliegt [155]. Durch den vergleichsweise schnellen Metabolismus vertragen Mäuse in der Regel höhere Dosen eines Arzneimittels [156]. Umso erstaunlicher ist das Ergebnis, wenn man die in der aktuellen S3-Leitlinie [41] aufgeführten 5-FU-Schemata umrechnet. In Tabelle 11 wurde die wöchentliche Gesamt-5-FU-Dosis gemäß der drei aufgeführten, infusionalen 5-FU-/FS-Protokolle, angelehnt an das mittlere Erkrankungsalter beim CRC, für einen durchschnittlichen 70- bis unter 75-jährigen Menschen [157] berechnet. Bei einer Größe von 170 cm und einem Gewicht von 77,4 kg wurde eine BSA von 1,89 m^2 nach DuBois ermittelt.

Tabelle 11 Beispielhafte 5-FU-Dosisberechnung

Infusionales 5-FU-/FS-Schema	5-FU-Dosis pro Woche*
LV5FU2: FS (200 mg/m^2 als 2-Stunden-Infusion, Tag 1 und 2) + 5-FU (400 mg/m^2 als Bolus, danach 600 mg/m^2 als 22-Stunden-Infusion; Tag 1 und 2) ein Zyklus umfasst zwei Wochen, insgesamt zwölf Zyklen	2 × 1890 mg ≙ 2 × 24 mg/kg KG
5-FU/FS: FS (500 mg/m^2 als 1-bis-2-Stunden-Infusion) + 5-FU (2600 mg/m^2 als 24-Stunden-Infusion) einmal pro Woche über sechs Wochen (Tag 1, 8, 15, 22, 29, 36). Erneuter Beginn der Therapie in Woche 9 (Tag 50), insgesamt zwei Zyklen.	1 × 4914 mg ≙ 1 × 64 mg/kg KG
venöse 5-FU-Dauerinfusion: 5-FU als Dauerinfusion über insgesamt zwölf Wochen (300 mg/m^2/Tag)	7 × 567 mg ≙ 7 × 7 mg/kg KG

*Berechnung für einen Beispielpatienten (170 cm, 77,4 kg, BSA: 1,89 m^2), FS: Folinsäure

Es ist zu erkennen, dass im vorliegenden Projekt eine 5-FU-Dosis verwendet wurde, die nicht oder nur geringfügig höher ist (3 × 20 mg/kg KG pro Woche) als die für CRC-Patienten übliche Dosis und sich in einer klinisch relevanten Größenordnung bewegt. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass infusionales 5-FU beim Menschen mit Folinsäure kombiniert wird, was sowohl die Effektivität als auch Toxizität steigert [54].
Im Fall von Panobinostat wurde sich an der verfügbaren Literatur [93, 117, 118] orientiert und eine Dosis von 10 mg/kg KG ausgewählt. Beim Menschen beträgt die empfohlene Anfangsdosis 20 mg oral als Einzeldosis dreimal wöchentlich für zwei Wochen eines 21-tägigen Zyklus [158]. Dies lässt sich aber nicht unverändert auf ein Mausmodell übertragen, weil pharmakokinetischen Unterschiede infolge der Größendifferenz und Applikationsform bestehen, die bei der Ermittlung einer tierischen Äquivalenzdosis berücksichtigt werden müssen [155]. Diese Beispiele veranschaulichen, welche Schwierigkeiten sich bei der Berechnung von Äquivalenzdosen zwischen den Spezies ergeben.

Entsprechend den Ergebnissen der Dosisfindungsstudie empfiehlt es sich deshalb, im Vorfeld ein geeignetes Therapieregime zu ermitteln. Ein solches Vorgehen birgt ebenfalls die Option, individuelle Therapieprotokolle und Dosisanpassungen zu evaluieren. So ist aus klinischen Studien [64, 159] bekannt, dass die Toxizität von 5-FU von dessen Plasmakonzentration abhängig ist und individualisierte Behandlungspläne die Therapieeffektivität sowie Verträglichkeit steigern können.

(III) Drittens lässt sich das Monitoring des Tumorwachstums durchaus verbessern. Anders als beim haarlosen NMRI-Mausstamm wird die Messung der Tumorgröße bei NSG-Mäusen dadurch erschwert, dass die Konturen des subkutan wachsenden Tumors vom Fell bedeckt sind. Zugleich erhöhen Bewegungen und Abwehrverhalten die Wahrscheinlichkeit für Messfehler. Solche Messungenauigkeiten sind auch der wahrscheinliche Grund für einen sprunghaften Volumenverlauf, der sich in der Auswertung des Tumorwachstums einiger HROC-Gruppen präsentiert. Ausgeprägt zeigt sich dies vor allem im Panobinostat-Monotherapiearm von HROC50 (Abb 22), HROC54 (Abb. 19) und HROC86 (Abb. 14) sowie im Kombinationstherapiearm von HROC71 (Abb. 25) und HROC245 (Abb. 27). Die Messungen wurden bevorzugt vom selben Untersucher vorgenommen. Weil dies nicht immer möglich war, kann ein gewisser Einfluss durch die Interobserver-Variabilität angenommen werden.
Eine genauere Abschätzung des Tumorvolumens kann beispielweise durch die Bestimmung von zwei Tumorachsen erzielt werden, wie es bei Rivera et al. [127] und anderen [94, 124] Anwendung findet. Dies führt allerdings auch zur Verlängerung des Messvorgangs und der gelegentlich notwendigen Fixierung. Die Volumenbestimmung ist durch die Messung von Länge und Breite des PDX-Tumors insbesondere dann deutlich exakter, wenn der Tumor keine rundliche Form entwickelt. Unter den explantierten Tumoren zeigten einige eine eher längliche Gestalt, wobei in einem Fall ein hantelförmiger Tumor explantiert wurde (HROC32, Kontrolltier). Vermutlich wurden hierbei versehentlich zwei zusammenhängende Tumorstücke implantiert, die sich als subkutaner Doppeltumor präsentierten. Auch aufgrund dieser Beobachtungen wurden PDX-Tumore in nachfolgenden Projekten zweiachsig vermessen.
Bei einer Verfügbarkeit stellt der Einsatz von moderner Kleintierbildgebung eine Alternative dar. Mithilfe von Mikro-MRT und Hybridverfahren (PET-CT/MRT) können Tumorvolumina genauestens bestimmt und gleichzeitig biochemische Prozesse dargestellt werden. Die Mikro-MRT ist besonders dazu geeignet, das Tumorwachstum unter Therapie zu überwachen und Informationen betreffend Tumordifferenzierung, Sauerstoffversorgung und Angiogenese zu gewinnen [160]. Nachteile sind, dass diese Verfahren eine Allgemeinanästhesie und Fixation der Tiere voraussetzen, dazu zeitaufwendig und kostenintensiv sind.
Darüber hinaus erreichten im vorliegenden Ansatz einige PDX-Tumore bereits innerhalb der Therapiephase das zuvor festgelegte Explantationsvolumen von über 700 mm^3, womit ein Abbruchkriterium erfüllt wurde. Der Vergleich aller vier Behandlungsarme war deshalb zu späteren Zeitpunkten nicht mehr möglich. Infolgedessen wurde das Startvolumen für weitere In-vivo-Studien auf ≥ 125 mm^3 und das Explantationsvolumen auf ≥ 1500 mm^3 standardisiert. Das neu festgesetzte, größere Explantationsvolumen verlängert das Zeitintervall für die Beobachtung der Wachstumsdynamik, während es nur eine geringere Mehrbelastung für das Versuchstier bedeutet. Als Abbruchkriterium definiert, wird das Tierwohl dahingehend geschützt, dass zu hohe Tumorvolumina vermieden werden, die zu Bewegungseinschränkungen und vermehrtem Stress führen.

7.3 Expressionsanalyse der Biomarker

In der Behandlungsstrategie des mCRC sind Informationen über den RAS- und BRAF-Mutationszustand sowie den Mikrosatellitenstatus essenziell für die Zusammenstellung der Chemotherapie [41]. Im Frühjahr 2022 wurde das therapeutische Spektrum mit der Zulassung von Pembrolizumab erweitert, sodass der PD1-Inhibitor nun in Erst- und Zweitlinientherapie des MSI-CRC zum Einsatz kommt [161]. Auch wird der HER2-Status zunehmend bedeutsam und kann in Zukunft neue Behandlungschancen eröffnen [121, 124, 162, 163]. Diese Entwicklung verdeutlicht das große Interesse an therapierelevanten Biomarkern. Dabei ist die Identifikation

solcher Marker in zweierlei Hinsicht erstrebenswert: Einerseits können neue zielgerichtete Ansätze entwickelt und andererseits der Einsatz von Wirkstoffen vermieden werden, gegen die wahrscheinlich eine Chemoresistenz besteht [70]. Durch eine kombinierte Bewertung mehrerer Biomarker kann eine bessere Vorhersage erzielt werden [52]. Von einer Abklärung der erwähnten Faktoren profitiert bisher nur ein kleines CRC-Patientenkollektiv, doch ist das Vorkommen von angeborenen oder erworbenen Resistenzen gegen Standard- und Zweitlinienchemotherapeutika weit verbreitet, was die Notwendigkeit neuer therapiebezogener Indikatoren unterstreicht [78, 92].
In Tabelle 12 sind die Biomarker aufgeführt, die neben DPYD in der Ex-vivo-Analyse der PDX-Tumore untersucht wurden. Zudem ist eine Einordnung ihrer Funktion im Kontext des CRC aufgeführt.

Tabelle 12 *Ausgewählte Biomarker und ihre Funktion*

Biomarker	Funktion
CXCR4	Beim CRC ist der Chemokin-Rezeptor CXCR4 an der Tumorgenese und Metastasierung sowie in Verbindung mit der Tumormikroumgebung an der Arzneimittelresistenz beteiligt [103]. Laut Ottaiano et al. [102] korreliert die CXCR4-Expression mit dem Ansprechen auf die Erstlinienchemotherapie bei mCRC-Patienten.
DSE	Das DSE-Gen (auch als SART-2 oder DS-epi1 bekannt) kodiert ein Enzym, das bei der Synthese von Dermatansulfat (DS) eine Rolle spielt und bei einer Vielzahl von Plattenepithel- und Adenokarzinomen diverser Entitäten nachweisbar ist [101, 105]. Kolorektales Tumorgewebe weist erhöhte DS-Werte auf. Weil Glykosaminoglykane wie DS mit der Genese und Progression von Tumoren assoziiert werden, stellen die involvierten Enzyme potenzielle Ziele der Chemotherapie dar [100].
FGF9	FGF9 wird insbesondere in höheren CRC-Stadien überexprimiert und als Akteur im Wnt/β-Catenin-Signalweg mit der Chemoresistenz gegenüber der Standard- und anti-EGFR-Therapie in Verbindung gebracht [52, 98, 99, 104].
IGFBP7	Über p53 und Signalachsen, wie TGFβ/SMAD, ist IGFBP7 in wesentlichen Abläufen der Onkogenese involviert, darunter Proliferation, Differenzierung und Metastasierung. Verschiedene Studien belegen ein erhöhtes Expressionslevel in kolorektalen Karzinomen [112]. Im Gegensatz dazu zeigten Suzuki et al. [113], dass CIMP-Tumore mit einer epigenetischen Inaktivierung des Gens assoziiert sind. Beim NSCLC und der T-ALL wurde ein Zusammenhang mit Chemoresistenz festgestellt [109, 110]. In einer CRC-PDX-Studie [97] konnte das Tumorwachstum durch die Behandlung mit rekombinantem IGFBP7 vollständig unterdrückt werden. IGFBP7 werden multifunktionale, vermeintlich widersprüchliche Eigenschaften zugeschrieben, die noch weitgehend unverstanden sind [111].
NRP1	Die Funktionen von NRP1 betreffen unter anderem die Immunantwort, Zellmigration und Invasion sowie die Angiogenese [108]. Während eine Überexpression die Metastasierungsfähigkeit von CRC-Zellen fördert [107], kann eine gezielte NRP1-Blockade die 5-FU-Chemosensitivität von Karzinomzellen erhöhen [106].

Es wurde untersucht, ob diese Faktoren mit dem beobachteten Therapieansprechen im NSG-Mausmodell assoziiert werden können. Den Ergebnissen der Expressionsbestimmung (Abb. 32) ist zu entnehmen, dass sich die Expressionslevel der sechs Biomarker zwischen den vier Behandlungsarmen nicht wesentlich unterscheiden. Auch konnten in der einfaktoriellen ANOVA keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Folglich lässt sich kein Effekt der Therapeutika 5-FU und Panobinostat auf die ausgewählten Biomarker feststellen, auf dessen Grundlage sich Aussagen zum Therapieansprechen ableiten lassen. Im Durchschnitt waren die Expressionslevel der Biomarker CXCR4, DPYD, FGF9 und NRP1 im untersuchten

Gewebe sehr niedrig (hohe dCT-Werte). Angesichts dieser Expressionsergebnisse ist der Einfluss folgender Aspekte in Erwägung zu ziehen.
Analog zum Engraftmentversagen stellt die Verwendung von nekrotischem Gewebe bei der RNA-Isolation eine naheliegende Fehlerquelle dar. Für die Isolation wurden sehr kleine Tumorstücke (ca. 20 mg) benötigt, die zuvor durch Zertrümmern des gefrorenen Gewebes gewonnen wurden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Tumorfragmente mit nekrotischen Anteilen verarbeitet wurden. Dieser Verdacht wird durch die Tatsache gestützt, dass von den 117 Proben 19 (16 %), aufgrund einer zu geringen Menge an RNA (< 100 ng/µl), nicht für die nachfolgende cDNA-Synthese verwendet werden konnten.
Ein weiterer Grund für die niedrigen Expressionslevel könnte darin liegen, dass die ausgewählten Biomarker im untersuchten Gewebe schlichtweg nicht oder nur sehr geringfügig exprimiert wurden. Im Fall von FGF9 zeigen nur etwa 4–6 % aller CRC-Tumorproben eine vermehrte Amplifikation [104], womit ein Nachweis bei der Anzahl von 34 HROC-Tumoren von 32 Patienten (Anhang) unwahrscheinlich ist.
Studien zur Expression von IGFBP7 im CRC kommen zu unterschiedlichen und, in Bezug auf die Abhängigkeit vom Tumorstadium, zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. In einigen Arbeiten wird sogar von fehlender bzw. einer Herunterregulierung der IGFBP7-Exression berichtet [112]. Der Methylierungsstatus scheint dabei maßgeblich an der Expressionsregulation beteiligt zu sein [113]. In der ergänzenden Expressionsauswertung (Anhang) konnten bei IGFBP7 hoch signifikante Unterschiede ($p = 0{,}0008$) zwischen den molekularen Subtypen festgestellt werden. Dabei zeigten die CIN- und CIMP-H-Gruppe höhere Expressionslevel (niedrigere dCT-Werte) als die MSI-Gruppe (MSI-H und LS), was den Ergebnissen von Suzuki et al. [113] widerspricht.
Bei den Biomarkern DPYD, DSE und FGF9 wurden in der ergänzenden Auswertung ebenfalls signifikant unterschiedliche Expressionslevel festgestellt. Dies verdeutlicht die molekulare Heterogenität von CRC-Tumoren. Weil die Proben jedoch unabhängig von der Therapiegruppe ausgewertet wurden, kann ein therapiebedingter Einfluss nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Deshalb bietet sich eine differenzierte und umfangreiche Untersuchung von unbehandelten PDX-Tumoren an, um diese Ergebnisse zu verifizieren.
Es ist außerdem fraglich, inwiefern CRC-Tumore mit einer Hochregulation der NRP1-Expression assoziiert sind. Eine vergleichende Analyse des NRP1-Expressionsprofils im CRC-Tumor- und im gesunden Gewebe ergab, dass die mRNA-Spiegel in CRC-Tumoren niedriger waren [107].
Für die Quantifizierung der Expression eines Biomarkers ist die Art des Nachweisverfahrens auschlaggebend. Eine hohe Transkriptionsaktivität bedeutet nicht zwangsläufig eine gesteigerte Synthese von Proteinen. Vielmehr ist die Translation in eine Verflechtung von Regulationsmechanismen eingebunden, die zu einer starken Diskrepanz zwischen dem Level von mRNA und dessen Produkt führen kann. Zum Beispiel ist vom klinisch etablierten Marker PAI-1 bekannt, dass die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression nicht die Antigenspiegel im Gewebe des Mammakarzinoms widerspiegelt [164, 165].
Um Aussagen über die tatsächliche Expression von aktiven Proteinen zu treffen, sind Immunassays folglich die geeignetere Methode. Dies wird vor allem beim Biomarker DPD deutlich. So war in diesem Projekt die Expressionsbestimmung des DPD Gens (DPYD) nicht zielführend, um Unterschiede im Therapieansprechen festzustellen. In der Dosisvergleichsstudie [74] hingegen wurden die DPD-Plasmalevel der NSG-Tiere mittels ELISA ermittelt, wodurch aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Plasmaspiegel wurden mit denen anderer Laborstämme verglichen und signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt. Dieses Vorgehen ließe sich in künftigen Projekten fernerhin auf den Vergleich von Therapiearmen übertragen. Bemerkenswerterweise waren die DPYD-Expressionslevel zwischen den molekularen Subtypen in der ergänzenden Analyse (Anhang) hoch signifikant ($p < 0{,}0001$). Die MSI-H-Gruppe zeigte dabei im Mittel die höchsten Expressionslevel. In Anbetracht der Tatsache, dass DPD im 5-FU-Metabolismus als Schlüsselenzym fungiert, kann eine erhöhte Expression im Tumorgewebe zu einer verstärkten intra-tumoralen Inaktivierung von 5-FU führen und somit zur Chemoresistenz beitragen [166, 167].

Alternativen zur qPCR sind auch bei der Analyse von CXCR4 und DSE beschrieben. Ottaiano und Kollegen [102] nutzten ein immunhistochemisches Verfahren, um eine CXCR4-Expression in CRC-Gewebeschnitten zu quantifizieren. Den Enzymspiegel von DSE (SART-2) bestimmten Sasatomi et al. [105] mittels Western Blot, während Kalathas et al. [100] mit Western Blot und qPCR zwei Verfahren kombinierten, um die Expression der Schlüsselenzyme von Dermatansulfat auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen.
Reduziert auf die Essenz dieser Erläuterung, ist die Wahl eines geeigneten Nachweisverfahrens mindestens genauso entscheidend wie die Auswahl von erfolgsversprechenden Markern. Auch wenn es in diesem Setting nicht gelungen ist, anhand der ausgewählten Marker Unterschiede im Therapieansprechen zwischen den Therapiegruppen festzustellen, ist das PDX-Format ein wertvoller Ansatz, um den Weg für biomarkergesteuerte Arzneimittelentwicklung zu ebnen [78, 79, 124]. Kiweler und Kollegen [30] zeigten, dass HDAC2 die Apoptoseresistenz gegenüber 5-FU von MSI-positiven CRC-Zellen in vitro und im NSG-Modell moduliert, und sie definierten neue pharmakologische Angriffspunkte. Diese Erkenntnis sowie eine mögliche MSI-H-spezifische Erhöhung der DPD-Expression könnten die unbeantwortete Frage klären, ob der Nutzen einer Standardchemotherapie bei CRC-Patienten mit MSI-Tumoren überwiegt.

8 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist die am dritthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [1]. Wie bei anderen Malignomen handelt es sich hierbei um ein heterogenes Krankheitsbild, bei dem molekulare Subklassen definiert werden [11, 12, 13]. Unterschiede im molekularen Profil haben klinische Relevanz für die Therapie und den Krankheitsverlauf. Sekundärpräventive Programme und personalisierte Therapiestrategien erwiesen sich zwar als effektive Mittel im Kampf gegen Darmkrebs [40, 53, 121, 168], doch liegt in der chemotherapeutischen Behandlung großes Optimierungspotenzial. Der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie in Stadium II ist umstritten [49, 56]. Zudem wird ein Großteil der Patienten in Stadium III einer unnötigen Behandlungstoxizität ausgesetzt [47]. Im metastasierten Krankheitsstadium konnte die mittlere Überlebenszeit durch eine kombinierte Anwendung von zytotoxischen und zielgerichteten Wirkstoffen deutlich gesteigert werden, die Heilungschancen sind jedoch äußerst gering [51, 52, 53]. Im präklinischen Setting ist das PDX-Modell ein idealer Ausgangspunkt für die Prüfung konventioneller und neuer Chemotherapeutika, weil histologische, genetische und stromale Eigenschaften des humanen Tumors über mehrere Passagen hinweg erhalten bleiben [71, 72]. Klinische PDX-Studien (PCT) repräsentieren die Heterogenität der Patientenpopulation und erzielen Ergebnisse mit hoher klinischer Übereinstimmung [79, 80,122, 123, 124, 125]. Im vorliegenden Projekt wurde das Engraftment individueller CRC-Tumore der HROC-Kollektion im NSG-Mausmodell analysiert. Im Stile einer PCT sollten überdies das Standardtherapeutikum 5-FU und der Histon-Deacetylase-Paninhibitor (HDACi) Panobinostat (LBH589) auf ihre wachstumshemmende Wirkung hin untersucht werden. Dabei sollte auch geklärt werden, welchen Einfluss die molekularen Subgruppen auf das Engraftment und Therapieansprechen haben und ob ausgewählte Biomarker mit der Chemosensitivität korrelieren. Nach erfolgreichem Engraftment wurden die PDX-Mäuse randomisiert und einem von vier Behandlungsarmen zugeteilt, bestehend aus Kontrollgruppe (0,9 % NaCl), Monotherapie mit 5-FU (Dosisreduktion von 30 auf 20 mg/kg KG i. p.) bzw. mit Panobinostat (10 mg/kg KG i. p.) und der Kombination beider Wirkstoffe. Die Applikation erfolgte dreimal wöchentlich, insgesamt neunmal. Die Tumorgröße wurde mehrmals wöchentlich mit einem digitalen Messschieber bestimmt. Aufgrund eines begrenzten Therapieansprechens und der hohen Toxizität, die im Zuge der Behandlung auftrat und auch nach der Dosisreduktion von 5-FU zu verzeichnen war, wurde das geplante Vorhaben abgebrochen. Es folgte die Auswertung der bis dahin erhobenen Daten und die Durchführung einer 5-FU-Dosisfindungsstudie [74].
Eine optimierte Methodik und die Verwendung des stark immundefizienten NSG-Mausstamms gewährleisteten ein effizientes Engraftment des zuvor kryokonservierten Tumorgewebes. Mit 82,4 % konnte eine Engraftmentrate erzielt werden, die die Transplantationsraten anderer Modelle übertraf [69, 116, 128]. Die Transplantation von mikrosatelliteninstabilen (MSI) Tumoren war gegenüber den Mikrosatellitenstabilen (MSS) tendenziell häufiger erfolgreich und ihre Anwachszeit signifikant kürzer als die der anderen Subklassen. Folglich sollte eine mögliche Überlegenheit von MSI-Tumoren im Kontext des Biobankings berücksichtigt werden. Aus den Verlaufskurven einzelner PDX-Gruppen konnte ein gewisser 5-FU-vermittelter wachstumshemmender Therapieeffekt abgeleitet werden. Mit HROC82 (CIN) wurde ein potenzieller HDACi-Responder identifiziert. Die folgenden Faktoren wurden als hauptsächliche Problempunkte bei der Umsetzung dieser Therapiestudie bewertet: das gewählte Behandlungsschema, die sich überschneidenden Toxizitätsprofile von 5-FU und Panobinostat sowie eine vermutlich erhöhte Vulnerabilität des NSG-Stamms gegenüber Chemotherapeutika. Analog zu den Ergebnissen der Dosisfindungsstudie empfiehlt es sich in der Vorbereitung künftiger PDX-Studien, stammspezifische pharmakogenetische Eigenschaften zu untersuchen und ein geeignetes Therapieregime zu ermitteln. Die Expressionsbestimmung der ausgewählten Biomarker führte zu keinem Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Chemosensitivität.
Trotz der unvollständigen Studienrealisierung zeigt die vorliegende Arbeit, dass mit dem NSG-Mausmodell humanes Tumormaterial höchst effizient vervielfacht werden kann. Außerdem bietet das beschriebene Vorgehen, bei geeignetem Therapieprotokoll, eine reelle Chance für die personalisierte Echtzeitanwendung bei der Behandlung des CRC.

9 Thesen

1. Das PDX-Modell ist ein wichtiger Ausgangspunkt für die Tumorforschung, weil histopathologische, genetische und stromale Eigenschaften des humanen Primärtumors erhalten bleiben.

2. Klinische PDX-Studien (PCTs) können den Verlauf und das Therapieansprechen von Patienten prognostizieren.

3. Die HROC-Xenobank reproduziert die Heterogenität der deutschen CRC-Population.

4. PDX-Modelle können als Plattform für die Identifikation von Biomarkern und die biomarkergesteuerte Arzneimittelentwicklung fungieren.

5. Der Erfolg von Xenotransplantationen wird durch das Ausmaß der Immunsuppression des eingesetzten Mausmodells beeinflusst.

6. Der NSG-Mausstamm erzielt sehr hohe PDX-Engraftmentraten (> 80 %) und ermöglicht die effiziente Vervielfachung von Tumorgewebe für das Biobanking.

7. Die ermittelte Anwachsdauer der HROC-Tumore von durchschnittlich zwei Monaten (55 ± 35 Tage) ermöglicht eine Echtzeitanwendung personalisierter Therapiestrategien.

8. Das molekulare Profil von CRC-Tumoren wirkt sich auf die Engraftmentrate und die Anwachsdauer im PDX-Modell aus.

9. CRC-Tumore mit MSI-H sind den MSS-Tumoren im Kontext des Xenografting überlegen, was sich durch eine höhere Engraftmentrate und eine kürzere Anwachsdauer zeigt.

10. Der Engraftmentvorteil von MSI-H-Tumoren kann zu deren Überrepräsentation in PDX-Sammlungen führen.

11. Die Chemotherapeutika 5-FU und Panobinostat zeigen eine wachstumshemmende Wirkung auf individuelle PDX-Tumore im NSG-Mausmodell.

12. NSG-Mäuse haben eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber 5-FU, die zu einer starken behandlungsbedingten Toxizität führt.

13. Eine Kombinationstherapie von NSG-Mäusen mit 5-FU und Panobinostat ist mit einer erhöhten Toxizität verbunden, weil sich die Nebenwirkungsprofile beider Wirkstoffe überschneiden.

14. Aufgrund einer wahrscheinlich erhöhten, stammspezifischen Vulnerabilität gegenüber Chemotherapeutika ist die Eignung des NSG-Mausstamm für Arzneimittelstudien anzuzweifeln.

15. Bei der Planung von PDX-Studien im PCT-Format sollten ein geeignetes Mausmodell und Therapieregime ermittelt werden.

10Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein modifiziert.....7
Abbildung 2 Strategie der personalisierten Medizin 13
Abbildung 3 Schematische Darstellung Nucleosom. 14
Abbildung 4 Applikation der Anästhetika und Injektion des RFID-Responders..... 23
Abbildung 5 Tumorimplantation 24
Abbildung 6 Therapieschema 25
Abbildung 7 Beispielhafte Fotografien explantierter Tumore 26
Abbildung 8 Zyklusdiagramm der qPCR 28
Abbildung 9 Prozentuale Anteile der CIN- und CIMP-H Gruppe (MSS) sowie der MSI-Gruppe (MSI-H + LS) 32
Abbildung 10 Engraftmentzeit (t_E) 33
Abbildung 11 Verlauf der Tumorvolumina von HROC32, HROC39 und HROC46..... 34
Abbildung 12 Verlauf der Tumorvolumina von HROC62, HROC69 und HROC72Met1..... 35
Abbildung 13 Verlauf der Tumorvolumina von HROC80, HROC82 und HROC86..... 36
Abbildung 14 Verlauf der Tumorvolumina von HROC100, HROC103 und HROC103Met1 37
Abbildung 15 Verlauf der Tumorvolumina von HROC107, HROC222 und HROC239..... 38
Abbildung 16 Verlauf der Tumorvolumina von HROC250 und HROC260 39
Abbildung 17 Verlauf der Tumorvolumina von HROC40 39
Abbildung 18 Verlauf der Tumorvolumina von HROC54, HROC60 und HROC92..... 40
Abbildung 19 Verlauf der Tumorvolumina von HROC112Met1 und HROC183 41
Abbildung 20 Verlauf der Tumorvolumina von HROC24 41
Abbildung 21 Verlauf der Tumorvolumina von HROC48, HROC48Met1 und HROC50..... 42
Abbildung 22 Verlauf der Tumorvolumina von HROC53 und HROC170 43
Abbildung 23 Verlauf der Tumorvolumina von HROC29 43
Abbildung 24 Verlauf der Tumorvolumina von HROC71, HROC113 und HROC285..... 44
Abbildung 25 Verlauf der Tumorvolumina von HROC324 45
Abbildung 26 Verlauf der Tumorvolumina von HROC245 45
Abbildung 27 Tumorgewichte der Tumore einer HROC-Gruppe, die zum gleichen Zeitpunkt explantiert wurden 46
Abbildung 28 Gewichtsverlauf der Tiere im jeweiligen Therapiearm 47
Abbildung 29 Gesamtüberlebensanalyse nach Kaplan-Meier 48
Abbildung 30 Überlebensanalyse Kaplan-Meier mit Exklusion der Avatare, die mit der höheren 5-FU-Dosis von 30 mg/kg KG therapiert wurden 48
Abbildung 31 Expressionsbestimmung der Biomarker CXCR4, DPYD, DSE, FGF9, IGFBP7 und NRP1..... 50

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2020 10
Tabelle 2 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2020 11
Tabelle 3 Therapiearme 24
Tabelle 4 Mastermix qPCR 28
Tabelle 5 Übersicht implantierter HROC-Tumore 29
Tabelle 6 Auflistung histopathologisch untersuchter Tumore 30
Tabelle 7 Engraftment der implantierten HROC-Tumore 32
Tabelle 9 Engraftmentzeit (t_E) 33
Tabelle 10 Auflistung vorzeitig verstorbener Mausavatare 56
Tabelle 11 Beispielhafte 5-FU-Dosisberechnung 58
Tabelle 12 Ausgewählte Biomarker und ihre Funktion 60

12 Literaturverzeichnis

[1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660.

[2] M.M. Fidler, I. Soerjomataram, F. Bray, A global view on cancer incidence and national levels of the human development index, Int. J. Cancer. 139 (2016) 2436–2446. https://doi.org/10.1002/ijc.30382.

[3] Robert Koch-Institut, Krebs in Deutschland für 2015 / 2016, Robert Koch Inst. (2019) 160.

[4] V. Das, J. Kalita, M. Pal, Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges, Biomed. Pharmacother. 87 (2017) 8–19. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064.

[5] J.N. Poynter, R.W. Haile, K.D. Siegmund, P.T. Campbell, J.C. Figueiredo, P. Limburg, J. Young, L. Le Marchand, J.D. Potter, M. Cotterchio, G. Casey, J.L. Hopper, M.A. Jenkins, S.N. Thibodeau, P.A. Newcomb, J.A. Baron, Associations between smoking, alcohol consumption, and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18 (2009) 2745–2750. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0517.

[6] M. Stolte, J. Rüschoff, G. Klöppel, Pathologie, 3rd ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02322-4.

[7] G. et al. Herold, Innere Medizin, Herold, Köln, 2020.

[8] N. Rodriguez-Salas, G. Dominguez, R. Barderas, M. Mendiola, X. García-Albéniz, J. Maurel, J.F. Batlle, Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 109 (2017) 9–19. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.11.007.

[9] F. Migheli, L. Migliore, Epigenetics of colorectal cancer, Clin. Genet. 81 (2012) 312–318. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01829.x.

[10] V.B. Fearon ER, A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis, Cell. 61 (1990) 759–767.

[11] J.R. Jass, Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features, Histopathology. 50 (2007) 113–130. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x.

[12] C. Ostwald, M. Linnebacher, V. Weirich, F. Prall, Chromosomally and microsatellite stable colorectal carcinomas without the CpG island methylator phenotype in a molecular classification, Int. J. Oncol. 35 (2009) 321–327. https://doi.org/10.3892/ijo_00000343.

[13] K. Tariq, K. Ghias, Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms, Cancer Biol. Med. 13 (2016) 120–135. https://doi.org/10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.

[14] S. Thiagalingam, S. Laken, J.K.V. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer, Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 2698–2702. https://doi.org/10.1073/pnas.051625398.

[15] M.S. Pino, D.C. Chung, The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer, Gastroenterology. 138 (2010) 2059–2072. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065.

[16] A. Prossomariti, G. Piazzi, C. Alquati, L. Ricciardiello, Are Wnt/β-Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer?, Cmgh. 10 (2020) 491–506. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.04.007.

[17] C. Rosty, J.P. Young, M.D. Walsh, M. Clendenning, R.J. Walters, S. Pearson, E. Pavluk,

B. Nagler, D. Pakenas, J.R. Jass, M.A. Jenkins, A.K. Win, M.C. Southey, S. Parry, J.L. Hopper, G.G. Giles, E. Williamson, D.R. English, D.D. Buchanan, Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features, Mod. Pathol. 26 (2013) 825–834. https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.240.

[18] D. Santini, F. Loupakis, B. Vincenzi, I. Floriani, I. Stasi, E. Canestrari, E. Rulli, P.E. Maltese, F. Andreoni, G. Masi, F. Graziano, G.G. Baldi, L. Salvatore, A. Russo, G. Perrone, M.R. Tommasino, M. Magnani, A. Falcone, G. Tonini, A. Ruzzo, High Concordance of KRAS Status Between Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites: Implications for Clinical Practice, Oncologist. 13 (2008) 1270–1275. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0181.

[19] A. Lièvre, J.B. Bachet, V. Boige, A. Cayre, D. Le Corre, E. Buc, M. Ychou, O. Bouché, B. Landi, C. Louvet, T. André, F. Bibeau, M.D. Diebold, P. Rougier, M. Ducreux, G. Tomasic, J.F. Emile, F. Penault-Llorca, P. Laurent-Puig, KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab, J. Clin. Oncol. 26 (2008) 374–379. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.5906.

[20] P.C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, eds., Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3.

[21] R. Hamelin, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, N. Jego, B. Asselain, Y. Remvikos, J. Girodet, R.J. Salmon, G. Thomas, Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer, Gastroenterology. 106 (1994) 42–48. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(94)94217-X.

[22] A. Leslie, F.A. Carey, N.R. Pratt, R.J.C. Steele, The colorectal adenoma ± carcinoma sequence, (2002) 845–860.

[23] L.D. Wood, D.W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjöblom, R.J. Leary, D. Shen, S.M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P.A. Wilson, J.S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J.K.V. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, H.P. Ben, C.L. Pethiyagoda, P.V.K. Pant, D.G. Ballinger, A.B. Sparks, J. Hartigan, D.R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S.D. Markowitz, G. Parmigiani, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers, Science (80-.). 318 (2007) 1108–1113. https://doi.org/10.1126/science.1145720.

[24] N.C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, Y.F. Weit, K.C. Carter, S.M. Ruben, C.A. Rosen, W.A. Haseltine, R.D. Fleischmann, C.M. Fraser, M.D. Adams, J.C. Venter, M.G. Dunlop, S.R. Hamilton, G.M. Petersen, A. De La Chapelle, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer, Nature. 371 (1994) 75–80. https://doi.org/10.1038/371075a0.

[25] H. Iino, L. Simms, J. Young, J. Arnold, I.M. Winship, S.I. Webb, K.L. Furlong, B. Leggett, J.R. Jass, DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer, Gut. 47 (2000) 37–42. https://doi.org/10.1136/gut.47.1.37.

[26] A. De La Chapelle, H. Hampel, Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer, J. Clin. Oncol. 28 (2010) 3380–3387. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.0652.

[27] C.R. Boland, M. Koi, D.K. Chang, J.M. Carethers, The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside, Fam. Cancer. 7 (2008) 41–52. https://doi.org/10.1007/s10689-007-9145-9.

[28] H. Yamamoto, K. Imai, Microsatellite instability: an update, Arch. Toxicol. 89 (2015)

899–921. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1474-0.

[29] J. Trojan, A. Brieger, J. Raedle, N. Weber, S. Kriener, B. Kronenberger, W.F. Caspary, S. Zeuzem, BAX and caspase-5 frameshift mutations and spontaneous apoptosis in colorectal cancer with microsatellite instability, Int. J. Colorectal Dis. 19 (2004) 538–544. https://doi.org/10.1007/s00384-004-0597-1.

[30] N. Kiweler, H. Schwarz, A. Nguyen, S. Matschos, C. Mullins, A. Piée-Staffa, C. Brachetti, W.P. Roos, G. Schneider, M. Linnebacher, W. Brenner, O.H. Krämer, The epigenetic modifier HDAC2 and the checkpoint kinase ATM determine the responses of microsatellite instable colorectal cancer cells to 5-fluorouracil, Cell Biol. Toxicol. 1 (2022) 1–19. https://doi.org/10.1007/s10565-022-09731-3.

[31] H.T. Lynch, C.L. Snyder, T.G. Shaw, C.D. Heinen, M.P. Hitchins, Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015, Nat. Rev. Cancer. 15 (2015) 181–194. https://doi.org/10.1038/nrc3878.

[32] E. Vilar, S.B. Gruber, Microsatellite instability in colorectal cancerthe stable evidence, Nat. Rev. Clin. Oncol. 7 (2010) 153–162. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.237.

[33] C.R. Boland, Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: An ongoing challenge, J. Clin. Oncol. 25 (2007) 754–756. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.4607.

[34] T. Arai, Y. Esaki, M. Sawabe, N. Honma, K.I. Nakamura, K. Takubo, Hypermethylation of the hMLH1 promoter with absent hMLH1 expression in medullary-type poorly differentiated colorectal adenocarcinoma in the elderly, Mod. Pathol. 17 (2004) 172–179. https://doi.org/10.1038/modpathol.3800018.

[35] D.J. Weisenberger, K.D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T.I. Long, M.A. Faasse, G.H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A.J. French, S.N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile, P.W. Laird, CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer, Nat. Genet. 38 (2006) 787–793. https://doi.org/10.1038/ng1834.

[36] A.M. Deaton, A. Bird, CpG islands and the regulation of transcription, Genes Dev. 25 (2011) 1010–1022. https://doi.org/10.1101/gad.2037511.

[37] J.M. Yi, M. Dhir, L. Van Neste, S.R. Downing, J. Jeschke, S.C. Glockner, M.D.F. Calmon, C.M. Hooker, J.M. Funes, C. Boshoff, K.M. Smits, M. Van Engeland, M.P. Weijenberg, C.A. Iacobuzio-Donahue, J.G. Herman, K.E. Schuebel, S.B. Baylin, N. Ahuja, Genomic and epigenomic integration identifies a prognostic signature in colon cancer, Clin. Cancer Res. 17 (2011) 1535–1545. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2509.

[38] E. Oikonomou, E. Koustas, M. Goulielmaki, A. Pintzas, BRAF vs RAS oncogenes: Are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications, Oncotarget. 5 (2014) 11752–11777. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2555.

[39] S.M. Advani, M.D. Swartz, J. Loree, J.S. Davis, A.M. Sarsashek, M. Lam, M.S. Lee, J. Bressler, D.S. Lopez, C.R. Daniel, V. Morris, I. Shureqi, B. Kee, A. Dasari, E. Vilar, M. Overman, S. Hamilton, D. Maru, D. Braithwaite, S. Kopetz, Epidemiology and Molecular-Pathologic Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer, Clin. Colorectal Cancer. 20 (2021) 137-147.e1. https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.09.007.

[40] T.R. Levin, D.A. Corley, C.D. Jensen, J.E. Schottinger, V.P. Quinn, A.G. Zauber, J.K. Lee, W.K. Zhao, N. Udaltsova, N.R. Ghai, A.T. Lee, C.P. Quesenberry, B.H. Fireman, C.A. Doubeni, Effects of Organized Colorectal Cancer Screening on Cancer Incidence and Mortality in a Large Community-Based Population, Gastroenterology. 155 (2018) 1383-1391.e5. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.017.

[41] AWMF, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom publiziert bei AWMF, 2019. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLl_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf (accessed March 10, 2022).

[42] H. Brenner, C. Stock, M. Hoffmeister, Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies, BMJ. 348 (2014). https://doi.org/10.1136/bmj.g2467.

[43] C.C. Chin, Y.H. Kuo, J.M. Chiang, Synchronous colorectal carcinoma: predisposing factors and characteristics, Color. Dis. 21 (2019) 432–440. https://doi.org/10.1111/codi.14539.

[44] M.J. Duffy, Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful?, Clin. Chem. 47 (2001) 624–630. https://doi.org/10.1093/clinchem/47.4.624.

[45] C. Wittekind, TNM - Klassifikation maligner Tumoren : korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019, Wiley-VCH, Weinheim, 2020.

[46] S. Gill, C.L. Loprinzi, D.J. Sargent, S.D. Thomé, S.R. Alberts, D.G. Haller, J. Benedetti, G. Francini, L.E. Shepherd, J.F. Seitz, R. Labianca, W. Chen, S.S. Cha, M.P. Heldebrant, R.M. Goldberg, Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much?, J. Clin. Oncol. 22 (2004) 1797–1806. https://doi.org/10.1200/JCO.2004.09.059.

[47] E. Auclin, A. Zaanan, D. Vernerey, R. Douard, C. Gallois, P. Laurent-Puig, F. Bonnetain, J. Taieb, Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy, Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 28 (2017) 958–968. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx030.

[48] R. Sauer, H. Becker, W. Hohenberger, C. Rödel, C. Wittekind, R. Fietkau, P. Martus, J. Tschmelitsch, E. Hager, C.F. Hess, J.-H. Karstens, T. Liersch, H. Schmidberger, R. Raab, Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer, N. Engl. J. Med. 351 (2004) 1731–1740. https://doi.org/10.1056/nejmoa040694.

[49] J. Kannarkatt, J. Joseph, P.C. Kurniali, A. Al-Janadi, B. Hrinczenko, Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer: A clinical dilemma, J. Oncol. Pract. 13 (2017) 233–241. https://doi.org/10.1200/JOP.2016.017210.

[50] D. Arnold, B. Lueza, J.Y. Douillard, M. Peeters, H.J. Lenz, A. Venook, V. Heinemann, E. Van Cutsem, J.P. Pignon, J. Tabernero, A. Cervantes, F. Ciardiello, Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials, Ann. Oncol. 28 (2017) 1713–1729. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx175.

[51] D. Cunningham, W. Atkin, H.J. Lenz, H.T. Lynch, B. Minsky, B. Nordlinger, N. Starling, Colorectal cancer, Lancet. 375 (2010) 1030–1047. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4.

[52] P.T. Makondi, C.M. Chu, P.L. Wei, Y.J. Chang, Prediction of novel target genes and pathways involved in irinotecan-resistant colorectal cancer, PLoS One. 12 (2017). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180616.

[53] A. Silvestri, E. Pin, A. Huijbers, R. Pellicani, E.M. Parasido, M. Pierobon, E. Petricoin, L. Liotta, C. Belluco, Individualized therapy for metastatic colorectal cancer, J. Intern. Med. 274 (2013) 1–24. https://doi.org/10.1111/joim.12070.

[54] M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, Pharmakologie und Toxikologie, Springer Berlin Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-58304-3.

[55] T. André, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont,

Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer, N. Engl. J. Med. 350 (2004) 2343–2351. https://doi.org/10.1056/nejmoa032709.

[56] C. Tournigand, T. André, F. Bonnetain, B. Chibaudel, G. Lledo, T. Hickish, J. Tabernero, C. Boni, J.B. Bachet, L. Teixeira, A. De Gramont, Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: Subgroup analyses of the multicenter international study of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin in the adjuvant tre, J. Clin. Oncol. 30 (2012) 3353–3360. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.5645.

[57] F.M. de Man, A.K.L. Goey, R.H.N. van Schaik, R.H.J. Mathijssen, S. Bins, Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics, Clin. Pharmacokinet. 57 (2018) 1229–1254. https://doi.org/10.1007/s40262-018-0644-7.

[58] C. Cremolini, F. Loupakis, C. Antoniotti, C. Lupi, E. Sensi, S. Lonardi, S. Mezi, G. Tomasello, M. Ronzoni, A. Zaniboni, G. Tonini, C. Carlomagno, G. Allegrini, S. Chiara, M. D'Amico, C. Granetto, M. Cazzaniga, L. Boni, G. Fontanini, A. Falcone, 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, Lancet Oncol. 16 (2015) 1306–1315. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00122-9.

[59] W. Eisterer, G. Prager, Chemotherapy, Still an Option in the Twenty-First Century in Metastatic Colorectal Cancer?, Cardiovasc. Intervent. Radiol. 42 (2019) 1213–1220. https://doi.org/10.1007/S00270-019-02278-7/FIGURES/2.

[60] J.J. Lee, J.H. Beumer, E. Chu, Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil, Cancer Chemother. Pharmacol. 78 (2016) 447–464. https://doi.org/10.1007/s00280-016-3054-2.

[61] P. García-Alfonso, G. Torres, G. García, I. Gallego, L. Ortega, C. Sandoval, A. Muñoz, A. Lloansí, FOLFOXIRI plus biologics in advanced colorectal cancer, Expert Opin. Biol. Ther. 19 (2019) 411–422. https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1595580.

[62] A. Saini, A.R. Norman, D. Cunningham, I. Chau, M. Hill, D. Tait, T. Hickish, T. Iveson, F. Lofts, D. Jodrell, P.J. Ross, J. Oates, Twelve weeks of protracted venous infusion of fluorouracil (5-FU) is as effective as 6 months of bolus 5-FU and folinic acid as adjuvant treatment in colorectal cancer, Br. J. Cancer. 88 (2003) 1859–1865. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600995.

[63] B.B. Sharma, K. Rai, H. Blunt, W. Zhao, T.D. Tosteson, G.A. Brooks, Pathogenic DPYD Variants and Treatment-Related Mortality in Patients Receiving Fluoropyrimidine Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis, Oncologist. 26 (2021) 1008–1016. https://doi.org/10.1002/onco.13967.

[64] S.A. Ploylearmsaeng, U. Fuhr, A. Jetter, How may anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised?, Clin. Pharmacokinet. 45 (2006) 567–592. https://doi.org/10.2165/00003088-200645060-00002.

[65] H.S. Hochster, L.L. Hart, R.K. Ramanathan, B.H. Childs, J.D. Hainsworth, A.L. Cohn, L. Wong, L. Fehrenbacher, Y. Abubakr, M.W. Saif, L. Schwartzberg, E. Hedrick, Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results of the TREE study, J. Clin. Oncol. 26 (2008) 3523–3529. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4138.

[66] T. André, K.-K. Shiu, T.W. Kim, B.V. Jensen, L.H. Jensen, C. Punt, D. Smith, R. Garcia-Carbonero, M. Benavides, P. Gibbs, C. de la Fouchardiere, F. Rivera, E. Elez, J. Bendell, D.T. Le, T. Yoshino, E. Van Cutsem, P. Yang, M.Z.H. Farooqui, P. Marinello, L.A. Diaz, Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer, N. Engl. J. Med. 383 (2020) 2207–2218. https://doi.org/10.1056/nejmoa2017699.

[67] K. Ganesh, Z.K. Stadler, A. Cercek, R.B. Mendelsohn, J. Shia, N.H. Segal, L.A. Diaz, Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 16 (2019) 361–375. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0126-x.

[68] M. Oberländer, M. Linnebacher, A. König, V. Bogoevska, C. Brodersen, R. Kaatz, M. Krohn, M. Hackmann, J. Ingenerf, J. Christoph, S. Mate, H.U. Prokosch, E.F. Yekebas, C. Thorns, J. Büning, F. Prall, R. Uhlig, U.J. Roblick, J.R. Izbicki, E. Klar, H.P. Bruch, B. Vollmar, J.K. Habermann, The “north German Tumor Bank of Colorectal Cancer”: Status report after the first 2 years of support by the German Cancer Aid Foundation, Langenbeck’s Arch. Surg. 398 (2013) 251–258. https://doi.org/10.1007/s00423-012-1043-4.

[69] M. Linnebacher, C. Maletzki, C. Ostwald, U. Klier, M. Krohn, E. Klar, F. Prall, Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting, BMC Cancer. 10 (2010). https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-362.

[70] P. Malaney, S. V. Nicosia, V. Davé, One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy, Cancer Lett. 344 (2014) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.010.

[71] S. Matschos, F. Bürtin, S. Kdimati, M. Radefeldt, S. Krake, F. Prall, N. Engel, M. Krohn, B. Micheel, M. Kreutzer, C.S. Mullins, M. Linnebacher, The HROC-xenobank—A high quality assured PDX biobank of >100 individual colorectal cancer models, Cancers (Basel). 13 (2021). https://doi.org/10.3390/cancers13235882.

[72] D. Guenot, E. Guérin, S. Aguillon-Romain, E. Pencreach, A. Schneider, A. Neuville, M.P. Chenard, I. Duluc, S. Du Manoir, C. Brigand, P. Oudet, M. Kedinger, M.P. Gaub, Pimary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability, J. Pathol. 208 (2006) 643–652. https://doi.org/10.1002/path.1936.

[73] M. Hidalgo, F. Amant, A. V. Biankin, E. Budinská, A.T. Byrne, C. Caldas, R.B. Clarke, S. de Jong, J. Jonkers, G.M. Mælandsmo, S. Roman-Roman, J. Seoane, L. Trusolino, A. Villanueva, Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research, Cancer Discov. 4 (2014) 998–1013. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001.

[74] C. Maletzki, S. Bock, P. Fruh, K. Macius, A. Witt, F. Prall, M. Linnebacher, NSG mice as hosts for oncological precision medicine, Lab. Investig. 100 (2020). https://doi.org/10.1038/s41374-019-0298-6.

[75] J. Jung, H.S. Seol, S. Chang, The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research, Cancer Res. Treat. 50 (2018) 1–10. https://doi.org/10.4143/crt.2017.307.

[76] Q. Zhou, J. Facciponte, M. Jin, Q. Shen, Q. Lin, Humanized NOD-SCID IL2rg–/– mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies, Cancer Lett. 344 (2014) 13–19. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2013.10.015.

[77] A. Ito, T. Ishida, H. Yano, A. Inagaki, S. Suzuki, F. Sato, H. Takino, F. Mori, M. Ri, S. Kusumoto, H. Komatsu, S. Iida, H. Inagaki, R. Ueda, Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull mouse model, Cancer Immunol. Immunother. 58 (2009) 1195–1206. https://doi.org/10.1007/S00262-008-0632-0.

[78] G. Migliardi, F. Sassi, D. Torti, F. Galimi, E.R. Zanella, M. Buscarino, D. Ribero, A. Muratore, P. Massucco, A. Pisacane, M. Risio, L. Capussotti, S. Marsoni, F. Di Nicolantonio, A. Bardelli, P.M. Comoglio, L. Trusolino, A. Bertotti, Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas, Clin. Cancer Res. 18 (2012) 2515–2525. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2683.

[79] H. Gao, J.M. Korn, S. Ferretti, J.E. Monahan, Y. Wang, M. Singh, C. Zhang, C. Schnell, G. Yang, Y. Zhang, O.A. Balbin, S. Barbe, H. Cai, F. Casey, S. Chatterjee, D.Y. Chiang, S. Chuai, S.M. Cogan, S.D. Collins, E. Dammassa, N. Ebel, M. Embry, J. Green, A. Kauffmann, C. Kowal, R.J. Leary, J. Lehar, Y. Liang, A. Loo, E. Lorenzana, E. Robert McDonald, M.E. McLaughlin, J. Merkin, R. Meyer, T.L. Naylor, M. Patawaran, A. Reddy, C. Röelli, D.A. Ruddy, F. Salangsang, F. Santacroce, A.P. Singh, Y. Tang, W. Tinetto, S. Tobler, R. Velazquez, K. Venkatesan, F. Von Arx, H.Q. Wang, Z. Wang, M. Wiesmann, D. Wyss, F. Xu, H. Bitter, P. Atadja, E. Lees, F. Hofmann, E. Li, N. Keen, R. Cozens, M.R. Jensen, N.K. Pryer, J.A. Williams, W.R. Sellers, High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response, Nat. Med. 21 (2015) 1318–1325. https://doi.org/10.1038/nm.3954.

[80] F. Bürtin, C.S. Mullins, M. Linnebacher, Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives, World J. Gastroenterol. 26 (2020) 1394–1426. https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I13.1394.

[81] Y. Zhang, Z. Sun, J. Jia, T. Du, N. Zhang, Y. Tang, Y. Fang, D. Fang, Overview of Histone Modification, in: Adv. Exp. Med. Biol., Adv Exp Med Biol, 2021: pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1.

[82] H. Kimura, Histone modifications for human epigenome analysis, J. Hum. Genet. 58 (2013) 439–445. https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66.

[83] E. Seto, M. Yoshida, Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6 (2014). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713.

[84] J.M. Mariadason, HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer, Epigenetics. 3 (2008) 28–37. https://doi.org/10.4161/epi.3.1.5736.

[85] A. Ito, Y. Kawaguchi, C.H. Lai, J.J. Kovacs, Y. Higashimoto, E. Appella, T.P. Yao, MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation, EMBO J. 21 (2002) 6236–6245. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf616.

[86] S. Ropero, M.F. Fraga, E. Ballestar, R. Hamelin, H. Yamamoto, M. Boix-Chornet, R. Caballero, M. Alaminos, F. Setien, M.F. Paz, M. Herranz, J. Palacios, D. Arango, T.F. Orntoft, L.A. Aaltonen, S. Schwartz, M. Esteller, A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition, Nat. Genet. 38 (2006) 566–569. https://doi.org/10.1038/ng1773.

[87] A. Salek Farrokhi, M. Mohammadlou, M. Abdollahi, M. Eslami, B. Yousefi, Histone Deacetylase Modifications by Probiotics in Colorectal Cancer, J. Gastrointest. Cancer. 51 (2020) 754–764. https://doi.org/10.1007/s12029-019-00338-2.

[88] E.E. Hull, M.R. Montgomery, K.J. Leyva, HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases, Biomed Res. Int. 2016 (2016). https://doi.org/10.1155/2016/8797206.

[89] Farydak | European Medicines Agency, (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/farydak (accessed August 30, 2022).

[90] P.G. Richardson, V.T.M. Hungria, S.S. Yoon, M. Beksac, M.A. Dimopoulos, A. Elghandour, W.W. Jedrzejczak, A. Guenther, T. Na Nakorn, N. Siritanaratkul, R.L. Schlossman, J. Hou, P. Moreau, S. Lonial, J.H. Lee, H. Einsele, M. Sopala, B.R. Bengoudifa, C. Corrado, F. Binlich, J.F. San-Miguel, Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone in previously treated multiple myeloma: Outcomes by prior treatment, Blood. 127 (2016) 713–721. https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-665018.

[91] M.J. Labonte, P.M. Wilson, W. Fazzone, S. Groshen, H.J. Lenz, R.D. Ladner, DNA microarray profiling of genes differentially regulated by the histone deacetylase inhibitors vorinostat and LBH589 in colon cancer cell lines, BMC Med. Genomics. 2 (2009) 67. https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-67.

[92] S. Blondy, V. David, M. Verdier, M. Mathonnet, A. Perraud, N. Christou, 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes, Cancer Sci. 111 (2020) 3142–3154. https://doi.org/10.1111/cas.14532.

[93] W. Fazzone, P.M. Wilson, M.J. LaBonte, H.J. Lenz, R.D. Ladner, Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells, Int. J. Cancer. 125 (2009) 463–473. https://doi.org/10.1002/ijc.24403.

[94] A. Tumber, L.S. Collins, K.D. Petersen, A. Thougaard, S.J. Christiansen, M. Dejligbjerg, P.B. Jensen, M. Sehested, J.W.A. Ritchie, The histone deacetylase inhibitor PXD101 synergises with 5-fluorouracil to inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo, Cancer Chemother. Pharmacol. 60 (2007) 275–283. https://doi.org/10.1007/s00280-006-0374-7.

[95] J. Shin, A. Carr, G.A. Corner, L. Tögel, M. Dávaos-Salas, H. Tran, A.C. Chueh, S. Al-Obaidi, F. Chionh, N. Ahmed, D.D. Buchanan, J.P. Young, M.S. Malo, R.A. Hodin, D. Arango, O.M. Sieber, L.H. Augenlicht, A.S. Dhillon, T.K. Weber, J.M. Mariadason, The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like Factor 5 (KLF5)-defendent manner, J. Biol. Chem. 289 (2014) 25306–25316. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557546.

[96] G. Lech, R. Słotwiński, M. Słodkowski, I.W. Krasnodębski, Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances, World J. Gastroenterol. 22 (2016) 1745–1755. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745.

[97] N. Wajapeyee, V. Kapoor, M. Mahalingam, M.R. Green, Efficacy of IGFBP7 for treatment of metastatic melanoma and other cancers in mouse models and human cell lines, Mol. Cancer Ther. 8 (2009) 3009–3014. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0470.

[98] N. Chikazawa, H. Tanaka, T. Tasaka, M. Nakamura, M. Tanaka, H. Onishi, M. Katano, Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells, Anticancer Res. 30 (2010) 2041–2048.

[99] Z. Zhang, Y. Zhang, X. Qin, Y. Wang, J. Fu, FGF9 promotes cisplatin resistance in colorectal cancer via regulation of Wnt/β-catenin signaling pathway, Exp. Ther. Med. 19 (2019). https://doi.org/10.3892/etm.2019.8399.

[100] D. Kalathas, D.A. Theocharis, D. Bounias, D. Kyriakopoulou, N. Papageorgakopoulou, M.S. Stavropoulos, D.H. Vynios, Chondroitin synthases I, II, III and chondroitin sulfate glucuronyltransferase expression in colorectal cancer, Mol. Med. Rep. 4 (2011) 363–368. https://doi.org/10.3892/mmr.2011.431.

[101] E. Listik, E.G. Xavier, M.A. da Silva Pinhal, L. Toma, Dermatan sulfate epimerase 1 expression and mislocalization may interfere with dermatan sulfate synthesis and breast cancer cell growth, Carbohydr. Res. 488 (2020). https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107906.

[102] A. Ottaiano, S. Scala, N. Normanno, G. Botti, F. Tatangelo, A. Di Mauro, M. Capozzi, S. Facchini, S. Tafuto, G. Nasti, Prognostic and Predictive Role of CXC Chemokine Receptor 4 in Metastatic Colorectal Cancer Patients, Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 28 (2020) 755–760. https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000828.

[103] T. Khare, M. Bissonnette, S. Khare, Cxcl12-cxcr4/cxcr7 axis in colorectal cancer: Therapeutic target in preclinical and clinical studies, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 7371. https://doi.org/10.3390/ijms22147371.

[104] T. Mizukami, Y. Togashi, S. Naruki, E. Banno, M. Terashima, M.A. de Velasco, K. Sakai, A. Yoneshige, H. Hayashi, Y. Fujita, S. Tomida, T.E. Nakajima, T. Fujino, N. Boku, A. Ito, K. Nakagawa, K. Nishio, Significance of FGF9 gene in resistance to anti-EGFR therapies targeting colorectal cancer: A subset of colorectal cancer patients with FGF9

upregulation may be resistant to anti-EGFR therapies, Mol. Carcinog. 56 (2017) 106–117. https://doi.org/10.1002/mc.22476.

[105] T. Sasatomi, Y. Suefuji, K. Matsunaga, H. Yamana, Y. Miyagi, Y. Araki, Y. Ogata, K. Itoh, K. Shirouzu, Expression of tumor rejection antigens in colorectal carcinomas, Cancer. 94 (2002) 1636–1641. https://doi.org/10.1002/cncr.10421.

[106] H. Jia, L. Cheng, M. Tickner, A. Bagherzadeh, D. Selwood, I. Zachary, Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity, Br. J. Cancer. 102 (2010) 541–552. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605539.

[107] X. Liu, X. Meng, X. Peng, Q. Yao, F. Zhu, Z. Ding, H. Sun, X. Liu, D. Li, Y. Lu, H. Tang, B. Li, Z. Peng, Impaired AGO2/miR-185-3p/NRP1 axis promotes colorectal cancer metastasis, Cell Death Dis. 12 (2021). https://doi.org/10.1038/s41419-021-03672-1.

[108] P. Fernández-Palanca, T. Payo-Serafín, F. Fondevila, C. Méndez-Blanco, B. San-Miguel, M.R. Romero, M.J. Tuñón, J.J.G. Marin, J. González-Gallego, J.L. Mauriz, Neuropilin-1 as a Potential Biomarker of Prognosis and Invasive-Related Parameters in Liver and Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Human Studies, Cancers (Basel). 14 (2022). https://doi.org/10.3390/cancers14143455.

[109] I. Bartram, U. Erben, J. Ortiz-Tanchez, K. Blunert, C. Schlee, M. Neumann, S. Heesch, C.D. Baldus, Inhibition of IGF1-R overcomes IGFBP7-induced chemotherapy resistance in T-ALL, BMC Cancer. 15 (2015). https://doi.org/10.1186/s12885-015-1677-z.

[110] J. Okamura, Y. Huang, D. Moon, M. Brait, X. Chang, M.S. Kim, Downregulation of insulin-like growth factorbinding protein 7 in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer, Cancer Biol. Ther. 13 (2012) 148–155. https://doi.org/10.4161/cbt.13.3.18695.

[111] R.B. Georges, H. Adwan, H. Hamdi, T. Hielscher, U. Linnemann, M.R. Berger, The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis, Cancer Biol. Ther. 12 (2011) 69–79. https://doi.org/10.4161/cbt.12.1.15719.

[112] L. Jin, F. Shen, M. Weinfeld, C. Sergi, Insulin Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7)-Related Cancer and IGFBP3 and IGFBP7 Crosstalk, Front. Oncol. 10 (2020) 727. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00727.

[113] H. Suzuki, S. Igarashi, M. Nojima, R. Maruyama, E. Yamamoto, M. Kai, H. Akashi, Y. Watanabe, H. Yamamoto, Y. Sasaki, F. Itoh, K. Imai, T. Sugai, L. Shen, J.P.J. Issa, Y. Shinomura, T. Tokino, M. Toyota, IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype, Carcinogenesis. 31 (2010) 342–349. https://doi.org/10.1093/carcin/bgp179.

[114] C.S. Mullins, S. Bock, M. Krohn, M. Linnebacher, Generation of xenotransplants from human cancer biopsies to assess anti-cancer activities of HDACi, in: Methods Mol. Biol., Methods Mol Biol, 2017: pp. 217–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6527-4_16.

[115] corning.com, Matrigel Matrix | Extracellular Matrix | Corning, (n.d.). https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html (accessed September 26, 2022).

[116] M. Gock, F. Kühn, C.S. Mullins, M. Krohn, F. Prall, E. Klar, M. Linnebacher, Tumor Take Rate Optimization for Colorectal Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models, Biomed Res. Int. 2016 (2016). https://doi.org/10.1155/2016/1715053.

[117] S. Gahr, C. Mayr, T. Kiesslich, R. Illig, D. Neureiter, B. Alinger, M. Ganslmayer, T. Wissniowski, P. Di Fazio, R. Montalbano, J.H. Ficker, M. Ocker, K. Quint, The pan-deacetylase inhibitor panobinostat affects angiogenesis in hepatocellular carcinoma models via modulation of CTGF expression, Int. J. Oncol. 47 (2015) 963–970. https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3087.

[118] S. Maschauer, S. Gahr, M. Gandesiri, P. Tripal, R. Schneider-Stock, T. Kuwert, M.

Ocker, O. Prante, In vivo monitoring of the anti-angiogenic therapeutic effect of the pan-deacetylase inhibitor panobinostat by small animal PET in a mouse model of gastrointestinal cancers, Nucl. Med. Biol. 43 (2016) 27–34. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.10.003.

[119] T.V. Sakpal, Sample size estimation in clinical trial., Perspect. Clin. Res. 1 (2010) 67–9. /pmc/articles/PMC3148614/ (accessed November 1, 2022).

[120] C.S. Mullins, B. Micheel, S. Matschos, M. Leuchter, F. Bürtin, M. Krohn, M. Hühns, E. Klar, F. Prall, M. Linnebacher, Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research, Cancers (Basel). 11 (2019). https://doi.org/10.3390/CANCERS11101520.

[121] S. Piawah, A.P. Venook, Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer, Cancer. 125 (2019) 4139–4147. https://doi.org/10.1002/cncr.32163.

[122] B.Y. Oh, W.Y. Lee, S. Jung, H.K. Hong, D.H. Nam, Y.A. Park, J.W. Huh, S.H. Yun, H.C. Kim, H.K. Chun, Y.B. Cho, Correlation between tumor engraftment in patient-derived xenograft models and clinical outcomes in colorectal cancer patients, Oncotarget. 6 (2015) 16059–16068. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3863.

[123] S.Y. Cho, W. Kang, J.Y. Han, S. Min, J. Kang, A. Lee, J.Y. Kwon, C. Lee, H. Park, An integrative approach to precision cancer medicine using patient-derived xenografts, Mol. Cells. 39 (2016) 77–86. https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2350.

[124] A. Bertotti, G. Migliardi, F. Galimi, F. Sassi, D. Torti, C. Isella, D. Corà, F. di Nicolantonio, M. Buscarino, C. Petti, D. Ribero, N. Russolillo, A. Muratore, P. Massucco, A. Pisacane, L. Molinaro, E. Valtorta, A. Sartore-Bianchi, M. Risio, L. Capussotti, M. Gambacorta, S. Siena, E. Medico, A. Sapino, S. Marsoni, P.M. Comoglio, A. Bardelli, L. Trusolino, A molecularly annotated platform of patient- derived xenografts (“xenopatients”) identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer, Cancer Discov. 1 (2011) 508–523. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0109.

[125] H. Janakiraman, Y. Zhu, S.A. Becker, C. Wang, A. Cross, E. Curl, D. Lewin, B.J. Hoffman, G.W. Warren, E.G. Hill, C. Timmers, V.J. Findlay, E.R. Camp, Modeling rectal cancer to advance neoadjuvant precision therapy, Int. J. Cancer. 147 (2020) 1405–1418. https://doi.org/10.1002/ijc.32876.

[126] J. Chou, M.P. Fitzgibbon, C.L.L. Mortales, A.M.H. Towlerton, M.P. Upton, R.S. Yeung, M.W. McIntosh, E.H. Warren, Phenotypic and transcriptional fidelity of patient-Derived colon cancer xenografts in immune-deficient mice, PLoS One. 8 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079874.

[127] M. Rivera, I. Fichtner, A. Wulf-Goldenberg, C. Sers, J. Merk, G. Patone, K.M. Alp, T. Kanashova, P. Mertins, J. Hoffmann, U. Stein, W. Walther, Patient-derived xenograft (PDX) models of colorectal carcinoma (CRC) as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine, Neoplasia (United States). 23 (2021) 21–35. https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.11.005.

[128] K.M. Brown, A. Xue, A. Mittal, J.S. Samra, R. Smith, T.J. Hugh, Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in preclinical research: A systematic review, Oncotarget. 7 (2016) 66212–66225. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11184.

[129] S. Okada, K. Vaeteewoottacharn, R. Kariya, Application of highly immunocompromised mice for the establishment of patient-derived xenograft (PDX) models, Cells. 8 (2019). https://doi.org/10.3390/cells8080889.

[130] L. Pompili, M. Porru, C. Caruso, A. Biroccio, C. Leonetti, Patient-derived xenografts: A relevant preclinical model for drug development, J. Exp. Clin. Cancer Res. 35 (2016). https://doi.org/10.1186/s13046-016-0462-4.

[131] J. Maykel, J.H. Liu, H. Li, L.D. Shultz, D.L. Greiner, J.M. Houghton, NOD-

scidIl2rgtm1Wjl and NOD-Rag1nullIl2rg tm1Wjl: A model for stromal cell-tumor cell interaction for human colon cancer, Dig. Dis. Sci. 59 (2014) 1169–1179. https://doi.org/10.1007/s10620-014-3168-5.

[132] J.J. Tentler, A.C. Tan, C.D. Weekes, A. Jimeno, S. Leong, T.M. Pitts, J.J. Arcaroli, W.A. Messersmith, S.G. Eckhardt, Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development, Nat. Rev. Clin. Oncol. 9 (2012) 338–350. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.61.

[133] S. Okada, K. Vaeteewoottacharn, R. Kariya, Establishment of a patient-derived tumor xenograft model and application for precision cancer medicine, Chem. Pharm. Bull. 66 (2018) 225–230. https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00789.

[134] D.J. Erstad, M. Sojoodi, M.S. Taylor, S. Ghoshal, A.A. Razavi, K.A. Graham-O'Regan, N. Bardeesy, C.R. Ferrone, M. Lanuti, P. Caravan, K.K. Tanabe, B.C. Fuchs, Orthotopic and heterotopic murine models of pancreatic cancer and their different responses to FOLFIRINOX chemotherapy, DMM Dis. Model. Mech. 11 (2018). https://doi.org/10.1242/DMM.034793.

[135] Q. Chen, T. Wei, J. Wang, Q. Zhang, J. Li, J. Zhang, L. Ni, Y. Wang, X. Bai, T. Liang, Patient-derived xenograft model engraftment predicts poor prognosis after surgery in patients with pancreatic cancer, Pancreatology. 20 (2020) 485–492. https://doi.org/10.1016/J.PAN.2020.02.008.

[136] H. Castillo-Ecija, G. Pascual-Pasto, S. Perez-Jaume, C. Resa-Pares, M. Vila-Ubach, C. Monterrubio, A. Jimenez-Cabaco, M. Baulenas-Farres, O. Muñoz-Aznar, N. Salvador, M. Cuadrado-Vilanova, N.G. Olaciregui, L. Balaguer-Lluna, V. Burgueño, F.J. Vicario, A. Manzanares, A. Castañeda, V. Santa-Maria, O. Cruz, V. Celis, A. Morales La Madrid, M. Garraus, M. Gorostegui, M. Vancells, R. Carrasco, L. Krauel, F. Torner, M. Suñol, C. Lavarino, J. Mora, A.M. Carcaboso, Prognostic value of patient-derived xenograft engraftment in pediatric sarcomas, J. Pathol. Clin. Res. 7 (2021) 338–349. https://doi.org/10.1002/cjp2.210.

[137] S. Corso, C. Isella, S.E. Bellomo, M. Apicella, S. Durando, C. Migliore, S. Ughetto, L. D'Errico, S. Menegon, D. Moya-Rull, M. Cargnelutti, T. Capelôa, D. Conticelli, J. Giordano, T. Venesio, A. Balsamo, C. Marchio, M. Degiuli, R. Reddavid, U. Fumagalli, S. de Pascale, G. Sgroi, E. Rausa, G.L. Baiocchi, S. Molfino, F. Pietrantonio, F. Morano, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, M. Bencivenga, V. Mengardo, R. Rosati, D. Marrelli, P. Morgagni, S. Rausei, G. Pallabazzer, M. de Simone, D. Ribero, S. Marsoni, A. Sottile, E. Medico, P. Cassoni, A. Sapino, E. Pectasides, A.R. Thorner, A. Nag, S.D. Drinan, B.M. Wollison, A.J. Bass, S. Giordano, A comprehensive PDX gastric cancer collection captures cancer cell–intrinsic transcriptional MSI traits, Cancer Res. 79 (2019) 5884–5896. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1166.

[138] M. Linnebacher, A. Wienck, I. Boeck, E. Klar, Identification of an MSI-H tumor-specific cytotoxic T cell epitope generated by the (- 1) frame of U79260(FTO), J. Biomed. Biotechnol. 2010 (2010). https://doi.org/10.1155/2010/841451.

[139] F. Gelsomino, M. Barbolini, A. Spallanzani, G. Pugliese, S. Cascinu, The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review, Cancer Treat. Rev. 51 (2016) 19–26. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.005.

[140] I. Zlobec, M.P. Bihl, A. Foerster, A. Rufle, L. Terracciano, A. Lugli, Stratification and prognostic relevance of Jass's molecular classification of colorectal cancer, Front. Oncol. 2 (2012) 1–8. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00007.

[141] J. Hoffmann, Integrative oncology drug discovery accompanied by preclinical translational research as prerequisite for clinical development, Chinese Clin. Oncol. 3 (2014) 15–15. https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.09.

[142] M. Keil, T. Conrad, M. Becker, U. Keilholz, M.L. Yaspo, H. Lehrach, M. Schütte, J. Haybaeck, J. Hoffmann, Modeling of personalized treatments in colon cancer based on preclinical genomic and drug sensitivity data, Cancers (Basel). 13 (2021).

https://doi.org/10.3390/cancers13236018.

[143] R.M. Stammer, S. Kleinsimon, J. Rolff, S. Jäger, A. Eggert, G. Seifert, C.I. Delebinski, Synergistic Antitumour Properties of viscumTT in Alveolar Rhabdomyosarcom, J. Immunol. Res. 2017 (2017). https://doi.org/10.1155/2017/4874280.

[144] D. Gürgen, T. Conrad, M. Becker, S. Sebens, C. Röcken, J. Hoffmann, S. Langhammer, Breaking the crosstalk of the Cellular Tumorigenic Network by low-dose combination therapy in lung cancer patient-derived xenografts, Commun. Biol. 5 (2022). https://doi.org/10.1038/s42003-022-03016-5.

[145] Pharma Intelligence, 2021 Clinical Development Success Rates l Pharma Intelligence, Pharma Intell. (2022). https://pharmaintelligence.informa.com/resources/product-content/2021/03/03/17/07/2021-clinical-development-success-rates (accessed January 13, 2023).

[146] A. Lunardi, P.P. Pandolfi, A co-clinical platform to accelerate cancer treatment optimization, Trends Mol. Med. 21 (2015) 1–5. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.008.

[147] P. Papanastasopoulos, J. Stebbing, Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: Lessons from clinical practice, Anticancer Res. 34 (2014) 1531–1536.

[148] J.F. San-Miguel, V.T.M. Hungria, S.S. Yoon, M. Beksac, M.A. Dimopoulos, A. Elghandour, W.W. Jedrzejczak, A. Günther, T.N. Nakorn, N. Siritanaratkul, P. Corradini, S. Chuncharunee, J.J. Lee, R.L. Schlossman, T. Shelekhova, K. Yong, D. Tan, T. Numbenjapon, J.D. Cavenagh, J. Hou, R. LeBlanc, H. Nahi, L. Qiu, H. Salwender, S. Pulini, P. Moreau, K. Warzocha, D. White, J. Bladé, W.M. Chen, J. de la Rubia, P. Gimsing, S. Lonial, J.L. Kaufman, E.M. Ocio, L. Veskovski, S.K. Sohn, M.C. Wang, J.H. Lee, H. Einsele, M. Sopala, C. Corrado, B.R. Bengoudifa, F. Binlich, P.G. Richardson, Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: A multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial, Lancet Oncol. 15 (2014) 1195–1206. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70440-1.

[149] E. Eleutherakis-Papaiakovou, N. Kanellias, E. Kastritis, M. Gavriatopoulou, E. Terpos, M.A. Dimopoulos, Efficacy of Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma, J. Oncol. 2020 (2020). https://doi.org/10.1155/2020/7131802.

[150] M. Abt, D. Ph, H.B. Iii, A. Carrato, J. Cassidy, A. Cervantes, J. Fagerberg, D. Ph, P. Koralewski, H. Kröning, J. Maroun, N. Marschner, J. Mckendrick, M. Pawlicki, R. Rosso, J. Schüller, J.-F. Seitz, B. Stabuc, D. Ph, J. Tujakowski, G. Van Hazel, J. Zaluski, W. Scheithauer, Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer, Https://Doi.Org/10.1056/NEJMoa043116. 352 (2005) 2696–2704. https://doi.org/10.1056/NEJMOA043116.

[151] Y. Guo, B.H. Xiong, T. Zhang, Y. Cheng, L. Ma, XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis, Cancer Invest. 34 (2016) 94–104. https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1104689.

[152] M. Ducreux, J. Bennouna, M. Hebbar, M. Ychou, G. Lledo, T. Conroy, A. Adenis, R. Faroux, C. Rebischung, L. Bergougnoux, L. Kockler, J.Y. Douillard, Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus 5-fluorouracil/leucovorin plus oxaliplatin (FOLFOX-6) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer, Int. J. Cancer. 128 (2011) 682–690. https://doi.org/10.1002/ijc.25369.

[153] A. Felici, J. Verweij, A. Sparreboom, Dosing strategies for anticancer drugs: The good, the bad and body-surface area, Eur. J. Cancer. 38 (2002) 1677–1684. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00151-X.

[154] J.J. Sacco, J. Botten, F. Macbeth, A. Bagust, P. Clark, The average body surface area of adult cancer patients in the UK: A multicentre retrospective study, PLoS One. 5 (2010) 8933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008933.

[155] A. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, J. Basic Clin. Pharm. 7 (2016) 27. https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703.

[156] M. De Jong, T. Maina, Of mice and humans: Are they the same? - Implications in cancer translational research, J. Nucl. Med. 51 (2010) 501–504. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.065706.

[157] AOK-Bundesverband, Gesundheit, Statistik, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Bundesministerium Für Gesundh. Gesundheitsberichterstattung Des Bundes. (2013). https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_isgbe (accessed April 20, 2023).

[158] Farydak | European Medicines Agency, (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/farydak (accessed April 21, 2023).

[159] E. Gamelin, R. Delva, J. Jacob, Y. Merrouche, J.L. Raoul, D. Pezet, E. Dorval, G. Piot, A. Morel, M. Boisdron-Celle, Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: Results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer, J. Clin. Oncol. 26 (2008) 2099–2105. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.3934.

[160] D.T. Lauber, A. Fülöp, T. Kovács, K. Szigeti, D. Máthé, A. Szijártó, State of the art in vivo imaging techniques for laboratory animals, Lab. Anim. 51 (2017) 465–478. https://doi.org/10.1177/0023677217695852.

[161] EMA, Keytruda | European Medicines Agency, EMA Rep. (2022). https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda (accessed February 25, 2023).

[162] M. Greally, C.M. Kelly, A. Cercek, HER2: An emerging target in colorectal cancer, Curr. Probl. Cancer. 42 (2018) 560–571. https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.07.001.

[163] K. Yonesaka, Her2-/her3-targeting antibody—drug conjugates for treating lung and colorectal cancers resistant to EGFR inhibitors, Cancers (Basel). 13 (2021) 1–13. https://doi.org/10.3390/cancers13051047.

[164] J.C. Biermann, L. Holzscheiter, M. Kotzsch, T. Luther, M. Kiechle-Bahat, F.C.G.J. Sweep, P.N. Span, M. Schmitt, V. Magdolen, Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: Comparison to antigen quantification by ELISA, Int. J. Mol. Med. 21 (2008) 251–259. https://doi.org/10.3892/ijmm.21.2.251.

[165] I.D. Witzel, K. Milde-Langosch, R.M. Wirtz, C. Roth, M. Ihnen, S. Mahner, C. Zu Eulenburg, F. Jänicke, V. Müller, Comparison of microarray-based RNA expression with ELISA-based protein determination of HER2, uPA and PAI-1 in tumour tissue of patients with breast cancer and relation to outcome, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 136 (2010) 1709–1718. https://doi.org/10.1007/s00432-010-0829-4.

[166] T. Kubota, 5-Fluorouracil and dihydropyrimidine dehydrogenase, Int. J. Clin. Oncol. 8 (2003) 127–131. https://doi.org/10.1007/s10147-003-0319-7.

[167] M. Ciaparrone, M. Quirino, G. Schinzari, G. Zannoni, D.C. Corsi, F.M. Vecchio, A. Cassano, G. La Torre, C. Barone, Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil, Oncology. 70 (2007) 366–377. https://doi.org/10.1159/000098110.

[168] C.J. Kahi, T.F. Imperiale, B.E. Juliar, D.K. Rex, Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality, Clin. Gastroenterol. Hepatol. 7 (2009) 770–775. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.12.030.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich mit ihrer großartigen Unterstützung während des gesamten Promotionsprozesses begleitet haben.

In erster Linie möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher meinen aufrichtigen Dank für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie die geduldige und humorvolle Betreuung aussprechen. Seine Forschungsbeiträge und fachlichen Ratschläge haben mich inspiriert und ermutigt, dieses Vorhaben abzuschließen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki und Frau Stephanie Matschos, die mich bei der Laborarbeit und bei den tierexperimentellen Techniken instruierten.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Mathias Krohn für die methodische Anleitung und seine wertvollen Anregungen herzlich bedanken.

Auch bin ich Herrn Randy Przybylla für seine Erläuterungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit sehr dankbar.

Ich danke Herrn Dr. med. Philipp Leon Fruh für das gemeinsame Bewältigen dieser Herausforderung.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Prall vom Institut für Pathologie der Universität Rostock richten, der die histopathologische Beurteilung der Gewebeproben vornahm. Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar und dem Team des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock danke ich aufrichtig für die Bereitstellung der notwenigen Ressourcen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner lieben Familie und meinen Freunden bedanken, die mich unermüdlich und in allen Lebenslagen unterstützen. Ihr seid mir von unschätzbarem Wert.

Abschließend möchte ich den Tieren danken und gedenken, die für dieses Forschungsprojekt ihr Leben ließen.

14 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 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)

15 Anhang

15.1 HROC-Xenoliste

HROC Tumor-ID	Alter/ Geschlecht	Lokalisation	TNM	UICC-Stadium	molekularer Subtyp
24 fT3	98/m	rechtes Kolon	T2, N0, M0, G2, R0, L0, V1	I	MSI-H
29 fT4	59/m	rechtes Kolon	T3, N2, M1, G3, R0, L0, V1	IV	LS
32 fT3	82/w	rechtes Kolon	T4, N2, M1, G2, R2, L0, V1	IV	CIN
39 fT2	69/m	rechtes Kolon	T4, N0, M0, G3, R0, L0, V1	II	CIN
40 fT2	69/m	linkes Kolon	T3, N1, M0, G3, R0, L1, V1	III	CIMP-H
46 fT2	66/m	rechtes Kolon	T3, N0, M1, G3, R2, L0, V1	IV	CIN
48 fT2	68/w	Querkolon	T2, N1, M0, G3, R2, L1, V0	III	MSI-H
48Met1 fT2	72/w	Peritoneum			MSI-H
50 fT2	67/w	rechtes Kolon	T4, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	MSI-H
53 fT3	72/w	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G3, R0, L0, V0	II	MSI-H
54 fT2	63/w	linkes Kolon	T3, N2, M0, G2, R0, L1, V1	III	CIMP-H
59 fT2	76/m	rechtes Kolon	T3, N1, M1, G2, R0, L1, V0	IV	CIN
60 fT2	71/m	rechtes Kolon	T2, N0, M0, G2, R0, L0, V0	I	CIMP-H
62 fT2	83/w	rechtes Kolon	T4, N2, M1, G3, R2, L1, V2	IV	CIN
69 fT2	62/m	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G3, R0, L0, V0	II	CIN
70 fT1	65/w	rechtes Kolon	T4, N1, M0, G3, R0, L1, V0	III	CIN
71 fT2	52/m	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	LS
72Met1 fT2	61/m	Leber	(T3, N2, M1, G2, R1, L0, V1)	(IV)	CIN
80 fT3	72/m	rechtes Kolon	T3, N2, M0, G2, R0, L1, V0	III	CIN
82 fT1	61/m	Querkolon	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	CIN
86 fT2	79/w	Sigmoid	T3, N1, M0, G2, R0, L0, V1	III	CIN
92 fT2	60/m	rechtes Kolon	T3, N1, M1, G2, R2, L0, V1	IV	CIMP-H
100 fT1	82/m	Sigmoid	T2, N0, M0, G2, R0, L0, V1	I	CIN
103 fT2	44/m	Rektum	T2, N1, M0, G2, R0, L0, V0	III	CIN
103Met1 fT2	48/m	Leber			CIN
107 fT2	74/m	Sigma	T3, N2, M1, G2, R2, L1, V0	IV	CIN
112Met1 fT3	79/w	Leber	(T3, N2, M1, G2, R2, L1, V1)	(IV)	CIMP-H
113 fT2	41/w	rechtes Kolon	T4b, N2, M0, G3, R0, L1	III	LS
150 fT2	63/m	Querkolon	T4, N2, M1, G2, R0, L0, V0	IV	CIN
161 fT3	82/m	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	CIMP-H
170 fT3	68/w	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G3, R0, L0, V0	II	MSI-H
183 fT2	59/w	rechtes Kolon	T3, N2, M0, G3, R0, L1, V0	III	CIMP-H
222 fT2	79/m	Querkolon	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	CIN
239 fT2	72/w	Rektum	T4, N2b, M0, G2, R0, L0, V0	III	CIN
245 fT2	73/m	Rektum	T3, N0, M0, G3, R0, L0, V0	II	n.d.
250 fT3	64/w	Sigmoid	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	CIN
260 fT2	79/w	rechtes Kolon	T3, N0, M0, G2, R0, L0, V0	II	CIN
285 fT1	30/w	linkes Kolon	T4b, N2, M1, G2, R2, L1, V0	IV	LS
324 fT2	55/w	rechtes Kolon	T3, N2, M1a, G3, R2, L1, V0	IV	LS

Met: Metastase, fTx: Transfergeneration, m: männlich, w: weiblich, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, LS: Lynch Syndrom, n. d.: nicht determiniert

15.2 Score Sheet Mausbefinden

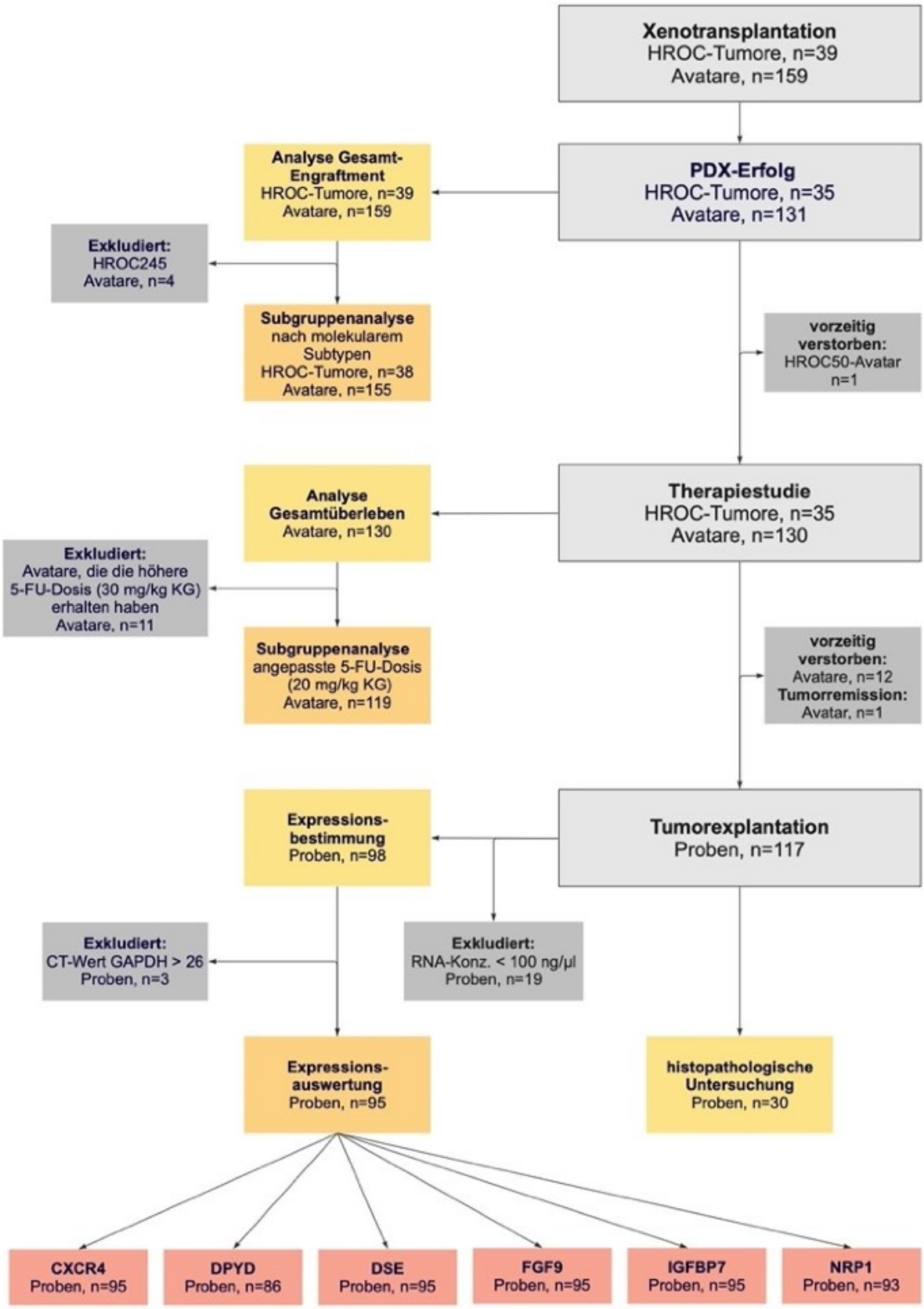
klinisches Modell	metrische und parametrische Kriterien	Score
Definition der Tumorart: solid, autochton, Wachstum lokal-verdrängend bis invasiv	ohne klinischen Befund	0
	verminderte Fellpflege	1
	verändertes (Sozial-)Verhalten (Teilnahmslosigkeit; geringe Interaktion mit Käfiggenossen)	1
	gesteigerte Abwehrreaktion/Beißen/Lautäußerungen beim Ergreifen (z. B. zum Wiegen/Umsetzen)	1
	unphysiologische Körperhaltung/Fortbewegung (gekrümmt)	2
	Gewichtsreduktion ≤ 15 %	2
	Gewichtsreduktion > 15 %	3
	Ulzeration (Aufbruch) des Tumors	3
	Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (starke Diarrhoe)	3
	rektale Blutung/Analprolaps	3
	Tumorgröße ≥ 700 mm^2	3

Summierter Score ≥ 6 oder Einzelscore 3 sollten nicht erreicht werden.

Handlungsanweisungen:

Summierter Score ≥ 6 oder Einzelscore 3: Versuchsabbruch durch Tötung, Gewebeanalyse

15.3 Flussdiagramm Ergebnisse



15.4 Avatare Expressionsanalyse

HROC ID	Therapiearm	molekularer Subtyp	RNA-Konz. [ng/µl]
24 M8*	Kontrolle	MSI-H	193,8
24 M9	Panobinostat	MSI-H	157,32
24 M10*	5-FU	MSI-H	683,03
29 M5*	Kontrolle	LS	745,43
29 M6	Kombination	LS	1122
29 M7*	5-FU	LS	105,9
29 M8	Panobinostat	LS	1564,26
32 M6	5-FU	CIN	414,43
32 M7	Kontrolle	CIN	142,07
39 M1*	5-FU	CIN	177,8
39 M3	Kontrolle	CIN	329,54
39 M4	Panobinostat	CIN	0
40 M1	Kontrolle	CIMP-H	919,47
40 M2	Kombination	CIMP-H	0
40 M3	Panobinostat	CIMP-H	176,03
40 M4	5-FU	CIMP-H	217,44
46 M4	Kombination	CIN	412,23
46 M5*	Kontrolle	CIN	735,52
46 M6	5-FU	CIN	294,52
46 M7	Panobinostat	CIN	846,79
48 M5	5-FU	MSI-H	1119,14
48 M6	Kontrolle	MSI-H	994,11
48 M7	Kombination	MSI-H	1157,03
48 M8	Kontrolle	MSI-H	951,57
48Met1 M3	5-FU	MSI-H	1072,29
48Met1 M4	Kontrolle	MSI-H	1026,25
48Met1 M5	Panobinostat	MSI-H	125,08
48Met1 M6	Kombination	MSI-H	962,08
50 M5	Kontrolle	MSI-H	833,36
50 M7	Panobinostat	MSI-H	113,73
50 M8	Kombination	MSI-H	917,49
50 M9	5-FU	MSI-H	1213,43
53 M7	Kombination	MSI-H	158,76
53 M9	5-FU	MSI-H	819,84
53 M10	Kontrolle	MSI-H	979,71
60 M1**	Panobinostat	CIMP-H	829,17
60 M2	5-FU	CIMP-H	1318,04
60 M3	Kontrolle	CIMP-H	1228,75
60 M4	Kombination	CIMP-H	1333,64
62 M3	Kontrolle	CIN	0
62 M4	5-FU	CIN	901,2
62 M5	Panobinostat	CIN	0
62 M6	Kombination	CIN	1032,5
69 M3	Panobinostat	CIN	342,74
69 M4	Kontrolle	CIN	1116,74

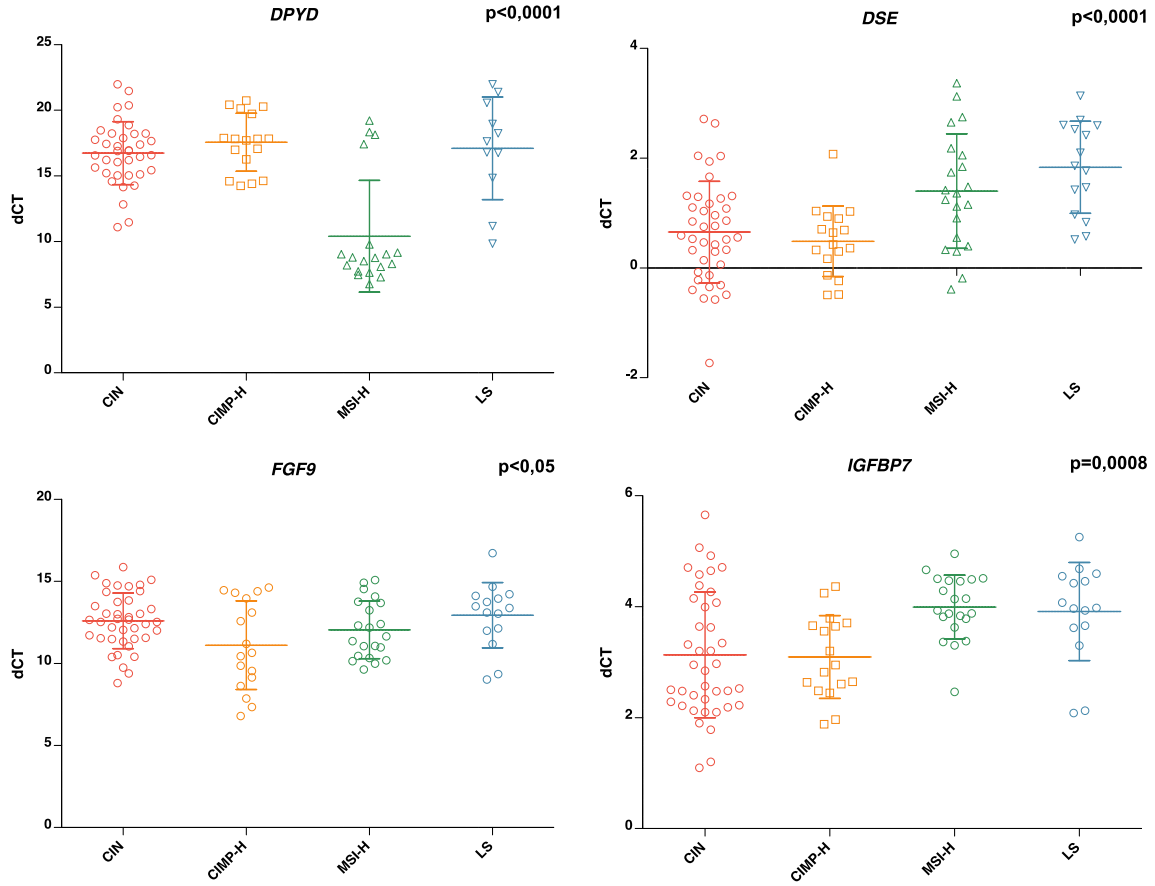
69 M5	5-FU	CIN	142,22
71 M5	5-FU	LS	241,55
71 M6	Kontrolle	LS	644,8
71 M7	Panobinostat	LS	0
71 M9	Kombination	LS	0
72Met1 M3	Panobinostat	CIN	633,14
72Met1 M4	5-FU	CIN	0
72Met1 M5	Kombination	CIN	846,4
72Met1 M6	Kontrolle	CIN	284,88
80 M20	Panobinostat	CIN	n.v.
80 M21	Kontrolle	CIN	337,16
82 M1	Kontrolle	CIN	1358,58
82 M2	Panobinostat	CIN	0
82 M3	Kombination	CIN	0
82 M4	5-FU	CIN	0
86 M1	Kontrolle	CIN	120,36
86 M3	Panobinostat	CIN	104,62
86 M4	Kombination	CIN	631,29
92 M2	5-FU	CIMP-H	345,58
92 M3	Panobinostat	CIMP-H	592,55
92 M4	Kontrolle	CIMP-H	333,58
92 M5	Kombination	CIMP-H	262,98
100 M1	Kontrolle	CIN	0
100 M3	Kombination	CIN	732,05
100 M4	5-FU	CIN	1052,54
103 M3	5-FU	CIN	700,91
103 M4	Kontrolle	CIN	678,21
103Met1 M3	5-FU	CIN	758,33
103Met1 M4	Panobinostat	CIN	932,21
103Met1 M5	Kombination	CIN	1392,87
103Met1 M6	Kontrolle	CIN	1073,08
107 M5	Panobinostat	CIN	353,02
107 M6	Kontrolle	CIN	868,93
112Met1 M3	Panobinostat	CIMP-H	200,86
112Met1 M4	Kontrolle	CIMP-H	611,83
112Met1 M5	Kombination	CIMP-H	243,3
112Met1 M6	5-FU	CIMP-H	453,93
113 M1	Kombination	LS	143,48
113 M2	Kontrolle	LS	1278,38
113 M3	Panobinostat	LS	1057,48
113 M4	5-FU	LS	n.v.
170 M1	5-FU	MSI-H	1432,11
170 M2	Kontrolle	MSI-H	818,94
170 M4	Kombination	MSI-H	1221,04
183 M11	Panobinostat	CIMP-H	825,17
183 M12	Kontrolle	CIMP-H	0
183 M13	5-FU	CIMP-H	0
183 M14	Kombination	CIMP-H	377,98
222 M1	Panobinostat	CIN	0

222 M2**	5-FU	CIN	103,07
222 M3*	Kombination	CIN	122,4
222 M4	Kontrolle	CIN	966,88
239 M2	Kontrolle	CIN	597,64
239 M3	Panobinostat	CIN	817,49
239 M4	Kombination	CIN	303,28
245 M1	Kombination	n.d.	0
245 M2	Panobinostat	n.d.	875,9
245 M4	Kontrolle	n.d.	270,65
250 M1	Kontrolle	CIN	741,41
250 M2	Panobinostat	CIN	605,45
250 M3	5-FU	CIN	0
260 M1	5-FU	CIN	691,4
260 M2	Kontrolle	CIN	590,04
260 M3	Panobinostat	CIN	443,1
260 M4	Kombination	CIN	613,63
285 M1	Kombination	LS	578,44
285 M3*	Panobinostat	LS	195,11
285 M4*	Kontrolle	LS	1128,05
324 M1	Kontrolle	LS	1231,63
324 M2	5-FU	LS	1180,43
324 M3	Kombination	LS	0
324 M5	Panobinostat	LS	455,8

Met: Metastase, Mx: Nummerierung der Maus, CIN: sporadische chromosomale Instabilität, CIMP-H: CpG-Insel-Methylierungsphänotyp, MSI-H: sporadische Mikrosatelliteninstabilität, LS: Lynch Syndrom, n. d.: nicht determiniert, n. v.: nicht verfügbar, * CT-Werte von DPYD nicht determiniert, ** CT-Werte von NRP1 nicht determiniert

15.5 Ergänzende Auswertung der Biomarker-Expression

Die Expressionsergebnisse der Biomarker DPYD, DSE, FGF9 und IGFBP7 sind in der nachfolgenden Abbildung in Abhängigkeit vom molokularen Subtyp dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA.



***DPYD**: CIN n = 37, CIMP-H n = 17, MSI-H n = 19, LS n = 11, **DSE**: CIN n = 40, CIMP-H n = 17, MSI-H n = 21, LS n = 15, **FGF9**: CIN n = 40, CIMP-H n = 17, MSI-H n = 21, LS n = 15, **IGFBP7**: CIN n = 40, CIMP-H n = 17, MSI-H n = 21, LS n = 15*