

Abschlussbericht
zum BMBF Forschungsprojekt

Verbundprojekt kolorektales Karzinom-Teilprojekt 1: Sensitives Polyprobe Verfahren zur verbesserten Prädiktion von Therapieresponse und Bestimmung der Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Förderkennzeichen 01ES0808
Laufzeit des Vorhabens: 06.04.2009 bis 30.04.2013

Prof. Dr. Franz Rödel
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Zentrum für Radiologie
Klinik für Strahlentherapie und Onkologie
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Kurze Darstellung	3
1.1. Aufgabenstellung	3
1.2. Voraussetzungen der Durchführung	3
1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes	4
1.5. Verwendete Literaturquellen	6
1.6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	6
2. Eingehende Darstellung	6
2.1. Verwendung der Zuwendungen	6
2.2. Erzielte Ergebnisse	6
2.2.1. Organisatorische Ergebnisse und Patientenrekrutierung	6
2.2.2. Methodisch/experimentelle Ergebnisse	7
2.3. Zahlenmäßiger Nachweis	11
2.4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	11
2.5. Fortschritte anderer Stellen während der Projektlaufzeit	12
2.6. Erfolgte und eingereichte Veröffentlichungen der Ergebnisse	13
2.7. Literatur	14
3. Unterschrift	14

1. Kurze Darstellung

1.1. Aufgabenstellung

Derzeit beruht eine Prädiktion des Therapieansprechens und der Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom überwiegend auf bildgebenden und histopathologischen Kriterien wie dem Tumorstadium (1). Demgegenüber könnten tumorbiologisch und molekular ausgerichtete Ansätze eine sinnvolle Basis für eine signifikant verbesserte Diagnostik und Prädiktion liefern. Rationale der prospektiven Studie war deshalb die Evaluation einer spezifischen mRNA-Expressionssignatur für die Stadien-Einteilung und - Hintergrund des hier beschriebenen Teilprojektes - für das Therapieansprechen des kolorektalen Karzinoms. Zu diesem Zweck wurde erstmals eine Technologieplattform eingesetzt, die in Paraffinmaterial, welches nach diagnostischen Standardprozeduren gewonnen wurde, einen Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierten, simultanen Nachweis von mehreren Markergenen (Markersignatur) ermöglichen konnte.

1.2. Voraussetzungen der Durchführung

Bei dem Projekt handelte es sich primär um ein Verbundprojekt zwischen zwei universitären Einrichtungen (Universitätskliniken Erlangen und Frankfurt) und einem Diagnostik-Unternehmen (Siemens Healthcare), welches jedoch aufgrund firmeninterner Entscheidungen am 15.06.2010 den Geschäftsbereich schloss und sich als Projektpartner aus dem Verbund zurückzog. Das Forschungsvorhaben wurde federführend von der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Hohenberger, Herrn Prof. Dr. R. Croner und Herrn Prof. Dr. M. Stürzl (Abteilung molekulare und experimentelle Chirurgie) koordiniert. Dabei war für die Durchführung des Projektes in hohem Maße von Vorteil, dass die Mitglieder des Verbundes auf eine erfolgreiche etablierte Kooperationsstruktur im Rahmen von Nationalen-Genom-Forschungs-Netzwerk (NGFN1)-Projekten (2000-2003) aufbauen konnten. Verbundübergreifende Aktivitäten waren zudem regelmäßige, protokollierte Arbeitstreffen an der Universitätsklinik Erlangen und ein Berichtskolloquium in Erlangen zur Evaluation des Projektfortschrittes mit externen Fachbeiräten am 29.06.2011.

1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen der Studie wurden folgende Forschungsziele angestrebt: A) Die Validierung unterschiedlicher Gruppen von Biomarkern auf Genexpressions-Ebene, um Tumorstadien, Überleben und Ansprechen auf Chemotherapie und Radiochemotherapie individueller Patienten vorherzusagen zu können (prospektive diagnostische Studie). B) Die Anwendung einer neuen technologischen Plattform für die Untersuchung von RNA-Markern in Formalin-fixiertem, paraffineingebettetem Routinegewebe. C) Eine mögliche kommerzielle Verwertung und Verbreitung der validierten Technologie als ein prädiktives diagnostisches Testsystem. Die Studie wurde dabei in Form einer nicht-randomisierten, verblindeten prospektiven Studie durchgeführt. Die Projektplanung sah nach einer 30-monatigen Rekrutierungsperiode bis zum Abschluss der Förderperiode (36 Monate) die Untersuchung der prädiktiven Relevanz des Polyprobe-Tests für die Bestimmung des Tumorstadiums (primärer Endpunkt) und des Ansprechens auf eine Standardtherapie (sekundärer Endpunkt) vor. Im Rahmen der Nachsorgeperiode (36 Monate nach Rekrutierungsende) sollte dann überprüft werden, ob die in dem Projekt validierte und prädiktive Biomarker-Signatur oder einzelne Markergene auch eine Aussage über klinische Endpunkte wie das Fünf-Jahres-krankheitsfreie-Überleben und das Gesamtüberleben erlauben.

Das Teilprojekt 01ES0808 an der Universitätsklinik Frankfurt wurde primär zum 06.04.2009 bewilligt. Eine verspätete Rekrutierung des wissenschaftlichen Mitarbeiters, technische Verzögerungen bei der Implementierung der notwendigen Dokumentationssysteme und unerwartet schwierige Vertragsverhandlungen bzw. der spätere Rückzug des Industriepartners mit nachfolgenden Neuverhandlungen zum Transfer der Extraktionsgeräte und eines notwendigen Neuantrages des Partners in Erlangen (Förderkennzeichen 1ES1001) führten jedoch letztendlich zu einem vollumfänglichen Start des Gesamtprojektes zum 01.11.2010 und geplantem Projektende am Standort Frankfurt zum 30.04.2013. Für die Verbundpartner Erlangen wurde aufgrund der Notwendigkeit der weiteren Rekrutierung von Patienten eine Verschiebung des Projektendes zum 31.12.2013 genehmigt, so dass der Abschlussbericht des Gesamtprojektes zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen wird.

1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes

Das kolorektale Karzinom ist die dritt-häufigste Krebserkrankung in Industrienationen (2). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation erkrankten jährlich etwa 945.000 Menschen

an dieser Erkrankung und 492.000 sterben daran. Klinische Entscheidungen für Therapiealgorithmen und Art der chirurgischen Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom beruhen aktuell nur auf bildgebenden Verfahren (Computertomographie und Kernspintomographie) (1) oder konventionellen histopathologischen Charakteristika. So ist beispielsweise beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom die Infiltration des Tumors in das umgebende Gewebe und das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen mit einer schlechten Prognose assoziiert. In diesen Fällen ist seit der Publikation der Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie (3) eine präoperativ (neoadjuvant) kombinierte Radiochemotherapie (Gesamtdosis: 50,4 Gy und 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie) mit nachfolgender chirurgischer Tumoresektion Standardtherapie. Zu den Vorteilen dieser Behandlungsmodalität zählen die deutlich bessere Verträglichkeit sowie die erhöhte biologische Wirksamkeit mit Induktion einer Tumorschrumpfung (sog. *Downsizing*). Diese ermöglicht konsekutiv in einem hohen Prozentsatz eine komplette Tumoresektion (R0) sowie eine Sphinkter-erhaltende Operation bei Karzinomen nahe dem Schließmuskel. Das Monitoring der Therapieantwort beispielsweise durch eine histopathologische Regressionsbeurteilung des Operationspräparates hat jedoch gezeigt, dass die Tumorantwort im Einzelfall trotz identischer Therapie und vergleichbaren Tumorstadien erheblichen Schwankungen unterliegt (4). Diese reichen von einer klinisch und histopathologisch kompletten Remission bis hin zu einer Tumorprogression unter Therapie, für die u.a. zelluläre Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht werden. Dabei geht man davon aus, dass die Resistenz bei individuell unterschiedlicher Genexpression auf einer komplexen Deregulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle, der Proliferation, der DNA-Schadensantwort, der Apoptose und der Angiogenese beruhen (5, 6).

In diesem Zusammenhang wurden mittels ausgedehnter Transkriptomanalysen an Frischgeweben kolorektaler Karzinome durch Mitglieder des Verbundprojektes eine prognostische Markersignatur (n=61) identifiziert, welche eine mögliche Bestimmung metastasierender Tumorstadien (25 Markergene), des angiogenesebezogenen Überlebens der Patienten (15 Gene), des Ansprechens auf Chemotherapie (10 Gene) und auf Radiochemotherapie (11 Gene) erlauben könnten. Diese Signatur war Grundlage der Erhebung im Rahmen der prospektiven Polyprobe Studie. Ein wesentliches weiteres Element der technologischen Basis des Forschungsprojektes war zudem die Implementierung einer neuartigen Plattform für die Isolierung von Nukleinsäuren aus paraffineingebettetem Tumormaterial. Bei dieser Hoch-

durchsatz-Methode ermöglichen spezielle magnetische Partikel unter optimierten Bedingungen eine effiziente Aufreinigung von RNA und DNA aus Standard-Paraffin-Gewebe-proben für die histopathologische Routine.

1.5. Verwendete Literaturquellen

Die medizinische Fachliteratur wurde über die medizinische Datenbank PubMed (www.PubMed.com; NCBI: National Center for Biotechnology Information) und entsprechende Online-Zugänge der Zeitschriften durch Universitätsbibliotheken in Erlangen und Frankfurt bezogen.

1.6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Umsetzung der Forschungsvorhabens im Rahmen des Teilprojekts fand in Abstimmung mit den Verbundpartnern in Erlangen statt und beinhaltete darüber hinaus Kooperationen mit der Klinik für Chirurgie und der Klinik für Strahlentherapie am Universitätsklinikum Göttingen und lokale Kooperationen mit Nicht-universitären pathologischen Instituten in Rhein-Main Gebiet (Pathologie am Klinikum Höchst, Gemeinschaftspraxis für Pathologie Frankfurt, Pathologie Wiesbaden).

2. Eingehende Darstellung

2.1. Verwendung der Zuwendungen

Siehe Verwendungsnachweis Drittmittelverwaltung Universitätsklinikum Frankfurt

2.2. Erzielte Ergebnisse

2.2.1. Organisatorische Ergebnisse und Patientenrekrutierung

Die Korrelation der Expression von tumorspezifischen Markern mit dem Therapie-ansprechen, dem Tumorstadium und dem klinischen Verlauf bei Patienten mit fort-geschrittenem kolorektalem Karzinom war zentraler Gegenstand des Teilprojektes am Universitätsklinikum Frankfurt am Main. Entsprechend der Absprache des Konsortiums war es ein Ziel des Teilprojektes prätherapeutisches Paraffinmaterial und klinische Daten von 45

Patienten zur zentralen Aufarbeitung und Auswertung nach Erlangen zu transferieren und histochemische Nachweisverfahren für ausgewählte Marker zu etablieren.

Die Patientenrekrutierung am Universitätsklinikum Frankfurt/Main wurde Mitte 2010 begonnen, die Initialisierung und ein externes Daten-Monitoring am Standort Frankfurt durch die Firma Winicker-Norimed fand erstmals am 30.11.2010 statt. Insgesamt konnten bis April 2013 59 Patienten rekrutiert werden, von denen jedoch aufgrund eines zu geringen Tumoranteils im Gewebe (geringer als 30 %) und von Ausschlußkriterien (Colitis ulcerosa, Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom) 14 Patienten als „Drop out Patienten“ ausgeschlossen werden mussten. Von den verbleibenden Patienten (n=45) liegen von 23 Nachsorge (*Follow up*) Daten nach 6 Monaten, von 14 Patienten Daten nach 12 Monaten und von 4 Patienten nach 18 Monaten vor. Es konnte somit die angestrebte Anzahl von rekrutierten Patienten erreicht werden. Aufgrund der Projektplanung (5 Jahres Planung) findet auch nach dem Ende der Förderperiode eine Dokumentation der Patienten-Nachsorge am Standort Frankfurt statt.

2.2.2. Methodisch/experimentelle Ergebnisse

Die Etablierung der Nukleinsäure-Extraktion und des Multiplex PCR-Nachweises und deren Validierung wurde zentral und federführend von der Chirurgischen Klinik (Prof. Stürzl, Prof. Hohenberger, Prof. Croner) und dem Pathologischen Institut (Prof. Hartman) am Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt und wird entsprechend im Abschlussbericht dieser Institutionen detailliert dargestellt.

Im Folgenden werden exemplarisch am Beispiel von drei Markern mit Relevanz für die molekulare Stadieneinteilung und Metastasierungstendenz des kolorektalen Karzinoms die prinzipielle Durchführbarkeit und erste klinische Korrelationen dargestellt. Diese Ergebnisse sind aktuell zur Publikation eingereicht. Dazu wurden Biomarker, die in vorangegangenen Microarray Expressionsstudien im Vergleich von Patienten (n=80) mit metastasiertem und nicht-metastatischem Krankheitsverlauf identifiziert wurden in einem unabhängigen retrospektiven (n=82 Patienten) und einem prospektiven Patientenkollektiv (n=302 Patienten, Polyprobe Studie) validiert. Dabei zeigte sich, dass die Marker Collagen 10 (COL10A1), Matrix Metalloproteinase 11 (MMP-11) und Abhydrolase domain-containing protein 2 (ABHD2) sowohl in den Microarray Analysen als auch in den retro- und

prospektiven quantitativen PCR (qRT-PCR) Untersuchungen aus Paraffinmaterial signifikant mit fortgeschrittenen (metastasierenden) Tumorstadien assoziiert sind (Abbildung 1).

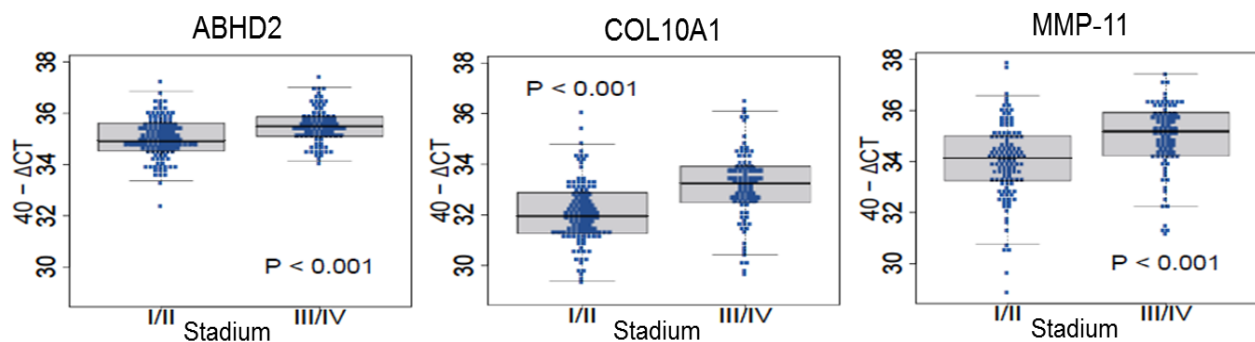


Abbildung 1.

Molekulare Marker für fortgeschrittene Stadien des kolorektalen Karzinoms in einer prospektiven Polyprobe Validierungsstudie. RNA wurde aus Paraffinmaterial von 203 Patienten mit unterschiedlichen Stadien eines kolorektalen Karzinoms (Union Internationale Contre le Cancer (UICC) Stadium I (n = 58), UICC II (n = 59), UICC III (n = 46), UICC IV (n = 40)) gewonnen und die Expression der Gene ABHD2, COL10A1 und MMP-11 mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt sind Box-Plot-Diagramme des Vergleichs der Tumorstadien I/II vs. III/IV.

In weiteren Analysen wurde die Relevanz dieser Marker für längerfristige klinische Endpunkte untersucht. Da die Nachbeobachtungszeit der prospektiven Polyprobe Studie noch zu kurz ist, um einen sicheren Einfluss für das Auftreten von Rezidiven und das krankheitsspezifische Überleben zu bestimmen, wurden diese Analysen auf Patienten im Stadium UICC II der Microarray-Studien mit einem ausreichend langen Follow up > 8 Jahre beschränkt.

Dabei zeigte sich für alle drei Marker eine signifikante Beziehung der Überexpression mit dem krankheitsspezifischen Überleben (Abb. 2). Bemerkenswerterweise wies eine parallele quantitative immunhistochemische Färbung der Marker in konsekutiven Schnitten keine Korrelation zu den mRNA-Expressions-Daten auf, so dass auf eine ausschließlich prognostische/prädiktive Relevanz und Aussagekraft der mRNA-Signatur geschlossen werden kann.

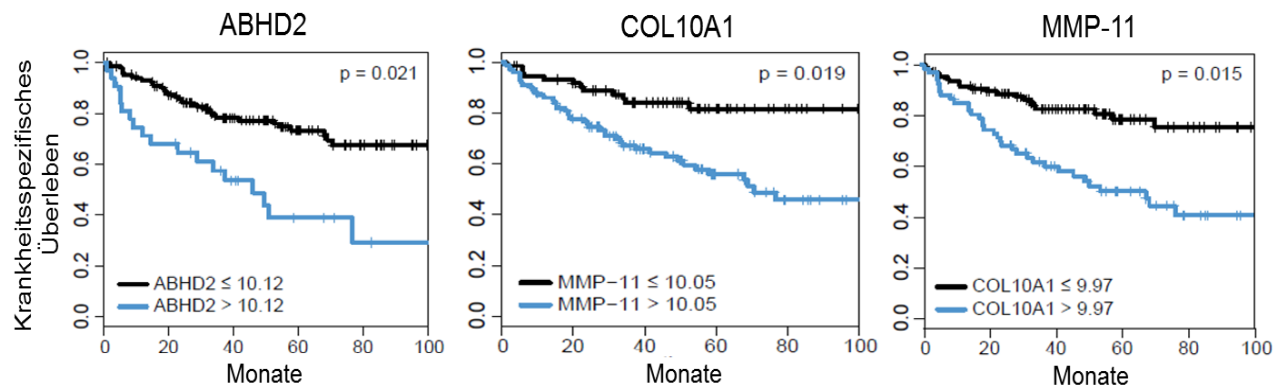
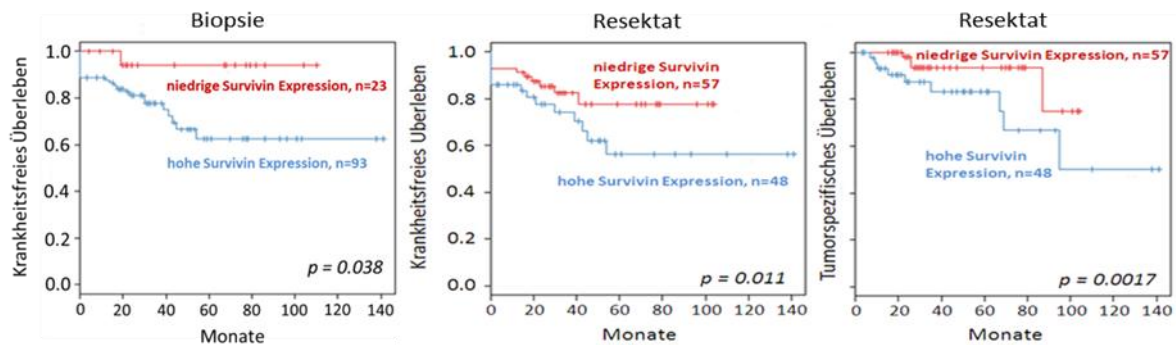


Abbildung. 2

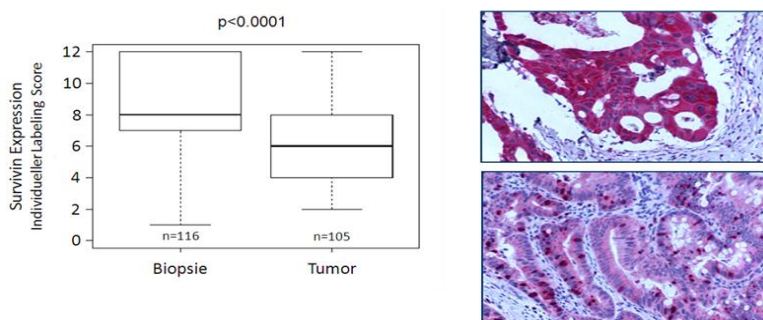
Assoziation des krankheitsspezifischen Überlebens mit der Expression von ABHD2, COL10A1 und MMP-11 überhalb (blaue Linien) und unterhalb (schwarze Linien) der in den Graphen angegebenen Grenzwerte der mRNA-Expression bei Patienten mit Kolonkarzinom.

In parallelen Untersuchungen wurde für einen weiteren Marker der Signatur, den Apoptoseinhibitor Survivin, der im Tumorgewebe auf mRNA-Ebene stark überexprimiert ist, ebenfalls in einem unabhängigen Patientenkollektiv die Relevanz für Therapieansprechen und Überlebensparameter nach präoperativer Radiochemotherapie evaluiert. Dazu standen in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Göttingen Paraffinmaterial sowohl von prätherapeutischen Biopsien als auch von korrespondierenden posttherapeutischen Operationspräparaten eines Vergleichskollektivs (n=116) von Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom zur Verfügung. Die statistische Auswertung der Färbungen in beiden Gewebeproben (7) zeigte eine signifikante Beziehung der Überexpression des Proteins, definiert als ein Färbeindex > Median im Biopsiegewebe für das krankheitsfreie Überleben und für das krankheitsfreie und tumorspezifische Überleben im Resektat (Abbildung. 3).

Zusätzlich gelang der Nachweis einer signifikanten Herunter-Regulation des Proteins nach Radiochemotherapie (Abb. 4). Blieb diese jedoch aus, bestand eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Fern-Metastasierung und ein vermindertes krankheitsfreies und tumorspezifisches Überleben (Tabelle. 1).

**Abbildung 3.**

Krankheitsfreies und tumorspezifisches Überleben in Abhängigkeit der Survivin Expression in prätherapeutischen Biopsien und postoperativen Tumorpräparaten von Patienten mit Rektumkarzinom und neoadjuvanter Radiochemotherapie. Den Cut-off-Wert der Kaplan-Meier Darstellungen stellt der mediane Färbeindex (Anzahl gefärbter Tumorzellen $\times$ Färbeintensität) von Survivin dar, mit einer niedrigen Expression bei einem Färbeindex < 6 und einer hohen Expression bei einem Index > 6 .

**Abbildung 4.**

Herunterregulation der Survivin-Expression nach neoadjuvanter Radiochemotherapie von 116 Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom (11 Patienten zeigten eine komplette Tumorregression) und Beispiele für eine prätherapeutische Biopsie in intensiver Färbung (Färbeindex 12) und des korrespondierenden Operationspräparates (Färbeindex 4).

Diese Daten bestätigen frühere eigene retrospektive Untersuchungen an einem kleineren Patientenkollektiv (8) und belegen erstmals eine prognostische/prädiktive Wertigkeit des Markers für ein mögliches Monitoring des Therapieerfolges beim Rektumkarzinom. Auch in multivariaten Analysen behält die Survivin-Expression neben dem Lymphknotenstatus eine statistisch signifikante Relevanz für das krankheitsfreie und tumorspezifische Überleben (7).

Variable	Biopsie		Tumorsektat	
	Korrelations-Koeffizient	p-Wert	Korrelations-Koeffizient	p-Wert
ypT	0.26	0.026	0.24	0.03
ypN	0.08	0.38	0.21	0.04
ypUICC	0.19	0.05	0.17	0.11
Tumorregression	-0.1	0.32	0.02	0.86
Lokalrezidiv	-0.03	0.71	0.04	0.91
Fernmetastasen	0.03	0.92	0.31	0.0056
Tumorspez. Tod	-0.02	0.69	0.28	0.026

Tabelle 1.

Korrelation einer hohen Survivin-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Auftreten von Fernmetastasen bei Patienten mit Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Radiochemotherapie.

Da nach dem geplanten Abschluss des Gesamt-Projekts im Jahr 2018 die Fünf-Jahres-Nachsorge-Daten der Patienten aus der Studie vorliegen, kann erst zu diesem Zeitpunkt abschließend überprüft werden, ob die Stadien-spezifische und prädiktiven Biomarker-signatur oder einzelne ausgewählte Marker eine Aussage für das langfristige krankheitsfreie, das metastasenfreie und das Gesamtüberleben bei den Patienten erlauben.

2.3. Zahlenmäßiger Nachweis

Siehe Verwendungsnachweis Drittmittelverwaltung Universitätsklinikum Frankfurt

2.4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Ziel des Polyprobe-Forschungsprojektes war die prospektive Evaluierung von Tumorstadium, Therapieansprechen und Prognose individueller Patienten basierend auf den spezifischen biologischen Charakteristika der Tumoren. Der Biomarker-Test beruht dabei auf Genexpressionsanalysen mit kinetischer PCR an Paraffin-eingebettetem Gewebe und ist weitgehend automatisierbar. Kolorektale Tumoren stellen die dritthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und Frauen weltweit mit einer Inzidenz von 945.000 Patienten/Jahr in den USA, Europa und Japan, den derzeit wichtigsten Märkten für Biomarker-Testsysteme, dar. Ein großer Teil der Patienten befindet sich bei Diagnosestellung bereits in fortgeschrittenen Stadien III oder IV und wird einer systemischen Therapie zugeführt, während Patienten in Stadium I und II zwar operiert, jedoch nicht systemisch behandelt werden. Während eine sichere Bestimmung des Tumorstadiums und des Therapieansprechens bei fortgeschrittenen Tumoren beispielsweise den Einsatz weniger belastender Operationstechniken oder alter-

nativer Therapieoptionen ermöglichen könnte, besteht bei Patienten im Stadium I und II aufgrund des möglichen Auftretens von Tumorrezidiven das Problem der Untertherapie. Biomarker-Tests, die diese beiden Patienten-Gruppen und das Therapieansprechen sicher identifizieren können, stellen somit eine wesentliche Grundlage für individualisierte Therapiestrategien dar. Sie könnten entsprechend dazu beitragen, das Risiko exakter einzuschätzen und die Kosten im Gesundheitswesen durch Vermeidung unnötiger Therapien zu reduzieren. Dabei ist das Marktpotenzial für das kolorektale Karzinom aufgrund der Häufigkeit der Erkrankung in den nächsten Jahren als hoch einzuschätzen. Man geht davon aus, dass der Markt für molekulare Diagnostik ein starkes Wachstum aufweist und sich schätzungsweise bis zum Jahr 2015 auf ca. 22,5 Mrd US\$ mehr als verdoppeln wird (9). Zudem ist ein Transfer auf andere Tumorentitäten, besondere in technischer Hinsicht (Extraktionsplattform) und unter Verwendung Entität-spezifischer Marker sinnvoll und durchführbar.

Valide Biomarker können, insbesondere bei selektiver Überexpression im Tumorgewebe, auch als sinnvolle Zielstrukturen einer molekular zielgerichteten Tumorthherapie dienen. Daher richten sich große Hoffnungen für die Verbesserung des individuellen Therapieerfolges im Sinne einer personalisierten Medizin auf neuartige multimodale Konzepte unter Einbeziehung dieser Optionen. Ein in diesem Zusammenhang interessanter Faktor ist der Apoptoseinhibitor Survivin, der ein wesentliches Mitglied der Prädiktionsmarker-Signatur darstellt. Für Survivin werden aktuell Antagonisten in frühen klinischen Studien (Phase I/II) bei unterschiedlichen Tumorentitäten (u. a. Brust-, Kolon-, Prostatakarzinom und Melanom) geprüft. Diese Antagonisten umfassen 2'-O-Methoxy-Methyl modifizierte Antisense-Oligonukleotide (LY2181308, Gataparsen) und den „*Small Molecule*“ Inhibitor YM155. Ein leicht anzuwendendes Nachweisverfahren kann langfristig zur Selektion geeigneter Patienten und zur Verlaufskontrolle Survivin-basierter, zielgerichteter Therapiestrategien bei einer Vielzahl von Tumorarten eingesetzt werden (4, 10).

2.5. Fortschritte anderer Stellen während der Projektlaufzeit

Da der komplexe Phänotyp einer Therapieresistenz mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur auf die Deregulation eines einzelnen sondern vielmehr auf die von mehreren Faktoren zurückzuführen ist, wurden eine Reihe von Hochdurchsatztechnologien, einschließlich aktueller „*Next-Generation-Sequencing*“ Methoden entwickelt, um die molekularen

Grundlagen aufzuklären und prädiktive Signaturen zu entwickeln. Ein Vergleich von publizierten Signaturen (11-13) und Markern der Signatur des Verbundprojektes zeigt jedoch sehr wenig, wenn überhaupt, überlappende Gene. Diese Diskrepanzen scheinen auf unterschiedlichen Definitionen des Therapieansprechens, limitierten Patientenzahlen, einer Redundanz der Signal- und Reaktionswege sowie einer extrem hohen Dimensionalität der Daten und einer immensen Anzahl gemessener genetischer Parameter zu beruhen. Es ist entsprechend wahrscheinlich, dass nicht nur eine, sondern parallel mehrere Signaturen mit prädiktiver Relevanz bestehen können. Neuere Untersuchungen zeigen zudem oftmals nur eine geringe bis mäßige Korrelation der mRNA mit der korrespondierenden Protein-Expression, die auf post-transkriptionellen und post-translationalen Modifikation und der Wirkung regulatorischer mikroRNAs (miRNA) beruhen (14, 15).

2.6. Erfolgte und eingereichte Veröffentlichungen der Ergebnisse

Vorhabensbezogene Ergebnisse und Zusammenfassungen mit Benennung des Projektträgers BMBF als Förderinstitution wurden publiziert in:

- Sprenger T*, **Rödel F***, Beissbarth T, Conradi LC, Rothe H, Homayounfar K, Wolff HA, Ghadimi BM, Yildirim M, Becker H, **Rödel C**, Liersch T. Failure of downregulation of survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. Clin Cancer Res 2011;17:1623-31. *gleichberechtigte Autorenschaft.
- **Rödel F**, Sprenger T, Kaina B, Liersch T, **Rödel C**, Fulda S, Hehlhans S. Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy. Curr Med Chem 2012;19:3679-88.
- **Rödel F**, Reichert S, Sprenger T, Gaipf US, Mirsch J, Liersch T, Fulda S, **Rödel C**. The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis Inhibition. Curr Med Chem 2011;18:191-9.
- Croner R, Konrad A, Wirtz R, Beyer A, Adler W, Naschberger E, Grenz S, Gefeller O, Henriette Golcher H, Merkel S, Schaal U, Rau T, **Rödel F**, Schmid M, Prokosch HU, Köpcke F, Hartmann A, Lausen B, Hohenberger W, Stürzl M. COL10A1, MMP-11 and ABHD2 expression in colorectal carcinoma primary tumors is associated with metastatic disease. Zur Publikation eingereicht.

2.7. Literatur

1. Guillem JG, Moore HG, Akhurst T, *et al.* Sequential preoperative fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment of response to preoperative chemoradiation: a means for determining longterm outcomes of rectal cancer. *J Am Coll Surg* 2004;199:1-7.
2. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-337.
3. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-1740.
4. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, *et al.* Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8688-8696.
5. Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, *et al.* The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbecks Arch Surg* 2012;397:543-555.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
7. Sprenger T, Rödel F, Beissbarth T, *et al.* Failure of downregulation of survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clin Cancer Res* 2011;17:1623-1631.
8. Rödel F, Hoffmann J, Distel L, *et al.* Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005;65:4881-4887.
9. Jain K. Personalized Medicine: Scientific & Commercial Aspect. *Jain PharmaBiotech Publications* 2007.
10. Rödel F, Sprenger T, Kaina B, *et al.* Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy. *Curr Med Chem* 2012;19:3679-3688.
11. Brettingham-Moore KH, Duong CP, Greenawalt DM, *et al.* Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:3039-3047.
12. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, *et al.* Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:1826-1838.
13. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, *et al.* Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:53-61.
14. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;13:227-232.
15. Salendo J, Spitzner M, Kramer F, *et al.* Identification of a microRNA expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells, involving miRNAs-320a, -224, -132 and let7g. *Radiother Oncol* 2013;108:451-457.

3. Unterschrift

Frankfurt am Main, 28. 11. 2013



Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht	
3. Titel Schlussbericht zum Verbundprojekt kolorektales Karzinom Teilprojekt 1: Sensitives Polyprobe Verfahren zur verbesserten Prädiktion von Therapieresponse und Bestimmung der Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom.		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.04.2013	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Schlussbericht	
	9. Ber. Nr. Durchführende Institution	
Goethe-Universität Frankfurt am Main Zentrum für Radiologie Klinik für Strahlentherapie und Onkologie Theodor-Stern-Kai 7 60590 Frankfurt am Main	10. Förderkennzeichen 01ES0808	
	11. Seitenzahl 18	
	13. Literaturangaben 19	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	14. Tabellen 1	
	15. Abbildungen 4	
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Projektträger im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Gesundheitsforschung Heinrich-Konen-Str.1 53227 Bonn November 2013		
18. Kurzfassung Derzeit beruht die Prädiktion der Prognose und des Therapieansprechens bei Patienten mit kolorektalem Karzinom überwiegend auf bildgebenden und histopathologischen Kriterien. Zielsetzung der prospektiven, multizentrischen Studie war die Validierung und diagnostische Anwendung spezifischer RNA-Expressionssignaturen für eine molekulare Stadien Einteilung und Prädiktion des Ansprechens auf eine Tumorthherapie einschließlich der Chemo- und Radiotherapie. Für diese Zielsetzung wurde erstmals eine neuartige Technologieplattform (Polyprobe Technologie) etabliert, die den simultanen Nachweis von mehr als 50 unterschiedlichen Markergenen aus im Rahmen von in Routine diagnostischen Prozeduren gewonnenem Paraffinmaterial ermöglicht. Im Rahmen des Sub- projektes am Universitätsklinikum Frankfurt am Main wurde dem Forschungskonsortium Biopsiematerial bzw. klinische und Nachsorgedaten von insgesamt 45 Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom zur Verfügung gestellt. Die prinzipielle Durchführbarkeit und erste klinische Korrelationen wurden am Beispiel von drei Markern mit Relevanz für die Prädiktion fortgeschrittener Tumorstadien (Kollagen 10, Matrix Metalloproteinase 11 und Abhydrolase domain-containing protein 2) und der Metastasierungstendenz (Apoptoseinhibitor Survivin) belegt. Aufgrund des prospektiven Charakters des Vorhabens sind jedoch abschließende Aussagen zum längerfristigen onkologischen Ausgang (5-Jahres Überleben) erst nach ausreichend langer Nachbeobachtungszeit möglich. Zusammengefasst stellen die Untersuchungen eine wesentliche Voraussetzung für die Implementierung und Kommerzialisierung einer RNA-Marker basierten Prädiktion für zukünftige personalisierte Therapieoptionen dar.		
19. Schlagwörter Kolorektales Karzinom, Prädiktion, Prognose, Therapieansprechen, prospektive Studie		
20. Verlag	21. Preis	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report		
3. title Final report to the collaborative project: Sensitive polyprobe approach for improved prediction of therapy response and assessment of prognosis in colorectal cancer			
4. author(s) (family name, first name(s)) Prof. Dr. Franz Rödel		5. end of project April, 30 th 2013	
		6. publication date	
		7. form of publication Final report	
8. performing organization(s) (name, address) Goethe-Universität Frankfurt am Main Center of Radiology Department of Radiotherapy and Oncology Theodor-Stern-Kai 7 60590 Frankfurt am Main		9. originator's report no.	
		10. reference no. 01ES0808	
		11. no. of pages 18	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		13. no. of references 19	
		14. no. of tables 1	
		15. no. of figures 4	
16. supplementary notes			
17. presented at (title, place, date) Projektträger im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Gesundheitsforschung Heinrich-Konen-Str.1 53227 Bonn November 2013			
18. abstract At present, the prediction of prognosis and therapy responses of patients with colorectal cancer are predominantly determined by medical imaging and histopathological criteria. The goal of the prospective, multicentre study was the validation and diagnostic application of specific RNA expression profiles to determine the stage of CRC and to predict the response to anti-cancer therapy including chemo- and radiation therapy. To this goal a novel (polyprobe) technology platform was established for simultaneous detection of the expression of more than 50 different marker genes in one paraffin section obtained during routine diagnostic procedures. Within the sub-project at the University Hospital at Frankfurt am Main biopsy material, clinical characteristics and follow up data from a total of 45 patients with advanced rectal cancer were provided to the research consortium. The feasibility of the approach and first clinical correlations were exemplarily documented by the relevance of three selected markers (collagen 10, matrix metalloproteinase 11 and abhydrolase domain-containing protein 2) to predict advanced stages and metastatic behaviour (inhibitor of apoptosis protein Survivin). Due to the prospective character of the investigation, however, data on long term oncologic outcome (5-year survival) of the entire signature will be available after a sufficient follow up time. In conclusion, these data provide a prerequisite for the implementation and commercialisation of a RNA marker-based prediction in future personalised treatment options.			
19. keywords Colorectal carcinoma, prediction, prognosis, therapy response, prospective clinical trial			
20. publisher		21. price	