

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Arbeitsgruppe für Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

**Analyse prädiktiver Biomarker für therapeutische Strategien
bei kolorektalem Karzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christiane Gerstlauer
aus Weingarten

Würzburg, August 2006

Referentin: Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Koreferent: Professor Dr. med. M. Böck

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 3. August 2007

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Grundlagen	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Anatomie	1
1.1.3. Ätiologie	3
1.1.4. Pathogenese	4
1.1.5. Pathologie und Tumorklassifikation	6
1.2. Symptomatologie	8
1.3. Diagnostik	8
1.3.1. Screening	8
1.4. Kurative Therapie - Operationsverfahren	10
1.4.1. Kolonkarzinome	11
1.4.2. Rektumkarzinome	11
1.5. Postoperativer Verlauf	12
1.6. Neoadjuvante Therapie	13
1.7. Adjuvante Therapie	13
1.8. Palliative Therapie und Residualtumorklassifikation	14
1.9. Prognose	15
1.10. Nachsorge	15
1.11. Rezidiv	16
2. FRAGESTELLUNG	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Patientengut	21
3.2. Statistische Methoden	22

3.3.	Labormethoden	23
3.3.1.	Serummessung von CEA, CA 19-9 und p53	23
3.3.2.	Messung von p53 Antikörper	23
3.3.3.	Immunhistologie	24
3.3.4.	RNA Extraktion	25
3.3.5.	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) für die Bestimmung von p53 Mutationen	25
3.3.6.	Real Time PCR	25
4.	ERGEBNISSE	27
4.1.	Geschlecht und Alter	27
4.1.1.	Geschlechtsverteilung	27
4.1.2.	Altersverteilung	28
4.2.	Tumorlokalisation / UICC-Stadium / Grading	29
4.2.1.	Tumorlokalisation	29
4.2.2.	UICC-Stadium	30
4.2.3.	Grading	31
4.3.	Korrelation von CEA und prognoserelevanten Faktoren	32
4.4.	Einfluss prognoserelevanter Faktoren auf das tumorbedingte Überleben	33
4.4.1.	UICC-Stadium	34
4.4.2.	Infiltration der Darmwand (T-Status)	35
4.4.3.	Befall der Lymphknoten (N-Status)	36
4.4.4.	CEA	37
4.5.	Einfluss von UICC in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben	38
4.5.1.	UICC und CEA	38
4.5.2.	UICC III und CEA	40
4.6.	Einfluss prognoserelevanter Faktoren auf die rezidivfreie Zeit	43
4.7.	Tumorsuppressorgen p53	44
4.7.1.	Humorale Antwort auf p53	44
4.7.2.	Analyse der Mutationen im p53-Gen	46
4.8.	Korrelation von CEA, CA 19-9 und p53 im Serum und Tumor	47
5.	BEANTWORTUNG DER FRAGEN	51

6. DISKUSSION	53
7. ZUSAMMENFASSUNG	62
8. LITERATURVERZEICHNIS	64
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	71

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

1.1. Grundlagen

1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten Malignomen und ist maßgeblich an der Krebs verursachten Morbidität und Mortalität beteiligt. Trotz großer Fortschritte sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie der Krankheit, blieb die Mortalität nahezu unverändert innerhalb der letzten 20 Jahre. In Deutschland steht es an erster Stelle der Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Jährlich wird eine Inzidenz von ca. 50 je 100.000 Einwohner angegeben, davon betreffen ca. 17 Sterbefälle pro 100.000 Einwohner das Rektumkarzinom (1). Betrachtet man die Gesamtheit aller Tumoren, steht das KRK an zweiter Stelle sowohl bei Männern (nach dem Bronchialkarzinom) als auch bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) (2, 3). 90 % der KRK finden sich nach dem 50. Lebensjahr und nur vereinzelte Fälle vor dem 40. Lebensjahr. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (4).

1.1.2. Anatomie

Als Kolonkarzinome gelten Tumore, deren aboraler Rand mehr als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist (5). Somit umfasst dies folgende Abschnitte: Zökum mit Ileozökalklappe, Kolon ascendens, Flexura hepatica, Kolon transversum, Flexura lienalis, Kolon descendens und Sigma. Die arterielle Blutversorgung erfolgt für das rechte Kolon und das Querkolon über die Arteria mesenterica superior (A. mesent. sup.), während die Abschnitte distal der Flexura lienalis über die Arteria mesenterica inferior (A. mesent. inf.) versorgt werden. Die venöse Drainage des rechten Hemikolon und Transversum erfolgt prinzipiell den art. Gefäßen, während sich der Blutrückstrom aus dem linken Hemikolon in der Vena mesenterica inferior (V. mesent. inf.) sammelt, mit der V. lienalis konfluiert und sich anschließend wie die V. mesent. sup. in die Pfortader ergießt. Der Lymphabfluss erfolgt ebenfalls entlang der Arterien und durchläuft 4 Stationen: epikolisch, parakolisch, intermediär und zentral (aortennah).

Für das Rektumkarzinom gilt definitionsgemäß, dass der aborale Rand 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist (5). Es findet eine Einteilung in das obere, mittlere und untere Rektumdrittel statt; dementsprechend erfolgt auch die arterielle Blutversorgung über die Arteria rectalis superior, media und inferior. Das venöse Blut fließt aus den oberen Rektalgefäßen über die V. mesent. inf. in die Pfortader und die mittleren und unteren Rektalgefäße münden über die V. iliaca interna in die untere Hohlvene. Die lymphogene Drainage geschieht in 2 Richtungen: Tumoren des oberen und mittleren Rektumdrittels drainieren vorwiegend entlang der Rectalis-superior-Gefäße, diejenigen im unteren Rektumdrittel drainieren nach kranial und lateral entlang der Rectalis-media Gefäße. Lymphbahnblockaden können auch eine retrograde Drainage bewirken.

Entsprechend der Blut- und Lymphdrainage lassen sich die Metastasierungswege erklären: die hämatogene Metastasierung folgt dem venösen Abfluss über die V. portae in die Leber und nur beim distalen Rektumkarzinom über die V. cava inf. primär in die Lunge. Leber (75%) und Lunge (15%) sind demnach am häufigsten betroffen und erst danach die anderen Organe (Kaskadentheorie). Bei 25% sind bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen zu finden und bei mehr als 50% entwickeln sich diese im Laufe der Zeit (6).

Die lymphogene Ausbreitung des Rektumkarzinoms verläuft über 3 Metastasenstraßen je nach Sitz des Tumors. Tumoren des oberen Drittels infiltrieren hauptsächlich die paraaortalen Lymphknoten, je weiter distal die Lokalisation ist, sind zusätzlich Beckenwand- (iliakale) und inguinale Lymphknoten betroffen. Die befallenen Lymphknoten des Kolonkarzinoms infolge lymphogener Metastasierung liegen epikolisch, parakolisch, intermediär und aortennah.

In den letzten Jahren wurde eine zunehmende „Rechtsverschiebung“ des KKK beobachtet mit einem selteneren Befall des linken Hemikolon und Rektum und einer relativen Zunahme im rechten Hemikolon (7). Dies könnte bedeutende Auswirkungen haben für das Screening. Andere Studien jedoch zeigen nur eine allgemeine Zunahme der Tumorinzidenz in allen Darmabschnitten auf, ohne eine spezielle „Rechtsverschiebung“ (8).

1.1.3. Ätiologie

Das KRK unterliegt einer multifaktoriellen Genese: die Tatsache, dass weltweit die Inzidenz des KRK sehr variiert, spricht stark für die Einflußnahme von Umweltfaktoren an dieser Erkrankung. So gelten fettreiche und fleischreiche (v.a. rohes Fleisch) Nahrung als gesicherte Risikofaktoren bei der Entstehung. Möglicherweise spielt auch ballaststoffarme Kost eine Rolle, die aufgrund ihrer längeren Verweildauer im Kolon die Einwirkung von Karzinogenen begünstigt (9). Generell sind Fettleibigkeit und mangelnde sportliche Aktivität mit einem erhöhten Risiko verbunden (10). Desweiteren haben Alkohol- und Nikotinkonsum negativen Einfluß auf die Adenom-Karzinom-Sequenz und begünstigen die Tumorentstehung.

Einen protektiven Einfluß dagegen zeigen sowohl Pflanzenfasern (11) als auch Calcium und Vitamin D (12). Weitere Studien bekräftigen eine chemoprotektive Einflußnahme von Nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAID), insbesondere Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitoren. COX-2 ist bei 85-90% der KRK erhöht, während COX-1 unverändert erscheint. Bei regelmäßiger Einnahme von COX-2 Inhibitoren ist eine 40-50%ige Reduktion des kolorektalen Karzinomrisikos zu sehen; der Wirkmechanismus läßt sich zum einen durch die Veränderung einer Anzahl an Signaltransduktionswegen erklären, zum anderen führen COX-2 Inhibitoren zu einer Zunahme der Apoptose (13, 14).

Darüber hinaus gilt auch eine ausgeprägte und langwierig bestehende Colitis ulcerosa als Risikofaktor und ist damit eine Risikoerkrankung (15). Eine rechtzeitige Intervention durch medikamentöse Behandlung, chirurgische Therapie und engmaschige Nachsorge kann das Risiko jedoch erheblich senken.

Das KRK entsteht zu 90% sporadisch, während die restlichen 5-10% hereditär bedingt sind. Die genetischen Faktoren sind nicht unbedeutend: Die häufigste Form der hereditären Kolorektalkarzinomsyndrome ist das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) kommt wesentlich seltener vor (16). Ursache für die FAP ist eine Mutation des Adenoma-polyposis-coli-(APC-) Gens, welches autosomal-dominant vererbt wird (17). Schon im Alter von 30 Jahren entwickeln sich bei betroffenen Individuen viele Polypen in Kolon und Rektum und mit dem 40. Lebensjahr ist das Fortschreiten bis zum Karzinom meist erreicht (18).

Eine Kolektomie im Alter von 20 Jahren scheint die einzigste karzinompräventive Maßnahme zu sein; dennoch bleibt ein erhöhtes Risiko für Duodenum- und Desmoidtumoren bestehen. Ursächlich für das HNPCC (Lynch-Syndrom) ist eine Mutation auf der DNS der „Mismatch-repair(MMR)-Gene, von denen derzeit 5 bekannt sind (19). Aufgrund der inaktivierten MMR-Gene kann eine fehlerhaft replizierte DNS nicht mehr repariert werden, es kommt zur Ansammlung von Genmutationen und die Zellproliferation kann direkt beeinflusst werden. Das Lynch-Syndrom hat zudem ein erhöhtes Risiko für extrakolonische Neoplasien (20, 21). Mit >30% ist davon insbesondere das Endometriumkarzinom betroffen, gefolgt von Ovarialkarzinom, Magen-, Urothel- und Pankreaskarzinom. Nicht zuletzt ist auch das Vorhandensein einer positiven Familienanamnese für das KRK bedeutend.

1.1.4. Pathogenese

Ausgangspunkt für die Entstehung ist die Adenom-Karzinom-Sequenz. Zahlreiche genetische Veränderungen führen zu einer malignen Transformation und letztlich zur Tumorprogression. Dieses nach Vogelstein erstmals beschriebene Tumorprogressionsmodell durchläuft einen mehrstufigen Prozess (18, 22, 23). Die molekularbiologischen Alterationen werden durch zwei Genklassen verursacht: dabei handelt es sich zum einen um eine Aktivierung von Onkogenen (K-Ras-Gene) und zum anderen um einen Verlust von Tumorsuppressor-Genen (APC-, DCC-, p53-Gene). Die Aktivierung der Proto-Onkogene kann durch mehrere Mechanismen erfolgen wie Punktmutationen, Rekombinationen oder durch einen Verlust der Promotormethylierung. Tumorsuppressor-Gene verhindern das Zellwachstum. Sie verlieren in der Regel ihre Funktion durch Mutation, Genverlust oder Promotormethylierung (24).

Die Inaktivierung des APC-Genes (Chromosom 5q) spielt schon am Anfang der Sequenz bei der Entstehung der Adenome eine Rolle. Der Verlust des APC-Genes führt zu erhöhten β -Catenin-Spiegeln, was sich ungünstig auf die Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums auswirkt und auch die Apoptose verhindert. Fraglich ist, ob sich die APC Abnormalitäten nicht auch negativ auf die E-Cadherine, welche die Zell-Adhäsionskontakte herstellen, auswirken (24). Ebenso am Anfang der Sequenz erfolgt die Aktivierung von K-ras Proto-Onkogenen (Chromosom 12p), die mitverantwortlich

sind für die Signaltransduktion, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (25). Das DDC(deleted in coclorectal carcinoma)-Gen zeigt eine Deletion auf Chromosom 18q und ist bei Karzinomen wesentlich häufiger zu finden als bei Adenomen, was für ein relativ spätes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz spricht (22). Das Fehlen des Proteinproduktes des DDC-Gens reduziert die intrazellulären Kontakte und begünstigt damit das Loslösen und Metastasieren von Zellen (18). Das Tumorsuppressor-Gen p53 (Chromosom 17p) steht ganz am Ende der Sequenz. Seine Funktion besteht darin, beschädigte DNA an der Replikation zu hindern und die Apoptose zu regulieren (24). Seine Inaktivierung bedingt daher eine starke Progression vom Adenom zum Karzinom.

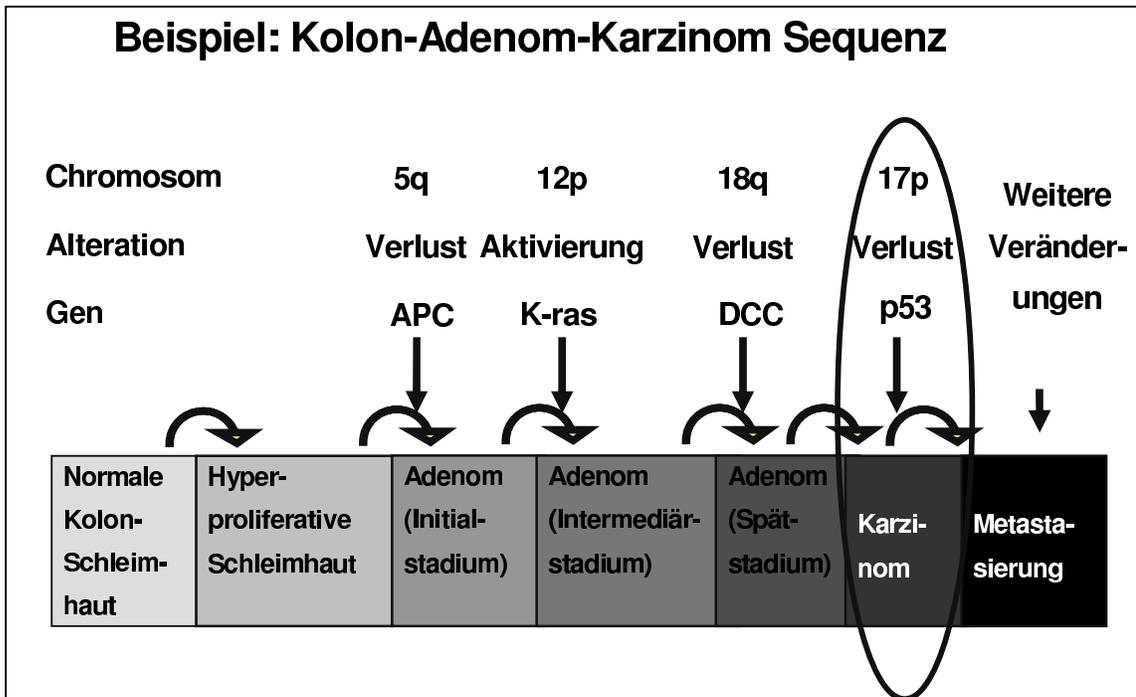


Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz: Der Verlust der funktionellen Integrität des p53-Gens führt im Adenom zur Entwicklung eines Karzinoms

1.1.5. Pathologie und Tumorklassifikation

Makroskopisch bestehen 4 Wachstumsformen des KRK: das ulzeröse Karzinom wächst entweder zirkulär oder oval und infiltriert die Darmwand in der Regel tief. Sowohl eine frühe lymphatische Metastasierung als auch tumorbedingte Wandperforation sind hierfür charakteristisch. Der polypoide Typ hingegen wächst häufig gelappt, infiltriert die Wand nicht so tief und wird vor allem in Zökum und Kolon ascendens gefunden. Die *zirkulär* wachsende Form nimmt die ganze Wandzirkumferenz ein und kann des öfteren Stenosen ausbilden, was sich naturgemäß häufig als Ileus äußert; diese Art von Karzinom liegt meistens im Kolon transversum, Kolon descendens und im Rektum vor. Nur ganz selten wächst das KRK diffus und infiltriert über größere Areale hinweg die Darmwand.

Histologisch handelt es sich so gut wie immer um ein Adenokarzinom. Die histopathologische Beschreibung des Differenzierungsgrades (Grading) benutzt ein Numerierungssystem von 1-4 (G1-G4) entsprechend der Adjektive: gut, mäßig, schlecht und undifferenziert. Weiter können die Karzinome auch in Low-grade-Karzinome (G1, G2) und High-grade-Karzinome (G3, G4) eingeteilt werden.

Dukes konnte schon sehr früh nachweisen, dass das Grading unmittelbar mit dem Ausmaß von Lymphknoten- und Fernmetastasierung zusammenhängt (26, 27). Desweiteren wurde später festgestellt, dass auch die Wahrscheinlichkeit venöser und lymphatischer Gefäßeinbrüche und die lokale Tumorausdehnung mit dem Schweregrad der Differenzierung korrelieren.

Für die Stadieneinteilung wird die 1932 von Dukes vorgeschlagene und später auch von Astler und Coller (28) modifizierte Stadieneinteilung verwendet, wobei die TNM-Tumorklassifikation nach UICC heute weitaus gebräuchlicher ist (29, 30).

TNM-System (Tumor-Node-Metastasis-System):

T1-4: Ausmaß der Tumordinfiltration

N0-2: Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung

M0-1: fehlende oder vorhandene Metastasen

Diese Klassifikation ist weltweit anerkannt und ermöglicht eine einheitliche Einteilung; auf dieser Basis können auch Vergleiche bezüglich der Primärdiagnose vorgenommen werden.

TNM	Beschreibung
Tis	Carcinoma in situ
T1	Mucosa und Submucosa befallen
T2	Muscularis propria befallen
T3	Subserosa befallen
T4	angrenzende Organe befallen
N0	keine regionären Lymphknoten befallen
N1	angrenzende Lymphknoten befallen
N2	entfernte Lymphknoten befallen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

UICC Stadium

	M0			M1
	pN0	pN1	pN2	
pT1	St. I	St. III A	St. III C	St. IV
pT2				
pT3	St. II A	St. III B		
pT4	St. II B			

Abb. 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC (überarbeitete Version von 2003)

1.2. Symptomatologie

Die Karzinome des Kolons und Rektums wachsen oft langsam und persistieren manchmal über Jahre bevor Beschwerden auftreten. Klinisch präsentieren sich diese Tumore vielfältig und sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Symptome stehen in gewissem Zusammenhang mit der Lokalisation der Tumore: Tumore des proximalen Kolons wachsen oft länger asymptomatisch, während die Karzinome des distalen Kolons und Rektums viel früher Symptome zeigen. Für das proximale Kolon ist desweiteren eine Obstruktion aufgrund des im Vergleich zum distalen Kolon größeren Durchmessers eher selten, wohingegen im distalen Kolon öfters mit einer Obstruktion zu rechnen ist (31).

Prinzipiell führen Tumore des KRK zu akuten und chronischen Symptomen. Das häufigste Symptom in einer chronischen Situation ist die Veränderungen von Stuhlgewohnheiten. Sehr häufig wird über abdominelle Schmerzen geklagt, wobei ein kolikartiger Schmerzcharakter für eine Obstruktion richtungsweisend sein kann. Perianaler Blutabgang ist ebenso auffällig; hierfür gilt je weiter proximal die Läsion liegt, desto okkulter wird das Blut und je weiter distal desto hellroter ist die Blutbeimengung. Die Folgen des Blutverlustes können sich in einer hypochromen normozytären Anämie äußern, oft als einzigen Befund bei sonst beschwerdefreien Patienten. Gelegentlich kommt auch analer Schleimabgang vor. Gewichtsverlust ist eher unspezifisch und erst bei sehr starkem Verlust ist dann bereits an Metastasen zu denken. Sind Patienten sehr schlank, kann der Tumor eventuell sogar palpiert werden.

Nur sehr selten präsentiert sich das KRK als Notfall und bedarf dann eines notfallmäßigen chirurgischen Eingriffes. Hierbei handelt es sich dann entweder um einen Dickdarmileus oder um eine tumorbedingte Wandperforation mit konsekutiver Peritonitis.

1.3. Diagnostik

1.3.1. Screening

Screeningprogramme haben zum Ziel, Karzinomdiagnosen in einem frühen Stadium zu erfassen und damit die Heilungschancen zu erhöhen. Die American Cancer Society

empfiehlt deshalb ein generelles Screening jenseits des 50. Lebensjahres für asymptotische Individuen (32). Bei Risikogruppen hingegen ist allgemein akzeptiert, dass das Screening bereits vor dem 50. Lebensjahr stattfindet.

Präoperative Untersuchung

Eine präoperative Untersuchung zielt darauf ab, den Primärtumor und dessen Ausbreitung weitgehend zu charakterisieren, um entsprechendes Therapieverfahren einleiten zu können. Nach ausführlich erfolgter Anamnese folgt die klinische Untersuchung, zu welcher die digitale Rektumuntersuchung, Inspektion, Palpation und Auskultation des Abdomens gehören. Weiterhin gehört zur Standarduntersuchung für das KRK die Koloskopie mit Biopsieentnahme. Sollte ein distaler Tumor endoskopisch bereits gesichert sein, ist eine totale Koloskopie dennoch sinnvoll, um einen Zweittumor auszuschließen, was in 2-3% der Fälle auftritt. Ist dies aufgrund eines stenosierenden Prozesses zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, sollte es dennoch spätestens 6 Monate nach der Operation durchgeführt werden. Weitere Alternativen zur Koloskopie sind der Kolondoppelkontrasteinlauf (Kolon-KE) und die Rektoskopie. Speziell für das Rektumkarzinom besteht auch die Möglichkeit einer endorektalen Sonographie; diese ermöglicht es, die Penetrationstiefe eines Tumors nach dem TNM-System festzulegen (33). Weiter ist für das Rektumkarzinom die Computertomographie (CT) eine absolute Indikation, da das Therapieverfahren von der Tumordinfiltration in die umliegenden Organe entscheidend abhängt. Darüber hinaus können mit dem CT auch fokale Herde der Leber erfasst werden (34). Zur weiteren Untersuchung auf Metastasen sind die Sonographie der Leber und die Röntgenthoraxaufnahme in 2 Ebenen empfehlenswert.

Neben dem üblichen Routinelabor sollten präoperativ auch Serumwerte für die Tumormarker abgenommen werden. Tumormarker im allgemeinen sind körpereigene Substanzen, deren erhöhte Konzentrationen Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose der Tumorerkrankung ermöglichen (35). Für das KRK eignen sich besonders das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das Carbohydratantigen 19-9 (CA 19-9) in Kombination miteinander (36).

Das CEA umfasst eine Gruppe heterogener Zelloberflächenglykoproteine mit noch unklarer Funktion. CEA ist auch bei gesunden Personen in niedrigen Konzentrationen nachzuweisen (1,5-5,0 ng/ml), wird aber auch in Zellen unterschiedlicher Karzinome,

ganz besonders bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes, sehr stark exprimiert. Beim KRK sind besonders hohe Konzentrationen zu finden. Das CA 19-9 ist ein Glykolipid, leitet sich vom Lewis-Blutgruppensystem ab und hat einen oberen Grenzwert von 37 U/ml.

Beim Einsatz von Tumormarkern in der Therapieüberwachung ist die initiale Bestimmung der Ausgangswerte bedeutend, denn nur so kann die Therapie anhand der Tumormarkerverläufe sachgerecht beurteilt werden. Sowohl für die Therapieüberwachung als auch für die Nachsorge zur Rezidivfrüherkennung ist die Kenntnis der biologischen Eliminationshalbwertszeiten der Tumormarker von zentraler Bedeutung; anhand dieser können die Folgebestimmungen vernünftig geplant werden. Bei der Verlaufsbeurteilung müssen unbedingt auch mögliche Störfaktoren berücksichtigt werden. Dazu gehören unter anderem die analytische Varianz und die individuell biologische Varianz. Ebenso von großer praktischer Bedeutung ist die konstante Verwendung von gleichem Testbesteck. Auch sollte berücksichtigt werden, dass unmittelbar nach der Operation, aber auch nach Chemo- oder Strahlentherapie, Tumormarker aus dem zerfallenen Tumorgewebe freigesetzt werden, was natürlich zu fälschlich hohen Werten führt. Die Notwendigkeit einer Bluttransfusion kann durch den Verdünnungseffekt auch zu fälschlich niedrigen Werten führen. Nicht zuletzt sollte auch erwähnt werden, dass Raucher erhöhte CEA Werte bis 20 ng/ml aufweisen können.

1.4. Kurative Therapie - Operationsverfahren

Vor der Operation (OP) sollte der Patient selbstverständlich über alle möglichen Komplikationen und Risiken aufgeklärt werden. Er sollte insbesondere über das Risiko einer Anastomoseninsuffizienz mit der Notwendigkeit eines späteren Anlegen eines Anus praeter informiert werden, als auch darüber, dass das Karzinom in sehr fortgeschrittenem Stadium nicht komplett reseziert werden kann und auch hier ein künstlicher Darmausgang notwendig sein könnte. Die mechanische Reinigung des Dickdarms vor der OP gehört genauso zum Standardvorgehen wie die perioperativ verabreichte Einmaldosis eines Cephalosporins in Kombination mit einem Metronidazolpräparat.

1.4.1. Kolonkarzinome

Üblicherweise wird für den Zugang zum Abdomen die mediane Laparotomie gewählt. Ziel ist eine En-bloc-Resektion von tumortragendem Kolonabschnitt und Mesenterium unter Einhaltung einer ausreichenden Sicherheitszone normalen Gewebes und unter Mitnahme des regionären Lymphabflußgebietes, ggf. unter Mitresektion infiltrierter umgebender Organe. Je nach Tumorlokalisation bedeutet dies eine Hemikolektomie rechts bzw. links, eine Transversumresektion oder eine Sigmaresektion. Zur Entfernung des intramural gewachsenen Tumors ist ein Sicherheitsabstand von 2 cm nach oral und aboral prinzipiell ausreichend. Der regionäre Lymphabfluß erstreckt sich aber über ein weit größeres Gebiet; aus diesem Grund muß die Resektion entlang des Kolonschlauches entsprechend großzügiger vorgenommen werden, damit der Tumor zusammen mit den epikolischen, parakolischen aber auch intermediären und zentralen Lymphknoten en bloc entfernt werden kann. Da sich - wie zu Beginn bereits erwähnt - der lymphatische Abfluß nach dem Verlauf der arteriellen Gefäße richtet, sollte die Durchtrennung der arteriellen Gefäße möglichst zentral erfolgen. Auf diese Art und Weise können mehr tumorferne Lymphknoten entfernt werden. Dennoch konnte aber bislang nicht bewiesen werden, dass mit dieser erweiterten Lymphadenektomie die Prognose besser sei (37, 38). Um das Ausmaß des Lymphknotenbefalls (N-Status) adäquat beurteilen zu können, müssen mindestens 12 Lymphknoten histologisch untersucht werden. Werden 14 Lymphknoten analysiert, steigt die diagnostische Sicherheit bezüglich des N-Status (39). Um das intraoperative Metastasierungsrisiko möglichst gering zu halten wurde 1967 von Turnbull die „no-touch“-Technik entwickelt: hierbei sollen bereits vor der Tumormobilisation die ab- und zuführenden Gefäße ligiert werden (40).

1.4.2. Rektumkarzinome

Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms erfolgt in der Regel durch Resektion des Tumors im Gesunden und durch eine partielle oder totale En-bloc-Entfernung des Mesorektums und des regionären Lymphabflussgebietes (5). Rektumkarzinome breiten sich sowohl intramural (Submukosa, Muscularis propria) also auch extramural (Mesorektum) aus. Die intramurale Ausbreitung erfolgt oft nur wenige Millimeter jenseits des makroskopisch erkennbaren Tumorrandes, wohingegen viel häufiger eine

extramurale Ausbreitung in das Mesorektum stattfindet, besonders bei T3- und T4-Tumoren. Bei Karzinomen des oberen Drittels sollte ein Sicherheitsabstand von 5 cm in der Rektumwand nach aboral eingehalten werden und eine ebenso weit nach aboral reichende Entfernung des Mesorektums. Bei Karzinomen der unteren zwei Drittel muß das Mesorektum komplett bis zur Puborektalschlinge entfernt werden (totale mesorektale Exzision = TME) (41, 42). Eine TME senkt die Lokalrezidivrate ganz entscheidend, in Deutschland von 39% auf 10% (43). Ein intramuraler Sicherheitsabstand nach aboral von 2 cm ist hier ausreichend. Bei „High-grade-Karzinomen“ empfiehlt sich allerdings ein dementsprechend größerer Abstand (42). Zur Einhaltung dieser Kriterien stehen folgende Verfahren zur Verfügung, wobei die Indikationsstellung unter anderem von der Tumorlokalisation, aber auch von der Tumorgröße und anderen Faktoren abhängig ist. Befindet sich der Tumor im oberen Drittel wird eine anteriore Rektumresektion durchgeführt, ist er im mittleren Drittel wird hingegen die tiefe anteriore Rektumresektion bevorzugt. Nur bei Low-grade-T1-Karzinomen ohne Lymphgefäßinvasion im distalen Drittel kann auch eine transanale Lokalexzision durchgeführt werden (44). Bei dieser Methode können die Risiken einer radikalen Chirurgie umgangen werden. Diese oben genannten kontinenzhaltenden Verfahren sind generell anzustreben. Bei einer Tumordinfiltration des Sphinkters und einem intramuralen Sicherheitsabstand kleiner 2 cm zwischen Tumorrund und Linea dentata kann die Abdominoperineale Rektumextirpation (APR) mit Anlage eines endständigen Anus praeter (Kolostoma) nicht umgangen werden. Dies ist die radikalste Form der Rektumresektion mit TME inklusive der Resektion des Sphinkterapparates und des Beckenbodens. Allen Verfahren gemeinsam ist die Ligatur der Arteria mesenterica inferior, zumindest unmittelbar distal des Abgangs der Arteria colica sinistra, um die Resektion des gesamten lymphovaskulären Stiels zu erleichtern und die Rezidivrate und das Staging zu verbessern.

1.5. Postoperativer Verlauf

Sowohl auskultierbare Darmgeräusche ab dem 2. postoperativen Tag sowie Wind- und Stuhlabgang ab dem 4. Tag nach der Operation sprechen für einen unkomplizierten Verlauf. Es wird auf eine frühe perorale Ernährung beginnend mit Tee, Zwieback und Suppe geachtet, die später auf leicht verdauliche Kost umgestellt wird.

Weniger erwünschenswert ist der komplizierte Verlauf, wobei hier chirurgische (Nachblutung, Bauchwanddehiszenz, Anastomoseninsuffizienz, Fistelbildung, intraabdominelle Abszesse) und nichtchirurgische Komplikationen (kardiopulmonales System) unterschieden werden. Letztere kommen besonders häufig bei Notfalleingriffen vor. Wundinfekte sind heute aufgrund der modernen Operationstechnik und der prophylaktischen Antibiotikagabe ein seltenes Ereignis (45). Die Anastomoseninsuffizienz kommt häufiger vor und führt zu Fisteln und Abszessen, was letztendlich bei einer schweren Peritonitis auch tödlich enden kann. Deshalb muß hier so rasch als möglich durch eine Reoperation und antibiotische Therapie eingegriffen werden. Aus bisherigen Erfahrungen kann der Rückschluss gezogen werden, dass je näher die Anastomose beim Anus zu liegen kommt, das Risiko einer Insuffizienz auch steigt.

1.6. Neoadjuvante Therapie

Bei T4-Tumoren des Rektums wird eine präoperative Radio- bzw. Radiochemotherapie dann empfohlen, wenn aufgrund des präoperativen Stagings eine R0-Resektion nicht erreichbar erscheint; die Intention ist dabei eine Reduktion der Tumorgröße („downstaging“). Ebenso ist die präoperative Therapie bei Patienten mit R0-resektablem Rektumkarzinom zur Senkung der Rezidivrate erwiesen. Ein Einfluss auf die Langzeitprognose konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (46).

Von Vorteil bei der präoperativen Radiotherapie sind die geringeren toxischen Nebenwirkungen, da sich präoperativ weniger Darmschlingen im kleinen Becken befinden als postoperativ. Der einzige Nachteil ist eine mögliche „Übertherapie“ eines frühen Stadiums, falls es präoperativ falsch eingestuft wurde.

1.7. Adjuvante Therapie

Adjuvante Therapien beabsichtigen, lokale Rezidive und Fernmetastasen zu senken und so die Heilungschancen weiter zu verbessern. Voraussetzung dafür ist allerdings - sowohl für das Kolon- als auch das Rektumkarzinom - eine R0-Resektion (kein Residualtumor) des Primärtumors.

Für Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium I oder II oder nach R0-Resektion von Fernmetastasen ist eine adjuvante Therapie außerhalb von Studien nicht induziert. Erst bei nodal positiven Kolonkarzinomen im *UICC Stadium III* ist eine adjuvante *Chemotherapie* induziert. Hierbei hat sich die 6-monatige Behandlung mit 5-Fluoruracil (5-Fu) und Folinsäure (Leucovorin) nach dem Mayo-Schema sehr bewährt (46, 47).

Patienten mit einem Rektumkarzinom im Stadium I oder nach R0-Resektion von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen sollten außerhalb von Studien ebenfalls keiner adjuvanten Therapie unterzogen werden. Für Tumoren im mittleren und unteren Drittel im *UICC Stadium II und III* wird jedoch die postoperative *Radiochemotherapie* empfohlen. Tumoren des oberen Rektumdrittels werden dagegen wie Kolonkarzinome behandelt (48). Bereits mehrere Studien konnten die Vorzüge einer postoperativen Radiochemotherapie im UICC Stadium II und III als Behandlungsstandart im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollgruppe bestätigen. Die Ergebnisse sind ein signifikant verlängertes 5-Jahres-Überleben, einen Trend zu einer geringeren Fernmetastasierung und nicht zuletzt eine signifikant verringerte Rate an Lokalrezidiven (49). Ebenso zeigt die postoperative Radiochemotherapie im Vergleich zu einer alleinigen postoperativen Bestrahlung eine Verbesserung des Überlebens und eine Senkung der Lokalrezidivrate auf (50). Dennoch ist der Stellenwert einer alleinigen postoperativen Bestrahlung innerhalb der adjuvanten Therapie noch in Diskussion.

Nach neuesten Erkenntnissen kann nun die bisher mit einer 5-FU-Bolusgabe durchgeführte Radiochemotherapie durch eine 5-FU-Dauerinfusion optimiert werden. Durch eine Dauerinfusion während der gesamten Bestrahlung kann das Langzeitüberleben erhöht werden (51).

1.8. Palliative Therapie und Residualtumorklassifikation

Indikation für eine palliative Therapie ist die R1- bzw. R2-Resektion des Primärtumors. Eine R1-Resektion bedeutet, dass der Primärtumor bzw. die Fernmetastasen zwar makroskopisch komplett entfernt wurden, histologisch jedoch an den Resektionsrändern noch Tumor nachgewiesen werden kann. Eine R2-Resektion liegt vor, sobald der Primärtumor bzw. die Fernmetastasen operativ nicht entfernt werden konnten oder nach Meinung des Operateurs makroskopisch nicht komplett im Gesunden entfernt wurden.

Residualtumorklassifikation:

R0 = kein Residualtumor

R1 = mikroskopischer Residualtumor

R2 = makroskopischer Residualtumor

Bei diffusen, nicht resektablen Metastasen sollte eine Chemotherapie mit 5-FU und Folinsäure nach dem Mayo-Schema durchgeführt werden. Bei inoperablem Kolon- bzw. Rektumkarzinom besteht die Möglichkeit, einen Anus praeter naturalis anzulegen.

1.9. Prognose

Das KRK ist von vielen prognoserelevanten Faktoren abhängig. Deshalb ist es von besonderem Interesse deren Bedeutung abzuwägen, um ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen zu ermöglichen. Die derzeitige 5-Jahresüberlebensrate für das Kolonkarzinom beträgt im UICC Stadium I ca. 95%, im Stadium II 90%, im Stadium III 65% und im Stadium IV 5%. Für das Rektumkarzinom verhält es sich ganz ähnlich (UICC-Stadium I-IV): 95%, 85%, 55% und 5% (52).

1.10. Nachsorge

Die regelmäßige Nachsorgeuntersuchung dient der frühzeitigen Tumorrezidiverkennung, erfasst aber auch Operationsfolgen und ermöglicht die Beurteilung der Therapieergebnisse im Sinne einer Qualitätskontrolle.

Bei Kolonkarzinompatienten mit geringem Risiko im Stadium I kann durch regelmäßige Nachsorge kaum ein prognostischer Gewinn erwartet werden. Erst bei Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko im Stadium II und III scheint das Nachsorgeschema sinnvoll zu sein. Hierbei werden Anamnese, körperliche Untersuchung, CEA, radiologische Bildgebung (Abdomensonographie, Röntgenthorax) als auch die Endoskopie in regelmäßigen Abständen eingesetzt (53). Bei Risikopatienten mit HNPCC und FAP sollte vom Standardschema abgewichen werden und eine engmaschige Nachsorge durchgeführt werden, insbesondere mit der Intention extrakolonische Zweittumoren zu erkennen.

Für Rektumkarzinompatienten ist das Nachsorgeschema ebenso erst ab den Stadien II und III, die mit erhöhtem Risiko behaftet sind, zu empfehlen. Beim Rektumkarzinom kommen lokoregionäre Rezidive häufiger vor als beim Kolonkarzinom. Werden die Lokalrezidive erst beim Auftreten von Symptomen entdeckt, ist es für eine kurative Therapie oftmals zu spät. Aus diesem Grund wird eine engmaschige digitale Rektumuntersuchung kombiniert mit einer Proktosigmoidoskopie und Endosonographie während der ersten 2-3 postoperativen Jahre empfohlen. 85% der Rezidive treten nämlich innerhalb der ersten 30 postoperativen Monate auf (54). Außerdem hat sich der Einsatz der CEA-Bestimmung für die Therapieüberwachung und die Nachsorge des KRK besonders bewährt (55). Voraussetzung dafür ist allerdings eine stabile individuelle CEA-Baseline, denn nur dann können auch minimale Abweichungen Hinweise für ein Tumorrezidiv liefern. Bezüglich der Fernmetastasen hat die CEA-Bestimmung sogar eine höhere Sensitivität als die Computertomographie (CT) (56). Desweiteren werden natürlich ebenso radiologische Verfahren (Abdomensonographie, Röntgenthorax, Computertomographie) insbesondere zum Ausschluß von Fernmetastasen angewandt. Intensive Follow-Up-Untersuchungen haben sich also beim Rektumkarzinom bestätigt (57). Durch eine rechtzeitige Früherkennung können dementsprechend öfters kurative Resektionen durchgeführt werden.

1.11. Rezidiv

Unter einem Rezidiv versteht man definitionsgemäß eine erneute Tumormanifestation nach einer R0-Resektion. Dieses manifestiert sich entweder lokoregionär im Operationsbereich oder im Anastomosenbereich oder tritt als Fernmetastase auf, wobei Leber und Lunge hier die häufigsten Organe sind. Eine kurative Resektion des Rezidivs ist nur in 40-60% der Fälle möglich, ca. 20-30% der Patienten sterben daran (58). Wie oben bereits erwähnt, fallen die Rezidiverkrankungen meist durch einen Anstieg des CEA Wertes auf, bevor diese überhaupt klinische Beschwerden machen oder in der Bildgebung feststellbar sind.

Sobald der Verdacht auf ein Rezidiv besteht, sind bei einem lokoregionären Rezidiv die CT oder Magnetresonanztomographie (MRT) das Mittel der Wahl zur Diagnostik. Falls ein mögliches Rezidiv mittels dieser Bildgebung nicht von Narbengewebe unterschieden werden kann, steht auch die Positronenemissionstomographie (PET) zur

Verfügung. Den letztendlichen Beweis erbringt eine Biopsie entweder endoskopisch gesteuert oder durch endoluminale Sonographie. Bei Verdacht auf Lebermetastasen wird in der Regel das kontrastverstärkte CT zur Diagnostik herangezogen, alternativ steht auch hier das MRT zur Verfügung. Die optimalste Diagnostik kann durch den intraoperativen Ultraschall in Kombination mit der sonographisch gesteuerten Biopsie erzielt werden. Bei Lungenmetastasen ist ebenfalls das CT heranzuziehen.

Was die Therapie angeht, sollten Patienten mit einem Lokalrezidiv entweder palliativ oder durch eine erneute Resektion in kurativer Absicht behandelt werden. Dies gilt auch für asymptomatische Patienten (58). Von den 50-70% der von Lebermetastasen betroffenen Patienten eignen sich lediglich 5-10% für eine Metastasenresektion. Dennoch konnte bei diesen eine 5-Jahresüberlebensrate zwischen 30 und 40% erreicht werden (59). Falls nach der Lebermetastasenresektion wiederum ein erneutes Rezidiv auftreten sollte, ist auch dieses in bis zu 20% durch eine Reresektion behandelbar (60). Die Mehrzahl allerdings sind aufgrund der Anzahl der Herde und deren diffusen Lokalisation keine Kandidaten für eine Resektion. Deshalb verbleiben hier nur palliative Verfahren wie Chemoembolisation, Kryo-, Laser- oder Radiofrequenztherapie (61). Ca. 15% der Patienten sind nach Resektion des Primärtumors von Lungenmetastasen betroffen. Auch die Lungenmetastasenresektion zeigt eine erstaunlich niedrige operative Mortalität und eine 5-Jahresüberlebensrate bis zu 44%, was diesen Eingriff rechtfertigt (58). Selbst bei Patienten, die sowohl eine Leber- als auch eine Lungenmetastasenresektion erhielten, konnte eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 31% nach 5 Jahren erreicht werden und noch 23% nach 8 Jahren (62).

Wie zu Beginn bereits beschrieben ist das kolorektale Karzinom eine der Hauptursachen für die Tumor assoziierte Mortalität weltweit; trotz großer Fortschritte sowohl in der Diagnose als auch in der Therapie des KRK blieb die Mortalität innerhalb der letzten 20 Jahren beinahe unverändert (63, 64). Derzeit ist das KRK-Stadium eines der meist genutzten prognoserelevanten Faktoren für Patienten mit KRK; in der Tat entwickeln ca. 30-40% der Patienten in UICC II oder III ein Rezidiv oder versterben sogar (63, 64). Zusätzliche prognoserelevante Faktoren würden es ermöglichen, innerhalb der Patienten

mit UICC II und III, sowohl Patienten mit hohem/niedrigem Risiko für ein Rezidiv zu identifizieren als auch eine entsprechende zusätzliche Therapie nach erfolgter Operation einzuleiten.

Einige Investigatoren haben die mögliche prognoserelevante Aussagekraft des Tumorsuppressorgens p53 und seinen Mutationen bei Patienten mit KRK untersucht. Diese konnten beweisen, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumor eine p53 Mutation bzw. eine verstärkte p53 Expression im Tumor mit einer schlechteren Prognose korrelierte (65-73). Andere wiederum haben entweder die umgekehrte Korrelation festgestellt oder konnten gar keine Assoziation zwischen p53 und der Prognose feststellen (74-76). In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass das APC-Gen im Serum mit den Lymphknotenmetastasen und dem Stadium korrelierte; für die APC-Genmutation konnte jedoch keine Korrelation mit den demographischen Daten bewiesen werden (70). Auch die präoperativ gemessenen erhöhten Serumwerte des CEA haben prognostischen Aussagewert wie es bereits durch einige Studien demonstriert wurde (Tab. 19). Allerdings ist der CEA Wert zu einem frühen Zeitpunkt der Krankheit noch nicht aussagekräftig genug, und kann deshalb nicht für das Screening verwendet werden. Während erhöhte präoperative CEA Serumwerte mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, ermöglicht die postoperative CEA Messung die Identifikation von Patienten mit Metastasen, die dann von einer lokalen Resektion der Metastasen oder einer anderen Therapie profitieren. Allerdings konnte noch kein eindeutiger Unterschied bezüglich der Prognose festgestellt werden, ob die Metastasenresektion auf der Grundlage erhöhter CEA Werte oder anderer Auffälligkeiten im Labor bzw. in der Bilddarstellung durchgeführt wurde (77). Ebenso gibt es keinen eindeutigen Konsensus bezüglich der Häufigkeit oder der Dauer der Messung von CEA Werten, obwohl die American Society of Clinical Oncology (ASCO) derzeit alle 2-3 Monate eine Kontrolle für mindestens 2 Jahre nach erfolgter Primäroperation empfiehlt. Im Laufe der Therapie ist in der Regel ein Rückgang der CEA Werte zu verzeichnen. Darüber hinaus ist CEA nicht nur ein Indikator für das Ansprechen der Therapie sondern auch für den stabilen Krankheitszustand eines Patienten (77). Das Carbohydratantigen 19-9 (CA 19-9) wird oft in Kombination mit CEA bei Patienten mit KRK verwendet; der alleinige Nutzen dieses Markers ist allerdings nicht ausreichend bewiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Kombination gegebener Biomarker zu definieren, auf deren Grundlage therapeutische Entscheidungen mit größerer Präzision für die einzelnen Individuen mit KRK getroffen werden können. Wir untersuchten das Tumorsuppressorgen p53 im Vergleich mit APC, CEA und CA 19-9 als Biomarker, die potentielle Aussagekraft besitzen, die Prognose der Patienten der UICC Stadien II und III besser zu definieren; diese wiederum können dann von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren.

2. FRAGESTELLUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, allgemeine prognoserelevante Faktoren des kolorektalen Karzinoms anhand des eigenen Patientengutes zu untersuchen. Insbesondere sollte die prognostische Relevanz der Tumormarker CEA, CA 19-9 und p53 im Serum sowie im Tumor auf Protein- und Genebene in Bezug auf das tumorbedingte Überleben und die rezidivfreie Zeit analysiert werden, um zusätzliche therapierelevante Informationen für den Patienten zu gewinnen.

1. Welche der untersuchten Parameter haben einen signifikanten Einfluss auf das tumorbedingte Überleben?
2. Welchen Einfluss hat das UICC Stadium in Abhängigkeit des Serum CEA auf das tumorbedingte Überleben?
3. Welche der untersuchten Parameter haben signifikanten Einfluss auf die rezidivfreie Zeit?
4. Besteht eine Korrelation zwischen der Expression der Biomarker (CEA, CA-19-9 und p53) im Tumor (Protein- und Genexpression) und dem UICC Stadium?
5. Besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten p53 spezifischer IgG Antikörper im Serum und dem immunhistologischen Nachweis des Proteins im Tumor?
6. Welcher Zusammenhang besteht zwischen den Biomarkern (CEA, CA 19-9 und p53) im Serum und im Tumor (Protein- und Genexpression) und der Prognose?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientengut

In der vorliegenden Arbeit wurden von 783 Patienten (452 männliche und 331 weibliche) mit histologisch gesichertem KRK die Daten retrospektiv erhoben. Dazu wurden die zu untersuchenden Parameter unter Datenausnutzung aus Akten, die per ICD-Schlüssel erfasst wurden, ausgewertet. Hierbei wurden die benötigten Daten anhand eines definierten tabellarischen Fragebogens gesammelt. Das Datenkollektiv beinhaltete unter anderem folgende wichtigsten Parameter: Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, UICC-Stadium, Infiltration der Darmwand, Lymphknotenbefall, Differenzierungsgrad und Tumormarker (CEA, CA-19-9, p53). Die International Union Against Cancer (UICC) Klassifikation wurde für die Festlegung der KRK Tumorstadien herangezogen. Das Kollektiv umfasste nur R0-resezierte Patienten der Stadien I-III nach UICC; Patienten mit Metastasen oder einem Zweitkarzinom wurden von der Studie ausgeschlossen. Das Blut für die Bestimmung der Tumormarker wurde den Patienten unmittelbar vor der Operation entnommen. Die Primärtumorthherapie dieser Patienten erfolgte ausschließlich in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg. Nach Entlassung aus der Klinik wurde ein Großteil der Patienten regelmäßig im Rahmen der Tumornachsorge (im Abstand von 3-6 Monaten) in der Chirurgischen Poliklinik gesehen, weitere Daten stammen von betreuenden Hausärzten. Zu dem Follow Up gehörten eine körperliche Untersuchung, Blutentnahme, Röntgen Thorax, Ultraschall des Abdomens sowie eine Computertomographie bzw. eine Magnetresonanztomographie je nach den Richtlinien der deutschen Tumorzentren. Zusätzlich wurden aus dem Gesamtkollektiv von 783 Patienten bei einer Subgruppe von 116 Patienten, die zwischen Oktober 2001 und Dezember 2003 operiert wurden, Tumorgewebeproben bei der Primärtumoroperation entnommen und anschließend mittels Immunhistologie und Genanalyse untersucht. Der mittlere Beobachtungszeitraum für CEA Serumwerte lag bei 6,5±4 Jahren, während dieser für CEA (Immunhistologie und Genanalyse), CA 19-9 und p53 (Serumwerte, Immunhistologie und Genanalyse) bei 32±6,2 Monaten lag.

3.2. Statistische Methoden

Zur Prüfung der Daten hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede kamen in der vorliegenden Arbeit folgende Tests zur Anwendung:

Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test ist ein Anpassungstest, mit dessen Hilfe auf die zugrunde liegende Verteilung des Datenmaterials einer Stichprobe geschlossen werden kann. Es wird geprüft, ob eine beobachtete Zufallsgröße X einem vorgegebenen Verteilungsgesetz $F_0(X)$ genügt. Anhand dieser univariaten Analyse wurde der Zusammenhang zwischen CEA und den anderen prognoserelevanten Parametern analysiert.

Kaplan-Meier-Schätzung

Diese Methode dient der Schätzung der Überlebensfunktion, wenn in einem Beobachtungszeitraum alle Patienten entweder nicht zum gleichen Zeitpunkt in die Beobachtung aufgenommen werden und/oder aus verschiedenen Gründen nicht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachverfolgt werden können. Mit Hilfe des log rank Testes konnte die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Kurven berechnet werden.

Tumorbedingtes Überleben beschreibt den Zeitraum zwischen Diagnose und Tod/letztem Kontakt mit dem Patienten. Rezidivfreie Zeit beschreibt den Zeitraum zwischen Diagnose und erstem Rezidiv. Von zensierten Daten spricht man, wenn bis zu einer bestimmten Zeit (last seen) das Ereignis (tumorbedingter Tod/Rezidiv) noch nicht eingetreten ist.

Cox-Regression

Multivariate Analyse zur Bestimmung der aussagekräftigsten Parameter unter allen möglichen Variablen bei gleichzeitiger Betrachtung.

Mann-Whitney-U-Test

Die Testgröße U zählt die Paare einer Beobachtung der ersten Stichprobe und einer Beobachtung der zweiten Stichprobe, bei denen der Wert der Beobachtung der ersten

Stichprobe kleiner ist als derjenige der zweiten Stichprobe. Diese Methode diente dem Vergleich zwischen CEA, CA 19-9 und p53 (Serumwerte, Immunhistologie und Genexpression) und dem jeweiligen Auftreten eines postoperativen Rezidives innerhalb der Subgruppe von 116 Patienten.

Signifikanz

Werte für $p \leq 0,05$ gelten als signifikant (*)

Werte für $p \leq 0,01$ gelten als hochsignifikant (**)

Zur Durchführung der Testverfahren wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 des Rechenzentrums der Universität Würzburg verwendet.

3.3. Labormethoden

3.3.1. Serummessung von CEA, CA 19-9 und p53

Blutproben wurden jeweils vor der Operation entnommen und bezüglich des in den Proben enthaltenen CEA, CA 19-9 und p53 untersucht. Präoperative Serumwerte für CEA und CA 19-9 wurden mittels der 'solid-phase double-antibody sandwich immunoassy' Methode nach entsprechender Protokoll-Anleitung ermittelt (Roche Laboratories, Basel, Switzerland). Dabei wurde die obere Grenze für normale Werte für CEA bei < 5 ng/ml festgesetzt, für CA 19-9 bei < 37 U/ml. Das in den Proben enthaltene p53 wurde anhand des ELISA Verfahrens nach vorgegebenem Protokoll analysiert (Biosource International, California, USA). Hierbei lag der obere cut-off point für normale Werte bei 11,9 U/ml.

3.3.2. Messung von p53 Antikörper

Die p53 spezifischen IgG Antikörper (Ak) wurden mittels des p53 ELISA Kits nach Protokoll quantifiziert (Oncogene, Boston, MA, USA). Bei allen ELISA Experimenten wurden die Proben (n=116) in Duplikaten und insgesamt 3 Wiederholungen getestet. Das Serum von gesunden Probanden (n=35) wurde als Kontrolle verwendet.

3.3.3. Immunhistologie

Um die Zelloberflächenantigene CEA, CA 19-9, p53 und APC sichtbar zu machen wurde eine Einzelfärbemethode (single staining) durchgeführt. Dazu wurde eine repräsentative Biopsie einer Tumorprobe mit umgebender kolorektaler Mukosa verwendet. Das Prinzip bestand darin, dass ein spezifischer, aber unkonjugierter Primär-AK an das Gewebe bindet, welcher in einem nächsten Schritt mit einem HRP-konjugierten Sekundär-AK gebunden und sichtbar gemacht wird.

Im ersten Schritt wurden die Gefrierschnitte für 10 Minuten in Aceton (Deventer, Holland) fixiert und anschließend für weitere 10 Minuten luftgetrocknet. Nach Waschen des Gewebes in Tris-NaCl-Puffer (Merck, Darmstadt) wurde der unkonjugierte Primär-AK (Neo Makers, Fremont, CA) zugefügt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Waschung mit Tris-NaCl-Puffer und anschließend die Applikation des HRP-konjugierten Sekundär-AK (Dako, Glostrup, Dänemark), welcher für entweder 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 18 Minuten bei 37°C in einer Wärmekammer inkubiert wurde. Dieser Enzym-Substrat-Komplex wurde nun mit einem Chromogen, Liquid DAB Substrat Pack (Biogenex, San Ramon, CA), der sich auf dem Gewebe in einem 'bräunlichen' Farbton darstellt, sichtbar gemacht. Es folgte eine erneute Waschung mit Tris-NaCl-Puffer. Abschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun (Merck, Darmstadt) durchgeführt und der Gewebeschnitt mit Glycerol (Dako, Glostrup, Dänemark) fixiert.

Der Prozentsatz der Tumorzellfärbung für CEA, CA 19-9, p53 und APC wurde in 20 nebeneinanderliegenden Vergrößerungsfeldern (x40 Vergrößerung) beurteilt und semiquantitativ in niedrig (+), mittel (++) oder hoch (+++) eingeteilt. Zur Beurteilung der immunhistologischen Anfärbungen wurde ein 'Blind-Versuch' durchgeführt: die Präparate wurden durch mindestens 3 Personen, die unabhängig voneinander arbeiteten, beurteilt. Im Falle von Diskrepanzen wurde ein gemeinsamer Konsens gefunden.

3.3.4. RNA Extraktion

Die RNA wurde mit Hilfe des RNA Extraktions Kits (Qiagen, Hilden, Germany) aus homogenisiertem Tumorgewebe extrahiert, in DEPC-75%-iger Ethanollösung gewaschen und anschließend bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Menge der RNA wurde bestimmt, indem die Absorbierung bei 260nm gemessen wurde. Die Reinheit des Produktes wurde dadurch erreicht, dass die 260:280 Ratio innerhalb des 1,8-2,0 Bereiches festgelegt wurde.

3.3.5. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) für die Bestimmung von p53 Mutationen

cDNA wurde unter Anwendung von 2 µg RNA mit Hilfe des Promega AccessQuick™ RT-PCR Systems präpariert (Promega, WI, USA). Wiederum wurden für die Analyse die Anweisungen des Standardprotokolls befolgt unter der Verwendung von AMV-Reverse Transcriptase. Es wurden 2 Sets von Primern, die die p53 Region von Exon 4 bis 9 amplifizierten, verwendet. Die Primer Sequenzen waren wie folgt: für die Exone 4-6 (5'-TGT CCC CGG ACG ATA TTG AAC-3' und 5'-TTC CTT CCA CTC GGA TAA GAT GC-3', Amplikon-Größe 465 Basenpaare (bp)), und für die Exone 5-9 (5'-GCT CAG ATA GCG ATG GTC TGG C-3' und 5'-TCT CGG AAC ATC TCG AAG CG-3', Amplikon-Größe 484 bp). Der RT-PCR Thermalzyklus gestaltete sich aus 45 minütigem Erhitzen auf 48°C, 2 minütigem Erhitzen auf 95°C, gefolgt von 40 Zyklen für 30 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 60°C, und 20 Sekunden bei 68°C und zuletzt 5 Minuten bei 68°C. Vor der Sequenzierung wurden alle PCR Produkte nach dem QIAquick PCR Reinigungs Kit Protokoll gereinigt (Qiagen, Hilden, Germany). Anschließend wurden die PCR Produkte mit dem ABI Prism 373 fluorescent dye terminator blind sequenziert (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3.6. Real Time PCR

Anhand der PCR sollte die in den kolorektalen Proben exprimierte mRNA von p53, CEA und APC analysiert werden (n=46). Die RNA wurde wie oben beschrieben extrahiert. cDNA wurde unter Anwendung von 2 µg hitzedenaturierter RNA präpariert. Die folgenden Sequenzen wurden dann verwendet (Sigma Genosys, Woodlands, TX): für GAPDH (5'- ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG -3' und 5'- CGC CCC ACT

TGA TTT TGG-3'), für APC (5'-TAT GGA AGC CGG GAA GGA TC-3' und 5'-AGG ACT GCA CTC TCC AGA ACG-3'), für CEA (5'-GCC CGC ATA CAG TGG TCG-3' and 5'-ATC AGC AGG GAT GCA TTG G-3'), und für p53 (5'-CCA GAA AAC CTA CCA GGG CA-3' and 5'-GAA TGC AAG AAG CCC AGA CG-3'). Die Primer wurden unter Anwendung der Primer Express Software für Primerdesign gestaltet, um die kurzen Segmente der 50-150 Basenpaare der vorgegebenen cDNA zu erweitern. Eine optimale Primerkonzentration wurde durch die Durchführung der Primertitration erreicht.

Die quantitative Real Time PCR wurde in einer zwei-Schritte-RT-PCR unter Anwendung von SYBR Green PXR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) mit 100 ng cDNA und 300 nM Primern in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Der PCR-Thermalzyklus bestand aus zehnmütigem Erhitzen auf 95°, gefolgt von 40 fünfzehnsekündigen Erhitzungszyklen auf 95° und einer sechzigsekündigen Abkühlung auf 60°. Genspezifische Produkte wurden kontinuierlich mit Hilfe des ABI Prism 7700-Sequenzdetektors (Applied Biosystems, Foster City) gemessen und die relative Quantität wie vom Hersteller empfohlen kalkuliert. Alle Muster wurden in Duplikaten ausgeführt und während der Datenanalyse durch den Passive Reference-Farbstoff von SYBR Green PC Master Mix normalisiert, um well-to-well Fluoreszenzvariationen zu korrigieren. Der durchschnittliche *threshold cycle* (Ct) Wert wurde als Zyklusnummer berechnet, an dem die Fluoreszenz des *Reporters* einen fixierten Schwellenwert erreichte. Die Differenz (ΔCt) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Proben in den *target wells* und denen des *housekeeping genes* GAPDH wurde bestimmt. Darauf folgte die Berechnung der Differenz zwischen der durchschnittlichen Ct-Werten für jedes Target und dem ΔCt -Wert der Kontrollprobe für dieses Target ($\Delta\Delta Ct$). Der relative Quantifizierungswert *fold change* wurde ausgedrückt als $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4. ERGEBNISSE

4.1. Geschlecht und Alter

4.1.1. Geschlechtsverteilung

Von den 783 untersuchten Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK) zeigte sich eine deutliche Differenz in der Geschlechtsverteilung. Es waren mit 58% mehr Männer als Frauen (42%) betroffen wie auch untenstehende Tabelle und Abbildung veranschaulichen. (Tab. 1, Abb. 4)

Tab. 1: Verteilung des Geschlechts bei kolorektalem Karzinom

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Männer	452	57,7	57,7	57,7
	Frauen	331	42,3	42,3	100,0
	Gesamt	783	100,0	100,0	

von den insgesamt 783 Patienten waren 452 Männer und 331 Frauen

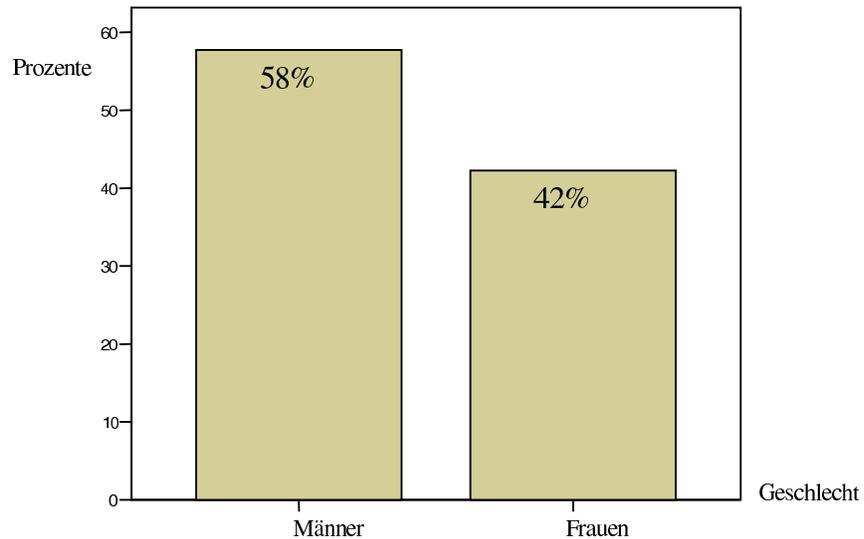


Abb. 3: Verteilung des Geschlechts bei kolorektalem Karzinom: mit 58% waren mehr Männer als Frauen (42%) betroffen

4.1.2. Altersverteilung

Die Altersspanne der 783 erfassten Patienten erstreckte sich vom 22. bis zum 92. Lebensjahr, wobei die Häufigkeit des kolorektalen Karzinoms (KRK) in der Altersgruppe von 60-80 Jahren deutlich zunahm (Abb. 4). Im höheren Alter (>80 Jahre) dagegen war wiederum ein Rückgang zu verzeichnen. Wie in Tab. 2 zu sehen ist, lag der durchschnittliche Mittelwert bei 66 Jahren und der Median bei 67 Jahren.

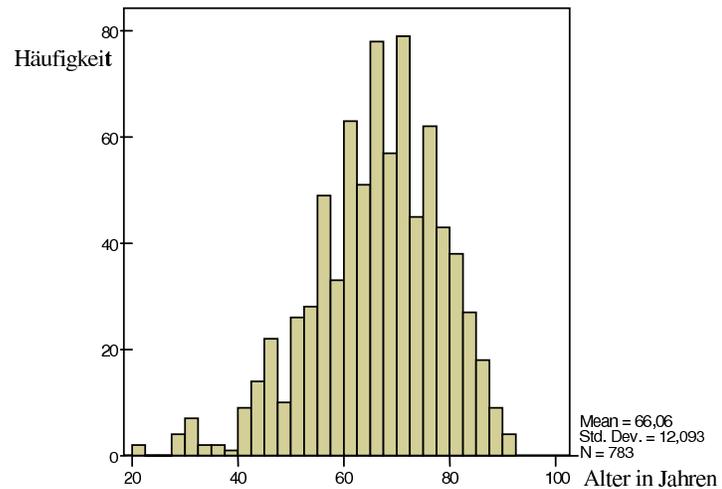


Abb. 4: Altersverteilung der Patienten bei Primärdiagnose des KRK: deutliche Zunahme des KRK in der Altersgruppe von 60-80 Jahren

Tab. 2: Mittelwert und Median des Patientenalters in Jahren bei Primärdiagnose des KRK

n	Gültig	783
	Fehlend	0
Mittelwert		66,06
Median		67,00

4.2. Tumorlokalisation / UICC-Stadium / Grading

4.2.1. Tumorlokalisation

Innerhalb dieses Patientengutes dominierte das Kolonkarzinom (51%) über dem Rektumkarzinom (43%) und weitere 6% konnten laut der vorhandenen Datenbank keiner Lokalisation eindeutig zugeordnet werden. (Tab. 3, Abb. 5)

Tab. 3: Tumorlokalisation des KKK

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Kolon	396	50,6	50,6	50,6
	Rektum	340	43,4	43,4	94,0
	Sonst.	47	6,0	6,0	100,0
	Gesamt	783	100,0	100,0	

von 783 Patienten waren 396 mit Kolonkarzinom diagnostiziert, 340 mit Rektumkarzinom, 47 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden

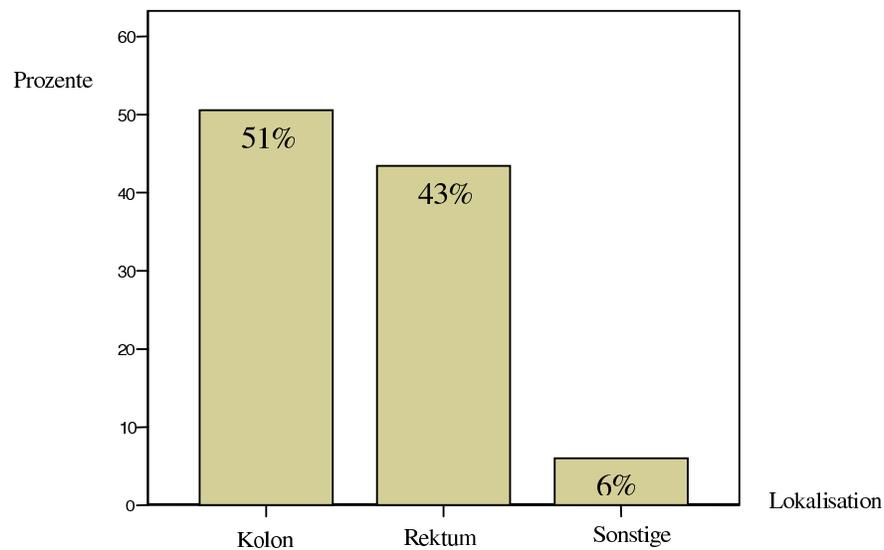


Abb. 5: Tumorlokalisation des KKK: mit 51% dominierte das Kolonkarzinom über dem Rektumkarzinom (43%), für 6% keine eindeutige Zuordnung

4.2.2. UICC-Stadium

In dieser Studie befanden sich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose 38% der Patienten in UICC I, 33% in UICC II und bei 29% der Untersuchten waren bereits die Lymphknoten befallen (UICC III). (Tab. 4, Abb. 6)

Tab. 4: UICC-Stadien bei Primärdiagnose des KRK

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	UICC I	298	38,1	38,1
	UICC II	256	32,7	70,8
	UICCIII	229	29,2	100,0
	Gesamt	783	100,0	

UICC I: 298 Patienten; UICC II: 256 Patienten; UICC III: 229 Patienten

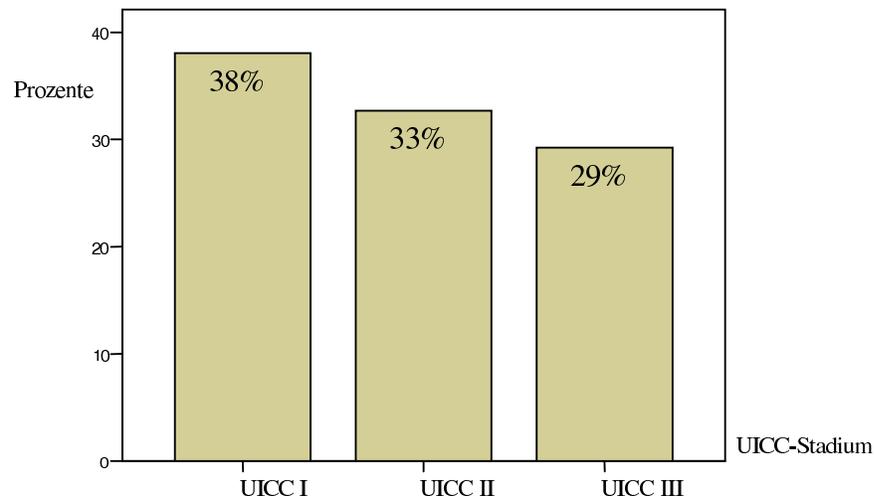


Abb. 6: UICC-Stadien bei Primärdiagnose des KRK:
UICC I: 38%; UICC II: 33%; UICC III: 29%

4.2.3. Grading

Der überwiegende Anteil der Tumoren (82%) wurde bei Primärdiagnose als mäßig differenziert (G2) eingestuft, gefolgt von schlecht differenzierten (G3) mit 13%, während die übrigen Differenzierungsgrade nur schwach vertreten waren (G1:4%, G4:1%). (Tab. 5, Abb. 7)

Tab. 5: Grading bei Primärdiagnose des KRK

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	G1	28	3,6	3,7	3,7
	G2	619	79,1	82,6	86,4
	G3	97	12,4	13,0	99,3
	G4	5	,6	,7	100,0
	Gesamt	749	95,7	100,0	
Fehlend	System	34	4,3		
Gesamt		783	100,0		

von 749 Patienten wurden 619 Patienten mit einem G2-Tumor eingestuft, gefolgt von 97 (G3), 28 (G1) und 5 (G4)

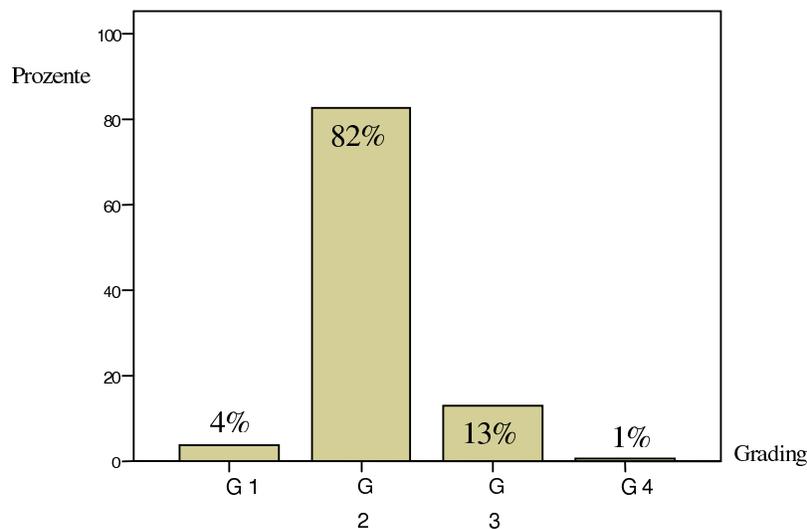


Abb. 7: Grading bei Primärdiagnose des KRK: häufigstes Vorkommen der G2 differenzierten Tumoren mit 82%, gefolgt von G3 (13%), G1 (4%), G4 (1%)

4.3. Korrelation von CEA und prognoserelevanten Faktoren

Im Folgenden sollte festgestellt werden, inwiefern der Tumormarker CEA in einem Patientengut von 492 Untersuchten mit den restlichen prognoserelevanten Faktoren korreliert. Anhand des Chi-Quadrat Testes konnte bestätigt werden, dass CEA (n=492) sowohl mit dem UICC-Stadium (p=0,002) als auch der Darmwandinfiltration (p<0,001) und dem Lymphknotenbefall (p=0,030) signifikant korreliert ist, während für die übrigen Parameter (Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Grading, CA-19-9 und p53) keine signifikante Assoziation festgestellt werden konnte. Für CEA wurde ein cut-off point bei 5 ng/ml festgelegt, d.h. Werte <5 ng/ml wurden als normal betrachtet und Werte darüber pathologisch. (Tab. 6)

Tab. 6: Korrelation von CEA und prognoserelevanten Faktoren bei KRK:

Parameter		CEA<5 ng/ml	CEA≥5 ng/ml	Signifikanz p
Geschlecht	Männlich	192	93	0,455
	Weiblich	146	61	
Alter	<66 Jahre	161	67	0,395
	>66 Jahre	177	87	
Lokalisation	Kolon	150	77	0,364
	Rektum	168	66	
Stadium	I	151	43	0,002**
	II	97	54	
	III	90	57	
T-Status	1	54	10	0,000**
	2	125	41	
	3	145	87	
	4	14	16	
N-Status	0	248	97	0,030*
	1	63	33	
	2	17	18	
	3	10	6	
Grading	1	16	4	0,654
	2	262	124	
	3	43	17	
	4	3	1	

signifikante Korrelation von CEA mit UICC-Stadium (p=0,002**), T-Status (p<0,001**) und N-Status (p=0,030*)

Schlussfolgerung:

Aufgrund der signifikanten Assoziation kann CEA gekoppelt mit dem UICC-Stadium, der Darmwandinfiltration und dem Lymphknotenbefall zur Prognosebeurteilung herangezogen werden.

4.4. Einfluss prognoserelevanter Faktoren auf das tumorbedingte Überleben

Mit Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens sollte nun der Einfluss einzelner prognoserelevanter Faktoren bei kolorektalem Karzinom untersucht werden. Dabei konnte in eigenem Patientengut festgestellt werden, dass Stadium ($p < 0,0001$), T-Status ($p < 0,0001$), N-Status ($p < 0,0001$) und CEA ($p = 0,0003$) einen hochsignifikanten Einfluss auf das tumorbedingte Überleben haben (Tab.7-10, Abb. 8-11). Dahingegen konnte diese signifikante Einflussnahme von Geschlecht, Alter, Tumorlokalisierung, Grading, CA 19-9 Serumwerten ($p = 0,2180$) und p53 Serumwerten ($p = 0,8655$) auf das Überleben nicht festgestellt werden.

Anhand der Cox-Regression sollte der Einfluss der aussagekräftigsten Parameter bei gleichzeitiger Betrachtung mehrerer Variablen auf das tumorbedingte Überleben bestimmt werden. Dabei konnten das UICC Stadium ($p < 0,001$) und der CEA Serumwert ($p = 0,002$) als signifikante Parameter identifiziert werden.

4.4.1. UICC-Stadium

Tab. 7: Überlebensanalyse für das UICC-Stadium bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
Stadium I	298	25	273	91,61
Stadium II	256	37	219	85,55
Stadium III	229	54	175	76,42
Gesamt	783	116	667	85,19

Anzahl events = Zahl der bereits tumorbedingt Verstorbenen; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

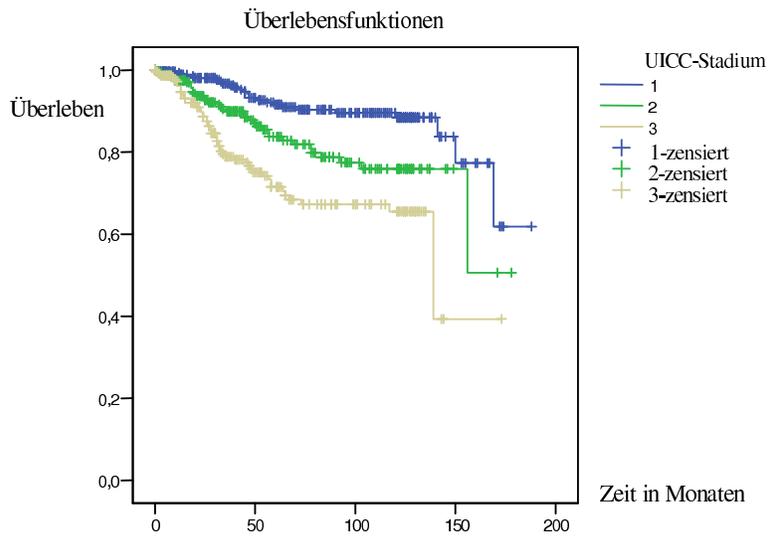


Abb. 8: hochsignifikanter Einfluss des UICC-Stadiums auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten in UICC I bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als Patienten in UICC III

4.4.2. Infiltration der Darmwand (T-Status)

Tab. 8: Überlebensanalyse für T-Status bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
T1	119	6	113	94,96
T2	236	27	209	88,56
T3	375	66	309	8,40
T4	53	17	36	67,92
Gesamt	783	116	667	85,19

Anzahl events = Anzahl der tumorbedingt Verstorbenen; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

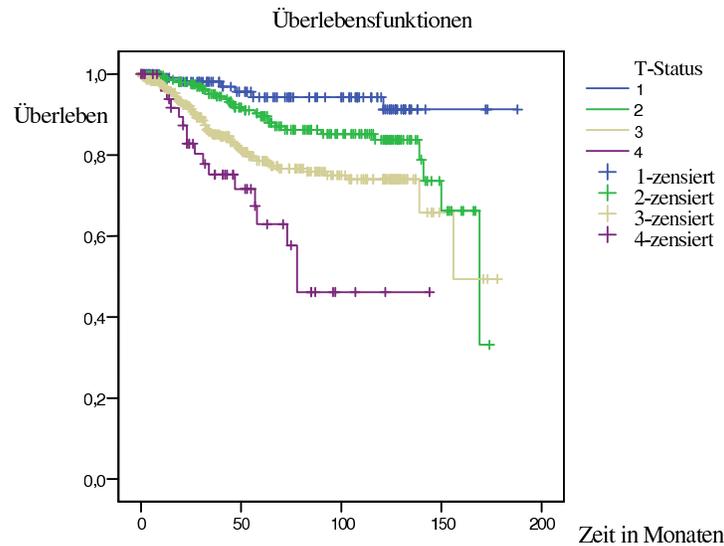


Abb. 9: hochsignifikanter Einfluss des T-Status auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten mit T1 bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als Patienten mit T4

4.4.3. Befall der Lymphknoten (N-Status)

Tab. 9: Überlebensanalyse für N-Status bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
N0	554	62	492	88,81
N1	152	24	128	84,21
N2	53	17	36	67,92
N3	24	13	11	45,83
Gesamt	783	116	667	85,19

Anzahl events = Anzahl der tumorbedingt Verstorbenen; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

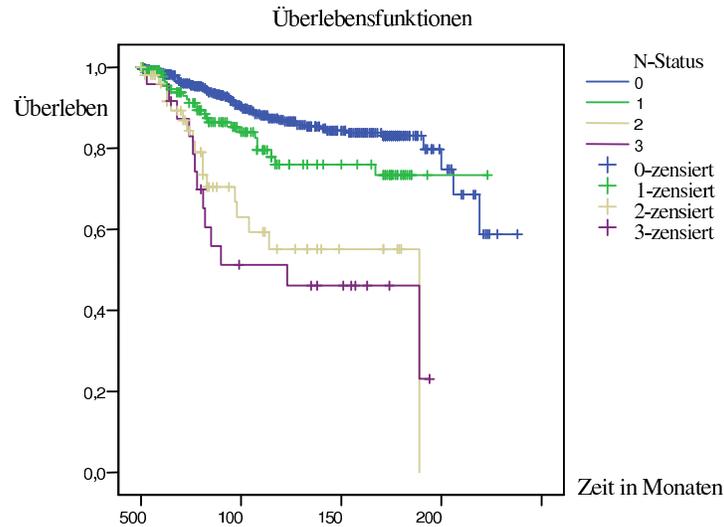


Abb. 10: hochsignifikanter Einfluss des N-Status auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten ohne/mit weniger Lymphknotenbefall bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als diejenigen mit/mit mehr Lymphknotenbefall

4.4.4. CEA

Tab. 10: Überlebensanalyse für CEA bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
CEA < 5 ng/ml	338	41	297	87,87
CEA > 5 ng/ml	154	35	119	7,27
Gesamt	492	76	416	84,55

Anzahl events = Anzahl der tumorbedingt Verstorbenen; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

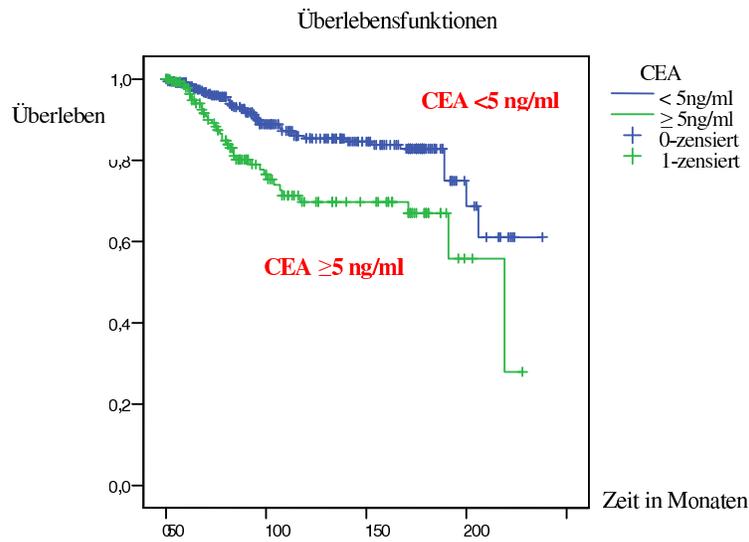


Abb. 11: hochsignifikanter Einfluss von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,0003$ (**). Patienten mit CEA Werten < 5 ng/ml bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als diejenigen mit Werten ≥ 5 ng/ml

Schlussfolgerung:

UICC Stadium, Darmwandinfiltration, Lymphknotenbefall und der CEA Tumormarker können als hochsignifikante Parameter dienen, um Aussagen über das tumorbedingte Überleben zu machen.

4.5. Einfluss von UICC in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben

4.5.1. UICC und CEA

Weiterführend sollte nun der alleinige Einfluss der einzelnen UICC-Stadien in Abhängigkeit von CEA auf das tumorbedingte Überleben betrachtet werden (Kaplan-Meier). Dabei zeigte sich für Patienten in UICC I und II keine signifikante Einflussnahme in Abhängigkeit von CEA auf das tumorbedingte Überleben (Abb. 12 und 13). Im Gegensatz dazu, konnte aber für Patienten in Stadium III eine hochsignifikante Einflussnahme in Abhängigkeit von CEA dargestellt werden: Patienten in UICC III mit einem CEA-Serum-Level <5 ng/ml zeigten ein signifikant höheres Überleben als diejenigen mit Werten ≥ 5 ng/ml ($p=0,0044^{**}$) (Abb. 14). Der cut-off point für CEA wurde wiederum bei 5 ng/ml festgelegt. Tabelle 11 gibt einen Überblick der einzelnen UICC Stadien in Abhängigkeit von CEA.

Tab. 11: Überlebensanalyse für UICC in Abhängigkeit von CEA bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
<i>UICC I</i>	194	19	175	90,21
CEA<5 ng/ml	151	12	139	92,05
CEA\geq5 ng/ml	43	7	36	83,72
<i>UICC II</i>	151	19	132	87,42
CEA<5 ng/ml	97	11	86	88,66
CEA\geq5 ng/ml	54	8	46	85,19
<i>UICC III</i>	147	38	109	74,15
CEA<5 ng/ml	90	18	72	80,0
CEA\geq5 ng/ml	57	20	37	64,91
Gesamt	492	76	416	84,55

Anzahl events = Anzahl der tumorbedingt Verstorbenen: Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

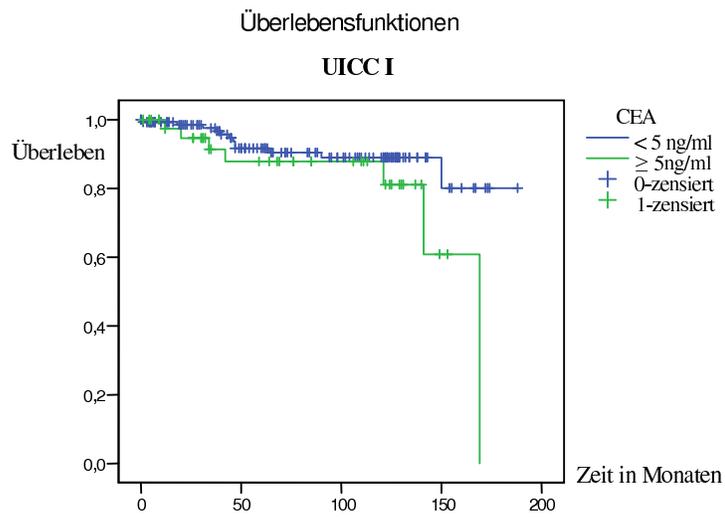


Abb. 12: kein signifikanter Einfluss von UICC I in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,1043$

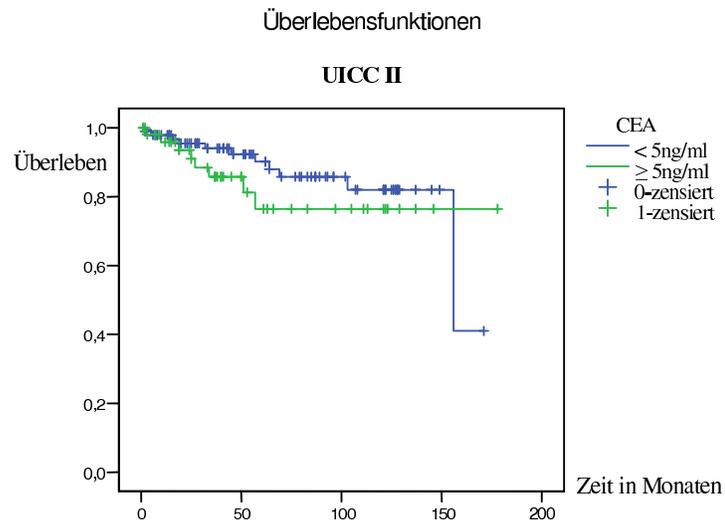


Abb. 13: kein signifikanter Einfluss von UICC II in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,3273$

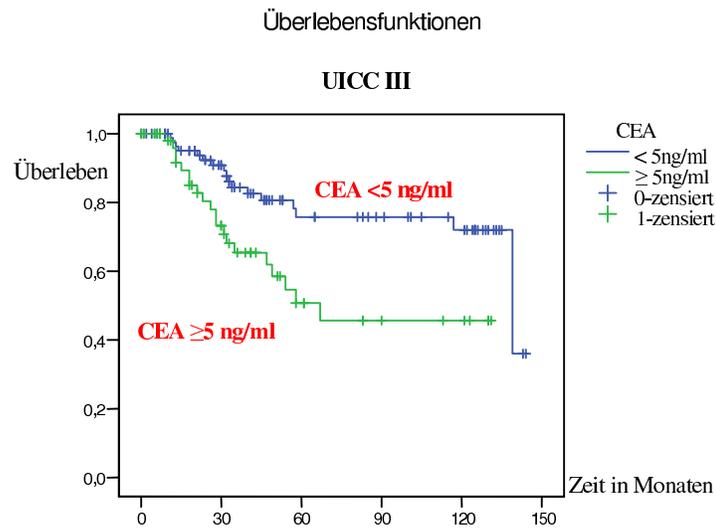


Abb. 14: hochsignifikanter Einfluss von UICC III in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,0044$ (**)

4.5.2. UICC III und CEA

Betrachtete man nun die UICC-Stadien III A, B und C differenziert in Abhängigkeit von CEA, konnten wiederum Unterschiede aufgezeigt werden: Patienten in Stadium UICC III A mit CEA Werten <5 ng/ml zeigten eine signifikant bessere Prognose ($p=0,040^*$) (Abb. 15), was dagegen für diejenigen in UICC III B/C nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 16 und 17). Allerdings sollte insbesondere dieser Sachverhalt an einem noch größeren Patientgut überprüft werden, um entgeltliche statistische Signifikanz beweisen zu können. Ebenso wurde hier der cut-off point von 5 ng/ml für CEA verwendet. Tabelle 12 veranschaulicht einen Überblick über UICC III A, B und C in Abhängigkeit von CEA.

Tab. 12: Überlebensanalyse für UICC III A, B und C in Abhängigkeit von CEA bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
<i>UICC III A</i>	29	5	24	82,76
CEA <5 ng/ml	22	3	19	86,36
CEA ≥5 ng/ml	7	2	5	71,43
<i>UICC III B</i>	67	13	54	80,60
CEA <5 ng/ml	41	7	34	82,93
CEA ≥5 ng/ml	26	6	20	76,92
<i>UICC III C</i>	35	12	23	65,71
CEA <5 ng/ml	17	5	12	70,59
CEA ≥5 ng/ml	18	7	11	61,11
Gesamt	131	30	101	77,10

Anzahl events = Anzahl der tumorbedingt Verstorbenen; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

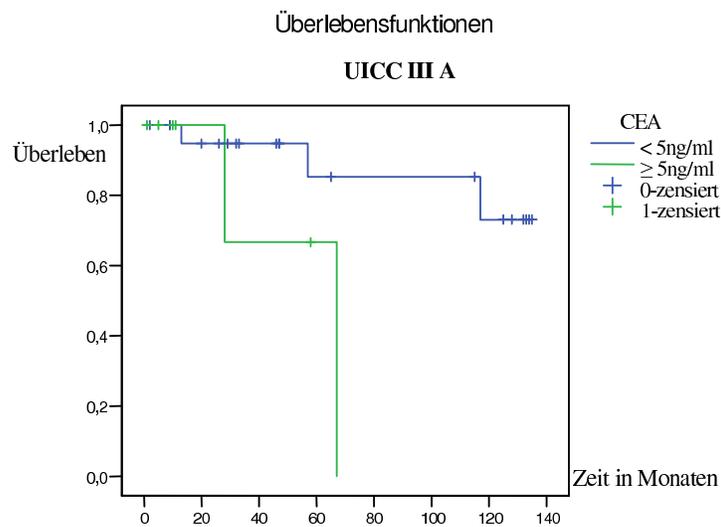


Abb. 15: signifikanter Einfluss von UICC III A in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,0410$ (*)

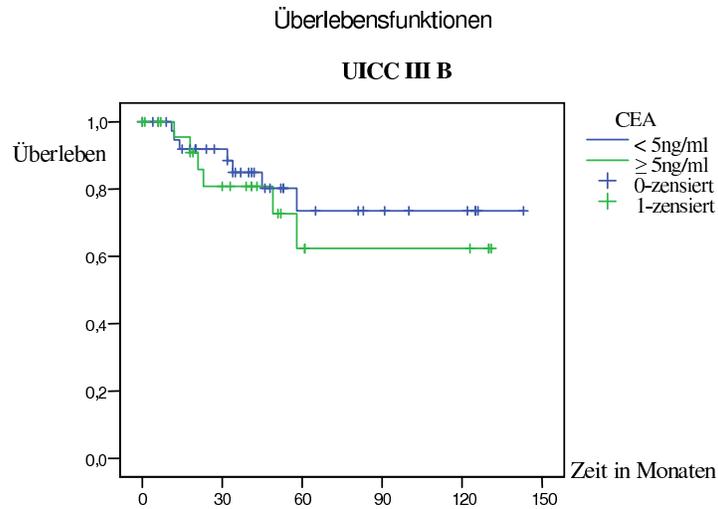


Abb. 16: kein signifikanter Einfluss von UICC III B in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,5102$

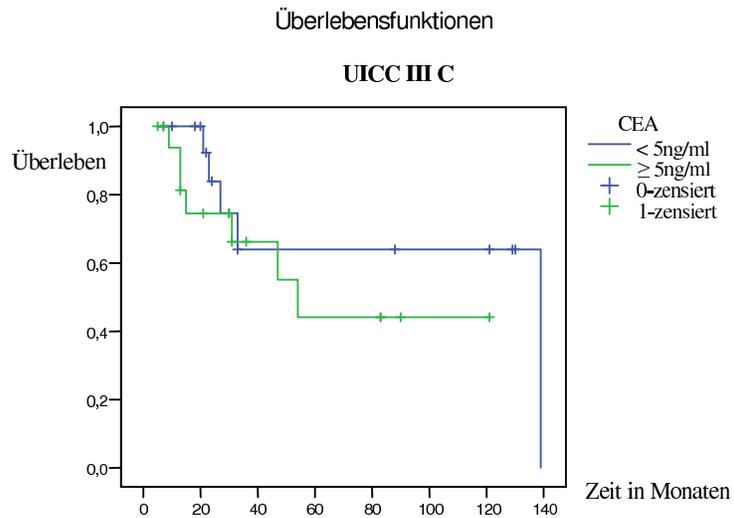


Abb. 17: kein signifikanter Einfluss von UICC III C in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p=0,3674$

Schlussfolgerung:

Präoperatives CEA (Serum) mit einem cut-off von 5 ng/ml kann als der aussagekräftigste Marker bei Patienten mit kolorektalem Karzinom betrachtet werden – insbesondere für UICC Stadium III.

4.6. Einfluss prognoserelevanter Faktoren auf die rezidivfreie Zeit

Auch für die rezidivfreie Zeit bei kolorektalem Karzinom konnte festgestellt werden, dass diese signifikant beeinflusst wird durch UICC-Stadium ($p < 0,0001^{**}$), T-Status ($p < 0,0001^{**}$), N-Status ($p < 0,0001^{**}$) und CEA Serumwert ($p = 0,0436^*$). Insbesondere spielte auch die Lokalisation (Kolon/Rektum) des Tumors eine erhebliche Rolle für das Rezidivrisiko: Tumoren des Kolons hatten eine niedrigere Rezidivrate als die des Rektums – trotz der Tatsache, dass bei sämtlichen Tumoren der unteren zwei Drittel des Rektums eine totale mesorektale Resektion durchgeführt wird, um die hohe Rezidivrate zu reduzieren ($p = 0,0210^*$) (Tab. 13, Abb. 18). Geschlecht, Alter, Grading, CA 19-9 und p53 (Serum) zeigten dagegen keine signifikante Einflussnahme auf die Rezidivbildung.

Tab. 13: Überlebensanalyse für Tumorlokalisierung bezüglich rezidivfreier Zeit bei KRK

	Gesamt	Anzahl events	Anzahl zensiert	Proz. zensiert
Kolon	369	63	333	84,09
Rektum	340	78	262	77,06
Sonstige	47	9	38	80,85
Gesamt	783	150	633	80,84

Anzahl events = Anzahl der Patienten mit Rezidiv; Anzahl zensiert = event noch nicht eingetreten

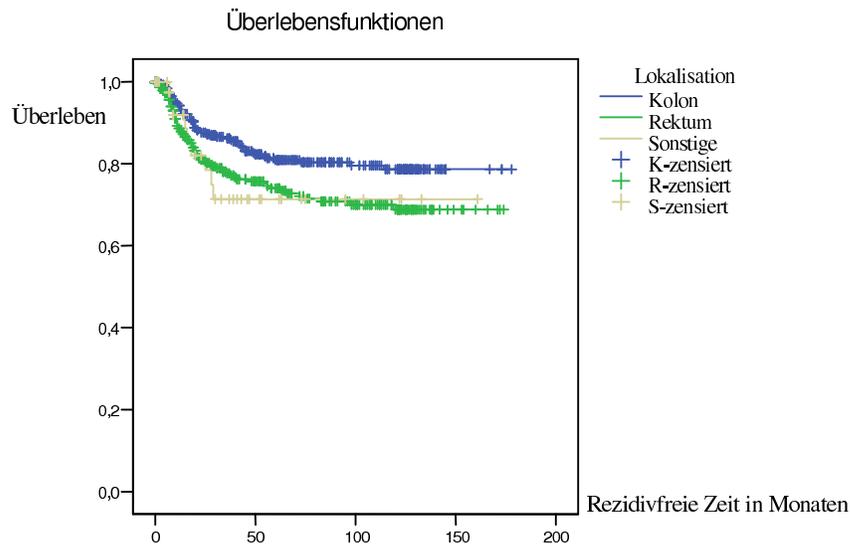


Abb. 18: Einfluss der Tumorlokalisierung auf rezidivfreie Zeit (Kaplan-Meier); $p = 0,0210^*$. Tumoren des Kolons haben eine niedrigere Rezidivrate als die des Rektums

Schlussfolgerung:

Tumoren des Rektums haben ein höheres Risikoprofil für ein Tumorrezidiv als die des Kolons.

4.7. Tumorsuppressorgen p53**4.7.1. Humorale Antwort auf p53**

Im folgenden Teil soll der Tumormarker p53 näher betrachtet werden - insbesondere die p53 spezifischen Ak im Serum und die Expression von p53 im Tumor. Dafür wurde eine Serie (Subgruppe) von 116 Patienten analysiert. 41,3% (n=48) der Patienten zeigten p53 spezifische IgG Ak im Serum, während bei 58,7% (n=68) der Patienten Antikörper nicht nachweisbar waren oder unter dem kritischen Wert lagen. Desweiteren zeigte die immunhistologische Darstellung von p53 eine signifikant stärkere Expression im UICC Stadium III als in den frühen Stadien I und II (UICC I/II, $p < 0,05$, Abb. 19). Auffällig war, dass die Präsenz von p53 spezifischen Ak signifikant mit der p53 Proteinexpression im Tumor korrelierte (80-100% Expression positiver Zellen, $p < 0,05$), was die Annahme eines Zusammenhangs zwischen der intrazellulären Ansammlung von p53 in den Tumorzellen und der humoralen Antwort auf p53 unterstützt. Im Gegensatz dazu korrelierten die p53 spezifischen Ak im Serum nicht mit dem freien p53 Protein im Serum.

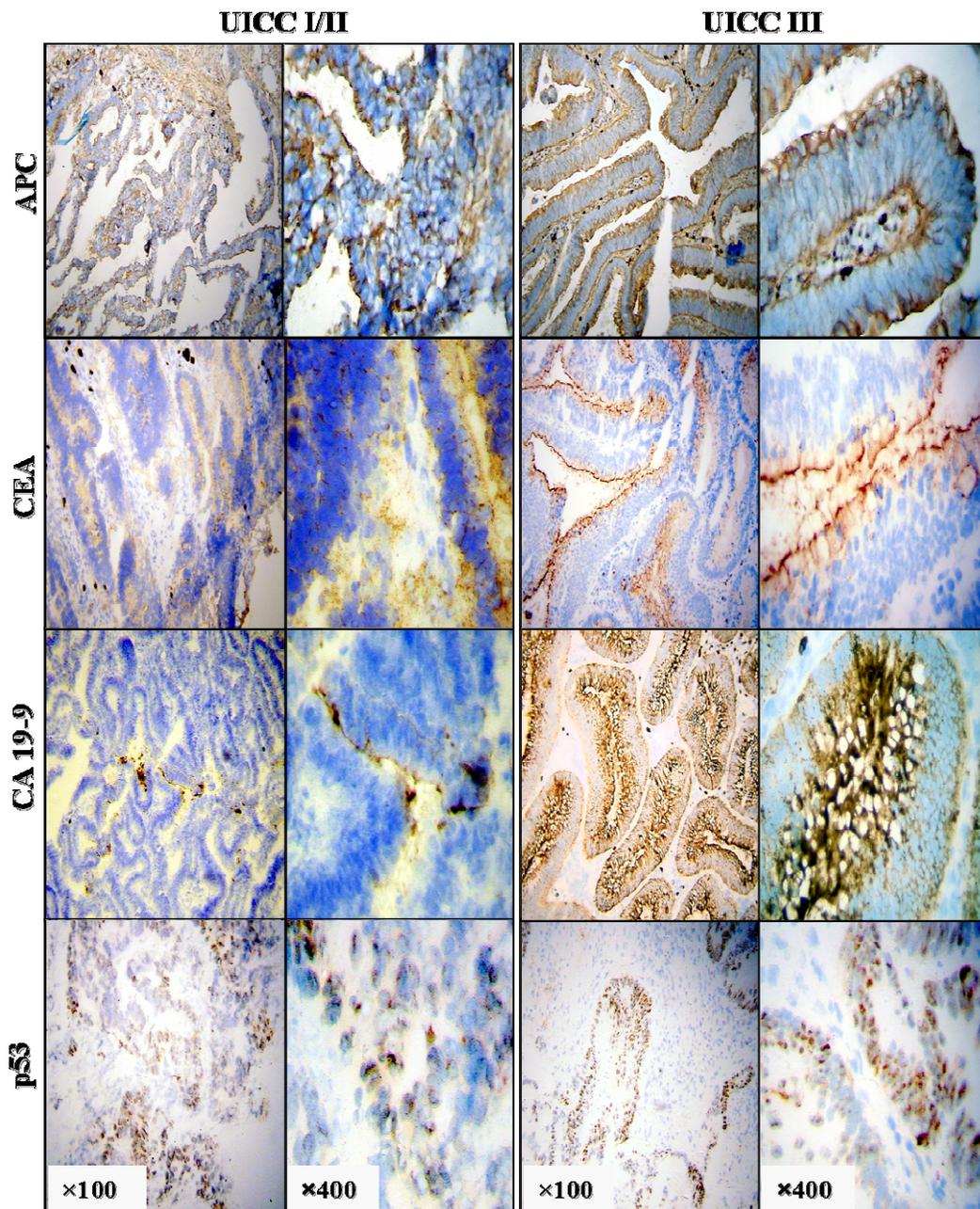


Abb. 19: Immunhistologische Analyse der Tumormarker. Tumoren der Patienten in Stadium III zeigten eine signifikant stärkere Proteinexpression als die in UICC I und II ($p < 0,05$). Beurteilung positiver Tumorzellen bei 100-facher und 400-facher Vergrößerung

4.7.2. Analyse der Mutationen im p53-Gen

Der Mutationsstatus von p53 wurde anhand von 24 zufällig ausgewählten Patienten aus der oben beschriebenen Subgruppe von 116 Patienten mit kolorektalem Karzinom analysiert. Dazu wurden 5 unterschiedliche Punktmutationen, die an 5 unterschiedlichen Stellen entlang der p53 Sequenz lokalisiert waren, in der Tumorbiopsie identifiziert (Basenpaar (Bp) 82 C:G, Bp 300 T:C, Bp 366 A:G, Bp 686 T:C, Bp 711 T:C). Die p53 Mutationen zeigten keine signifikante Korrelation mit dem Vorhandensein von p53 spezifischen Antikörpern. Erstaunlicherweise jedoch konnte bei 20% der analysierten Tumoren, bei denen eine Mutation vorlag, auch gleichzeitig eine Entwicklung von Metastasen festgestellt werden (Tab. 14).

Tab. 14: p53 Mutationen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

Patient	UICC	Base #	Mutation	Codon #	Follow up Metastasen/ Tod	Präsenz von p53 spe- zifischen AK
#20 76J, m	I	1068	wt: GTCCG T GTTT mut: GTCT T GTTT	253	32 M, nach 56 M gestorben	ja
#43 77J, f	II A	466	wt: TCCCCG G CGTG mut: TCCCC C CGTG	52	15 M	ja
#95 64J, f	II A	750	wt: TCACAG C CACA mut: TCAA A GCACA	147	19 M	ja
#48 81J, f	II A	1095	wt: AGACCG G GCGC mut: AGACT T GGCGC	262	59 M, nach 66 M gestorben	nein
#52 80J, f	III	684	wt: CAGCT G TGGG mut: CAG T TGTGGG	125	6 M, nach 9 M gestorben	nein

m = männlich; f = weiblich; J = Jahre; wt = Wildtyp; mut = mutiert; M = Monate

4.8. Korrelation von CEA, CA 19-9 und p53 im Serum und Tumor

Von den 116 Patienten, bei denen Tumorgewebe analysiert wurde, zeigten 61,3% (71/116) mindestens einen erhöhten Marker im Serum; dahingegen wurde im Tumor sogar bei 93,5% (108/116) mindestens einer der 3 Marker exprimiert (Tab. 15). Zusätzlich wurden Serumwerte von CEA, CA 19-9 und p53 in 57,7%, 29,6%, und 75% der Fälle auch gleichzeitig im Tumor exprimiert (Tab. 15). Insgesamt wurde bei 65,7% (71/108) der Patienten die Expression von mindestens einem Marker im Serum und gleichzeitig im Tumor festgestellt (Tab. 15).

Tab. 15: Vorkommen von CEA, CA 19-9, and p53 im Serum und deren Expression im Tumor

	Vorkommen Im Serum	Expression im Tumor	positive Serum- biomarker
CEA	56/116 (48,4%)	97/116 (83,9%)	56/97 (57,7%)
CA 19-9	21/116 (18,2%)	71/116 (61,3%)	21/71 (29,6%)
p53	45/116 (38,7%)	60/116 (51,6%)	45/60 (75,0%)
gesamt	71/116 (61,3%)	108 /116 (93,5%)	71/108 (65,7%)

Eine stadienbezogene Korrelation konnte sowohl in der Genexpression von APC, CEA und p53 als auch in der Proteinexpression von APC, CEA, CA 19-9 und p53 beobachtet werden (Tab. 16, Abb. 19). Das APC Gen war in unserer Studie bereits in den frühen Stadien besonders hoch exprimiert (UICC I-III: 83,3%-100%). Interessanterweise wurde ebenso in den frühen Stadien (UICC I) eine bemerkenswert hohe Genexpression von CEA und p53 festgestellt (66,7% und 50,0%). Insgesamt wurde die Alteration von mindestens einem Tumormarker in 50% (3/6) bei UICC I, 73,7% (14/19) bei UICC II, and 85,7% (18/21) bei UICC III nachgewiesen (Tab. 16).

Tab. 16: Genetisches Profil der Biomarker innerhalb des Tumors als Ausdruck des Tumorstadiums (Real Time PCR n=46)

UICC	APC	CEA	p53	gesamt
I	5/6 (83,3%)	4/6 (66,7%)	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)
II	17/19 (89,5%)	13/19 (68,0%)	9/19 (47,4%)	14/19 (73,7%)
III	21/21 (100%)	17/21 (83,3%)	13/21 (61,9%)	18/21 (85,7%)

Der Zusammenhang des Vorhandenseins von p53 im Serum und der Expression im Tumor anhand von Immunhistologie und Genexpression mit pathologischen Parametern (Lymphknotenbefall, UICC, Grading) ist in Tab. 17 beschrieben: eine stadienabhängige Korrelation, wie für die p53 Tumorexpression (Immunhistologie und Gene) beschrieben, konnte für die p53 Serumwerte nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Der Differenzierungsgrad korrelierte mit p53 weder im Serum noch im Tumor, während das Vorhandensein von Lymphknoten eindeutig mit der Präsenz von p53 im Tumor – nicht aber mit der im Serum – korrelierte.

Tab. 17: Korrelation zwischen dem Vorkommen von p53 im Serum und im Tumor

	Vorkommen im Serum (n=45)	Expression im Tumor (n=60)	Genexpression im Tumor (n=25)
Lymphknotenmetastasen			
nicht vorhanden	22 (48,9%)	15 (25,0%)	6 (24,0%)
vorhanden	23 (51,1%)	45 (75,0%)	19 (76,0%)
UICC			
I	14 (31,1%)	8 (13,3%)	3 (12,0%)
II	18 (40,0%)	18 (30,0%)	9 (36,0%)
III	13 (28,9%)	34 (56,7%)	13 (52,0%)
Tumordifferenzierung			
gut	3 (6,7%)	4 (6,7%)	3 (12,0%)
mäßig	36 (80%)	46 (76,7%)	18 (72,0%)
schlecht	6 (13,3%)	10 (16,7%)	4 (16,0%)

Mit Ausnahme von CEA, zeigten CA 19-9 und p53 für sich alleine keine Korrelation zwischen erhöhten Serumwerten und/oder der Expression im Tumor und dem postoperativen Auftreten von Rezidiven. Interessanterweise aber entwickelten diejenigen Patienten, die mindestens 3 erhöhte Parameter (CEA, CA 19-9 und p53) im Serum und/oder im Tumor (Protein- oder Genexpression) aufzeigten, eine höhere Rezidivrate (Lokal-, Metastasen) während des Follow-Up ($36 \pm 6,6$ Monate), unabhängig von ihrem UICC Stadium (UICC I-III). Tabelle 18 zeigt repräsentativ 10 Patienten aus dem Kollektiv von 116 Patienten: 5 davon, die für alle 3 Marker (CEA, CA 19-9 und p53) positiv waren (Serum und/oder Tumorexpression), u.a. mit nachweisbarer p53 Mutation (Tab. 14), entwickelten ein Tumorrezidiv, weitere 5, die nicht für alle 3 Marker positiv waren, entwickelten auch kein Rezidiv.

Tab. 18: Korrelation zwischen erhöhten Serumwerten und der Expression im Tumor

Patient /UICC	CEA			CA 19-9			p53			Tumor- rezidiv/ Metastasen
	Serum	Tumor	Expression	Serum	Tumor	Expression	Serum	Tumor	Expression	
	Protein	Protein	Gene	Protein	Protein	Gene	Protein	Protein	Gene	
#20 / I	+	+	+	-	+	+	+	-	+	ja, 32 M
#43 / IIA	-	+	+	-	-	+	+	+	+	ja, 15 M
#95 / IIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ja, 19 M
#48 / IIA	-	+	+	-	+	+	-	+	+	ja, 59 M
#52 / III	-	-	+	+	+	+	-	+	+	ja, 6 M
#35 / IIB	-	-	+	-	-	-	-	+	+	nein,DFS 54 M
#65 / IIB	+	+	+	-	-	-	-	+	+	nein,DFS 55 M
#100 / III	-	+	+	-	-	+	-	-	-	nein,DFS 55 M
#18 / III	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nein,DFS 55 M
#71 / III	+	-	+	-	-	-	-	+	+	nein,DFS 55 M

M = Monate; DFS = disease free survival

Diese Daten zeigen, dass zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors anhand einer Kombination aus p53, CA 19-9 und CEA (Serum und/oder Tumorexpression) eine Risikogruppe für eine höhere Rezidivrate identifiziert werden kann. Speziell diese Risikogruppe könnte von einer adjuvanten Therapie profitieren. p53 oder CA 19-9 als unabhängige prognostische Serummarker scheinen nicht mit einem größeren

Risikoprofil verbunden zu sein im Gegensatz zu Patienten mit erhöhten CEA Serumwerten (≥ 5 ng/ml).

5. BEANTWORTUNG DER FRAGEN

Die eingangs gestellten Fragen lassen sich wie folgt beantworten:

1. Bezüglich des tumorbedingten Überlebens wurde anhand des Kaplan-Meier Verfahrens nachgewiesen, dass sich sowohl UICC-Stadium als auch Darmwandinfiltration (T-Status), Lymphknotenbefall (N-Status) und CEA (Serummessung) als hochsignifikante Parameter eignen. Dahingegen wurde eine signifikante Einflussnahme von Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Grading, CA 19-9 und p53 (Serummessung) auf das Überleben nicht festgestellt.
2. Bei näherem Betrachten der einzelnen UICC-Stadien in Abhängigkeit von CEA war dieser der aussagekräftigste prognostische Tumormarker (Serummessung, cut-off point ≥ 5 ng/ml) für Patienten in höherem UICC-Stadium (UICC III). Bei weiterer Betrachtung der einzelnen Subgruppen des UICC III-Stadiums war CEA insbesondere für Patienten in UICC IIIA am relevantesten.
3. Bezüglich der rezidivfreien Zeit zeigten UICC-Stadium, T-Status, N-Status, CEA (Serummessung) und Tumorlokalisation (Kolon/Rektum) eine signifikante Einflussnahme. Tumoren des Rektums hatten ein höheres Risikoprofil als die des Kolons.
4. Immunhistologische und molekulargenetische Analyse bezüglich CEA, CA 19-9 und p53 bestätigten das UICC Stadium III als ein Risikostadium. Hierbei lies sich entgegen der Serummessungen auch für CA 19-9 und p53 eine stadienabhängige Korrelation darstellen.
5. p53 spezifische IgG Antikörper im Serum korrelierten sehr stark mit der p53 Proteinexpression, was die Annahme eines Zusammenhangs zwischen intrazellulärer Ansammlung von p53 in Tumorzellen und einer humoralen Antwort auf p53 stützt.
6. Mit Ausnahme von CEA, zeigten CA 19-9 und p53 für sich alleine keine Korrelation zwischen erhöhten Serumwerten und/oder der Expression im Tumor und dem postoperativen Auftreten von Rezidiven.

Dahingegen alle Patienten, die mindestens drei erhöhte Parameter (CEA, CA 19-9 und p53) im Serum und/oder im Tumor (Protein- oder Genexpression) hatten, zeigten eine höhere Rezidivrate (Lokal-, Metastasen) während der Tumornachsorge ($36 \pm 6,6$ Monate); dies unabhängig von ihrem UICC Stadium (UICC I-III).

6. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Einflussnahme allgemeiner prognoserelevanter Faktoren bei kolorektalem Karzinom auf das tumorbedingte Überleben und die rezidivfreie Zeit charakterisiert; insbesondere lag der Schwerpunkt auf der Bedeutung der prognostischen Aussagerelevanz des Tumorsuppressorgens p53 im Vergleich zu den bereits gut untersuchten Tumormarkern CEA und CA 19-9, bzw. auch deren Verwendung in Kombination. Ziel war es, anhand gegebener Tumormarkerkonstellation diejenigen Patienten zu identifizieren, die einem höheren Rezidivrisiko nach stattgefundener Primärtumoroperation ausgesetzt waren. Es stellt sich die Frage, in welchem UICC-Stadium Tumormarker von besonderer Aussagekraft sind bzw. ob Tumormarker zusätzlich zu der UICC Stadieneinteilung bei Primärdiagnose einen zusätzlichen Nutzen bezüglich der Prognose bringen. Ebenso kann der cut-off point der einzelnen Marker diskutiert werden, d.h. ab welchem Wert diese einen signifikanten Einfluss auf die Prognose nehmen.

Einer der aussagekräftigsten prognostischen Parameter bei kolorektalem Karzinom ist derzeit das UICC Stadium, wie wir auch in unserer Studie beweisen konnten. Dennoch spielen auch Faktoren wie Geschlecht, Alter, Lokalisation, Infiltration der Darmwand, Lymphknotenmetastasierung, Differenzierungsgrad, DNA Ploidität und onkogene Expression in unterschiedlichem Maße eine Rolle (63, 78). Was den Nutzen von CEA und CA 19-9 angeht, sollte deren Gebrauch möglichst genau definiert werden (Stadium, cut-off point), um die bisher vorhandenen Parameter sinnvoll zu ergänzen. Die Tatsache, dass die Tumormarker CEA und CA 19-9 einen prognostischen Wert besitzen, ist bewiesen wie in Tabelle 19 dargestellt (36, 79-97). Trotz unterschiedlicher cut-off points wurde in den meisten Fällen bis zu einem gewissen Grad eine positive Signifikanz bewiesen. Dennoch unterscheiden sie sich in ihrem prognostischen Wert bezüglich des Stadiums.

Tab. 19: Gegenüberstellung verschiedener Studien bezüglich der prognostischen Relevanz von CEA und CA 19-9 bei kolorektalem Karzinom

Autor/Jahr	Art der Studie	Anzahl der Pat.	CEA/CA19-9	cut-off point	Prognostischer Wert	DFS/OS
Wanebo/1978	R	358	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in Duke B+C	DFS
Goslin/1980	R	145*	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in Duke C	DFS
Staab/1981	R	563	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in UICC II	OS
Steele/1982	P	563	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in Duke C1 , nur für Kolon, nicht für Rektum	DFS
Wolmark/1984	R	945	CEA	CEA:2,5 und 10 ng/ml	signifikant in Duke B+C	DFS
Lewi/1984	R	217	CEA	CEA:10 ng/ml	signifikant in Duke C	OS
Moertel/1986	R	319*	CEA	CEA:2,5 und 5 ng/ml	signifikant in Duke C mit pN2	OS
Chu/1991	R	425	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in Duke B+C	DFS
Lindmark/1995	R	203*	CEA/CA19-9	CEA:4 ng/ml CA19-9:14 U/ml	CEA+CA 19-9: signifikant im gesamten Kollektiv	OS
Carpelan-Homstrong/1996	R	259*	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant im gesamten Kollektiv , aber nicht innerhalb der Duke Stadien	OS
Carriquiry/1999	R	209*	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in UICC II + III	DFS/OS
Forones/1999	R	74	CEA/CA19-9	CEA:3 ng/ml CA19-9:37 U/ml	CEA+CA 19-9: signifikant im gesamten Kollektiv	DFS
Reiter/2000	R	495*	CEA/CA19-9	CEA:4 ng/ml CA19-9:60 U/ml	CEA+CA 19-9: signifikant im gesamten Kollektiv	OS
Behbehani/2000	P	85	CEA/CA19-9	CEA:4,4 ng/ml CA19-9:43 U/ml	CEA+CA 19-9: signifikant in Duke B+C	DFS
Wang/2000	R	218	CEA	CEA:5 ng/ml	signifikant in Duke C	OS
Allende/2001	R	275*	CEA	CEA:6 ng/ml	signifikant in Duke C	OS
Wang/2002	R	128*	CA19-9	CA19-9:37 U/ml	CA 19-9: signifikant im gesamten Kollektiv	OS
Young/2002 Q16	R	122	CEA	CEA:6 ng/ml	CEA: signifikant im gesamten Kollektiv	OS
Turoldo/2002-2003	R	512	CEA	CEA:60 ng/ml	signifikant in Duke B+C	DFS/OS
Chen/2005	R	574	CEA/CA19-9	CEA:5 ng/ml CA19-9:37 U/ml	signifikant in UICC II	OS

R = retrospektive Studie, P = prospektive Studie; * Stadium IV eingeschlossen

DFS = Disease free survival, OS = Overall survival

Wanebo et al. untersuchte erstmals in einem Patientengut von 358 Patienten den prognostischen Einfluss von CEA auf das Überleben; dabei stellte sich heraus, dass Patienten der Duke B (UICC II) und C (UICC III) Stadien mit einem CEA >5 ng/ml eine schlechtere Überlebenschance hatten (79). Wolmark et al. bestätigte in seiner Studie ebenfalls Duke B und C als ein Risikostadium: es ergab sich für Patienten mit präoperativem CEA <2,5 ng/ml verglichen mit denen >10 ng/ml eine Signifikanz von $p=0,003$ (Duke B) und $p=0,05$ (Duke C) (83). Auch Chu et al. konnte anhand von 425 Patienten beweisen, dass die Überlebensrate der Patienten in UICC II und III bei einem cut-off point von 5 ng/ml signifikant beeinflusst wird (II: $p=0,003$ und III: $p=0,04$) (86). Carriquiry et al. identifizierte bei Überschreiten des kritischen Wertes von 5 ng/ml für CEA dieselbe Risikogruppe (89). Behbehani et al. konnte für Duke B und C Patienten beweisen, dass beide Tumormarker einen signifikanten Einfluss auf die rezidivfreie Zeit nehmen. Bei CEA Werten unterhalb bzw. oberhalb des cut off (CEA=4,4 ng/ml) ergab sich ein rezidivfreies Intervall von 23% versus 74% (CEA: $p=0,003$), bei CA 19-9 Werten unterhalb bzw. oberhalb des cut off (CA 19-9=37 U/ml) betrug das rezidivfreie Intervall 71% versus 33% (CA 19-9= $0,004$) (92). Nicht zuletzt bewies auch Turollo et al. für Patienten in Duke B und C eine schlechtere Prognose bezüglich des tumorbedingten Überlebens und der rezidivfreien Zeit bei Überschreiten eines Schwellenwertes von CEA (60 ng/ml) (97).

Manche Arbeiten wiederum zeigten, dass erhöhte präoperative Werte nur in Stadium III mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Diesen Sachverhalt stellte Goslin et al. in seiner Studie dar: für Patienten in Duke B konnte kein nachteiliger Einfluss erhöhter CEA Werte auf das Überleben festgestellt werden, wohingegen Patienten in Duke C durch Werte >5 ng/ml signifikant beeinflusst wurden ($p<0,005$) (80). Lewi et al. untersuchte 217 Duke B und C Patienten und konnte dabei für Duke B Patienten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Überleben und erhöhten CEA Werten feststellen ($p=0,65$); Duke C Patienten dagegen mit einem CEA Wert >10 ng/ml hatten eine signifikant schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate ($p<0,05$) (84). Steele et al. konnte in seiner Studie mit 563 Patienten insbesondere Duke C1 als ein Risikostadium hervorheben (82). Moertel et al. argumentierte, dass CEA nur bei Patienten in Duke C mit mehr als 4 befallenen Lymphknoten (pN2) als signifikanter Parameter diene. In dieser Gruppe lag die Überlebensrate für Patienten mit CEA Werten <10 ng/ml

drastisch höher verglichen mit denen mit Werten über dem cut-off ($p=0,028$) (85). Weiter konnten Wang und seine Mitarbeiter eine signifikante Einflussnahme von CEA Werten >5 ng/ml bei Patienten in Duke C1 ($p=0,0054$) und C2 ($p=0,0002$) überzeugend darstellen (93). Allende et al. legte den cut-off bei 6 ng/ml fest und konnte bei erhöhten Werten ebenso ein hochsignifikant kürzeres Überleben für Duke C Patienten beweisen ($p<0,0001$) (94).

Unsere aktuell erhobenen Daten bestätigen die in oben beschriebenen Studien signifikante Einflussnahme von CEA auf das Überleben in Stadium III ($n=492$, cut-off point von 5 ng/ml, $p=0,0044$). Wie auch die Studien von Steele, Moertel und Wang bewiesen, ist es von großer Wichtigkeit zusätzlich die Subgruppen innerhalb des Stadiums näher zu betrachten, um auf der Basis von Darminfiltrationstiefe und Lymphknotenbefall ein noch differenziertes Eingreifen zu ermöglichen. In unserer Arbeit stellte sich insbesondere das UICC Stadium III A ($pT1/T2$ $pN1$) als ein Risikostadium dar ($p=0,0410$). So hatten Patienten in UICC III A mit CEA Werten <5 ng/ml eine bessere Prognose als diejenigen mit Werten ≥ 5 ng/ml und besser als diejenigen in UICC III B ($pT3/T4$ $pN1$) und C ($pT1-T4$ $pN2$). Allerdings werden noch mehr Patienten in der Gruppe von UICC III A mit CEA <5 ng/ml gebraucht, um endgültige statistische Signifikanz zu beweisen. Die Ergebnisse für CA 19-9 der oben aufgeführten Studien konnten in unserer Studie anhand der untersuchten Patienten nicht bestätigt werden ($p=0,2180$). Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine zu kleine Patientenzahl zurückzuführen. Entgegen der Ergebnisse der Serummessung für CA 19-9 bestätigten dafür die Immunhistologie und die Genanalyse eine stadienabhängige Korrelation – wie auch für CEA - und damit das Stadium III als ein Risikostadium.

Im Gegensatz dazu kam Staab et al. zu einer anderen Feststellung: in seiner Studie machten die erhöhten CEA Werte (>5 ng/ml) nur in Stadium II ($p<0,02$) einen signifikanten Unterschied und nicht bei Patienten mit schon vorhandenen Lymphknotenmetastasen (Stadium III) ($p=0,1$) (81). Auch Chen et al. konnte diese Argumentation für beide Marker bei einem cut-off point für CEA=5 ng/ml und CA 19-9=37 U/ml bestätigen; insbesondere bedeutete deren kombinierte Anwendung einen Benefit ($p=0,035$) (36). Die Folge dieser Feststellung wäre, dass eine Risikogruppe (UICC II) zu einem noch relativ frühen Zeitpunkt und noch wenig fortgeschrittenem

Stadium identifiziert wird. Damit wäre ein früheres therapeutisches Eingreifen möglich und die Heilungschancen noch besser.

Eine weitere Gruppe von Studien konnte diese signifikante Einflussnahme der Tumormarker nur auf das gesamte Kollektiv bestätigen, ohne signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Stadien festzustellen. So argumentierte beispielsweise Lindmark et al. nach Untersuchung seiner 203 Patienten bei cut-off Werten für CEA=4 ng/ml und CA 19-9=14 U/ml (87). Auch Carpelan-Holmstrom et al. stellte zwar einen signifikanten Einfluss von CEA (cut-off: 5 ng/ml) auf das Überleben fest ($p=0,03$), nicht jedoch innerhalb der einzelnen Duke Stadien (88). Forones und Mitarbeiter bestätigten den prädiktiven Wert beider Marker hinsichtlich der Prognose (CEA: $p=0,001$, CA 19-9: $p=0,01$), aber ohne weitere Stadiendifferenzierung (90). Reiter et al. legte den cut-off für CEA bei 4 ng/ml und für CA 19-9 bei 60 U/ml fest und konnte wiederum ein erhöhtes Risiko bei präoperativen Werten über dem Schwellenwert nachweisen (CEA: $p<0,001$, CA 19-9: $p<0,07$) (91). Wang et al. favorisierte in seiner Studie mit 128 Patienten CA 19-9 als den aussagekräftigsten Indikator bezüglich des Überlebens ($p<0,001$), allerdings auch nicht stadienspezifisch; interessanterweise konnte er CEA als keinen signifikanten Parameter identifizieren (95). Young et al. wiederum bestätigte die prognostische Aussagekraft von CEA in seinem Kollektiv von 122 Patienten (96).

Die Ergebnisse der zuletzt genannten Studien machen es schwierig die Marker möglichst präzise einzusetzen, da sie nur Aussagen über ein allgemeines Kollektiv machen, nicht aber über eine spezifische Gruppierung. Auf diese Weise kann keine Risikogruppe identifiziert werden, bei der gezielt engmaschiger therapiert werden kann und den weniger Gefährdeten die Nebeneffekte und Kosten der Therapie erspart bzw. reduziert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Studien im Gesamten, können mehrere Gründe existieren, warum teilweise verwirrende und auch widersprüchliche Ergebnisse zu finden sind. Erstens sind die Patientenzahlen mancher Studien nicht groß genug. Zweitens sind die Einschlusskriterien bezüglich der Stadien unterschiedlich definiert, d.h. manche Studien beinhalten Stadium IV und manche wiederum nicht. Auch sind desweiteren unterschiedliche cut-off Werte für die beiden Marker zu finden, wie sie in

Tabelle 19 dargestellt sind. Zuletzt darf nicht vergessen werden, dass unterschiedliche statistische Methoden verwendet wurden und deren Ergebnisse eventuell unterschiedlich interpretiert wurden.

Im folgenden Teil soll die Prognoserelevanz des p53-Tumorsuppressorgens diskutiert werden; p53 Genmutationen sind die häufigsten genetischen Alterationen in dem weiten Spektrum von Tumoren, und treten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in bis zu 60 % der Fälle auf (64, 98, 99). Hierbei stellt sich vor allem die Frage, inwiefern eine Alteration dieses Markers mit dem tumorbedingten Überleben/rezidivfreien Zeit korreliert und somit ergänzend zu den oben dargestellten Markern CEA und CA 19-9 einen Nutzen bringt. Ebenso ist es von Bedeutung, die unterschiedlichen Methoden (Serum, Immunhistologie, Genanalyse) der p53 Bestimmung zu diskutieren, um die aussagekräftigste Methode zu identifizieren bzw. auch deren komplementären Vorteil auszunutzen (65-70, 73-76).

Allegra et al. konnte in seiner Studie von 706 Patienten, die mittels Immunhistologie untersucht wurden, ganz eindeutig darstellen, dass Patienten in Duke B und C mit positivem p53 eine schlechtere Prognose hatten als die mit negativem p53. Eine statistische Signifikanz konnte er insbesondere für p53+ und die rezidivfreie Zeit nachweisen ($p=0,01$), während der Zusammenhang zwischen p53+ und dem Gesamtüberleben diese Signifikanz nicht erreichte ($p=0,81$) (65). Einige weitere Studien haben unter Ausnutzung der Immunhistologie überzeugend einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überexpression von p53 und einer schlechteren Prognose demonstriert: Yamamura et al. argumentierte, dass insbesondere die Kombination von p53 Überexpression mit Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($p=0,000$)/ Gefäßinfiltration ($p=0,018$)/ CEA Werten >5 ng/ml ($p=0,009$) einen exzellenten prognostischen Indikator bei kolorektalem Karzinom bietet (66). Gleichermäßen überzeugte Diez et al. davon, dass p53 (Immunhistologie) und CEA (Serum) als komplementäre Indikatoren fungieren. Eine positive p53-Akkumulation und erhöhte CEA Werte (cut-off: 5 ng/ml) waren signifikant mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall assoziiert und so mit einer schlechteren Prognose (p53: $p=0,002$, CEA: $p=0,02$) (67). Hierraus läßt sich schließen, dass die kombinierte Anwendung beider Marker (p53: Immunhisto, CEA: Serum) von besonders prognoserelevantem Nutzen ist.

Caldes et al. untersuchte seine 72 Patienten sowohl mit Hilfe der Immunhistologie als auch der Genanalyse. Patienten mit p53-Alterationen – auf Gen- und Proteinebene – hatten beide ein schlechteres Überlebensrisiko als die ohne eine Alteration. Interessanterweise war jedoch nur die p53-Protein Akkumulation eindeutig signifikant ($p < 0,008$), während die p53-Genmutation eher grenzwertig signifikant war ($p < 0,09$). Zusätzlich wurde hier noch eine Korrelation mit dem Stadium nachgewiesen ($p < 0,001$) (68). Okubo et al. machte sich bei seinen Forschungsarbeiten auch die Immunhistologie und die Genanalyse zunutze; dabei identifizierte er die p53-Genmutation als signifikanten prognostischen Indikator spezifisch für das distale KRK ($p = 0,0011$), jedoch nicht für die proximalen Tumoren des KRK ($p = 0,6673$) (69). In unserer Studie konnte für die p53 Proteinexpression und Genmutation auch eine stadienabhängige Korrelation festgestellt werden, obwohl die p53 Werte im Serum nicht mit dem UICC Stadium korrelierten; die p53 Genmutation und die p53 Proteinexpression können als hervorragende vorhersagbare Marker für die Beurteilung der Prognose herangezogen werden.

Desweiteren korrelierten in unserer Studie die p53 spezifischen IgG Antikörper sehr stark mit der p53 Proteinexpression, was die Annahme eines Zusammenhangs zwischen intrazellulärer Ansammlung von p53 in Tumorzellen und einer humoralen Antwort auf p53 stützt - so wie es auch vorherige Studien vermuteten (71, 72).

Zwei weitere Studien untersuchten ihr Patientengut ausschließlich mittels der Genanalyse (PCR) (28,32): Hamelin et al. bestätigte eine starke Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer p53-Genmutation und kürzerem Überleben ($p = 0,003$) (73). Hsieh et al. untersuchte neben dem p53 Gen auch das APC und K-ras Gen: hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der einzelnen Marker und der demographischen Daten ($p > 0,05$); dafür aber war jeweils mindestens einer der Marker mit dem T-Status ($p = 0,033$), N-Status ($p < 0,001$) und Stadium ($p < 0,001$) assoziiert. Zusätzlich hatten Patienten, die für alle 3 Marker positiv waren, eine höhere Rezidivrate ($p < 0,001$). Darüber hinaus war das Vorhandensein von p53 in dieser Studie insbesondere mit Peritonealmetastasen assoziiert ($p = 0,004$) (70). Diese Ergebnisse schlagen vor, dass es durchaus von Vorteil sein kann, auch die anderen Gene der Adenom-Karzinom-Sequenz in Betracht zu ziehen.

Trotz überzeugender Ergebnisse bezüglich der prognostischen Relevanz von p53 gibt es auch Studien, die diese nicht nachweisen konnten. Watanebe et al. beispielsweise, konnte keine signifikante Assoziation zwischen der p53 Überexpression und dem Outcome der Patienten nachweisen (74). Shim et al., der bei 63 Patienten eine p53 Serumbestimmung mittels ELISA durchführte, konnte zwar für Duke C und D relativ hohe Level an p53 nachweisen, jedoch waren diese statistisch nicht signifikant. Auffällig war dennoch eine signifikante Korrelation zwischen Serum p53-Protein und Serum CA 19-9 ($p < 0,01$): Serum p53 Levels stiegen mit erhöhten CA 19-9 Levels an. Bemerkenswert war zusätzlich der Rückgang von p53 nach der operativen Entfernung des Tumors ($p < 0,001$) (75). Bezüglich der p53 Werte im Serum wurden auch von uns vergleichbare Ergebnisse erzielt - es bestand weder eine Korrelation zwischen p53 Serumwerten und dem UICC Stadium noch konnte eine signifikante Einflussnahme auf das Überleben festgestellt werden.

Entgegen aller bisher gemachten Aussagen gab es auch Studien, die genau das Gegenteil bewiesen: erhöhte p53 Level bedeuteten eine bessere Prognose. Adrover et al. verwendete für die Serummessung seiner 111 Patienten einen luminometric immunoassay (LIA). Der cut-off für p53 lag bei $2,7 \text{ ng/ml}^{-1}$. Er konnte in Stadium III eine signifikante Korrelation zwischen hohen p53 Levels und einem verlängerten rezidivfreien Intervall aufweisen ($p = 0,05$); ein längeres tumorbedingtes Gesamtüberleben wurde ebenso beobachtet, jedoch erlangte dieses keine statistische Signifikanz ($p = 0,09$) (76). In Tabelle 20 ist eine Gegenüberstellung verschiedener Studien dargestellt.

Tab. 20: Gegenüberstellung verschiedener Studien bezüglich der prognostischen Relevanz von p53 bei kolorektalem Karzinom

Autor/Jahr	Methode	Anzahl der Patienten	Signifikanz
Hamelin/1994	Genanalyse: PCR	85	Y: p53 + → Prognose -
Shim/1998	Serum: ELISA	63	N: Duke C+D nur rel.hoch
Caldes/1998	Immunhistologie Genanalyse:SSCP	72	Y: p53-Proteinakkumulation N: p53-Genmutation p53 + → Prognose -
Adrover/1999	Serum:luminometric immunoessay (LIA)	111	Y: p53 + → Prognose + cut-off: 2,7 ng/ml ⁻¹
Yamamura/1999	Immunhistologie	142	Y: p53 + → Prognose -
Diez/2000	Immunhistologie	174	Y: p53 + → Prognose -
Okubo/2001	Immunhistologie Genanalyse: PCR	110	Y: p53 + → Prognose -
Allegra/2003	Immunhistologie	706	Y: p53 + → Prognose - ; Duke B+C
Watanabe/2003	Immunhistologie	460	N
Hsieh/2005	Genanalyse: PCR	118	Y: p53 + → Prognose -

Y= prognostische Signifikanz, N= keine prognostische Signifikanz;
Prognose - = Prognose schlecht, Prognose + = Prognose gut.

Ebenso wie für CEA und CA 19-9 sind auch für p53 teilweise sehr kontroverse Ergebnisse vertreten; auch hier spielen natürlich wieder unterschiedliche Fallzahlen und definitiv die Anwendung unterschiedlicher Methoden eine Rolle.

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors anhand einer Kombination aus p53, CA 19-9 und CEA (Serum und/oder Tumorexpression) eine Risikogruppe für eine höhere Rezidivrate identifiziert werden kann. Speziell diese Risikogruppe könnte von einer adjuvanten Therapie profitieren.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, prognoserelevante Faktoren für das kolorektale Karzinom anhand des eigenen Patientengutes zu untersuchen. Insbesondere sollte die prognostische Relevanz der Tumormarker CEA, CA 19-9 und p53 in Bezug auf tumorbedingtes Überleben und rezidivfreie Zeit analysiert werden, um anhand ihrer Ausprägung die Prognose eines Patienten nach primär chirurgischer Therapie besser definieren zu können. Dementsprechend sollte ein möglichst adäquates therapeutisches Vorgehen gewährleistet sein.

Bezüglich des tumorbedingten Überlebens wurde anhand des Kaplan-Meier Verfahrens nachgewiesen, dass sowohl das UICC-Stadium als auch die Darmwandinfiltration (T-Status), Lymphknotenbefall (N-Status) und CEA im Serum als hochsignifikante Parameter dienen, wohingegen eine signifikante Einflussnahme für das Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Grading, CA 19-9 und p53 (Serummessung) auf das Überleben nicht festgestellt wurde. Bei näherem Betrachten der einzelnen UICC-Stadien in Abhängigkeit von CEA war dieser der aussagekräftigste prognostische Tumormarker (Serummessung, cut-off point ≥ 5 ng/ml) für Patienten in höherem UICC-Stadium (UICC III). Bei weiterer Betrachtung der einzelnen Subgruppen des UICC III-Stadiums war CEA insbesondere für Patienten in UICC IIIA am relevantesten. Bezüglich der beiden anderen Tumormarker CA 19-9 und p53 konnte mittels der Serummessungen keine Korrelation mit dem UICC-Stadium bzw. auch keine signifikante Einflussnahme auf das tumorbedingte Überleben festgestellt werden.

Für die rezidivfreie Zeit zeigten UICC-Stadium, T-Status, N-Status, CEA (Serummessung) und Tumorlokalisation (Kolon/Rektum) eine signifikante Einflussnahme. Tumoren des Rektums hatten ein höheres Risikoprofil als die des Kolons.

Die immunhistologische und molekulargenetische Analyse bezüglich aller drei Tumormarker bestätigte das UICC Stadium III als ein Risikostadium. Dabei lies sich entgegen der Serummessungen auch für CA 19-9 und p53 eine stadienabhängige Risiko-Korrelation darstellen. Des Weiteren korrelierte das Auftreten p53 spezifischer

IgG Antikörper stark mit der p53 Proteinexpression im Gewebe, was die Annahme eines Zusammenhangs zwischen intrazellulärer Ansammlung von p53 in Tumorzellen und einer humoralen Antwort auf p53 stützt.

Mit Ausnahme von CEA, zeigten CA 19-9 und p53 für sich alleine keine Korrelation zwischen erhöhten Serumwerten und/oder der Expression im Tumor und dem postoperativen Auftreten von Rezidiven.

Dahingegen wurde erstmals in dieser Arbeit festgestellt, dass Patienten, die mindestens drei erhöhte Parameter (CEA, CA 19-9 und p53) im Serum und/oder im Tumor (Protein- oder Genexpression) hatten, eine höhere Rezidivrate (Lokal-, Metastasen) während der Tumornachsorge ($36 \pm 6,6$ Monate) zeigten; dies unabhängig von ihrem UICC Stadium (UICC I-III). Speziell diese Risikogruppe könnte von einer adjuvanten Therapie profitieren.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lehnert T, Golling M, Buchholz J: [Locally recurrent rectal carcinoma]. *Chirurg* 2004; 75(1):38-44
2. Parkin DM, Muir CS: Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992(120):45-173
3. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H: Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ* 1993(121):1-806
4. Midgley R, Kerr D: Colorectal cancer. *Lancet* 1999; 353(9150):391-9
5. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC: Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6(4):325-44
6. Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M: Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 1995; 19(1):59-71
7. Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A: Continued rightward shift of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(8):1035-40
8. Ponz de Leon M, Marino M, Benatti P, Rossi G, Menigatti M, Pedroni M, Di Gregorio C, Losi L, Borghi F, Scarselli A, Ponti G, Roncari B, Zangardi G, Abbati G, Ascari E, Roncucci L: Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol* 2004; 15(6):940-6
9. Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA: Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006; 66(3):1859-65
10. van den Brandt PA, Goldbohm RA: Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20(3):589-603
11. Weisburger JH, Reddy BS, Rose DP, Cohen LA, Kendall ME, Wynder EL: Protective mechanisms of dietary fibers in nutritional carcinogenesis. *Basic Life Sci* 1993; 61:45-63
12. Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER: Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1999; 340(2):101-7
13. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B: The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342(26):1946-52
14. Sheehan KM, O'Connell F, O'Grady A, Conroy RM, Leader MB, Byrne MF, Murray FE, Kay EW: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16(6):619-25
15. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323(18):1228-33

16. Offit K: Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(2):124-5
17. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986; 25(3):473-6
18. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67
19. Haber DA, Fearon ER: The promise of cancer genetics. *Lancet* 1998; 351 Suppl 2:SIII-8
20. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104(5):1535-49
21. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF: Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology* 1998; 55(2):103-8
22. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9):525-32
23. Toribara NW, Sleisenger MH: Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995; 332(13):861-7
24. Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):11-27
25. Fearon ER: K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(24):1978-80
26. Dukes CE: The surgical pathology of rectal cancer. *Am J Surg* 1950; 79(1):66-71, illust; Disc, 94
27. Dukes CE: The relation of histology to spread in intestinal cancer. *Br J Cancer* 1950; 4(1):59-62
28. Astler VB, Coller FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139(6):846-52
29. Hermanek P, Wittekind C, Seib HJ: [Current TNM aspects. 5. TNM classification and stage grouping]. *Zentralbl Chir* 1997; 122(10):934-7
30. Hermanek P: The superiority of the new International Union Against Cancer and American Joint Committee on Cancer TNM staging of gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88(8):1763-5
31. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF: Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 2000; 343(3):169-74
32. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA: American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 1997; 47(3):154-60
33. Rifkin MD, Ehrlich SM, Marks G: Staging of rectal carcinoma: prospective comparison of endorectal US and CT. *Radiology* 1989; 170(2):319-22

34. Thompson WM, Halvorsen RA, Foster WL, Jr., Roberts L, Gibbons R: Preoperative and postoperative CT staging of rectosigmoid carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1986; 146(4):703-10
35. von Kleist S, Wagener C, Breuer H: [Second International Expert Meeting of the German Foundation for Cancer Research, "Current trends in cancer research." Critical review of tumour markers in diagnosis and surveillance]. *Onkologie* 1980; 3(6):310-5
36. Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Chang SC: Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* 2005; 124(2):169-74
37. Lehnert T, Herfarth C: [Principles and value of lymph node excision in colorectal carcinoma]. *Chirurg* 1996; 67(9):889-99
38. Curti G, Maurer CA, Buchler MW: Colorectal carcinoma: is lymphadenectomy useful? *Dig Surg* 1998; 15(3):193-208
39. Wong JH, Severino R, Honnebiel MB, Tom P, Namiki TS: Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2896-900
40. Turnbull RB, Jr., Kyle K, Watson FR, Spratt J: Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *CA Cancer J Clin* 1968; 18(2):82-7
41. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD: The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69(10):613-6
42. Hermanek P, Hohenberger W, Klimpfinger M, Kockerling F, Papadopoulos T: The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18(4):335-41
43. Kockerling F, Reymond MA, Altendorf-Hofmann A, Dworak O, Hohenberger W: Influence of surgery on metachronous distant metastases and survival in rectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(1):324-9
44. Parks AG, Stuart AE: The management of villous tumours of the large bowel. *Br J Surg* 1973; 60(9):688-95
45. Glennly AM, Song F: Antimicrobial prophylaxis in colorectal surgery. *Qual Health Care* 1999; 8(2):132-6
46. Junginger T, Kneist W, Seifert JK: [Surgical treatment of colorectal liver metastases]. *Zentralbl Chir* 2003; 128(11):911-9
47. Junginger T: [Surgical therapy and adjuvant measures in colorectal carcinoma]. *Zentralbl Chir* 1997; 122 Suppl:15-9
48. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Gunderson LL, Rich TA: Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994; 331(8):502-7
49. Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, Trondsen E, Harbitz T, Nygaard K, Nilsen JB, Wist E, Hannisdal E: Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group. *Br J Surg* 1997; 84(8):1130-5

50. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, et al.: Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(11):709-15
51. Kohne CH, Wils J, Lorenz M, Schoffski P, Voigtmann R, Bokemeyer C, Lutz M, Kleeberg C, Ridwelski K, Souchon R, El-Serafi M, Weiss U, Burkhard O, Ruckle H, Lichnitscher M, Langenbuch T, Scheithauer W, Baron B, Couvreur ML, Schmoll HJ: Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. *J Clin Oncol* 2003; 21(20):3721-8
52. Hermanek P, Jr., Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P: [Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group]. *Chirurg* 1994; 65(4):287-97
53. Berman JM, Cheung RJ, Weinberg DS: Surveillance after colorectal cancer resection. *Lancet* 2000; 355(9201):395-9
54. Wanebo HJ, Llaneras M, Martin T, Kaiser D: Prospective monitoring trial for carcinoma of colon and rectum after surgical resection. *Surg Gynecol Obstet* 1989; 169(6):479-87
55. Sugarbaker PH, Gianola FJ, Dwyer A, Neuman NR: A simplified plan for follow-up of patients with colon and rectal cancer supported by prospective studies of laboratory and radiologic test results. *Surgery* 1987; 102(1):79-87
56. Link KH, Staib L, Schatz M, Suhr P, Rottinger E, Beger HG: Adjuvant radiochemotherapy--what is the patients benefit? *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(6):416-26
57. Pietra N, Sarli L, Costi R, Ouchemi C, Grattarola M, Peracchia A: Role of follow-up in management of local recurrences of colorectal cancer: a prospective, randomized study. *Dis Colon Rectum* 1998; 41(9):1127-33
58. Rougier P, Neoptolemos JP: The need for a multidisciplinary approach in the treatment of advanced colorectal cancer: a critical review from a medical oncologist and surgeon. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23(5):385-96
59. Fong Y, Salo J: Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *Semin Oncol* 1999; 26(5):514-23
60. Scheele J, Altendorf-Hofmann A: Resection of colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(4):313-27
61. Vogl TJ, Muller PK, Mack MG, Straub R, Engelmann K, Neuhaus P: Liver metastases: interventional therapeutic techniques and results, state of the art. *Eur Radiol* 1999; 9(4):675-84
62. Kobayashi K, Kawamura M, Ishihara T: Surgical treatment for both pulmonary and hepatic metastases from colorectal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118(6):1090-6
63. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT: A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61(2):386-95
64. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53

65. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS: Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003; 21(2):241-50
66. Yamamura T, Matsuzaki H, Suda T, Ozasa T, Tsukikawa S, Yamaguchi S: Clinicopathological variables and p53 overexpression as a combined prognosticator for hematogenic recurrence in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1999; 70(1):1-5
67. Diez M, Pollan M, Muguerza JM, Gaspar MJ, Duce AM, Alvarez MJ, Ratia T, Hernandez P, Ruiz A, Granell J: Time-dependency of the prognostic effect of carcinoembryonic antigen and p53 protein in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88(1):35-41
68. Caldes T, Iniesta P, Vega FJ, de Juan C, Lopez JA, Diaz-Rubio E, Fernandez C, Cerdan J, Balibrea JL, Benito M: Comparative survival analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology* 1998; 55(3):249-57
69. Okubo R, Masuda H, Nemoto N: p53 mutation found to be a significant prognostic indicator in distal colorectal cancer. *Oncol Rep* 2001; 8(3):509-14
70. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY: APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg* 2005; 71(4):336-43
71. Soussi T: p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000; 60(7):1777-88
72. Zalzman G, Tredaniel J, Schlichtholz B, Urban T, Milleron B, Lubin R, Meignin V, Couderc LJ, Hirsch A, Soussi T: Prognostic significance of serum p53 antibodies in patients with limited-stage small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; 89(1):81-6
73. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G: Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106(1):42-8
74. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR: Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(16):1196-206
75. Shim KS, Kim KH, Park BW, Lee SY, Choi JH, Han WS, Park EB: Increased serum levels of mutant p53 proteins in patients with colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 1998; 13(1):44-8
76. Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT, del Barco V, Cerdan J, Fernandez C, Balibrea JL: Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br J Cancer* 1999; 81(1):122-6
77. Goldstein MJ, Mitchell EP: Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23(4):338-51
78. Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, Zanghieri G, Melotti G, Gatta G: Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. A population-based study. *Cancer* 1992; 69(3):626-35

79. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, Oettgen HF: Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978; 299(9):448-51
80. Goslin R, Steele G, Jr., Macintyre J, Mayer R, Sugarbaker P, Cleghorn K, Wilson R, Zamcheck N: The use of preoperative plasma CEA levels for the Stratification of patients after curative resection of colorectal cancers. *Ann Surg* 1980; 192(6):747-51
81. Staab HJ, Anderer FA, Brummendorf T, Stumpf E, Fischer R: Prognostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging. I. Colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1981; 44(5):652-62
82. Steele G, Jr., Ellenberg S, Ramming K, O'Connell M, Moertel C, Lessner H, Bruckner H, Horton J, Schein P, Zamcheck N, Novak J, Holyoke ED: CEA monitoring among patients in multi-institutional adjuvant G.I. therapy protocols. *Ann Surg* 1982; 196(2):162-9
83. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, Henry RS, Lerner H, Legault-Poisson S, Deckers PJ, Dimitrov N, Gordon PH, Jochimsen P, et al.: The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials. *Ann Surg* 1984; 199(4):375-82
84. Lewi H, Blumgart LH, Carter DC, Gillis CR, Hole D, Ratcliffe JG, Wood CB, McArdle CS: Pre-operative carcino-embryonic antigen and survival in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 1984; 71(3):206-8
85. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS: The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58(3):603-10
86. Chu DZ, Erickson CA, Russell MP, Thompson C, Lang NP, Broadwater RJ, Westbrook KC: Prognostic significance of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Serum levels before and after resection and before recurrence. *Arch Surg* 1991; 126(3):314-6
87. Lindmark G, Bergstrom R, Pahlman L, Glimelius B: The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995; 71(5):1090-4
88. Carpelan-Holmstrom M, Haglund C, Lundin J, Jarvinen H, Roberts P: Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A(7):1156-61
89. Carriquiry LA, Pineyro A: Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1999; 42(7):921-9
90. Forones NM, Tanaka M: CEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(26):905-8
91. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Lamerz R: Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(6D):5195-8
92. Behbehani AI, Al-Sayer H, Farghaly M, Kanawati N, Mathew A, al-Bader A, Van Dalen A: Prognostic significance of CEA and CA 19-9 in colorectal cancer in Kuwait. *Int J Biol Markers* 2000; 15(1):51-5

93. Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM: Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30(1):12-6
94. Allende T, Garcia Muniz JL, Vizoso F, Del Casar JM, Raigoso P, Llana B, Serra C, Zeidan N, Garcia-Moran M, Roiz C: [Preoperative serum levels of the carcinoembryonic antigen (CEA) and prognosis in colorectal cancer]. *Rev Esp Med Nucl* 2001; 20(5):358-64
95. Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM: CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(43):160-4
96. Young Tabusso F, Payet Meza E, Celis Zapata J, Ruiz Figueroa E, Berrospi Espinoza F: [Value of the preoperative carcinoembryonic antigen as an independent prognostic factor in cancer of the colon and rectum]. *Rev Gastroenterol Peru* 2002; 22(3):213-20
97. Turoldo A, Balani A, Scaramucci M, Babic F, Guidolin D, Liguori G: [Prognostic importance of preoperative CEA in patients with colorectal cancer]. *Chir Ital* 2002; 54(4):469-76
98. Goh HS, Yao J, Smith DR: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55(22):5217-21
99. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992; 70(12):2778-84

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz: Der Verlust der funktionellen Integrität des p53-Gens führt im Adenom zur Entwicklung eines Karzinoms.....	5
Abb. 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC (überarbeitete Version von 2003)	7
Abb. 3: Verteilung des Geschlechts bei kolorektalem Karzinom: mit 58% waren mehr Männer als Frauen (42%) betroffen.....	27
Abb. 4: Altersverteilung der Patienten bei Primärdiagnose des KRK: deutliche Zunahme des KRK in der Altersgruppe von 60-80 Jahren	28
Abb. 5: Tumorlokalisierung des KRK: mit 51% dominierte das Kolonkarzinom über dem Rektumkarzinom (43%), für 6% keine eindeutige Zuordnung	29
Abb. 6: UICC-Stadien bei Primärdiagnose des KRK: UICC I: 38%; UICC II: 33%; UICC III: 29%	30
Abb. 7: Grading bei Primärdiagnose des KRK: häufigstes Vorkommen der G2 differenzierten Tumoren mit 82%, gefolgt von G3 (13%), G1 (4%), G4 (1%)	31
Abb. 8: hochsignifikanter Einfluss des UICC-Stadiums auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten in UICC I bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als Patienten in UICC III	34
Abb. 9: hochsignifikanter Einfluss des T-Status auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten mit T1 bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als Patienten mit T4	35
Abb. 10: hochsignifikanter Einfluss des N-Status auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); $p < 0,0001$ (**). Patienten ohne/mit weniger Lymphknotenbefall bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als diejenigen mit/mit mehr Lymphknotenbefall	36

Abb. 11: hochsignifikanter Einfluss von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,0003 (**) Patienten mit CEA Werten <5 ng/ml bei Primärdiagnose haben eine bessere Überlebenschance als diejenigen mit Werten ≥5 ng/ml.....	37
Abb. 12: kein signifikanter Einfluss von UICC I in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,1043.....	39
Abb. 13: kein signifikanter Einfluss von UICC II in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,3273.....	39
Abb. 14: hochsignifikanter Einfluss von UICC III in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,0044 (**)	40
Abb. 15: signifikanter Einfluss von UICC III A in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,0410 (*).....	41
Abb. 16: kein signifikanter Einfluss von UICC III B in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kalplan-Meier); p=0,5102	42
Abb. 17: kein signifikanter Einfluss von UICC III C in Abhängigkeit von CEA auf tumorbedingtes Überleben (Kaplan-Meier); p=0,3674.....	42
Abb. 18: Einfluss der Tumorlokalisation auf rezidivfreie Zeit (Kalplan-Meier); p=0,0210 (*). Tumoren des Kolons haben eine niedrigere Rezidvrate als die des Rektums.....	43
Abb. 19: Immunhistologische Analyse der Tumormarker. Tumoren der Patienten in Stadium III zeigten eine signifikant stärkere Proteinexpression als die in UICC I und II (p<0,05). Beurteilung positiver Tumorzellen bei 100-facher und 400-facher Vergrößerung.....	45

DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Ana Maria Waaga-Gasser, der Leiterin der Abteilung für Molekulare Onkologie und Immunologie, danke ich für die Überlassung des Themas, die sehr gute Anleitung zur selbständigen wissenschaftlichen Arbeit sowie die exzellente Betreuung in der Phase des Schreibens der Doktorarbeit.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Martin Gasser, Chirurg an der Chirurgischen Klinik I des Zentrums für Operative Medizin, danke ich für die ebenfalls hervorragende Betreuung und die stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Sabine Müller, Frau Andrea Trumpfheller und Frau Mariola Dragan möchte ich für die gute Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente herzlich danken.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich den Mitdoktoranden Martin Grimm.

Herrn Dr. Uwe Mäder gilt auch mein Dank für die hervorragende statistische Beratung und Unterstützung.

Frau Helene Greb möchte ich herzlich danken für die Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Datenbank.

Schließlich möchte ich mich bei Frau Ulrike Faber, der Sekretärin der Abteilung für Molekulare Onkologie und Immunologie bedanken.

LEBENS LAUF

Name: Christiane Gerstlauer
Geboren am: 06.04.1978
Geboren in: Weingarten (88250, Württ.)
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. Hans Gerstlauer, Dipl. Agr. Ingenieur, Bürgermeister
Brigitte Gerstlauer, Grund- und Hauptschul-Lehrerin

SCHULBILDUNG

1984-1988: Grundschule Blitzenreute
1988-1998: Gymnasium St. Johann Blönried
1995-1996: Auslandsschuljahr Monte Vista High School,
Danville, Kalifornien, USA
Abschlüsse: US-High School Abschluss
Allgemeine Hochschulreife

FREIWILLIGES SOZIALES JAHR

1998-1999: Pflegedienst im Kreiskrankenhaus Kirchheim (Teck)

STUDIUM

Nov. 1999 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Beginn des Studiums der Humanmedizin
Sept. 2001 Ärztliche Vorprüfung
März 2003 1. Staatsexamen
März 2005 2. Staatsexamen
Mai 2006 3. Staatsexamen

PRAKTISCHES JAHR

April-Juli 2005 1.Tertial: Chirurgie (Kinderchirurgie, chirurgische
Intensivstation, Allgemein- und Viszeralchirurgie),
Universität Würzburg
Aug.-Nov. 2005 2.Tertial: Pädiatrie, Childrens Hospital, Harvard Medical
School, Boston, USA
Dez. 2005-Febr. 2006 3.Tertial: Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik,
Würzburg

PROMOTION

Jan. 2004-Juni 2006 Prof. Dr. A. M. Waaga-Gasser, Molekulare Onkologie und
Immunologie, Universität Würzburg
Thema: „Analyse prädiktiver Biomarker für therapeutische
Strategien bei Kolorektalem Karzinom“

PREISE UND AUSZEICHNUNGEN

2005 Otto-Goetze-Preis, Bayerische Chirurgen-Vereinigung
(Co-Preisträgerin)

SONSTIGES

Sprachen:

Englisch fließend,
Latein

Freizeit:

Geige, Gitarre
Tanz (Modern-, Jazz-), Skifahren, Volleyball