



Fakultät für Medizin
Technische Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess)

Prognostischer und prädiktiver Wert der intratumoralen Thymidilat-Synthase Expression beim Kolonkarzinom

Anna Katharina Mur

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dirk Wilhelm
2. Prof. Dr. Hana Algül

Die Dissertation wurde am 17.07.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.07.2019 angenommen.

*Meinen Eltern Birgit und Hans und
meinem Bruder Michael gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
1. Einleitung	7
1.1. Vorsorge.....	7
1.2. Diagnostik.....	9
1.3. Operative Therapie.....	13
1.3.1. Karzinome des Coecums und des Colon ascendens	13
1.3.2. Karzinome der rechten Flexur und des rechten Colon transversum	14
1.3.3. Karzinome des mittleres Colon transversum	14
1.3.4. Karzinome des distalen Colon transversum und der linken Colonflexur	15
1.3.5. Karzinome des mittleres Colon descendens	15
1.3.6. Karzinome des Sigmas und des Rektums.....	15
1.3.7. Lymphadenektomie	16
1.3.8. Komplette mesokolische Exzision (CME)	17
1.3.9. Spezielle Situationen in der chirurgischen Therapie	17
1.4. Palliative Therapie.....	17
1.4.1. Chemotherapie bei palliativen Patienten	18
1.5. Nachsorge.....	18
1.6. Prognostische Marker	19
1.6.1. Survivin	20
1.6.2. L1 (CD171)	20
1.6.3. Verhältnis zwischen Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten	20
1.6.4. Thymidilat-Synthase	20
1.7. Prädiktive Marker	21
1.7.1. RAS-Mutationen	21
1.7.2. Thymidilat-Synthase	21
1.7.3. Mikrosatelliteninstabilität	21
2. Fragestellung der Arbeit	25
3. Patienten und Methoden.....	26
3.1. Methoden.....	26
3.1.1. Auftauen und Splitten der Zellen	26
3.1.2. Isolierung der RNA aus Zelllinien	27
3.1.3. Isolierung der RNA aus Gewebe	28
3.1.4. Quantitative Nukleinsäuren-Bestimmung.....	28
3.1.5. RNA-Agarose Gelelektrophorese.....	29
3.1.6. Reverse Transkriptase zur Gewinnung von cDNA	30
3.1.7. Quantitative Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (q-PCR)	31
3.1.8. Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung von Geweben.....	34
3.1.9. Experimentelle Untersuchungen mit Zelllinien	35
3.1.9.a. 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test	35
3.1.9.b. Klon Assay	37
3.2. Statistische Tests und Begriffe.....	37
3.2.1. Cut-off Wert.....	37
3.2.2. Kaplan-Meier-Schätzer.....	38
3.2.3. Log-rank-Überlebensdatentest.....	38
3.2.4. Hazard und Hazard-Rate	38
3.2.5. Regressionsanalyse nach Cox.....	38
3.2.6. Korrelation und Kausalität	38
3.2.7. Spearman Korrelation	38
3.2.8. Grafikübersicht statistische Tests	39
3.3. Patientennachsorge.....	39

4. Ergebnisse	40
4.1. Klinische-Pathologische Ergebnisse der Datenbank	40
4.2. Molekulare Ergebnisse	53
4.2.1. Beschreibung des klinisch-experimentellen Patientenkollektiv UICC III (n=78).....	53
4.2.2.a. Ergebnisse des klinisch-experimentellen Patientenkollektivs UICC III (n=78).....	56
4.2.2.b. Ergebnisse des klinisch-experimentellen Patientenkollektivs UICC II (n=22)	57
4.2.3. Ergebnisse der Zelllinien	59
4.2.3a. 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test Auswertung.....	59
4.2.3b. Klon Assay Auswertung	61
5. Diskussion	64
5.1. Das kolorektale Karzinom und die aktuellen Empfehlungen für seine multimodale Behandlung	64
5.1.1. Chemotherapie im UICC Stadium III	66
5.1.2. Chemotherapie im UICC Stadium II.....	66
5.1.3. Rationale der Chemotherapie – derzeitige Schemata: FOLOX, FOLFIRI.....	67
5.1.3a. FOLFOX.....	67
5.1.3b. FOLFIRI	68
5.1.4. Antikörper im adjuvanten Setting.....	69
5.2. Selektive Chemotherapie unter Berücksichtigung der Thymidilat-Synthase?	70
5.2.1. Analyse der eigenen molekulargenetischen Ergebnisse am Patientenkollektiv im UICC Stadium III.....	70
5.2.2. Analyse der eigenen molekulargenetischen Ergebnisse am Patientenkollektiv im UICC Stadium II	71
5.2.3. Expression der Thymidilat-Synthase in verschiedenen kolorektalen Zelllinien.....	73
5.2.4. Erfassung der Thymidilat-Synthase Expression für die DLD1-Zelllinie im Klon-Assay und im Zell-Stress Test.....	74
5.3. Prognostische und prädiktive Wertigkeit der Thymidilat-Synthase	75
5.3.1. Korreliert das Ausmaß der Thymidilat-Synthase Expression mit anderen klinischen Parametern?	75
5.3.2. Besitzt die Thymidilat-Synthase Expression einen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit kolorektalen Karzinom?	76
5.3.3. Kann die Expression der Thymidilat-Synthase das Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte adjuvante Chemotherapie vorhersagen?	77
5.4. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur	83
5.4.1. Vergleich des experimentellen Patientenkollektivs mit der Literatur	83
5.4.2. Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der Literatur	83
5.4.3. Mangelnde Vergleichbarkeit zwischen Therapien von heute und früher	84
5.4.4. Ist das Ansprechen des Patienten mit Kolonkarzinom auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie prädizierbar?	85
5.5. Schlussfolgerung und Therapieempfehlung	91
6. Zusammenfassung	93
Materialien	95
Tabellenverzeichnis	100
Abbildungsverzeichnis	102
Literaturverzeichnis	106
Danksagung	120

Verzeichnis der Abkürzungen

5-FdUMP	5-FluordesoxyUridinMonoPhosphat
5-FdUTP	5-FluordesoxyUridinTriPhosphat
5-FU	5-Fluorouracil/5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
APC	Adenomatous Polyposis of the Colon
AQUA	Automated quantitative analysis
ASA	American Society of Anesthesiologists
Bcl-2	B-cell lymphoma protein
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CI	Konfidenzintervall
CME	Komplette Mesokolische Exzision
CRM	Circumferential Resection Margin
CT	Computertomographie
CTx	Chemotherapie
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase
dTMP	Desoxythymidylat
dUMP	Desoxyuridylat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor – Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FIT	Fecal immunochemical test
FOLFIRI	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin
G	Histologisches Grading
GI ₅₀	Growth Inhibition
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
HR	Hazard-Ratio
HRAS	Harvey RAS (Rat Sarcoma)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
INH	National Institutes of Health
JAMA	Journal of the American Medical Association
KRAS	Kirsten RAS (Rat Sarcoma)
L	Lymphgefäßinvasion
LFU	Lost to follow-up
LK	Lymphknoten
M	Metastase
M2-PK	M2-Pyruvatkinase
MLH1	mutL homolog 1
MRT	Magnetresonanztomographie

MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
N	Lymphknoten (Nodus)
n	Anzahl (number)
N ⁵ ,N ¹⁰ -FH ₄	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylentetrahydrofolat
NLR	Neutrophilen/Lymphozyten Ratio
OPRT	Orotate-phosphoribosyl-transferase
q-PCR	Quantitative-Echtzeit-Polymerasen Kettenreaktion
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PET	Positronen-Emissions-tomographie
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
R	Resektionsstatus
RCTx	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x antigen
T	Tumor
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TMA	Tissue Microarray
TS, TYMS	Thymidilat-Synthase
UFT	Uracil + Tegafur
UICC	Union internationale contre le cancer
UPL	Universal Probe Library
V	Veneninvasion (vasular invasion)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WMS	Survival with metastasis

1. Einleitung

Das Kolonkarzinom zählt zu den häufigsten Tumorentitäten auf der Welt, es belegt derzeit Rang zwei in Zusammenschau der Geschlechter. Davor liegt bei Frauen das Mammakarzinom und bei Männern das Prostatakarzinom. Im Schnitt werden laut Robert Koch Institut pro Jahr mehr als 60 000 Neuerkrankungen in Deutschland diagnostiziert (Kaatsch et al, 2015). Dabei liegt das durchschnittliche Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken bei 4 bis 6%, daran zu versterben bei 2,5-3% (Jehle et al, 2003). Das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung beträgt zwischen 60 und 70 Lebensjahren. Das Kolonkarzinom gewinnt zunehmend an Bedeutung und dementsprechend ist mit klinischen und globalen Konsequenzen zu rechnen. Trotz Einführung der Koloskopie zur Früherkennung mit signifikanten Erfolgen, sind die Zahlen der Neuerkrankungen an kolorektalen Karzinomen immer noch zu hoch. Daher sind weitere Maßnahmen von Bedeutung, welche die Mortalität senken.

1.1. Vorsorge

Anhand der oben geschilderten zunehmenden Inzidenz des Kolonkarzinoms in unserer Gesellschaft stellt sich die Frage nach einer effizienten, flächendeckenden Vorsorge. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren ist das Kolonkarzinom hier klar im Vorteil, denn es gibt eine effektive Vorsorge in Form der Darmspiegelung. Um ein Kolonkarzinom rechtzeitig zu erkennen muss allerdings das Früherkennungsprogramm, welches auch von der gesetzlichen Krankenkasse finanziert wird, in Anspruch genommen werden. Dieses Programm beginnt mit dem 50. Lebensjahr, dabei wird einmal jährlich ein Papierstreifentest z.B. HämoCult® durchgeführt. Ab dem 55. Lebensjahr übernimmt die Krankenkasse die Kosten der Koloskopie. Allerdings ist es Gegenstand aktueller Diskussion die Vorsorge bereits ab dem 50. Lebensjahr durch die Krankenkasse zu finanzieren, sodass sich die Empfehlungen in den nächsten Jahren ändern könnten. Eine Ausnahme von dieser Regelung bilden Patienten bei denen ein erhöhtes Risiko vorliegt, beispielsweise aufgrund einer positiven Familienanamnese, hier wird die Koloskopie bereits früher empfohlen. Falls die durchgeführte Koloskopie keine Auffälligkeiten zeigt, so kann bis zur nächsten Untersuchung 10 Jahre gewartet werden (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2009). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die von der gesetzlichen Krankenkasse zur Vorsorge vom kolorektalen Karzinom bezahlten Untersuchungen unter Aufführung der Vor- und Nachteile.

Tabelle 1: Übersicht der Vorsorgeleistungen durch die gesetzliche Krankenkasse

Alter	Art	Turnus	Vorteil	Nachteil
50-54	Papierstreifentest	jährlich	Einfach, unkompliziert	Niedrige Sensitivität, geringe Spezifität Frühe Befunde und Vorläuferläsionen werden nicht erkannt

Ab 55	Papiersteifentest nur, falls das Angebot zur Koloskopie nicht in Anspruch genommen wird	2-jährlich	Einfach, unkompliziert	Siehe oben Positive Ergebnisse müssen durch eine Koloskopie abgeklärt werden
Ab 55	Koloskopie	Sofern kein pathologischer Befund alle 10 Jahre	Hohe Sensitivität und Spezifität, definitive und endgültige Klärung, Entfernen der Vorläuferläsionen des kolorektalen Karzinoms	Aufwendige und unangenehme Untersuchung, Gefahr für Komplikationen

Falls sich jemand nicht bereit erklärt an diesem Screening teilzunehmen, so besteht alternativ die Möglichkeit, falls dennoch eine Untersuchung gewünscht ist, zweimal jährlich den Hämoccult® Test durchzuführen.

Jeder Patient mit Beschwerden (perianale Blutung, Änderung der Stuhlgewohnheiten, sonstige Symptomatik) sollte sich frühzeitig vorstellen und gegebenenfalls früher beziehungsweise auch vor Ablauf der 10 Jahre eine Koloskopie durchführen lassen.

Das größte Problem der Früherkennung des Kolonkarzinoms ist somit nicht die Diagnostik, sondern die Bevölkerung dazu zu bringen die Screeningprogramme in Anspruch zu nehmen. Im Zeitraum von 2003 bis 2014 lag die geschätzte Teilnehmerrate an der Vorsorge-Koloskopie der anspruchsberechtigten Altersgruppen bei 23,8% bei den Frauen und 21,3% bei den Männern (Altenhofen Lutz, 2016).

Eine obere Grenze bezüglich des Alters kann jedoch nicht gesetzt werden, da dies von vielen begleitenden Faktoren wie etwa die Lebenserwartung und Begleiterkrankungen abhängt (Pox et al, 2014).

Nun stellt sich natürlich die berechtigte Frage ob die Vorsorge auch ihren Nutzen in Studien zeigen kann. „In großen Kohorten u.a. aus Deutschland konnte gezeigt werden, dass durch die Koloskopie eine hohe Anzahl an Karzinomen im frühen Stadium sowie Adenomen im gesamten Dickdarm entdeckt werden kann“ (Pox et al, 2014).

Da sich bis zu 50% aller kolorektalen Karzinome proximal des Colon descendens befinden wäre hier eine Diagnose nur im Falle eines Rektumkarzinoms mittels Sigmoidoskopie möglich, nicht jedoch im Falle eines Kolonkarzinoms. Es ist nämlich in Diskussion ob eine Sigmoidoskopie als Vorsorge ausreichen kann. Dazu erschien im Jahre 2014 eine Publikation im Magazin JAMA (Journal of the American Medical Association), in der mittels flexibler Sigmoidoskopie mit und ohne Hämoccult® eine signifikante Inzidenz- und Mortalitätsreduktion für kolorektale Karzinome gezeigt werden konnte (Holme et al, 2014). Beide Verfahren können Adenome frühzeitig entdecken und abtragen und somit die Entstehung von Karzinomen verhindern. Derzeit zeigt eine Studie des deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), dass als Effekt der Vorsorge in Deutschland eine deutlich positive Bilanz gezogen werden kann. Dabei liegt die Number needed to screen bei 19 Personen. Dies bedeutet, dass 19 Personen an der Vorsorge teilnehmen müssen, damit ein unerwünschtes Ereignis in diesem Fall das kolorektale Karzinom verhindert werden kann. Bei 2,82 Millionen durchgeführten Vorsorgekoloskopien im Alter von 55 bis 84 Jahren, wurden insgesamt 98 734 Kolonkarzinom Vorstufen und 47 168 asymptomatische Kolonkarzinome entdeckt (Brenner et al, 2014).

Die Gründe weshalb Patienten nur zurückhaltend an der Vorsorge Koloskopie teilnehmen sind vielfältig. In der Studie unter D. van Dam war der Hauptgrund der fehlenden Teilnahme die Abwesenheit von abdominalen Beschwerden. Außerdem

spielen die Angst vor Komplikationen wie Darmperforationen, Infektionen oder allergische Reaktionen eine große Rolle (van Dam et al, 2013). Außerdem berichten viele Patienten, dass sie die abführenden Maßnahmen zur Vorbereitung auf die Untersuchung als sehr störend empfinden.

„Die Komplikationsrate der Untersuchung in Deutschland war in einer Studie auf freiwilliger Basis sehr gering“ (Sieg et al, 2001). Eine Studie aus dem Jahr 2010 mit 21 375 Patienten konnte folgenden Komplikationen aufzeigen: Gastrointestinale Blutungen 1,59 /1000 Untersuchungen, Perforationsrate 0,19/1000 Untersuchungen, Divertikulitisrate (bei bereits vorhandenen Divertikeln durch Reizung des Gewebes) 0,23/1000 Untersuchungen und Postpolypektomie Syndrom (eine Irritation der Serosa durch eine transmurale Verbrennung des Gewebes mit konsekutiver Entzündung) Rate 0,09/1000 Untersuchungen. Daraus ergibt sich eine Gesamt-Komplikationsrate von 2 pro 1000 Untersuchungen (Ko et al, 2010).

1.2. Diagnostik

Sehr häufig werden die Patienten wegen blutigen Stühlen, Stuhlunregelmäßigkeiten und unspezifischen Symptome wie Nachtschweiß oder Gewichtsverlust primär vorstellig. Somit stellt die Anamnese einen sehr wichtigen Baustein in der Diagnostik dar, gefolgt von einer genauen körperlichen Untersuchung inklusive digitaler-rektaler Untersuchung. Zusätzlich kann, wenn blutige Stühle nicht schon makroskopisch sichtbar sind, ein Hämocult[®] Test durchgeführt werden. Allerdings sei hierbei erwähnt, dass dessen Sensitivität nicht sehr hoch ist. Allerdings gab es in den letzten Jahren einen starken Zuwachs an immunologischen Stuhltests (FIT). Die Arbeitsgruppe des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) unter Gies et al. verglich neun dieser neuartigen FIT und konnte zeigen, dass alle in der Lage waren Darmerkrankungen und auch Vorstufen des Kolonkarzinoms frühzeitig zu entdecken. Es sei aber zu betonen, dass die jeweils sehr stark variierenden Schwellenwerte der Hersteller bei der Hämoglobinbestimmung unbedingt beachtet werden müssen (Gies et al, 2018). Inzwischen gibt es auch die Möglichkeit einen Tumormarker namens M2-PK (M2-Pyruvatkinase, ein Schlüsselenzym der Polypen- und Tumorentstehung) zu bestimmen, allerdings wird diese Untersuchung nicht routinemäßig eingesetzt und sehr kritisch betrachtet.

Besteht der Verdacht auf ein Kolonkarzinom so ist eine weiterführende Diagnostik unumgänglich. Dabei stellt die oben genannte Koloskopie einen wichtigen Baustein dar, da bei dieser Untersuchung Biopsien entnommen und vom Pathologen bewertet werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass mittels Koloskopie auch die Lage des Tumors oder der Polypen abgeschätzt werden kann. Allerdings sei hierbei erwähnt, dass es unter Umständen zu Fehleinschätzungen kommen kann, beispielsweise weil der Patient/ die Patientin einen längeren Darm als gewöhnlich hat oder weil es technische Probleme gibt.

Sobald sich der Verdacht auf ein Kolonkarzinom ergeben hat, sollten weiterführende Maßnahmen in die Wege geleitet werden, um ein genaues Staging (Einschätzung der Ausbreitung der Erkrankung) des Tumors zu erreichen.

Untersuchung	KolonCa	RektumCa
Komplette Koloskopie	X	X
CEA	X	X
Abdomensonographie	X	X
Rö-Thorax	X	X
Starre Rektoskopie		X
MR (CT)-Becken mit Angabe Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie		X
Rektale Endosonographie bei lokal begrenztem Tumor		X

Abbildung 1: Übersicht der von den S3-Leitlinien empfohlenen Staging Untersuchungen bei Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms. Aufgrund der Tumorausbreitung ergeben sich hierbei Unterschiede zwischen Kolonkarzinom und Rektumkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Wie in Abbildung 1 zu erkennen sind mindestens vier Untersuchungen für ein genaues Staging laut aktuellen S3-Leitlinien nötig (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Dazu zählt die eben genannte komplette Koloskopie, der CEA-Wert, die Abdomen Sonographie und das Röntgen Thorax mit Darstellung in 2 Ebenen. Alternativ zur Sonographie und Röntgenbildgebung kann eine CT Untersuchung von Thorax/Abdomen/Becken erfolgen.

Die Sonographie des Abdomens dient dem Ausschluss von Lebermetastasen und das Röntgen Thorax in zwei Ebenen dem Ausschluss von Lungenfiliae. Der CEA-Wert dient eher der Verlaufskontrolle, da dieser aufgrund der geringen Spezifität als Screening Verfahren weniger geeignet ist.

Bei Verdacht auf weitere Fernmetastasen wird meist primär ein CT der Bauch- und Brusthöhle durchgeführt. Bei begründetem Verdacht auf Skelettmastasen kann zudem eine Knochenszintigrafie durchgeführt werden.

Wie aus der Grafik hervorgeht wird beim Staging des Rektum Karzinoms ein MRT/CT des Beckens, um den zirkumferentiellen Abstand (CRM) und suspekta Lymphknoten zu erfassen, eine starre Rektoskopie zur genauen Höhenbeziehung im Bezug zum Anus und eine rektale Endosonographie, zur Beurteilung des T-Stadiums empfohlen.

Die N-Kategorie kann mit MRT und Endosonographie mit einer deutlich geringeren Sensitivität (70%) und Spezifität (78%) festgestellt werden (Dighe et al, 2010). Das CT ist beim Kolonkarzinom laut Leitlinien nicht zwingend erforderlich, wird aber meist durchgeführt. Einer der neuesten Tumormarker ist derzeit CCSA-2 (colon-cancer-specific-antigen 2). Erste Studien konnten zeigen, dass dieser Marker mit einer Sensitivität von 88,8% und einer Spezifität von 84,2% kolorektale Karzinome im Blut nachweisen kann. Allerdings werden die Ergebnisse noch kritisch angesehen, größere Studien müssen diese ersten Ergebnisse erst noch bestätigen (Walgenbach-Brunagel et al, 2008).

Der Septin 9 – Test ist der erste molekulardiagnostische Test, welcher in Europa zur Früherkennung von Darmkrebs zugelassen wurde. Die Krankenkassen übernehmen jedoch derzeit die Kosten noch nicht (Stand 2018). Der Test beruht darauf, dass das Gen Septin-9 bei Tumoren des Darms ein stärkeres Methylierungsmuster zeigt. Dies wird mittels real- time PCR nachgewiesen. Dabei liegt der Test gemittelt über alle UICC Stadien bei einer Sensitivität von 90% und Spezifität von 88% (Warren et al, 2011). Die PET/CT und PET/MRT besitzen derzeit außerhalb von Studien keinen Stellenwert in der Diagnostik des Kolonkarzinoms. Allerdings kann es bei Verdacht auf Lebermetastasen unter Umständen eine unnötige Laparotomie ersparen und sollte somit im Einzelfall in Betracht gezogen werden. Laut Leitlinien Empfehlungsgrad 0, Level of Evidence 2b (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Das Ziel der gesamten Diagnostik und Pathologie ist es, eine prognostische Klassifikation des Tumors zu erreichen. Somit können Therapieentscheidungen in Abhängigkeit vom Stadium des Tumors getroffen und auch Behandlungsergebnisse verschiedener Kliniken miteinander verglichen werden. Es wird dabei zwischen dem klinischen (cTNM) und dem postoperativen pathologischen (pTNM) TNM Stadium unterschieden.

Diese TNM-Stadieneinteilung wird erstellt von der UICC (Union international contre le cancer) und stets erneuert, derzeit erscheint sie in der 8. Auflage (Wittekind Christian, 2017).

Dabei bezieht sich das T auf den Primärtumor und zeigt dabei die Infiltrationstiefe. Tabelle 2 zeigt die genaue Klassifikation.

Tabelle 2: T-Stadium des kolorektalen Karzinoms (Wittekind Christian, 2017).

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa oder nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

Für die klinische Einschätzung des Lymphknotenstatus werden die körperliche Untersuchung und die durchgeführten Bildgebungen herangezogen. Um den Lymphknotenstatus pathologisch zu bestimmen, werden laut Leitlinien 12 Lymphknoten aus dem Operationsgebiet benötigt. Falls dies nicht gelingt, kann keine sichere Aussage für den Nodalstatus getroffen werden (Nx). Die Beurteilung erfolgt wie in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: N-Stadium des kolorektalen Karzinoms (Wittekind Christian, 2017).

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionäre Lymphknoten
N1a	Metastasen in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 regionäre Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionäre Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 bis 6 regionäre Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionäre Lymphknoten

Bei den in Tabelle 3 beschriebenen Tumorknötchen, beziehungsweise Satellitenherden handelt es sich um makroskopische oder mikroskopische Knötchen, welche Tumorzellen enthalten und sich im Lymphabflussgebiet des Primärtumors befinden, aber keinen Lymphknotenmetastasen entsprechen. Dabei erfolgte die Streuung

diskontinuierlich und ohne Nachweis von weiteren Befunden in regionären Lymphknoten, Gefäßstrukturen oder Perineuralscheiden.
Der letzte Buchstabe steht für Fernmetastasen und wird in Tabelle 4 erläutert.

Tabelle 4: M-Stadium des kolorektalen Karzinoms (Wittekind Christian, 2017).

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nicht regionäre Lymphknoten), ohne Peritonealmetastasen
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

In der folgenden Tabelle 5 wird aufgezeigt, wie aus den TNM-Angaben die Stadieneinteilung nach UICC vorgenommen werden kann. Außerdem gibt es noch die Einteilung nach Dukes allerdings ist diese heute selten im Gebrauch (Dukes Cuthbert Esquire, 1932).

Tabelle 5: Übersicht über die UICC - und Dukes Stadien (Dukes Cuthbert Esquire, 1932; Wittekind Christian, 2017).

UICC- Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	Dukes-Klassifikation
Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium I	T1, T2	N0	M0	Dukes A
Stadium II	T3, T4	N0	M0	Dukes B
Stadium II a	T3	N0	M0	
Stadium II B	T4a	N0	M0	
Stadium II C	T4b	N0	M0	Dukes C
Stadium III A	T1, T2 T1	N1a N2a	M0	
Stadium III B	T1, T2 T2,T3 T3,T4a	N2b N2a N1	M0	
Stadium III C	T3, T4a T4a T4b	N2b N2a N1,N2	M0	Dukes D
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	
Stadium IV A	Jedes T	Jedes N	M1a	
Stadium IV B	Jedes T	Jedes N	M1b	
Stadium IV C	Jedes T	Jedes N	M1c	

Im Stadium III liegen bei jedem Patienten Lymphknotenmetastasen vor, die Anzahl und die Lokalisation der betroffenen Lymphknoten entscheidet somit welcher Buchstabe hinter dem UICC Stadium III steht. Im Falle von IIIA sind bei T1/T2 1 regionärer LK betroffen oder bei T1 4-6 regionäre LK. Bei IIIB bei T1/T2 7 oder mehr, bei T2/T3 4-6 oder bei T2/T4a 1-3 regionäre Lymphknoten betroffen. Bei IIIC sind bei T3/T4a 7 oder mehr, bei T4a 4-6 oder bei T4b 1-3 oder 4 bis mehr regionäre Lymphknoten betroffen.

1.3. Operative Therapie

Tabelle 6 gibt eine Übersicht der möglichen Prozedere in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Kolonkarzinoms.

Tabelle 6: Übersicht der stadiengerechten chirurgischen Therapie

Situation	Procedere
Lokalisiert = auf das Kolon beschränkt	R0-Resektion
Lokal Fortgeschritten= Hinauswachsen über das Kolon	R0 Resektion anstreben, eventuell mit multiviszeraler Resektion
Lebermetastasen	Sofern möglich R0-Resektion des Primärtumors und Einschätzung der Resektabilität der Metastasen, in Abhängigkeit der Gesamtsituation Entscheidung – OP, CTx, liver first approach (= neoadjuvant CTx, dann zunächst Resektion der Lebermetastasen, dann Resektion des Kolonkarzinoms – nur bei synchroner Metastasierung eine Therapieoption)
Peritonealkarzinose	Eventuelle Palliative Kolonresektion ohne Lymphadenektomie, ggf. Anus praeter, ggf. Peritonektomie, ggf. Stoma, ggf. Bypass, ggf. keine OP sondern Chemotherapie + hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion (HIPEC)

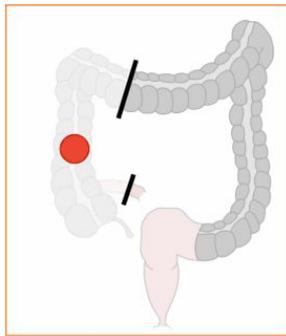
Anhand Tabelle 6 wird deutlich, dass die wichtigste Therapie die radikale operative Entfernung darstellt. Dies gilt unabhängig vom Stadium mit Ausnahme des frühen sogenannten low-risk Karzinoms, welches auch einer lokalen (ggf. endoskopischen) Therapie zugänglich ist. Auch die Komorbiditäten des Patienten stellen einen wichtigen Einflussfaktor dar. Des Weiteren gibt es neben kurativen, auch die eben erwähnten palliativen operativen Zielsetzungen wenn eine Heilung nicht möglich ist.

Allgemein gilt es zu erwähnen, dass die Leitlinien einen minimalen intestinalen Resektionsabstand von 10 cm auf jeder Seite vorgeben, da sich Lymphknotenmetastasen über die perikolischen Lymphgefäße bis zu 10 cm vom makroskopischen Tumorrand entfernt ausbreiten können (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Somit wird das Ausmaß der Resektion vor allem durch das Lymphabflussgebiet und weniger durch die Tumorausbreitung bestimmt. Für den distalen Resektionsrand des Rektumkarzinoms bestehen nochmals andere Vorgehen, hier reichen gegebenenfalls wenige Millimeter aus. Je nach Lokalisation des Tumors unterscheidet man verschiedene Operationsverfahren. Im Folgenden wird auf diese kurz eingegangen:

1.3.1. Karzinome des Coecums und des Colon ascendens

Hierbei wird wie in Abbildung 2 gezeigt, eine Hemikolektomie rechts mit radikaler Lymphadenektomie durchgeführt und anschließend die Darmpassage durch eine Ileotransversostomie rekonstruiert. Sowohl die A. ileocolica, als auch die A. colica dextra müssen hierbei zentral durchtrennt werden. Falls das Omentum majus direkten Kontakt mit dem Tumor hat, so müssen Anteile von diesem mitentfernt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF),

2017; Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 1999).

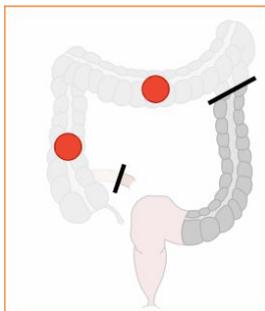


Proximaler Resektionsrand: Terminales Ileum
Distaler Resektionsrand: Proximal der A. colica dextra und ggf.
A. colica. media bei distaler Tumorlage

Abbildung 2: Hemikolektomie rechts- vom terminalen Ileum bis proximal der A. colica dextra, ggf. unter Mitnahme der A. colica media bei distaler Lokalisation des Tumors (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).

1.3.2. Karzinome der rechten Flexur und des rechten Colon transversum

Standardverfahren ist hierbei eine erweiterte Hemikolektomie rechts mit Ileo-deszendostomie, vergleiche dazu Abbildung 3. Dabei werden die A. ileocolica, A. colica dextra und die A.colica media zentral ligiert. Die distale Resektionsgrenze liegt im Bereich des linken Colon transversums. Aufgrund der lymphogenen Metastasierung werden, neben Skelettierung der großen Magenkurvatur, das Omentum majus, die Gastroepiploica-dextra-Arkade und Lymphknoten über dem Pankreaskopf disseziert



Proximaler Resektionsrand: Terminales Ileum
Distaler Resektionsrand: distal der linken Kolonflexur

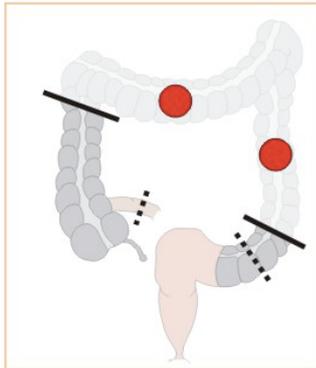
Abbildung 3: Erweiterte Hemikolektomie rechts- vom terminalen Ileum bis distal der linken Kolonflexur (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).

1.3.3. Karzinome des mittleren Colon transversum

Falls sich der Tumor im Colon transversum oder nahe der linken Flexur befindet, so wird eine nochmals erweiterte Hemikolektomie rechts, Transversumresektion, beziehungsweise eine Hemikolektomie links (gegebenenfalls erweitert) durchgeführt. Grund hierfür ist die mögliche lymphogene Metastasierung entlang von Ästen der A. mesenterica superior als auch inferior. Zusätzlich muss eine Omentumresektion und Skelettierung der großen Magenkurvatur mit Entfernung der Lymphknoten durchgeführt werden (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2009; Siewert et al, 2010).

1.3.4. Karzinome des distalen Colon transversum und der linken Colonflexur

Hierbei stellt den Standard, wie Abbildung 4 zeigt, eine erweiterte Hemikolektomie links mit zentraler Ligatur der A. colica media und stammnahen Absetzen der A colica sinistra am Abgang der A. mesenterica inferior inklusiver Entfernung des entsprechenden Lymphstromgebiets dar. Es erfolgt eine Ascendo-Sigmoideostomie zur Herstellung der Kontinuität. Anteile des linken Omentum majus müssen meist unter Dissektion der Arkade mitentfernt werden: (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

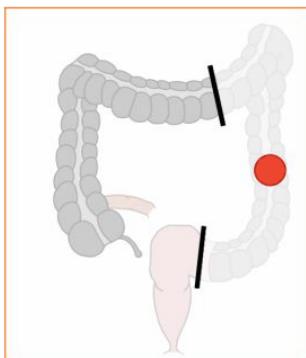


Proximaler Resektionsrand: proximal der rechten Kolonflexur
Distaler Resektionsrand: Übergang Colon descendens zu Sigma

Abbildung 4: Erweiterte Hemikolektomie links- von der proximalen rechten Kolonflexur bis zum Übergang des Colon descendens ins Sigma (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).

1.3.5. Karzinome des Colon descendens

Die Hemikolektomie links mit zentraler Durchtrennung der A. mesenterica inferior (Descendo-Rektostomie) stellt hierbei die Methode der Wahl dar. Dazu Abbildung 5. Entsprechende Omentum majus Anteile müssen mitentfernt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).



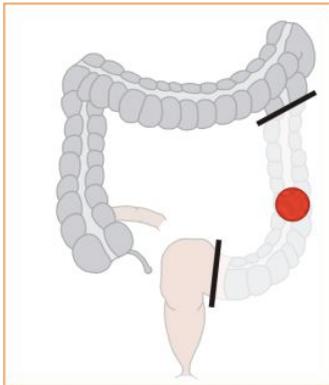
Proximaler Resektionsrand: proximal der linken Kolonflexur
Distaler Resektionsrand: Auf Höhe des Promontoriums

Abbildung 5: Hemikolektomie links- von der linken Kolonflexur bis Höhe des Promontoriums reichend (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).

1.3.6. Karzinome des Sigmas und des Rektums

Bei proximaler und mittlerer Lokalisation im Sigma erfolgt eine Hemikolektomie links mit zentraler Durchtrennung der A. mesenterica inferior. Es wird auf Abbildung 6 verwiesen. Falls distale Anteile betroffen sind, so ist auf die Leitlinien des Rektumkarzinoms zu achten. Sitzt das Karzinom im oberen Drittel, so erfolgt die Durchtrennung des Rektums mit partieller Mesorektumexzision bis 5 cm distal des makroskopischen Tumorrands, gemessen in vivo. Befindet sich das Karzinom im

mittleren oder unteren Drittel des Rektums so sollte eine totale mesorektale Exzision (TME) bis zum Beckenboden erfolgen oder gegebenenfalls eine Rektumsexstirpation nach Miles je nach Lokalisation und Sphinkterbeteiligung (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).



Proximaler Resektionsrand: Im Bereich des Colon descendens
Distaler Resektionsrand: Auf Höhe des Promontoriums

Abbildung 6: Sigmaresektion – vom proximalen Colon descendens bis zur Höhe des Promontoriums (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).

1.3.7. Lymphadenektomie

Die Entfernung der Lymphknoten ist von prognostisch großer Bedeutung. Dabei gilt im Allgemeinen, dass je radikaler die Lymphadenektomie ist, desto besser ist das onkologische Outcome (Rosenberg et al, 2010). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Patienten im UICC Stadium III eine schlechtere Prognose haben, wenn weniger als 12 Lymphknoten untersucht wurden, gesehen am Vergleich mit jenen Patienten im UICC III Stadium, bei denen mehr Lymphknoten reseziert und untersucht wurden (Le Voyer et al, 2003). In Abbildung 7 sind die Ergebnisse dieser Studie dargestellt. Dies konnte auch in späteren Untersuchungen für das UICC II und III bestätigt beziehungsweise aufgezeigt werden (Chang et al, 2007). Deshalb fordern die deutschen Leitlinien die Resektion und pathologische Aufarbeitung von mindestens 12 Lymphknoten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Colon Cancer Survival Is Associated With Increasing Number of Lymph Nodes Analyzed: A Secondary Survey of Intergroup Trial INT-0089

By T.E. Le Voyer, E.R. Sigurdson, A.L. Hanlon, R.J. Mayer, J.S. Macdonald, P.J. Catalano, and D.G. Haller

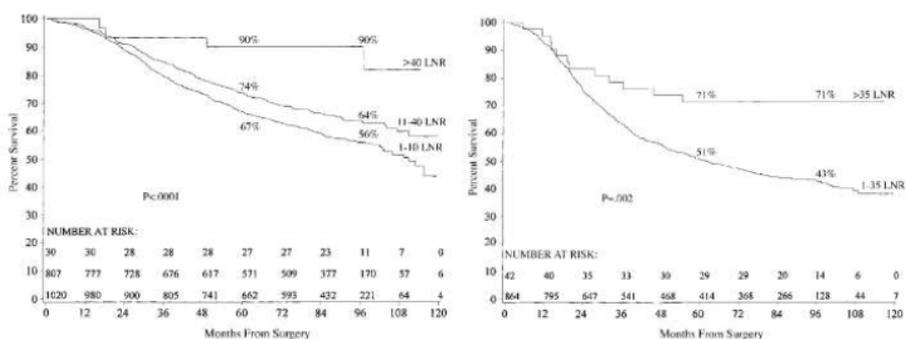


Fig 4. Overall survival for patients with N1 disease. LNR, lymph nodes recovered.

Fig 5. Overall survival for patients with N2 disease. LNR, lymph nodes recovered.

Abbildung 7: Es wurden Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC Stadium III hinsichtlich ihres klinischen Outcomes in Abhängigkeit von den resezierten Lymphknoten verglichen. Im Median wurden dabei 11 Lymphknoten entfernt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Vorteil im Falle einer radikalen Lymphadenektomie. Die Abbildung stammt aus der Studie von Le Voyer et al. (Le Voyer et al, 2003).

1.3.8. Komplette mesokolische Exzision (CME)

Laut Leitlinien soll die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms die komplette mesokolische Exzision beinhalten. Das Mesokolon umfasst dabei als eine Art beidseitige Hülle die Lymphknoten an den versorgenden Arterien.

Dabei erfolgt eine Präparation entlang der embryonalen Schichten zwischen parietaler und mesenterialer Schicht des Mesenteriums. Daraufhin wird eine komplette Exzision der regionalen Lymphabflusswege und Lymphknotenstationen durchgeführt. Somit kann man die CME als analog zu der bereits früher beschriebenen TME beim Rektumkarzinom sehen. Die CME bietet die beste Möglichkeit der Radikalität. Eine exakte Kenntnis über die embryonalen Schichten und Faszienvverhältnisse ist dabei unabdingbar. Durch diese Weiterentwicklung zur CME hin ist die Rate an Lokalrezidiven deutlich gesunken und die 5-Jahres-Überlebensrate gestiegen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017; Hohenberger et al, 2009).

1.3.9. Spezielle Situationen in der chirurgischen Therapie

Falls Fernmetastasen vorliegen, so ist in einem relevanten Prozentsatz, wenn eine komplette Resektion (R0) durchführbar ist, eine lange tumorfreie Zeit oder sogar ein kurativer Ansatz möglich. Sofern das Risiko vertretbar und eine R0 Resektion möglich ist, sollte die Indikation für die entsprechende Operation daher immer gestellt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Chemotherapie die immer anzustreben ist, wenn eine operative Therapie nicht möglich ist und der Allgemeinzustand des Patienten dies ermöglicht.

Dabei spielt die Chemotherapie laut den aktuellen Leitlinien nur bei primärer Irresektabilität oder bei prognostisch ungünstigen Kriterien (beispielweise synchrone Metastasierung) eine Rolle, nicht jedoch im adjuvanten Setting (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Die Patientenbefunde müssen dabei wiederholt im interdisziplinären Tumorboard besprochen werden. Eine Strahlentherapie ist vor allem dann indiziert, wenn Metastasen des Skeletts und des ZNS vorliegen. Dies liegt daran, weil hier das Bestrahlungsfeld besser definierbar ist und zudem befindet sich kein Darm in der Nähe, der davon Schaden nehmen kann. Der Grund für die Bestrahlung liegt entweder in der Intention zu heilen oder aber um Schmerzen (Knochen) oder Symptome (Raumforderung ZNS) zu lindern (Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 1999; Schalhorn et al, 2005).

1.4. Palliative Therapie

Die palliative Situation ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen, es kann eine ausgedehnte Metastasierung, ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten (Inoperabilität) oder auch lokale Irresektabilität vorliegen. Alle möglichen Aspekte müssen dabei im Tumorboard abgeklärt und besprochen werden. Dennoch sollte, da Kolonkarzinome im Verlauf meist stenosierend wachsen, eine möglichst vollständige Resektion des Primärtumors angestrebt werden. Ziel ist die Darmpassage aufrecht zu erhalten, wobei hierbei die Radikalität nicht mehr im Mittelpunkt steht. Neben der Operation besteht die Möglichkeit zur Chemotherapie oder palliativen Stomaanlage bei schlechtem Allgemeinzustand. Dies kann eine Verbesserung des Überlebens, vor allem

aber eine Sicherung der Lebensqualität mit sich bringen (Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 1999; Schalhorn et al, 2005).

1.4.1. Chemotherapie bei palliativen Patienten

Im Falle der palliativen Chemotherapie ist das primäre Ziel entweder eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei guter Lebensqualität und geringer Toxizität oder den Patienten durch Verkleinerung des Tumors operabel zu bekommen, wodurch man jedoch eine hohe Toxizität der Therapie in Kauf nimmt. Besteht hierbei die Indikation für eine intensive palliative Chemotherapie, um eine Tumorverkleinerung zu erreichen, so sollte es sich sofern möglich um eine Kombinationstherapie handeln. Bei palliativen Patienten, welche aufgrund verschiedener Ursachen nicht für eine intensive Chemotherapie geeignet sind, ist folgendes die Empfehlung der deutschen Leitlinien: „Bei Patienten mit multiplen Metastasen ohne Option für Resektion nach Metastasenrückbildung ohne tumorbezogene Symptome oder Organkomplikationen und/oder schwerer Komorbidität kann eine Monotherapie als Erstlinientherapie eingesetzt werden“ (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

1.5. Nachsorge

Für Patienten im UICC Stadium I gilt, dass aufgrund der geringen Rezidivrate (UICC Ia 2,9% und UICC Ib 5,6%) und günstigen Prognose bei R0-Resektion eine Nachsorge nicht notwendig erscheint. Im UICC Stadium II und III soll laut Leitlinien 6 Monate, im Falle einer präoperativ unvollständigen Koloskopie, ansonsten ein Jahr postoperativ eine vollständige Koloskopie durchgeführt werden. Sofern diese unauffällig ist, sollte ein 5-Jahres Rhythmus eingehalten werden, da ein erhöhtes Risiko für metachrone (nacheinander auftretende) Zweitkarzinome besteht (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Untersuchung	Monate										
	3	6	9	12	15	18	21	24	36	48	60
Anamnese, körp.Untersuch., CEA		X		X		X		X	X	X	X
Koloskopie		X*		X**							X**
Abdomensonografie***		X		X		X		X	X	X	X
Sigmoidoskopie (Rektoskopie) ****		X		X		X		X			
Spiralcomputertomografie x	X										
Röntgen Thorax *****				X				X	X	X	X

* wenn keine vollständige Koloskopie präoperativ erfolgt ist
 ** bei unauffälligem Befund (kein Adenom, kein Karzinom) nächste Koloskopie nach 5 Jahren
 *** eine Metaanalyse ergab einen Vorteil für ein bildgebendes Verfahren zum Nachweis von Lebermetastasen in der Nachsorge. Aus diesem Grund entschied sich die Expertenkommission, das einfachste und kostengünstigste Verfahren anzuwenden.
 **** nur beim Rektumkarzinom ohne neoadjuvante oder adjuvante Radiochemotherapie
 ***** nur beim Rektumkarzinom kann jährlich eine Röntgen Thoraxuntersuchung durchgeführt werden.
 x nur beim Rektumkarzinom 3 Monate nach Abschluss der tumorspezifischen Therapie (Operation bzw. adjuvante Strahlen-/Chemotherapie) als Ausgangsbefund.

Abbildung 8: Ab dem UICC II besteht die Indikation zur regelmäßigen Nachsorge. Falls sich bei einem Rezidiv keine therapeutische Konsequenz ergibt, so kann auf eine Nachsorge laut Leitlinien verzichtet werden. Das

Nachsorgeprogramm ist für insgesamt 5 Jahre ausgelegt und umfasst die Anamnese, die körperliche Untersuchung, den CEA-Wert, die Koloskopie und die Abdomensonographie. Die Sigmoidoskopie, die Spiralcomputertomographie und das Röntgen-Thorax sind kein Teil der Nachsorge des Kolonkarzinoms, sondern des Rektumkarzinoms. Diese Nachsorgeempfehlung stammt aus den S3-Leitlinien des kolorektalen Karzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Falls Patienten jedoch ein Kolonkarzinom im UICC Stadium II und III vollständig entfernt bekommen haben, so ist eine regelmäßige Nachsorge indiziert. Laut Leitlinien ist dies aber nur nötig, wenn bei einem Rezidiv therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden können. Der Nachsorgezeitraum beträgt 5 Jahre und die programmierten Untersuchungen umfassen beim Kolonkarzinom die Anamnese, die körperliche Untersuchung, die CEA-Wert Bestimmung, die Koloskopie und die Abdomensonographie. Eine Übersicht über die durchzuführenden Maßnahmen bietet Abbildung 8 (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Falls Patienten im UICC Stadium IV R0 bezüglich ihrer Metastasen reseziert wurden, so sollten sie ebenfalls einer Nachsorge nachgehen. Falls es jedoch zu einem Rezidiv kommt, ohne jegliche therapeutische Konsequenz, so kann auf die Nachsorge verzichtet werden. Alle hier festgehaltenen Angaben beziehen sich auf die S3-Leitlinie kolorektales Karzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

1.6. Prognostische Marker

Es gibt eine Vielzahl an prognostischen Markern für das kolorektale Karzinom. Ein prognostischer Parameter korreliert mit dem krankheitsfreien beziehungsweise dem Gesamtüberleben. Dabei wird an dieser Stelle vor allem auf die molekularen Marker eingegangen, wobei erwähnt werden muss, dass es zusätzlich eine große Anzahl an klinischen und histopathologischen Markern gibt. Dazu zählen das bereits unter 1.4 erwähnte TNM-System, sowie das Grading, welches den Grad der Abweichung des Tumorgewebes vom Normalgewebe angibt. Die Einteilung reicht dabei von G1 (gut differenziert, „low grade“) über G2 (mäßig differenziert) über G3 (schlecht differenziert) bis G4 (undifferenziert, „high“ grade) und G9 (Grad der Differenzierung nicht beurteilbar).

In Tabelle 7 ist eine Auflistung jener Marker, die sich derzeit in der Forschung und teilweise auch in der Klinik am vielversprechendsten in Bezug auf das kolorektale Karzinom und dessen Prognose gezeigt haben (Arlt Franziska, 2008).

Tabelle 7: Die Übersicht ausgewählter Kandidatengene, die sich derzeit in der Evaluierung befinden. (Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert: Bcl-2: B-cell lymphoma protein, CEA: Carcinoembryonic antigen, PCNA : Proliferating cell nuclear antigen sLe^x: Sialyl Lewis^x antigen, TIMP-1: Tissue inhibitor of

Potentielle prognostische molekulare Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms	
Onkogene	K-RAS, c-myc, TGF- β , ErbB2, EGFR, β -Catenin, Bcl-2
Tumorsuppressorgene	P53, APC, DCC, Smad2/4
Proliferationsmarker	PCNA, Ki-67
Adhäsion	E-Cadherin, CD55, sLe ^x
Angiogenese	VEGF
Migration/Invasion	HGF, Met, S100A4
Nukleinsäure-Metabolismus	Thymidin-Phosphorylase, Thymidin-Synthase
Epigenetische Marker	MSI, LOH (5q, 17p, 18q), Hypermethylierung
Serummarker in der Diagnostik	CEA, CA 19-9

metalloproteinase 1) (Arlt Franziska, 2008).

1.6.1. Survivin

Es handelt sich hierbei um ein Apoptose-inhibierendes Protein, welches somit den Zellzyklus und auch die Metastasierung für die Tumorprogression unterstützt. Da es bereits zuvor in zahlreichen Studien zu anderen Tumorentitäten prognostische Eigenschaften aufgewiesen hat, wurde dies auch beim Magen- und Kolonkarzinom weiter untersucht (Li et al, 2014; Huang et al, 2013; He et al, 2015). Survivin stellt einen negativen prognostischen Marker dar, denn je höher die Expression, desto schlechter die Prognose. Dabei untersuchten Werner et al. in einer Metaanalyse 2695 Patienten mit einem Magenkarzinom und 1934 Patienten mit einem Kolonkarzinom. Hierbei zeigten sich sowohl für Kolonkarzinome als auch für Magenkarzinome eindeutige Korrelationen zwischen hoher Survivin-Expression und schlechter Prognose. Außerdem zeigte sich beim Kolonkarzinom, sofern hohe Wert vorlagen, häufiger ein metastasierender Phänotyp (Werner et al, 2015).

1.6.2. L1 (CD 171)

L1 spielt als Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle für migratorische Prozesse und dient ebenso als Schutz vor Apoptose. Eine Vielzahl an Tumoren exprimieren L1 auf ihrer Oberfläche, womit es die Motilität der Tumorzellen erhöht und somit deren Metastasierung begünstigt. In einer Studie an 138 Patienten zwischen Januar 1995 und Dezember 2000 konnte aufgezeigt werden, dass L1 an der Invasion des Kolonrektales Karzinoms beteiligt ist und somit einen negativen prognostischen Marker darstellt. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der L1 Expression und fortgeschrittenen Stadien ($p= 0,001$), Fernmetastasierungen ($p< 0,001$) und Tumor Rezidiven ($p= 0,006$) (Boo et al, 2007).

1.6.3. Verhältnis zwischen Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten

Ein weiterer wichtiger und vor allem einfach zu erhebender prognostischer Marker ist die Neutrophilen/Lymphozyten Ratio (NLR). Eine Ratio über 4 korreliert mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs. Es wurden in einer Studie 141 Patienten im UICC Stadium IIA untersucht. Lag die Ratio >4 , so betrug das 5-Jahres - Gesamtüberleben 63,5% (95% Konfidenzintervall: 51,1- 76,3%) gegenüber jenen Patienten mit einer Ratio ≤ 4 mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 91,4% (95% Konfidenzintervall: 88,6 – 94,2%) (Ding et al, 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine NLR >4 im Stadium IIA in 68,3% der Fälle dem 5-Jahres-Rezidiv freien Intervall des Stadiums IIIB entspricht (O'Connell et al, 2004).

1.6.4. Thymidilat-Synthase

Das Enzym Thymidilat-Synthase könnte sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Parameter sein. Es wird in der Studie von Baukelien van Triest davon ausgegangen, dass die Höhe der Expression der Thymidilat-Synthase mit dem Gesamtüberleben korreliert. Dabei kam es zum Ergebnis, dass je höher die Thymidilat-Synthase exprimiert wird, desto schlechter das Gesamtüberleben der Patienten ist (Van Triest et al, 2000). Auch weitere Studien konnten ein schlechteres Gesamtüberleben bei hoher Expression der Thymidilat-Synthase feststellen (Edler et al, 2002; Allegra et al, 2003; Popat et al M. A., 2004). Konkurrierende Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang

zwischen geringer Expression der Thymidilat-Synthase und schlechteren Gesamtüberleben (Soong et al, 2008). Dies wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausreichend diskutiert.

1.7. Prädiktive Marker

Ein prädiktiver Marker definiert das Ansprechen auf eine Therapie. Derzeit in der Klinik hauptsächlich relevant sind die RAS-Mutationen. Das Ziel ist es, in Zukunft viele prädiktive Marker zu etablieren um eine optimale Therapie zu ermöglichen.

1.7.1. RAS-Mutationen

Die K-RAS Mutation ist bereits sehr lange als negativ prädiktiver Faktor bekannt und bestimmt die Möglichkeit einer Therapie mit EGFR-Inhibitoren. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Mutation im KRAS Gen (NRAS, HRAS) nicht von einer Therapie mit Cetuximab profitierten, wohingegen wild-type Formen sehr wohl von einer Therapie mit dem EGFR-Inhibitor profitierten (Lièvre et al, 2006). Bei Cetuximab handelt es sich um einen hemmenden Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor – Rezeptor (EGFR). Durch die Blockade des Rezeptors, welcher in Tumorzellen häufig überexprimiert ist, wird die Proliferation der malignen Zellen gehemmt. Der Grund für die mangelnde Wirkung von Cetuximab bei KRAS-Mutationen liegt darin, dass der Antikörper zwar den EGF-Rezeptor wirkungsvoll blockiert, allerdings nicht vollständig den downstream liegenden RAS/RAF/MAPK- Signalweg. Dieser Signalweg ist bei der KRAS-Mutation unabhängig vom Rezeptor konstitutiv aktiv und somit auch unbeeinflusst von einer Blockade des EGFR durch Antikörper wie Cetuximab.

Die Bestimmung ob eine Mutation vorliegt oder nicht, spielt vor allem in der metastasierten Situation eine bedeutende Rolle, um so die bestmögliche Therapie festzulegen (Karapetis et al, 2008). Des Weiteren zählen K-RAS Mutation auch als negativ prognostischer Parameter. Aus den QUASAR- Studiendaten geht hervor, dass Patienten im Stadium II mit einer K-RAS Mutation ein signifikant erhöhtes Rezidiv Risiko hatten (Relatives Risiko 2,32 , $p < 0,00001$) (Quasar Collaborative Group, 2007).

Die S3- Leitlinien empfehlen die Bestimmung von RAS-Mutationen möglichst vor Einleitung einer Erstlinientherapie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

1.7.2. Thymidilat-Synthase

Es wird hier auf die Diskussion im Kapitel 5 verweisen.

1.7.3. Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliten sind kurze, einfache repetitive DNA-Sequenzen, die aus zwei bis vier Nukleotiden bestehen (Heinimann Karl, 2000). Sie befinden sich im gesamten Genom verteilt und weisen, bedingt durch eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen, einen sehr großen Längenpolymorphismus auf.

Pearson et al. konnten bereits 2005 zeigen, dass mehr als 40 neurologische, neurodegenerative und neuromuskuläre Erkrankungen mit einer Mikrosatelliteninstabilität verbunden sind (Pearson et al, 2005). Für das kolorektale wie auch für viele weitere Karzinome spielt die Mikrosatelliteninstabilität ebenfalls eine wichtige Rolle.

Die Mikrosatelliteninstabilität stellt einen wichtigen prädiktiven Marker bezogen auf das Ansprechen auf 5-Fluorouracil dar.

Es konnte durch Sargent et. al und Jover et. al gezeigt werden, dass der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität bei kolorektalen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Dies ist vermutlich bedingt durch eine Resistenz der MSI Tumoren gegenüber 5-Fluorouracil (Sargent et al, 2010; Jover et al, 2009).

In einer Studie mit 73 Patienten unter Bendardaf et al. konnte gezeigt werden, dass jene Patienten mit einer geringeren Expression der Thymidilat-Synthase und gleichzeitig vorhandener Mikrosatelliteninstabilität ein kürzeres krankheitsfreien Überleben, aber ein längeres Überleben mit Metastasen (WMS= Zeit vom Nachweis der Metastasen bis zur letzten Nachsorge oder zum Tod des Patienten) aufgewiesen haben, als Patienten mit Mikrosatelliteninstabilität aber hoher Expression der Thymidilat-Synthase. Dies lag vor allem daran, dass Patienten mit geringeren Expressionswerten mehr von der 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie profitierten (Bendardaf et al, 2008).

Des Weiteren ist vor allem das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom) zu nennen. Das HNPCC-Syndrom beruht auf einer autosomal dominant vererbten Keimbahnmutation des DNA-Mismatch Reparatursystems, liegt diese vor, so spricht man auch vom Lynch Syndrom. In der Klinik werden beide Begriffe meist synonym verwendet. Streng genommen betrifft das HNPCC-Syndrom auch auf jene Patienten, die zwar die Amsterdam-I und II oder Bethesda-Richtlinien erfüllen, aber keine oder noch nicht erforschte Keimbahnmutation in den Genen des Mismatch-Reparatursystems aufweisen. Etwa 2-3% aller kolorektalen Karzinome in Deutschland beruhen auf dem Lynch-Syndrom (Lamberti et al, 2006). Mit Hilfe der unter Tabelle 8 angeführten Amsterdam-I und II Kriterien und den weniger strengen Bethesda-Richtlinien können Patienten, die am HNPCC-Syndrom leiden, leichter identifiziert werden (Steinke et al, 2013).

Tabelle 8: Amsterdam I-Kriterien, Bethesda-Richtlinien, Amsterdam II-Kriterien und Revidierte Bethesda-Richtlinien (Steinke et al, 2013).

Amsterdam I-Kriterien

Alle genannten Kriterien müssen erfüllt sein

- Mindestens drei Familienmitglieder mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom, davon einer mit den Beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein
- Wenigstens zwei aufeinander folgende Generationen betroffen
- Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr

Bethesda- Richtlinien

Mindestens eines der genannten Kriterien muss erfüllt sein

- Patienten mit positiver Familienanamnese entsprechend der Amsterdam-Kriterien
- Patienten mit synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder HNPCC-assoziierten Tumor-Erkrankungen (Endometrium, Ovarien, Magen ,Gallengang, Dünndarm, Karzinome des Ureters oder Nierenbeckens)
- Patienten mit kolorektalen Karzinom und erstgradig Verwandten mit kolorektalem Karzinom und/oder HNPCC-assoziiertes Tumorerkrankungen (einer davon diagnostiziert vor dem Alter von 45 Jahren) und/oder kolorektalem Adenom diagnostiziert vor dem Alter von 40 Jahren
- Patienten mit Kolon- oder Endometriumkarzinom diagnostiziert vor dem Alter von 45 Jahren

- Patienten mit rechtsseitigem, histologisch undifferenziertem kolorektalem Karzinom diagnostiziert vor dem Alter von 45 Jahren
- Patienten mit kolorektalem Karzinom vom Siegelring- Zelltyp diagnostiziert vor dem Alter von 45 Jahren
- Patienten mit Adenom diagnostiziert vor dem Alter von 40 Jahren

Amsterdam II-Kriterien

Alle genannten Kriterien müssen zutreffen

- Mindestens drei Familienmitglieder mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom oder einem Karzinom des Endometriums, Dünndarms, Ureters oder Nierenbecken, davon einer mit den Beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein
- Wenigstens zwei aufeinander folgende Generationen betroffen
- Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem Alter von 50 Jahren

Revidierte Bethesda-Richtlinien

Mindestens eines der genannten Kriterien muss erfüllt sein

- Patienten mit kolorektalen Karzinom vor dem 50. Lebensjahr
- Patienten mit synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder anderen HNPP-assoziierten Tumoren (Endometrium, Magen, Ovarien, Pankreas, Urothel, Gallengang, Dünndarm und Gehirn (meist Glioblastome wie bei Turcot-Syndrom) sowie Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome (bei Murie-Torre-Syndrom) unabhängig vom Alter
- Patienten mit kolorektalem Karzinom mit MSI-Histologie (Vorliegen von Tumorinfiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnliche lymphozytäre Reaktion, muzinös/Siegelring-Differenzierung, oder medulläres Wachstumsmuster) vor dem 60. Lebensjahr
- Patient mit kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der einen Verwandten 1. Grades mit einem kolorektalem Karzinom oder HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr hat
- Patient mit kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der mindestens zwei Verwandte 1. oder 2. Grades hat, bei denen kolorektale Karzinome oder ein HNPCC-assoziiertes Tumor (unabhängig vom Alter) diagnostiziert wurde

Das Risiko mit dem Lynch Syndrom an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt für Männer 34- 73 %, für Frauen 32 - 59%. Des Weiteren steigt das Risiko auch für eine Reihe anderer Tumoren. Dazu zählen bei der Frau das Endometrium (39-50%) – und das Ovarialkarzinom (7-8%), bei beiden Geschlechtern die Magen- (1-8%), Nierenbecken/Harnleiter- (2-8%), Gallengangs-(1-4%), Dünndarm-(1-4%), ZNS-(2%) und Pankreas-(4%) Karzinome (Watson et al, 2008; Stoffel et al, 2009; Kastrinos et al, 2009; Bonadona et al, 2011).

Die kolorektalen Karzinome beim Lynch-Syndrom sind häufiger im rechten Hemikolon, als dies bei sporadische Karzinome der Fall ist. Durch die Mutation der Mismatch-Reparaturgene kommt es zusätzlich zur Entstehung von veränderten Proteinen, was wiederum eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen mit sich zieht. Histopathologisch ist dies an einer Lymphozyten Infiltration zu erkennen. Aufgrund dieser Immunreaktion gegen den Tumor lässt sich eine bessere Prognose ableiten.

In 10- 15% aller sporadischen Kolonkarzinome findet sich ebenfalls eine Instabilität der Mikrosatelliten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche

Krebshilfe, AWMF), 2017) In diesem Fall ist die Mikrosatelliteninstabilität meist durch eine Methylierung des MLH1-Promotors im Tumorgewebe bedingt, was dann zur funktionellen Abschaltung des MLH1-Gens führt. Durch diese Mutation ist die Zelle nicht mehr in der Lage Fehler, die während der Replikation der DNA auftreten, zu korrigieren. Es kommt in Folge zur Akkumulation von Einzelnukleotid-Mutationen und Längenänderungen. Sehr häufig finden sich bei sporadischen kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität serratierte Adenome als Vorläufer.

Es wird dabei zwischen high - (MSI-H) und low-frequency (MSI-L) Mikrosatelliteninstabilität unterschieden. Die Zuordnung erfolgt dabei über eine PCR, wobei bei MSI-H zwei oder mehr der vier etablierten Standard-Marker MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 positiv sind, bei MSI-L nur ein Locus der vier genannten positiv ist (Vasen et al, 1999).

Die Untersuchung von Patienten auf Mikrosatelliteninstabilität mittels PCR gilt als bewährte Screening Methode für das oben genannte HNPCC-Syndrom. Insgesamt weisen circa 90% aller HNPCC assoziierten Tumoren eine Instabilität auf. (Müller et al, 2004)

Unter anderem konnte festgestellt werden, dass kolorektale Karzinome mit instabilen Mikrosatelliten stets sehr ähnliche pathologische Eigenschaften haben, dazu zählen expansives Wachstum, fokale Schleimbildung, zahlreiche intratumorale T-Lymphozyten, medullär histologischer Subtyp und peritumorale Entzündungszeichen (Lugli, 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass kolorektale Karzinome mit MSI-H eine signifikant bessere Prognose und niedrigere Fernmetastasierungsrate hatten, verglichen mit mikrosatellitenstabilen und MSI-L Karzinomen (Hemminki et al, 2000; Sinicrope et al, 2006; Popat et al, 2005; Malesci et al, 2007).

Dies ist, wie bereits oben erläutert, vermutlich auf die verstärkte Immunantwort zurückzuführen, die auf die veränderten Oberflächenproteinen beruht.

Allerdings konnten, wie anfangs erwähnt einige Arbeitsgruppen zeigen, dass die Mikrosatelliteninstabilität ein negativer prädiktiver Faktor sein kann. Sofern die Patientin eine Chemotherapie erhielten, wie dies im Falle von Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand empfohlen wird. Dies ist vermutlich auf eine Resistenz der MSI Tumoren gegenüber 5-Fluorouracil zurückzuführen (Sargent et al, 2010; Jover et al, 2009).

Auch wenn die Literatur nicht vollkommen übereinstimmt, so ist die Mikrosatelliteninstabilität heute ein anerkannter positiver prognostischer Parameter des kolorektalen Karzinoms. Ebenso spielt die MSI eine wichtige Rolle als negativ prädiktiver Faktor für das adjuvante Ansprechen auf 5-Fluorouracil. Sargent et. al und Jover et. al konnten zeigen, dass Patienten mit MSI-H nicht von einer adjuvanten Therapie mit 5-Fluorouracil profitierten (Sargent et al, 2010; Jover et al, 2009). Eine mögliche Erklärung für die 5-FU Resistenz bei MSI-H Patienten ist, dass durch die Abwesenheit der DNA-Reparaturgene die Wirkung von 5-FU abgeschwächt wird, indem 5-FU von der DNA entfernt wird (Fischer et al, 2007).

Die aktuellen S3-Leitlinien empfehlen vor Indikationsstellung zur adjuvanten Chemotherapie im Stadium UICC II die Bestimmung des Mikrosatellitenstatus. Falls eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) nachgewiesen wird, sollte keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) empfiehlt die MSI-Diagnostik bereits für alle Patienten mit Kolonkarzinom (The National Comprehensive Cancer Network, 2016).

2. Fragestellung der Arbeit

Die Behandlung mittels Chemotherapie ist beim Kolonkarzinom im Stadium III im adjuvanten Setting und in der metastasierten Situation im Stadium IV heute Standard. Nicht alle Patienten profitieren jedoch im gleichen Maße von einer Chemotherapie. Ein möglicher Einflussfaktor könnte das Ausmaß der Expression der Thymidilat-Synthase (TS) sein, ihre Bedeutung beim Kolonkarzinom ist derzeit aber noch unklar.

Eine Vielzahl an Studien hat den Zusammenhang zwischen Aktivität beziehungsweise Expressionslevel von intratumoral gemessener Thymidilat-Synthase und dem Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie untersucht. Hierbei wurden widersprüchliche Ergebnisse berichtet. Während einige Studien ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie mit verbesserten Gesamtüberleben bei niedrigen TYMS Spiegeln berichten (Leichman et al, 1997; Salonga et al, 2000; Iacopetta et al, 2001), gibt es auch andere Berichte über einen fehlenden oder sogar negativen Einfluss bei geringen Expressionswerten (Edler et al, 2002; Kornmann et al, 2003; Jensen et al, 2012). Zudem fehlt in nahezu allen Studien eine Kontrollgruppe, die keine Therapie erhielt (Jensen et al, 2012).

In dieser retrospektiven Analyse soll daher untersucht werden, welchen Einfluss die Expressionshöhe der intratumoralen Thymidilat-Synthase auf die Therapie mit 5-Fluorouracil basierter adjuvanter Chemotherapie hat. Es soll hierbei nach Hoch- und Niedrigexpression unterteilt werden. Zudem sollte untersucht werden, ob die Expression der Thymidilat-Synthase unabhängig von einer etwaigen Chemotherapie eine prognostische Bedeutung besitzt.

Hierzu soll ein Patientenkollektiv mit Kolonkarzinom im UICC Stadium III, welches im Zeitraum von 1992 bis 2010 operiert wurde statistisch analysiert und die Expression der Thymidilat-Synthase quantifiziert werden. Die Fragestellung soll durch folgende Vergleiche beantwortet werden:

- a. Der Einfluss der Thymidilat-Synthase Expression auf klinische und pathologische Parameter
- b. Der Einfluss der Thymidilat-Synthase Expression auf das Überleben
- c. Die Wirkung von 5-Fluorouracil in der adjuvanten Chemotherapie des Kolonkarzinoms im UICC III in Abhängigkeit von der Thymidilat-Synthase Expression.

Alle klinischen Patientendaten inklusive postoperativer Chemotherapie und Tumornachsorge wurden hierbei prospektiv erfasst, die Bestimmung der Thymidilat-Synthase Expression erfolgt mittels rtPCR an aufgereinigter genomischer DNA von kryokonservierten Proben der eigenen Gewebebank (Kolorektale Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer.nat. Janssen, Klinikum rechts der Isar).

3. Patienten und Methoden

3.1. Methoden

3.1.1. Auftauen und Splitten der Zellen

Zur Etablierung der Methode wurden folgende Kolonkarzinom-Zelllinien verwendet: SW480, SW 620, CaCo2, DLD1, HT29, HCT116.

Zunächst wurden die Zelllinien in Kryoröhrchen aus Stickstoff (-197 Grad Celsius) entnommen und in der Hand aufgetaut. Es sollte darauf geachtet werden, dass schnell gearbeitet wird. Die aufgetauten Zellsuspensionen werden mit 10 ml Medium (siehe Tabelle 9) in eine Petrischale (10 cm Durchmesser) versetzt. Um ein regelmäßiges Wachstum zu erreichen, sollte die Platte etwas geschwenkt werden, sodass sich die Zellen verteilen. Nun kommen die Petrischalen in den Inkubator bei 37° Celsius, bei einer Luftfeuchtigkeit von 96-98% und einer CO₂ Konzentration von 5%.

Tabelle 9: Übersicht Zelllinien - Medium

Zelllinie(n)	Zusammensetzung Medium
SW480, SW620, CaCo2,DLD1,HT29	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 7% Fetal Calf Serum (FCS) + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) + 1% Glutamin
HCT116	Gibco 36600 Mc Coy's 5A + Glutamax + 7% FCS + 1% P/S

Um das Wachstum der Zellen zu kontrollieren werden diese jeden Tag unter dem Mikroskop betrachtet. In Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie werden die Zellen wie folgt erklärt gesplittet.

Zunächst wird von den Petrischalen das Medium mit einer Messpipette eingesaugt, dann wird Phosphatgepuffte Salzsäure (PBS) hinzugefügt. Somit werden die Zellkulturen gereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Minuten bei Raumtemperatur wird das PBS abgesaugt. Nun wird 1,5 ml Trypsin hinzugegeben und für circa 2 Minuten bei 37° Celsius, bei einer Luftfeuchtigkeit von 96-98% und 5%iger CO₂ Konzentration inkubiert. Als nächstes werden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, dabei sollte eine deutliche Ablösung der Zellen vom Grund der Petrischalen zu sehen sein. Falls dies nicht der Fall ist, kann etwas gewartet werden, allerdings nichts zu lange, da Trypsin schädlich für die Zellen ist. Ist die Einwirkdauer mit Trypsin richtig begrenzt, so werden nur extrazelluläre Proteine gespalten. Sobald sich die Zellen ausreichend gelöst haben, wird erneut 10 ml Medium hinzugefügt. Als nächstes wird Zellsuspension in ein Falcon überführt und im Anschluss für 4-5 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Dies sollte mit Vorsicht geschehen, damit das Zellpellet nicht mitabgesaugt wird. Es wird erneut 10 ml Medium hinzugefügt. Von dieser Zellsuspension werden 0.5 - 1 ml auf eine neue Petrischale überführt und mit Medium versorgt. Die restlichen 9 - 9,5 ml werden erneut mit 15000 U/min im Falcon zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet wird zusammen mit 1000 µl PBS in ein 1,5 cm großes Reaktionsgefäß gegeben. Dies wird für 5 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird wie zuvor abgesaugt. Das Pellet wird entweder

eingefroren oder sofort weiterverarbeitet, beispielsweise für die Isolierung von RNA aus Zelllinien.

3.1.2. Isolierung der RNA aus Zelllinien

Die Isolierung der RNA aus den Zelllinien erfolgt mittels Protokoll und Kit der Firma Qiagen: RNA PlusMini Kit. Das Protokoll ist in Tabelle 10 dargestellt.

Das zuvor gewonnene Zellpellet wird in 350 µl RLT Puffer und Mercaptoethanol (10 µl auf 1ml RLT) resuspendiert. Dieser Ansatz wird mittels Pipette auf den Quishredder gegeben und für zwei Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert. Das homogenisierte Zelllysat wird dann auf die gDNA Eliminator Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 10 000 rpm (revolutions per minute) zentrifugiert. Im Anschluss wird das Säulchen, welches nun die genomische DNA enthält verworfen und der zurückgebliebene Inhalt wird mit 350 µl 70%igen Ethanol versetzt. Gut gemischt wird der Ansatz auf die RNeasy Säule gegeben.

Tabelle 10: Schritte der RNA-Isolierung

30 Sekunden 10 000 rpm zentrifugiert
+ 700 µl RWI Puffer
30 Sekunden 10 000 rpm zentrifugiert
+ 500 µl RPE Puffer
30 Sekunden 10 000 rpm zentrifugiert
+ 500 µl RPE Puffer
2 Minuten 10 000 rpm zentrifugiert

Nach jeder Zentrifugierung wird der untere Inhalt verworfen.

Nun wird das untere Collection Tube inklusive dessen Inhalt verworfen. Die Säule wird in ein neues Collection Tube gestellt und erneut für 1 Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Collection Tube wird erneut verworfen, wobei die Säule nun in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt wird. Im nächsten Schritt wird 50 µl RNase freies Wasser genau auf die Säule pipettiert.

Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute. Das Reaktionsgefäß wird nun 1 Minute lang bei 10 000 rpm zentrifugiert.

Die gewonnene RNA befindet sich nun im Eppendorf Reaktionsgefäß, sodass die RNeasy Säule jetzt verworfen werden kann. Die im Eppendorf Reaktionsgefäß enthaltene RNA muss sofort auf Eis gekühlt werden. Abbildung 9 zeigt eine graphische Darstellung des soeben beschriebenen Vorgangs.

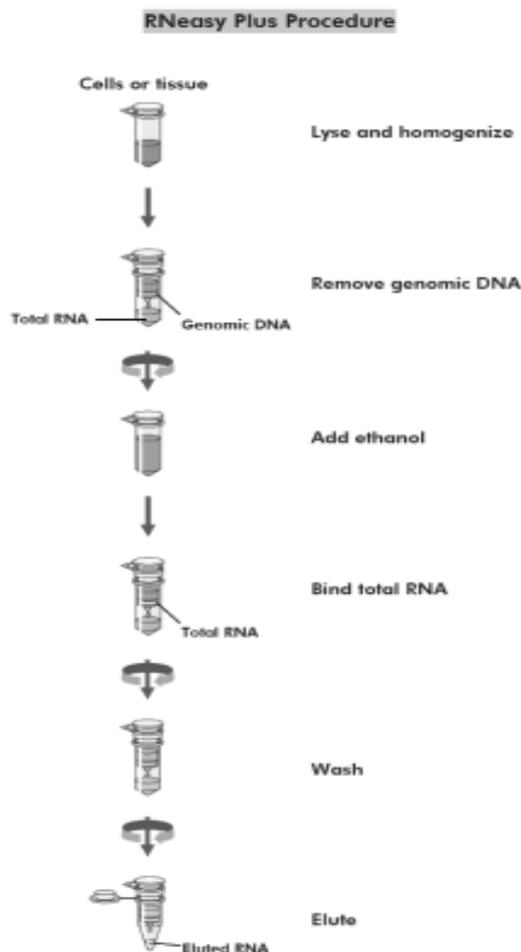


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schritte zur RNA-Isolierung ausgehend von Zellen oder Gewebe. Es wird das zuvor gewonnene Zellpellet mittels 350 µl RLT Puffer und Mercaptoethanol resuspendiert. Dieser Ansatz wird auf den Quiashredder gegeben und zentrifugiert. Es folgt die Elimination der genomischen DNA mittels gDNA Eliminator Säule mit anschließender Zentrifugierung. Nach Zugabe von 70%igen Ethanol wird der Ansatz auf die RNeasy Säule gegeben, gefolgt von mehreren Zentrifugierungen wie in Tabelle 10 ersichtlich ist, und der Zugabe von Rnase freien Wasser. Die gewonnene RNA befindet sich am Ende im 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, die RNeasy Säule muss verworfen werden. Die gewonnene RNA muss sofort auf Eis gekühlt werden. RNeasy Plus Procedure © Quiagen: RNA PlusMini Kit.

3.1.3. Isolierung der RNA aus Gewebe

Die RNA Isolierung aus Geweben erfolgt ebenfalls mittels Protokoll und Kit der Firma Quiagen. Das in -80 Grad gelagerte und geschnittene Gewebe (25 mg) wird in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße auf Eis gesetzt. Nun wird eine Edelstahlkugel und 1 ml Trizol hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße werden in den Tissue Lyser für 1,5 Minuten (30x) gegeben. Es folgt eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend werden 200 µl Phenol-Chloroform (zuvor gut schütteln) zugefügt, gut gemischt und erneut bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Der Ansatz wird für 15 Minuten bei 12 000 rpm bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Vom entstandenen klaren Überstand (obere Phase) werden 400 µl auf die gDNA Eliminator Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nun werden wie bereits bei den Zelllinien 350 µl 70% Ethanol zugefügt, gut gemischt und auf die RNeasy Säule gegeben. Alle darauffolgenden Schritte sind synchron zu jenen bei den Zellen (siehe Kapitel 3.1.2). Die am Ende gewonnene RNA befindet sich nun wie bei den Zelllinien in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

3.1.4. Quantitative Nukleinsäuren-Bestimmung

Die Konzentrationsmessung der zuvor unter 3.1.2 und 3.1.3 isolierten RNA-Proben erfolgt mittels dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (Fa. NanoDrop

Technologies, Wilmington, DE, USA). Die Eichung des Geräts ist vor jeder Messung durchzuführen und erfolgt mit 1 µl RNase freien Wasser. Bevor die RNA-Probe aufgetragen wird, wird das Spektrophotometer mit einem Einmaltuch geputzt. Ist dies erfolgt wird 1 µl der RNA genauestens auf die Messstelle aufgetragen. Anschließend erfolgt die Messung mittels Software der Firma NanoDrop Technologies. Die Konzentration kann nun abgelesen werden. Die Angabe erfolgt in ng/uL, der photospektrometrische Quotient 260nm/280nm gibt die Reinheit der Messung an. Innerhalb 260 bis 280 nm liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren RNA und DNA. Proteine, Phenole und andere verschmutzende Stoffe haben eine starke UV-Absorption bei 280 nm, wodurch bei Verunreinigung der Nukleinsäuren der Quotient sinken würde.

Liegt der Wert um die 2 geht dies mit hoher Reinheit der isolierten RNA einher. Wobei es hier zu beachten gibt, dass die 260/280nm Quotienten der RNA stets höher sind als jene der DNA, weil statt Thymin Uracil enthalten ist und diese eine höhere 260/280 Ratio besitzt. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 10 zu sehen (NanoDrop Technologies, Inc , 2007).

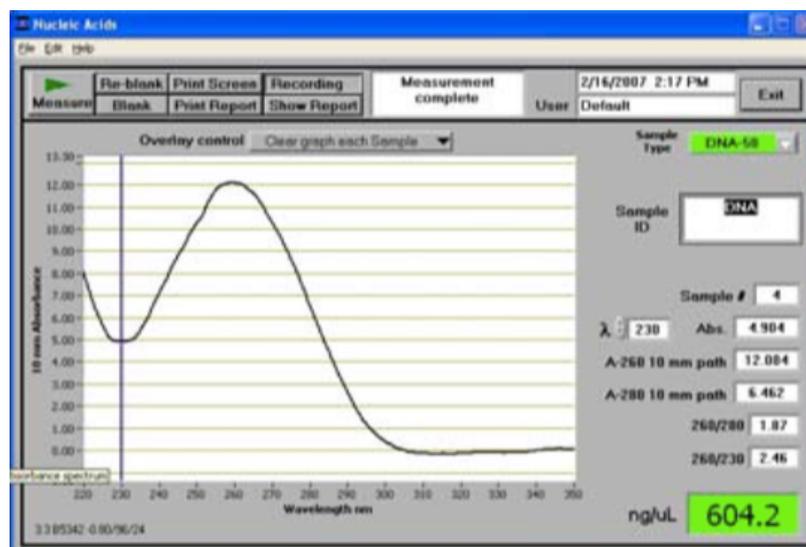


Abbildung 10: Nano-Drop Beispiel RNA Photospektroskopie. Die Konzentrationsangabe der gemessenen RNA erfolgt in ng/uL. Der photospektrometrische Quotient 260nm/280nm gibt die Reinheit der jeweiligen Messung an. Diese Werte sind darauf zurückzuführen, dass zwischen 260 und 280 nm das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren RNA und DNA liegt. Ein Wert um 2 bedeutet eine hohe Reinheit der zuvor isolierten RNA. Eine Verunreinigung durch beispielsweise Phenole oder Proteine würden zu einer Verringerung des Quotienten führen, da sie eine starke UV-Absorption bei 280 nm aufweisen. (NanoDrop Technologies, Inc , 2007)

3.1.5. RNA- Agarose Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wird die gewonnene RNA anhand ihrer Größe getrennt. Zunächst wird 85 ml DEPC H₂O und 1,5 g RNA Agarose zusammen in der Mikrowelle aufgekocht. Dies erfolgt solange, bis die Flüssigkeit klar erscheint. Anschließend werden 10 ml 10xMOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure C₇H₁₅NO₄S; als biochemischer Puffer zur Proteinreinigung) und 5 ml 38% Formaldehyd zugefügt. Die zuvor zusammengebaute und mit H₂O₂ gewaschene Gelkammer wird mit der Flüssigkeit gefüllt, zusätzlich wird ein Kamm eingesetzt und unter dem Abzug für circa 20 Minuten stehen gelassen. In dieser Zeit sollte eine gelartige Konsistenz entstehen. Der zuvor eingeschobene Kamm wird entfernt, somit bleiben Aussparungen zurück, sogenannte Taschen.

Das Gel muss vollständig vom Laufpuffer (1xMOPS) bedeckt sein. Ist dies geschehen, werden je 10 µl RNA mit 10 µl Auftragspuffer (-20 Grad) bei 75 Grad kurz aufgekocht. Anschließend wird 1 µl 1:10 Ethidiumbromid (cave: mutagen) zugefügt. Nun wird der Ansatz in die dafür vorgesehenen Taschen eingefügt und für circa 2 Stunden bei 55 Volt durch die elektrische Spannung je nach RNA Größe und Ladung separiert. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren sind negativ geladen, somit erfolgt die Wanderung bei angelegter elektrischer Spannung in Richtung Pluspol (Anode). Sobald der Farbstoff das Gel durchlaufen hat, zeigen sich beim Vorhandensein reiner und nicht abgebauter RNA zwei gut sichtbare Banden, dabei handelt es sich um die 28s- und 18s-Bande der ribosomalen RNA. Das Gel wird anschließend verworfen. Ein Beispiel einer bereits abgebauten RNA zeigt Abbildung 11.

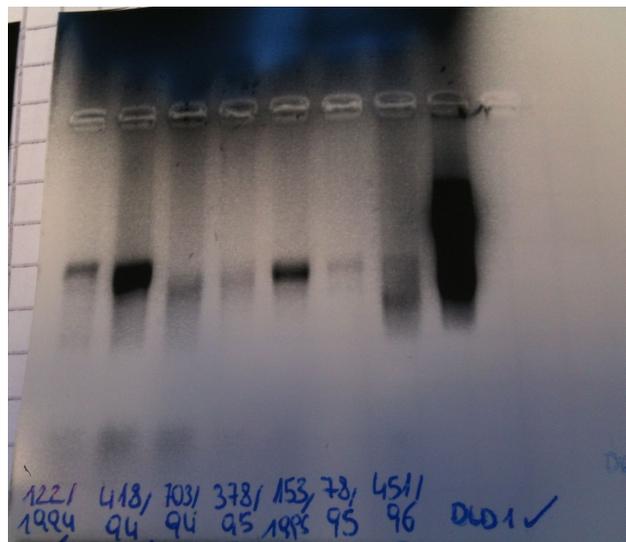


Abbildung 11: RNA-Gelelektrophorese. Im Falle einer reinen und nicht abgebauten RNA wandern die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, da diese negativ geladen sind, bei angelegter elektrischer Spannung in Richtung Pluspol. Es entstehen dabei zwei gut sichtbare 28s- und 18s-Banden. Der zugefügte, potenziell mutagene Farbstoff Ethidiumbromid, macht diese Banden deutlich sichtbar.

Hier zeigt sich eine deutliche Degradation der 28s- und 18s- rRNA Banden im Patientengewebe der eigenen Arbeit. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die RNA bereits abgebaut ist, aufgrund einer zu langen Einfrierzeit im Stickstoff oder an unsachgemäßer Handhabung postoperativ. Die parallelen Kontrollbanden der Zelllinie DLD1 zeigen keinen relevanten Abbau der RNA. Somit kann ein rein technischer Fehler beim Durchführen der RNA-Gelelektrophorese weitgehend ausgeschlossen werden. Dennoch lässt sich retrospektiv die genaue Ursache des RNA-Abbaus nicht mit absoluter Sicherheit eruieren. Bild aufgenommen am 09. März 2015.

3.1.6. Reverse Transkriptase zur Gewinnung von cDNA

Die zuvor isolierte RNA dient als ‚Template‘ in der Polymerasen-Ketten-Reaktion. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Das Enzym schreibt somit die RNA in DNA um. Folgende Primer werden dabei verwendet:

Oligo -dt-Nukleotide: Komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA
 Random Hexamer Oligonukleotide: Zufällig zusammengesetzte Nukleotide.

Zunächst werden die benötigten Konzentrationen von H₂O und der RNA berechnet (V (für 1000ng RNA) = $1000\text{ng}/c(\text{RNA, ng}/\mu\text{l})$) (V (H₂O auf 25 µl) = $25\mu\text{l} - V(\text{RNA})$). Die 0,5 Mikroliter Reaktionsgefäße werden beschriftet und der erste Mastermix wird vorbereitet. Dieser besteht aus je 1 µl Random Primer (1:150) und 1 µl Oligo Primer

(1:20) (Beispiel: 10 Proben, je 10 µl Random Primer und je 10 µl Oligo Primer). Nun wird in je ein Eppendorf Reaktionsgefäß RNA und H₂O zugefügt und der Mastermix 1 mit 2 µl zugefügt. Die Proben werden in den Thermocycler gegeben. Der Thermocycler ist in der Lage Temperaturzyklen der Reversen Transkriptase selbstständig durchzuführen.

Der erste Schritt für die Denaturierung der RNA erfolgt bei 70 Grad für 10 Minuten. Der zweite Mastermix wird nun angesetzt. Dieser besteht aus 5x RT-Puffer, dTNPs (10mM), RNase Inhibitor und Revert Aid RT H-Minus. Dabei gilt es zu beachten, dass der RNase Inhibitor und die Revert Aid RT-H Minus sehr temperaturempfindlich sind und somit sollte diese Bestandteile des Mastermix 2 erst kurz vor Zugabe in den Eppendorf Reaktionsgefäße beigefügt werden. Sobald je 13 µl des Mastermix 2 in jedes Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben worden sind, kann das zweite Programm gestartet werden.

Der Ansatz wird nun zunächst für 10 Minuten bei 20 Grad (Raumtemperatur) inkubiert, die cDNA Synthese erfolgt daraufhin bei 42 Grad für 60 Minuten und für 5 Minuten bei 95 Grad, als erneuter Denaturierungsprozess. Die Gewinnung der cDNA ist somit abgeschlossen. Falls nicht sofort damit weitergearbeitet wird, sollte die cDNA bei -20 Grad Celsius und die restliche RNA sofort bei -80 Grad Celsius aufbewahrt werden.

Das Resultat ist eine komplementäre cDNA – der erste Strang von dieser cDNA ist mit dem ursprünglichen RNA Strang noch hybridisiert. Dieser kann nur mit der RNase H abgebaut werden. Der zweite cDNA Strang wird mittels DNA-abhängiger-DNA Polymerase synthetisiert. Die gewonnene DNA besitzt im Vergleich zur normalen eukaryotischen DNA keine Introns, da die als Matrize dienende RNA das Splicing bereits hinter sich hat. Introns sind nicht-kodierende DNA-Abschnitte, welche die Exons unterbrechen und während der Transkription zu mRNA wieder entfernt werden.

3.1.7. Quantitative Echtzeit-Polymerasen Kettenreaktion (q-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (q-PCR) beruht auf der herkömmlichen Funktion der Polymerasen-Ketten-Reaktion. Diese dient dem Enzym DNA Polymerase der Vervielfältigung der DNA in vitro. Dabei werden die Produkte der vorherigen Reaktion als Ausgangsstoffe für den neuen Zyklus verwendet, daher der Begriff Kettenreaktion. Eine exponentielle Vermehrung der DNA wird somit möglich. Für das Verständnis der q-PCR wird vorerst das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion erklärt.

Das Ziel der Polymerasen-Ketten-Reaktion ist die identische Vervielfältigung, in unserem Fall von cDNA, ausgehend von zwei kurzen einzelsträngigen Startmolekülen. Dabei werden die Primer genau so gewählt, dass sie den gewünschten Bereich auf der DNA zu beiden Seiten hin begrenzen. In jedem Vermehrungsschritt wird somit der zuvor gewählte DNA-Abschnitt zwischen den Primern verdoppelt. Der Prozess besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Er erfolgt die Trennung der Wasserstoffbrücken in den DNA Strängen mittels Erhitzung auf 96 Grad Celsius. Somit liegen zwei Einzelstränge vor.
2. Primerannealing: Die Anlagerung der Primer erfolgt je an das 3' Ende nach Abkühlen auf 70 Grad Celsius. Die richtige Temperatur ist entscheidend, falls diese zu hoch ist bindet der Primer nicht, falls sie zu niedrig ist, bindet der Primer auch an anderen Stellen.

3. Primer-Extension: Nun ergänzt die DNA Polymerase die einzelsträngige DNA wieder zu einem Doppelstrang. Im vorherigen Schritt wurde ein kurzes Stück Doppelstrang hergestellt. Die DNA Polymerase erkennt das freie 3'Ende des Primers und fügt nun solange Nucleotide an, bis der Doppelstrang vollständig ist. Die Temperatur sollte beim Temperaturoptimum der gewählten DNA Polymerase liegen (bei hitzestabilen Polymerasen circa 72 Grad Celsius).

Dieser Zyklus beginnt immer wieder vorne. Somit werden nach dem ersten Zyklus die beiden Doppelstränge wieder zu vier Einzelsträngen aufgetrennt und wie oben erwähnt zu vier Doppelsträngen ergänzt. Das Template wird exponentiell vermehrt bis dieses an Substraten erschöpft ist.

In diesem Fall handelt es sich um die real-time quantitative PCR (qPCR). Diese qPCR hat den Vorteil, dass die Menge an neu gebildeten Produkten über die Zunahme an Fluoreszenz mittels fluoreszenzmarkierten Sonden verfolgt werden kann. Diese Sonden emittieren je nach Menge der produzierten cDNA Licht. Diese Lichtemission wird vom LightCycler® kontinuierlich erfasst. Somit kann vorab eine Aussage darüber getroffen werden, ob die PCR erfolgreich war. Das Reaktionsgefäß muss bei der qPCR nicht geöffnet werden, sodass das Risiko einer Kontamination sinkt. Die eingesetzte DNA korreliert genau mit der Menge des entstanden Produktes, wodurch eine Abschätzung der am Anfang eingesetzten Konzentration des Templates möglich ist. Bei älteren PCR Methoden war dies nicht möglich.

Im Labor erfolgt die qPCR in einem Gerät namens Light Cycler® 480 II. Dieses Gerät ist in der Lage die Fluoreszenz in den Proben kontinuierlich über alle Temperaturzyklen zu erfassen. Der Prozess erfolgt mit hoher Geschwindigkeit, sodass es möglich ist innerhalb kürzester Zeit viele Proben zu analysieren. Der Light Cycler® 480 II der Firma Roche setzt sich zusammen aus folgenden Bestandteilen:

- PCR – Cyler
- Fluorimeter
- Computer mit Monitor und Software

Vereinfacht dargestellt werden die Proben in Plastikcapillaren eingebracht und verschlossen. Dann wird die Platte kurz zentrifugiert und in den Light Cycler® 480 II gegeben. Dabei werden die Proben mit einer Linse bewegt, die Licht mit 450 Nanometer abgibt und daraufhin wird das Licht ermittelt, welches von den Proben emittiert wird. Sobald die ganzen Zyklen abgeschlossen sind, erfolgt die Auswertung mittels Software, ein Beispiel zeigt die Abbildung 12.

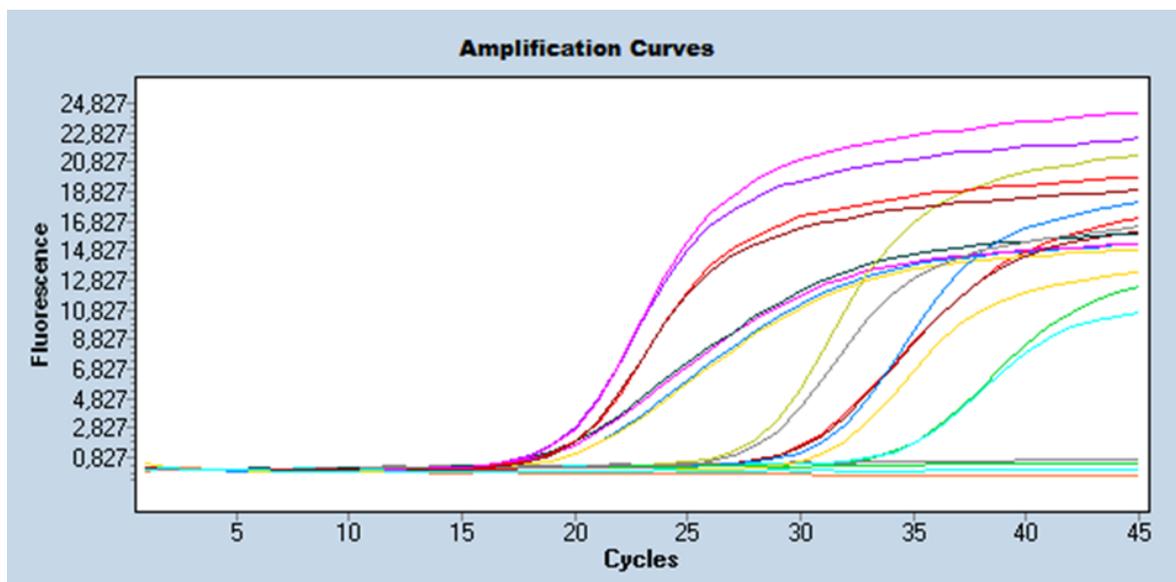


Abbildung 12: Amplifikationskurven der Zelllinien SW480, SW620, CaCo2, DLD1. Die Proben werden hierfür zuvor kurz in der 96-Well Platte zentrifugiert und dann im LightCycler® 480 II mittels Linse bewegt. Das von dieser Linse abgegebene Licht mit 450 Nanometer wird von den Proben mehr oder weniger emittiert. Der Light Cycler® 480 II ist in der Lage die Fluoreszenz in den Proben kontinuierlich über alle Temperaturzyklen zu erfassen. Nach Ablauf aller Zyklen entsteht eine Grafik mit den verschiedenen Amplifikationskurven der Zelllinien. Grafik aufgenommen am 10. März 2015.

Für eine Reaktion im Light Cycler® 480 II wird eine 96-Well Platte verwendet. In diesem hier beschriebenen Fall finden sich für 21 Proben, 1 Probe H₂O und 2 Zelllinien als Referenz Platz. Dabei besteht jede einzelne Probe aus folgenden Bestandteilen: je ein Target + Housekeeping 15 µl Mastermix pro Reaktion + 5µl cDNA (=10 ng/µl) (Doppelbestand). Das Housekeeping Gen wird unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium oder äußeren Einflüssen exprimiert und ist somit in jeder untersuchten Zelle (in den gesunden Zellen des Kolons genauso wie in den Karzinomzellen) ähnlich exprimiert. Es dient somit der Kalibrierung des DNA Gehalts.

Vorab sollte die Anzahl der Proben festgelegt werden, hierfür ein Beispiel: Bei einer Probe benötigt man insgesamt je zwei Ansätze. Es wird somit die Anzahl der Proben stets verdoppelt. Zusätzlich wird noch 10% dazugerechnet, damit es keine Mängel beim ‚Einfüllen‘ gibt. In diesem Beispiel wäre dies bei 2,2. In der Tabelle 11 sind die Komponenten sowie die Dosierungen des Mastermix sichtbar. Pro Reaktion werden wie bereits erwähnt 15 µl Mastermix benötigt.

Tabelle 11: Light Cycler® 480 II - UPL - Mastermix

	Beispiel mit 2 Proben
Je 10 µl Gene Expression MM Abi	20 µl Gene Expression MM Abi
Je 0,2 µl Primer left (20µM)	0,4 µl Primer left (20µM)
Je 0,2 µl Primer right (20µM)	0,4 µl Primer right (20µM)
Je 4,4 µl H ₂ O	Je 8,8 µl H ₂ O
Je 0,2 µl UPL (Universal ProbeLibrary)	Je 0,4 µl UPL

Dabei sind Primer natürlich vom jeweiligen Target abhängig. In diesen Reaktionen wurden folgende Primer und UPLs verwendet:

- Primer:
Thymidilat-Synthase (Metabion Martiensried)
Forward: ATC ATG TGC GCT TGG AAT C

Reverse: TCA CCA CAT AGA ACT GGC AGA
 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Metabion, Martinsried)
 Forward: GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T
 Reverse: AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT G

- UPL:

Thymidilat-Synthase (Metabion, Martinsried)
 Forward: ATC ATG TGC GCT TGG AAT C
 Reverse: TCA CCA ACA TAG AAC TGG CAG A
 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Metabion, Martinsried)
 Forward: GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT
 Reverse: GTG TCA ATT ATA TCT TCC ACA ATC AAG

Dabei gilt zu beachten, dass die UPL sehr lichtempfindlich sind. Daher sollten diese vor Helligkeit geschützt werden und die Proben in Alufolie eingewickelt werden.

Der fertige Mastermix ist durch die UPL ebenfalls lichtempfindlich. Auch hier sollte Alufolie als Schutz vor Licht verwendet werden. Alles muss bei 4° Celsius verarbeitet werden. Sobald der Mastermix fertig zusammengestellt ist kann die 96-Well Platte gefüllt werden.

Sobald alle Wells sorgfältig gefüllt sind wird eine durchsichtige klebende Folie (Micro Amp Optical Adhesive Film) straff über die Platte gezogen. Falls es nötig ist die Platte in einen anderen Raum zu transportieren, sollte diese erneut für den Lichtschutz mit Alufolie bedeckt werden. Die 96-Well Platte wird kurz für circa eine Minute abzentrifugiert und anschließend in den Light Cycler® 480 II eingesetzt. Per Computer wird dann das passende Programm programmiert beziehungsweise gestartet. Tabelle 12 zeigt die genauen Schritte des Programms.

Tabelle 12: Programm LightCycler® 480

Prozess	Temperatur [C°]	Dauer [sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	40
Primer Annealing	60	60	40
Elongation	60	15	40
Storage	40	60	1

Sobald das Programm fertig ist, kann mit der Auswertung mittels LightCycler® 480 Software (für UPL) begonnen werden.

3.1.8. Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung von Geweben

Die auf Objektträger geschnittenen Gewebe (je mit Anfang und Ende, somit zwei Objektträger pro Präparat) werden in Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt. Dieser Schritt erfolgt um den Tumorgehalt, die Richtigkeit des Gewebes und der Zelle zu kontrollieren. Dafür werden folgende Schritte durchgeführt:

1. Die Objektträger werden für eine Minute in 4%iges Formalin eingelegt
2. Es folgt das Abspülen der Objektträger mit ddH₂O
3. Daraufhin werden die Gewebe für 5 Minuten in Hämatoxylin eingelegt
4. Es folgt 5 Minuten lang eine Spülung mit Leitungswasser

5. Gefolgt von der Färbung mit Eosin für circa 1 Minute
6. Nochmaligen Reinigen durch 5-maliges Heben und Senken der Objektträger in ddH₂O
7. Entwässern durch 5-maliges Heben und Senken zuerst in 70%igen Ethanol
8. Sodann entwässern in 96%igen Ethanol (erneut 5 mal Heben und Senken)
9. Abschließendes Entwässern 2-malig in 100%iges Ethanol für 1,5-2 Minuten
10. Daraufhin für insgesamt 3-mal je 3-4 Minuten Xylol einlegen
11. Am Ende werden die Objektträger mit Eukit ein gedeckelt

Die gefärbten Objektträger werden über Nacht getrocknet. Am nächsten Morgen können diese mikroskopiert werden.

3.1.9. Experimentelle Untersuchungen mit Zelllinien

Im weiteren experimentellen Verlauf wurde zusätzlich zu den bereits vorhandenen Patientenproben im UICC Stadium III und II ein alternativer Ansatz mit Zelllinien unternommen, um das Ansprechen auf eine 5-FU basierte Chemotherapie in Abhängigkeit von der Konzentration und Zeitdauer zu testen. Dazu 3.1.9a. und b.

3.1.9a. 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test

Im folgenden Versuch werden zunächst die Zellen der verwendeten Zelllinien mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Dazu werden zunächst 40 µl der Zellsuspension und 40 µl Trypanblau auf eine 96-Well Platte gegeben. Von dieser Suspension werden 10 µl in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Es folgt die Auszählung anhand der vier Großquadrate. Es werden insgesamt 4×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well Platte benötigt.

Zur genaueren Veranschaulichung sei dies an einem Beispiel dargestellt:

Angabe: 20 Zellen in allen vier Quadraten. Gewünschte Zellzahl 4×10^5 pro 6-Well.

1. Um einen Mittelwert zu erhalten wird der Wert 20 durch 4 geteilt; ergibt somit $5 \times 10^4 = 50\,000$ Zellen/ml

2. $50\,000 \times 2 = 100\,000$ Zellen/ml; bedingt durch eine 1:1 Verdünnung zwischen Trypanblau und Zellen.

3. Die gewünschte Zellzahl steht nun im Zähler. 4×10^5 Zellen / 1×10^5 Zellen/ml = 4 ml. Somit muss in jedes der 6 Wells 4 ml pipettiert werden um die gewünschte Zellzahl zu erreichen.

Die Zellsuspension wird auf die 6-Well Platte aufgeteilt, zusätzlich werden je 2ml des passenden Mediums angepasst an die verwendete Zelllinien hinzugefügt. Die 6-Well Platte wird nun in den Brutschrank gestellt. In Abhängigkeit von der Teilungsrate kann der Versuch nach mehreren Stunden oder auch Tagen begonnen werden. Es sollte jedoch auf ausreichend vorhandene Zellen geachtet werden, da das zu einem späteren Zeitpunkt gewonnene Zellpellet ansonsten zu gering ist.

Sobald ausreichend Zellen vorhanden sind, werden diese mit 5-Fluorouracil zu unterschiedlichen Zeiten bebrütet. Die Verdünnung des 5-Fluorouracils (50 mg/ml) erfolgt 1:100. Eine graphische Skizze des Vorgehens zeigt Abbildung 13.

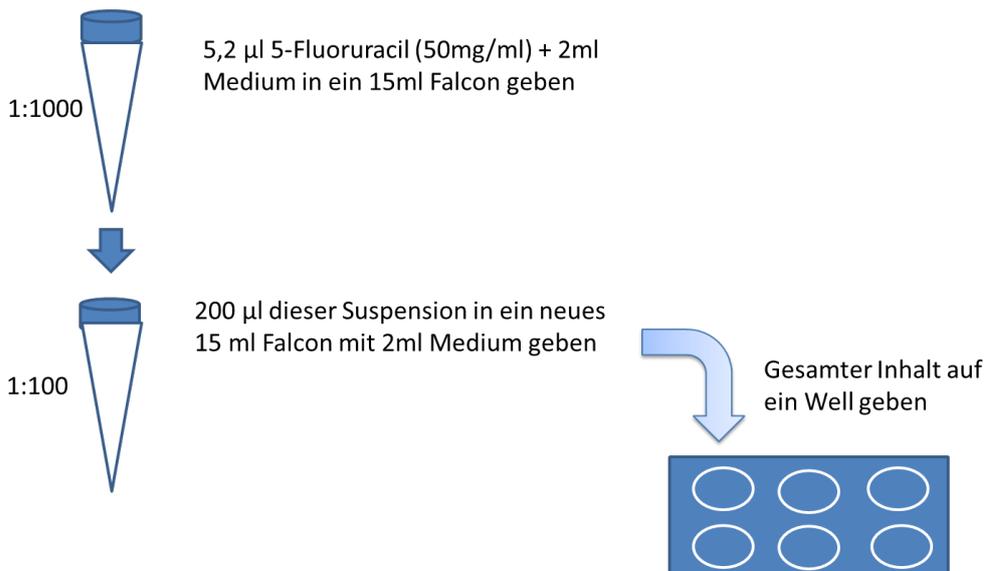


Abbildung 13: Verdünnungsvorgang beim 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test. Es wird schematisch dargestellt wie die gewünschte 1:100 Verdünnung des 5-FU hergestellt wird. Dazu werden 5,2 µl 5-Fluorouracil mit 2 ml Medium in ein Falcon mit 15 ml Volumen gegeben. Von dieser Suspension werden 200 µl erneut mit 2 ml Medium in ein Falcon mit 15 ml Volumen gegeben. Diese Verdünnung wird anschließend zu je unterschiedlichen Einwirkzeiten (24 Stunden, 18 Stunden, 6 Stunden, 1 Stunde, 30 Minuten und 0 Minuten) auf die 6-Well Platte mit den zuvor gezüchteten Zellen aufgetragen. Nach Ablauf der Einwirkzeiten erfolgt die RNA-Isolierung aus dem übriggebliebenen Zellpellet nach Protokoll mit anschließender Konzentrationsbestimmung im NANO Drop, bevor sie in cDNA umgeschrieben wird und die Thymidilat-Synthase Aktivität mittels q-PCR bestimmt wird. © Paint Microsoft.

Bevor die Verdünnungen aufgetragen werden, sollten die Zeitspannen für das Einwirken von 5-Fluorouracil festgelegt werden. Ein Beispiel für eine solche Zeiteinteilung ist eine Einwirkzeit für 24 Stunden, 18 Stunden, 6 Stunden, 1 Stunde, 30 Minuten und 0 Minuten.

Zu den geplanten Zeiten wird die Zellsuspension mit Medium mit dem verdünnten Chemotherapeutikum versetzt. Dann wird die 6-Well Platte erneut in den Brutschrank gegeben. Sobald die vorher festgelegten Zeiten abgelaufen sind, werden die Zellen geerntet. Hierfür wird das Medium abgesaugt und 1ml PBS hinzugefügt. Die Zellen werden abgeschabt und mittels Pipette in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Diese werden für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird nach Absaugen des Überstands in -20 Grad Celsius eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Im nächsten Schritt erfolgt die Isolierung der RNA gemäß Protokoll, wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben und im Anschluss wird die Konzentration der RNA in ng/µl mittels NANO Drop Technologie gemessen. Bei ausreichender Konzentration > 40 ng/µl wird die RNA dann mittels reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA wird dann 1:100 mit ddH₂O verdünnt und mittels q-PCR wird die Aktivität der Thymidilat-Synthase bestimmt.

Die Durchführung des Zell-Stress-Testes mit 5-FU erfolgte wie soeben beschrieben in dieser Arbeit mit der Zelllinie DLD1.

Drei Mal wurde für eine je unterschiedliche Zeitdauer von 0, 30 Minuten, 1, 6, 18 und 24 Stunden eine Menge von 100 µM 5-FU auf die Zellen aufgetragen. Somit ergab sich ein

Unterschied in der Einwirkdauer, nicht jedoch in der Konzentration des Chemotherapeutikums. Das Ziel war es, herauszufinden, ob sich die Expression der Thymidilat-Synthase durch die unterschiedlich langen Einwirkzeiten des 5-Fluorouracils auf die Zelllinien verändert. Hier stellt sich die Frage, ob die Thymidilat-Synthase infolge der 5-FU Gabe eine Gegenmaßnahme in Form einer Hochregulation auf Genexpressionsebene zeigt oder aber, ob sie eher ihre Aktivität reduziert.

3.1.9b. Klon-Assay

Im folgenden Versuch werden die ausgewählten Zelllinien gesplittet und pro Well werden 10^5 Zellen ausgebracht. Insgesamt werden 4 der 6 Wells besetzt und mit je 2ml zur Zelllinie passendem Medium versorgt. Nach 24 Stunden erfolgt der Wechsel des Mediums und pro Well wird eine unterschiedliche Konzentration an 5-Fluorouracil aufgetragen.

Als Beispiel: $1000\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $0\mu\text{M}$

Die Einwirkdauer beträgt 6 Stunden. Nach Ablauf der Zeit wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit einem neuen Medium (circa 2ml) über Nacht erneut in den Brutkasten (37°Celsius , Luftfeuchtigkeit 96-98%, 5% CO_2 Konzentration) gegeben. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit Hilfe von Trypsin gelöst. Daraufhin wird die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und insgesamt werden 1×10^2 Zellen pro Petrischale ausgebracht. Diese Petrischalen werden für 14 Tage in den Brutschrank gegeben, dabei muss das Medium nicht gewechselt werden und die Zellen sollten an Ort und Stelle bleiben.

Nach Ablauf der 14 Tage werden die Zellkolonien fixiert und mit Crystal Violet gefärbt.

Die Färbung wird hierfür wie folgend angesetzt: Crystal Violet Solution 1% von Sigma #V5265 (250/500ml),
1/10 mit Aqua destilliert oder Ethanol
auf 0.1/ final Lösung.

Zunächst wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 5 ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen für 5 Minuten mit 2ml 3%PFA oder 3%gepufferter Formalin Lösung fixiert. Dann folgt eine zweimalige Reinigung der Zellen mit PBS und anschließend werden 2ml 0,1% Crystal Violet Lösung auf die Zellen gegeben. Nun wird das Ganze für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten werden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen. Nun ist die Färbung abgeschlossen und die Petrischalen werden umgedreht und auf einem Tuch über Nacht getrocknet.

Am nächsten Tag erfolgt die Auswertung der Ergebnisse mittels manueller Auszählung der Zellkolonien und mittels der Software ImageJ.

3.2. Statistische Begriffe und Tests – Definitionen

3.2.1. Cut-off-Wert

Dieser wird auch als Toleranzgrenze bezeichnet, da er festlegt, ab wann ein Ergebnis unabhängig von der Art des Tests als positiv beziehungsweise negativ zu werten ist. Dabei ist der Wert nur qualitativ festgelegt und unterscheidet sich somit quantitativ von Labor zu Labor. Dieser Wert hat somit in jedem der hier durchgeführten Versuche eine Bedeutung.

3.2.2. Kaplan-Meier-Schätzer

Der Kaplan-Meier-Schätzer dient der Abschätzung des Überlebens im Rahmen eines gewissen Ereignisfensters, sodass es hierbei um die Wahrscheinlichkeit geht, dass ein Ereignis innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nicht eintritt. Bei jedem Todeszeitpunkt kommt es zu einem Sprung in der Kurve nach unten, wobei zensierte Patienten (Patienten ohne Ereignis) durch senkrechte Striche gekennzeichnet sind. Es ist sehr bedeutend, dass Patienten ohne Ereignis in die Analyse eingeschlossen werden. Somit können Überlebensraten und mediane Überlebenszeiten angegeben werden.

3.2.3. Log-rank-Überlebensdatentest

Dieser Test dient dem statistischen Vergleich von Überlebenszeiten. Es wird geprüft ob die jeweiligen Überlebenszeiten in den Gruppen sich unterscheiden oder gleich lang sind, wobei der gesamte Beobachtungszeitraum betrachtet wird.

3.2.4. Hazard und Hazard-Rate

Dabei wird die derzeitige Sterberate bezogen auf eine Patientengruppe bezeichnet. Natürlich kann sich das Risiko im Verlauf verändern, sodass sie vom Zeitpunkt t abhängig ist. Die Ratio ist somit der Quotient aus den jeweiligen Risiken von zwei verschiedenen Gruppen. Dabei kann abgeschätzt werden, um wie viel höher die Sterberate in der einen Gruppe verglichen zur anderen Gruppe ist.

Hazard-Ratio = Hazardratiefunktion 2(t) / Hazardratiefunktion 1(t)

Liegt der Quotient bei 1, so kann davon ausgegangen werden, dass das Ereignisrisiko in beiden Gruppen gleich groß ist. Liegt die Ratio > 1 so ist das Risiko in Gruppe 2 größer, liegt sie < 1 so ist das Risiko in Gruppe 1 größer.

3.2.5. Regressionsanalyse nach Cox

Die Cox-Regression dient dazu, den Einfluss von mehreren Faktoren wie Therapie, Geschlecht, Alter bei Operation, Resektionsgrad und Metastasenstatus auf die Überlebenszeit abzuschätzen. Dabei ist entscheidend, dass die Hazard Ratio für den beobachteten Zeitraum konstant ist. Dies trifft dann zu, wenn das Hazard in beiden Gruppen proportional zueinander ist, dabei kann das Hazard, also das Ereignisrisiko unterschiedlich sein, allerdings sollte dieses über die Zeit betrachtet gleich sein.

3.2.6. Korrelation und Kausalität

Eine Korrelation kann definiert werden als Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Wobei die Kausalität eine Aussage darüber trifft ob eine Variable eine Auswirkung auf die andere Variable hat.

3.2.7. Spearman Korrelation

Mit der Spearman Korrelation wird der lineare Zusammenhang zwischen zwei Variablen gemessen. Dabei reichen die Werte von -1 , was bedeutet, dass es eine negative Korrelation gibt, über 0 , was heißt, dass es keine Korrelation gibt, bis hin zu $+1$, was eine positive Korrelation anzeigt. Um exakt zu sein, muss hierbei erwähnt werden, dass der (Rang-) Korrelationskoeffizient zwischen den Rängen und nicht wie der klassische

Korrelationskoeffizient nach Spearman zwischen den Daten berechnet wird. Daher ist diese Methode auch bei einer nicht vorhandenen Normalverteilung möglich.

3.2.8. Grafikübersicht statistische Tests

Es gibt verbundene statistische Tests, dazu zählt der normalverteilte Wilcoxon-Test. Auf der anderen Seite sind die unverbundenen statistischen Tests, dazu zählen der normalverteilte T-Test, sowie der nicht normalverteilte Mann-Whitney-U-Test. Letzterer wurde im Vergleich Rezidiv und nicht-Rezidiv im UICC Stadium II anhand der TYMS Expressionshöhe angewendet.

Die statistischen Tests, welche nicht expliziert in der Doktorarbeit verwendet wurden, sind aus Vollständigkeitsgründen hier mit dargestellt worden.

3.3. Patientennachsorge

Die Nachsorge der Patienten erfolgt anhand der Kolorektalen Datenbank des Klinikum rechts der Isar. Diese Datenbank registriert seit 1. Jänner 1982 Patienten, welche am kolorektalen Karzinom am Klinikum rechts der Isar operiert wurden. In dieser Arbeit ging es gezielt um jene Patienten, die in einem Erfassungszeitraum (Jänner 2006 bis Dezember 2013, Beginn der Arbeit 1. Dezember 2014) mindestens 24 Monaten zuvor am Klinikum rechts der Isar mit der Diagnose Kolonkarzinom operiert wurden. Alle Patienten sollten mindestens 80 Monate postoperativ nachgesorgt werden. Dieses Kollektiv umfasst insgesamt 730 Patienten. Für die Aktualisierung der Datenbank wurden verschiedene Wege eingeschlagen. Einige Patienten sind noch aktiv am interdisziplinären Tumortherapezentrum (TTZ) des Klinikums rechts der Isar angebunden, sodass die Nachsorge über die Unterlagen des TTZ erfolgen konnte. Allerdings gilt dies nicht für alle Patienten, sodass es in den meisten Fällen nötig war, telefonisch den Kontakt zu suchen. Dabei wurden Informationen über den derzeitigen Gesundheitszustand des Patienten, sowie über die Art der Nachsorge standardisiert mit einem Fragebogen eingeholt. Nicht jeder Patient war erreichbar, sodass es nötig war, die Hausärzte, falls diese bekannt waren zu kontaktieren. Hierbei zeigten sich meist keine Probleme, allerdings unterliegen diese ebenfalls der Schweigepflicht, sodass per Fax der wissenschaftlich-klinische Aspekt zum Einholen der Patientendaten bestätigt werden musste. Falls Patienten nicht erreichbar waren so konnte es sein, dass der Wohnort und somit die Telefonnummer gewechselt haben und keine neue Nummer hinterlegt haben oder, dass sie über ihre Krankheit nicht mehr sprechen wollten.

Die Nachsorge wurde entsprechend der S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Das Kollektiv für die Laboruntersuchungen umfasste 78 Patienten, welche am Kolonkarzinom im UICC Stadium III am Klinikum rechts der Isar im Zeitraum von November 1992 bis Februar 2010 operiert und adjuvant behandelt wurden. Natürlich wurden in diesem Zeitraum deutlich mehr Patienten am Klinikum rechts der Isar aufgrund eines Kolonkarzinoms behandelt, aber bei dieser Patientengruppe war das Gewebe bereits in unserem Labor in Stickstoff gefroren vorhanden. Zusätzlich, wenn möglich, war eine vollständige Information über die stattgefundenene Chemotherapie vorhanden. Dabei konnten nicht für jeden Patienten Informationen eingeholt werden,

weil diese entweder nicht elektronisch dokumentiert worden waren, die Patienten nicht genau darüber Bescheid wussten oder weil sie nicht mehr erreichbar waren.

Zusätzlich wurde ein Kollektiv von 22 Patienten mit Kolonkarzinom im UICC II in den Laboruntersuchungen untersucht. Davon erlitt die Hälfte dieser 22 Patienten ein Rezidiv, die andere Hälfte nicht. Dieses Kollektiv wurde bereits unter Nitsche et al. im Jahre 2013 erfolgreich untersucht (Nitsche et al, 2013).

4. Ergebnisse

4.1. Klinisch-Pathologische Ergebnisse der Datenbank (n=730)

Die prospektive Datenbank der Arbeitsgruppe Kolorektal des Klinikum rechts der Isar wurde im Jahre 1990 angelegt und wurde über die Jahre konstant mit Patienten, welche an einem kolorektalen Karzinom erkrankt und therapiert worden sind, erweitert. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Doktorarbeit umfasste diese soeben erwähnte prospektive Datenbank insgesamt 4313 Patienten. Die für diese Dissertation nachgesorgten 730 Patienten wurden gezielt anhand des postoperativen Zeitraums ausgewählt. Alle Patienten wurden vor mindestens 24 und maximal 80 Monaten am Klinikum rechts der Isar aufgrund eines Kolonkarzinoms operiert. Insgesamt konnten 15 Patienten nicht nachgesorgt werden, davon 9 Männer und 6 Frauen, sie zählen somit als LFU (Lost to follow-up). Somit ergibt sich eine absolute Zahl von 715 Patienten, die erfolgreich nachgesorgt wurden. Die Auswertung bezieht sich jedoch auf alle 730 Patienten (Intention to treat Analyse), die Patienten, die hier gesondert berücksichtigt werden müssen, werden dediziert aufgeführt.

Tabelle 13: Geschlechterverteilung im statistischen Kollektiv

Geschlecht	Anzahl der Patienten	Prozent %
Männlich	450	61,7
Weiblich	280	38,3

Unter den 730 Patienten befanden sich 450 Männer und 280 Frauen. Insgesamt ist mit 442 Fällen die Mehrheit an einem Kolonkarzinom und der kleinere Anteil mit 288 berücksichtigten Patienten an einem Rektumkarzinom erkrankt. Dazu Tabelle 13.

Tabelle 14: Übersicht über das Alter der Patienten

Alter in Jahre	Anzahl an Patienten	Prozent %
0-10	0	0,0
11-20	1	0,1
21-30	5	0,6
31-40	23	3,2
41-50	64	8,8
51-60	147	20,2
61-70	229	31,3
71-80	184	25,3
81-90	73	10,0
91-100	4	0,5

In Tabelle 14 wird die Altersverteilung der eingeschlossenen Patienten gezeigt. Die deutliche Mehrheit der in dieser Doktorarbeit erfassten Patienten befindet sich zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr. Abbildung 14 zeigt eine graphische Darstellung der Altersverteilung.

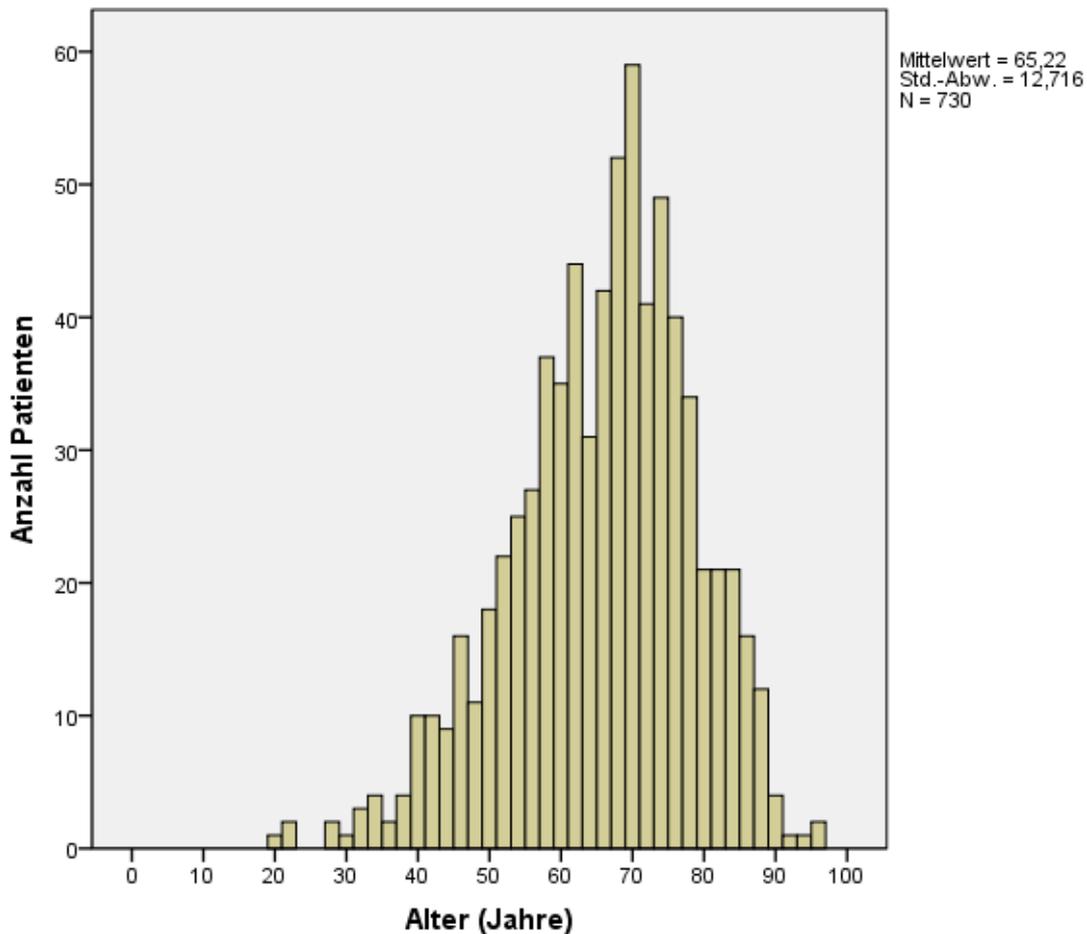


Abbildung 14: Dieses Histogramm zeigt die Altersverteilung des Patientenkollektivs in der Datenbank-Nachsorge mit einer Anzahl von 730 Patienten. Wie bereits in Tabelle 14 ersichtlich, zeigt sich ein gehäuftes Auftreten des kolorektalen Karzinoms in diesem Patientenkollektiv zwischen 50. und 80. Lebensjahr. Der Mittelwert liegt bei 65,22 Jahren mit einer Standardabweichung von 12,716 Jahren. Jüngere sowie ältere Patienten sind selten betroffen.

Tabelle 15: Übersicht Operationsjahr mit Anzahl der Patienten

OP - Jahr	Anzahl an Patienten
1982	2
1995	1
1999	1
2001	1
2004	3
2005	2
2006	44
2007	74
2008	85
2009	92
2010	100
2012	114

2013	102
2014	1

Der Operationszeitpunkt, wie in Tabelle 15 dargestellt, der hier erfassten Patienten befindet sich vor allem zwischen 2006 und 2013. Die entspricht dem bereits in den Methoden erläuterten Nachsorgezeitraum von mindestens 24 bis maximal 80 Monaten postoperativ. Der Grund weshalb einige Patienten außerhalb dieses Rahmens liegen, sind metachrone Tumore oder Rezidive, welche erneut operiert oder therapiert werden mussten. Somit sind sie erneut in den Nachsorgezeitraum miteinbezogen worden.

Tabelle 16: Tumorlokalisation

Lokalisation des Tumors	Anzahl der Patienten	Prozent %
Coecum	63	8,7
Appendix	19	2,6
Colon ascendens	90	12,3
Rechte Flexur	33	4,5
Colon transversum	37	5,1
Linke Flexur	31	4,2
Colon descendens	36	5,0
Sigma	223	30,5
Proximales Rektum	88	12,1
Mittleres Rektum	104	14,2
Distales Rektum	0	0,0
Analkanal	6	0,8

In Tabelle 16 werden die Lokalisationen der Kolonkarzinome dargestellt. Hierbei zeigt sich ein deutlich gehäuftes Auftreten des Kolonkarzinoms im Sigma sowie im Rektum. Es zeigt sich eine Zunahme der Lokalisation von proximal nach distal. Doppelkarzinome sind in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

Tabelle 17: Verteilung der Tumorstadien

Tumorstadium	Anzahl der Patienten	Prozent %
I	122	16,7
II	176	24,2
III	217	29,7
IV	117	16,0
Unbekannt	98	13,4

In Tabelle 17 werden die Tumorstadien der 730 Patienten, welche im Rahmen dieser Doktorarbeit erhoben wurden, in absoluten und in prozentuellen Zahlen dargestellt. Dabei zeigt sich eine verhältnismäßig gleichmäßige Verteilung der Tumorstadien. Bei 13,4% kann keine Aussage über das Tumorstadium gemacht werden. Dies liegt an nicht vorhandenen Aufzeichnungen in der Datenbank.

Tabelle 18: Tumortyp

Tumortyp	Anzahl der Patienten	Prozent %
Primär	692	94,8
Rezidiv	21	2,9
Nicht in der Datenbank erfasst	17	2,3

Wie in Tabelle 18 erkennbar, handelt es sich in über 90% der hier erfassten bösartigen Tumoren des Kolons um Primärtumoren. Nur bei 21, der hier erfassten Patienten, handelt es sich um Rezidivtumoren. Die Patienten wurden dabei nur einmal erfasst.

Tabelle 19: Tumorstatus

Tumorstatus bezogen auf alle möglichen bösartigen Tumoren	Anzahl der Patienten	Prozent %
Ersttumor	628	86,0
Zweitumor	84	11,5
• Prostatakarzinom	24	
• Nierenzellkarzinom	12	
• Mammakarzinom	10	
• Lymphom	9	
• Urothelkarzinom	5	
• Pankreaskarzinom	5	
• Ösophaguskarzinom	4	
• Endometriumkarzinom	3	
• Spinalzellkarzinom	3	
• Ovarialkarzinom	1	
• Vulva-Karzinom	1	
• Gallenblasenkarzinom	1	
• Magenkarzinom	1	
• Schilddrüsenkarzinom	1	
• Mundbodenkarzinom	1	
• Tonsillenkarzinom	1	
• Melanom	1	
• Basaliom	1	
Drittumor	15	2,0
• Prostatakarzinom	8	
• Mammakarzinom	3	
• Lungenkarzinom	3	
• Endometriumkarzinom	1	
Weitere Tumoren	3	0,5

In Tabelle 19 zeigt sich, dass es sich bei 86% der Patienten um das Erstmalignom handelt. Bei knapp 14% war bereits vor der Diagnosestellung des kolonrektalen Karzinoms, ein, zwei oder sogar mehrere weitere Tumoren festgestellt worden.

Tabelle 20: Zweittumor metachron und synchron

Zweittumor	Anzahl der Patienten	Prozent %
Colon metachron (hintereinander)	29	3,9
Colon synchron (gleichzeitig)	45	6,2

Insgesamt entwickelten, wie in Tabelle 20 ersichtlich, 74 Patienten ein metachrones, also zu einem anderen Zeitpunkt auftretend, kolorektales Zweitkarzinom.

45 Patienten litten darüberhinaus an einem Doppelkarzinom mit mehreren synchronen kolorektalen Karzinomen.

Tabelle 21: Begleiterkrankungen

Begleiterkrankungen	Anzahl der Patienten	Prozent %
Patienten mit Begleiterkrankungen	502	68,7
Kardiovaskulär	229	31,3
Diabetes mellitus	76	10,5
Pulmonal	66	9,1
Renal	54	7,3
Neurologisch	39	5,3
Hepatisch	38	5,2

Insgesamt haben 68,7% der Patienten tumorunabhängige Begleiterkrankungen, wobei die kardiovaskulären Komorbiditäten den größten Anteil davon ausmachen, wie Tabelle 21 zeigt. Daneben gibt es einen relevanten Anteil an Patienten, die mehrere Begleitmorbiditäten aufwiesen, was sich in einem entsprechend höheren ASA (American Society of Anesthesiologists)- Score widerspiegelt.

Tabelle 22: ASA-Score

ASA-Score	Anzahl der Patienten	Prozent %
I	101	13,8
II	434	59,5
III	157	21,5
IV	4	0,5
V	0	0
Unbekannt	34	4,7

Aufgrund der Begleiterkrankungen zeigt sich in Tabelle 22, dass bei der Mehrheit der Patienten ein ASA-Score von 2 oder 3 von den Anästhesisten festgelegt wurde. Dies bedeutet, dass eine leichte Allgemeinerkrankung ohne oder mit Leistungseinschränkung zum Zeitpunkt der Operation vorgelegen hat.

Tabelle 23: OP- Indikation

OP -Indikation	Anzahl der Patienten	Prozent %
Kurativ	690	94,6
Palliativ	40	5,4

Die Tabelle 23 zeigt, dass bei 94,6% der Patienten in kurativer Absicht operiert wurde. Bei 37 Patienten handelte es sich Notfalloperationen. Diese waren bedingt durch schwere Blutungen oder durch einen mechanischen Ileus.

Bei 37 der insgesamt 730 Patienten kam es zu intraoperativen Komplikationen und in 60 Fällen musste im Verlauf der Behandlung eine Re-Laparotomie durchgeführt werden. Davon waren 32 Patienten von einer Anastomoseninsuffizienz betroffen.

Eine gedeckte Tumorperforation gab es bei 24 Patienten, dies bedeutet, dass die Bruchstelle von einem benachbarten Organ abgedichtet wird. Bei weiteren 29 Patienten kam es zu einer freien Perforation. Insgesamt waren somit 53 Patienten von einer Tumorperforation betroffen.

Tabelle 24: Lymphadenektomie mit Anzahl der entfernten Lymphknoten

Lymphadenektomie	Anzahl der Patienten	Prozent %
Ja	554	75,8
Ja, erweitert	113	15,4
Nein	63	8,8
Anzahl der entfernten Lymphknoten		
<12 Lymphknoten	97	13,2
mindestens 12 Lymphknoten	570	78,0
12-20	374	51,3
21-30	142	19,4
31-40	41	5,6
41-50	7	0,9
51-60	3	0,4
61-70	0	0,0
71-80	3	0,4

Bei 554 der insgesamt 730 erfassten Patienten wurde eine Lymphknotenentfernung durchgeführt. In 113 Fällen erfolgte die Entfernung in einem erweiterten Ausmaß, das heißt unter Entfernung weiterer Lymphabflusswege. Somit kommt man insgesamt auf 91,2%, mit Lymphknotenentfernung, in Gegenüberstellung zu 8,8% ohne Lymphknotenentfernung. Jene Patienten ohne Lymphknotenentfernung wurden aufgrund eines Rektumkarzinoms operiert und hierbei ist die erweiterte Lymphadenektomie nicht als Standard zu sehen. Die Leitlinien geben vor, dass mindestens 12 Lymphknoten entfernt werden müssen, um eine sichere Beurteilung des LK-Status für das UICC Stadium abzugeben. Dies erfolgte bei 85,4% der Patienten von insgesamt 667 Patienten mit Lymphadenektomie. Auch in diesem Fall handelt es sich bei den restlichen 14,6% um Patienten mit Rektumkarzinom und in diesem Fall mit LK-Entfernung. Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse in der Übersicht. Die Prozentangaben in der Tabelle sind auf alle 730 Patienten bezogen.

Tabelle 25: Verteilung der Tumorhistologie

Tumorhistologie	Anzahl der Patienten	Prozent %
Klassisches Adenokarzinom	629	86,2
Muzinöses Adenokarzinom	65	9,0
Siegelringkarzinom	1	0,1
Undifferenziertes Karzinom	1	0,1

Adenosquamöses Karzinom	1	0,1
Plattenepithelkarzinom	2	0,3
Neuroendokrines Karzinom	11	1,5
Gastrointestinaler Stromatumor	1	0,1
Adenom	3	0,5
Sonstige Histologie, nicht weiter beschrieben	16	2,1

In Tabelle 25 zeigt sich, dass bei 86,2 % der Patienten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nachgesorgt wurden, ein klassisches Adenokarzinom des Dickdarms in der Histologie festgestellt wurde. Weitere Tumorarten, wie Neuroendokrine Tumore, Plattenepithelkarzinome oder Gastrointestinale Stroma Tumore (GIST) wurden sehr selten diagnostiziert.

In 129 Fällen (17,7%) wurde zusätzlich eine Lymphangiosis festgestellt (entspricht L1). Eine Gefäßinfiltration konnte bei 60 Patienten (8,3%) diagnostiziert werden (entspricht V1).

Tabelle 26: Verteilung histologisches Grading

Histologisches Grading	Anzahl der Patienten	Prozent %
G1	54	7,4
G2	451	61,8
G3	153	20,9
G4	6	0,8
Gx	66	9,1

In Tabelle 26 wird verdeutlicht, dass die Mehrheit der Patienten, in Prozent 61,8%, ein histologisches Grading der Stufe G2 aufgewiesen hat, gefolgt von G3 mit 20,9%. Seltener waren sowohl die G1 als auch die G4 Einstufungen.

Tabelle 27: R-Klassifikation

R- Klassifikation (Residualtumor nach OP)	Anzahl der Patienten	Prozent %
R0	631	86,4
R1	27	3,7
R2	28	3,8
RX	44	6,1

Tabelle 27 zeigt den Status des Residualtumors nach der Operation. Es zeigt sich, dass in 631 Fällen eine R0-Resektion möglich war und somit keine mikroskopischen oder makroskopischen Tumorreste im Patienten zurückgeblieben sind. Bei 27 Patienten wurden mikroskopische (R1) und bei 28 Patienten makroskopische (R2) Tumorreste intraoperativ belassen. Keine Beurteilung bezüglich des Residualtumors nach der Operation (RX) konnte in 44 Fällen getroffen werden.

Tabelle 28: Metastasen

Metastasen	Anzahl der Patienten	Prozent %
Leber solitär	25	3,4
<3	14	2,0
>3	17	2,3

>50% disseminiert	17	2,3
Ovar	2	0,3
Lunge	27	3,7
Lymphknoten	15	2,1
Peritoneum	16	2,1
Sonstige	4	0,5

Von insgesamt 730 Patienten, waren 593 Patienten, das heißt 81,3%, nicht von Fernmetastasen betroffen. Bei 18,7%, das heißt 137 Patienten, wurden Fernmetastasen diagnostiziert, wie Tabelle 28 zeigt. Die Lebermetastasen machen hierbei mit 73 Fällen quantitativ gesehen den größten Anteil aus, gefolgt von Lungenmetastasen (27 Fälle), sowie Lymphknoten (15 Fälle) und Peritoneum (16 Fälle).

Tabelle 29: Neoadjuvante Therapie

Neoadjuvante Therapie	Anzahl der Patienten	Prozent %
Radiotherapie/ Strahlentherapie	25	3,4
Radiochemotherapie	123	16,8
Chemotherapie	25	3,4

Insgesamt erhielten 173 Patienten eine neoadjuvante Therapie vor der Operation, hierbei sei allerdings erwähnt, dass es sich ausschließlich um Patienten mit einem Rektumkarzinom handelte. Bei den restlichen 115 Patienten mit Rektumkarzinom wurde hingegen keine neoadjuvante Therapie durchgeführt, genauso wie bei den verbleibenden 442 Patienten mit einem Kolonkarzinom. Hierzu Tabelle 29.

Tabelle 30: Adjuvante Therapie

Adjuvante Therapie	Anzahl der Patienten	Prozent %
Chemotherapie	256	35,0
Strahlentherapie	2	0,2
Radiochemotherapie	18	2,4
- Kolonkarzinom	1	0,1
- Rektumkarzinom	17	2,3
Chemotherapie und HIPEC (= hypertherme intraperitoneale Chemotherapie)	1	0,1
Chemotherapie + Antikörper	54	7,4
Somatostatinrezeptor - Antagonist	2	0,2

333 Patienten wurden adjuvant therapiert (Tabelle 30), davon war in 277 Fällen die Therapie vollständig und in 56 Fällen die Therapie unvollständig. 16 Patienten brachen die Therapie aufgrund mangelnder Compliance ab, ein Patient musste die Therapie wegen eines Infektes abbrechen, ein Weiterer wegen zu starker Knochenmarksdepression. In 9 Fällen waren neurologische Symptome der Grund für den Abbruch. 8 Patienten gaben keinen Grund an und in 21 weiteren Fällen waren sonstige Gründe die Ursache.

Nur ein Patient mit einem Kolonkarzinom wurde adjuvant mit einer Radiochemotherapie behandelt. Dies war in diesem Fall auf pulmonale Metastasen

zurückzuführen. Bei Rektumkarzinom hingegen handelt sich um ein etabliertes Therapieschema.

Jene zwei Patienten, welche mit einem Somatostatinrezeptor-Antagonisten behandelt wurden, litten an einem neuroendokrinen Tumor und somit an keinem klassischen Adenokarzinom.

Insgesamt erhielten 397 Patienten keine adjuvante Therapie. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass zu früheren Zeitpunkten auch im Stadium III nicht immer eine Chemotherapie durchgeführt wurde.

Tabelle 31: Adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil

Adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil	Anzahl der Patienten	Prozent %
Monotherapie mit 5-FU	28	3,8
Ardalan-Schema (5-FU + Folinsäure)	7	0,9
FOLFOX	86	11,8
FOLFOX + Cetuximab	12	1,6
+ Bevacizumab	14	1,9
+ Panitumumab	3	0,4
FOLFIRI	12	1,6
FOLFIRI + Cetuximab	6	0,8
+ Bevacizumab	16	2,1
Xelox (Capecitabin + Oxaliplatin)	16	2,1
Capecitabin	57	7,9
Capecitabin + Bevacizumab	3	0,4
Oxaliplatin + Capecitabin	1	0,1

Laut Tabelle 31 wurde bei 261 Patienten eine 5-FU basierte Chemotherapie durchgeführt, davon erhielten 28 Patienten 5-FU als Monotherapie und 234 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.

Tabelle 32: Adjuvante Chemotherapie ohne 5-Fluorouracil

Adjuvante Chemotherapie ohne 5-FU	Anzahl der Patienten	Prozent %
Oxaliplatin	2	0,2
Cetuximab	1	0,1
Bevacizumab	2	0,2
UFT (Uracil+Tegafur) + Folinsäure	1	0,1

Bei 6 Patienten wurde eine Chemotherapie ohne 5-FU durchgeführt, dazu Tabelle 32. Dies war aufgrund von Kontraindikationen gegen eine 5-FU basierte Chemotherapie oder auch auf Wunsch der Patienten der Fall.

Insgesamt wurden 333 Patienten adjuvant therapiert, davon erhielten zwei Patienten eine alleinige Strahlentherapie aufgrund eines Rektumkarzinoms. In allen anderen Fällen, war die Chemotherapie Bestandteil der Behandlung oder die alleinige Therapieform. Bei 267 Patienten von 331 mit Chemotherapie behandelten Patienten ist die verordnete Therapie bekannt und dokumentiert. Bei 64 Patienten wurde die

Chemotherapie nicht dokumentiert beziehungsweise konnte den vorliegenden Unterlagen keine Erkenntnisse darüber entnommen werden.

Tabelle 33: Rezidiv

Rezidiv	Anzahl der Patienten	Prozent % von 730 Patienten
Bei R0	132	18,1
Bei R1/2 /Progression	70	9,5

Insgesamt erlitten 132 Patienten nach R0 Status ein Rezidiv. Davon hatten 5 Patienten eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU erhalten und weitere 85 Patienten eine Kombinationstherapie mit 5-FU.

Bei 42 der insgesamt 132 betroffenen Patienten wurde keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Adjuvant bezieht sich dabei auf die Chemotherapie im Anschluss an die R0 Operation und somit vor dem Rezidiv. Dazu Tabelle 33.

Bei 70 Patienten kam es zur Progression bei nicht vollständig mikroskopisch (R1) oder makroskopisch (R2) entfernten Tumor. Von diesen 70 Patienten erhielten 2 eine additive Chemotherapie mit 5-FU Mono und weitere 46 Patienten eine Kombinationstherapie mit 5-FU.

22 Patienten wurden trotz R1 oder R2 Status nicht additiv mit einer Chemotherapie behandelt. Die Gründe hierfür waren sehr häufig der schlechte Allgemeinzustand des Patienten, der eine additive Therapie nicht möglich machte oder teilweise eine Ablehnung durch die Patienten selbst.

Tabelle 34: Recurrence-free Survival

Zeitdauer in Monate bis zum Rezidiv	Anzahl der Patienten mit Rezidiv = 202	Prozent % bezogen auf 202 Patienten
0-10	78	38,6
11-20	62	30,6
21-30	30	14,8
31-40	14	6,9
41-50	3	1,4
51-60	8	3,9
61-70	2	1,2
71-80	2	1,2
81-90	3	1,4

Von den insgesamt 202 Patienten, die ein Rezidiv erlitten hatten, waren mehr als 50 % in den ersten 2 Jahren davon betroffen. Spätere Zeitpunkte waren, wie Tabelle 34 zeigt, sehr selten. Abbildung 15 zeigt eine graphische Darstellung über die Zeitpunkte, wann Rezidive im Patientenkollektiv aufgetreten sind.

Rezidivmonate

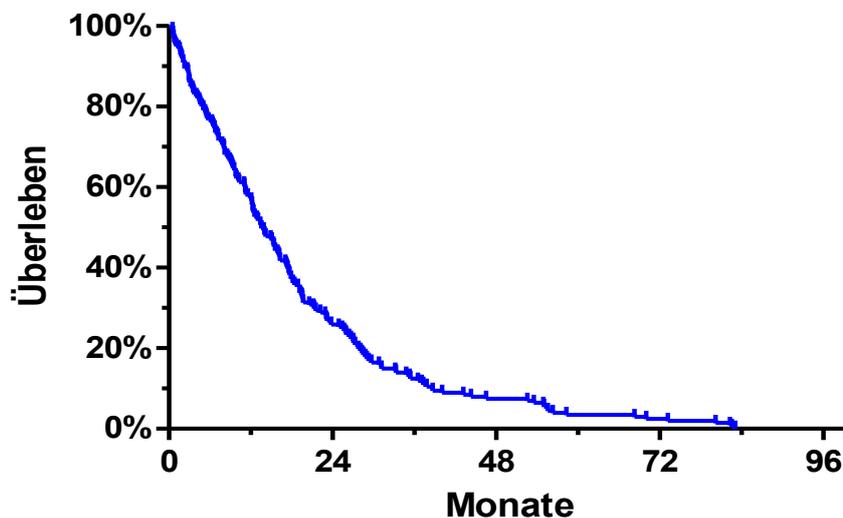


Abbildung 15: Diese Darstellung bezieht sich auf jene 202 Patienten, welche im Verlauf an einem Rezidiv erkrankt sind. Alle anderen Patienten, sprich 528, werden in dieser Grafik nicht mitangeführt. Es wird deutlich, dass Rezidive vor allem innerhalb der ersten 24 Monate auftreten. Spätere Zeitpunkte sind, wie bereits in Tabelle 34 dargestellt deutlich seltener.

Tabelle 35: Lokalisation des Rezidivs

Lokalisation des Rezidivs	Anzahl der Patienten
Lymphknoten	37
Endoluminal	16
Extraluminal	24
- Lokal	6
- Andere Lokalisation wie Sakral	18
Endo- und Extraluminal	7
Peritonealkarzinose	46
Fernmetastasen	135, davon
Leber	101
Lunge	80
Skelett	5
Gehirn	5
Weichteile	18

Bei 528 Patienten trat kein Rezidiv auf. Die Anzahl der Rezidive mit 265 weicht von der Endsumme mit insgesamt 202 Rezidiven ab, da hier Mehrfachnennungen auftraten und diese separat in die Tabelle eingerechnet wurden. Dies gilt auch für die Fernmetastasen. Siehe auch Tabelle 35.

Tabelle 36: Nachsorge der Patienten

Nachsorge	Anzahl der Patienten	Prozent %
Nicht an der Nachsorge teilgenommen	52	7,2
Stationär	132	18,1
Tumor-Ambulanz	321	44,0
Hausarzt	92	12,7

Wechselnd	118	16,2
Nicht erfassbar / lost to follow up	15	2,0

Insgesamt konnten, wie in Tabelle 36 aufgeschlüsselt, 715 Patienten nachgesorgt und für diese Arbeit ausgewertet werden. Diese gaben Auskunft per Telefon, Email oder waren über die Tumor-Ambulanz mit der Datenbank verbunden.

Tabelle 37: Status der Patienten

Status	Anzahl der Patienten	Prozent %
Am Leben	549	75,2
- UICC I	88	12,1
- UICC II	123	16,7
- UICC III	159	21,8
- UICC IV	41	5,7
- Unbekannt	138	18,9
Frauen	216	29,6
Männer	333	45,6
Verstorben	166	22,8
Davon Tumorabhängig	99	13,6
- UICC I	0	0,0
- UICC II	6	0,8
- UICC III	8	1,1
- UICC IV	65	11,7
- Unbekannt	20	
Davon Tumorunabhängig	67	9,2
Lost to follow up	15	2,0

Lediglich bei 15 Patienten konnte keine Aussage über den Überlebensstatus getroffen werden, da sie trotz wiederholter Kontaktaufnahme nicht zu erreichen waren. Von den Gesamtüberlebenden Patienten sind 216 Frauen und 333 Männer. Das entspricht bei insgesamt 441 erfassten Männern und 274 Frauen einen Anteil an Überlebenden von 75,5% der Männer und 78,8% der Frauen bei einer medianen Follow-up Periode von 80 Monaten, siehe dazu auch Tabelle 37.

362 Patienten, die überlebt haben, erhielten keine Chemotherapie.

Die restlichen 187 Patienten, die ebenfalls überlebt haben, wurden adjuvant mit einer Chemotherapie behandelt. Davon erhielten 23 Patienten eine 5-FU mono Therapie und 162 Patienten eine Chemotherapie mit 5-FU in Kombination. 2 Patienten erhielten eine adjuvante Chemotherapie ohne 5-FU.

Bei der Mehrheit der verstorbenen Patienten lag ein UICC Stadium IV und somit bereits Fernmetastasen vor. Von den 99 Patienten, die tumorbedingt verstorben sind, wurden 5 Patienten mit 5-FU Mono und 60 Patienten mit 5-FU in Kombination adjuvant therapiert. 34 Patienten erhielten keine adjuvante Chemotherapie.

Insgesamt ergibt sich eine Zahl von 252 Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie bekamen. Bei 267 Patienten ist die Chemotherapie bekannt; allerdings bezieht sich diese Tabelle 37 nur auf die nachgesorgten 715 Patienten.

Tabelle 38: Krankheitsfreies Überleben in Monaten – Disease- free Survival

Überlebenszeit in Monaten	Anzahl der Patienten	Prozent %
0-10	35	4,8
11-20	59	8,2
21-30	94	12,8
31-40	105	14,4
41-50	56	7,7
51-60	93	12,9
61-70	67	9,2
71-80	66	9,1
81-90	51	7,0
91-100	54	7,4
101-110	25	3,4
111-120	5	0,6
121-130	1	0,1
131-140	0	0,0
141-150	0	0,0
151-160	0	0,0
161-170	0	0,0
171-180	3	0,3
181-190	0	0,0
191-200	1	0,1
Lost to follow up	15	2,0

In Tabelle 38 wird die Überlebenszeit der hier erfassten Patienten dargestellt. Das mediane Überleben nach 5 Jahren in dieser Kohorte beträgt 70,0%. Längere Nachsorgen wurden, wie angegeben, vereinzelt durchgeführt, entsprechen aber nicht den Empfehlungen der Fachgesellschaft. Eine graphische Darstellung mittels Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigt Abbildung 16.

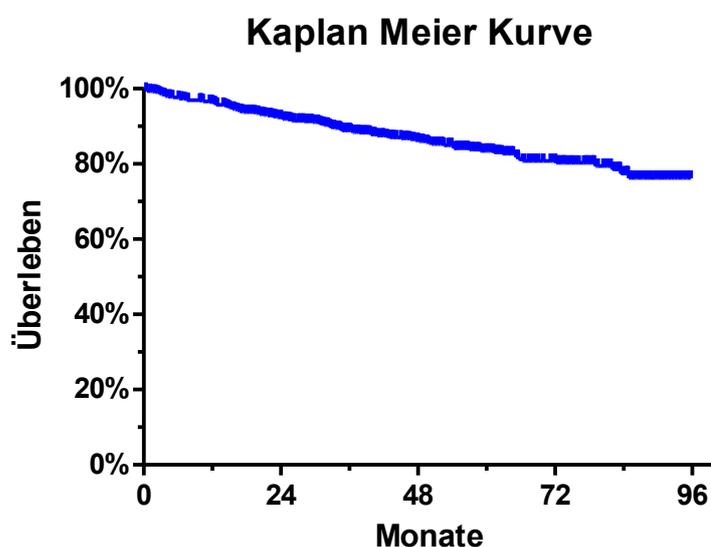


Abbildung 16: In der Kaplan Meier Kurve wurden alle 730 Patienten eingeschlossen, unabhängig davon, ob sie Tumorabhängig oder Tumorunabhängig verstorben sind. Dabei zeigt sich, dass die deutliche Mehrheit des Patientenkollektivs überlebt hat oder Tumorunabhängig verstorben ist.

4.2. Molekulare Ergebnisse

4.2.1. Beschreibung des klinisch-experimentellen Patientenkollektivs UICC III (n=78)

Für den experimentellen Teil standen 78 Gewebeproben zur molekulargenetischen Analyse zur Verfügung. Dabei handelte es sich 47 Männer und 31 Frauen. Alle Patienten waren primär an einem Kolonkarzinom und nicht an einem Rektumkarzinom erkrankt, es war in keinem Fall ein vorausgegangenes Karzinom bekannt.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München (1926/07) genehmigt. Dieses Votum erlaubt das Sammeln und Auswerten von Geweben und Patientendaten.

Im Folgenden werden die klinischen und molekularen Ergebnisse dieser Subgruppe präsentiert.

Tabelle 39: Alter der molekulargenetisch aufgearbeiteten Patienten

Alter in Jahre	Anzahl der Patienten	Prozent %
31-40	3	3,8
41-50	5	6,4
51-60	27	34,7
61-70	28	35,9
71-80	15	19,2

Bereits an diesem kleineren Kollektiv in Tabelle 39 zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Inzidenz um das 50. – 70. Lebensjahr.

Tabelle 40: OP Jahr - Experimentelles Kollektiv

OP Jahr	Anzahl der Patienten	Prozent %
1992 – 1995	11	14,1
1996 – 2000	34	43,6
2001 – 2005	32	41,0
2006 – 2010	1	1,3

Die Mehrheit der Patienten, dazu Tabelle 40 wurde zwischen 1995 und 2005 operiert.

Tabelle 41: Tumorlokalisation - Experimentelles Kollektiv

Tumorlokalisation	Anzahl der Patienten	Prozent %
Coecum	9	11,5
Colon ascendens	12	15,3
Rechte Flexur	3	3,8
Colon transversum	6	7,7
Linke Flexur	1	1,3
Colon descendens	6	7,7
Colon sigmoideum	41	52,7

In Tabelle 41 wird deutlich, dass sich auch an einem kleinen Kollektiv die Häufung des Tumors im Bereich des distalen Kolons zeigt. Es steigt die Auftrittswahrscheinlichkeit des Tumors von proximal nach distal an.

Tabelle 42: UICC Stadium - Experimentelles Kollektiv

Tumorstadium nach UICC	Anzahl der Patienten	Prozent %
III A	11	14,1
III B	49	62,9
III C	18	23,0

Wie in Tabelle 42 dargestellt, befanden sich alle 78 Patienten, die in das Kollektiv für die Untersuchungen des Labors eingeschlossen wurden, im UICC Stadium III. In diesem Stadium wurde, wie die Leitlinien empfehlen, eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt.

Tabelle 43: Histopathologisches Grading - Experimentelles Kollektiv

Histopathologisches Grading	Anzahl der Patienten	Prozent %
G1 – gut differenziert	0	0,0
G2 – mäßig differenziert	46	59,0
G3 – schlecht differenziert	32	41,0
G4 – undifferenziert	0	0,0

Es handelte es sich bei allen in das Kollektiv eingeschlossenen Patienten um ein Adenokarzinom des Kolons. Tabelle 43 zeigt, dass die Tumoren des Kollektivs ein histologisches Grading von G2 (mäßig differenziert) oder G3 (schlecht differenziert) aufwiesen. Bei 36 Patienten kam es zur Lymphangiosis und bei 4 Patienten zu einer Gefäßinfiltration.

Tabelle 44: Anzahl der resezierten LK - Experimentelles Kollektiv

Anzahl der resezierten LK	Anzahl der Patienten	Prozent %
0-10	2	2,6
11-20	40	51,2
21-30	29	37,2
31-40	6	7,7
> 40	1	1,3

Die Tabelle 44 zeigt die Anzahl an resezierten Lymphknoten. Bei 2 Patienten war die Anzahl der entfernten Lymphknoten unter einer Anzahl von 12 und somit nicht für eine histopathologische Beurteilung gemäß den Leitlinien ausreichend. Eine Ursache für die nicht adäquat durchgeführte Lymphadenektomie konnte trotz intensiven Nachforschens nicht herausgefunden werden.

Alle 78 Patienten wurden R0 reseziert, somit waren weder makroskopische noch mikroskopische Reste des Tumors histologisch am operativen Absetzungsrand nachweisbar. Alle betroffenen Patienten erhielten eine 5-FU Monotherapie als adjuvante Chemotherapie. Diese wurde in 59 Fällen vollständig durchgeführt, in 2 Fällen wurde aus Compliance Gründen abgebrochen und bei 17 Patienten konnte über die Vollständigkeit der Therapie keine Aussage getroffen werden.

Tabelle 45: Rezidiv bei R0 - Experimentelles Kollektiv

Rezidiv bei R0	Anzahl der Patienten	Prozent %
Lymphknoten	4	5,1

Fernmetastasen davon in (Mehrfach Nennung möglich)	25	32,1
Leber	16	
Lunge	8	
Skelett	1	
Gehirn	4	
Weichteile	1	
Endoluminal	3	3,8
Peritonealkarzinose	3	3,8
Extraluminal lokal	5	6,4

Insgesamt erlitten, wie in Tabelle 45 dargestellt 31 der 78 Patienten ein Rezidiv bei R0 Situation (39,8%). Aufgrund von Mehrfachnennung deckt sich die Anzahl nicht.

Tabelle 46: Status der Patienten - Experimentelles Kollektiv

Status der Patienten	Anzahl der Patienten	Prozent %
Am Leben	50	64,1
- Frauen	28	35,9
- Männer	22	28,2
Verstorben	28	35,9
_Davon Tumorabhängig	26	33,3
- Frauen	10	12,8
- Männer	16	20,5
_Davon Tumorunabhängig	2	2,6
- Frauen	0	0,0
- Männer	2	2,6

Während 50 Patienten zum Untersuchungszeitpunkt noch am Leben waren, waren 26 Patienten tumorabhängig und 2 Patienten tumorunabhängig verstorben. Es zeigt sich, dass mehr Männer als Frauen tumorabhängig verstorben sind und somit mehr Frauen überlebt haben. Dazu Tabelle 46.

Tabelle 47: Korrelation zwischen Überleben und adjuvanter Chemotherapie - Experimentelles Kollektiv

Adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil	Anzahl der Patienten	Prozent %
Vollständig	40	51,2
_Am Leben	_25	32,0
_Verstorben	_15	19,2
__Davon Tumorabhängig	__14	17,9
___Davon Tumorunabhängig	___1	1,3
Unvollständig	2	2,6
_Am Leben	_0	0,0
_Verstorben	_2	2,6
__Davon Tumorabhängig	__2	2,6
___Davon Tumorunabhängig	___0	0,0
Nicht beurteilbar	36	46,2

_Am Leben	_27	34,7
_Verstorben	_9	11,5
___Davon Tumorabhängig	___8	10,2
___Davon Tumorunabhängig	___1	1,3

In Tabelle 47 zeigt sich, dass insgesamt nur knapp die Mehrheit mit 53,8% eine adjuvante Chemotherapie mit Sicherheit erhalten hat. Die Abbruchgründe bei den 2 gesicherten Patienten waren Compliance und weitere nicht näher bezeichnete Hintergründe. Beide Patienten, die keine vollständige adjuvante Chemotherapie mit 5-FU erhalten hatten, verstarben in Folge eines Tumorrezidivs.

Bei 36 Patienten (46,2%) kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob die adjuvante Chemotherapie laut Leitlinien und somit vollständig durchgeführt worden war. Von dieser Untergruppe aus dem experimentellen Kollektiv sind 34,7% noch am Leben und 10,2% in Folge der Tumorprogression verstorben. Nur 1,3% sind Tumorunabhängig verstorben.

Dem gegenüber stehen 40 Patienten (51,2%), die eine vollständige adjuvante Chemotherapie erhalten hatten. In dieser Subgruppe sind noch 32,0% am Leben und 17,9% in Folge der Tumorprogression verstorben. 1,3% sind auf Grund anderer Krankheiten oder Umstände verstorben.

4.2.2.a. Ergebnisse des klinisch-experimentellen Patientenkollektivs UICC III (n=78)

Das Gewebe der 78 Patienten war zum Zeitpunkt der OP innerhalb der Jahre 1992-2010 entnommen worden. In dieser Doktorarbeit wurde das vorhandene kryokonservierte Gewebe auf einen Zusammenhang zwischen der Expression der Thymidilat-Synthase und dem Ansprechen auf eine Monotherapie mit 5-FU untersucht.

Wie bereits im Methodenteil unter 3.1. beschrieben, wurde die RNA des Tumorgewebes mittels Protokoll und Kit der Firma Quiagen isoliert. Die genaue Vorgehensweise wird unter 3.1.3. beschrieben. Es folgte die quantitative RNA Bestimmung mit anschließender RNA Agarose Gelelektrophorese. Diese zeigte die qualitative Wertigkeit der isolierten RNA. Die Gelelektrophorese zeigte jedoch unerwartet keine verwertbaren 28S- und 18S Banden der RNA aller untersuchten Proben – trotz völlig unauffälliger Positiv-Kontrolle der RNA von Zelllinien (Abbildung 11). Um einen Fehler in der Durchführung der RNA Isolation auszuschließen, wurde einerseits die Isolierung der RNA aus den Geweben 3 mal wiederholt, aber auch bei dieser durchgeführten RNA Agarose Gelelektrophorese ergab sich eine qualitative nicht verwertbare RNA. Andererseits wurde als Kontrolle für die Güte der Gelelektrophorese die Zelllinie DLD1 mitgeführt. Diese zeigte hierbei eine deutliche Darstellung der Banden, sodass auch diese mögliche Ursache ausgeschlossen werden konnte. Vergleiche hierzu Abbildung 11 im Kapitel 3.1.5.

Die H.E. Färbungen, wie unter 3.1.8. beschrieben, konnten problemlos durchgeführt werden, sodass die Qualität der Gewebe trotz der längeren Zeit des Einfrierens nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Vergleiche hierzu Abbildung 17.

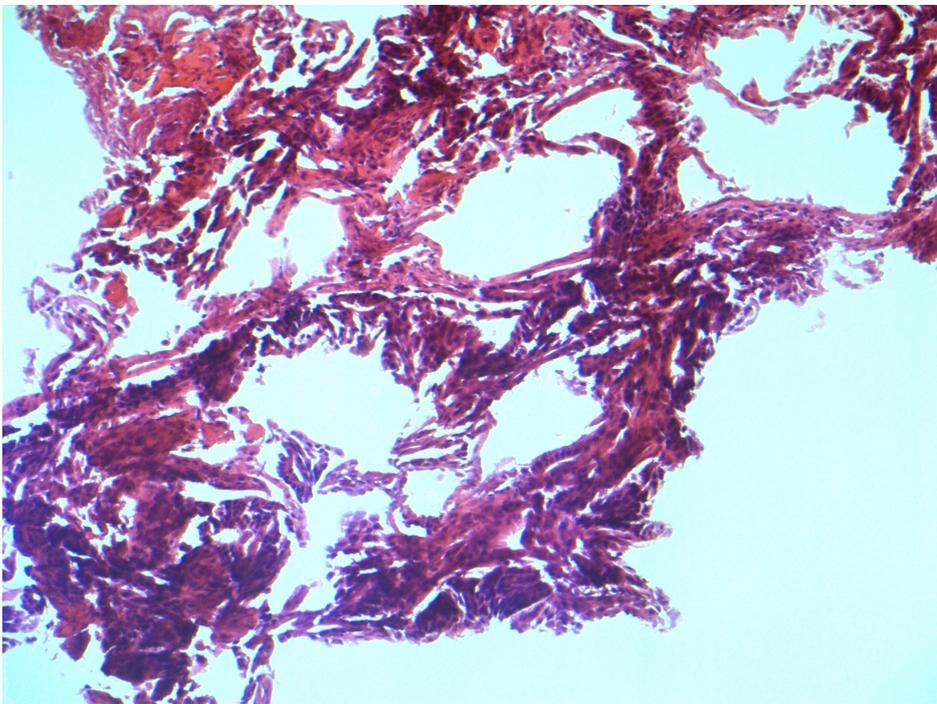


Abbildung 17: Das Bild des Lichtmikroskops zeigt als Beispiel ein Gewebepreparat eines operierten Kolonkarzinoms aus dem Jahr 2002 in H.E. Färbung auf einem Objektträger. Es handelt sich hier um den histologischen Subtyp eines Adenokarzinoms. Die Qualität des Gewebes ist somit von der langen Einfrierdauer nicht wesentlich beeinträchtigt. April 2015.

4.2.2.b. Ergebnisse des klinisch-experimentellen Patientenkollektivs UICC II (n=22)

Um ein Vergleichskollektiv zu erhalten wurde zusätzlich noch ein weiterer Ansatz mit 22 Patienten im UICC Stadium II durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein bereits bekanntes Kollektiv, welches allerdings wie in den Leitlinien verankert keine 5-FU basierte Chemotherapie erhalten hatte. Diese 22 Patienten wurden bereits in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Nitsche et al. vollständig untersucht und analysiert, und von der RNA, bei der erfolgreich eine Degradation ausgeschlossen werden konnte, war cDNA bereits in Stickstoff tiefgefroren (Nitsche et al, 2013). Die Hälfte dieser Patienten, somit 11 an der Zahl, erlitten im Verlauf ein Rezidiv des Kolonkarzinoms.

Es wurde wie unter 3.1.7. beschrieben eine real-time PCR durchgeführt um die Thymidilat-Synthase Expression in den Geweben der Patienten sowohl ohne als auch mit Rezidiv zu messen. Ziel war es herauszufinden ob die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase einen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit der Patienten hat und somit eine prognostische Wertigkeit aufzeigt. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse beider Kollektive zeigt sich in Abbildung 18 und 19.

UICC II ohne Rezidiv

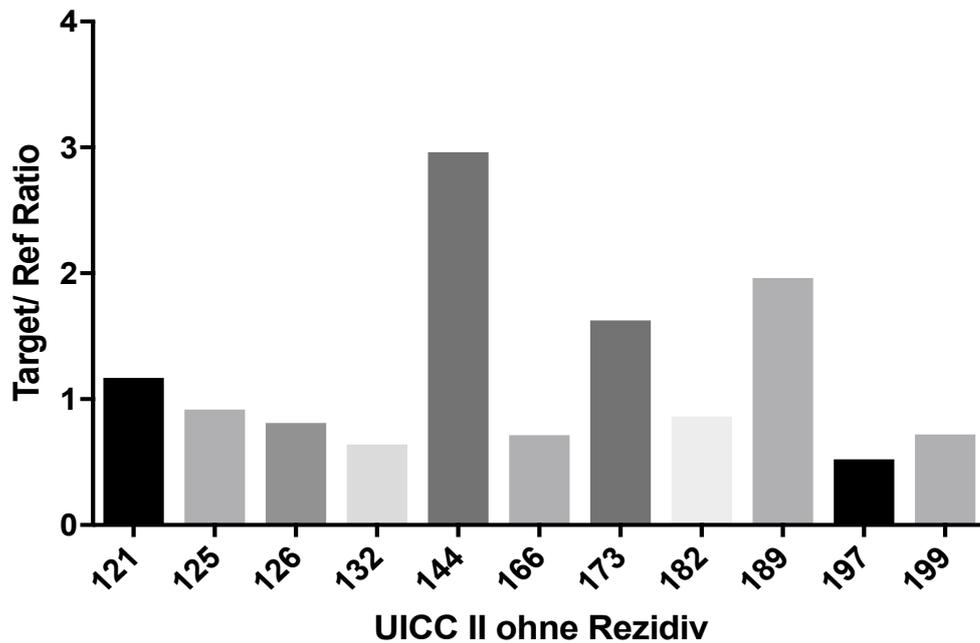


Abbildung 18: Die Grafik zeigt die Thymidilat-Synthese Expressionswerte jener 11 Patienten im UICC Stadium II, welche kein Rezidiv des Kolonkarzinoms im Verlauf erlitten hatten. Die Expressionswerte wurden mittels rt-PCR bestimmt. Die angegebenen Nummern entsprechen den Patientennummern im Labor. Die Target/Reference Ratio bezieht sich auf die Mittelwerte der TS und HPRT. April 2015.

UICC II mit Rezidiv

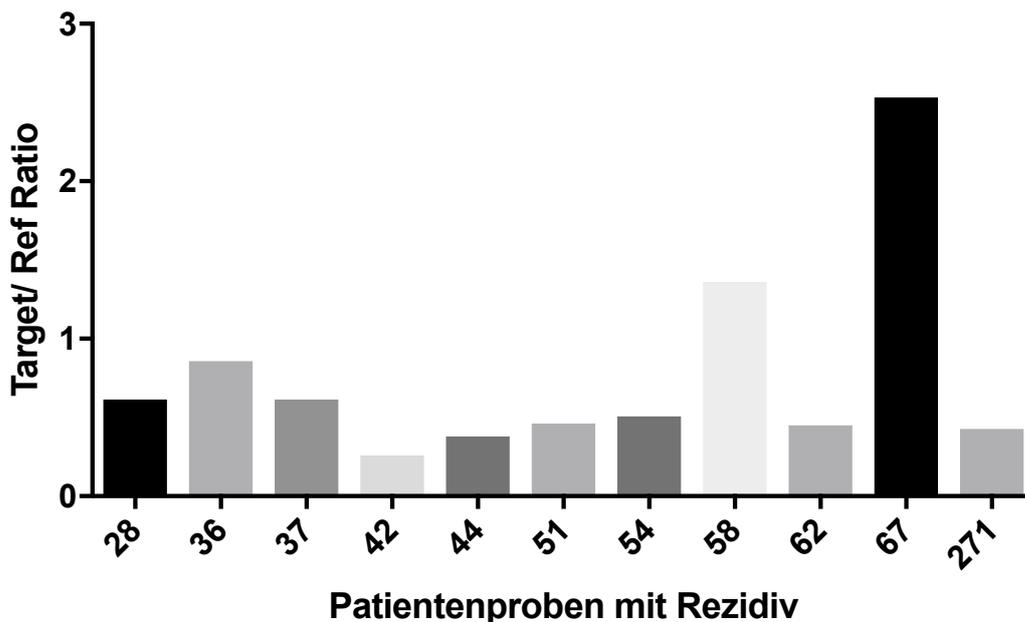


Abbildung 19: Diese Grafik zeigt die Expressionswerte der Thymidilat-Synthase, jener 11 Patienten im UICC Stadium II mit Rezidiv im Verlauf. Die Thymidilat-Synthase Expressionswerte wurden auch hier mittels rt-PCR bestimmt. Die angegebenen Nummern entsprechen den Patientennummern im Labor. Die Target/Reference Ratio bezieht sich auf die Mittelwerte der TS und HPRT. April 2015.

Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte mit einer statistisches Signifikanz von $p = 0,0215$ gezeigt werden, dass jene Patienten, welche ein Rezidiv erlitten hatten, signifikant geringere Expressionswerte der TYMS aufwiesen, als jene die im Verlauf kein Rezidiv erlitten hatten. Dies zeigt sich in Abbildung 20 im Mann-Whitney-Test.

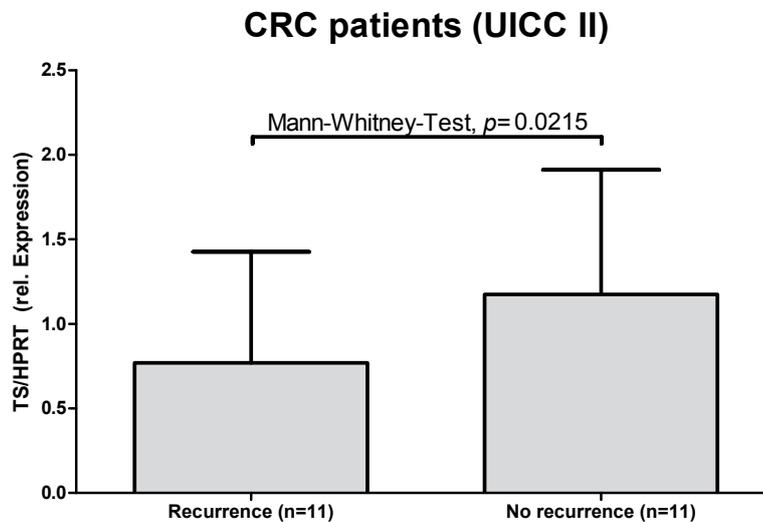


Abbildung 20: Im Mann-Whitney-Test wird das Ergebnis der zuvor bestimmten Expressionswerte der Thymidilat-Synthase im UICC Stadium II bei Patienten mit und ohne Rezidiv dargestellt. Insgesamt umfasst das gesamte Kollektiv 22 Patienten in diesem Experiment. Die Expression der Thymidilat-Synthase in der Gruppe im UICC Stadium II mit Rezidiv zeigte sich signifikant reduziert im Vergleich zur Gruppe ohne Rezidiv mit einem p-Wert von 0,0215. n=22, p= 0,0215; April 2015.

4.2.3. Ergebnisse der Zelllinien

Um zusätzlich weitere Vergleichswerte zu erhalten, wurde ein alternativer Ansatz mit Zelllinien durchgeführt.

4.2.3a. 5-Fluorouracil Zell - Stress -Test Auswertung

Der Versuch wurde wie unter 3.1.9.a. mit der Zelllinie DLD1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse konnten zeigen, dass sich die Expression der Thymidilat-Synthase in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des 5-FUs nicht signifikant veränderte ($p=0,8545$). Die Grafik der Abbildung 21 zeigt die Mittelwerte der insgesamt dreimal durchgeführten Versuche mit Standardabweichung der Zelllinie DLD1 im 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test.

Mittelwerte mit Standardabweichung

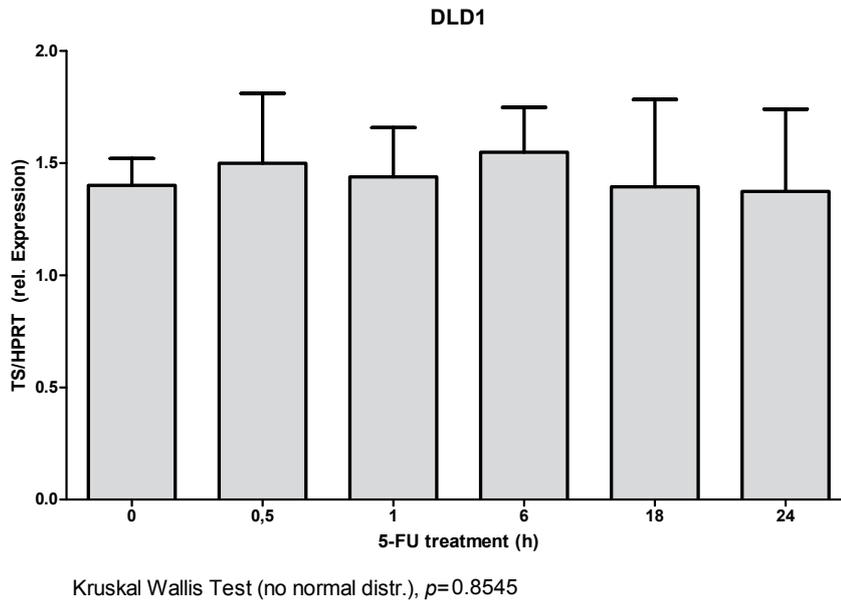


Abbildung 21: In dieser Darstellung zeigt sich die relative Thymidilat-Synthase Expression der Zelllinie DLD1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einwirkzeiten (0, 0,5, 1, 6, 18 und 24 Stunden) des 5-Fluorouracils. Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt, sodass die hier gezeigten Ergebnisse den Mittelwert aller durchgeführten Versuche darstellen. Eine statistisch signifikante Veränderung der Thymidilat-Synthase Expression in Abhängigkeit der Wirkdauer des 5-Fluorouracils konnte hierbei nicht festgestellt werden ($p=0,8545$). April 2015.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TYMS der Zelllinie DLD1 mit keiner Gegenregulation reagiert, denn die Expression des Enzyms bleibt über den Zeitraum relativ konstant. Aufgrund dieser Tatsache, wurden die Thymidilat-Synthase Expressionswerte in fünf weitere Zelllinien, CaCo2, HT29, HCT116, SW480 und SW620 bestimmt und mit jener der DLD1 Zelllinie verglichen. Die graphische Darstellung der Expressionswerte mit Standardabweichung zeigt Abbildung 22.

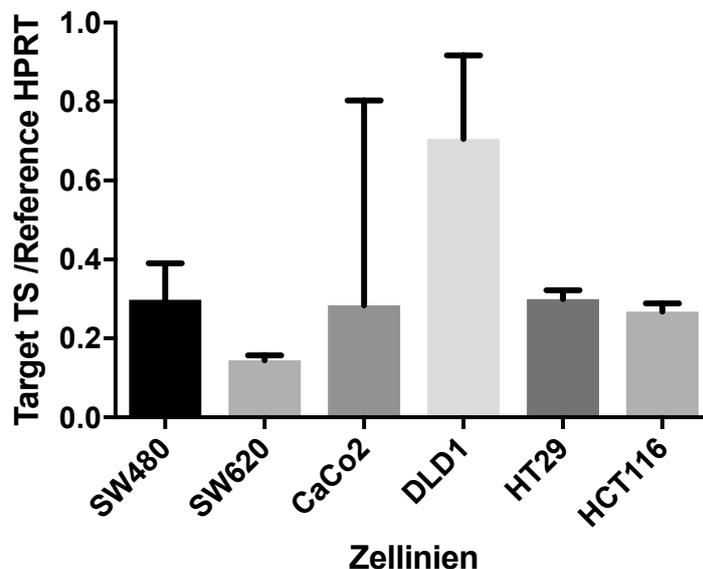


Abbildung 22: Die graphische Darstellung präsentiert die Mittelwerte der Zelllinien SW480, Sw620, CaCo2, DLD1, HT29 und HCT116 der Thymidilat-Synthase Expression im Verhältnis zur Hypoaxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase mit Angabe der jeweiligen Standardabweichungen. Es konnte somit gezeigt wird, dass sich die Thymidilat-Synthase Expressionswerte in den hier verwendeten Zelllinien deutlich voneinander unterscheiden. April 2015.

Die Expressionsanalysen der Thymidilat-Synthase in den fünf weiteren Zelllinien, neben DLD1, zeigen deutlich unterschiedliche Werte über vier Zellgenerationen hinweg.

4.2.3b. Klon Assay Auswertung

Die Durchführung des Versuchs wird unter 3.2.9b. beschrieben. Die Zelllinie DLD1, in Petrischalen zu je 10^5 Zellen, wurde mit 0, 10, 100 und 1000 μM 5-FU über insgesamt 14 Tage behandelt. Ziel war es, herauszufinden ob die Zellzahl durch mehr Konzentration an 5-FU über denselben Zeitraum, eine Dosis-spezifische Abnahme zeigt. Somit wurden die Zellen nach 14 Tagen mittels Crystal Violet gefärbt, sodass die Anzahl der zurückgebliebenen Kolonien nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-FU gezählt werden konnten. Dazu Abbildung 23. Die Zählung der Kolonien erfolgte hierbei auf zwei verschiedene Arten, einerseits wurden die Anzahl der Klone per Hand mittels Clone count, andererseits mittels einer Software namens ImageJ bestimmt. Hierbei zeigten sich mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse, wie die Abbildungen 24 und 25 zeigen.

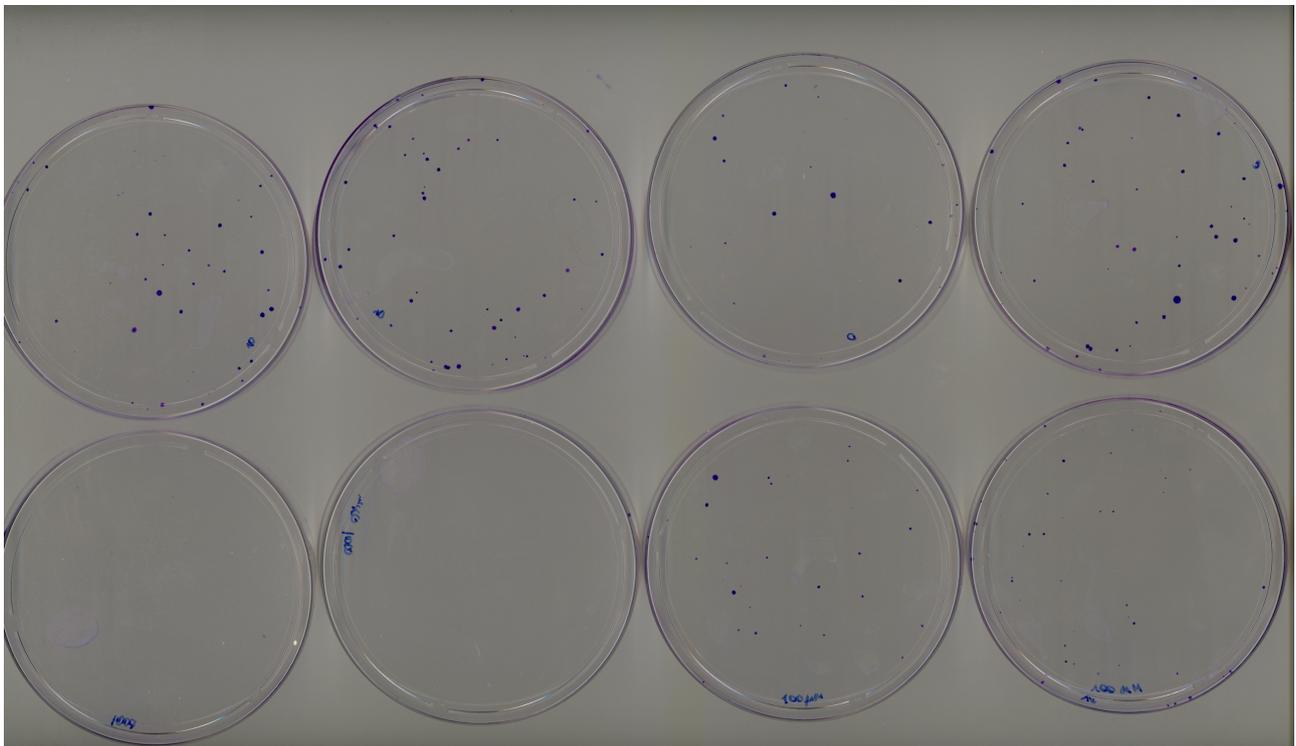


Abbildung 23: Das im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Janssen aufgenommene Foto zeigt insgesamt acht Petrischalen nach Behandlung mit $0\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ (oben von rechts nach links), $100\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M}$ (unten von rechts nach links) 5-Fluoruracil und Färbung mit Crystal Violet. Jede Petrischale wurde mit 10^5 DLD1 Zellen beimpft. Es wurden je zwei Petrischalen mit derselben Konzentration an 5-FU als Kontrolle behandelt. April 2015.

**DLD 1 Clones + 0 - 10 - 100- 1000 μ M Fluoruracil,
6 Stunden
Viability: Total Area (ImageJ) - Clonogenic Assay**

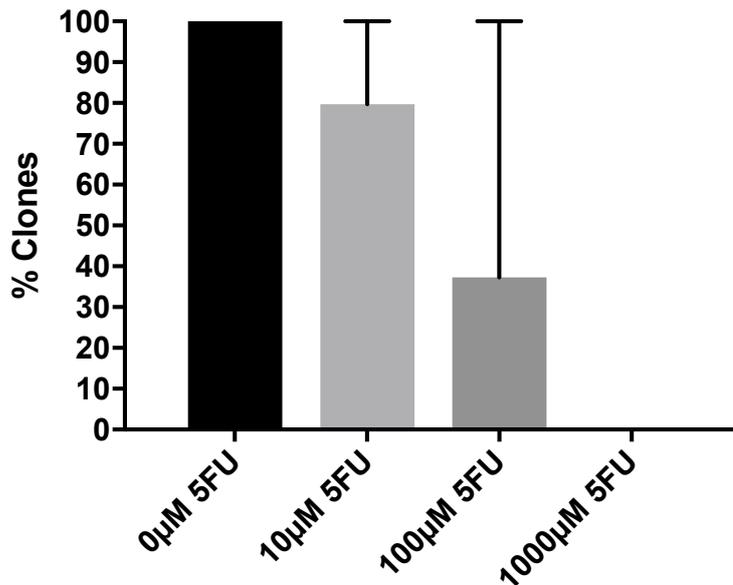


Abbildung 24: Die Zellklone wurden mittels ImageJ Software quantifiziert und in % Angabe graphisch in Abhängigkeit von der Konzentration (μ M) an 5-Fluoruracil dargestellt. Das Ergebnis zeigt eine Dosis-spezifische Abnahme der Zellzahl, mit vollständiger Suppression des Zellwachstums bei einer 5-FU Konzentration von 1000 μ M. n=1, April 2015.

**DLD 1 Clones + 0 - 10 - 100- 1000 μ M Fluoruracil,
6 Stunden
Viability: Clone Count - Clonogenic Assay**

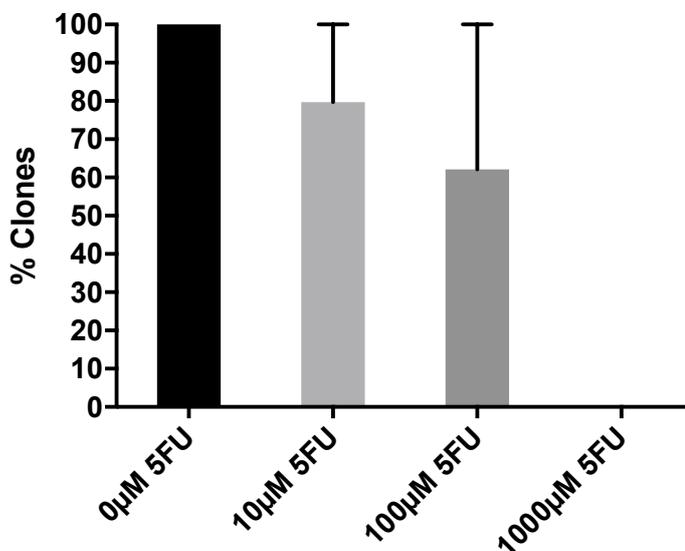


Abbildung 25: Die zweite Darstellung der Ergebnisse des Klon Assay mit der Zelllinie DLD1 zeigt die Auswertung mittels manueller Zählung der Zellkolonien. Die % Angabe erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration des 5-Fluoruracils. Auch hier zeigt sich eine vollständige Suppression des Zellwachstums der Zelllinie DLD1 bei 1000 μ M 5-Fluoruracil. Somit kann hier von einer Dosis-spezifischen Abnahme des Zellwachstums in Abhängigkeit von der Konzentration an 5-FU gesprochen werden. April 2015.

Die Auswertung der Zählung zeigt, dass es einen Dosis-abhängigen Effekt auf das Wachstum der Zelllinie DLD1 gibt. Bei der maximal verwendeten Konzentration von 1000 μM 5-FU wurden keinerlei Zellkolonien gefunden. Aufgrund der Ergebnisse wurde die sogenannte mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechnet. Diese beschreibt jene Konzentration an 5-FU, bei der eine halbmaximale Wachstumsinhibition beobachtet wird. Die Bestimmung der IC_{50} erfolgte mittels GraphPad Prism 5.00 für Windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA). Hierbei wird das obere beziehungsweise das untere Plateau aus den Werten sowie das vorhandene Gefälle berücksichtigt, um auf die mittlere inhibitorische Konzentration zu schließen. Die graphische Darstellung der Hemmkurve für die Zelllinie DLD1 ist in Abbildung 26 gezeigt.

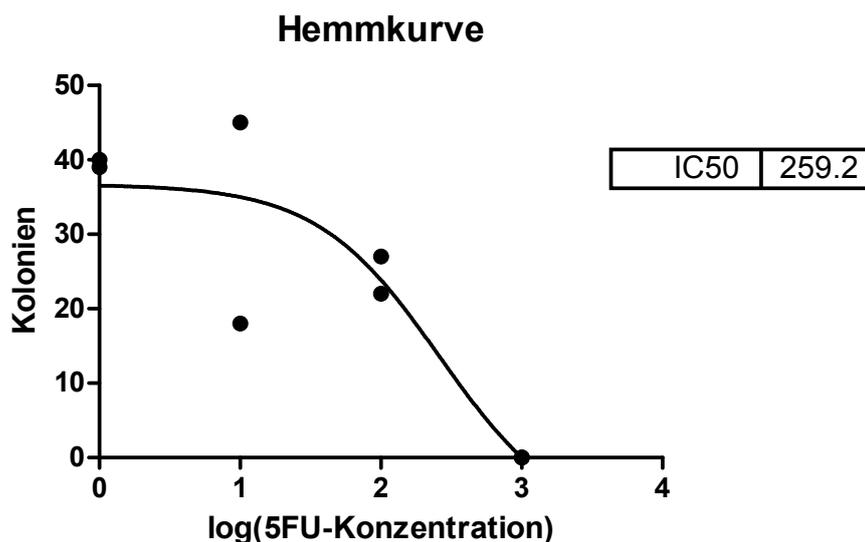


Abbildung 26: Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), beschreibt jene Konzentration (μM) an 5-FU, bei welcher eine halbmaximale Wachstumsinhibition der Zelllinie (in diesem Fall DLD1) beobachtet wird. Das Programm GraphPad Prism 5.00 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet anhand des oberen und unteren Plateaus sowie dem Gefälle die mittlere inhibitorische Konzentration. Diese beträgt bei dem durchgeführten Experiment mit der Zelllinien DLD 1 259,2 μM 5-FU. Bei dieser Konzentration an 5-FU wird 50% des Zellwachstums bei der Zelllinie DLD1 in vitro gehemmt. April 2015.

Die Hemmkurve zeigt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bei 259,2 μM 5-FU. Diese Konzentration ist nötig, damit 50% des Zellwachstums der Zelllinie DLD1 in vitro gehemmt wird.

5. Diskussion

5.1. Das kolorektale Karzinom und die aktuellen Empfehlungen für seine multimodale Behandlung

Wie bereits in der Einleitung unter Kapitel 1.3. erwähnt, ist die onkologisch-chirurgische Resektion im Falle einer kurativen Zielsetzung eine unverzichtbare Säule in der multimodalen Therapie des kolorektalen Karzinoms. Dies erfolgt gemäß den aktuellen Standards, oder wie intensiv diskutiert wird, als mesokolische Resektion, in beiden Fällen mit zentraler arterieller Ligatur und radikaler Lymphadenektomie.

Bei einem multimodalen Ansatz kann die Radio/-Chemotherapie die Operation ergänzen und sowohl vor der Operation (neoadjuvant), als auch nach der Operation (adjuvant) stattfinden. Trotz guter Resultate nach neoadjuvanter Therapie (FOXTROT Studie) hat sich ein neoadjuvantes Konzept beim Kolonkarzinom bislang nicht durchgesetzt (Fox Trot Collaborative Group, 2012). Gleiches gilt für die Strahlentherapie, die eine große Relevanz beim Rektumkarzinom aufweist, beim Kolon sich aufgrund der hochmobilen Anatomie und Nähe zum radiosensitiven Dünndarm, jedoch nicht etablieren konnte. Zudem ist die Strahlentherapie eine lokale Therapieform, hat aber keinen Einfluss auf die systemische Metastasierung. Allerdings ist gerade diese das Problem in der Langzeitprognose des Kolonkarzinoms. Entsprechend kann man die multimodale Therapie des Kolonkarzinoms auf die adjuvante Chemotherapie einschränken. Dies ist gemäß den aktuellen Empfehlungen der Leitlinien und der aktuellen Literatur für das Stadium III und für Risikopatienten im Stadium II durchzuführen. Siehe hierzu auch Tabelle 48, die eine Übersicht der Empfehlungen zur adjuvanten Therapie gemäß den Leitlinien in Abhängigkeit vom UICC Stadium darstellt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Tabelle 48: Übersicht über adjuvantes Vorgehen beim Kolonkarzinom entsprechend den aktuellen Empfehlungen der Leitlinien (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

UICC-Stadium	Procedere
I	Keine adjuvante Therapie
II	Keine adjuvante Therapie, mit Ausnahme von Hochrisikopatienten (T4, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering, schlechtes histologisches Grading)
III	Adjuvante Chemotherapie
IV	Individuelle Abwägung, meist palliative Therapie

Für die Indikation zur adjuvanten Therapie nach Tumorresektion ist die pathohistologische Stadienbestimmung, insbesondere die Bestimmung des pN-Status von entscheidender Bedeutung. Zur Festlegung von pN0 sollen 12 oder mehr regionäre Lymphknoten entfernt und histologisch untersucht werden (UICC 2017) (Wittekind Christian, 2017). Laut den deutschen Leitlinien ist eine adjuvante Therapie im Stadium I nicht indiziert, da keine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht wird beziehungsweise die Nachteile der Chemotherapie den potentiellen Vorteilen überlegen sind (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

Patienten mit den UICC Stadien II und III sollten, sofern möglich, in kontrollierte, prospektive Studien eingebracht werden, um so Information über die Indikation und optimale adjuvante Therapie zu erhalten. Derzeit wird bei Patienten im Stadium II keine zwingende Indikation zur adjuvanten Therapie gesehen. Eine Ausnahme davon stellen Patienten mit hohem Risiko dar, dazu zählen das Tumorstadium T4, Tumorperforation oder -einriss, eine Operation unter Notfallbedingungen, zu geringe Anzahl untersuchter Lymphknoten und ein schlechtes histologisches Grading. Man spricht, sofern eines der sieben aufgezählten Risiken zutrifft, von einem sogenannten „high-risk“ Karzinom. (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Allerdings profitieren nicht alle Subgruppen, sodass eine weitere Stratifizierung erwünscht ist. Aktuell wird daher in dieser Situation, gegebenenfalls in Abhängigkeit vom mikroskopischen Wachstumsmuster, zusätzlich der Mikrosatellitenstatus des Patienten im UICC II bestimmt. Falls sich eine Instabilität (MSI) zeigt, wird, wie bereits im Kapitel 1.7. erwähnt, keine adjuvante 5-FU basierte Chemotherapie aufgrund des mangelnden Ansprechens auf 5-Fluorouracil, durchgeführt. Im Falle einer Mikrosatellitenstabilität (MSS) wird eine adjuvante Chemotherapie mit einem 5-FU Analogon als Monotherapie empfohlen.

Im Stadium UICC III wird generell die Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie gestellt, wobei diese in Abhängigkeit vom Alter und Status des Patienten 5-Fluorouracil basiert als Monotherapie oder als Polychemotherapie (zum Beispiel FOLFOX) erfolgen sollte. Dennoch profitieren nicht alle Patienten von der Chemotherapie, sodass es trotz der R0 Resektion und adjuvanter Therapie zu einem Tumorrezidiv kommen kann.

Die Tatsache, dass im UICC Stadium III nach R0 Resektion des Primarius eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt wird, Patienten jedoch dennoch rezidivieren, lässt vermuten, dass nicht alle Patienten von der adjuvanten Therapie profitieren beziehungsweise adäquat darauf ansprechen. Diese Tatsache wirft eine wichtige Fragestellung auf, nämlich wie man in Zukunft eine Prognose darüber geben kann, welcher Patient von einer Chemotherapie profitieren wird und welcher nicht, beziehungsweise welchem Patient die Toxizität einer nicht-effektiven Chemotherapie erspart werden kann.

Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass eine adjuvante Chemotherapie die Rezidivrate senken kann, wenn der Patient darauf anspricht. Dies lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass das disease-free-survival der Patienten nach alleiniger OP etwa 50% beträgt, bei zusätzlicher adjuvanter Chemotherapie auf 60-70% gesteigert werden kann. Hieraus ergibt sich eine Reduktion des Risikos für ein Tumorrezidiv von etwa 10%-20%. Auf der anderen Seite scheint es zumindest, dass bei 30-40% der Patienten die zusätzliche Therapie das Rezidiv nicht verhindert, beziehungsweise möglicherweise nur hinauszögert. Dabei zeigt sich, dass 80 Prozent der Rezidive beim Kolonkarzinom innerhalb der ersten drei Jahre auftreten, wohingegen das Rezidivrisiko ab dem 5. Jahr auf unter 5% absinkt (Kosmider et al, 2007). Gegenüber diesem explorativen Ansatz, wäre eine Stratifizierung aller Patienten in eine Gruppe, die auf eine zusätzliche Chemotherapie anspricht und eine Gruppe, die von einer derartigen Maßnahme nicht profitiert, durchaus sinnvoller. Ein derartiger Ansatz würde nicht-effektive Chemotherapien vermeiden, und damit Kosten und Komorbiditäten reduzieren, könnte aber auch für Patienten, die bislang keine Chemotherapie erhalten (UICC Stadium I und II non-risk), einen Vorteil beinhalten.

5.1.1. Chemotherapie im UICC Stadium III

Eine Oxaliplatin-haltige Therapie stellt den Standard in der adjuvanten Therapie im UICC Stadium III dar (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Dabei wird meist das sogenannte FOLFOX-Schema verwendet, bestehend aus Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin. Ein Zyklus umfasst 2 Wochen, insgesamt werden 12 Zyklen laut Leitlinien empfohlen.

Die NSABP-Studie konnte zeigen, dass die 4-Jahres krankheitsfreie Überlebensrate im UICC Stadium II und III von 67,0% auf 73,2% signifikant gesteigert werden konnte, wenn zusätzlich Oxaliplatin in der adjuvanten Therapie mit 5-FU und Folinsäure kombiniert wurde (Kuebler et al, 2007). In der MOSAIC-Studie mit 2246 Patienten wurde das FOLFOX4 Schema mit der Kombination aus 5-Fluorouracil und Folinsäure mit 12 Zyklen verglichen. Dabei konnte erneut gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung des krankheitsfreien Überlebens kommt. Betrachtet man dabei nur das UICC Stadium III, so konnte eine Steigerung des krankheitsfreien Überlebens von 7,3 Prozent (Hazard Ratio (HR) 0,78; 95% CI: 0,65-0,93; p=0.005) und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens um 4,4 Prozent (p=0,029) nachgewiesen werden (De Gramont et al, 2007).

Falls es eine Kontraindikation gegen das FOLFOX-Schema gibt, so sollte eine Monotherapie mit bevorzugt oralem, falls nicht möglich intravenösen Fluoropyrimidinen durchgeführt werden. Dabei wurde bei Patienten im UICC Stadium III gezeigt, dass die orale Gabe von Capecitabin, dem oralen Prodrug (=Vorstufe) von 5-FU, genauso effektiv ist wie die Gabe von 5-FU/Folinsäure nach dem Mayo-Schema. Das Nebenwirkungsprofil unterscheidet sich hierbei nicht wesentlich (Twelves Chris J., 2006).

5.1.2. Chemotherapie im UICC Stadium II

Die bislang größte Studie zur Effektivität der adjuvanten Chemotherapie im UICC Stadium II war die QUASAR Studie. Insgesamt wurden 3239 Patienten nach R0 Resektion im UICC Stadium II zwischen Mai 1994 und Dezember 2003 in 19 Ländern eingeschlossen. Es erhielten 1622 Patienten eine adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Folinsäure, wohingegen das Vergleichskollektiv von 1617 Patienten alleinig nachgesorgt wurde. Die Studie konnte den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie im Stadium II ohne Risikofaktoren nicht mit voller Zufriedenheit klären. Es zeigte sich nur eine geringe absolute Verbesserung des Überlebens um 3,6%, die jedoch gegen die Chemotherapie assoziierte Toxizität und der damit verbundenen Mortalität abgewogen werden muss (0,82%). Gemäß dieser Studie sollte dennoch eine adjuvante Therapie im UICC Stadium II zumindest in Betracht gezogen werden (Quasar Collaborative Group, 2007).

Selektioniert man aber, wie bereits erwähnt, die Patienten im Stadium II die definierte Risikofaktoren aufweisen (pT4, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering, schlechtes histologisches Grading), so steigt das Rezidivrisiko deutlich an, sodass dann die Vorteile der Chemotherapie überwiegen und daher eine adjuvante Therapie gemäß den deutschen Leitlinien durchgeführt werden sollte (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Caplin et al. zeigten zudem, dass Patienten bei denen 6 oder weniger Lymphknoten entfernt wurden, ein schlechteres klinisches Ergebnis hatten, als jene, bei denen 7 oder mehr Lymphknoten entfernt wurden (Caplin et al, 1998). Zum selben Schluss kamen Peeples et al. im Jahr 2010, auch wenn in dieser Studie erst bei mindestens 24 entfernten Lymphknoten ein

signifikant verbessertes Überleben im UICC II festgestellt wurde (Peeples et al, 2010). Somit sollte auch im Falle von zu wenig entfernten Lymphknoten (<12 Lymphknoten) eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017). Allerdings gibt es hierzu bislang keine Studien, die den Vorteil einer solchen Therapie klar belegen, sodass zunächst die Vor- und Nachteile abgewogen werden müssen und der Patient intensiviert darüber aufgeklärt werden muss.

Sollte bei Patienten im UICC Stadium II eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, so sollten laut den deutschen Leitlinien auch ein Fluoropyrimidine als Monotherapie verwendet werden. Dieses Schema wird aufgrund der geringeren Toxizität bevorzugt.

5.1.3. Rationale der Chemotherapie - Derzeitige Schemata: FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI

Die adjuvante (nach einer R0 - Resektion) Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms im UICC Stadium II high-risk und UICC Stadium III erfolgt derzeit bei guten Allgemeinzustand mit Fluoropyrimidin-basierten Kombinationsregimen. Dazu zählen laut den S3-Leitlinien die Schemata FOLFOX im adjuvanten Setting und FOLFIRI als Zweitlinientherapie oder im palliativen Setting (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

5.1.3a. FOLFOX

Das FOLFOX-Schema besteht aus den drei Substanzen 5-Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin. Das Standardschema umfasst 12 Zyklen mit vierzehntägigem Rhythmus. Tabelle 49 zeigt dabei eine von vielen möglichen Dosierungen und Applikationsformen. Die Zahl hinter dem FOLFOX (FOLFOX-4/-6) steht je für eine Art der Verabreichung und Dosierung. Der Unterschied zwischen FOLFOX 4 und 6 liegt darin, dass bei FOLFOX6 nach einer 5-FU Bolusgabe am ersten Tag eine 46 Stunden Pumpe mit 2400 mg/m² (ab dem dritten Zyklus bei fehlender Toxizität Steigerung auf 3000 mg/m²) 5-Fluorouracil und bei FOLFOX4, wie in Tabelle 49 zu sehen ist, eine 22 Stunden Pumpe mit 600 mg/m² 5-Fluorouracil verwendet wird. Somit bleibt dem Patienten beim FOLFOX6 Schema eine zweite Bolusgabe und ein Wechsel der Pumpe am zweiten Tag erspart. Ein weiterer Unterschied liegt in einer höheren Dosis an Oxaliplatin 100 mg/m² bei FOLFOX6 gegen 85 mg/m² bei FOLFOX4. Die Zyklusdauer und Therapiedauer unterscheidet sich jedoch nicht.

Tabelle 49: Die drei Leitsubstanzen des FOLFOX4-Schemas sind 5-Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin. FOLOFX4 bedeutet, dass die 5-Fluoruracil Pumpe 22 Stunden mit 600 mg/m² läuft und dann gewechselt werden muss mit einem erneuten 5-FU Bolus. Bei FOLFOX6 wären es 46 Stunden mit 2400 mg/m² mit Steigerung ab dem dritten Zyklus bei fehlender Toxizität auf 3000 mg/m² und ohne Pumpenwechsel mit erneuten 5-FU Bolus. Die Dosis von 100 mg/m² Oxaliplatin ist um 15 mg/m² mehr als bei FOLFOX4. Insgesamt umfassen beide Schemata 12 Zyklen in einem 14-tägigem Rhythmus.

FOLFOX4				
Substanz	Dosis	Applikation	Dauer	Tag
Oxaliplatin	85 mg/m ²	i.v. Infusion	2h	1
Folinsäure	200 mg/m ²	i.v. Infusion	2 h	1 + 2
5-Fluorouracil	400 mg/m ²	i.v. Bolus	2 min	1 + 2
5-Fluorouracil	600 mg/m ²	i.v. Infusion	22 h	1 + 2

Wie bereits erwähnt, wurde in der MOSAIC Studie eine adjuvante Therapie bestehend aus 5-Fluorouracil und Leucovorin mit dem FOLFOX4 Schema verglichen. Nach chirurgischer Resektion wurden 2246 Patienten im UICC Stadium II (40%) und III (60%) in die Studie eingeschlossen, davon erhielten 2200 eine adjuvante Therapie. Hierbei konnte für das FOLFOX4 Schema im Gesamtkollektiv ein signifikanter Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Überlebens nachgewiesen werden (73,3% versus 67,4% p= 0,003). Auch das Gesamtüberleben wurde im UICC Stadium III durch die FOLFOX-4 Chemotherapie signifikant verbessert (p=0,029). Die MOSAIC-Studie konnte erstmals zeigen, dass eine adjuvante Kombinationstherapie mit FOLFOX-4 gegenüber der Monotherapie mit 5-Fluorouracil einen Vorteil aufweist (Thierry et al, 2004; De Gramont et al, 2007).

Weitere Studien konnten dies bestätigen. Jeon et al. etwa untersuchten in einer retrospektiven Studie 82 Patienten im UICC Stadium III und II high-risk, wobei hier ausschließlich das krankheitsfreie Intervall betrachtet wurde. Auch hier zeigte die adjuvante Therapie mit FOLFOX-4 oder -6 einen Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Überlebens (Jeon et al, 2011).

5.1.3b. FOLFIRI

Ein weiteres Therapieschema ist das FOLFIRI Protokoll, welches vorwiegend im palliativen Setting oder als Zweitlinientherapie eingesetzt wird. Diese Therapie besteht aus drei Wirkstoffen, zu denen 5-Fluorouracil, Folinsäure und Irinotecan zählen. Tabelle 50 zeigt dabei die Dosis und Verteilung der Therapie. Auch hier besteht die Therapie aus insgesamt 12 Zyklen, die sich alle vierzehn Tage wiederholen.

5-Fluorouracil stellt somit einen zentralen Bestandteil in beiden Schemata dar. Die Anwendung von Irinotecan zeigte im adjuvanten Setting in Studien von Papadimitriou et al. und Saltz et al. keinen Vorteil weder im Gesamtüberleben noch im krankheitsfreien Überleben, gegenüber FOLFOX. Es kommt sogar zu einer signifikanten Zunahme der durch die Toxizität aufgrund der durch Irinotecan bedingten Nebenwirkungen, wie Neutropenie und Leukopenie (Papadimitriou et al, 2011; Saltz et al, 2007). In einer weiteren Studie von Colucci et al. wurden FOLFOX und FOLFIRI bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium (UICC IV) und in einer palliativen Situation verglichen. Beide Gruppen hatten zuvor keine Chemotherapie erhalten. Erneut zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder bezüglich der Gesamtansprechrate, noch dem progressionsfreien und dem gesamten Überleben. Erneut zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede bezüglich des Toxizitätsprofils. Dabei fanden sich bei Irinotecan vor allem hämatologische und gastrointestinale Nebenwirkungen, sowie eine ausgeprägte Alopezie, während man unter Oxaliplatin die oben bereits erwähnte Polyneuropathie am häufigsten feststellen konnte (Colucci et al, 2005).

Tabelle 50: Das FOLFIRI-Schema enthält 5-Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan und ist ebenfalls wie das FOLFOX Schema für 12 Zyklen im 14-tägigen Rhythmus vorgesehen. Dieses Schema wird vor allem im palliativen Setting und als Zweitlinientherapie eingesetzt. Der Vorteil gegenüber von FOLFOX besteht in der fehlenden kumulativen Toxizität von Oxaliplatin, welche sich vor allem in einer Polyneuropathie zeigt. Allerdings zeigen sich bei Irinotecan vor allem gastrointestinale sowie hämatologische Nebenwirkungen und eine Alopezie.

FOLFIRI				
Wirkstoff	Dosis	Applikation	Dauer	Tag
Irinotecan	180 mg/m ²	i.v. Infusion	2 h	1
Folinsäure	200 mg/m ²	i.v. Infusion	2 h	1 + 2
5-Fluorouracil	400 mg/m ²	i.v. Bolus	2 min	1 + 2
5-Fluorouracil	600 mg/m ²	i.v. Infusion	22 h	1 + 2

Der Vorteil der FOLFIRI Therapie liegt somit alleine darin, dass die durch Oxaliplatin bedingte Neurotoxizität, welche kumulativ ist, wegfällt. Daher wird das Schema nur noch als Zweitlinie und bereits erfolgter Oxaliplatin-basierter Chemotherapie empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).

5.1.4. Antikörper im adjuvanten Setting

Zielgerichtete Therapien unter Verwendung von Antikörpern finden derzeit primär Anwendung im palliativen Setting. Aber auch in der adjuvanten Situation im Stadium III wurden sie bereits untersucht. So behandelten Alberts et al. 2686 Patienten im UICC Stadium III mit 12 Zyklen FOLFOX6 und wahlweise ohne oder mit zusätzlicher Gabe des Antikörpers Cetuximab, einem Epidermal Growth Factor Rezeptor-Antikörper. Dabei wurde zuvor der KRAS-Status bestimmt und zusätzliche Untergruppen gebildet. 717 Patienten hatten eine KRAS Mutation, 1863 Patienten hatten keine KRAS Mutation (Wildtyp) und bei 106 war der Status unklar. Primärer Endpunkt der Studie war das krankheitsfreie Überleben, sekundäre Endpunkte waren die Toxizität und das Gesamtüberleben. Das mittlere Follow-up betrug 28 Monate und es zeigte sich kein Profit bei zusätzlicher Gabe von Cetuximab. In der Wild-Typ KRAS Gruppe war die 3-Jahres Überlebensrate von FOLFOX6 alleine 74.6% im Vergleich zu 71.5%, wenn zusätzlich Cetuximab verabreicht wurde. Auch in der Untergruppe der KRAS-Mutationen zeigte sich kein Vorteil für Cetuximab (67.1% FOLFOX6 vs. 65.0% FOLFOX6 mit Cetuximab). Des Weiteren waren unerwünschte Ereignisse und Therapieabbrüche bei jenen Patienten, die zusätzlich den Antikörper erhalten haben, signifikant häufiger. Bei Patienten die 70 Jahre alt oder älter waren, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Toxizität bei der zusätzlichen Gabe des Antikörpers. Somit ist die zusätzliche Verwendung von Cetuximab im adjuvanten Setting mit keiner Verbesserung des Gesamtüberlebens assoziiert und wird daher bisher nur im palliativen Setting, sofern keine KRAS-Mutation vorliegt, empfohlen. Die Gabe des Antikörpers erfolgt hierbei häufig in Kombination mit Irinotecan (Alberts et al, 2012).

Im Jahre 2012 publizierten deGramont et al. die Ergebnisse ihrer Studie über den Nutzen von FOLFOX4 in Kombination mit Bevacizumab, einem Antikörper gegen den Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF). Die Studie umfasste 3451 Patienten mit kurativ resezierten Kolonkarzinom im UICC Stadium III, sowie jene mit hohem Risiko im UICC Stadium II. Dabei erhielt eine Gruppe mit 955 Patienten nur FOLFOX4 für 12 Zyklen. Innerhalb dieser Gruppe entwickelten 237 Patienten (25%) nach durchschnittlich 48 Monaten follow-up ein Rezidiv. Die zweite Gruppe mit 960 Patienten erhielt FOLFOX4 plus Bevacizumab über 8 Zyklen. Dabei zeigte sich innerhalb der 48 Monate bei 280 Patienten (29%) der soeben erwähnte Endpunkt. Die dritte und letzte Gruppe mit 952 Patienten wurde mit Bevacizumab und XELOX über 8 Zyklen therapiert. Hierunter entwickelten 253 Patienten (27%) ein Rezidiv. Insgesamt verstarb therapiebedingt ein Patient unter FOLFOX4, zwei Patienten unter FOLFOX4 mit Bevacizumab und fünf Patienten unter XELOX mit Bevacizumab (De Gramont et al, 2012). Im Jahre 2016 publizierten Kerr et al. eine ähnliche Studie mit der Frage nach dem Nutzen einer zusätzlichen Gabe von Bevacizumab zu Capecitabin. Zwischen den Jahren 2005 und 2010 wurde 1952 Patienten im UICC III oder mit hohem Risiko im UICC Stadium II, entweder mit Capecitabin alleine (968 Patienten) oder zusätzlich mit Bevacizumab (973 Patienten) im adjuvanten Setting behandelt. Dabei zeigte sich bezüglich des 3-Jahres krankheitsfreien Überleben kein signifikanter Unterschied

zwischen beiden Gruppen (78.4% Capecitabin vs. 75.4% Capecitabin plus Bevacizumab). Die therapiebedingten Todesfälle waren unter der zusätzlichen Gabe von Bevacizumab mit 15 Fällen im Vergleich zu 8 Fällen in der Monotherapie deutlich höher (Kerr et al, 2016).

Somit zeigte sich auch für Bevacizumab kein Vorteil für das krankheitsfreie Überleben im UICC Stadium III oder high-risk Stadium II. Die Daten lassen zudem eine zusätzliche schädigende Wirkung des Antikörpers vermuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die adjuvante Chemotherapie unter Berücksichtigung der Chemotoxizität aktuell für das Stadium III und in der Risikosituation im Stadium II induziert ist. Die derzeit üblichen Schemata sind hierbei Fluoropyrimidin basiert, entweder als Monotherapie (Stadium II, alte Patienten) oder als Polychemotherapie analog dem FOLFOX Schema (vor allem Stadium III). Sowohl Irinotecan (FOLFIRI) als auch die Antikörper Bevacizumab und Cetuximab im Sinne einer zielgerichteten Therapie kommen vor allem im palliativen Setting oder als Zweitlinientherapie des Kolonkarzinoms zum Einsatz.

5.2. Selektive Chemotherapie unter Berücksichtigung der Thymidilat-Synthase?

5.2.1. Analyse der eigenen molekulargenetischen Ergebnisse am Patientenkollektiv im UICC Stadium III

Die Analyse des Patientenkollektivs erfolgte, wie unter 4.2.2.a. beschrieben und konnte, wie bereits kurz erläutert, keine verwertbaren 28S- und 18S- Banden in der Gel-Elektrophorese hervorbringen. Somit konnte aufgrund der Elektrophorese Ergebnisse keine cDNA-Isolierung durchgeführt werden, welche für die reverse-Polymerase-Kettenreaktion benötigt wird, um die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase zu bestimmen.

Mögliche Ursachen für die nicht erfolgreiche RNA Isolierung könnten sein, dass das Gewebe zu lange im Stickstoff tiefgefroren war, beziehungsweise im Rahmen von (wiederholten) vorausgegangen Auftauzyklen die RNA im Verlauf der Jahre abgebaut wurde. Andererseits wurde aber auch ein Fehler in der Durchführung der vorher durchgeführten RNA Isolierung oder ein Problem in der Gelelektrophorese in Betracht gezogen.

Letzteres konnte durch dreimaliges Wiederholen des Versuchs ausgeschlossen werden. Zusätzlich sei an dieser Stelle erwähnt, dass es sich bei dieser Art der RNA-Gewinnung um eine lange und mehrfach erfolgreich durchgeführte Methode handelt, die sich in unserem Labor in der Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Janssen seit Jahren etabliert hat. Da die Positiv-Kontrollen der Zelllinien keine relevante Degradation aufzeigten und regelrechte RNA-Banden vorhanden waren, lässt sich ein Fehler beim Durchführen der Experimente mit hoher Sicherheit ausschließen. Somit liegt die wahrscheinlichste Ursache für die nicht erfolgreiche RNA-Isolierung an der Qualität des hier verwendeten Gewebes.

Der Abbau der RNA könnte neben der bereits erwähnten Kryokonservierung in Stickstoff auch auf einer unsachgemäßen Handhabung postoperativ beruhen. Beide führen zu einer irreversiblen Schädigung des Gewebes und machen eine ausreichende qualitative RNA-Gewinnung unmöglich. Welche Ursache letztendlich verantwortlich ist, lässt sich aufgrund der meist über 15 Jahre zurückliegenden Operationen allerdings schlecht beurteilen.

Da die erwarteten Ergebnisse dieser Arbeit jedoch die Grundlage für die Beurteilung der Frage waren, ob die Thymidilat-Synthase sowohl ein prognostischer als auch ein

prädiktiver Parameter beim Kolonkarzinom darstellen kann, kann diese Frage aufgrund eigener Ergebnisse somit nicht beantwortet werden. Dennoch wird unter Berufung auf Literaturangaben in dieser Arbeit deutlich gezeigt, dass die bisherigen Ergebnisse zu dieser Thematik sehr heterogen sind, sodass sich auch hieraus keine klare Aussage ableiten lässt (Aschele et al, 2000; Paradiso et al, 2000; Salonga et al, 2000; Van Triest et al, 2000; Edler et al, 2002; Allegra et al, 2003; Kornmann et al, 2003; Popat et al, 2006; Niedzwiecki et al, 2017; Karlberg et al, 2010).

5.2.2. Analyse der eigenen molekulargenetischen Ergebnisse am Patientenkollektiv im UICC Stadium II

Es wurde eine weitere molekulargenetische Untersuchung mit einem bereits vorhandenen Kollektiv im UICC Stadium II durchgeführt. Dieses Kollektiv entspricht einer früheren Analyse der Arbeitsgruppe, wie bereits unter 4.2.2b erwähnt, von Nitsche et al. (Nitsche et al, 2013). Die Bestimmung der Thymidilat-Synthase Aktivität in den Gewebeproben dieser 22 Patienten konnte aufgrund der bereits vorab in diversen Experimenten bestätigten Güte der cDNA problemlos, wie unter 3.1.7. beschrieben durchgeführt werden. Die verwendeten Gewebeproben stammen aus den Jahren 1987 bis 2012 und wurden wie im eigenen Kollektiv innerhalb von einer Stunde postoperativ in -80 Grad Celsius kalten flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Das eigene Kollektiv wurde in einem sehr ähnlichen Zeitraum operiert, nämlich 1992 bis 2010, sodass die Einfrierdauer und die Kryokonservierung keine wesentlichen Unterschiede darstellen. Des Weiteren erfolgte in beiden Fällen eine histologische Selektion der Patientengewebe und es muss an dieser Stelle beton werden, dass es für die RNA und cDNA Gewinnung keine Relevanz hat, ob es sich um Tumor- oder Normalgewebe handelt.

Es wurden im erwähnten Kollektiv von Nitsche et al. 11 Patienten, welche ein Rezidiv erlitten hatten mit 11 Patienten ohne Rezidiv verglichen, um hierdurch die prognostische Wertigkeit der Thymidilat-Synthase näher zu analysieren (Nitsche et al, 2013). Im UICC Stadium II wird eine Chemotherapie laut Leitlinien nur empfohlen, wenn die unter 5.1 erwähnten Risikofaktoren (high-risk) vorliegen. Innerhalb des hier beschriebenen Kollektivs wurde aufgrund nicht vorhandener Risikofaktoren bei keinem Patienten eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Dies ist insofern relevant, weil somit ausgeschlossen werden kann, dass eine adjuvante 5-Fluorouracil basierte adjuvanten Chemotherapie die Expression der Thymidilat-Synthase im Sinne einer Gegenregulation beeinflussen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit im UICC Stadium II zeigen eine deutlich geringere Expression der Thymidilat-Synthase im Patientenkollektiv mit Rezidiv. Der Unterschied war bei einem p-Wert von 0,0215 nach Testung mittels Mann-Whitney-Test, signifikant. Siehe hierzu auch Abbildung 20.

Aufgrund dieser signifikanten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase mit der Rezidiv-Wahrscheinlichkeit von Patienten mit Kolonkarzinom korreliert.

Niedzwiecki et al. konnten die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken, indem eine Korrelation zwischen hoher Thymidilat-Synthase Expression und besseren Gesamtüberleben bei Patienten mit Kolonkarzinom im UICC Stadium II und alleiniger operativer Therapie aufgezeigt wurde (Niedzwiecki et al, 2017).

Die Studie unter Soong et al. mit 967 Patienten im UICC II und III konnte die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls unterstützen. Es wurde gezeigt, dass jene Patienten mit geringeren Expressionswerten der Thymidilat-Synthase und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase und alleiniger operativer Therapie ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen (p-Wert UICC II Thymidilat-Synthase: 0,019 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase: 0,003 und p-Wert UICC III Thymidilat-Synthase:

0,124 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase: 0,038). Allerdings verbesserte sich das Gesamtüberleben signifikant, wenn Patienten im UICC II eine adjuvante 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie erhielten. Im Stadium UICC III konnte in dieser Studie allerdings keine prognostische Wertigkeit der Thymidylat-Synthase bei adjuvanter Therapie mit 5-FU gezeigt werden (Soong et al, 2008). Johnston et al. und Paradiso et al. fanden ebenfalls eine Korrelation zwischen geringer Thymidylat-Synthase Expression und verbesserten Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie (Johnston et al, 1995; Paradiso et al, 2000). Broll et al. konnten dies ebenfalls bestärken, indem sie bei Patienten mit hoher TYMS Expression ein schlechteres Ansprechen auf 5-FU im Sinne eines verringerten Gesamtüberlebens und krankheitsfreien Überlebens aufzeigten (Broll R, 2005). Somit unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass die in dieser Arbeit analysierten 11 Patienten im UICC II mit Rezidiv und geringer TYMS-Expression, von einer adjuvanten 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie profitieren hätten können. Dennoch finden sich, bezogen auf die prognostische Wertigkeit der Thymidylat-Synthase auch zahlreiche Studien, die ein gegenteiliges Ergebnis aufweisen. Salonga et al. zeigten im Jahre 2000, dass Patienten mit geringer Expression der messenger-RNA (mRNA) der Thymidylat-Synthase, Dihydropyrimidin-Dehydrogenase und Thymidin-Phosphorylase ein signifikant längeres Gesamtüberleben zeigten, als jene mit erhöhten Expressionswerten (Salonga et al, 2000). In der Meta-Analyse unter Popat et al. zeigte sich ebenfalls ein besseres Gesamtüberleben bei erniedrigten Expressionswerten der Thymidylat-Synthase verglichen zu erhöhten Werten (Popat et al, 2004).

In der Studie von Kornmann et al. etwa zeigte sich bei Patienten im Stadium UICC II und III mit Rezidiv eine mittlere recurrence-free survival Zeit von 11 Monaten bei erhöhter Expression der Thymidylat-Synthase verglichen zu 18 Monaten bei erniedrigter Expression. Somit trat bei geringer TYMS Expression das Rezidiv später auf (Kornmann et al, 2002).

Hierbei muss beachtet werden, dass nicht jeder Patient, der in eine Studie zur Wertigkeit der adjuvante Therapie und zur Untersuchung der Bedeutung der Thymidylat-Synthase eingeschlossen wurde, klar charakterisiert ist, beziehungsweise, dass die operative Therapie mögliche Unterschiede aufweist. Entsprechend ist das Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie in Abhängigkeit von der Höhe der Expression der Thymidylat-Synthase einem Bias unterworfen, der von Studie zu Studie variieren kann. Auch ist bekannt, dass unterschiedliche Rassen eine genetische Heterogenität aufweisen (zum Beispiel Europa versus Afrika), die einen Einfluss auf die Chemosensitivität haben und entsprechend berücksichtigt werden müssen.

Bezogen auf die eigenen Ergebnisse zeigt sich eine negative prognostische Wertigkeit der Thymidylat-Synthase in Form einer signifikant (p -Wert=0,0215) erhöhten Rezidivrate bei alleiniger operativer Therapie im UICC II. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass eine niedrige Expression der Thymidylat-Synthase bei kolorektalen Karzinomen mit einem aggressiveren Phänotyp des Tumors assoziiert ist.

Nun stellt sich die Frage, ob Patienten im UICC II mit geringer Expression der Thymidylat-Synthase im Tumorgewebe nach der operativen Therapie auf eine adjuvante 5-Fluorouracil basierter Chemotherapie ansprechen würden. In vitro konnte bereits unter van Triest et al. nachgewiesen werden, dass kolorektale Tumorzelllinien mit geringer Thymidylat-Synthase Expression ein gutes Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie zeigen (Van Triest et al, 1999). In klinischen Studien konnte das bessere Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie bei niedriger Expression der Thymidylat-Synthase im Vergleich zu höheren Expressionswerten mehrfach bestätigt werden (Salonga et al, 2000; Aschele et al, 2000; Ichikawa et al, 2003). Die Tatsache, dass bei der Studie unter Soong et al. Patienten im UICC II (kein high-risk) ein besseres Gesamtüberleben aufweisen, sofern sie bei geringer TYMS Expression eine

adjuvante 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie erhalten, bestärkt die Annahme, dass auch die Patienten des eigenen Kollektivs davon profitiert hätten (Soong et al, 2008). Aber auch hierfür finden sich gegensätzliche Ergebnisse in der Literatur. In einer Studie von Edler et al. fand sich ein schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten im UICC II und III, wenn bei geringer Expression der Thymidilat-Synthase eine adjuvante 5-FU basierter Chemotherapie durchgeführt wurde, während Patienten mit deutlich erhöhten Expressionswerten von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten (Edler et al, 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kornmann et al., denn auch hier zeigte sich ein besseres Ansprechen auf eine adjuvante 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie für Patienten mit hoher Thymidilat-Synthase und geringe Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Expression. Natürlich muss hier beachtet werden, dass die zusätzliche Bestimmung der DPD Expression auch die alleinige Ursache für das bessere Ansprechen auf 5-FU sein kann, was im Kapitel 5.4.4. genauer erläutert wird (Kornmann et al, 2003). Abschließend lässt sich anhand der eigenen Ergebnisse sagen, dass die Thymidilat-Synthase im UICC II und alleiniger operativer Therapie durchaus eine negative prognostische Wertigkeit besitzen könnte. Allerdings ist aufgrund der geringen Kollektivgröße mit insgesamt 22 Patienten eine falsch positive Korrelation nicht sicher auszuschließen. Die abzuleitenden Ergebnisse wären für betroffene Patienten jedoch von großem Wert, da sie als prognostischer Marker genutzt werden könnten. Bislang gibt es hierfür allerdings wie bereits erläutert, auch in Zusammenschau mit der Literatur keine validen, konklusiven Daten.

Ob sich aus diesen Ergebnissen und der prognostischen Bewertung anhand der Expression der Thymidilat-Synthase aber auch therapeutische Konsequenzen ergeben, ist ebenso unklar.

Die prädiktive Wertigkeit in Bezug auf eine 5-Fluorouracil basierte adjuvante Chemotherapie wurde, wie bereits erwähnt, in einigen Studien untersucht und wird in dieser Arbeit im Verlauf erneut diskutiert. Allerdings zeigen sich auch hier konkurrierende Ergebnisse, sodass weitere klinische Studien mit genauer Charakterisierung des Patientenkollektivs nötig sind.

5.2.3. Expression der Thymidilat-Synthase in verschiedenen kolorektalen Zelllinien

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Expressionswerte der Thymidilat-Synthase in den untersuchten *in vitro* Zelllinien unterscheiden. Auch in menschlichen Tumorzellen des Kolons finden sich sehr unterschiedliche Expressionswerte der TYMS, wie ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Die Frage hierbei ist, ob dies eine statische Eigenschaft ist, oder ob das Enzym seine Aktivität als Reaktion auf äußere Reize oder im Rahmen der Tumorgenese hinauf oder hinab reguliert. So könnte auch eine Chemotherapie eine Veränderung der Expression bewirken. Dies wäre aus biologischer und physiologischer Sicht eine durchaus plausible Erklärung für die unterschiedlichen Werte, denn eine Chemotherapie geht mit vielfältigen Veränderungen in der Zelle einher und hat somit auch einen Einfluss auf die dort vorhandenen Enzyme. Falls dies der Fall sein sollte, hätte dies eine möglicherweise große Bedeutung in der zukünftigen Chemotherapie des Kolonkarzinoms, wenn man zudem davon ausgeht, dass die Expression mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie korreliert. Es ist dabei möglich, dass dieser Effekt nur bei 5-Fluorouracil auftritt und bei allen anderen Wirkstoffen nicht, oder ein von der Substanz unabhängiger Effekt ist.

Um die biologischen Resistenzmechanismen *in vitro* zu erklären wurde unter de Angelis et al. eine 5-Fluorouracil resistente HCT116 Zelllinie mit den Derivaten ResB und ResD

generiert. Diese Derivate zeigten im Vergleich zu normalen HCT116 Zellen eine signifikant höhere Expression in verschiedensten Genen, darunter Anti-Apoptose Gene (beispielsweise IRAK1, MALT1, BIRC5), Wachstumsregulierende Gene (beispielsweise CCNF, CCNE2) und Metastasen regulierende Gene (beispielweise LMNB1, F3, TMSNB). Es wird davon ausgegangen, dass es sich somit um einen deutlich aggressiveren Wachstumsphänotypen handelt. Es fand sich auch eine Hochregulation der TYMS und der DNA-Reparatur Gene, sodass dies die Erklärung sein könnte, warum HCT116 resistente Derivate die 5-Fluorouracil vermittelte Hemmung der Thymidylat-Synthase sowie die durch das Chemotherapeutikum vermittelten DNA Schäden überwinden (De Angelis et al, 2004).

Eine weitere Studie zur Thematik der 5-FU Resistenz findet sich ebenfalls zur Zelllinie HCT116, in welcher mit zwei verschiedenen 5-FU Protokollen gearbeitet wurde. Eine Gruppe der Zellen erhielt eine 5-Fluorouracil Bolusgabe mit 0,5 μM für 5 Tage, gefolgt von einer Pause mit 18 Verdopplungszeiten und das insgesamt für drei Intervalle. Die anderen HCT116 Zellen wurden kontinuierlich mit 5-FU in einer aufsteigenden Dosis von 5 bis 770 μM für 48 Stunden mit einer Pause von ebenfalls 18 Verdopplungszeiten behandelt. Dabei waren in beiden Gruppen ähnliche Transkriptions Gene zu finden. Allerdings entwickelte sich im Vergleich zur kontinuierlichen Gruppe bei der Bolusgabe keine 5-Fluorouracil Resistenz und die Apoptose Rate war signifikant höher. Somit kann auch das Chemotherapie Protokoll einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben (De Angelis et al, 2004).

Es wurde bereits ein autoregulatorischer Feedbackweg gefunden, in welchen die Thymidylat-Synthase ihre eigene Translation reguliert und somit auch eine Hochregulation der Expression induzieren kann (Zhang et al, 2008). Der Zusammenhang zwischen Thymidilat-Synthase Überexpression und 5-Fluorouracil Resistenz wurde bereits auch in weiteren in vitro Studien festgestellt. Allerdings muss beachtet werden, dass die Ursache der Resistenz auch an anderen den Stoffwechsel und die Apoptose regulierenden Genen liegen könnte (Johnston et al, 1995; Peters et al, 2002).

Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe unter Wang et al. auch verdeutlichen, dass von der Thymidilat-Synthase unabhängige molekulare Ereignisse, wie der Verlust des Tumorsuppressorgens p53 oder die Überexpression des Transkriptionsfaktor NF- κB , eine Rolle in der 5-FU Resistenz spielen können (Wang et al, 2007).

Eine konkurrierende Überlegung muss an dieser Stelle sein, dass eine geringere Expression der Thymidylat-Synthase mit weniger Proliferation einhergeht, sodass dies auch ein Schutz vor der 5-Fluorouracil Wirkung sein kann.

Innerhalb dieser Diskussion muss stets beachtet werden, dass hier von in vitro Ergebnisse gesprochen wird, die somit keine direkten Rückschlüsse auf die Reaktionen in humanen Geweben erlauben. Denn mit Verweis auf die Diskussion unter 5.2.2. im Stadium UICC II, findet sich in vivo eine sehr divergierende Studienlage zum Ansprechen auf 5-Fluorouracil in Abhängigkeit von der Thymidilat-Synthase.

5.2.4. Erfassung der Thymidilat-Synthase Expression für die DLD1-Zelllinie im Klon-Assay und im Zell-Stress Test

Im 5-Fluorouracil Zell-Stress-Test konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie DLD 1 keine signifikante Veränderung der Thymidilat-Synthase Expressionswerte in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des 5-FU präsentierte. Somit hat in diesem Test die 5-FU Wirkung keinen Einfluss auf die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase gezeigt. Dies zu verallgemeinern wäre jedoch ein voreiliger Entschluss, denn um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssen im Verlauf weitere Zelllinien untersucht werden. Ein

weiterer möglicher Ansatz könnte sein, die Zelllinie CaCo2 zu untersuchen. Diese zeigte eine signifikant niedrigere Thymidilat-Synthase Expression im Versuch und somit stellt sich die Frage ob die Zelllinie CaCo2 eine ähnliche oder andere Verhaltensweise im 5-FU Zell-Stresstest sowie im Klon Assay mit Bestimmung der IC₅₀ zeigen würde.

Im Klon-Assay der Zelllinie DLD1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Wachstum der Zellklone sich in Abhängigkeit von der Konzentration an 5-Fluorouracil verändert. Dieser Dosis-spezifische Effekt ist aufgrund der zytotoxischen Wirkung von 5-Fluorouracil zu erwarten. Um den dabei festgestellten IC₅₀ Wert zu vergleichen, findet sich in der Literatur bereits mit der Zelllinie HCT116 eine IC₅₀ nach 72 Stunden Behandlung mit 5-FU von 4,3 µM (Boyer et al, 2004). Unter Sharma et al. wurde die Zelllinie SW620 untersucht mit einer IC₅₀ von 4 µM, auch hier nach 72 Stunden Behandlung mit 5-Fluorouracil (Sharma Rituka I and Smith Tim A, 2008). Ein Vergleich zu dieser Literatur ist nur begrenzt möglich, einerseits weil es sich um andere Zelllinien handelt, andererseits weil die Einwirkdauer in der eigenen Arbeit 14 Tage bei unterschiedlicher 5-FU Konzentration (0, 10, 100, 1000 µM) betrug. Somit ist der unterschiedliche IC₅₀ Wert im direkten Vergleich kausal nachvollziehbar.

In der Arbeitsgruppe unter De Angeli et al. wurde eine GI₅₀ (Growth Inhibition) von 90 µM bei 5-FU sensiblen nicht vorbehandelten Derivaten gefunden. Bei HCT116 Zellen nach 5-FU Bolusgabe lag die GI₅₀ bei 2,2µM und nach kontinuierlicher Verabreichung des Chemotherapeutikums bei 2400µM und 10900 µM (De Angelis et al, 2004). Dieser Wert liegt somit bei den unbehandelten und nach 5-FU Bolusgabe bei HCT116 Zellen deutlich unter jenem der Zelllinien DLD1 in dieser Arbeit mit einer IC₅₀ von 259,2 µM. Allerdings zeigt sich bei kontinuierlicher Gabe von 5-Fluorouracil ein signifikanter Anstieg, sodass hier wiederum, wie bereits unter 5.2.3. erwähnt, eine Zunahme der Resistenz vorliegen kann. Die IC₅₀ und die GI₅₀ können in diesem Fall als gleichwertig angesehen werden, da sowohl in dieser Arbeit, als auch in der angegebenen Studie, die Hemmung der Zellproliferation als Anhaltspunkt der genannten Werte verwendet wurden. Die Expressionswerte der Thymidilat-Synthase beider soeben erwähnten Zelllinien unterscheiden sich in den Versuchen dieser Arbeit darin, dass die Zelllinie DLD1 eine signifikant höhere Expression der Thymidilat-Synthase aufweist als jene der HCT116 Zelllinie.

Innerhalb dieser in-vitro Ergebnisse muss jedoch erneut betont werden, dass diese keinerlei Rückschlüsse auf die Wirkung in-vivo erlaubt. Vor allem die potentiellen Nebenwirkungen können nur am lebenden Organismus abgeschätzt werden. Nur in vivo Untersuchungen können helfen die Wirkung der Chemotherapie mit 5-Fluorouracil auf das Maximale zu steigern und im besten Falle die Rezidivrate sowie die Nebenwirkungen signifikant zu senken. Natürlich könnte man die IC₅₀ auch am Patienten bestimmen, allerdings sind die dann zu erwartenden Nebenwirkungen und die resultierende Toxizität ethisch nicht vertretbar.

5.3. Prognostische und prädiktive Wertigkeit der Thymidilat-Synthase

5.3.1. Korreliert das Ausmaß der Thymidilat-Synthase Expression mit klinisch-pathologischen Parametern?

Es stellt sich nun die Frage, ob die Expression der Thymidilat-Synthase direkt mit klinisch-pathologischen Parametern, wie beispielsweise Tumorgröße, Tumordinfiltration oder Tumorlokalisierung, korreliert.

In einer Studie unter Ishikawa et al. wurde untersucht, ob die Expressionshöhe der Thymidylat-Synthase, Orotate-phosphoribosyl-transferase (OPRT) sowie Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) einen klinisch-pathologischen Einfluss auf das

Gewebe von insgesamt 40 Patienten mit kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II und III zeigte. Die Patienten waren kurativ R0 reseziert worden und erhielten eine adjuvante orale Therapie mit 300mg/Tag Tegafur/Uracil (UFT) für zwei Jahre. In der Studie fand sich keine Korrelation zu Alter, Geschlecht oder pathologischen Kriterien, wie Tumorgroße, Lokalisation, Tumordinfiltration, histologischer Subtyp. Allerdings war die Expression der OPRT in Tumoren mit Lymphknoten Metastasen signifikant geringer (Ishikawa et al, 2008). Zu diesem Ergebnis kam auch Ochiai et al., zudem wurde hier auch eine Korrelation zwischen DPD-Aktivität und schlecht differenzierten Adeno- sowie muzinösen Karzinomen aufgezeigt (Ochiai et al, 2002).

Die Arbeitsgruppe unter Tomiak et al. konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Tumorstadium, Lokalisation, Infiltrationstiefe oder histologischen Grading und Expression der Thymidilat-Synthase finden (Tomiak et al, 2001). Außerdem wurde auch keine Korrelation zwischen Thymidilat-Synthase Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern nachgewiesen (Iacopetta et al, 2001).

In der Studie unter Banerjee et al. zeigte sich, dass Patienten mit Lungenmetastasen bei kolorektalen Adenokarzinom signifikant höhere Expressionswerte der Thymidilat-Synthase aufwiesen, als Patienten mit Lebermetastasen. Zusätzlich wurden aber auch erhöhte Werte beim Transkriptionsfaktor E2F-1 festgestellt, sodass hier eine mögliche Korrelation vermutet werden kann (Banerjee et al, 2000). Eine Korrelation zwischen TYMS und E2F-1 Expression wurde bisher nicht eindeutig nachgewiesen (Belvedere et al, 2004; Banerjee et al, 2000).

Es wird somit gezeigt, dass eine eindeutige Korrelation zwischen Thymidilat-Synthase Expressionshöhe und klinisch-pathologischen Parametern des Kolonkarzinoms in der bisherigen Literatur nur in einzelnen Studien beschrieben wurde, insgesamt aber keine Auswirkung zu erwarten ist.

5.3.2. Besitzt die Thymidilat-Synthase Expression einen Einfluss auf das Überleben von Patienten mit kolorektalen Karzinom?

Wie bereits unter 5.2.2. erwähnt, gibt es konkurrierende Ergebnisse in der Literatur für die prognostische Aussagekraft der Thymidilat-Synthase beim kolorektalen Karzinom.

Lenz et al. fanden heraus, dass Patienten im UICC II bei hohen Expressionswerten der Thymidilat-Synthase und alleiniger operativen Therapie, ein schlechteres Gesamtüberleben sowie eine höhere Rate an Rezidiven aufwiesen (Lenz et al, 1998).

In einer Studie unter von Triest et al. und Allegra et al. konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben bei hoher Expression signifikant schlechter war, als in jener Gruppe mit geringer Expression (Van Triest et al, 2000; Allegra et al, 2003). Zum selben Ergebnis kam die Metaanalyse unter Popat et al. In dieser wurden dreizehn Studien mit 887 Patienten mit deutlich fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom (UICC III und IV) und sieben Studien mit 2610 Patienten mit lokal fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom (UICC I und II) ausgewertet. Dabei konnte ein schlechteres Gesamtüberleben bei erhöhten Thymidilat-Synthase Expressionswerten für beide Subgruppen aufgezeigt werden (Popat et al, 2004).

Das Gegenteil konnten, wie bereits erläutert, Soong et al. zeigen. Bei den 945 Patienten mit kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II und III, die sie untersuchten, zeigte sich bei hoher Expression der Thymidilat-Synthase und alleiniger chirurgisch onkologischer Resektion ein deutlich besseres Gesamtüberleben (Soong et al, 2008). Die Ergebnisse der eigenen Arbeit unterstützen die positive prognostische Wertigkeit der Thymidilat-Synthase im UICC Stadium II und alleiniger operativer Therapie.

In der Metaanalyse von Chen et al. wurden zuletzt 17 Studien mit insgesamt 2893 Patienten mit kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II und III mit der Fragestellung

nach der prognostischen Wertigkeit der Thymidilat-Synthase ausgewertet. Dabei wurde die Thymidilat-Synthase als ungeeigneter prognostischer Parameter bewertet, es ergab sich weder ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben noch auf das krankheitsfreie Überleben (Chen et al, 2012).

Innerhalb der Patientenkollektive konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Rasse, Alter oder Geschlecht herausgefunden werden, welche die Divergenz in der prognostischen Wertigkeit erklären könnten. Auch wenn in den verschiedenen Studien mehrheitlich, sofern dies nachvollziehbar war, mit immunhistochemischen Verfahren für die Bestimmung der Expressionshöhe der TYMS gearbeitet wurde, so müssen bezüglich der Bestimmungsmethode dennoch diverse Einflussfaktoren beachtet werden. Die verwendeten Antikörper sind von Studie zu Studie sehr unterschiedlich, Allegra et al. verwendeten polyklonale Antikörper, während in der Studie unter Soong et al. monoklonale angewendet wurden (Allegra et al, 2003; Soong et al, 2008). Monoklonale Antikörper sind spezifischer, da sie nur von einem einzigen B-Zell-Klon hergestellt werden, allerdings sind sie deutlich teurer, instabiler und sehr empfindlich gegenüber Veränderungen im verwendeten Epitop des Antigens. Polyklonale Antikörper sind deutlich einfacher, schneller und günstiger herzustellen. Sie können an verschiedene Epitope der Antigene binden, da sie ein Gemisch von verschiedenen B-Zell-Klonen sind und damit deutlich robuster als monoklonale Antikörper. Allerdings leidet bei polyklonalen Antikörpern die Spezifität aufgrund von möglichen Kreuzreaktionen. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass eine Bestimmung der Expressionshöhe der TYMS auch mittels rt-PCR und somit ohne Antikörper, so wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, erfolgen kann. Weitere Einflussfaktoren sind darüber hinaus denkbar, sollen aber hier nicht weiter aufgeführt werden.

Es zeigt somit deutlich, dass sich in der derzeitigen Literatur in Bezug auf die prognostische Wertigkeit der Thymidilat-Synthase keine konklusiven Ergebnisse zeigen, sodass diese Fragestellung weiter offen ist und weitere Studien notwendig sind. Aufgrund der multiplen Einflussfaktoren und methodischen Schwächen ist es aber zweifelhaft, ob sich überhaupt eindeutige Korrelationen finden lassen. So scheinen noch zahlreiche weitere, zum Teil alltägliche Faktoren einen Einfluss auf die Prognose zu haben. So zeigten etwa Guercio et al. im Jahr 2015, dass ein Kaffeekonsum von mindestens vier Tassen pro Tag prognostisch relevant ist und Fadelu et al. im Jahr 2018, dass ein Nusskonsum von mindestens zwei Unzen pro Woche (entspricht circa 56,6g) mit einem reduzierten Rezidivrisiko und verringerter Mortalität bei Patienten mit Kolonkarzinom im UICC III nach operativer Resektion und adjuvanter Chemotherapie assoziiert ist (Guercio et al, 2015; Fadelu et al, 2018). Wollte man die Fragestellung somit eindeutig beantworten, müsste man sie im Rahmen großer prospektiv-randomisierter Studien adressieren, oder alle möglichen Einflussfaktoren berücksichtigen (was augenscheinlich nahezu unmöglich ist).

5.3.3. Kann die Expression der Thymidilat-Synthase ein Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte adjuvante Chemotherapie vorhersagen?

Es sei an dieser Stelle nochmals betont, dass die adjuvante Anwendung von 5-Fluorouracil in der Therapie des Kolonkarzinoms einen großen Stellenwert einnimmt. Das Chemotherapeutikum 5-FU, erstmals 1957 in Nature unter Heidelberger et al. publiziert, zählt bis heute zu den am häufigsten verwendeten Zytostatika der Welt (Heidelberger et al, 1957).

Der Wirkmechanismus von 5-FU ist auch von der Form der Verabreichung abhängig. Wird eine Bolus-Injektion durchgeführt, so entfaltet das Chemotherapeutikum seine

zellschädigende Wirkung hauptsächlich über den Einbau von Fluorouridindiphosphat (FUDP) in die RNA. Eine kontinuierliche Gabe führt zu einer Hemmung der Thymidilat-Synthase und wirkt vor allem in der S-Phase des Zellzyklus.

Die Metanalyse group in cancer konnte bereits 1998 zeigen, dass eine kontinuierliche intravenöse Gabe von 5-Fluorouracil bezogen auf die Ansprechrate und dem Gesamtüberleben der Bolusgabe überlegen ist (Meta-analysis Group In Cancer et al, 1998). Es zeigte sich auch, dass die hämatologische Toxizität unter kontinuierlicher Gabe geringer ist, bei gleichzeitig aber vermehrtem Auftreten des Hand-Fuß-Syndroms (HFS). Unter der Bolusgabe erlitten 13% der Patienten ein Hand-Fuß-Syndrom, unter kontinuierlicher Gabe 34% (Meta-analysis Group In Cancer et al, 1998).

Betrachtet man nun das Ansprechen der Patienten auf 5-FU in Abhängigkeit von der Expression der Thymidilat-Synthase, so finden sich in der Literatur, wie bereits unter 5.2.2. erläutert, widersprüchliche Aussagen. Einige Arbeitsgruppen fanden bei hoher Expression der Thymidilat-Synthase ein signifikant besseres Gesamtüberleben sowie verlängertes krankheitsfreies Überleben, wenn adjuvant mit 5-Fluorouracil therapiert wurde (Edler et al, 2002; Kornmann et al L. K., 2002). Edler et al. fanden heraus, dass bei Patienten (n=420) mit kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II und III nach einer kurativen Operation unter Bolus-Gabe mit 5-FU und einer erhöhten Expression der Thymidilat-Synthase, eine verminderte Rezidivhäufigkeit und ein verbessertes Gesamtüberleben erzielt werden konnte. Zusätzlich zeigte sich bei den Patienten sowohl ein schlechteres Gesamtüberleben bei hoher Expression mit alleiniger operative Therapie, als auch bei geringer Expression und adjuvanter 5-FU basierter Chemotherapie. Eine Veränderung der Expression durch die Bolusgabe wurde dabei nicht beschrieben (Edler et al, 2002). Auch Niedzwiecki et al. konnten bei Patienten im UICC Stadium III bei erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase und adjuvanter 5-FU basierter Chemotherapie (Bolus 5-FU/Leukovorin oder 5-FU/Leukovorin/Irinotecan) ein verbessertes Gesamtüberleben belegen. Allerdings konnte keine prädiktive Wertigkeit im Sinne der Vorhersagbarkeit auf das Ansprechen auf eine 5-FU basierte Chemotherapie in Abhängigkeit von der Thymidylat-Synthase abgeleitet werden. Für das UICC Stadium II liegen Untersuchungen ohne und mit adjuvanter Therapie mit dem Antikörper Edrecolomab (AK gegen das Oberflächenglykoprotein EpCAM) vor, allerdings ohne, dass sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben oder krankheitsfreien Überleben ergab. Allerdings zeigte sich auch im UICC II bei erhöhten Expressionswerten der Thymidilat-Synthase ein verbessertes Gesamtüberleben (Niedzwiecki et al, 2017).

Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe unter Salonga et al. bei Patienten mit disseminierten oder rekurrenden kolorektalem Karzinom eine Korrelation zwischen niedriger Expression der Thymidilat-Synthase, Thymidin-Phosphorylase (TP) und Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD) und verbesserten Ansprechen auf 5-Fluorouracil. Die adjuvante Therapie erfolgte in dieser Studie mit 5-FU (200 mg/m²/Tag) und Leukovorin (20 mg/m² wöchentlich i.v.) für insgesamt 4 Wochen mit einer Woche Pause und insgesamt zwei Zyklen (Salonga et al, 2000). Die Korrelation zwischen niedriger Thymidilat-Synthase Expression und besseren Ansprechen auf 5-Fluorouracil fand sich auch in einer Studie unter Paradiso et al., bei welcher allerdings Patienten mit Metastasen oder mit einem Rezidiv von einem kolorektalen Karzinom eingeschlossen wurden. Hierbei wurde eine zwei-stündige Infusion mit 5-FU (1200 mg/m²), gefolgt mit 20 Stunden Pause von Methotrexat (MTX) (200 mg i.v.) und nach einer erneuten Pause von 24 Stunden (nach MTX Gabe) mit Leukovorin (25 mg i.v. alle 6 Stunden, insgesamt 8 Mal) als Therapieschema für mindestens zwei Zyklen mit 15 Tagen Pausen durchgeführt (Paradiso et al, 2000). Zu diesem Ergebnis kamen auch Aschele et al. mit einem sehr ähnlichen Schema, allerdings wurde hier ausschließlich das

Stadium UICC IV betrachtet. Es wurde eine Bolusgabe von 5-FU mit 24 Stunden versetzter Gabe von MTX alternierend nach einer Pause von 14 Tage mit einer kontinuierlichen Infusion von 5-Fluorouracil für 3 Wochen mit Leucovorin je am ersten Tag der neuen Woche verabreicht (Aschele et al, 1999). Bei Ichikawa et al. wurde ebenfalls das metastasierte UICC IV untersucht, dabei wurde allerdings die Therapie mit Uracil und Tegafur und Leucovorin für insgesamt 4 Zyklen durchgeführt. Zusätzlich muss beachtet werden, dass hier ausschließlich japanische Patienten in der Kohorte eingeschlossen waren, sodass dies auch einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte (Ichikawa et al, 2003).

Die Studie unter Broll et al. konnte eine Korrelation zwischen hoher Expression der Thymidilat-Synthase und schlechten Ansprechen auf eine 5-FU basierte Chemotherapie, im Sinne eines verringerten Gesamtüberlebens und kürzerem krankheitsfreien Überlebens aufzeigen. Dabei wurde 120 Patienten eingeschlossen, allerdings erhielten nur 30 Patienten eine adjuvante Therapie. Die Bestimmung der TYMS Expression erfolgte hier mit einem monoklonalen Antikörper (Broll R, 2005). Eine genaue Angabe zum UICC Stadium sowie zur verabreichten adjuvanten Therapie liegt jedoch nicht vor, sodass eine weiterführende Interpretation schwierig ist.

In der Studie unter Allegra et al. wurden insgesamt 706 Patienten (davon 291 im Stadium UICC II und 415 in Stadium UICC III) untersucht, davon erhielten 275 eine alleinige kurative operative Therapie und 431 Patienten wurden adjuvant mit 5-Fluorouracil/Leucovorin behandelt. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression der Thymidilat-Synthase und dem Ansprechen auf 5-Fluorouracil im adjuvanten Setting beim kolorektalen Karzinom im Stadium UICC II und III aufgezeigt werden. Das Gesamtüberleben war bei hoher Expression der Thymidilat-Synthase und gleichzeitig positiver Färbung von dem Tumorsuppressorgen p53 geringer (Allegra et al, 2003).

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten unter anderem durch verschiedene Messmethoden hervorgerufen worden sein. Die Expressionswerte der Thymidilat-Synthase lassen sich sowohl durch PCR, wie es auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde, als auch durch immunhistochemische Verfahren mit Hilfe von Antikörpern bestimmen. Johnston et al. publizierte 1991 die Produktion und Charakterisierung jener monoklonalen Antikörper, mit welchen man die menschliche Thymidilat-Synthase Expression bestimmen kann (Johnston et al, 1991). Die Methode der PCR um die Expression des Enzyms zu analysieren, wurde unter Horikoshi et al. im Jahr 1992 in einem Artikel im Magazin Cancer Research publiziert (Horikoshi et al, 1992).

Im Jahre 2005 wurde unter Knösel et al. eine Erweiterung der immunhistochemischen Methode zur Bestimmung der Expressionswerte der TYMS veröffentlicht. Es handelt sich hierbei um die Tissue Microarrays (TMA), welche es ermöglichen eine Vielzahl an Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger auf Proteinebene zu untersuchen (Knösel et al, 2005). Zwei entscheidende Nachteile sind die mangelnde Evaluation der Heterogenität der Gewebe und die begrenzte Größe der Tumorgewebe, die untersucht werden kann.

Somit besteht die Möglichkeit, dass die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnissen in der jeweils verwendeten Methode liegen könnte. In der Immunhistochemie kommen teilweise sehr unterschiedliche Antikörper für die Bestimmung der Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase zum Einsatz. Bisher wurde allerdings keine Studie durchgeführt, in welcher eine Kohorte mit unterschiedlichen Labormethoden untersucht wurde, um diesen Einfluss genauer zu analysieren. Des Weiteren muss natürlich beachtet werden, dass jeder Mensch sehr individuelle zelluläre Antworten auf verschiedene Reize zeigt und somit auch hier eine Ursache für unterschiedliche Ergebnisse liegen könnte. Die adjuvanten Therapieschemata waren oftmals, wenn auch gering, sowohl in der

Dosierung als auch in der Verabreichung (Bolus oder kontinuierliche Gabe) unterschiedlich, sodass auch hier nicht immer ein direkter Vergleich möglich ist.

Des Weiteren müssen zusätzliche Einflussfaktoren beachtet werden. Eine sehr relevante Studie zum adjuvanten Ansprechen auf 5-Fluorouracil in Abhängigkeit von Polymorphismen im Thymidilat-Synthase Gen wurde unter Iacopetta et al. 2001 veröffentlicht. Sie umfasste 221 Patienten im Stadium UICC III, davon erhielten 117 eine adjuvante Therapie mit 5-Fluorouracil über 6 Monate. Hierbei zeigte sich, dass bei geringen Thymidilat-Synthase Polymorphismen (double repeat homozygot 2R/2R und double repeat heterozygot 2R/3R) die Expressionshöhe der TYMS signifikant niedriger war und das Gesamtüberleben durch eine adjuvante Therapie 5-Fluorouracil verglichen mit jenen, die keine adjuvante Therapie erhielten, deutlich verbessert war. Patienten mit mehr Polymorphismen (triple repeat homozygot 3R/3R) zeigten häufiger eine erhöhte Expression der Thymidilat-Synthase und bei adjuvanter 5-Fluorouracil basierter Chemotherapie fand sich eine Abnahme im Gesamtüberleben. Somit ergibt sich hiermit ein vermeintlicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismusgrad und der Expressionshöhe der TYMS. Allerdings zeigte sich der Polymorphismus 3R/3R nur bei 58 der insgesamt 221 Patienten (Iacopetta et al, 2001).

Zusätzlich muss an dieser Stelle der ethnische Hintergrund der in den Studien eingeschlossenen Patienten beachtet werden, welcher ebenfalls einen Einfluss auf die Polymorphismen der Thymidilat-Synthase haben könnte. So wurde der Polymorphismus homozygot triplet repeat, der in der Studie unter Iacopetta et al. mit erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase und schlechteren Ansprechen auf 5-Fluorouracil assoziiert war, doppelt so häufig in der chinesischen Bevölkerung (67%) gefunden worden, verglichen zur kaukasischen Population (38%) (Marsh et al, 1999; Iacopetta et al, 2001). Natürlich können auch weitere genetische Faktoren einen Einfluss haben, so fanden Lenz et al. eine signifikant höhere Expression der TYMS bei Patienten mit mutiertem p53, verglichen zum Wildtyp (Lenz et al, 1998). Auch die Arbeitsgruppe unter Popat et al. zeigte, dass kolorektale Zellen mit hoher Thymidilat-Synthase Expression häufiger eine Überexpression von p53 zeigen (Popat et al, 2006). Kristensen et al. zeigten, dass die TYMS Expression signifikant höher ist, wenn eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vorliegt, verglichen zu Mikrosatellitenstabilen (MSS) kolorektalen Tumoren. Zusätzlich war der Polymorphismus 3R/3R im Thymidilat-Synthase Gen häufiger mit erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase assoziiert (Kristensen et al, 2010). Bei Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und geringer Thymidilat-Synthase Expression zeigt sich bei alleiniger operativer Therapie im Stadium UICC II ein verbessertes Gesamtüberleben. Außerdem fanden Öhrling et al. eine Korrelation zwischen Mikrosatellitenstabilität, erhöhten Expressionswerten der TYMS und verbessertem Gesamtüberleben bei adjuvanter 5-FU basierter Chemotherapie im Stadium UICC II und III (Öhrling et al, 2013).

Ein weiterer zu beachtender Aspekt für die sehr heterogenen Resultate könnte sein, dass noch weitere unbekannt Mutationen einen Einfluss auf die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase haben könnten.

Es steht jedenfalls fest, dass verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der prädiktiven Wertigkeit der Thymidilat-Synthase gekommen sind. Im metastasierten Stadium UICC IV konnte in der bisherigen Literatur mehrheitlich, nicht jedoch zur Gänze, eine Assoziation zwischen hoher Thymidilat-Synthase Expression und schlechterem Gesamtüberleben bei adjuvanter 5-FU Therapie aufgezeigt werden (Johnston et al, 1995; Lenz et al, 1998; Popat et al M. A., 2004). Im adjuvanten Setting im Stadium UICC II und III sind die Studienergebnisse jedoch weiterhin sehr divergent, wofür es wie erwähnt einige Hypothesen gibt (Edler et al, 2002; Allegra et al, 2003; Popat

et al, 2006; Niedzwiecki et al, 2017). Somit ist derzeit, bis auf in speziellen Subgruppen, von keiner im klinischen Alltag relevante prädiktiven Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom auszugehen.

In Tabelle 51 wird eine Übersicht über Studien mit Fragestellung nach der prognostischen und prädiktiven Wertigkeit der Thymidilat-Synthase gegeben.

Tabelle 51: Übersicht der Studien zur prognostischen und prädiktiven Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom – Abkürzungen: M. = Monat, ↑= Steigt bzw. hochreguliert ↓ = Sinkt bzw. runterreguliert →= kein Einfluss, keine Korrelation

Studie	Untersuchter Faktor	Follow-Up	Parameter	Einfluss	TYMS
Lenz et al. 1998	Prognostische Wertigkeit TYMS und p53 UICC II 45 Patienten	5,1 Jahre	Gesamtüberleben Rezidivhäufigkeit Tumorlokalisierung P53 Mutation	↓ ↑ Links ↑	↑ ↑ ↑ ↑
Allegra et al. 2003	Prognostische Wertigkeit TYMS, Ki-67 und p53 UICC II und III 706 Patienten	5 Jahre	Gesamtüberleben + Mutation p53 + Ki-67 positiv Rezidivfreies Überleben Ansprechen auf 5-FU basierte CTx	↓ ↑ ↓ →	↑ → ↑ →
Popat et al. 2004	Metaanalyse Prognostische Wertigkeit TYMS 20 Studien:13 mit UICC IV (887 Patienten) und 7 mit UICC I,II,III (2610 Patienten)		Gesamtüberleben	↓	↑
Chen et al. 2012	Metaanalyse Prognostischen Wertigkeit TYMS 17 Studien UICC II + III 2893 Patienten		Gesamtüberleben Krankheitsfreies-Überleben	→ →	→ →
Kornmann et al. 2002	Assoziation zwischen TYMS und DPD und Auftritt eines Rezidivs UICC II und III 348 Patienten		Rezidivfreie Zeit (DPD ohne Einfluss)	18 M. 11 M.	↓ ↑
Johnsten et al. 1995	Prädiktive Wertigkeit TYMS Kolonkarzinom: UICC IV, 9 Patienten Magenkarzinom: UICC I,II,II, 12 Patienten		5-FU Ansprechen	↑ ↓	↓ ↑
Aschele et al. 1999	Prädiktive Wertigkeit TYMS bei 5-FU basierter CTx UICC IV 48 Patienten	3 Jahre	Progressionsfreie Zeit Mittlere Überlebenszeit 3-Jahre Überlebensrate	9,6 M. 6,2 M. 18,4 M. 15,4 M. 19% 0%	↓ ↑ ↓ ↑ ↓ ↑
Salonga et al. 2000	Prädiktive Wertigkeit TYMS, DPD und TP UICC IV 33 Patienten	3 Jahre	5-FU Ansprechen +DPD ↓ +TP ↓	↑ ↑	↓ ↓
Paradiso et al. 2000	Prädiktive Wertigkeit TYMS und p53 UICC IV 108 Patienten	3 Jahre	5-FU Ansprechen +p53 Überexpression	↑ ↑	↓ ↓

Ichikawa et al. 2003	Prädiktive Wertigkeit TYMS und DPD UICC IV 37 Patienten	1,2 Jahre	5-FU Ansprechen +DPD hoch +DPD nieder	↓ ↑	↕
Edler et al. 2002	Prognostische und Prädiktive Wertigkeit TYMS UICC II + III 862 Patienten		Gesamtüberleben +alleinige OP +adjuvante 5-FU basierte CTx	↑ ↓ ↓	↓ ↕
Broll et al. 2005	Prognostische und prädiktive Wertigkeit TYMS und p53 UICC I,II,III 120 Patienten, davon 30 mit adjuvanter CTx		Gesamtüberleben + 5-FU basierte CTx Rezidivrate mit p53 Überexpression Tumorinvasion	↓ ↓ ↑ ↑	↑ ↑ ↑ ↑
Soong et al. 2008	Prognostische und prädiktive Wertigkeit TYMS, DPD und TP UICC II + III 945 Patienten		Gesamtüberleben +niedrige DPD 5-FU Ansprechen +niedrige DPD +niedrige TP	↓ ↓ ↑ ↑ ↑	↓ ↓ ↓ ↓ ↓
Niedzwiecki et al. 2017	Prognostische und Prädiktive Wertigkeit TYMS UICC III: 1264 Patienten UICC II: 1738 Patienten	7 Jahre	Gesamtüberleben +UICC II mit OP alleine +adjuvante 5-FU basierte CTx bei UICC III und high-risk II Tumorstadium MSI MSI + Krankheitsfreies Überleben MSI + BRAF- Mutation + krankheitsfreies Überleben 5-FU Ansprechen	↑ ↑ → ↑ ↑ ↓ →	↑ ↑ → ↑ ↑ ↑ →
Iacopetta et al. 2001	Einfluss von Polymorphismen im TYMS Gen auf das Ansprechen auf 5-FU im adjuvanten Setting UICC III 221 Patienten	2,5 Jahre	Ansprechen auf 5-FU bei 3R/3R 2R/3R 2R/2R	↓ ↑ ↑	↕ ↓ ↓
Popat et al. 2006	Korrelation TYMS, MSI und p53 UICC I,II,III 444 Patienten		p53 Überexpression MSI-Status	↑ →	↑ →
Kristensen et al. 2010	Korrelation TYMS Expression und MSI UICC I,II,III,IV 68 Patienten		MSI MSS 3R/3R	↑ ↓ ↑	↑ ↓ ↑
Öhring et al. 2013	Prognostische und prädiktive Wertigkeit TYMS und MSI UICC II, III 716 Patienten		Gesamtüberleben +MSI mit OP allein + MSS mit CTx 5-FU	↑ ↑	↓ ↑

5.4. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

5.4.1. Vergleich des experimentellen Patientenkollektivs mit der Literatur

Im experimentellen Patientenkollektiv dieser Arbeit wurden insgesamt 78 Patienten im UICC Stadium III mit R0-Resektion untersucht. Die Geschlechterverteilung mit 47 Männern und 31 Frauen (1,5:1) ist mit den Angaben aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Institutes vergleichbar (1,2:1). Das Alter der Patienten, welches sich vor allem zwischen 50. und 70. Lebensjahr befand, ist ebenfalls mit der Literatur übereinstimmend, da hier vor allem ein Anstieg ab dem 50. Lebensjahr beschrieben wird. Bei der Lokalisation des Kolonkarzinoms bestätigten sich die Verteilungsangaben aus dem Krebsregister, welche eine Zunahme der Häufigkeit von proximal nach distal zeigen. In diesem Kollektiv zeigte sich ebenfalls eine Häufung im distalen Kolon (Sigma) mit 52,7%. Verglichen mit 30% aus der Literatur eine etwas verzerrte Darstellung. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Patienten in diesem Kollektiv ausschließlich an einem Kolonkarzinom erkrankt sind und nicht an einem Rektumkarzinom, welches meist einen noch größeren Prozentanteil ausmacht. In 97,4% wurden mindestens 12 Lymphknoten oder mehr reseziert, dies entspricht der Anzahl, welche die Leitlinien als adäquat bezeichnen, um eine ausreichende histologische Beurteilung (pN) abzugeben. Da in deutschen Krebszentren ein Sollwert von mindestens 12 untersuchten Lymphknoten in $\geq 95\%$ der Fälle vorausgesetzt wird, ist diese Prozentangabe akzeptabel (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Zertifizierungskommission Viszeralonkologische Zentren / Darmkrebszentren, 2017). Gründe für eine nicht adäquate Lymphknoten Resektion mit einer Anzahl < 12 sind Voroperationen, Notfallresektionen sowie lokale Resektionen bei sehr alten Patienten. Bei insgesamt 51,2% wurde eine vollständige 5-Fluorouracil basierte adjuvante Chemotherapie durchgeführt. In 2,6% wurde die Chemotherapie aufgrund mangelnder Compliance oder sonstiger, nicht näher bekannter Gründe abgebrochen. Zusätzlich konnte bei 36 Patienten (46,2%) keine Angaben über die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie gemacht werden. Da die S3-Leitlinien, wie bereits erwähnt, den Allgemeinzustand des Patienten im Vordergrund sehen, ist die Unvollständigkeit der 5-FU basierten adjuvanten Chemotherapie im Kollektiv nachvollziehbar. Die Rezidivrate in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit mit einem follow-up Zeitraum von mindestens 24 Monaten bis maximal 80 Monaten liegt bei 39,8%, dabei kam es in nur 6,4% zu einem Lokalrezidiv. Dies deckt sich nahezu mit der Literatur, welche eine Lokalrezidivrate von weniger als 5% aufzeigt. 33,3% aller Patienten im Kollektiv dieser Arbeit sind tumorabhängig verstorben. Da in der Literatur die 5- Jahresüberlebensrate bei radikaler R0 Resektion mit adjuvanter Chemotherapie im UICC Stadium III zwischen 24 – 58% variiert, zeigt sich auch hier, dass die Ergebnisse in unserem Patientenkollektiv mit Literaturangaben übereinstimmen. Zusammenfassend handelt es sich somit um ein repräsentatives Patientenkollektiv in dieser Arbeit (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017; Kaatsch et al, 2015; Labianca et al, 2010).

5.4.2. Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der Literatur

In dieser Arbeit wurde mittels reverse-Transkriptase-Polymerasen-Kettenreaktion (rtPCR) die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase im Gewebe von Patienten mit Kolonkarzinom im UICC II und III bestimmt, wobei der Nachweis aufgrund oben diskutierter Gründe nur für das Kollektiv UICC II gelang. In der Literatur existieren bereits zahlreiche Studien zur prognostischen Wertigkeit der TYMS, wobei nicht jede

Studie für einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen geeignet scheint. Der Grund liegt hierbei in der Methode, denn sehr viele Arbeiten basieren auf immunhistochemischen Verfahren unter Verwendung von Antikörpern, die in der Regel zu divergenten Ergebnissen führen. Die Patienten im UICC Stadium II dieser Arbeit zeigten im Falle eines Rezidivs signifikant geringere Expressionswerte der Thymidilat-Synthase in der rtPCR. In der Studie unter Kornmann et al. konnte im Jahre 2003 gezeigt werden, dass Patienten im UICC II und III mit geringer TYMS und hoher Dihydropyrimidin-Dehydrogenase signifikant am häufigsten ein Rezidiv entwickelten. Zusätzlich zeigte sich auch bei alleiniger Betrachtung einer geringen Expression der Thymidylat-Synthase ein gehäuftes, wenn auch nicht signifikantes, Auftreten von Rezidiven. Insgesamt wurden 309 Patienten mit Kolonkarzinom oder Rektumkarzinom im UICC II und III eingeschlossen, dabei erhielten alle Patienten eine adjuvante 5-FU basierte Chemotherapie (drei Versuchsarme, 5-FU mit Leucovorin, 5-FU mit Leucovorin und Folinsäure und 5-FU mit Leucovorin und Inferferon Alpha, Radiochemotherapie bei Rektumkarzinom) (Kornmann et al, 2003). In dieser Arbeit wurde die DPD nicht bestimmt, allerdings stimmen die Ergebnisse bezogen auf die TYMS überein und es wurde auch dort mit der Methode der rtPCR gearbeitet. Dennoch muss beachtet werden, dass das Kollektiv in dieser Arbeit nicht mit 5-Fluorouracil adjuvant behandelt wurde. Dies ist insofern entscheidend, weil sich die Thymidilat-Synthase Expression durch die adjuvante Chemotherapie verändert haben kann. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit nur Patienten mit Kolonkarzinom untersucht, sodass auch dies ein Unterschied zur Studie von Kornmann et al. ist (Kornmann et al, 2003). Eine weitere Studie, welche mit der rtPCR gearbeitet hat, wurde von Salonga et al. im Jahre 2000 publiziert. Dabei zeigte sich bei geringer Expression der TYMS ein verbessertes Ansprechen auf eine kontinuierliche 5-Fluorouracil basierte Therapie (zwei Zyklen = 8 Wochen) im adjuvanten Setting und dies war auch mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert. In dieser Arbeit wurden allerdings Patienten mit disseminierten oder rezidivierenden kolorektalen Karzinom eingeschlossen, sodass die Schlussfolgerung, dass Patienten mit geringer Thymidilat-Synthase Expression im UICC Stadium II besser auf 5-FU ansprechen, nur begrenzt möglich ist (Salonga et al, 2000).

In der Studie unter Soong et al. zeigten sich ebenfalls vergleichbare Ergebnisse. Wie bereits erläutert, zeigten hier Patienten im Stadium UICC II (kein high-risk) bei alleiniger operativer Therapie und geringer Expression der TYMS ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben, allerdings verbesserte sich dies bei adjuvanter 5-FU/Leucovorin basierter Chemotherapie (Soong et al, 2008). Aufgrund der angewandten immunhistochemischen Methodik, sind die Ergebnisse aber nur eingeschränkt mit dieser Arbeit (hier rtPCR) vergleichbar.

Insgesamt zeigt sich für das UICC Stadium II, dass die Ergebnisse der eigenen Arbeit, die eine schlechtere Prognose für Patienten mit einer geringeren Thymidilat-Synthase Expression aufgezeigt haben, durch Angaben in der Literatur gestützt. Allerdings lassen die in dieser Arbeit erfassten Ergebnisse keine Aussage bezüglich eines Ansprechens auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie zu, da diese bei dem untersuchten Kollektiv nicht eingesetzt wurde.

5.4.3. Mangelnde Vergleichbarkeit zwischen Therapien von heute und früher

In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Therapieregime in den letzten Jahren stetig verändert haben, ist ein Vergleich zwischen den Patienten von heute und früher oft nur eingeschränkt möglich. Seit 1990 wurde 5-Fluorouracil und Leucovorin zum Standard in der adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit Kolonkarzinom im UICC Stadium III. Diese Empfehlung wurde bei einer Consensuskonferenz des National Institutes of Health

(INH) im Jahre 1990 in Bethesda festgelegt. Patienten im UICC Stadium II zeigten keinen deutlichen Profit in den bis dahin publizierten Studien, sodass in diesem Stadium keine Empfehlung zu einer adjuvanten Chemotherapie ausgesprochen wurde (National Institutes of Health, 1990).

Bereits in den 1960er wurde mit 5-FU und Fluorodeoxyuridine im adjuvanten Setting therapiert. Allerdings sei hierbei erwähnt, dass die Dosierungen und die Zeitdauern der Chemotherapie sehr individuell von Klinik zu Klinik variierten. Deswegen sind weit zurückliegende Patientendaten oft nicht mit aktuellen Daten vergleichbar, da wie bereits erwähnt, die Therapieregime sehr unterschiedlich waren und auch nachdem 1990 ein Konsens erarbeitet wurde, nicht von einer sofortigen und flächendeckenden Umsetzung ausgegangen werden kann (National Institutes of Health, 1990).

Zusätzlich muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Daten, die bereits mehrere Jahre zurückliegen oft schwer zu erfassen sind, beziehungsweise unvollständig sind, sodass ein valider Vergleich auch aus diesen Gründen nur eingeschränkt möglich ist.

5.4.4. Ist das Ansprechen des Patienten mit Kolonkarzinom auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie prädizierbar?

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Thymidilat-Synthase als möglicher prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil. Der prädiktive Wert dieses Enzyms ist bereits seit mehr als 20 Jahren ein immer wiederkehrendes Thema in der Forschung des kolorektalen Karzinoms. Es konnten bisher wie bereits mehrfach erwähnt, in verschiedensten Studien nur kontroverse Ergebnisse erzielt werden, sodass bis heute nicht klar ist, welchen Stellenwert die Thymidilat-Synthase in der Frage nach der Vorhersagbarkeit auf das Therapieansprechen hat.

Das Enzym katalysiert die Synthese von dTMP (Desoxythymidylat) ausgehend von dUMP (Desoxyuridylat). Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Methylierung, wobei die Methylgruppe von N^5,N^{10} -Methylen tetrahydrofolat (N^5,N^{10} -FH₄) zur Verfügung gestellt wird. Eine ausreichende Menge an dTMP ist für die DNA-Replikation und Reparatur unbedingt erforderlich. Die Regeneration erfolgt über eine NADPH und Serin abhängige Reaktion, somit wird aus Dihydrofolat wieder N^5,N^{10} -FH₄. Der Stoffwechselfvorgang läuft dabei im Zytosol in allen Zellen des Körpers ab, die dTMP als Baustein für die DNA benötigen. Ausgenommen davon sind Prokaryonten und Pflanzen. Da dieser Vorgang wichtig für die Zellteilung und Vermehrung ist, findet sich das Enzym auch in Tumorzellen, was als Angriffspunkt für Chemotherapeutika dient. Die Abbildung 27 zeigt den soeben beschriebenen Ablauf des Stoffwechselweges der Thymidilat-Synthase (Ahern Kevin, 2013).

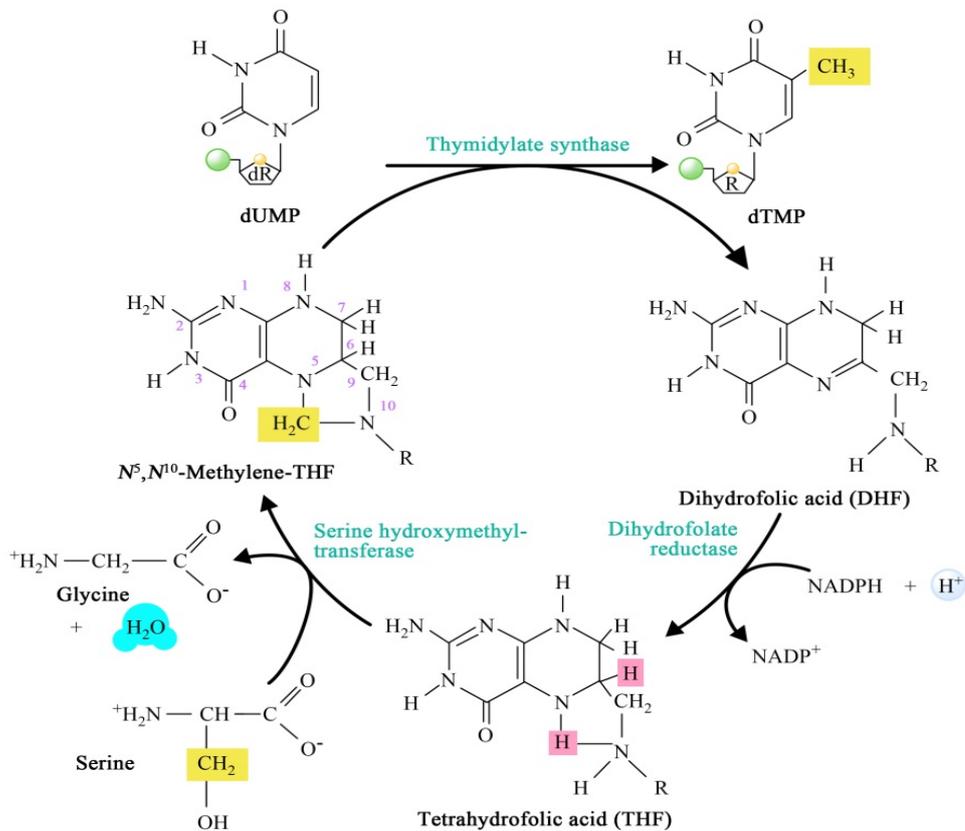


Abbildung 27: Der Stoffwechsel der Thymidilat-Synthase nach Kevin Ahern. Die Thymidilat-Synthase katalysiert die Methylierung von Desoxyuridylat (dUMP) zu Desoxythymidylat (dTMP). Für die Regeneration der Methylgruppe wird NAPDH benötigt. Diese Synthese ist essenziell für die Zellteilung und Vermehrung von allen Zellen, die dTMP als Baustein für die DNA benötigen. Dieser Vorgang spielt somit auch in der Vermehrung von Tumorzellen eine wichtige Rolle, sodass dies als Angriffspunkt für Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil dient (Ahern Kevin, 2013).

Das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil greift genau in diesen Stoffwechselweg ein, indem es die Thymidilat-Synthase irreversibel hemmt. Es kommt dadurch zu einer Hemmung der Zellteilung vor allem in der Interphase. Die Interphase ist der Abschnitt des Zellzyklus zwischen letzter und nächster Mitose. Sie besteht aus der G1-, S und G2-Phase und macht dabei einen Großteil des Zellzyklus aus. Somit kann hier im ersten Moment die Vermutung geäußert werden, dass jene Zellen mit hohen Teilungsraten besser auf das Chemotherapeutikum ansprechen, als jene mit niedriger Teilungsrate. Dennoch muss auf der anderen Seite beachtet werden, dass die erhöhte Expression der Thymidilat-Synthase auch zu einer Zunahme der 5-FU Resistenz führen und die Ansprechrate senken kann.

Darüber hinaus hemmt 5-Fluorouracil den Exosomenkomplex, welcher für die Zellen lebensnotwendig ist. Der Exosomenkomplex besitzt Ribonukleaseaktivitäten und zeigt Zellkompartiment spezifische Reaktionen. Im Zytosol dient er dem Abbau der messenger-RNA (mRNA), im Zellkern unterstützt er die Prozessierung der kleinen RNA und im Nukleolus dient er der Prozessierung von ribosomaler RNA. Im Nukleolus befindet sich die höchste Dichte an Exosomenkomplexen und dies ist gleichzeitig der Hauptangriffspunkt von 5-Fluorouracil (Fang et al, 2004).

Außerdem ist 5-Fluorouracil ein sogenannter Antimetabolit, da er Ähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Thymin, Cytosin und Uracil besitzt. 5-Fluorouracil wirkt als kompetitiver Antagonist, was heißt, dass es um die Bindestelle am katalytischen Zentrum der Thymidilat-Synthase mit dUMP konkurriert. In Folge kommt es fälschlicherweise zum Einbau in die DNA und RNA mit Folge eines Kettenabbruchs (National Library of Medicine: Toxnet - Toxicology data network, Ohne Jahr).

Die Abbildung 28 nach Schwarzenbach et al. zeigt eine Übersicht über die Stoffwechselwege des 5-Fluorouracils (Schwarzenbach Heidi, 2010).

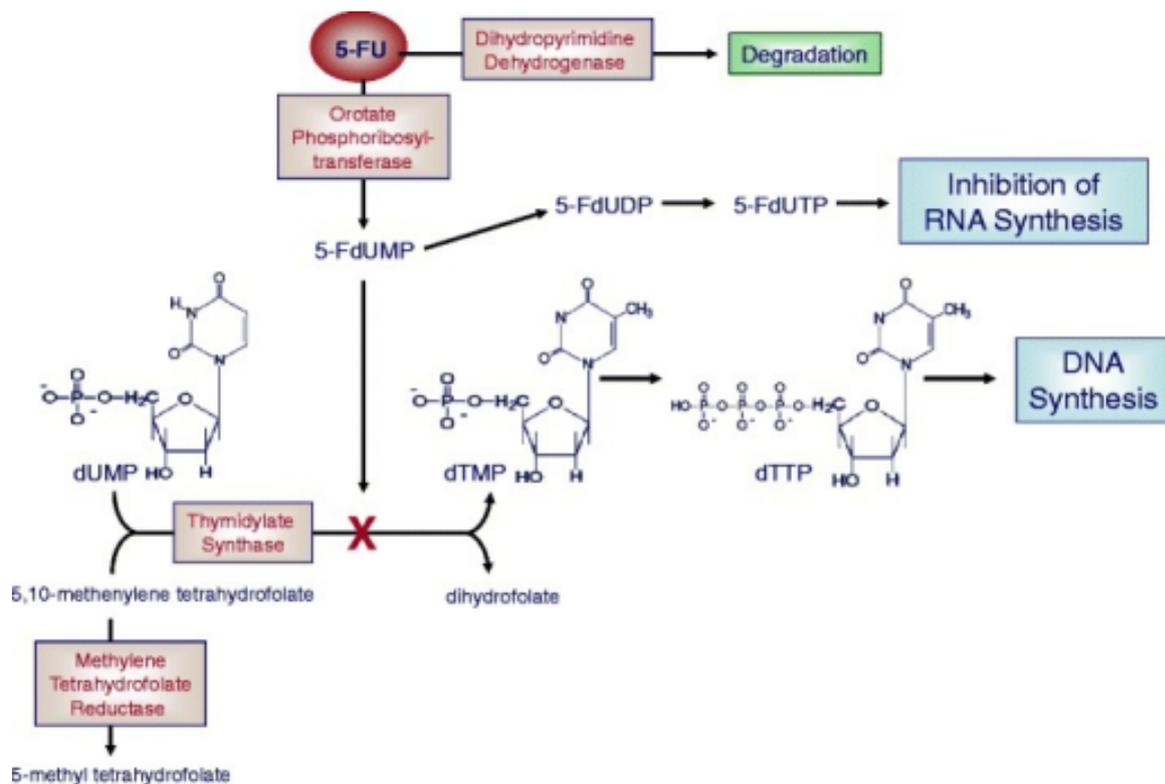


Abbildung 28: 5-Fluorouracil greift als Chemotherapeutikum an verschiedenen Stellen des RNA- und DNA-Stoffwechsels in die Zellteilung ein. Durch Hemmung der Thymidilat-Synthase wird die DNA-Synthese gehemmt und durch Entstehung von 5-FdUTP die RNA-Synthese blockiert. Zusätzlich interagiert das Chemotherapeutikum als Antimetabolit durch die Ähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Thymin, Cytosin und Uracil und führt damit zu Kettenabbrüchen sowohl in RNA als auch in DNA. Außerdem wird der Exosomenkomplex, welcher für den Abbau der messenger-RNA (mRNA) im Zytosol sowie für die Prozessierung der kleinen RNA im Zellkern und für der Prozessierung der ribosomalen RNA im Nukleolus essentiell ist, durch 5-Fluorouracil gehemmt. Zusätzlich ist der Abbau von 5-FU über die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase dargestellt (Schwarzenbach Heidi, 2010).

Dabei wird deutlich, dass 5-Fluorouracil in zweifacher Art und Weise wirkt. Einerseits wirkt es als Hemmung der Thymidilat-Synthase mittels 5-FluordesoxyUridinMonoPhosphat (5-FdUMP), welches durch das Enzym Orotate Phosphoribosyltransferase entsteht. 5-FdUMP kompetiert dabei mit dUMP um die Bindestelle bei der Thymidilat-Synthase. Andererseits wirkt es als Hemmstoff der RNA-Synthese als 5-FluordesoxyUridinTriPhosphat (5-FdUTP), ebenfalls synthetisiert durch die Orotate Phosphoribosyltransferase und anschließender Umwandlung von 5-FdUDP zu 5-FdUTP.

Anhand von diesem Wirkmechanismus liegt es nahe, dass die Aktivität der Thymidilat-Synthase einen Einfluss auf das Ansprechen auf 5-Fluorouracil besitzen könnte. Bereits in den 1990er Jahren wurde der prädiktive Wert der TYMS in Zusammenhang mit 5-Fluorouracil untersucht. Unter Peters GJ et al. konnte im Jahre 1994 gezeigt werden, dass Patienten, welche an einem Kolonkarzinom erkrankt waren, mit einer hohen Expression der TYMS ein schlechteres Ansprechen auf eine Chemotherapie mit 5-FU und Leucovorin zeigten. Allerdings wird darauf hingewiesen, dass sich diese Ergebnisse auf lokal fortgeschrittene Kolonkarzinome beziehen. Somit ist hier keine Aussage für alle

Stadien möglich und der Autor empfiehlt zusätzlich eine Reevaluation der Thymidilat-Synthase im Verlauf (Peters et al, 1994).

In der weiterführenden Literatur werden erhöhte Expressionswerte der Thymidilat-Synthase ebenfalls als Faktor für ein schlechteres Ansprechen auf 5-Fluorouracil diskutiert. Somit wird davon ausgegangen, dass eine erniedrigte Expression der TYMS mit einem längeren Überleben und/oder mit einem besseren Ansprechen auf 5-FU korreliert (Paradiso et al, 2000; Aschele et al, 2000; Salonga et al, 2000) Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die prädiktive Fähigkeit der Thymidilat-Synthase in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung ist. Aschele et al. und Johnston et al. konnten die mögliche Korrelation nur im Falle vom metastasierten Kolonkarzinom und nicht in Primärtumoren aufzeigen (Aschele et al, 2000; Johnston et al B. A., 2003).

Zwei weitere große Studien wurden von Allegra et. al durchgeführt. Dabei wurden in der ersten Studie im Jahre 2002 465 Patienten mit Kolonkarzinom eingeschlossen. 245 Patienten davon waren im UICC Stadium III und 220 im UICC Stadium II. Es erhielten 151 Patienten eine alleinige operative Therapie und 314 Patienten wurden operiert und erhielten adjuvant eine Chemotherapie auf Basis von 5-Fluorouracil. Die Studie hatte eine Follow-Up Zeit von mindestens 5 Jahren, wobei retrospektiv betrachtet kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Thymidilat-Synthase und dem klinischen Outcome gezeigt werden konnte (Allegra et al, 2002).

In der zweiten Studien im Jahre 2003 wurden 706 Patienten, davon 291 im UICC Stadium II und 415 Patienten im UICC Stadium III miteingeschlossen. 275 Patienten erhielten eine rein operative Therapie und 431 Patienten wurden adjuvant mit 5-FU basierter Chemotherapie behandelt. Retrospektiv konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen Expression der Thymidilat-Synthase ein schlechteres Langzeitüberleben hatten. Somit konnte hier ein möglicher prognostischer Wert der TYMS aufgezeigt werden. Ein Vorteil für eine adjuvante Chemotherapie in Abhängigkeit von der Thymidilat-Synthase Expression konnte allerdings auch hier nicht beobachtet werden (Allegra et al, 2003).

Kurz darauf gab es eine neue und bislang größte Studie zur Frage nach der prognostischen Wertigkeit der Thymidilat-Synthase. Es wurden 967 Patienten aus China untersucht, wobei 59% an einem Rektumkarzinom und 41% an einem Kolonkarzinom erkrankt waren. 90% der Patienten erhielten eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU (kontinuierliche für 7 Tage intravenös). Es wurden die Expressionswerte der TYMS mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers bei 779 Patienten bestimmt und zusätzlich der p53 Status. Es konnte weder für p53 noch für die Thymidilat-Synthase ein signifikanter prognostischer Wert im adjuvanten Setting bei kolorektalen Karzinomen aufgezeigt werden. Allerdings wurde der Effekt der Thymidilat-Synthase bei Patienten, die keine adjuvante Chemotherapie erhalten haben und somit nur operiert wurden, nicht ausreichend diskutiert und präsentiert (Popat et al, 2006).

Im Jahre 2008 publizierten Soong R. et al. eine Studie mit 945 Patienten, welche an einem kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II und III erkrankt waren. Sowohl in Stadium II als auch im Stadium III konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Expression der Thymidilat-Synthase und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase im Falle einer alleinigen operativen Therapie mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. Allerdings zeigten Patienten im UICC Stadium II ein signifikant besseres Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU im Falle eines niedrigen Expressionswertes. Somit wurde hier sowohl ein negativ prognostischer Wert, als auch ein positiv prädiktiver Wert der Thymidilat-Synthase aufgezeigt (Soong et al, 2008).

Allerdings kann in einigen Studien auch gegenteiliges gezeigt werden, indem vor allem Patienten mit einer deutlich erhöhten Thymidilat-Synthase Expression von einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-FU profitieren. Diese These wird zusätzlich auf zellulärer Ebene unterstützt. Im Jahre 2002 konnten Derenzini et al zeigen, dass die Expression der TYMS mit der zellulären Proliferation korreliert und auch ihre Aktivität hierbei stetig ansteigt. Dies unterstreicht die Vermutung, dass der Wert der Thymidilat-Synthase-Expression mit der Prognose korreliert und, dass Patienten, sofern die Expression sehr hoch ist, besser auf eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU ansprechen (Derenzini et al, 2002).

Es wurde auch in einer Studie unter Edler et al. verdeutlicht, dass Patienten mit geringen Expressionswerten der Thymidilat-Synthase von einer alleinigen Operation profitieren und die adjuvante 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie eher keinen Vorteil im Gesamtüberleben zeigt (Edler et al, 2002).

Es wird sich somit in Zukunft weiterhin vieles um die Frage nach dem idealen prädiktiven und auch prognostischen Marker beim kolorektalen Karzinom drehen. Vor allem Patienten im UICC Stadium II würden von signifikanten Biomarkern profitieren, da es hier noch keine eindeutige Antwort darauf gibt, ob eine adjuvante Chemotherapie von Vorteil ist. Die Herausforderung ist somit immer noch groß, denn das Ziel muss es sein, die Chemotherapie für jeden Patienten so individuell wie möglich zu indizieren, sodass bei möglichst wenigen Nebenwirkungen ein maximaler tumorspezifischer Effekt erlangt wird.

Im Jahre 2017 wurden unter Niedzwiecki et al die Ergebnisse einer prospektiven Studie im Oncologist veröffentlicht. Es wurden Patienten im UICC Stadium II und III eingeschlossen. Die Expressionsanalyse erfolgte per Tissue Mikroarrays (TMA) und Immunhistochemie. Zusätzlich wurde der Mismatch-Reparatur- und BRAF-Status evaluiert. Es konnte erneut gezeigt werden, dass Patienten mit einer erhöhten TYMS-Expression von einer adjuvanten Therapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des Krankheitsfreien Überlebens profitierten, obwohl die Höhe der Thymidilat-Synthase Expression nicht das Ansprechen auf 5-FU vorhersagen konnte. Es wird betont, dass die Thymidilat-Synthase Expressionsanalyse keine Hilfe in der Auswahl einer individuellen adjuvanten Chemotherapie beim Kolonkarzinom darstellt. Im UICC Stadium II fand sich ebenfalls, bei alleiniger Operation oder zusätzlicher Gabe des Antikörpers Edercolomab (ohne Einfluss), ein verbessertes Gesamtüberleben bei erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase. Allerdings wurden hier auch weitere Parameter untersucht, so zeigte sich im UICC II bei hoher Thymidilat-Synthase Expression ein vermehrtes Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität, verbunden mit einem verbesserten Krankheitsfreien-Überleben. Sobald jedoch zusätzlich eine BRAF Mutation nachgewiesen wurde, verschlechterte sich das Gesamtüberleben signifikant (Niedzwiecki et al, 2017).

Somit zeigt sich auch im Jahre 2017, dass die Frage nach dem prädiktiven und prognostischen Wert der Thymidilat-Synthase immer noch nicht vollständig geklärt ist.

Ebenfalls relevant in dieser Diskussion ist die Tatsache, dass angesichts eines normalen Metabolismus 80% des zugeführten 5-Fluorouracil in der Leber über das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) abgebaut werden. Dieser Abbau passiert innerhalb kürzester Zeit, die Plasmahalbwertszeit von 5-Fluorouracil beträgt nur 10-20 Minuten (Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate, 2014). Die 20% des 5-FU, welche nicht über die DPD abgebaut werden, werden wie bereits unter Abbildung 28 erläutert mittels Orotat-Phosphoribosyltransferase zu weiteren Metaboliten wie 5-

FdUMP und 5-FdUTP verstoffwechselt. Eine niedrigere Expression der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase ist in Studien nach Salonga et al. und Tsuji et al. allgemein mit einem besseren Ansprechen auf 5-Fluorouracil assoziiert (Salonga et al, 2000; Tsuji et al, 2004).

Das Gen der DPD wurde 1994 entdeckt und spielt seitdem eine wichtige Rolle in der Diskussion um die Nebenwirkungen sowie Resistenzmechanismen von 5-Fluorouracil. In Kombination mit Expressionswerten der Thymidilat-Synthase war der prädiktive Wert der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase sogar noch deutlicher ausgeprägt. Bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom und geringer Expression von TYMS und DPD fand sich eine 75%ige Ansprechrate auf die orale Chemotherapie mit Uracil und Tegafur und Leucovorin bei 39 in der Studie untersuchten Patienten. Die mittlere Überlebenszeit betrug bei Patienten mit niedrigen Expressionswerten in beiden Enzymen 16,3 Monaten, verglichen zu 8,4 Monaten bei Patienten mit erhöhten Werten (Ichikawa et al, 2003). In der Studie von Ciaparrone et al. wurden mit einer follow-up Zeit von 90 Monaten 62 Patienten mit kolorektalen Karzinom im UICC II und III nach radikaler onkologischer Resektion und adjuvanter 5-FU Chemotherapie eingeschlossen. Dabei zeigte sich ein signifikant besseres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit niedrigen Expressionswerten der Thymidilat-Synthase und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (Ciaparrone et al, 2006). Unter Kornmann et al. wurde analysiert, dass Patienten im UICC II und III mit einer hohen TYMS und niedrigen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Expression von einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil signifikant mehr davon profitieren, verglichen zu jenen Patienten mit geringer Expression der Thymidilat-Synthase und erhöhter DPD. Vier Jahre nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie waren 46,2% der Patienten mit geringer Expression der TYMS und hoher Expression der DPD verstorben, gegenübergestellt zu 15,9% bei umgekehrter Expression mit hoher TYMS und niedriger DPD Expression (Kornmann et al, 2003). Somit könnte die zusätzliche Bestimmung der DPD Expression dabei helfen Patienten, die von einer adjuvanten 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie profitieren, zu identifizieren. Möglicherweise besitzt die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase sogar einen größeren prognostischen Einfluss als die Thymidilat-Synthase für die Effektivität einer 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie. Da es, wie bereits erwähnt, verschiedene Wirkungsmechanismen für eine 5-FU basierte Chemotherapie gibt, könnte man spekulieren, dass es bei einer ausreichenden 5-Fluorouracil Konzentration immer zu einer chemotherapeutischen Wirkung kommt. Somit ist die verfügbare 5-FU Konzentration, die mit der Höhe der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase korreliert, entscheidender als die Aktivität eines einzelnen Zielenzym in einem der möglichen Angriffspunkte. Die S3-Leitlinie des kolorektalen Karzinoms bewertet die Bestimmung eines DPD-Mangels (DPYD*2A Polymorphismus) vor Einleitung einer Fluoropyrimidin-Therapie als Option, welche durchgeführt werden kann. Bei heterozygoten Trägern sollte aufgrund vermehrter Gefahr von Nebenwirkungen eine Dosisreduktion von 5-Fluorouracil erfolgen und bei homozygoten Trägern sollte wenn möglich aufgrund der deutlich erhöhten Toxizitätsgefahr vollständig auf Fluoropyrimidinen verzichtet werden (Evidenzgrad 2b) (Meulendijks et al, 2015; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017)

Es stellt sich die Frage, ob die Thymidilat-Synthase einen klinisch relevanten prädiktiven Wert besitzt. Die derzeitige Literatur zeigt eine sehr kontroverse Diskussion und es muss beachtet werden, dass wie bereits erläutert viele Bias eine Ursache für dies darstellen kann. Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Konzentration von 5-

Fluorouracil in vielen Studien unterschiedlich ist, sodass die Möglichkeit besteht, dass eine zu geringe Dosierung den erwarteten Therapieerfolg verhindert.

Eine Steigerung der Thymidilat-Synthase Expression im Sinne einer Gegenregulation nach Gabe von 5-FU konnte in dieser Arbeit anhand der Zelllinie DLD1 in vitro nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich zu in vivo Reaktionen ist allerdings nicht möglich, sodass eine mögliche Gegenregulation im Sinne eines physiologischen Anpassungsprozesses weiterhin eine Ursache für ein fehlendes Ansprechen auf 5-Fluorouracil im adjuvanten Setting sein kann.

5.5. Schlussfolgerung und Therapieempfehlung

Wenn die Höhe der Thymidilat-Synthase Expression im Gewebe bei Patienten mit Kolonkarzinom einen Einfluss auf die gesamte Prognose und das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie hätte, wäre dies von weitreichender therapeutischer Konsequenz. Somit könnten Patienten, die laut den Expressionswerte nicht auf die Gabe von 5-FU ansprechen, von den assoziierten Nebenwirkungen verschont werden. Hierzu müsste allerdings geklärt werden, ob geringe oder erhöhte Expressionswerte der Thymidilat-Synthase von Vorteil sind. Leider kann dies aus den eigenen Ergebnissen und den verfügbaren Literaturangaben nicht abgeleitet werden, denn die Daten sind hierfür widersprüchlich. Aber auch wenn sich eine klare Korrelation ergäbe, müsste man zudem über einen hochreaktiven Test verfügen, der aktuell nicht vorliegt. Dennoch erlangen derartige prädiktive Marker zunehmend Bedeutung und ermöglichen individualisierte Therapie, wie am Beispiel von K-RAS exemplarisch gezeigt werden kann.

In einer Metaanalyse von Tsoukalas N. et al. konnte mit einer Sensitivität von 47% und einer Spezifität von 96% gezeigt werden, dass KRAS Mutationen als negativer Prädiktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem Antikörper Cetuximab gelten (Tsoukalas et al, 2012). Weitere Mutationen wie die NRAS Mutation zeigen sich ebenfalls als negativ prädiktiver Faktor bezogen auf das Ansprechen auf EGFR-Antagonisten wie Cetuximab (Schirripa et al, 2015). Es war der Anspruch dieser Arbeit eine derartige Korrelation für die Thymidilat-Synthase herzustellen, leider konnte die Frage aber nicht mit ausreichender Sicherheit beantwortet werden.

Der Versuch in dieser Arbeit, mit Hilfe des Gewebes von Patienten mit Kolonkarzinom im UICC Stadium II, nachdem die Gewebe der Patienten im UICC III eine degradierte RNA aufwiesen, die prognostische Wertigkeit anhand der Rezidive genauer zu untersuchen, muss insofern kritisch betrachtet werden, da es sich um ein sehr kleines Patientenkollektiv handelt. Für eine definitive Aussage über den prognostischen Wert der TYMS hätte ein weitaus größeres Kollektiv untersucht werden müssen, welches aber nicht vorlag. Aber auch die Literatur, mit zum Teil deutlich größeren Kollektiven, lässt keine eindeutige Aussage zur prognostischen Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom zu. Es finden sich sowohl zur eigenen Arbeit kongruente Ergebnisse in der Literatur, wie in der Studie unter Kornmann et al., in welcher sich das höchste Rezidivrisiko bei Patienten im UICC II und III nach adjuvanter Chemotherapie mit 5-Fluorouracil bei niedriger Expression der Thymidilat-Synthase und erhöhter Expression der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase zeigte (Kornmann et al, 2003). Die Studie von Soong et al. unterstützt ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit. Es fand sich hier ein schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten im UICC II und III mit niedriger Expression der Thymidilat-Synthase. Diese Arbeit ist insofern interessant, da die Patienten im UICC Stadium II nur mittels onkologischer radikaler Resektion therapiert worden waren und keine adjuvante Chemotherapie erhielten, genauso wie in dieser Arbeit. Dies hat den

Vorteil, dass somit ein Einfluss der 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie auf die Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase ausgeschlossen werden kann (Soong et al, 2008). Allerdings fanden sich in einigen Studien auch widersprüchliche Aussagen, in denen aufgezeigt wurde, dass eine erhöhte Expression der Thymidilat-Synthase mit einem verschlechterten Gesamtüberleben einhergeht (Edler et al, 2002; Allegra et al, 2003; Popat et al M. A., 2004). In einer weiteren Studie unter Edler et al. lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei den eingeschlossenen 61 Patienten im UICC I-IV nach alleiniger operativer Therapie bei erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase bei 66%, verglichen zu 88% bei geringer (Edler et al, 2000).

Bisher empfehlen die deutschen Leitlinien eine Chemotherapie erst ab dem UICC Stadium III bzw. in ausgewählten Einzelfällen mit Risikoprofil ab dem UICC Stadium II. Falls die TYMS tatsächlich eine Aussage über die Rezidivwahrscheinlichkeit treffen könnte, so würden Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC Stadium II die keine der bekannten Risikofaktoren aufweisen zukünftig möglicherweise aggressiver behandelt werden und je nach Expression der Thymidilat-Synthase eine Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie bekommen. Dies könnte sowohl die Indikation zur Chemotherapie, gegeben falls aber auch die Auswahl der geeigneten, möglicherweise nicht 5-Fluorouracil basierten Regimes beinhalten.

Neben der generellen prognostischen Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom ist deren möglicher Einfluss auf das Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie von Interesse. Auch hierfür ergaben sich bislang keine konklusiven Ergebnisse.

In der bisherigen Literatur konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Expression der Thymidilat-Synthase mit einem verbesserten Ansprechen in-vitro und in-vivo einhergeht (Van Triest et al, Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines., 1999; Aschele et al, 2000; Salonga et al, 2000; Ichikawa et al, 2003). Andere Studien konnten jedoch Gegenteiliges beweisen, nämlich ein besseres Ansprechen auf 5-Fluorouracil bei erhöhter Expression der Thymidilat-Synthase (Edler et al, 2002; Johnston et al B. A., 2003; Niedzwiecki et al, 2017).

Möglicherweise ist aber nicht die Expression der Thymidilat-Synthase von alleiniger Bedeutung, da die 5-Fluorouracil Wirkung auch an anderen Stellen stattfinden kann, etwa als Antimetabolit oder in der Hemmung des Exosomenkomplexes. Neben der Expression der Thymidilat-Synthase wäre dann die absolute Höhe der TYMS von größerer Bedeutung, was ebenfalls intensiv diskutiert wurde. Enzyme, wie die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, die eine direkte Korrelation zur 5-Fluorouracil Konzentration aufweisen, könnten daher zukünftig von größerer Bedeutung sein, und wurden beziehungsweise werden derzeit in Studien untersucht (Deenen et al, 2016; Meulendijks et al, 2015).

Wenn wir die Prognose für Patienten mit Kolonkarzinom zukünftig verbessern wollen, ist eine weitere Therapiestratifizierung einer der vielversprechenden Ansätze. Die Selektion von Risikopatienten, die einer aggressiveren Therapie zugeführt werden müssen, ist hierbei speziell im Fokus. Um in Zukunft eine Entscheidung für oder gegen eine (neo)adjuvante Chemotherapie treffen zu können, werden neue prognostische und prädiktive Marker benötigt. Hierbei ist vor allem die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zu erwähnen, die in den letzten Jahren zunehmend als negativ prädiktiver Marker in Bezug auf eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU identifiziert wurde. In vielen Studien, darunter auch in jenen von Sargent et al. und Jover et al. konnte gezeigt werden, dass eine Mikrosatelliteninstabilität mit einer besseren Prognose einhergeht, aber mit einem schlechteren Ansprechen auf 5-FU, sodass in diesem Fall keine adjuvante

Chemotherapie empfohlen wird (Sargent et al, 2010; Jover et al, 2009). Falls im Gewebe jedoch Mikrosatellitenstabilität (MSS) gefunden wird, so ist dies mit einer schlechteren Prognose assoziiert, aber mit einem besseren Ansprechen auf die adjuvante 5-FU Chemotherapie. Inwiefern die MSI mit der Expression der Thymidilat-Synthase oder Dihydropyrimidin-Dehydrogenase korreliert, ist bislang nicht ausreichend untersucht, stellt aber eine sinnvolle Aufgabe für die Zukunft dar.

An dieser Stelle sei jedoch auch erwähnt, dass von derartigen neuen Erkenntnissen auch Patienten in anderen UICC Stadien profitieren würden, das heißt solche, bei denen die adjuvante (UICC III) oder additive (UICC IV) Chemotherapie bereits Standard ist. Könnte man für diese das Ansprechen auf die Chemotherapie vorhersagen, könnten auch eventuelle Nebenwirkungen minimiert werden, genauere Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs gemacht werden und möglicherweise die eingesetzten Regimes individuell angepasst werden (zum Beispiel Einsatz eines Biologicals).

6. Zusammenfassung

Das Kolonkarzinom gehört bei Frauen und Männern zu den drei häufigsten Tumorentitäten weltweit und besitzt daher eine große gesundheitsökonomische und volkswirtschaftliche Bedeutung. Noch immer versterben knapp 20 Prozent der betroffenen Patienten an dieser Diagnose, auch wenn sich in den letzten Jahren ein tendenziell positiver Trend aufzeigen lässt.

In dieser Arbeit wurde anhand von statistischer Datenerhebung der Verlauf von Patienten mit Kolonkarzinom untersucht und experimentell die prognostische, sowie prädiktive Wertigkeit der Thymidilat-Synthase erforscht.

Die genauen Fragestellungen der Arbeit lauteten hierbei:

1. Ist die Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom von prognostischer Bedeutung?
2. Besitzt die Thymidilat-Synthase eine prädiktive Wertigkeit bei einer adjuvanten 5-Fluorouracil basierten Chemotherapie beim Kolonkarzinom im UICC II und III?
3. Zeigen verschiedene Zelllinien eine unterschiedliche Expression der Thymidilat-Synthase und resultiert hieraus ein differentes Ansprechen auf die Therapie mit 5-Fluorouracil?
4. Zeigen Zelllinien von Kolonkarzinomen eine Veränderung der Thymidilat-Synthase Expression in Abhängigkeit von der Einwirkzeit von 5-Fluorouracil?

Diese Fragen konnten folgendermaßen beantwortet werden:

1. Die Expression der humanen Thymidilat-Synthase ist im Tumorgewebe heterogen, sodass sie einen potentiellen Biomarker in speziellen Subgruppen beim Kolonkarzinom für die Zukunft darstellen könnte. Die Ergebnisse der Arbeit und die in der Literatur gefundenen Resultate unterstützen diese Wertigkeit jedoch nicht.
2. Über die prädiktive Wertigkeit der Thymidilat-Synthase herrscht weiterhin kein Konsens, sodass hier weitere Faktoren und Mutationen wie aufgezeigt RAS-

Mutationen, Mikrosatelliteninstabilität, Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Expressionswerte miteinbezogen werden müssen, um das Ansprechen auf eine adjuvante 5-Fluorouracil basierte Chemotherapie beim Kolonkarzinom UICC Stadium III und II abzuleiten.

3. Innerhalb der Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Expression der Thymidilat-Synthase individuell sehr stark variiert und dies wiederum mit unterschiedlichen Reaktionen auf eine Therapie mit 5-FU einherging. Die in-vitro Ergebnisse sprechen daher für eine mögliche Bedeutung als prognostischer Marker, auch wenn dies bislang nicht durch klinische Ergebnisse gestützt wird.
4. In-vitro zeigte sich bei der Zelllinie DLD1 keine Veränderung der Expressionshöhe der Thymidilat-Synthase bei unterschiedlicher Therapiedauer mit 5-Fluorouracil.

Eine prognostische und prädiktive Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom kann derzeit allenfalls in Subgruppen, aber nicht mit zufriedenstellender Evidenz abgeleitet werden.

Materialien

Chemikalien	Referenz	Firma, Stadt
2- Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich, Steinheim
3- Morpholinopropansulfonsäure C₇H₁₅NO₄S (MOPS)	69947	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Fluoruracil	NA	Pharmakologie Klinikum rechts der Isar
Agarose (gereinigt)	50004	SeaKem, FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
Diethydicarbonat C₅H₁₀O₅ (DEPC)	D5758	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP Set (10mM)	R0182	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
Ethanol 70%, 96%, 100%	NA	Pharmakologie Klinikum rechts der Isar
Eukitt	NA	Kindler, Freiburg
FBS Superior (FCS)	S0616	Biochrom, Berlin
Formalin (36.5-38%)	F-8775	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämalaun nach Mayer (Romeis Nr 648, statt Hämatoxylin)	NA	Phramakologie Klinikum rechts der Isar
Kernechtrot Lösung (statt Eosin)	N302	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	K 02833	Biochrom, Berlin
Medium DMEM (1X)	41965	Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA
Medium McCoys 5A (1X) + GlutaMAX-I	36600	Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA
Oligo(dT) 18 Primer	S0132	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
Paraformaldehyde	P6148	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS-Dulbecco (1x)	L 1825	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	A 2213	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	P4265	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol 25:24:1	P3803	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease Inhibitor Set (PIC)	11 206 893 001	Roche, Mannheim
Random Hexamer Primer	S0142	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	EP0452	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
RiboLock RNase Inhibitor	E00382	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
RT-Buffer (M-MuIV RT, 5x)	EP0452	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
T4 DNA Ligase	EL0011	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
TRI Reagenz	T9424	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (1x)	L11-660	PAA Laboratories Gesellschaft, Pasching, Österreich
Wasserstoffperoxid H₂O₂	NA	Pharmakologie Klinikum rechts der Isar
Xylol (Xylene) C₈H₁₀	PZN 7475522	Heidinger, Stuttgart

Einmalgebrauch	Referenz	Firma, Stadt
6-Well Zellkulturplatten	353002	Falcon (Becton Dickinson), Le Pont De Claix, Frankreich
96- Well Zellkulturplatten	353219	Falcon (Becton Dickinson), Le Pont De Claix, Frankreich
96-Well PCR Mikroplatte, Lightcycler-Type, weiss (für LightCycler 480 II)	11402-9909	Starlab, Hamburg
BD Falcon 15ml Polystyrene kegelförmige Tube	352095	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Cryo-Vial FS	LW3332	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Edelstahlkugeln, 5mm	69989	Quiagen, Hilden
Feather Einmalskalpell No 10	02.001.30.010	Feather, Osaka, Japan
Gel Blotting Paper	10 426 994	Whatman, Dassel
Kegelförmige Falcon Tuben 15 ml	352097	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Kegelförmige Falcon Tuben 50 ml	358206	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Micro Amp Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Mikroskop Deckgläser	0101000	Marienfild superior, Marienfild
Pasteurpipetten (Glas)	7477 15	Brand, Wertheim
Pipette 10ml	86. 1254.001	Sarstadt, Nümbrecht
Pipette 25ml	86. 1255.001	Sarstadt, Nümbrecht
Pipette 2ml	86. 1252.001	Sarstadt, Nümbrecht
Pipette 5ml	86. 1253.001	Sarstadt, Nümbrecht

Pipettenspitzen 0,1 -10 µl	A300SX	Kisker Biotech, Steinfurt
Pipettenspitzen 2-20 µl	A20S	Kisker Biotech, Steinfurt
Pipettenspitzen 2-200 µl	A200S	Kisker Biotech, Steinfurt
Pipettenspitzen 50- 1000 µl	A10000S	Kisker Biotech, Steinfurt
Research Plus Pipette 0.1 - 2,5 µl	3120 000.011	Eppendorf, Hamburg
Research Plus Pipette 0.5 - 10 µl	3120 000.020	Eppendorf, Hamburg
Research Plus Pipette 10 - 100 µl	3120 000.046	Eppendorf, Hamburg
Research Plus Pipette 100 - 1000 µl	3120 000.062	Eppendorf, Hamburg
Research Plus Pipette 2 - 20 µl	3120 000.097	Eppendorf, Hamburg
Research Plus Pipette 20 - 200 µl	3120 000.038	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 0,5 ml	0030 121.023	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 1,5 ml	0030 120.086	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 2.0 ml	0030 120.094	Eppendorf, Hamburg
Superfrost Plus Mikroskop Deckgläser	J1800AMNZ	Menzel, Braunschweig
Tissue-Tek O.C.T Compound	4583	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Zellkultur Petrischale 10 cm	353003	Falcon (Becton Dickinson), Le Pont De Claix, Frankreich
Zellkultur Petrischale 15 cm	353025	Falcon (Becton Dickinson), Le Pont De Claix, Frankreich

Kits	Referenz	Firma, Stadt
DNeasy Blood & Tissue Kit	69504	Quiagen, Hilden
QIAshredder	79654	Quiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	79254	Quiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	74106	Quiagen, Hilden
TaqMan Gene Expression Master Mix (for UPL)	4369016	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Technische Geräte	Referenz	Firma, Stadt
Autoklav Systec	D-65	Systec, Wetzlar
Axio Observer Z1 Mikroskop	Verschiedene Komponenten	Zeiss, Jena

Benchtop Zentrifuge PerfectSpin Mini	C1301B-230V	Peqlab, Erlangen
Biofuge 28RS (39 000g)	75003650	Heraeus Kendro, Osterode
Zentrifuge (für Eppendorf Gefäße)	5415R	Eppendorf, Hamburg
Kryostat	CM2050 S	Leica, Wetzlar
Gelkammern	Verschieden	Verschieden
Laborglasflaschen, Kochgläser, allgemeines Laborglas	Verschieden	Schott Duran, Wertheim/Main
Heizblock	MBT250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziega, Isernhagen
Inkubator Heraeus	BBD6220	Heraeus Kendro, Osterode
Sicherheitswerkbank - Hera safe	KS18	Heraeus Kendro, Osterode
LightCycler 480 II	05 015 278 001	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Verschieden	Verschieden
Molecular Imager Gel Doc XR System	170-8170	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Zentrifuge - Multifuge 3S-R (für Falkons und Platten)	75004371	Heraeus Kendro, Osterode
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	ND-1000	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
Neubauer Zählkammer	0640130	Marienfeld superior, Marienfeld
PCR System 9700 (für cDNA)	N805-0200	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Netzteil (Leistungstransformator für Agarose Gelektrophorese)	P25T	Biometra, Göttingen
Purelab (für ddH₂O)	Ultra GE MK2	Elga, Marlow, Buckinghamshire, UK
TissueLyser II	85300	Quiagen, Hilden
Vortex-Genie 2	G-560E	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Thermocycler Biometra TRIO T3	846-x-070-720	Biometra, Göttingen

Software	Referenz	Firma, Stadt
7300 System Software	Version 1.4.0.25	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
AxioVision	Version 4.8.2 SP1	Zeiss, Göttingen
Excel	Version 2013	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
GraphPad Prim	Version 5.00	Graph Pad Software, La

		Jolla, CA, USA
IBM SPSS Statistics	Version 22	SPSS Inc., IBM Corporation, Somers, NY, USA
ImageJ	Version 1.46	Research Service Branch, http://rsb.info.nih.gov
LightCycler® 480 Software (für UPL)	Version 1.5.0.39	Roche, Mannheim
Nanodrop	Version 2.5.4	Thermo Scientific, Rockland, IL, USA
Paint	Version 2013	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA

Zellen	Referenz	Firma, Stadt
DLD1	CCL-221 (ATCC)	Rockville, Maryland, USA
HCT116	CCL-247 (ATCC)	Rockville, MD, USA
HT29	HTB-38 (ATCC)	Rockville, MD, USA
SW480	CCL-228 (ATCC)	Rockville, MD, USA
SW 620	CCL-227 (ATCC)	Department für Pathologie, LMU, Prof. Dr. rer. nat. A. Jung
CaCo2	HTB-37 (ATCC)	Colorectal Adenocarcinoma, from Male, 72 years

Primer, Sequenzen	Referenz	Firma, Stadt
Primer Thymidilat-Synthase fwd	atcatgtgcgcttgaatc	Metabion International, Martinsried
Primer Thymidilat-Synthase rev	tcaccacatagaactgg aga	Metabion International, Martinsried
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase fwd	gctttccttggtcaggcagtataat	Metabion International, Martinsried
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase rev	aagggcatatcctacaacaaacttg	Metabion International, Martinsried
hHPRT UPL fwd	gaccagtcaacagggggacat	Metabion International, Martinsried
hHPRT UPL rev	gtgtcaattatatcttcacaarcaag	Metabion International, Martinsried
TS UPL fwd	atcatgtgcgcttgaatc	Metabion International, Martinsried
TS UPL rev	tcaccacatagaactggcaga	Metabion International, Martinsried
Negativ Kontrolle siRNA	Uucuccgaacgugucacguu	Quiagen, Hilden

Tabellenverzeichnis

1. Tabelle: Übersicht der Vorsorgeleistungen durch die gesetzlichen Krankenkassen.....	Seite 7-8
2. Tabelle : T-Stadium des kolorektalen Karzinoms (Wittekind Christian, 2017).....	Seite 11
3. Tabelle: N-Stadium des kolorektalen Karzinoms (Wittekind Christian, 2017).....	Seite 11
4. Tabelle: M-Stadium des kolorektalen Karzinoms. - NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer (Wittekind Christian, 2017).....	Seite 12
5. Tabelle: Übersicht über die UICC – und Dukes Stadien (Wittekind Christian, 2017).....	Seite 12
6. Tabelle: Übersicht der stadiengerechten chirurgischen Therapie.....	Seite 13
7. Tabelle: Die Übersicht der wichtigsten Kandidatengene, die sich derzeit in der Evaluierung befinden. (Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert: Bcl-2: B-cell lymphoma protein, CEA: Carcinoembryonic antigen, PCNA : Proliferating cell nuclear antigen sLe ^x : Sialyl Lewis ^x antigen, TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1) (Arlt Franziska, 2008).....	Seite 19
8. Tabelle: Amsterdam I-Kriterien, Bethesda-Richtlinien, Amsterdam II-Kriterien und Revidierte Bethesda-Richtlinien (Steinke et al, 2013).....	Seite 22-23
9. Tabelle: Übersicht Zelllinien - Medium.....	Seite 26
10. Tabelle: Schritte der RNA-Isolierung.....	Seite 27
11. Tabelle: Light Cycler® 480 II - UPL – Mastermix.....	Seite 33
12. Tabelle: Programm LightCycler® 480.....	Seite 34
13. Tabelle: Geschlechterverteilung im statistischen Kollektiv.....	Seite 40
14. Tabelle: Übersicht über das Alter der Patienten.....	Seite 40
15. Tabelle: Übersicht Operationsjahr mit Anzahl der Patienten.....	Seite 41-42
16. Tabelle: Tumorlokalisierung.....	Seite 42
17. Tabelle: Verteilung der Tumorstadien.....	Seite 42
18. Tabelle: Tumortyp.....	Seite 43
19. Tabelle: Tumorstatus.....	Seite 43
20. Tabelle: Zweittumor metachron und synchron.....	Seite 44
21. Tabelle: Begleiterkrankungen.....	Seite 44
22. Tabelle: ASA-Score.....	Seite 44
23. Tabelle: OP-Indikation.....	Seite 44
24. Tabelle: Lymphadenektomie mit Anzahl der entfernten Lymphknoten.....	Seite 45
25. Tabelle: Verteilung der Tumorhistologie.....	Seite 45-46
26. Tabelle: Verteilung histologisches Grading.....	Seite 46
27. Tabelle: R-Klassifikation.....	Seite 46
28. Tabelle: Metastasen.....	Seite 46-47
29. Tabelle: Neoadjuvante Therapie.....	Seite 47
30. Tabelle: Adjuvante Therapie.....	Seite 47
31. Tabelle: Adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil.....	Seite 48
32. Tabelle: Adjuvante Chemotherapie ohne 5-Fluorouracil.....	Seite 48
33. Tabelle: Rezidiv.....	Seite 49
34. Tabelle: Recurrence-free Survival.....	Seite 49
35. Tabelle: Lokalisation des Rezidivs.....	Seite 50
36. Tabelle: Nachsorge der Patienten.....	Seite 50-51
37. Tabelle: Status der Patienten.....	Seite 51
38. Tabelle: Krankheitsfreies Überleben in Monaten – Disease-free Survival....	Seite 52

39. Tabelle: Alter der molekulargenetisch aufgearbeiteten Patienten.....	Seite 53
40. Tabelle: OP Jahr - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 53
41. Tabelle: Tumorlokalisation - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 53
42. Tabelle: UICC Stadium - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 54
43. Tabelle: Histopathologisches Grading - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 54
44. Tabelle: Anzahl der resezierten LK - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 54
45. Tabelle: Rezidiv bei R0 - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 54-55
46. Tabelle: Status der Patienten - Experimentelles Kollektiv.....	Seite 55
47. Tabelle: Korrelation zwischen Überleben und adjuvanter Chemotherapie – Experimentelles Kollektiv.....	Seite 55-56
48. Tabelle: Übersicht über adjuvantes Vorgehen beim Kolonkarzinom entsprechend den aktuellen Empfehlungen der Leitlinien (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).....	Seite 64
49. Tabelle: Die drei Leitsubstanzen des FOLFOX4-Schemas sind 5-Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin. FOLFOX4 bedeutet, dass die 5-Fluorouracil Pumpe 22 Stunden mit 600 mg/m ² läuft und dann gewechselt werden muss mit einem erneuten 5-FU Bolus. Bei FOLFOX6 wären es 46 Stunden mit 2400 mg/m ² mit Steigerung ab dem dritten Zyklus bei fehlender Toxizität auf 3000 mg/m ² und ohne Pumpenwechsel mit erneuten 5-FU Bolus. Die Dosis von 100 mg/m ² Oxaliplatin ist um 15 mg/m ² mehr als bei FOLFOX4. Insgesamt umfassen beide Schemata 12 Zyklen in einem 14-tägigen Rhythmus.....	Seite 67
50. Tabelle: Das FOLFIRI-Schema enthält 5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und ist ebenfalls wie das FOLFOX Schema für 12 Zyklen im 14-tägigen Rhythmus vorgesehen. Dieses Schema wird vor allem im palliativen Setting und als Zweitlinientherapie eingesetzt. Der Vorteil gegenüber von FOLFOX besteht in der fehlenden kumulativen Toxizität von Oxaliplatin, welche sich vor allem in einer Polyneuropathie zeigt. Allerdings zeigen sich bei Irinotecan vor allem gastrointestinale sowie hämatologische Nebenwirkungen und eine Alopezie.....	Seite 68
51. Tabelle: Übersicht der Studien zur prognostischen und prädiktiven Wertigkeit der Thymidilat-Synthase beim Kolonkarzinom - Abkürzungen: M. = Monat, ↑= Steigt bzw. hochreguliert ↓ = Sinkt bzw. runterreguliert → = kein Einfluss, keine Korrelation.....	Seite 81-82

Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung: Übersicht der von den S3-Leitlinien empfohlenen Staging Untersuchungen bei Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms. Aufgrund der Tumorausbreitung ergeben sich hierbei Unterschiede zwischen Kolonkarzinom und Rektumkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).....Seite 10
2. Abbildung: Hemikolektomie rechts- vom terminalen Ileum bis proximal der A. colica dextra, ggf. unter Mitnahme der A. colica media bei distaler Lokalisation des Tumors (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).....Seite 14
3. Abbildung: Erweiterte Hemikolektomie rechts- vom terminalen Ileum bis distal der linken Kolonflexur (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).....Seite 14
4. Abbildung: Erweiterte Hemikolektomie links- von der proximalen rechten Kolonflexur bis zum Übergang des Colon descendens ins Sigma (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.)..... Seite 15
5. Abbildung: Hemikolektomie links- von der linken Kolonflexur bis Höhe des Promontoriums reichend (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.).....Seite 15
6. Abbildung: Sigmaresektion – vom proximalen Colon descendens bis zur Höhe des Promontoriums (Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK, o.J.)..... Seite 16
7. Abbildung: Es wurden Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC Stadium III hinsichtlich ihres klinischen Outcome in Abhängigkeit von den resezierten Lymphknoten verglichen. Im Median wurden dabei 11 Lymphknoten entfernt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Vorteil im Falle einer radikalen Lymphadenektomie. Die Abbildung stammt aus der Studie von Le Voyer et al. (Le Voyer et al, 2003).....Seite 16
8. Ab dem UICC II besteht die Indikation zur regelmäßigen Nachsorge. Falls sich bei einem Rezidiv keine therapeutische Konsequenz ergibt, so kann auf eine Nachsorge laut Leitlinien verzichtet werden. Das Nachsorgeprogramm ist für insgesamt 5 Jahre ausgelegt und umfasst die Anamnese, die körperliche Untersuchung, den CEA-Wert, die Koloskopie und die Abdomensonographie. Die Sigmoidoskopie, die Spiralcomputertomographie und das Röntgen-Thorax sind kein Teil der Nachsorge des Kolonkarzinoms, sondern des Rektumkarzinoms. Diese Nachsorgeempfehlung stammt aus den S3-Leitlinien des kolorektalen Karzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2017).....Seite 18
9. Abbildung: Schematische Darstellung der Schritte zur RNA-Isolierung ausgehend von Zellen oder Gewebe. Es wird das zuvor gewonnene Zellpellet mittels 350 µl RLT Puffer und Mercaptoethanol resuspendiert. Dieser Ansatz wird auf den Qiashredder gegeben und zentrifugiert. Es folgt die Elimination der genomischen DNA mittels gDNA Eliminator Säule mit anschließender Zentrifugierung. Nach Zugabe von 70%igen Ethanol wird der Ansatz auf die RNeasy Säule gegeben, gefolgt mehreren Zentrifugierungen wie in Tabelle 10 ersichtlich ist, und der Zugabe von Rnase freien Wasser. Die gewonnene RNA befindet sich am Ende im 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, die RNeasy Säule muss verworfen werden. Die gewonnene RNA muss sofort auf Eis gekühlt

- werden. RNeasy Plus Procedure © Quiagen: RNA PlusMini Kit.....Seite 28
10. Abbildung: Nano-Drop Beispiel RNA Photospektroskopie. Die Konzentrationsangabe der gemessenen RNA erfolgt in ng/ml. Der photospektrometrische Quotient 260nm/280nm gibt die Reinheit der jeweiligen Messung an. Diese Werte sind darauf zurückzuführen, dass zwischen 260 und 280 nm das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren RNA und DANN liegt. Ein Wert um 2 bedeutet eine hohe Reinheit der zuvor isolierten RNA. Eine Verunreinigung durch beispielsweise Phenole oder Proteine würden zu einer Verringerung des Quotienten führen, da sie eine starke UV-Absorption bei 280 nm aufweisen.....Seite 29
11. Abbildung: RNA-Gelelektrophorese. Im Falle einer reinen und nicht abgebauten RNA wandern die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, da diese negativ geladen sind, bei angelegter elektrischer Spannung in Richtung Pluspol. Es entstehen dabei zwei gut sichtbare 28s- und 18s-Banden. Der zugefügte, potenziell mutagene Farbstoff Ethidiumbromid, macht diese Banden deutlich sichtbar. Hier zeigt sich eine deutliche Degradation der 28s- und 18s- rRNA Banden im Patientengewebe der eigenen Arbeit. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die RNA bereits abgebaut ist, aufgrund einer zu langen Einfrierzeit im Stickstoff oder an unsachgemäßer Handhabung postoperativ. Die parallelen Kontrollbanden der Zelllinie DLD1 zeigen keinen relevanten Abbau der RNA. Somit kann ein rein technischer Fehler beim Durchführen der RNA-Gelelektrophorese weitgehend ausgeschlossen werden. Dennoch lässt sich retrospektiv die genaue Ursache des RNA-Abbaus nicht mit absoluter Sicherheit eruieren. Bild aufgenommen am 09. März 2015.....Seite 30
12. Abbildung: Amplifikationskurven der Zelllinien SW480, SW620, CaCo2, DLD1. Die Proben werden hierfür zuvor kurz in der 96-Well Platte zentrifugiert und dann im LightCycler® 480 II mittels Linse bewegt. Das von dieser Linse abgegebene Licht mit 450 Nanometer wird von den Proben mehr oder weniger emittiert. Der Light Cycler® 480 II ist in der Lage die Fluoreszenz in den Proben kontinuierlich über alle Temperaturzyklen zu erfassen Nach Ablauf aller Zyklen entsteht eine Grafik mit den verschiedenen Amplifikationskurven der Zelllinien. Grafik aufgenommen am 10. März 2015.....Seite 33
13. Abbildung: Verdünnungsvorgang beim 5-Fluoruracil Zell-Stress-Test. Es wird schematisch dargestellt wie die gewünschte 1:100 Verdünnung des 5-FU hergestellt wird. Dazu werden 5,2 µl 5-Fluoruracil mit 2 ml Medium in ein Falcon mit 15 ml Volumen gegeben. Von dieser Suspension werden 200 µl erneut mit 2 ml Medium in einem Falcon mit 15 ml Volumen gegeben. Diese Verdünnung wird anschließend zu je unterschiedlichen Einwirkzeiten (24 Stunden, 18 Stunden, 6 Stunden, 1 Stunde, 30 Minuten und 0 Minuten) auf die 6-Well Platte mit den zuvor gezüchteten Zellen aufgetragen. Nach Ablauf der Einwirkzeiten erfolgt die RNA-Isolierung aus dem übriggebliebenen Zellpellet nach Protokoll mit anschließender Konzentrationsbestimmung im NANO Drop, bevor sie in cDNA umgeschrieben wird und die Thymidilat-Synthase Aktivität mittels q-PCR bestimmt wird. © Paint Microsoft.....Seite 36
14. Abbildung: Dieses Histogramm zeigt die Altersverteilung des Patientenkollektivs in der Datenbank-Nachsorge mit N =730. Wie bereits in Tabelle 14 ersichtlich, zeigt sich ein gehäuftes Auftreten des kolorektalen Karzinoms in diesem Patientenkollektiv zwischen 50. und 80. Lebensjahr. Jüngere sowie ältere Patienten sind selten betroffen..... Seite 41

15. Abbildung: Diese Darstellung bezieht sich auf jene 202 Patienten, welche im Verlauf an einem Rezidiv erkrankt sind. Alle anderen Patienten, sprich 528, werden in dieser Grafik nicht mitangeführt. Es wird deutlich, dass Rezidive vor allem innerhalb der ersten 24 Monate auftreten. Spätere Zeitpunkte sind, wie bereits in Tabelle 33 dargestellt deutlich seltener.....Seite 50
16. Abbildung: In der Kaplan Meier Kurve wurden alle 730 Patienten eingeschlossen unabhängig davon, ob sie Tumorabhängig oder Tumorunabhängig verstorben sind. Dabei zeigt sich, dass die deutliche Mehrheit des Patientenkollektivs überlebt hat oder Tumorunabhängig verstorben ist.....Seite 52
17. Abbildung: Das Bild des Lichtmikroskops zeigt als Beispiel ein Gewebepräparat eines operierten Kolonkarzinoms aus dem Jahr 2002 in H.E. Färbung auf einem Objektträger. Die Qualität des Gewebes ist somit von der langen Einfrierdauer nicht wesentlich beeinträchtigt. April 2015.....Seite 57
18. Abbildung: Die Grafik zeigt die Thymidilat-Synthase Expressionswerte jener 11 Patienten im UICC Stadium II, welche kein Rezidiv des Kolonkarzinoms im Verlauf erlitten hatten. Die Expressionswerte wurden mittels rt-PCR bestimmt. Die angegebenen Nummern entsprechen den Patientennummern im Labor. Die Target/Reference Ratio bezieht sich auf die Mittelwerte der TS und HPRT. April 2015.....Seite 58
19. Abbildung: Diese Grafik zeigt die Expressionswerte der Thymidilat-Synthase, jener 11 Patienten im UICC Stadium II mit Rezidiv im Verlauf. Die Thymidilat-Synthase Expressionswerte wurden auch hier mittels rt-PCR bestimmt. Die angegebenen Nummern entsprechen den Patientennummern im Labor. Die Target/Reference Ratio bezieht sich auf die Mittelwerte der TS und HPRT April 2015.....Seite 58
20. Abbildung: Im Mann-Whitney-Test wird das Ergebnis der zuvor bestimmten Expressionswerte der Thymidilat-Synthase im UICC Stadium II bei Patienten mit und ohne Rezidiv dargestellt. Insgesamt waren 22 Patienten umfasst das gesamte Kollektiv in diesem Experiment. Die Expression der Thymidilat-Synthase in der Gruppe im UICC Stadium II mit Rezidiv zeigte sich signifikant reduziert im Vergleich zur Gruppe ohne Rezidiv mit einem p-Wert von 0,0215. N=22, p=0,0215; April 2015.....Seite 59
21. Abbildung: In dieser Darstellung zeigt sich die relative Thymidilat-Synthase Expression der Zelllinie DLD1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einwirkzeiten (0, 0.5, 1, 6, 18 und 24 Stunden) des 5-Fluorouracils. Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt, sodass die hier gezeigten Ergebnisse den Mittelwert aller durchgeführten Versuche darstellen. Eine statistisch signifikante Veränderung der Thymidilat-Synthase Expression in Abhängigkeit der Wirkdauer des 5-Fluorouracils konnte hierbei nicht festgestellt werden (p=0,8545). April 2015..... Seite 60
22. Abbildung: Die graphische Darstellung präsentiert die Mittelwerte der Zelllinien SW480, Sw620, CaCo2, DLD1, HT29 und HCT116 der Thymidilat-Synthase Expression im Verhältnis zur Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase mit Angabe der jeweiligen Standardabweichungen. Es konnte somit gezeigt wird, dass sich die Thymidilat-Synthase Expressionswerte in den hier verwendeten Zelllinien deutlich voneinander unterscheiden. April 2015.....Seite 60
23. Abbildung: Das im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Janssen aufgenommene Foto zeigt insgesamt acht Petrischalen nach Behandlung mit 0µM und 10 µM (oben von rechts nach links), 100 µM und 1000 µM (unten von rechts nach links) 5-Fluorouracil und Färbung mit Crystal Violet. Jede Petrischale wurde mit 10⁵

- DLD1 Zellen beimpft. Es wurden je zwei Petrischalen mit derselben Konzentration an 5-FU als Kontrolle behandelt. April 2015.....Seite 61
24. Abbildung: Die Zellklone wurden mittels ImageJ Software quantifiziert und in % Angabe graphisch in Abhängigkeit von der Konzentration an 5-Fluoruracil dargestellt. Das Ergebnis zeigt eine Dosis-spezifische Abnahme der Zellzahl, mit vollständiger Suppression des Zellwachstums bei einer 5-FU Konzentration von 1000 μM . n =1, April 2015.....Seite 62
25. Abbildung: Die zweite Darstellung der Ergebnisse des Klon Assay mit der Zelllinie DLD1 zeigt die Auswertung mittels manueller Zählung der Zellkolonien. Die % Angabe erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration des 5-Fluoruracils. Auch hier zeigt sich eine vollständige Suppression des Zellwachstums der Zelllinie DLD1 bei 1000 μM 5-Fluoruracil. Somit kann hier von einer Dosis-spezifischen Abnahme des Zellwachstums in Abhängig April 2015.....Seite 62
26. Abbildung: Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), beschreibt jene Konzentration an 5-FU, bei welcher eine halbmaximale Wachstumsinhibition der Zelllinie (in diesem Fall DLD1) beobachtet wird. Das Programm GraphPad Prism 5.00 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet anhand des oberen und unteren Plateaus sowie dem Gefälle die mittlere inhibitorische Konzentration. Diese beträgt bei dem durchgeführten Experiment mit der Zelllinien DLD 1 259,2 μM 5-FU. Bei dieser Konzentration an 5-FU wird 50% des Zellwachstums bei der Zelllinie DLD1 in vitro gehemmt. April 2015.....Seite 63
27. Abbildung: Der Stoffwechsel der Thymidilat-Synthase nach Kevin Ahern. Die Thymidilat-Synthase katalysiert die Methylierung von Desoxyuridylat (dUMP) zu Desoxythymidylat (dTMP). Für die Regeneration der Methylgruppe wird NAPDH benötigt. Dieser Synthese ist essentiell für die Zellteilung und Vermehrung von von allen Zellen, die dTMP als Baustein für die DNA benötigen. Dieser Vorgang spielt somit auch in der Vermehrung von Tumorzellen eine wichtige Rolle, sodass dies als Angriffspunkt für Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil dient (Ahern Kevin, 2013).....Seite 86
28. Abbildung: 5-Fluorouracil greift als Chemotherapeutikum an verschiedenen Stellen des RNA- und DNA- Stoffwechsels in die Zellteilung ein. Durch Hemmung der Thymidilat-Synthase wird die DNA-Synthese gehemmt und durch Entstehung von 5-FdUTP die RNA-Synthese blockiert. Zusätzlich interagiert das Chemotherapeutikum als Antimetabolit durch die Ähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Thymin, Cytosin und Uracil und führt damit zu Kettenabbrüchen sowohl in RNA als auch in DNA. Außerdem wird der Exosomenkomplex, welcher für den Abbau der messenger-RNA (mRNA) im Zytosol sowie für die Prozessierung der kleinen RNA im Zellkern und für der Prozessierung der ribosomalen RNA im Nukleolus essentiell ist, durch 5-Fluorouracil gehemmt. Zusätzlich ist der Abbau von 5-FU über die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase dargestellt (Schwarzenbach Heidi, 2010).....Seite 87

Literaturverzeichnis

Ahern, Kevin: *Kevin Ahern's Biochemistry Course (BB 350) at Oregon State University - Lecture #35 - Nitrogen Metabolism*. Abbildung: *Deoxyribonucleotide Synthese – TS Reaction* unter <http://oregonstate.edu/instruct/bb350/ahernmaterials/a23/23p81.jpg>. Juni 2013

Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, Smyrk TC, Sinicrope FA, Chan E, Gill S, Kahlenberg MS, Shields AF, Quesenberry JT, Webb TA, Farr GH Jr, Pockaj BA, Grothey A, Goldberg RM., *Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial*. JAMA. 2012 Apr 4;307(13):1383-93.

Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, Klein P, Behan K, O'Connell MJ, Levitt R, Kugler JW, Tria Tirona M, Goldberg RM., *Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer*. Journal of Clinical Oncology 20, no.7 (April 01. 2002) 1735-1743.

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*. Journal of Clinical Oncology 21, no. 2 (January 15, 2003) 241-250.

Arlt Franziska., *Das neu identifizierte Gen MACC1 ist ein Regulator des HGF/Met-Signalweges und ist prognostisch für die Metastasierung des Kolonkarzinoms*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Deutschland; Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Promotionsfach Biologie. Seite 19. 16. Oktober 2008

Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A., *Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy*. Journal of Clinical Oncology 17, no. 6 (June 01, 1999) 1760-1760

Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A., *Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil*. Clin Cancer Res December 1 2000 (6) (12) 4797-4802;

Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg K, Danenberg PC, Danenberg PV, Klimstra D, Jhanwar S, Cordon-Cardo C, Fong Y, Kemeny N, Bertino JR., *Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase*. Cancer Res. 2000 May 1;60(9):2365-7.

Belvedere O, Puglisi F, Di Loreto C, Cataldi P, Guglielmi A, Aschele C, Sobrero A., *Lack of correlation between immunohistochemical expression of E2F-1, thymidylate synthase expression and clinical response to 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer*. Ann Oncol. 2004 Jan;15(1):55-8.

Bendardaf R, Lamlum H, Ristamäki R, Korkeila E, Syrjänen K, Pyrhönen S., *Thymidylate synthase and microsatellite instability in colorectal cancer: implications for disease free survival, treatment response and survival with metastases*. Acta Oncol. 2008;47(6):1046-53.

Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, Guimbaud R, Buecher B, Bignon YJ, Caron O, Colas C, Noguès C, Lejeune-Dumoulin S, Olivier-Faivre L, Polycarpe-Osaer F, Nguyen TD, Desseigne F, Saurin JC, Berthet P, Leroux D, Duffour J, Manouvrier S, Frébourg T, Sobol H, Lasset C, Bonaïti-Pellié C; French Cancer Genetics Network., *Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome*. JAMA. 2011 Jun 8;305(22):2304-10.

Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW, Moon HY., *L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer*. Annals of Surgical Oncology. Ann Surg Oncol. 2007 May;14(5):1703-11.

Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, Longley DB, Johnston PG., *Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan*. Clin Cancer Res. 2004 Mar 15;10(6):2158-67.

Brenner, Hermann; Altenhofen, Lutz; Hoffmeister, Michael., *Eight Years of Colonoscopic Bowel Cancer Screening in Germany: Initial Findings and Projections*. Dtsch Arztebl Int 2010; 107(43): 753-9; DOI: 10.3238/arztebl.2010.0753

Broll R, Busch P, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Farke S, Bruch HP, Windhövel U., *Influence of thymidylate synthase and p53 protein expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis. 2005 Mar;20(2):94-102

Caplin S, Cerottini JP, Bosman FT, Constanda MT, Givel JC., *For patients with Dukes' B (TNM Stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is related to poor prognosis*. Cancer. 1998 Aug 15;83(4):666-72.

Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA., *Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review*. J Natl Cancer Inst. 2007 Mar 21;99(6):433-41.

Chen Y, Yi C, Liu L, Li B, Wang Y, Wang X., *Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of colorectal cancer survival data*. Int J Biol Markers. 2012 Oct 8;27(3):e203-11.

Chirurgische Klinik Campus Charite Mitte/Campus Virchow Klinikum CCM/CVK., *Therapie des Kolonkarzinoms*, im Internet http://chirurgie-virchow.charite.de/klinik/dickdarmchirurgie_und_darmkrebs/dickdarm_chirurgie_standard_operating_procedure_sop/sop_kolonkarzinom/ Stand: ohne Jahr Abgerufen: 8. August 2015

Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM, Cassano A, La Torre G, Barone C., *Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil*. Oncology. 2006;70(5):366-77.

Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Cartenì G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C; Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale., *Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale.* J Clin Oncol. 2005 Aug 1;23(22):4866-75.

De Angelis PM, Fjell B, Kravik KL, Haug T, Tunheim SH, Reichelt W, Beigi M, Clausen OP, Galteland E, Stokke T., *Molecular characterizations of derivatives of HCT116 colorectal cancer cells that are resistant to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil.* Int J Oncol. 2004 May;24(5):1279-88.

De Angelis PM, Kravik KL, Tunheim SH, Haug T, Reichelt WH., *Comparison of gene expression in HCT116 treatment derivatives generated by two different 5-fluorouracil exposure protocols.* Mol Cancer. 2004 Apr 26;3:11.

De Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, Cunningham D, Cartwright TH, Hecht JR, Rivera F, Im SA, Bodoky G, Salazar R, Maindrault-Goebel F, Shacham-Shmueli E, Bajetta E, Makrutzki M, Shang A, André T, Hoff PM., *Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial.* Lancet Oncol. 2012 Dec;13(12):1225-33.

De Gramont A, Boni C, Navarro M, Tabernero, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Lorenzato C, and André T., *Oxaliplatin/5FU/LV in adjuvant colon cancer: Updated efficacy results of the MOSAIC trial, including survival, with a median follow-up of six years.* J Clin Oncol. 25, no.18 suppl (June 20, 2007) 4007-4007

Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Boot H, Smits PH, Rosing H, Mandigers CM, Soesan M, Beijnen JH, Schellens JH., *Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis.* J Clin Oncol. 2016 Jan 20;34(3):227-34.

Derenzini M, Montanaro L, Treré D, Chillà A, Tazzari PL, Dall'Olio F, Ofner D., *Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines.* Mol Pathol. 2002 Oct;55(5):310-4.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Zertifizierungskommission Viszeralonkologische Zentren / Darmkrebszentren, Thomas Seufferlein, Sprecher Zertifizierungskommission, Stefan Post, Stellv. Sprecher Zertifizierungskommission, Simone Wesselmann, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. ,Christoph Kowalski, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Julia Ferencz, OnkoZert GmbH., *Jahresbericht der zertifizierten Darmkrebszentren Kennzahlenauswertung 2017. Auditjahr 2016/Kennzahlenjahr 2015 Version A1.*, Kennzahl Nr. 30 Lymphknotenuntersuchung (LL QI 2) Seite 41. Im Internet:https://www.krebsgesellschaft.de/jahresberichte.html?file=files/dkg/deutsche_krebsgesellschaft/content/pdf/Zertifizierung/Jahresberichte%20mit%20DOI%20und%20ISBN/dz_jahresbericht-2017-A1_170616.pdf. Stand: 16.06.2017

Dighe S, Purkayastha S, Swift I, Tekkis PP, Darzi A, A'Hern R, Brown G., *Diagnostic precision of CT in local staging of colon cancers: a meta-analysis*. Clin Radiol. 2010 Sep;65(9):708-19

Ding PR, An X, Zhang RX, Fang YJ, Li LR, Chen G, Wu XJ, Lu ZH, Lin JZ, Kong LH, Wan DS, Pan ZZ., *Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts risk of recurrence following curative resection for stage IIA colon cancer*. Int J Colorectal Dis. 2010 Dec;25(12):1427-33.

Altenhofen Lutz., *Projekt Wissenschaftliche Begleitung von Früherkennungs-Koloskopien in Deutschland Berichtszeitraum 2014. 12. Jahresbericht, 2. Version* im Auftrag des GKV-Spitzenverbands und der Kassenärztlichen Bundesvereinigung .Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland 2016, Zusammenfassung Seite 6 a. Teilnahme

Dukes Cuthbert Esquire. *The classification of cancer of the rectum*. Journal of Pathological Bacteriology 1932;35:323

Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H., *Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy*. J Clin Oncol. 2002 Apr 1;20(7):1721-8.

Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, Pählman L, Lindmark G, Blomgren H., *Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival* . Clin Cancer Res. 2000 Feb;6(2):488-92.

Fadelu T, Zhang S, Niedzwiecki D, Ye X, Saltz LB, Mayer RJ, Mowat RB, Whittom R, Hantel A, Benson AB, Atienza DM, Messino M, Kindler HL, Venook A, Ogino S, Ng K, Wu K, Willett W, Giovannucci E, Meyerhardt J, Bao Y, Fuchs CS., *Nut Consumption and Survival in Patients With Stage III Colon Cancer: Results From CALGB 89803 (Alliance)*. J Clin Oncol. 2018 Apr 10;36(11):1112-1120.

Fang F, Hoskins J, Butler JS., *5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs*. Mol Cell Biol. 2004 Dec;24(24):10766-76.

Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J., *5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems*. Gastroenterology. 2007 Dec;133(6):1858-68.

Foxtrot Collaborative Group., *Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer: the pilot phase of a randomised controlled trial*. Lancet Oncol. 2012 Nov;13(11):1152-60

Gemeinsamer Bundesausschuss. *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungs-Richtlinie / KFE-RL) - III. Früherkennungsuntersuchungen auf kolorektales Karzinom* - in der Fassung vom 18. Juni 2009 veröffentlicht im Bundesanzeiger 2009, Nr. 148a in Kraft getreten am 3. Oktober 2009 ,zuletzt geändert am 21. April 2016, veröffentlicht im Bundesanzeiger AT 08.07.2016 B2, in Kraft getreten am 1. Januar 2017 ;im Internet: <https://www.g->

ba.de/downloads/62-492-1292/KFE-RL_2016-04-21_iK-2017-01-01_AT-08-07-2016-B2.pdf Stand: 21.04.2016

Gies A, Cuk K, Schrotz-King P, Brenner H., *Direct Comparison of Diagnostic Performance of 9 Quantitative Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening*. Gastroenterology. 2018 Jan;154(1):93-104

Guercio BJ, Sato K, Niedzwiecki D, Ye X, Saltz LB, Mayer RJ, Mowat RB, Whittom R, Hantel A, Benson A, Atienza D, Messino M, Kindler H, Venook A, Hu FB, Ogino S, Wu K, Willett WC, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS., *Coffee Intake, Recurrence, and Mortality in Stage III Colon Cancer: Results From CALGB 89803 (Alliance)*. J Clin Oncol. 2015 Nov 1;33(31):3598-607.

He C, Liu Z, Ji J, Zhu H., *Prognostic value of survivin in patients with non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis*. Int J Clin Exp Med. 2015 Apr 15;8(4):5847-54.

Heidelberger C, Chaudhuri Nk, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer Rj, Plevin E, Scheiner J., *Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds*. Nature. 1957 Mar 30;179(4561):663-6.

Heinimann Karl., *Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektal-Karzinom ohne generalisierte Polypose)*. Schweizerische Ärztezeitung Nr. 36, 2000, S. 2009-2012

Hemminki A, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H., *Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy*. Gastroenterology. 2000 Oct;119(4):921-8.

Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S., *Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome*. Colorectal Dis. 2009 May;11(4):354-64; discussion 364-5.

Holme Ø, Løberg M, Kalager M, Bretthauer M, Hernán MA, Aas E, Eide TJ, Skovlund E, Schneede J, Tveit KM, Hoff G., *Effect of flexible sigmoidoscopy screening on colorectal cancer incidence and mortality: a randomized clinical trial*. JAMA. 2014 Aug 13;312(6):606-15.

Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, Gustavsson B, Leichman L, Frösing R, Ray M, Gibson NW, Spears PC, Danenberg PV., *Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction*. Cancer Res. 1992 Jan 1;52(1):108-16.

Huang LN, Wang DS, Chen YQ, Zhao CL, Gong BL, Jiang AB, Jia W, Hu FD., *Expression of survivin and patients survival in non-small cell lung cancer: a meta-analysis of the published studies*. Mol Biol Rep. 2013 Feb;40(2):917-24.

Iacopetta B, Grieco F, Joseph D, Elsaleh H., *A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil*. Br J Cancer. 2001 Sep 14;85(6):827-30.

Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, Sugihara K, Hirayama R. *Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer.* Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):786-91.

Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten., *Kolonkarzinom.* Der Onkologe April 1999, Volume 5, Issue 4, pp 348–358

Ishikawa M, Miyauchi T, Kashiwagi Y., *Clinical implications of thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activity levels in colorectal carcinoma following radical resection and administration of adjuvant 5-FU chemotherapy.* BMC Cancer. 2008 Jul 2;8:188

Jehle EC, Bokemeyer C, Brand E, Budach W, Buntrock M, Burkart C, Eisold H, Greschniok A, Grund KE, Günther E, Hartmann JT, Keller-Matschke K, Klump B, Nehls O, Ohmenhäuser A, Schäfer J, Steinebrunner P, Vetter S., *Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Analkarzinom.* In: *Therapieempfehlungen des Interdisziplinären Tumorzentrums Tübingen.* 2. überarbeitete Auflage. Stand: August 2003 I. Kolon- und Rektumkarzinom A. Einführung 1. Epidemiologie Seite 1.

Jensen NF, Smith DH, Nygård SB, Rømer MU, Nielsen KV, Brünner N., *Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer.* Scand J Gastroenterol. 2012 Mar;47(3):340-55.

Jeon HJ, Woo JH, Lee HY, Park KJ, Choi HJ., *Adjuvant Chemotherapy Using the FOLFOX Regimen in Colon Cancer.* Jo J Korean Soc Coloproctol. 2011 Jun; 27(3): 140–146.

Johnston PG, Benson AB 3rd, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ., *Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites.* J Clin Oncol. 2003 Mar 1;21(5):815-9.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L., *Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors.* Cancer Res. 1995 Apr 1;55(7):1407-12.

Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ., *Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue.* Cancer Res. 1991 Dec 15;51(24):6668-76.

Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Balaguer F, Sempere L, Xicola RM, Bujanda L, Reñé JM, Clofent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolás-Pérez D, Pons E, Payá A, Alenda C; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association., *The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5- fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status.* Eur J Cancer. 2009 Feb;45(3):365-73.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S., Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015. Im Internet: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. Engl J Med. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.

Karlberg M, Ohrling K, Edler D, Hallström M, Ullén H, Ragnhammar P., *Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in primary colorectal cancer*. Anticancer Res. 2010 Feb;30(2):645-51.

Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S., *Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome*. JAMA. 2009 Oct 28;302(16):1790-5.

Kerr RS, Love S, Segelov E, Johnstone E, Falcon B, Hewett P, Weaver A, Church D, Scudder C, Pearson S, Julier P, Pezzella F, Tomlinson I, Domingo E, Kerr DJ., *Adjuvant capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine alone in patients with colorectal cancer (QUASAR 2): an open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol. 2016 Nov;17(11):1543-1557

Knösel T, Emde A, Schlüns K, Chen Y, Jürchott K, Krause M, Dietel M, Petersen I., *Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer*. Neoplasia. 2005 Aug;7(8):741-7.

Ko CW, Riffle S, Michaels L, Morris C, Holub J, Shapiro JA, Ciol MA, Kimmey MB, Seeff LC, Lieberman D., *Serious complications within 30 days of screening and surveillance colonoscopy are uncommon*. Clin Gastroenterol Hepatol. 2010 Feb;8(2):166-73

Kornmann M, Link KH, Galuba I, Ott K, Schwabe W, Häusler P, Scholz P, Sträter J, Polat S, Leibl B, Kettner E, Schlichting C, Baumann W, Schramm H, Hecker U, Ridwelski K, Vogt JH, Zerbian KU, Schütze F, Kreuser ED, Behnke D, Beger HG., *Association of time to recurrence with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in stage II and III colorectal cancer*. J Gastrointest Surg. 2002 May-Jun;6(3):331-7.

Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Sträter J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Häusler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH., *Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5- fluorouracil*. Clin Cancer Res. 2003 Sep 15;9(11):4116-24.

Kosmider Suzanne und Lipton Lara., *Adjuvant therapies for colorectal cancer*. World J Gastroenterol. 2007 Jul 28; 13(28): 3799–3805.

Kristensen MH, Weidinger M, Bzorek M, Pedersen PL, Mejer J., *Correlation between thymidylate synthase gene variants, RNA and protein levels in primary colorectal adenocarcinomas*. J Int Med Res. 2010 Mar-Apr;38(2):484-97.

Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, Petrelli NJ, Findlay MP, Seay TE, Atkins JN, Zapas JL, Goodwin JW, Fehrenbacher L, Ramanathan RK, Conley BA, Flynn PJ, Soori G, Colman LK, Levine EA, Lanier KS, Wolmark N., *Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP*. J Clin Oncol. 2007 Jun 1;25(16):2198-204

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group., *Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up*. Ann Oncol. 2010 May;21 Suppl 5:v70-7.

Lamberti C, Mangold E, Pagenstecher C, Jungck M, Schwering D, Bollmann M, Vogel J, Kindermann D, Nikorowitsch R, Friedrichs N, Schneider B, Houshdaran F, Schmidt-Wolf IG, Friedl W, Propping P, Sauerbruch T, Büttner R, Mathiak M., *Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among unselected patients with colorectal cancer in Germany*. Digestion. 2006;74(1):58-67.

Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG., *Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial*. J Clin Oncol. 2003 Aug 1;21(15):2912-9.

Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV., *Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin*. J Clin Oncol. 1997 Oct;15(10):3223-9.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/0070L, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 12.05.2018]

Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, Zhou L, Xiong YP, Danenberg PV, Leichman LP., *p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site*. Clin Cancer Res. 1998 May;4(5):1227-34.

Li Y, Ma X, Wu X, Liu X, Liu L., *Prognostic significance of survivin in breast cancer: meta-analysis*. Breast J 2014; 20: 514–24.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.

Lugli, Alessandro. *Standortbestimmung in der Pathologie des Kolorektalarzinoms Histopathologische, immunohistochemische und molekulare Aspekte*. Schweizer Zeitschrift für Onkologie, 1, pp. 6-14. Rosenfluh Publikationen AG

Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, Carnaghi C, Doci R, Rosati R, Montorsi M, Roncalli M, Gennari L, Santoro A., *Reduced likelihood of metastases in*

patients with microsatellite unstable colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3831-9.

Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL., *Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations.* Genomics. 1999 Jun 15;58(3):310-2.

Fachinformation 5-FU medac 50 mg/ml Injektionslösung. Stand: Oktober 2018. Medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg. Zulassungsnummer: 41196.00.00 Im Internet: <https://www.fachinfo.de/pdf/001835>

Meta-analysis Group In Cancer, Piedbois P, Rougier P, Buyse M, Pignon J, Ryan L, Hansen R, Zee B, Weirnerman B, Pater J, Leichman C, Macdonald J, Benedetti J, Lokich J, Fryer J, Brufman G, Isacson R, Laplanche A, Levy E., *Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer.* J Clin Oncol. 1998 Jan;16(1):301-8.

Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, Largiadèr CR, Jennings BA, Marinaki AM, Sanderson JD, Kleibl Z, Kleiblova P, Schwab M, Zanger UM, Palles C, Tomlinson I, Gross E, van Kuilenburg AB, Punt CJ, Koopman M, Beijnen JH, Cats A, Schellens JH., *Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data.* Lancet Oncol. 2015 Dec;16(16):1639-50.

Müller A, Edmonston TB, Dietmaier W, Büttner R, Fishel R, Rüschoff J., *MSI- testing in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC).* Dis Markers. 2004;20(4-5):225-36.

NanoDrop Technologies, Inc., *NanoDrop Technical Support Bulletin T009 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop[®] ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers* Typical spectral pattern for Nucleic Acid (Figure 1). Stand: 05/2007 Im Internet: https://biosciatzerlab.biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf

National Comprehensive Cancer Center Network. *Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colorectal v.1.2016.* National Comprehensive Cancer Network
Im Internet: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.

National Institutes of Health Consensus Conference. *Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer.* JAMA. 1990 Sep 19;264(11):1444-50.

National Library of Medicine: Toxnet - Toxicology data network., Substance Name: Fluorouracil [USAN:USP:INN:BAN:JAN] Registry Number: 51-21-8 UNII: U3P01618RT InChIKey: GHASVSINZRGABV-UHFFFAOYSA-N (NIH U.S. National Library of Medicine, Herausgeber) Im Internet: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/51-21-8> Stand: ohne Jahr

Niedzwiecki D, Hasson RM, Lenz HJ, Ye C, Redston M, Ogino S, Fuchs CS, Compton CC, Mayer RJ, Goldberg RM, Colacchio TA, Saltz LB, Warren RS, Bertagnolli MM., *A Study of Thymidylate Synthase Expression as a Biomarker for Resectable Colon Cancer: Alliance (Cancer and Leukemia Group B) 9581 and 89803*. *Oncologist*. 2017 Jan;22(1):107-114

Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, Slotta-Huspenina J, Käser SA, Michalski CW, Janssen KP, Friess H, Rosenberg R, Bader FG., *Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis*. *Ann Surg*. 2013 Nov;258(5):775-82; discussion 782-3.

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY., *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Oct 6;96(19):1420-5.

Ochiai T, Sugitani M, Nishimura K, Noguchi H, Watanabe T, Sengoku H, Komiyama H, Okano M., *Correlation between clinical pathophysiologic factors and expression of orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), thymidylate synthase (TS), and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer*. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2002 Mar;29(3):413-20.

Papadimitriou CA, Papakostas P, Karina M, Malettou L, Dimopoulos MA, Pentheroudakis G, Samantas E, Bamias A, Miliaras D, Basdanis G, Xiros N, Klouvas G, Bafaloukos D, Kafiri G, Papaspirou I, Pectasides D, Karanikiotis C, Economopoulos T, Efstratiou I, Korantzis I, Pisanidis N, Makatsoris T, Matsiakou F, Aravantinos G, Kalofonos HP, Fountzilias G., *A randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with irinotecan, leucovorin and fluorouracil versus leucovorin and fluorouracil for stage II and III colon cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group study*. *BMC Med*. 2011 Jan 31;9:10.

Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J, Romero A, Machiavelli M, De Lena M, Allegra CJ, Johnston PG., *Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients*. *Br J Cancer*. 2000 Feb;82(3):560-7.

Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD., *Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations*. *Nat Rev Genet*. 2005 Oct;6(10):729-42.

Peeples C, Shellnut J, Wasvary H, Riggs T, Sacksner J., *Predictive factors affecting survival in stage II colorectal cancer: is lymph node harvesting relevant?* *Dis Colon Rectum*. 2010 Nov;53(11):1517-23.

Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL, Bloemena E, Meijer S, Jansen G, van Groeningen CJ, Pinedo HM., *Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism*. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jul 18;1587(2-3):194-205.

Peters GJ, van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM., *Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon carcinoma patients: implications for treatment with fluorouracil*. *J Clin Oncol*. 1994 Oct;12(10):2035-42.

Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Hearle N, Chandler I, Shao Y, Aherne W, Houlston R., *A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer.* Ann Oncol. 2006 Dec;17(12):18

Popat S, Hubner R, Houlston RS., *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis.* J Clin Oncol. 2005 Jan 20;23(3):609-18

Popat S, Matakidou A, Houlston RS., *Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.* J Clin Oncol. 2004 Feb 1;22(3):529-36.

Popat S, Wort R, Houlston RS., *Inter-relationship between microsatellite instability, thymidylate synthase expression, and p53 status in colorectal cancer: implications for chemoresistance.* BMC Cancer. 2006 Jun 5;6:150.

Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W, Holstege A, Hübner J, Kolligs F, Kreis M, Lux P, Ockenga J, Porschen R, Post S, Rahner N, Reinacher-Schick A, Riemann JF, Sauer R, Sieg A, Scheppach W, Schmitt W, Schmoll HJ, Schulmann K, Tannapfel A, Schmiegel W., *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-0070L im Internet: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-0070Ll_S3_KRK_2014-08.pdf Stand: August 2014*

Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study.* Lancet. 2007 Dec 15;370(9604):2020-9.

Rosenberg R, Maak M, Nitsche U, Shibayama M, Janssen KP, Gertler R., *Lymphadenectomy in colorectal cancer: does it make a difference?* Eur Surg January 2010, Volume 42, Issue 1, pp 8–11

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV., *Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase.* Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1322-7.

Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, Fields AL, Mayer RJ., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803.* J Clin Oncol. 2007 Aug 10;25(23):3456-61.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, Ribic C, Grothey A, Moore M, Zaniboni A, Seitz JF, Sinicrope F, Gallinger S., *Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer.* J Clin Oncol. 2010 Jul 10;28(20):3219-26.

Schalhorn A, Siebeck M, Bumm R, Gross M, Günther B, Heiss MM, Huber FT, Lamerz R, Lau-Werner U, Lersch C, Roder JD, Sackmann M, Sander R, Stieber P, Waldner H, Weber

B, Wiebecke B, Zoller WG., *Kolonkarzinome*. In *Manual Gastrointestinale Tumoren*. (Ed. Heiss MM) pp. 215-234. 6.Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag, München (2001).

Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, Salvatore L, Antoniotti C, Marmorino F, Sensi E, Lupi C, Fontanini G, De Gregorio V, Giannini R, Basolo F, Masi G, Falcone A., *Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer*. *Int J Cancer*. 2015 Jan 1;136(1):83-90.

Schwarzenbach Heide., *Predictive diagnostics in colorectal cancer: impact of genetic polymorphisms on individual outcomes and treatment with fluoropyrimidine-based chemotherapy*. *EPMA J*. 2010 Sep; 1(3): 485–494.

Sharma, Rituka I. and Tim A D Smith., *Colorectal tumor cells treated with 5-FU, oxaliplatin, irinotecan, and cetuximab exhibit changes in 18F-FDG incorporation corresponding to hexokinase activity and glucose transport*. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49 8 (2008): 1386-94

Sieg A, Hachmoeller-Eisenbach U, Eisenbach T., *Prospective evaluation of complications in outpatient GI endoscopy: a survey among German gastroenterologists*. *Gastrointest Endosc*. 2001 May;53(6):620-7.

Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V (Juni 2010). *Kolonkarzinom* In: *Praxis der Viszeralchirurgie – Onkologische Chirurgie*, 3. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg. Pp 693-712

Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE., *Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients*. *Gastroenterology*. 2006 Sep;131(3):729-37.

Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, Tai BC, Soo RA, Han HC, Ng SS, Tan WL, Zeps N, Joseph D, Diasio RB, Iacopetta B., *Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy*. *Ann Oncol*. 2008 May;19(5):915-9

Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P., *Erblicher Darmkrebs ohne Polyposis - Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), Lynch-Syndrom*. *Dtsch Arztebl Int*. 2013 Jan;110(3):32-8.

Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB., *Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome*. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1621-7

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. *Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer*. *The N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2343-51.

Tomiak A, Vincent M, Earle CC, Johnston PG, Kocha W, Taylor M, Maroun J, Eidus L, Whiston F, Stitt L., *Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer*. Am J Clin Oncol. 2001 Dec;24(6):597-602.

Tsoukalas N, Tzovaras AA, Tolia M, Kostakis ID, Papakostidi A, Pistamaltzian N, Ardavanis A., *Meta-analysis of the predictive value of KRAS mutations in treatment response using cetuximab in colorectal cancer*. J BUON. 2012 Jan-Mar;17(1):73-8.

Tsuji T, Sawai T, Takeshita H, Nakagoe T, Hidaka S, Atsushi Nanashima, Yamaguchi H, Yasutake T, Nagayasu T, Tagawa Y., *Tumor dihydropyrimidine dehydrogenase in stage II and III colorectal cancer: low level expression is a beneficial marker in oral-adjuvant chemotherapy, but is also a predictor for poor prognosis in patients treated with curative surgery alone*. Cancer Lett. 2004 Feb 10;204(1):97-104.

Twelves Chris J., *Xeloda in Adjuvant Colon Cancer Therapy (X-ACT) trial: overview of efficacy, safety, and cost-effectiveness*. Clin Colorectal Cancer. 2006 Nov;6(4):278-87.

van Dam L, Korfage IJ, Kuipers EJ, Hol L, van Roon AH, Reijerink JC, van Ballegooijen M, van Leerdam ME., *What influences the decision to participate in colorectal cancer screening with faecal occult blood testing and sigmoidoscopy?* Eur J Cancer. 2013 Jul;49(10):2321-30.

van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y, Smid K, Telleman F, Schoenmakers PS, van der Wilt CL, van Laar JA, Noordhuis P, Jansen G, Peters GJ., *Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines*. Clin Cancer Res. 1999 Mar;5(3):643-54.

van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF, Peters GJ., *Prognostic Role of Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase/ Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, and Proliferation Markers in Colorectal Cancer*. Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):1063-72.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT., *New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC*. Gastroenterology. 1999 Jun;116(6):1453-6.

Walgenbach-Brunagel G, Burger B, Leman ES, Walgenbach KJ, Tolba R, Heukamp L, Hirner A, Getzenberg RH., *The use of a colon cancer associated nuclear antigen CCSA-2 for the blood based detection of colon cancer*. J Cell Biochem. 2008 May 1;104(1):286-94.

Wang W, McLeod HL, Cassidy J, Collie-Duguid ES., *Mechanisms of acquired chemoresistance to 5-fluorouracil and tomudex: thymidylate synthase dependent and independent networks*. Cancer Chemother Pharmacol. 2007 May;59(6):839-45.

Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA., *Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer*. BMC Med, 9 (2011), p. 133

Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, Myrhøj T, Sunde L, Wijnen JT, Lynch HT., *The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome*. Int J Cancer. 2008 Jul 15;123(2):444-449.

Werner TA, Baseras B, Tomczak M, Schulte am Esch J, Verde P, Stoecklein NH, Knoefel WT, Krieg A., *Prognostische und klinisch-pathologische Relevanz von Survivin in Magen- und Kolonkarzinomen: Eine Meta-Analyse*. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 28.04.-01.05.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015. Doc15dgch483

Wittekind Christian, *Tumoren des Verdauungstraktes: Kolon und Rektum* In: Wittekind C (Hrsg.) TNM: Klassifikation maligner Tumoren 8. Auflage., Wiley-VCH, Weinheim, pp 97-102 (2017)

Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS., *5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies*. Molecules. 2008 Aug 5;13(8):1551-69.

Öhrling K, Karlberg M, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P., *A combined analysis of mismatch repair status and thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer*. Clin Colorectal Cancer. 2013 Jun;12(2):128-35

Danksagung

Es ist vollbracht – ich habe meine Doktorarbeit fertiggestellt und dafür möchte ich mich bei einer Handvoll Menschen bedanken, die mich unterstützt und begleitet haben.

Ich danke

...meinem Doktorvater PD Dr. Dirk Wilhelm, der mir stets mit exzellenten Ratschlägen zur Seite stand und mich nie im Regen stehen lassen hat. Es war mir eine Ehre Ihre Doktorandin zu sein und Sie haben mir die beste Betreuung geboten (inklusive kürzester Mailantwortzeit aller Zeiten, selbst im Urlaub), die ich mir nur wünschen konnte.

...meinem Mentor Dr.med Dr.med.univ. Ulrich Nitsche, Ph.D. für seine ebenfalls ausgezeichnete Betreuung mit seiner Expertise auf jedem Gebiet, egal ob im Labor oder in der Statistik oder beim Antworten auf meine gefühlt tausend Fragen.

...Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Janssen und seiner gesamten kolorektalen Forschungsgruppe am Klinikum rechts der Isar. Ihr seid im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und habt in mir die Leidenschaft für wissenschaftliches Arbeiten geweckt.

...Prof. Dr. Friess, Chefarzt der Chirurgischen Klinik und Poliklinik rechts der Isar, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an dieser Abteilung durchzuführen.

...von tiefsten Herzen meinen Eltern, Birgit und Hans. Worte können wohl kaum beschreiben, wie sehr ich euch liebe. Auch wenn es während dieser Arbeit viele Höhen, aber auch kleine oder etwas größere Tiefen gegeben hat, so habt ihr mich unermüdlich begleitet und an mich geglaubt.

...meinem großen Bruder Michael, der am anderen Ende der Welt seinen Traum vom besseren Leben verwirklicht, aber dennoch stets an meiner Seite ist. Wir sind wie Ying und Yang, am Ende eine Einheit – Unconditional Love.

...allen Patienten und Patientinnen für Ihre Unterstützung mit mal kurzen, mal langen Gesprächen, auch wenn es oftmals emotional sehr schwierig war, ohne Sie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ihr habt mir wieder einmal mehr gezeigt, dass Ärztin werden und sein der schönste Beruf auf Erden ist.

...den Ärzten und Therapeuten in der Schönklinik in Prien am Chiemsee, die mich auf einen Teil dieser Doktorarbeit begleitet haben. Die Zeit war schwierig und lehrte mir so manches, doch es machte mich auch stark und ich bin stolz darauf, dass ich diese Hilfe annehmen konnte.

...darüber hinaus allen Freunden, Kommilitonen, Bekannten und Menschen, denen ich manchmal kürzer und manchmal länger auf dem Weg zu dieser Doktorarbeit begegnet bin. Sie haben mich alle auf Ihre Art und Weise unterstützt.

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe, Briefe. An Adelheid Amalia Fürstin von Gallitzin, 6 Februar 1797.