

Institut für Experimentelle Tumorforschung
Sektion für Molekulare Onkologie
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ANALYSE DER PROGNOSTISCHEN RELEVANZ
DER TUMORZELLDISSEMINIERUNG BEIM
KOLOREKTALEN KARZINOM IM VERGLEICH
VERSCHIEDENER NACHWEISVERFAHREN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

AMKE WITTIG

aus Oberhausen

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Kolorektales Karzinom	4
1.1.1.	Risikofaktoren	4
1.1.2.	Molekulare Karzinogenese.....	4
1.1.3.	Histopathologie, Tumorlokalisierung und Metastasierung.....	5
1.1.4.	Klinik und Diagnostik.....	6
1.1.5.	Therapie	7
1.1.6.	Prognose	9
1.2.	Tumorzelldisseminierung	9
1.2.1.	Definition von disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen und begriffliche Abgrenzung zur Mikrometastase	10
1.2.2.	Biologische Merkmale disseminierter und zirkulierender Tumorzellen	10
1.2.3.	Tumorzelldisseminierung und Metastasenbildung	11
1.2.4.	Methoden und Marker zur Detektion von CTC und DTC	12
1.2.5.	Tumorzelldisseminierung beim kolorektalen Karzinom.....	15
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	16
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Patientenkollektiv	17
2.2.	Probenentnahme und Aufarbeitung	17
2.2.1.	Gewinnung der Blutproben und Knochenmarkaspirate	17
2.2.2.	Bearbeitung der Blut- und Knochenmarkproben.....	18
2.3.	Molekularbiologische Nachweismethode zur Detektion von DTC und CTC in Blut und Knochenmark.....	20
2.3.1.	RNA-Isolierung.....	21
2.3.2.	cDNA Synthese.....	23
2.3.3.	CK 20 Nested RT-PCR	23
2.3.4.	Agarosegelelektrophorese	27
2.4.	Immunzytochemische Methode zur Detektion von DTC im Knochenmark	28
2.4.1.	Antikörper.....	28
2.4.2.	Immunzytochemischer Antigennachweis mittels APAAP– Methode.....	29

2.4.3.	Mikroskopische Analyse mit dem ACIS (Automated Cellular Imaging System)	32
2.5.	Statistische Auswertung	35
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Patientenkollektiv	39
3.1.1.	Klinische Daten der Patienten	39
3.1.2.	Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von verschiedenen klinischen Parametern	42
3.2.	Nachweis disseminierter und zirkulierender Tumorzellen	51
3.2.1.	Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark durch RT-PCR	51
3.2.2.	Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark durch immunzytochemische Untersuchungsverfahren	55
3.2.3.	Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen	58
3.2.4.	Abhängigkeit der Detektion von DTC und CTC von klinischen Parametern ..	59
3.3.	Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter und zirkulierender Tumorzellen und dem Überleben	63
3.3.1.	Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und CK 20 mRNA-Expression in Blut und Knochenmark	64
3.3.1.1.	Tumorlokalisation im Kolon/Sigma	68
3.3.1.2.	Tumorlokalisation im Rektum	74
3.3.2.	Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und Zytokeratinexpression im Knochenmark (Antikörper A45-B/B3)	78
3.3.2.1.	Tumorlokalisation im Kolon/Sigma	80
3.3.2.2.	Tumorlokalisation im Rektum	82
3.3.3.	Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und EpCAM-Expression im Knochenmark (Antikörper Ber-EP4)	85
3.3.3.1.	Tumorlokalisation im Kolon/Sigma	86
3.3.3.2.	Tumorlokalisation im Rektum	88
3.4.	Ergebnisse der multivariaten Analyse	89

3.5.	Tumorzelldisseminierung als Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom: Zusammenfassung der Ergebnisse der uni- und multivariaten Analysen	95
4.	Diskussion	97
4.1.	Patientenkollektiv	97
4.2.	Tumorzellanreicherung und Auswahl der Marker für Tumorzelldisseminierung	99
4.2.1.	EpCAM als Marker für Tumorzelldisseminierung	100
4.2.2.	Zytokeratine als Marker für Tumorzelldisseminierung	101
4.3.	Detektion und prognostische Bedeutung der Tumorzelldisseminierung beim kolorektalen Karzinom.....	102
4.4.	Analyse gestreuter Tumorzellen im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut.....	110
4.5.	Nachweis der Tumorzelldisseminierung durch RT-PCR im Vergleich zur immunzytochemischen Analyse	112
4.6.	Ausblick.....	115
5.	Zusammenfassung	117
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Danksagung.....	129
8.	Lebenslauf	130

Abkürzungen

ACIS	Automated Cellular Imaging System
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
cDNA	Komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	Zytokeratin
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
DPBS	Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline
DTC	Disseminierte Tumorzellen
DTT	Dithiothreitol
EMT	Epithelial mesenchymal transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
5-FU	5-Fluorouracil
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
ICC	Immunzytochemie
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
KM	Knochenmark
MET	Mesenchymal epithelial transition
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

1. Einleitung

In Deutschland ist etwa jede siebte Krebserkrankung im Darm lokalisiert. Darmkrebs stellt damit die zweithäufigste Krebserkrankung in Deutschland nach dem Mammakarzinom bei der Frau und dem Prostatakarzinom beim Mann dar (siehe Abbildung 1).

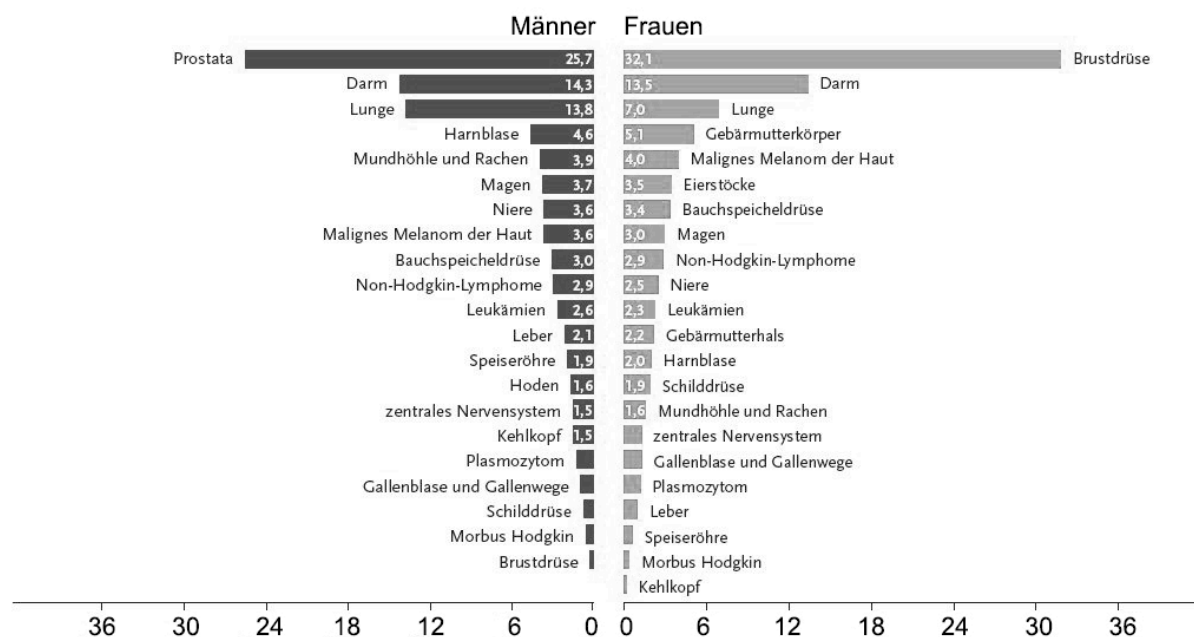


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2008 (umgezeichnet nach Robert Koch Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID) 2012).

Das mittlere Erkrankungsalter lag im Jahr 2008 für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren. Das Risiko einer Erkrankung steigt mit höherem Lebensalter, so dass über die Hälfte der Erkrankten bei Diagnosestellung über 70 Jahre alt sind. Nur circa 10% der Erkrankten sind jünger als 55 Jahre. Die altersstandardisierten Erkrankungsrate sind bei Betrachtung des Zeitraumes von 1999 bis 2008 bei den Frauen leicht rückläufig, während sie für die Männer in etwa konstant sind. Die altersstandardisierten Sterberaten hingegen nehmen für beide Geschlechter in den letzten zehn Jahren stetig ab. Die absolute 5-Jahresüberlebensrate (2007-2008) liegt für beide Geschlechter bei 52% (Robert Koch Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID), 2012).

Der entscheidende Prognosefaktor für Patienten mit kolorektalem Karzinom ist das Tumorstadium (Compton und Greene 2004). Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem TNM System der Union internationale contre le cancer (UICC) (Wittekind und Meyer 2010). Kriterien für die Einteilung sind die lokale Tumorausdehnung und der Lymphknoten- und Fernmetastasierungsstatus (siehe Tabelle 1). Neben seiner prognostischen Aussagekraft ist das TNM System mittlerweile in seiner Funktion erweitert worden und dient nun auch als Basis für die Therapieentscheidung (Quirke et al. 2007).

Obwohl die TNM Stadieneinteilung der UICC der Goldstandard aller Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms ist, entwickeln doch 30% der Patienten, die bei Erstdiagnose ein Stadium I oder II aufwiesen, nach erfolgter kurativer Behandlung letztendlich ein Rezidiv. Dies zeigt, dass die momentan durchgeführte Stadieneinteilung nicht präzise genug ist. In der Routinediagnostik werden zirkulierende Tumorzellen (CTC) sowie disseminierte Tumorzellen (DTC) nicht erfasst. Die Entwicklung von Detektionsmethoden für DTC und CTC könnte helfen, die Überlebenschancen durch rechtzeitige therapeutische Intervention zu verbessern. Es könnte gezielt gefördert werden, solche Patienten adjuvant zu behandeln, bei denen DTC und/oder CTC nachgewiesen worden sind, und dies könnte schon in frühen Tumorstadien erfolgen (Tsavellas et al. 2001).

Der Nachweis von DTC und CTC ist bei vielen Tumorarten und insbesondere beim Mammakarzinom von klinischer Relevanz. Dies hat sogar dazu geführt, dass beim Mammakarzinom die Detektion von disseminierten Tumorzellen in das TNM-System integriert wurde (Pantel et al. 2008, Singletary et al. 2003). Auch für das kolorektale Karzinom wurde die klinische und prognostische Relevanz der DTC und CTC in vielen Studien klar gezeigt (Schlimok et al. 1990, Hardingham et al. 2000, Koch et al. 2006, Vogelaar et al. 2010, Flatmark et al. 2011). Ziel ist es jetzt, methodische Standards zu entwickeln, um dann gezielt prospektive multiinstitutionale Studien mit großen Patientengruppen durchzuführen und so die Bedeutung der DTC und CTC als prognostischen Marker für die klinische Routine zu bestätigen (Steinert et al. 2012).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach der TNM-Klassifikation der Union internationale contre le cancer (UICC) (Wittekind und Meyer 2010) und publizierte 5-Jahresüberlebensraten für die verschiedenen Stadien (O'Connell et al. 2004, Heinemann et al. 2010)

T – Primärtumor				
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden			
T0	Kein Primärtumor			
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria			
T1	Infiltration bis in die Submukosa			
T2	Infiltration bis in die Muscularis propria			
T3	Infiltration über die Muscularis propria hinaus bis in das subseröse bzw. perikolische/perirektale Fettbindegewebe			
T4a	Perforation des viszeralen Peritoneums			
T4b	Direkte Infiltration anderer Organe oder Strukturen			
N – regionale Lymphknoten				
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden			
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen			
N1a	Metastasen in 1 regionalen Lymphknoten			
N1b	Metastasen in 2-3 regionalen Lymphknoten			
N1c	Tumorknötchen bzw. Satelliten in der Suserosa, ohne Metastasen in regionalen Lymphknoten			
N2a	Metastasen in 4 – 6 regionalen Lymphknoten			
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionalen Lymphknoten			
M – Fernmetastase				
M0	Keine Fernmetastasen			
M1a	Fernmetastase(n) auf ein Organ beschränkt			
M1b	Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum			
Stadium	T	N	M	5-Jahresüberlebensrate [%]
I	T1, T2	N0	M0	93,2 - 96
IIA	T3	N0	M0	82,5 - 85
IIB	T4a	N0	M0	
IIC	T4b	N0	M0	
IIIA	T1, T2 T1	N1 N2a	M0	59,5 - 61
IIIB	T3, T4a T2 – T3 T1 – T2	N1 N2a N2b	M0	
IIIC	T4a T3 – T4a T4b	N2a N2b N1 - 2	M0	
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a	8,1 – 9
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b	

1.1. Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom tritt in 88-94% der Fälle sporadisch auf, in 1-2% ist es mit einer entzündlichen Darmerkrankung wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn assoziiert und in 5-10% der Fälle tritt es im Rahmen eines hereditären Krebsyndroms auf. Die am häufigsten auftretenden hereditären Krebsyndrome sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) (Weitz et al. 2005).

1.1.1. Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für ein sporadisches kolorektales Karzinom gelten ein höheres Lebensalter, männliches Geschlecht, der Zustand nach Cholezystektomie, hormonelle Faktoren wie Nulliparität, hohes Lebensalter bei der ersten Schwangerschaft und frühe Menopause, kolorektale Polypen in der Vorgeschichte und der Zustand nach einem Karzinom des Dünndarms, Endometriums, der Brust oder des Eierstocks. Außerdem wird das Risiko durch viele Umweltfaktoren erhöht. Hierzu zählen fleisch – und fettreiche Ernährung mit niedrigem Anteil an Ballaststoffen, Bewegungsmangel, Adipositas, Diabetes mellitus, regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum und berufliche Risiken (z. B. Asbest Exposition) (Weitz et al. 2005).

Nach kurativer Resektion eines sporadischen kolorektalen Karzinoms besteht in den folgenden fünf Jahren ein Risiko von 1,5 bis 3 % erneut an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Weitz et al. 2005).

Circa 20% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom weisen eine positive Familienanamnese hinsichtlich dieser Erkrankung ohne klaren Vererbungsmodus auf. Hierbei erhöht sich das Risiko zwei- bis drei-fach, wenn ein erstgradig Verwandter an einem kolorektalen Karzinom erkrankt. Sind zwei oder mehr erstgradig Verwandte betroffen oder liegt das Erkrankungsalter unter 45 Jahren, steigt das Risiko weiter an (Weitz et al. 2005).

1.1.2. Molekulare Karzinogenese

Das invasive kolorektale Karzinom entwickelt sich aus adenomatösen Vorstadien über eine niedrig- und hochgradige Dysplasie in einem Zeitraum von 10-15 Jahren (Heinemann et al. 2010). Diese Entwicklung wird durch den von Jackman und Mayo eingeführten Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ beschrieben (Jackman und Mayo 1951). Fearon und Vogelstein konnten im Jahre 1990 erstmals die Mutationen

verschiedener Gene einzelnen histologischen Entwicklungsstufen der kolorektalen Karzinogenese zuordnen (Fearon und Vogelstein 1990, Heinemann et al. 2010).

Die kolorektale Karzinogenese wird durch zwei Grundmechanismen erklärt. Der erste Mechanismus wird als „**Gatekeeper Pathway**“ bezeichnet und beruht auf einer chromosomalen Instabilität. Der Schlüsselmechanismus ist die Mutation des Tumorsuppressorgens APC. Es sind jedoch noch viele weitere Tumorsuppressorgene (wie z. B. DCC, p53) und Onkogene (wie z. B. K-ras, c-myc) involviert. Kolorektale Karzinome bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) und circa 85% der sporadischen Karzinome entstehen auf diesem Wege (Weitz et al. 2005).

Dem zweiten Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese, der als „**Caretaker Pathway**“ bezeichnet wird, liegt eine Mutation oder eine epigenetische Veränderung von DNA-Reparaturgenen zugrunde (Weitz et al. 2005). Hierdurch wird die Akkumulation von Mutationen in einer Zelle begünstigt (Kinzler und Vogelstein 1997). Das Hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) und etwa 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome entstehen auf diesem Wege (Weitz et al. 2005).

1.1.3. Histopathologie, Tumorlokalisierung und Metastasierung

Histopathologisch handelt es sich bei 85-90% der kolorektalen Karzinome um Adenokarzinome, in 5-10% um muzinöse Adenokarzinome und in 1% um Siegelringkarzinome. In unter einem Prozent kommen kleinzellige Karzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome, medulläre Karzinome und undifferenzierte Karzinome vor. Und noch seltener sind Karzinoide, Lymphome und maligne Bindegewebstumoren zu finden (Heinemann et al. 2010).

Mit mindestens 55% liegt die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome im Rektosigmoid. Hierbei gelten alle Karzinome als Rektumkarzinome, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist. Die zweithäufigste Tumorlokalisierung ist das proximale Kolon, wobei 13% der Karzinome im Bereich des Zökums und 9% im Colon ascendens zu finden sind. In 11% der Fälle ist der Tumor im Colon transversum und in 6% der Fälle im Colon descendens zu finden. Nur in 2-3 % der Fälle treten Mehrfachkarzinome auf (Heinemann et al. 2010).

Das kolorektale Karzinom breitet sich per continuitatem sowie lymphogen und hämatogen aus. Das Kolon wird über Äste der Aa. mesentericae superior und inferior arteriell versorgt und gibt sein Blut über die Vv. mesentericae superior und inferior in das

Pfortadersystem ab. Der Lymphabfluss erfolgt entlang der versorgenden Arterien. Das Rektum wird über den Endast der A. mesenterica superior sowie über kleine Arterien aus der A. iliaca interna und der A. pudenda interna arteriell versorgt. Der venöse Abfluss des oberen Rektumdrittels erfolgt über die V. mesenterica inferior in das Pfortadersystem. Das mittlere und untere Rektumdrittels gibt sein Blut auch über die Vv. Iliacae direkt in die Vena cava inferior ab. Der lymphogene Ausbreitungsweg beim Rektumkarzinom ist ebenfalls je nach Tumorsitz unterschiedlich und erfolgt entlang der versorgenden Arterien (Renz-Polster et al. 2004). Nur wenn der Tumor sehr tief sitzt, erfolgt die Metastasierung nach distal und inguinal. Hämatogen metastasiert das kolorektale Karzinom bevorzugt in die Leber (70-80%) aufgrund des venösen Abflusses über das Pfortadersystem. Den zweithäufigsten Metastasierungsort stellt die Lunge (10-35%) dar. Lungenmetastasen treten beim Rektumkarzinom häufiger auf als beim Kolonkarzinom, bedingt durch die oben beschriebene Blutversorgung und die lymphogenen Ausbreitungswege bei Rektumkarzinomen im unteren und mittleren Rektum. Desweiteren treten in abnehmender Häufigkeit Fernmetastasen in Skelett, Nebennieren und Gehirn auf (Heinemann et al. 2010, Kreis et al. 2010).

1.1.4. Klinik und Diagnostik

Die Entstehung kolorektaler Karzinome bleibt oft lange Zeit unbemerkt aufgrund des schleichenden Beginns mit unspezifischen Symptomen, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, insbesondere Obstipation und rektalen Blutungen. Spätsymptome wären eine Blutungsanämie oder ein Subileus.

Goldstandard für die Diagnosestellung ist die Koloskopie mit gezielter Entnahme von Biopsien zur histologischen Sicherung des Befundes. Sie stellt das sensitivste Verfahren zur Detektion eines kolorektalen Karzinoms dar. Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) von 2007 gelten folgende Untersuchungen als obligat für die präoperative Diagnostik: Rektal-digitale Untersuchung, komplette Koloskopie mit Biopsie, Sonographie des Abdomens, Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen und CEA-Bestimmung, Spiral-CT und/oder MRT des Abdomens bei unklarem sonographischen Befund, Spiral-CT des Thorax bei Verdacht auf Lungenmetastasen. Beim Rektumkarzinom sollte präoperativ zusätzlich eine starre Rektoskopie und eine Endosonographie durchgeführt werden. Durch die starre Rektoskopie kann der genaue Abstand des distalen Tumorrandes von der Linea dentata

bestimmt werden. Dies ist wichtig für die weitere Therapieentscheidung. Die Endosonographie hat die höchste Genauigkeit zur Beurteilung der Tiefeninfiltration des Tumors und ist somit von wesentlicher Bedeutung, um die Notwendigkeit einer neoadjuvanten Therapie abzuklären (Schmiegel et al. 2008).

1.1.5. Therapie

Die chirurgische Resektion stellt die Grundlage der Therapie des kolorektalen Karzinoms dar (Weitz et al. 2005). Ziel der Behandlung ist es eine En-bloc-Resektion des tumortragenden Darmabschnitts durchzuführen, mit Entfernung des entsprechenden Lymphabflussgebiets, im Sinne einer R0-Resektion (Lippert 2004). Die Blutversorgung, die Tumorlokalisierung und die Verteilung der regionalen Lymphknoten bestimmen hierbei das Ausmaß der Resektion (Lehnert et al. 1996). Die Operation wird standardmäßig nach der „No-touch-technique“ nach Turnbull (Turnbull 1975) durchgeführt. Hierbei werden die stammnahen zu- und abführenden Gefäße ligiert, bevor eine Manipulation am tumortragenden Darmabschnitt stattfindet. Hierdurch soll eine Tumorzellaussaat verhindert werden. Danach erst wird der Darm im Bereich der späteren proximalen und distalen Resektionsgrenze angeschlungen (Heinemann et al. 2010). Betrachtet man nur das intramurale mikroskopische Tumorwachstum, wäre ein Sicherheitsabstand von 2cm ausreichend. Die lymphogene Metastasierung erfolgt jedoch primär bis zu 10 cm vom makroskopischen Tumorrand entfernt, entlang der perikolischen Gefäßarkade und erst danach entlang der versorgenden Gefäße. Der Resektionsabstand zum Tumor muss also entsprechend weiter gewählt werden (Schmiegel et al. 2008).

Beim Kolonkarzinom gelten die Hemikolektomie rechts bzw. links, die erweiterte Hemikolektomie rechts bzw. links, die Transversumresektion und die Sigmaresektion als Standardoperationsverfahren. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren kann es erforderlich sein, benachbarte Organe mit zu entfernen, um eine R0-Resektion zu erreichen (Heinemann et al. 2010). Eine adjuvante Chemotherapie wird für alle R0-resezierten Patienten mit UICC-Stadium III empfohlen. In mehreren randomisierten Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Überlebensrate für diese Patienten durch eine adjuvante Chemotherapie signifikant erhöht wird. Hierbei sollte 5-Fluorouracil (5-FU) und Folinsäure in Kombination mit Oxaliplatin eingesetzt werden (Schmiegel et al. 2008). Da 75% der Patienten mit UICC-Stadium II alleine durch die Operation geheilt werden können, ist der Einsatz einer adjuvanten Therapie bei die-

sen Patienten immer noch kontrovers. Es zeigt sich die gleiche Risikoreduktion durch eine adjuvante Therapie wie bei Patienten mit UICC-Stadium III, jedoch liegt der absolute Nutzen, bedingt durch das niedrige Rezidivrisiko, nur bei 2-5%. Momentan wird für diese Patienten empfohlen, in ausgewählten Risikosituationen (T4-Tumoren, Tumorperforation /–einriss, Anzahl untersuchter Lymphknoten <10, G3- und G4-Tumoren) eine adjuvante Chemotherapie durchzuführen (Kosmider und Lipton 2007).

Das Therapiekonzept beim Rektumkarzinom wird von der Lokalisation des Primärtumors im Rektum und dem präoperativen Tumorstadium bestimmt. Einer der größten Fortschritte in der Operationstechnik ist die vollständige Entfernung des Mesorektums. Hierdurch wird die Lokalrezidivrate und die perioperative Morbidität gesenkt (Cecil et al. 2004). Als Operationsverfahren kommen die sphinktererhaltende anteriore Rektumresektion nach Dixon, die abdominoperineale Rektumextirpation und in Ausnahmefällen die transanale endoskopische Mikrokirurgie (TEM) zum Einsatz (Lippert 2004). Die transanale endoskopische Mikrokirurgie (TEM) kommt nur bei Vorliegen eines „low-risk“-Karzinoms in Betracht. Dies besteht definitionsgemäß bei T1-Karzinomen mit hohem Differenzierungsgrad (G1/G2), ohne Lymphknoteninfiltration. Besteht eine Infiltration des M. sphincter ani externus oder reicht der Tumor bis nach distal der Linea dentata, ist eine abdominoperineale Extirpation mit Entfernung des Spinkterapparates unumgänglich. Im UICC-Stadium II und III mit Tumorlokalisation in den unteren zwei Rektumdritteln ist die Durchführung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie indiziert (Kreis et al. 2010). Bei diesen Patienten zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Lokalrezidivrate bei Durchführung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie im Vergleich zur adjuvanten Radiochemotherapie. Für die tief sitzenden Rektumkarzinome, die vor neoadjuvanter Therapie als extirpationspflichtig eingeschätzt wurden, konnte die Rate sphinktererhaltender Operationsverfahren durch die Vorbehandlung verdoppelt werden. Empfohlen wird eine konventionell fraktionierte präoperative Radiotherapie, mit einer simultanen 5-Fluorouracil/Folinsäure Chemotherapie. Eine adjuvante Therapie wird bei Patienten ohne vorausgegangene neoadjuvante Therapie mit UICC Stadium II und III sowie bei allen neoadjuvant therapierten Patienten empfohlen. Hierbei sollte bei den Patienten ohne vorausgegangene neoadjuvante Therapie eine Radiotherapie mit einer 5-FU-Monotherapie kombiniert werden. Bei bereits neoadjuvant therapierten Patienten

wird eine Chemotherapie entweder als 5-FU-Monotherapie oder kombiniert mit Folsäure empfohlen (Schmiegel et al. 2008).

1.1.6. Prognose

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist abhängig von einer Reihe von klinischen, histologischen, zytologischen und molekulargenetischen Faktoren. Der entscheidende Prognosefaktor ist jedoch das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Therapie (Heinemann et al. 2010). Weitere Faktoren, für die in mehreren Studien definitiv ein prognostischer Wert nachgewiesen wurde, sind, die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen, der Residualstatus nach Operation und der präoperative CEA-Level (Compton et al. 2000). Auch für die Tumorzell dissemination wurde in vielen Studien eine klinische und prognostische Relevanz gezeigt (Steinert et al. 2012).

Die stadienabhängigen 5-Jahresüberlebensraten für das kolorekale Karzinom werden mit 93,2 bis 96% im UICC-Stadium I, 82,5 bis 85% im UICC-Stadium II, 59,5 bis 61% im UICC-Stadium III und 8,1 bis 9 % im UICC-Stadium IV angegeben (O'Connell et al. 2004, Heinemann et al. 2010) (siehe Tabelle 1).

1.2. Tumorzell dissemination

Die meisten Krebserkrankungen in Europa werden durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Die Mehrzahl der betroffenen Patienten stirbt dabei nicht aufgrund des Primärtumors, sondern infolge einer Metastasierung. Lange Zeit wurde angenommen, dass es nur wenige Zellen mit dem Potential zur Bildung von Metastasen gibt und diese erst in späten Tumorstadien entstehen. Somit wurde die Metastasierung als ein spätes Ereignis aufgefasst. Viele Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Metastasierung schon viel früher beginnt (Hüsemann et al. 2008, Pantel und Brakenhoff 2004; Pantel et al. 2008). Auch die Tatsache, dass ein erheblicher Prozentsatz der kurativ behandelten Patienten mit kolorektalem Karzinom im weiteren Verlauf trotzdem ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase entwickelt, lässt vermuten, dass schon präoperativ eine Tumorzell dissemination stattgefunden hat, die durch die klinische Routinediagnostik nicht erfasst werden kann (Weitz et al. 1999).

Der Nachweis und die Charakterisierung dieser disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen ist daher von großem Interesse für die Forschung. Durch ein tieferes Verständnis der Biologie gestreuter Tumorzellen und eine Weiterentwicklung ihrer

Detektionsverfahren könnten sich neue Wege eröffnen eine metastatische Ausbreitung frühzeitig zu erkennen und erfolgreich zu therapieren (Pantel et al. 2008).

1.2.1. Definition von disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen und begriffliche Abgrenzung zur Mikrometastase

DTC und CTC werden nicht durch die herkömmliche Routinediagnostik für das Tumorstaging nachgewiesen. DTC befinden sich im Knochenmark oder auch in anderen Geweben und CTC sind im Blut lokalisiert. (Pantel et al. 2008).

Diese DTC und CTC sind klar begrifflich abzugrenzen von einer Mikrometastase. Bei den DTC und CTC handelt es sich um einzelne Tumorzellen oder um kleine Zellcluster, die eine maximale Größe von 0,2mm haben und bei denen noch keine Stromareaktion oder Proliferation stattgefunden hat. Die Detektion dieser isolierten Tumorzellen ist erst durch die Entwicklung verschiedener immunzytochemischer und molekularbiologischer Methoden möglich (siehe Kapitel 1.2.4). Eine Mikrometastase hingegen ist dadurch definiert, dass bereits eine Stromareaktion und extravaskuläre Tumorzellproliferation stattgefunden hat. Der Durchmesser einer Mikrometastase liegt zwischen 0,2 und 2mm und kann deshalb nur durch eine histologische Untersuchung nachgewiesen werden. Als Synonym wird auch der Begriff „okkulte Metastase“ verwendet (Singletary et al. 2003, Hermanek 1999).

1.2.2. Biologische Merkmale disseminierter und zirkulierender Tumorzellen

Tumorzellen im Blut wurden erstmalig 1869 von Ashworth beschrieben. (Ashworth 1869). Trotzdem hat es mehr als ein Jahrhundert gedauert, bis die biologischen Merkmale dieser Zellen weiter analysiert werden konnten (Steinert et al. 2012). Man geht davon aus, dass DTC und CTC genetisch abnormal und invasiv sind. Fraglich ist noch, ob diese Zellen auch die Fähigkeit zur Extravasation und Metastasenbildung haben (Pantel et al. 2008).

DTC und CTC scheinen nicht- oder langsam proliferierende Zellen zu sein. Dies wurde in einer Studie von Müller et al. durch eine Negativität für Ki-67 gezeigt, welches der Goldstandard-Biomarker für proliferierende Zellen ist (Müller et al. 2005). Die Frage, wie DTC von dem schlafenden Zustand zurück in einen proliferierenden Zustand versetzt werden können, ist noch nicht geklärt (Pantel et al. 2008). Nach einer Beobachtung von Koebel et al. scheint das Immunsystem ein Schlüsselfaktor

hierfür zu sein. In einer Studie mit Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Erschöpfung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und eine Hemmung von Interferon γ zu einem fortschreitenden Wachstum von vorher nicht proliferierenden Tumoren führte. Es könnte also sein, dass das Immunsystem den Tumor in einem schlafenden Zustand hält (Koebel et al. 2007).

Ein weiteres Merkmal dieser Zellen ist ihre offenbare Anoikis Resistenz. Normalerweise unterliegen epitheliale Zellen, die ihren Zellverband verlassen, einem programmierten Zelltod, ähnlich der Apoptose, der Anoikis genannt wird. Die Anoikis Resistenz der DTC und CTC könnte das Überleben, beispielsweise in der Blutzirkulation, erklären (Steinert et al. 2012).

1.2.3. Tumorzelldisseminierung und Metastasenbildung

Von Steinert und Kollegen wird die Tumorzelldisseminierung und Metastasenbildung in folgenden Schritten zusammengefasst: Als erster Schritt erfolgt ein Prozess, der als „Epitheliale-Mesenchymale Transition“ (EMT) bekannt ist, bei dem epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser erste Schritt scheint eine entscheidende Rolle zu spielen (Steinert et al. 2012). So konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen durch EMT Motilität, Invasivität, Apoptose-Resistenz, und Therapieresistenz erlangen (Sun et al. 2011). Diese Tumorzellen dringen dann zunächst in das umgebende Gewebe und später in Lymph- und Blutgefäße ein (Intravasation). Mit dem Blutstrom gelangen sie in das Kapillarbett anderer Organe. Über Adhäsionsprozesse sind sie in der Lage die Zirkulation wieder zu verlassen (Extravasation). Es findet eine erneute Umwandlung der mesenchymalen Derivate zurück in einen epithelialen Zustand statt (mesenchymal-epithelial transition, MET). Diese Zellen können in der neuen gewebsspezifischen Umgebung als sogenannte schlafende Zellen (dormant cells) oder proliferierende Zellen überleben und letztendlich Metastasen bilden.

Der gesamte Prozess der Tumorzelldisseminierung und Metastasenbildung ist komplex. Nur eine kleine Anzahl der Tumorzellen (~0,01%) schafft es jeden einzelnen Schritt bis zur Metastasenbildung zu vollenden (Steinert et al. 2012).

Grundsätzlich werden zwei Metastasierungsmodelle unterschieden: Das lineare Progressionsmodell und das parallele Progressionsmodell. Beim linearen Progressionsmodell geht man von einer späten Tumorzelldisseminierung aus. Erst wenn der Primärtumor eine bestimmte Zellmasse und einen hoch aggressiven Phänotyp en-

wickelt hat, kommt es zur Disseminierung von Tumorzellen und Metastasenbildung in anderen Organen. Diese späte Disseminierung von hoch malignen Tumorzellen ist abhängig von der Größe des Primärtumors. Die Annahme, dass nur diejenigen Tumorzellen, die in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium des Primärtumors disseminieren, die Möglichkeit zur Metastasenbildung haben, wird durch die gut bekannte Assoziation zwischen Tumorgröße und Häufigkeit von Metastasen gestützt. Das parallele Progressionsmodell hingegen geht von einer frühen Tumorzeldisseminierung aus, wenn der Primärtumor noch sehr klein ist. Die Tumorzellen disseminieren in andere Organe, wo sie einen Klon bilden, der sich parallel zum Primärtumor entwickelt. Bereits in den 1950er Jahren wurde in Studien zur Quantifizierung von Tumorwachstumsraten festgestellt, dass die Größe der Metastasen, in Anbetracht ihrer Wachstumsrate, nicht damit vereinbar ist, dass sich die Metastasen erst in einem späten Stadium des Primärtumors entwickelt haben. Die Metastasen waren einfach schon zu groß. Somit wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Metastasenbildung schon weit vor dem Auftreten von ersten Symptomen oder der Diagnosestellung des Primärtumors begonnen haben muss (Klein 2009, Bednarz-Knoll et al. 2011).

1.2.4. Methoden und Marker zur Detektion von CTC und DTC

Viele immunologische und molekulare Verfahren wurden entwickelt, um die einzelnen Tumorzellen in Lymphknoten, Blut und in anderen Geweben wie im Knochenmark nachzuweisen (Pantel und Brakenhoff 2004). Um die Sensitivität für die Detektion von CTC und DTC zu erhöhen, werden die Tumorzellen zuvor angereichert. Zur Anreicherung von Tumorzellen aus Blut- und Knochenmarkproben hat sich unter anderem die Dichtekissenzentrifugation mit Ficoll als Methode etabliert. Hierbei wird die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zelltypen ausgenutzt und so die selektive Isolierung der mononukleären Zellfraktion, in der sich auch die Tumorzellen befinden, ermöglicht (Balic et al. 2010). Diese Methode wurde auch für diese Arbeit verwendet und wird in Kapitel 2.2.2 genauer erläutert. Eine andere Methode stellt die immunomagnetische Zellanreicherung dar. Hierbei erfolgt die Selektion der Tumorzellen durch gegen spezifische Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper, die an magnetische Partikel gebunden sind. Es kann eine positive oder negative Selektion erfolgen. Für die positive Selektion werden Antikörper eingesetzt, die gegen Antigene epithelialer Zellen gerichtet sind, wie zum Beispiel der Antikörper Ber-EP4, der gegen das

EpCAM Antigen gerichtet ist. Hierdurch erfolgt eine direkte Anreicherung der epithelialen Tumorzellen. Die Antikörper für die negative Selektion sind gegen Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen gerichtet, wie CD45 oder Glycophorin. Hierdurch wird eine Abreicherung der Lymphozyten- bzw. der Erythrozytenfraktion erreicht. Mit Hilfe eines Magneten können die Zellen dann separiert werden (Balic et al. 2010).

Nach der Anreicherung der DTC und CTC erfolgt deren Detektion. Dies kann über den Nachweis tumorspezifischer (z. B. p53-Mutationen), tumorassoziierter (z. B. CEA) oder gewebsspezifischer (z. B. CK 20) Marker erfolgen. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der DTC und CTC über den Nachweis gewebsspezifischer Marker. Grundsätzlich haben sich zum Nachweis von DTC und CTC zwei Methoden bewährt: die immunzytochemische Färbung und die Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch diese sensitiven Verfahren ist es möglich, eine DTC oder CTC unter 10^6 bis 10^7 nicht neoplastischen Knochenmarks- oder Blutzellen zu identifizieren (Pantel et al. 2008).

Für das immunzytochemische Verfahren wurden in dieser Arbeit Antikörper eingesetzt, die gegen epithelspezifische Antigene gerichtet sind. Hierbei wird die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, zwischen epithelialen Tumorzellen und hämatopoetischen und stromalen Zellen von Knochenmark, Blut und Lymphknoten zu unterscheiden. Sie reagieren mit normalen und entarteten epithelialen Zellen und sind somit nicht tumorspezifisch. Trotzdem sind sie sehr nützlich, da sie eine fremde Zellpopulation von epithelialen Zellen in Kompartimenten (Blut, Knochenmark, Lymphknoten) nachweisen, in denen unter normalen Umständen keine epithelialen Zellen vorkommen. Die Antikörper sind dabei entweder gegen Oberflächen- oder Zellstrukturantigene epithelialer Zellen gerichtet (Balic et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden der gegen die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19 gerichtete Panzytokeratinantikörper A45-B/B3 und der gegen das Zelloberflächenglykoprotein EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) gerichtete Antikörper Ber-EP4 für die Detektion der DTC und CTC genutzt. Zytokeratine stellen einen Standardmarker für den Nachweis von DTC und CTC bei epithelialen Tumoren dar (Pantel et al. 2008). Sie bilden als größte Familie der Intermediärfilamente wichtige Teile des Zytoskeletts von epithelialen Zellen. Es sind mehr als 30 unterschiedliche Zytokeratine bekannt, die in unterschiedlichen Anteilen und verschiedener Expressionsstärke in allen epithelialen Tumoren vorkommen. Für die Detektion von DTC und CTC werden meist mehrere Antikörper benutzt,

die gegen verschiedene Zytokeratin-Antigene gerichtet sind oder ein Panzytokeratin-Antikörper (z. B. A45/B-B3), der ein Epitop erkennt, welches bei mehreren Zytokeratinen vorkommt (Pantel und Brakenhoff 2004). A45/B-B3 ist ein hochspezifischer Antikörper für den Nachweis von DTC und CTC in Knochenmark, Blut und Lymphknoten, der in vielen klinischen Studien erprobt wurde (Braun et al. 2000, Leinung et al. 2000, Klein et al. 2002). Antikörper, die gegen Oberflächenantigene gerichtet sind, (z. B. Ber-EP4) werden neben der Tumorzellanreicherung ebenfalls für den Nachweis von CTC und DTC herangezogen. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper Ber-EP4 ist gegen das Zelloberflächenglykoprotein EpCAM gerichtet. EpCAM ist ein epithelspezifisches Antigen, welches in Epithelzellen weit verbreitet ist und ein in hohem Maße konservierte Expression in Karzinomen zeigt (Lacza et al. 1990, Momburg et al. 1987). EpCAM ist ein hoch spezifischer Marker für den Nachweis von DTC und CTC in Blut, Knochenmark und Lymphknoten (Macadam et al. 2003, Klein et al. 2002, Izbicki et al. 1997).

Die Sichtbarmachung der Antigen-positiven Zellen erfolgt entweder durch indirekte Immunfluoreszenz-Methoden oder durch Immuno-Peroxidase- oder Immuno-Alkalische Phosphatase-Systeme mit anschließender Lichtmikroskopie (Balic et al. 2010). Für diese Arbeit wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) verwendet, die in Kapitel 2.4.2 näher erläutert wird. Die mikroskopische Auswertung kann manuell oder mit automatischen Systemen (z. B. ACIS= Automated Cellular Imaging System) erfolgen. In einer Studie von Bauer et al. hat sich gezeigt, dass die durch ACIS unterstützte Analyse eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit für die Detektion von DTC im Knochenmark hat und sogar genauere Ergebnisse liefert als die manuelle Mikroskopie (Bauer et al. 2000). In dieser Arbeit wurde eine ACIS-unterstützte Auswertung durchgeführt, die in Kapitel 2.4.3 näher erläutert wird.

Neben dem immunzytochemischen Nachweisverfahren wird auch die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Detektion von DTC und CTC eingesetzt. Hierbei muss prinzipiell unterschieden werden zwischen einem Nachweis auf DNA-Ebene und RNA-Ebene. Auf DNA-Ebene können genetische und epigenetische Alterationen mit spezifischer Assoziation zu Krebszellen nachgewiesen werden. Hierbei hat sich zum Beispiel der Nachweis tumorassoziierter Punktmutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen (z. B. p53, K-Ras) für die Detektion von Tumorzellen bewährt. Auf RNA-Ebene erfolgt ein Nachweis tumorassoziierter (z. B. CEA) oder gewebspe-

zifischer (z. B. CK 20) Marker (Balic et al. 2010). Die meistgenutzte molekularbiologische Methode zur Detektion von epithelialen Tumorzellen in Knochenmark, Lymphknoten und Blut beruht auf RNA-Ebene und ist ein Nachweis gewebsspezifischer Marker durch die reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) (Balic et al. 2010). Diese Nachweismethode wurde auch in dieser Arbeit benutzt. Als Marker wurde Zytokeratin 20 (CK 20) ausgewählt. CK 20 gehört, wie bereits zuvor beschrieben, zur größten Familie der Intermediärfilamente, die wichtige Teile des Zytoskeletts von epithelialen Zellen bilden. Von Moll et al. konnte gezeigt werden, dass die CK 20 mRNA Expression fast ausschließlich beschränkt ist auf das Epithel des Magen-Darm-Trakts, das Urothel, Merkel Zellen und alle Tumoren, die von diesen Geweben abstammen (Moll et al. 1992). CK 20 mRNA ist ein häufig genutzter diagnostischer und prognostischer Marker beim kolorektalen Karzinom und gilt als hoch sensitiv (Tsouma et al. 2008).

Der Nachweis der DTC und CTC erfolgte in dieser Arbeit durch eine CK 20 nested RT-PCR (Soeth et al. 1996). Diese Methode wurde von Soeth et al. etabliert und wird in Kapitel 2.3.3 näher erläutert.

1.2.5. Tumorzell disseminierung beim kolorektalen Karzinom

Seitdem die Tumorzell disseminierung mit dem Auftreten von Metastasen in Zusammenhang gebracht worden ist, ist unter anderem beim kolorektalen Karzinom durch diverse Studien mit unterschiedlichen Techniken versucht worden, diese einzelnen Tumorzellen zu detektieren, charakterisieren und ihre klinische Bedeutung zu hinterfragen. Dies hat zu einer Flut von heterogenen Ergebnissen geführt (Steinert et al. 2012, Guo et al. 2005, Soeth et al. 1997, Leinung et al. 2000, Flatmark et al. 2011).

Ein Standardmarker für den Nachweis von DTC und CTC bei epithelialen Tumoren sind Zytokeratine (Pantel et al. 2008), wobei CK 19 und CK 20 die meistgenutzten Zytokeratine für den Nachweis von DTC und CTC beim kolorektalen Karzinom darstellen. Abgesehen von Zytokeratinen wurden viele weitere Marker für den Nachweis von DTC und CTC beim kolorektalen Karzinom untersucht. Die neben CK 20 meist verwendeten RNA-Marker sind CEA (carcinoembryonales Antigen), EGFR (epidermal growth factor receptor) und hTERT (humane telomerase reverse Transkriptase) (Khair et al. 2007). Für den immunzytochemischen Nachweis wurden neben Antikörpern gegen Zytokeratine unter anderem Antikörper gegen Zelloberflächenantigene (z. B. EpCAM) und gegen tumorassoziierte Antigene (z. B. CEA) verwendet. In vielen

Studien konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von DTC und CTC beim kolorektalen Karzinom eine prognostische Auswirkung hat (Guo et al. 2005, Soeth et al. 1997, Leinung et al. 2000, Flatmark et al. 2011). Wie zuvor erwähnt, muss es nun das Ziel der Forschung sein, methodische Standards zu entwickeln, um dann gezielte prospektive multiinstitutionale Studien mit großen Patientengruppen durchzuführen und so die Bedeutung der DTC und CTC als prognostischen Marker für die klinische Routine zu bestätigen (Steinert et al. 2012).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgt ein Nachweis disseminierter (DTC) und zirkulierender (CTC) Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom parallel mit zwei etablierten Nachweisverfahren. Zum einen erfolgt ein immunzytochemischer Nachweis im Knochenmark unter Verwendung des Panzytokeratin Antikörpers A-45B/B3 und/oder unter Verwendung des Antikörpers Ber-EP4. A-45B/B3 bindet an epitheliale Zellen, wie disseminierte kolorektale Tumorzellen, nicht jedoch an mesenchymale Zellen des Knochenmarks und Ber-EP4 reagiert mit dem epithelspezifischen Zelloberflächenglykoprotein EpCAM. Darüberhinaus wird aus demselben Analysematerial sowie aus peripherem Blut ein molekularbiologischer Nachweis epithelialer Zellen durch Zytokeratin 20 RT-PCR in cDNA Präparationen durchgeführt. Ziel ist es, die prognostische Relevanz hinsichtlich der Überlebenszeit und des rezidivfreien Überlebens zu ermitteln und einen Ergebnisvergleich zwischen den beiden Nachweiverfahren durchzuführen. Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Gibt es einen Unterschied in Sensitivität, Spezifität und prognostischer Relevanz in Bezug auf die Überlebenszeit zwischen dem molekularbiologischen und immunzytochemischen Nachweisverfahren?
2. Gibt es einen Unterschied zwischen Blut und Knochenmark hinsichtlich der prognostischen Relevanz in Bezug auf die Überlebenszeit beim Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR?
3. Ist die prognostische Relevanz des Nachweises von disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit Kolon/Sigma-Karzinom unterschiedlich zu der bei Patienten mit Rektum-Karzinom?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Das untersuchte Kollektiv umfasst insgesamt 268 Patienten, die in dem Zeitraum vom 14.09.1993 bis zum 20.10.2005 in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel aufgrund eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. Die Nachbeobachtungszeit endete am 07.08.2008.

Zu den Einschlusskriterien, um in die Studie aufgenommen zu werden, gehörte, dass ausreichend Knochenmark- bzw Blutmaterial asserviert werden konnte, um eine CK 20 PCR in Blut und/oder Knochenmark und/oder eine immunzytochemische Untersuchung im Knochenmark durchzuführen. Außerdem wurden nur Patienten mit Primäroperation aufgrund des kolorektalen Karzinoms eingeschlossen, und es musste ein Zugriff zu den klinischen Daten für das follow up gewährleistet sein.

Ausschlusskriterium war eine postoperative Letalität innerhalb der ersten 28 Tage. Desweiteren wurden Patienten mit Rezidiv-Operation ausgeschlossen.

Eine Übersicht der klinischen Daten des Patientenkollektivs ist im Ergebnisteil unter Kapitel 3.1.1 aufgeführt.

2.2. Probenentnahme und Aufarbeitung

2.2.1. Gewinnung der Blutproben und Knochenmarkaspirate

Die in dieser Dissertation untersuchten Blut- und Knochenmarkproben wurden im Rahmen der Biomaterialbank-Routine der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie und der Sektion für Molekulare Onkologie des UKSH, Campus Kiel asserviert. Die Materialsammlung und anschließende Studie war durch ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt worden (Az.: 110/99). Die teilnehmenden Patienten wurden vor der Probennahme über die Studie aufgeklärt und erteilten schriftlich ihr Einverständnis mit Probennahme und Studie. Blutentnahme und Knochenmarkaspiration erfolgten präoperativ nach Einleitung der Narkose. Das Blut (20ml) wurde aus einem zentralen Venenkatheter entnommen. Um bei der Knochenmarkspunktion eine Kontamination der Probe mit kutanen Merkel-Zellen zu

vermeiden, die CK 20 exprimieren (Moll et al. 1992), wurde zuerst eine kleine Hautinzision über der Spina iliaca anterior gesetzt. Dann wurden 10ml Knochenmark mit einer Knochenmark Aspirationsnadel (Jamshidi®) aus dem Beckenkamm entnommen. Sowohl die Blut- als auch die Knochenmarkproben wurden in Lithium-Heparin Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) asserviert.

2.2.2. Bearbeitung der Blut- und Knochenmarkproben

Verwendete Reagenzien

- Ficoll-Paque-Plus
GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium
Life Technologies, Darmstadt, Katalog-Nr.: 52400-025
- DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
Life Technologies, Darmstadt, Katalog-Nr.: 14190-094
- Trypan-Blau 0,4%
Life Technologies, Darmstadt, Katalog-Nr.: 15250-061

Die Auftrennung der Bestandteile der Aspiarte erfolgte durch eine Dichtekissenzentrifugation mit Ficoll. Die Dichtekissenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, welches die unterschiedliche Dichte von Zellen ausnutzt. Ficoll weist mit einer relativen Dichte von 1.077 g/ml eine höhere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten auf. Somit ermöglicht diese Methode die selektive Isolierung der Fraktion mononukleärer Zellen.

Die Dichtekissenzentrifugation wurde mit Ficoll-Paque-Plus nach der Arbeitsanleitung des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die mit Lithium-Heparin als Antikoagulanzen versetzten Blutproben bzw. Knochenmarkproben mit dem Zellkulturmedium RPMI-1640 1:3 in einem sterilen 50ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. In einem zweiten Schritt wurde die verdünnte Blut- bzw. Knochenmarkprobe vorsichtig über 15 ml Ficoll-Paque Plus Lösung geschichtet, so dass sich die zwei Flüssigkeiten nicht vermischten (siehe Abbildung 2). Anschließend wurde 40 Minuten lang mit reduzierter Anlaufbeschleunigung und ohne Bremse bei 400 x g zentrifugiert. So entstanden folgende Phasen: Die unterste Schicht enthielt die Erythrozyten und Granulozyten, welche eine höhere Dichte aufweisen als das Ficoll und somit komplett durch das Ficoll-Paque Plus sedimentieren. Direkt darüber befand sich die Ficoll-Paque

Plus Schicht. Aufgrund ihrer geringeren Dichte verblieben die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Tumorzellen) über der Ficoll-Paque Plus Schicht in der sogenannten Interphase. In der obersten Schicht befand sich das Blutplasma (siehe Abbildung 2).

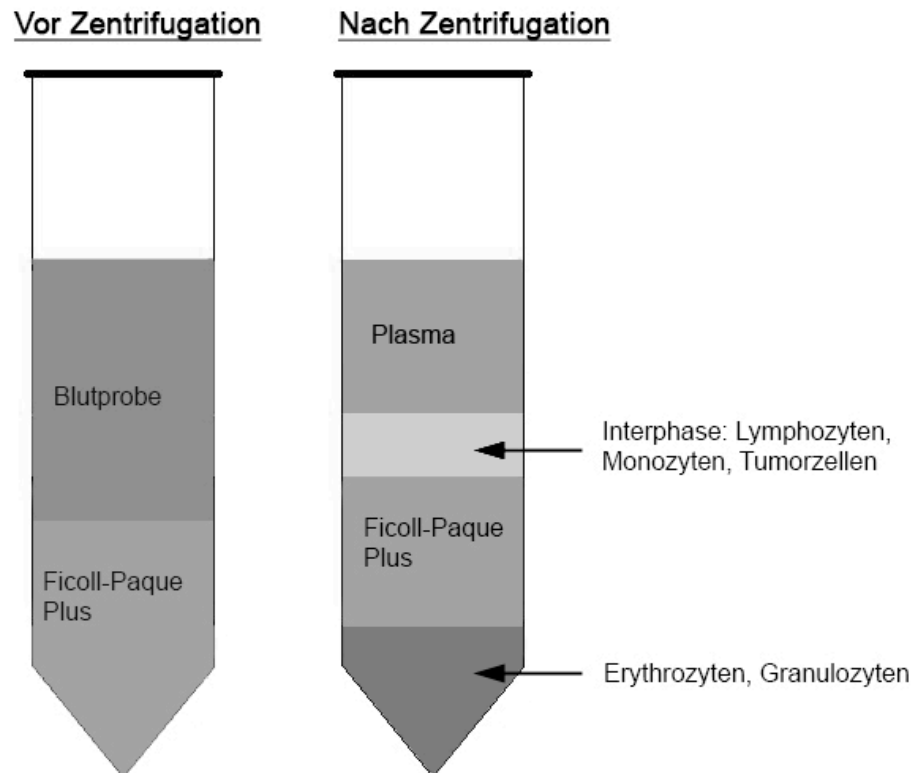


Abbildung 2: Dichtekissenzentrifugation mit Ficoll Blutprobe vor und nach Zentrifugation.

Nach der Zentrifugation wurde auf Eis weitergearbeitet, um einer Degradation von RNA und Proteinen der Zellen vorzubeugen. Die Interphase wurde dann vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abpipettiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die isolierten Zellen wurden anschließend 1:2 mit kalter, Phosphat gepufferter, Salzlösung (DPBS) verdünnt und 30 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Nach diesem Waschen wurden die Zellen in kaltem RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl Zellen mit 90 µl 0,4% Trypan-Blau vermischt und anschließend auf eine vorbereitete Neubauer-Kammer aufgetragen. Gezählt wurden jeweils die vier großen Eckquadrate.

Für die weitere Analyse wurden die Knochenmark- und Blut-Isolate aufgeteilt. Die gesamte Blut-Zellsuspension und die Hälfte der Knochenmark-Zellsuspension wurde für die RNA-Isolierung aufbereitet, wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben.

Mit der anderen Hälfte der Knochenmark-Zellsuspension wurden Zytospinpräparate angefertigt. Hierfür wurden die aus den Knochenmarkaspiraten isolierten mononukleären Zellen mit Hilfe einer Zytocentrifuge (Hettich, Tuttlingen) auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit einer Zytokammer sowie einer Filterkarte bestückt und pro Objektträger wurde ein Feld mit jeweils etwa 500.000 (5×10^5) Zellen beladen. Die Zellsedimentation erfolgte bei 340 x g für drei Minuten. Danach wurden die Zytokammern entfernt und die Zellen nur mit Filterkarten bei 1380 x g für eine Minute vorgetrocknet. Pro Patient wurden vier bis acht Zytospinpräparate angefertigt. Die fertigen Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend mit einem Vakuumschweißgerät (C 100, Multivac) in Plastikfolien eingeschweißt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

2.3. Molekularbiologische Nachweismethode zur Detektion von DTC und CTC in Blut und Knochenmark

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten. Dies erfolgt mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die die Fähigkeit hat, DNA ausgehend von einem Primer identisch zu kopieren. Die PCR erfolgt in drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden und in genau definierten Zeitintervallen bei genau definierter Temperaturen im Thermocycler ablaufen. Eine PCR läuft üblicherweise über 25-30 Zyklen. Ein Zyklus umfasst folgende drei Schritte:

- 1) Denaturierung: Trennung der beiden DNA-Stränge in Einzelstränge durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen durch Erhitzen.
- 2) Primer-Hybridisierung (Annealing): Bindung der Primer an die DNA.
- 3) Elongation: Synthetisierung der komplementären Stränge ausgehend von den Primern durch die DNA-Polymerase.

Zur Durchführung der PCR benötigt man eine doppelsträngige DNA-Matrize (Template), zwei Primer, die den jeweiligen Startpunkt der Amplifikation auf den beiden DNA-Einzelsträngen festlegen, eine temperaturstabile DNA-Polymerase, die vier Desoxynucleosid-Triphosphate, damit eine Polymerisation von Nukleotiden erfolgen kann, Magnesiumionen und eine Pufferlösung für die Funktion der DNA-Polymerase. Die reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) dient zum Nachweis von messenger RNA (mRNA). Sie wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wird die RNA durch reverse Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Im zweiten Schritt schließt sich die PCR an, wie oben beschrieben.

Bei der nested PCR (verschachtelte PCR) wird zuerst eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt und dann werden in einem zweiten Ansatz zwei weitere Primer eingesetzt, die weiter innen liegen als die zuvor verwendeten Primer, so dass in diesem 2. Schritt spezifische DNA-Abschnitte der Amplikons aus dem ersten Ansatz amplifiziert werden. Durch die nested PCR kann die Spezifität und die Sensitivität der PCR weiter erhöht werden, da weniger Nebenprodukte entstehen und die spezifische Amplifikation drastisch verstärkt wird (Soeth et al. 1996).

Für diese Arbeit wurde eine derartige nested RT-PCR zur Untersuchung der CK 20 mRNA Expression verwendet. Die genaue Beschreibung der RNA-Isolierung und der Durchführung der nested CK 20 RT-PCR erfolgt in den nächsten Abschnitten.

2.3.1. RNA-Isolierung

Verwendete Reagenzien

- PeqGOLD RNAPure™
Peqlab Biotechnologie, Erlangen
- Chloroform
Merck, Darmstadt
- 2-Propanol
Merck, Darmstadt
- Ethanol 100 % (Verdünnung 1:4 mit H₂O dest.)
Merck, Darmstadt

Die Isolierung der Gesamt- RNA aus der mononukleären Zellfraktion aus Knochenmark und venösem Blut basierte auf der Guanidinisothiocyanat/ Phenol/Chloroform singel-step Methode (Chomczynski und Sacchi 1987). Hierbei wurde als gebrauchsfertiges Reagenz das peqGOLD RNAPure™ der Firma Peqlab (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) verwendet.

Das Verfahren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und besteht aus fünf Schritten:

1. Homogenisieren

Die Zellsuspensionen wurden in 2 ml Eppendorf-Zentrifugen-Röhrchen aliquotiert (höchstens 1×10^7 Zellen/Röhrchen) und bei $950 \times g$ für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml peqGOLD RNAPure™ homogenisiert.

2. Phasentrennung

Je eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™ wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben für 15 Sekunden kräftig gevortext. Nach 3-10 Minuten Wartezeit wurden die Proben für 5 Minuten bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Hierbei trennten sie sich in drei Phasen auf: Eine untere organische Phase, die Phenol und Chloroform enthielt, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist dabei in der wässrigen Phase angereichert.

3. RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, ohne Spuren der Interphase dabei mitzupipettieren und es erfolgte die Präzipitation der RNA mit 0,5 ml 2-Propanol pro eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™. Die Proben wurden für 5-15 Minuten stehen gelassen und anschließend für 10 Minuten bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert.

4. Waschen der RNA

Der 2-Propanolüberstand wurde vorsichtig abpipetiert und das Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen.

5. Lösen der RNA

Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft trocknen gelassen und dann die RNA durch mehrmaliges Auf-und Abziehen mit der Pipette in RNase freiem Wasser gelöst.

Die Proben wurden bei -80°C gelagert, bis zur weiteren Bearbeitung. Die Probenasservierung und PCR-basierte Analytik erfolgte durch Mitarbeiter des Labors der Sektion für Molekulare Onkologie des UKSH, Campus Kiel.

2.3.2. cDNA Synthese

Um die PCR durchführen zu können, erfolgte zunächst eine cDNA-Synthese aus der isolierten Gesamt-RNA. Hierbei wurden in einem ersten Schritt 2 µg der isolierten RNA von jeder Probe bei 70°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die Synthetisierung der cDNA durch die Reverse Transkriptase wurde pro Probe ein Reaktionsansatz (20 µl) mit unten genannten Bestandteilen pipettiert.

cDNA Reaktionsansatz¹

- 2,0 µg denaturierte RNA (je nach Ansatz gelöst in ca.10 µl H₂O)
- 4,0 µl Erst-Strang Puffer
- 0,4 µl Dithiothreitol 0,1 M (DTT)
- 1,0 µl RNase Inhibitor
- 1,0 µl 50 µM Random Hexamer
- 1,0 µl 10 µM Deoxynukleotid Triphosphat (dNTP) Mix
- 1,0 µl SuperScript II (Reverse Transkriptase)
- ad 20µl H₂O ad inject. (Braun, Melsungen)

¹ Alle Reagenzien, soweit nicht anders angegeben, stammten von Life Technologies, Darmstadt.

Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne reverse Transkriptase pipettiert. Hierfür wurde anstatt von SuperScript II 1µl Wasser zum oben genannten Ansatz dazugegeben.

In einem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen) erfolgte dann die Umschreibung der denaturierten RNA in cDNA in folgenden drei Schritten:

1. **Hybridisierung der Random Hexanukleotide** durch Inkubation für 10 Minuten bei 24°C
2. **Synthese der cDNA** durch Inkubation für 60 Minuten bei 42°C
3. **Inaktivierung der reversen Transkriptase** durch Inkubation für 5 Minuten bei 95°C

2.3.3. CK 20 Nested RT-PCR

In dieser Arbeit wurde die von Soeth et al. entwickelte Zytokeratin 20 nested RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen gastrointestinaler Karzinome verwendet (Soeth et al. 1996). Die Methode wird im Folgenden erläutert.

Die nested RT-PCR zum Nachweis der CK 20 mRNA beinhaltet zwei nacheinander laufende PCR Ansätze. Im ersten Ansatz (externe PCR) wird ein CK 20 Primerpaar eingesetzt, welches ein langes Amplifikationsprodukt bildet (788 Basenpaare). Im zweiten Ansatz wird dann ein neues Primerpaar benutzt (interne PCR), welches spezifisch an Sequenzbereiche innerhalb des größeren CK 20 Amplikons binden kann und somit kleinere Amplifikationsprodukte (485 Basenpaare) liefert.

Als Referenz, um Variablen, welche die RT-PCR beeinflussen, zu kontrollieren, wurde zusätzlich eine PCR für Porphobilinogen Deaminase (PBGD) durchgeführt. PBGD ist ein sogenanntes „housekeeping“ Gen. „Housekeeping“ Gene kodieren für Proteine, deren Aktivität zur Erhaltung allgemeiner Zellfunktionen lebensnotwendig ist und kommen somit normalerweise in jeder Zelle und in konstanten Konzentrationen vor. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Primer für die CK 20 nested RT-PCR und PBGD-PCR

Primer	Sequenzen der sense und antisense Primer	Länge des Amplikons [Bp]
CKS222 CKAS988	5'-GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG-3' 5'-AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC-3'	788
CKS304 CKAS767	5'-CGGCGGGGACCTGTTTGT-3' 5'-CAGTGTTGCCAGATGCTTGTG-3'	485
PBGD sense PBGD antisense	5'-CTTCACCATCGGAGCCATCTGC-3' 5'-CGAAGCCGGGTGTTGAGGTTT-3'	204

Für die externe CK 20 RT-PCR wurde folgender Reaktionsansatz (50µl) pipettiert:

Reaktionsansatz für die externe PCR¹

- 2,0 µg cDNA-Lösung (in 20µl Lösung)
- 3,2 µl 10 x Tricine Puffer (Zusammensetzung siehe unten)
- 1,0µl 10 µM Deoxynukleotid Triphosphat (dNTP) Mix
- 1,0 µl 20 µM CK 20-A sense Primer und CK 20-B antisense Primer (MWG-Biotech, Ebersberg)
- 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase
- ad 50 µl H₂O ad inject. (Braun, Melsungen)

¹ Alle Reagenzien - soweit nicht anders angegeben - stammten von Life Technologies, Darmstadt.

Der Reaktionsansatz für die interne CK 20 RT-PCR (50µl) beinhaltete:

Reaktionsansatz für die interne PCR¹

- 1,0 µl des Reaktionsansatzes der externen PCR
- 4,9 µl 10 x Tricine Puffer (Zusammensetzung siehe unten)
- 1,0 µl 10 µM Deoxynukleotid Triphosphat (dNTP) Mix
- 1,0 µl je 20µM CK 20-C sense Primer und CK 20-D antisense Primer (MWG-Biotech, Ebersberg)
- 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase
- ad 50 µl H₂O ad inject. (Braun, Melsungen)

¹ Alle Reagenzien - soweit nicht anders angegeben - stammten von Life Technologies, Darmstadt.

Der Tricine Puffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 x Tricine Puffer (Ponce und Micol 1992)¹

- 300 mM Tricine pH 8,4
- 20 mM MgCl₂
- 50mM 2-Mercaptoethanol
- 0,1% Gelatine
- 1,0% Thesit

¹ Alle Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich, Taufenkirchen.

Die externe und interne CK 20 RT-PCR wurde nach der Touch-Down Methode durchgeführt. Für die Touch-Down PCR wurde die Annealing-Temperatur zunächst

so gewählt, dass sie deutlich über der optimalen Annealing-Temperatur lag. In den ersten neun Zyklen wurde sie jeweils pro Zyklus um 1°C gesenkt. Ab dem 10. Zyklus wurde die Annealing Temperatur dann für die folgenden 21 Zyklen konstant bei 61°C gehalten. Durch dieses Vorgehen wurde eine spezifischere Primerbindung erreicht und damit auch ein spezifischeres Amplikon gebildet und so eine übermäßige Vervielfältigung unspezifischer Sequenzen verhindert. Das Protokoll der Touch-Down PCR ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Protokoll der Touch-Down nested CK 20 RT-PCR nach Soeth et al. 1996 und 1997

Zyklus	Denaturierung Zeit [s] / Temperatur [°C]	Annealing ¹ Zeit [min, s] / Temperatur [°C]	Elongation Zeit [min, s] / Temperatur [°C]
1	40 s / 94°C	2 min / 70°C	
2	40 s / 94°C	1 min 55 s / 69°C	
3	40 s / 94°C	1 min 50 s / 68°C (66°C)	
4	40 s / 94°C	1 min 45 s / 67°C (65°C)	
5	40 s / 94°C	1 min 40 s / 66°C (64°C)	
6	40 s / 94°C	1 min 35 s / 65°C (63°C)	
7	40 s / 94°C	1 min 30 s / 64°C (62°C)	
8	40 s / 94°C	1 min 25 s / 63°C (61°C)	
9	40 s / 94°C	1 min 20 s / 62°C (60°C)	
10-30	40 s / 94°C	1 min / 61°C (59°C)	1 min 30 s / 72°C

¹Die Temperaturen in Klammern entsprechen den Temperaturen bei der PBGD-PCR.

In einem letzten Schritt wurde für 15 Minuten bei 72°C elongiert und anschließend auf 4°C abgekühlt.

Das Protokoll für die PBGD-PCR erfolgte nach dem gleichen Schema. Nur die Annealing-Temperaturen wurden niedriger gewählt (siehe Tabelle 3).

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen). Pro Knochenmark-/ beziehungsweise Blutprobe wurden mindestens zwei PCR-Durchläufe durchgeführt. Kam es in den beiden Durchläufen zu widersprüchlichen Ergebnissen, erfolgte ein

weiterer PCR-Durchlauf. Anhand des Ergebnisses des dritten Durchlaufs wurde dann über das Endergebnis der Probe entschieden.

2.3.4. Agarosegelelektrophorese

Verwendete Reagenzien

- Agarose 2%ig MetaPhor
Biozym, Hessisch Oldendorf
- TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer (50-fache Lösung):
242 g Tris Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromidlösung in Wasser [10mg/ml]
Merck, Darmstadt
- 10x BlueJuice™ Gel Loading Buffer
Life Technologies, Darmstadt

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode. Das Agarosegel fungiert dabei wie ein Sieb für die Moleküle. DNA-Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht wandern schneller als solche mit höherem Molekulargewicht. Somit erfolgt eine Auftrennung der DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe.

Für die Herstellung des Agarosegels für die Elektrophorese wurden zunächst zwei Gramm Agarose in 100 ml 1-fach verdünntem TAE-Puffer unter Kochen gelöst und dann auf 50 °C abgekühlt. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromidlösung in Wasser verwendet. Pro 100ml Agaroselösung wurde 5 µl Ethidiumbromidlösung hinzugemischt. Danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen und ein Plexiglasprobenkamm zur Formung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entnommen. In die so entstandenen Taschen konnten die einzelnen Proben aufgetragen werden. Hierfür wurden zunächst 10 µl der PCR-Probe mit 2 µl Ladepuffer vermischt und danach in die Auftragstaschen pipettiert.

Die Elektrophorese wurde in der Elektrophoresekammer für 1,5 Stunden bei 90 Volt konstanter Spannung durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht und photodokumentiert. Als Größenstandard diente der DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.4. Immunzytochemische Methode zur Detektion von DTC im Knochenmark

2.4.1. Antikörper

Zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurden in dieser Arbeit die Antikörper A-45B/B3 und Ber-EP4 verwendet. A-45B/B3 ist ein Panzytokeratinantikörper, der gegen die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19 gerichtet ist. Der Antikörper Ber-EP4 reagiert mit dem Zelloberflächenglykoprotein EpCAM. In Tabelle 4 ist der den Antikörper sezernierende Klon, die Antigene, der jeweilige Isotyp mit Spezies, die Bezugsquelle, die Referenzen und die verwendete Verdünnung für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Antikörper angegeben.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete spezifische monoklonale Antikörper zur Detektion disseminierter Tumorzellen

Klon	Antikörper für Antigen / Spezies	Isotyp / Spezies	Quelle	Referenzen	Verwendete Verdünnung
A45-B/B3	Panzytokeratin (CK 8, CK 18, CK 19) / human	IgG1 / Maus	AS Diagnostik, Hueckeswagen	Kasper et al. (1987)	1:200
Ber-EP4	EpCAM / human	IgG1, κ / Maus	Dako, Hamburg	Latza et al. (1990)	1:200

2.4.2. Immunzytochemischer Antigennachweis mittels APAAP– Methode

Verwendete Reagenzien

- Aceton
Merck, Darmstadt
- Dako REAL™ Detection System, APAAP, Mouse, Code K5000:
 - Dako Wash Buffer 10x, Code S3006
 - Dako REAL™ Link, Secondary Antibody (Kaninchen anti-Maus Immunglobulin; „Brückenantikörper“), gebrauchsfertige Verdünnung
 - Dako REAL™ APAAP Immunocomplex
 - Substratsystem: Dako REAL™ Chromogen Red 1, Dako REAL™ Chromogen Red 2, Dako REAL™ Chromogen Red 3, Dako REAL™ AP Substrate Buffer
 - Dako REAL™ Hematoxylin, Code S2020
Dako, Hamburg
- Primärantikörper (A45-B/B3, Ber-EP4): siehe Kapitel 2.4.1

Die eingefrorenen Zytospinpräparate wurden vor der weiteren Bearbeitung auf Raumtemperatur erwärmt, anschließend wurden sie für fünf Minuten in 100% Aceton fixiert und danach für zehn Minuten luftgetrocknet. Die anschließende immunzytochemische Färbung wurde mittels der APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) -Methode mit einem Dako Immunfärbeautomaten (Auto-stainer; Dako, Hamburg) angefertigt. Die APAAP-Methode ist eine sogenannte immunzytologische Sandwichtechnik. Sie ermöglicht den indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. Bei der APAAP-Methode werden lösliche Enzym-Immunkomplexe (APAAP-Komplexe) zwecks Signalverstärkung und Erhöhung der Sensitivität eingesetzt. Die APAAP-Komplexe bestehen aus intestinaler Alkalischer Phosphatase aus fötalem Kalbsdarm und Maus-Anti-alkalische-Phosphatase-Antikörpern, wobei je zwei Moleküle Enzym an einen Antikörper gebunden sind.

Der Nachweis erfolgt im 3-Schritt-Verfahren (siehe Abbildung 3):

1. Im ersten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem primären monoklonalen Mausantikörper, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist.

2. Im zweiten Schritt wird mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper reagiert mit allen Isotypen von Maus-Immunglobulinen und fungiert so als Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und dem APAAP-Komplex.
3. Im dritten Schritt wird dann der APAAP-Komplex zugegeben. Dieser bindet an den Brückenantikörper.

Nach der Bindung des letzten Komplexes wird das Substrat der alkalischen Phosphatase hinzugesetzt.

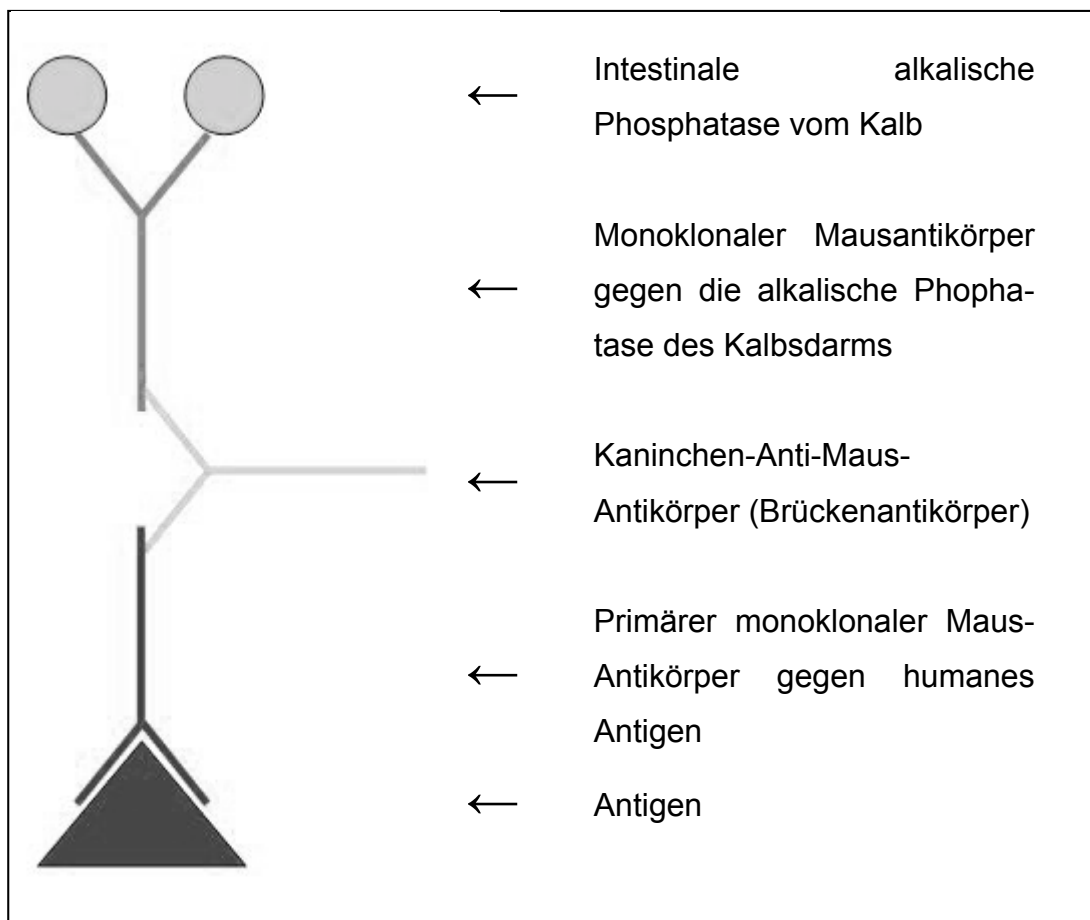


Abbildung 3: APAAP-Methode

In dieser Arbeit wurde das gebrauchsfertige Kit der Firma Dako (Dako REAL™ Detection System, APAAP, Mouse, Code K5000) verwendet, welches für immunzytochemische Verfahren mit dem Dako-Autostainer bestimmt ist. Hierbei wurden die oben genannten Reagenzien der Firma Dako genutzt (Zusammensetzung siehe Hersteller).

Als Primärantikörper wurden die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Antikörper A45-B/B3 und Ber-EP4 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Das genutzte Substratsystem besteht aus vier Komponenten: Chromogen Red1, Chromogen Red2, Chromogen Red3 und AP Substrate Buffer. Die Substratarbeitslösung wurde angesetzt, indem 750 µl AP Substrate Buffer mit 30 µl Chromogen Red 1, 30 µl Chromogen Red 2 und 30 µl Chromogen Red 3 in genau dieser Reihenfolge zugegeben wurden. Nach Zusatz jedes einzelnen Chromogens wurde gründlich gemischt. Das Substratchromogen wurde durch die alkalische Phosphatase zu einem kontrastreichen roten Endprodukt am Ort des Zielantigens umgesetzt. Für die Gegenfärbung wurde das gebrauchsfertige Reagenz der Firma Dako (Dako REAL™ Hematoxylin) verwendet, da es eine deutliche nukleäre Blaufärbung hervorruft.

Die immunzytochemische Färbung wurde nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur durchgeführt:

1. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
2. Inkubation mit dem Primärantikörper (A45-B/B3 oder Ber-EP4) für 45 Minuten
3. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
4. Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Dako REAL™ Link, Secondary Antibody) für 30 Minuten
5. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
6. Inkubation mit dem APAAP-Komplex (Dako REAL™ APAAP Immunocomplex) für 30 Minuten
7. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
8. Inkubation mit der Substrat-Arbeitslösung (bestehend aus Dako REAL™ Chromogen Red 1, Dako REAL™ Chromogen Red 2, Dako REAL™ Chromogen Red 3, Dako REAL™ AP Substrate Buffer) für 10 Minuten
9. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
10. Inkubation mit Hematoxylin (Dako REAL™ Hematoxylin, Code S2020) für 3 Minuten
11. Waschschrift (mit Dako Wash Buffer 1x, Code S3006)
12. Objektträger einmal kurz in Leitungswasser tauchen

Nach der Färbung wurden die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Als Negativkontrollen wurden statt des Primärantikörpers A45-B/B3 oder Ber-EP4 mit einem Kontroll-Antikörper desselben Isotyps als Primärantikörper gefärbt.

2.4.3. Mikroskopische Analyse mit dem ACIS (Automated Cellular Imaging System)

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem ACIS (Automated Cellular Imaging System; Chromavision medical systems). ACIS besteht aus zwei Hauptmontageteilen, zum einem aus einem Mikroskop mit 10x, 40x und 60x Objektiven und angeschlossenen Kreuztisch mit Schrittmotorsteuerung zur genauen 2-dimensionalen Positionierung der Objekte (X-, Y-Koordinaten) und zum anderen aus einem Computer mit Bilddigitalisierer und Bildverarbeitungssoftware (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Automated Cellular Imaging System (ACIS)

Das Gerät benutzt ein halbautomatisches Zuführungssystem, wobei jeder Träger mit vier Objektträgern beladen werden kann. 25 Träger können gleichzeitig eingelegt und nacheinander eingezogen und analysiert werden, so dass eine automatische Analyse durch das System alleine (z. B. über Nacht) möglich ist.

Durch eine schnelle und hochempfindliche Farbanalyse, zusammen mit einer Analyse morphologischer Kriterien gelingt es ACIS, die seltenen Zellen, die den Kriterien einer Tumorzelle entsprechen, zu finden („rare event Analyse“). Die Analyse erfolgt in zwei Schritten. Zunächst erfolgt ein sogenannter Raster-Scan. Hierbei wird ein vorher festgelegter Scanbereich, welcher den Zytospin einfasst (siehe Abbildung 5a), mit niedriger Vergrößerung (10x Objektiv) gescannt. Dies geschieht mit einer Ge-

schwindigkeit von circa 200ms pro Gesichtsfeld. Durch eine Analyse der Farben der potentiellen Zielzellen (rot gefärbtes Zytoplasma durch Zytokeratin-Reaktion, bläulicher Zellkern durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin) und morphologischer Kriterien (z. B. Größe der Zelle, Verhältnis Zytoplasma zu Zellkern) werden vermeintliche Tumorzellen detektiert (siehe Abbildung 5b). Die Koordinaten für die positiven Objekte werden gespeichert.

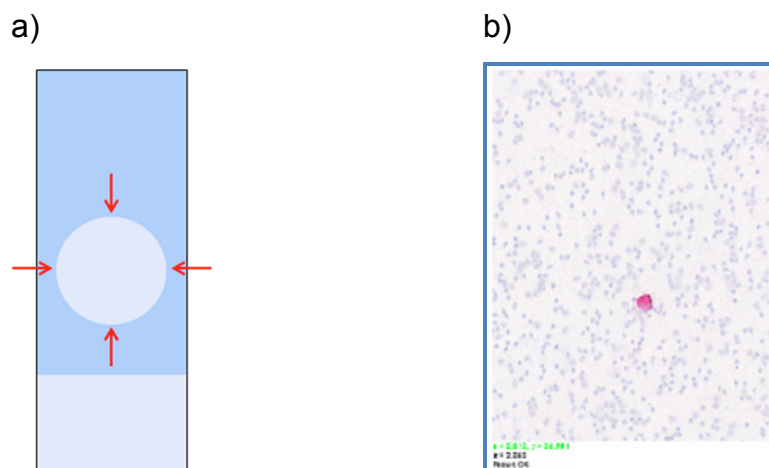


Abbildung 5: a) Festlegung des Scanbereiches b) Positive Zelle im Raster-scan

In einem zweiten Schritt werden die vermeintlich positiven Objekte erneut angesteuert für eine zweite Analyse in stärkerer Vergrößerung (40x Objektiv). Hierbei erfolgt eine genauere Bildanalyse der Farben und morphologischen Kriterien, um Zelldebris, Verklumpungen und Zellen, die morphologisch normalen mononukleären hämatopoetischen Zellen entsprechen, auszusortieren. Gleichzeitig werden die Koordinaten derjenigen Zellen, die den Farb- und morphologischen Kriterien einer Tumorzelle entsprechen, gesammelt und für eine erneute Durchsicht und Klassifikation präsentiert. Dies ist beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt. Die auf den beiden oberen Bildern dargestellten Zellaggregate wurden als epitheliale Tumorzellen im Knochenmark gewertet. Diese Zellen zeigen die typische rote Zytokeratinreaktion im Zytoplasma und weisen pathognomonische Zeichen epithelialer Tumorzellen auf, mit deutlich vergrößertem Zellkern und einer Clusterbildung. Alle anderen fraglichen Zellen wurden nicht als epitheliale Tumorzellen bewertet.

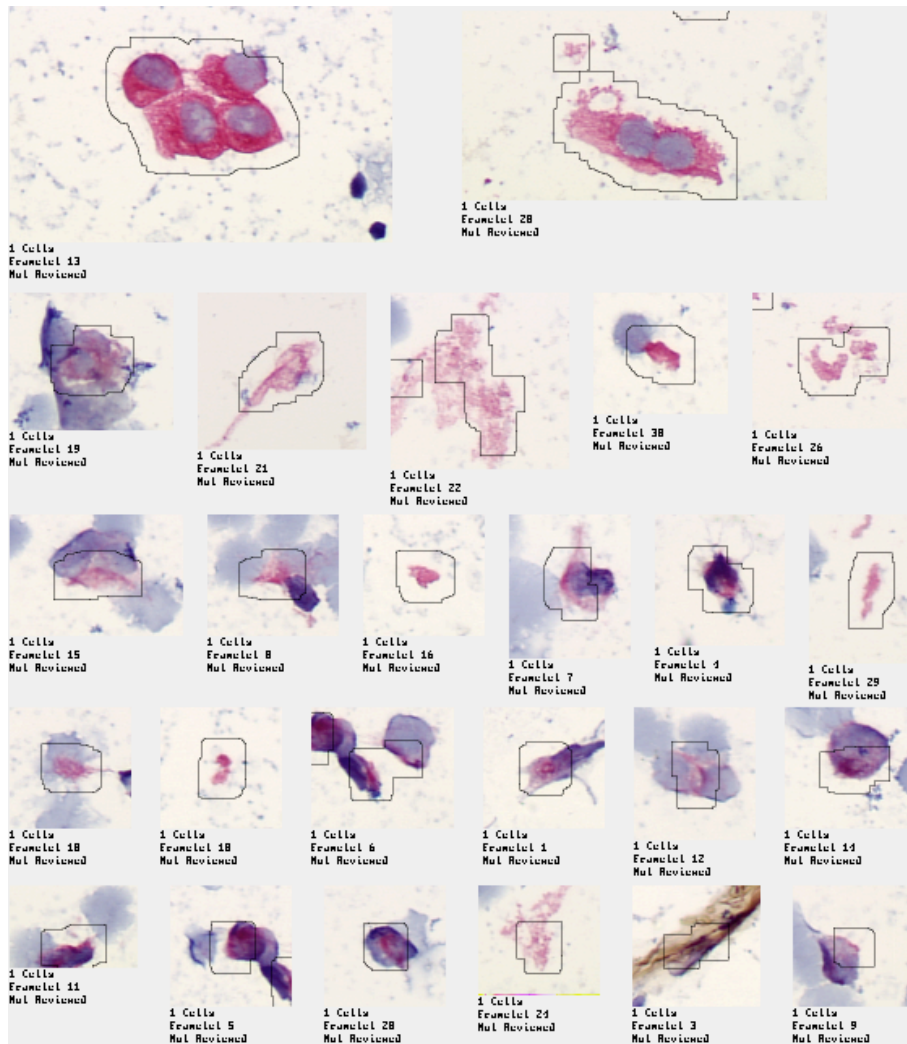


Abbildung 6: Detektion epithelialer Zellen im Knochenmark aufgrund ihrer Zytokeratinexpression (rote APAAP-Farbreaktion im Zytoplasma). Durch den Erkennungsalgorithmus werden die Zellen anhand der blauen Kernreaktion in Verbindung mit der positiven APAAP-Reaktion detektiert. Eine gewisse Unschärfe des Erkennungsalgorithmus zeigt sich darin, dass neben epithelialen Zellen (oberste Zeile) auch nicht zelluläre Strukturen erkannt werden.

Die X- und Y-Koordinaten der detektierten Zellen und Strukturen werden gespeichert, so dass es auch unter manueller Kontrolle des Mikroskops möglich ist, die Zellen erneut aufzusuchen, zu beurteilen und als Tumorzelle oder Nicht-Tumorzelle zu klassifizieren. In einer Studie von Bauer et al. hat sich gezeigt, dass die durch ACIS unterstützte Analyse eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit für die Detektion von DTC im Knochenmark hat und sogar genauere Ergebnisse liefert als die manuelle Mikroskopie (Bauer et al. 2000).

Für den immunzytochemischen Nachweis wurden zwei verschiedene primäre Antikörper eingesetzt. Der Panzytokeratinantikörper A45-B/B3 und der gegen das Zell-

oberflächenglykoprotein EpCam gerichtete Antikörper Ber-EP4. Es wurden jeweils zwei Zytopsinpräparate pro Antikörper und Patient, entsprechend 1×10^6 Zellen, mikroskopisch analysiert. Nach der Analyse mit ACIS erfolgte immer eine erneute manuelle Beurteilung der gefundenen Zellen mit dem Mikroskop. Als Tumorzellen wurden alle gefärbten Zellen gewertet, die typische Zeichen epithelialer Tumorzellen zeigten. Hierzu zählen deutlich vergrößerte Zellkerne, Clusterbildung von zwei oder mehr positiv gefärbten Zellen, kleine Nukleoli, irreguläres fein gestipptes Chromatin, inhomogene Färbung des Zytoplasmas, perinukleäre ringartige Farbverdichtung und/oder ein durch die Anfärbung des Zytoplasmas verdeckter Zellkern (Borgen et al. 1999).

2.5. Statistische Auswertung

Die für diese Arbeit verwendeten Daten wurden der Forschungsdatenbank Pro-WebDB der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH, Campus Kiel entnommen. In diese Datenbank werden fortlaufend die probenrelevanten Daten der in der Biomaterialbank des Krebszentrums Nord gesammelten Proben sowie die zugehörigen klinischen Daten der jeweiligen operierten Patienten eingegeben. In die Arbeit eingeschlossen wurden Patienten, die in dem Zeitraum vom 14.09.1993 bis zum 20.10.2005 aufgrund eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. Die letzte berücksichtigte Patientennachsorge fand am 07.08.2008 statt. Zur Erfassung der Nachsorgedaten wurden die zuständigen Hausärzte einmal pro Jahr angeschrieben, um den Gesundheitszustand der Patienten zu erfragen. Die Daten der Patienten, die zur Nachsorge in die Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH, Campus Kiel kamen, wurden der Ambulanzakte entnommen und ausgewertet. Die Nachsorgedaten wurden jeweils in die oben genannte Datenbank eingepflegt.

Die für diese Arbeit relevante Datenbankabfrage umfasste folgende Patientendaten:

- Geschlecht, Geburtsdatum
- Tumorlokalisation (Kolon, Sigma, Rektum), TNM-Klassifikation, UICC-Stadium, Operationsradikalität, neoadjuvante und adjuvante Therapie
- Operationsdatum, Aufnahme- und Entlassungsdatum aus dem Krankenhaus, letztes Nachsorgedatum, Daten für Lokalrezidive oder Fernmetastasen
- Todesdatum, Todesursache

- CTC-/DTC-Daten: Ergebnisse der CK 20 RT-PCR in Blut und Knochenmark, Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises mittels der Antikörper A45-B/B3 und Ber-EP4 im Knochenmark

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 11.5 für Windows durchgeführt. Die Überlebenswahrscheinlichkeit vom Zeitpunkt der Operation an wurde anhand der Kaplan-Meier-Analyse geschätzt. Die Kaplan-Meier-Analyse (Kaplan und Meier, 1958) ist eine Methode zur Berechnung der kumulierten (unbedingten) Überlebenswahrscheinlichkeiten. Es werden zu jedem Zeitpunkt, zu dem ein interessierendes Ereignis (z. B. Tod) eingetreten ist, die noch unter Beobachtung stehenden Patienten betrachtet und daraus die bedingten Überlebenswahrscheinlichkeiten berechnet. Die kumulierte (unbedingte) Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben, errechnet sich dann aus dem Produkt der entsprechenden bedingten Überlebenswahrscheinlichkeiten. Patienten, bei denen der interessierende Endpunkt (z. B. Tod) noch nicht beobachtet wurde oder zum Zeitpunkt der Analyse unbekannt ist, ob er eingetreten ist („lost to follow up“), werden zensiert. Die zensierten Patienten werden bis zum Eintritt des nächsten Ereignisses in die Berechnungen als überlebend mit einbezogen. Für die Berechnung der bedingten Wahrscheinlichkeit der nächsten Zeitintervalle werden sie nicht mehr berücksichtigt (Ziegler et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde das Gesamtüberleben, tumorspezifische Überleben und rezidivfreie Überleben untersucht. Das Gesamtüberleben beschreibt die Zeit von der Operation bis zum Tod jedweder Ursache. Zur Berechnung wurden alle Patienten ohne Todesdatum zensiert. Das tumorspezifische Überleben ist definiert als Zeit von der Operation bis zum Tod infolge des Tumors. Zur Berechnung des tumorspezifischen Überlebens wurden alle Patienten ohne Todesdatum und alle Patienten, die nicht aufgrund des Tumors verstorben waren, zensiert. Das rezidivfreie Überleben beschreibt die Zeit vom Zeitpunkt der Operation bis zum Eintreten einer Fernmetastase oder eines Lokalrezidivs. Alle Patienten ohne Fernmetastase oder Lokalrezidiv wurden für die Berechnung zensiert.

Die Überlebensverläufe wurden mithilfe des Log-Rank Tests (Mantel 1966, Peto und Peto 1972) verglichen. Als Signifikanzniveau für die Berechnungen wurde in dieser Arbeit der in biometrischen Analysen übliche Wert von $\alpha = 0,05$ gewählt. Der Log-Rank Test ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich von Überlebensverläufen

in zwei unverbundenen Stichproben. Er stellt das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche dar. Die Statistik des Log-Rank Tests basiert auf folgender Aussage (Nullhypothese): Die Überlebenszeitfunktionen der zu vergleichenden Gruppen stimmen überein. Geht man von dem interessierenden Endpunkt „Tod“ aus, bedeutet dies insbesondere, dass in beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt die gleiche Sterbewahrscheinlichkeit vorliegt. Wenn man also davon ausgeht, dass die Nullhypothese richtig ist, dann wäre die Reihenfolge der Todesfälle zufällig und somit unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit. Wenn jedoch die Patienten in einer der beiden Gruppen länger leben, werden die Patienten dieser Gruppe auch später sterben. Somit weichen die tatsächlich beobachteten Todesfälle von denen, die bei zufälliger Reihenfolge der Todesfälle erwartet werden, ab. Der Log-Rank Test vergleicht die beobachteten und die unter der Nullhypothese erwarteten Sterbehäufigkeiten zu jedem Zeitpunkt. Hierfür wird die Summe der beobachteten (x) und der erwarteten Todesfälle (y) zu den einzelnen Zeitpunkten berechnet und der Unterschied wird gemäß der Log-Rank-Teststatistik (LR) verglichen:

$$LR = \frac{(X_1 - y_1)^2}{y_1} + \frac{(X_2 - y_2)^2}{y_2}$$

Die Teststatistik ist unter der Nullhypothese annähernd χ^2 -verteilt mit einem Freiheitsgrad (Ziegler et al. 2007 a). Die χ^2 -Verteilung ist eine theoretische Verteilung, deren Eigenschaften bekannt sind. Somit kann man bei Benutzung von Statistikprogrammen wie SPSS automatisch entsprechende p-Werte ablesen.

Der p-Wert drückt die Wahrscheinlichkeit einer Abweichung von der Nullhypothese aus. Wenn sich ein p-Wert ergibt, der kleiner als das Signifikanzniveau α ist, dann wird die Nullhypothese verworfen und der Unterschied der Überlebensverläufe wird als statistisch signifikant bezeichnet.

Neben der univariaten Analyse des Einflusses einzelner Variablen auf die Überlebenszeit wurden auch die multivariaten Auswirkungen mehrerer Variablen auf das Überleben analysiert. Die Multivariate Analyse wurde anhand des proportionalen Hazardmodells von Cox (Cox, 1972) berechnet. Hierbei wurden nur solche Variablen in die Berechnung mit einbezogen, die bereits in der univariaten Analyse (Log-Rank Test) einen p-Wert $<0,05$ zeigten. Mit der Cox-Regressionsanalyse lässt sich der Ef-

fekt mehrerer Einflussgrößen auf die Überlebenszeit untersuchen. Der Sinn der multivariaten Analyse besteht darin, den Einfluss von Kovariablen auf andere Variablen zu korrigieren. Man untersucht also den Einfluss einer Kovariable, wenn alle anderen Kovariablen konstant sind. Zum Beispiel: Wie wirkt sich der Nachweis von CK 20 im Knochenmark auf das Überleben aus, wenn alle Patienten beispielsweise das gleiche UICC-Stadium, das gleiche Alter zum Zeitpunkt der Operation usw. haben (Mittlböck, 2004).

Aus dem Regressionskoeffizienten wurden adjustierte Hazard Ratios berechnet. Diese dienen als Maß für die Stärke des Zusammenhangs (Ziegler et al. 2007 b).

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ein Nachweis disseminierter (DTC) und zirkulierender (CTC) Tumorzellen bei einer Kohorte von 268 Patienten mit kolorektalem Karzinom parallel mit zwei etablierten Nachweisverfahren. Zum einen erfolgte ein immunzytochemischer Nachweis im Knochenmark unter Verwendung des Panzytokeratin Antikörpers A-45B/B3 und/oder unter Verwendung des Antikörpers Ber-EP4, der gegen das Zelloberflächenglykoprotein EpCAM gerichtet ist. Darüberhinaus wurde aus demselben Analysematerial sowie aus peripherem Blut ein molekularbiologischer Nachweis epithelialer Zellen durch Zytokeratin 20 RT-PCR in cDNA Präparationen durchgeführt. Ziel war es, die prognostische Relevanz hinsichtlich der Überlebenszeit zu ermitteln und einen Ergebnisvergleich zwischen den beiden Nachweisverfahren durchzuführen. Hierbei wurde unterschieden zwischen dem Gesamtüberleben, dem tumorspezifischen Überleben und dem rezidivfreien Überleben (siehe hierzu Kapitel 2.5).

3.1. Patientenkollektiv

3.1.1. Klinische Daten der Patienten

In diese Untersuchung wurden 268 Patienten eingeschlossen, die in dem Zeitraum vom 14.09.1993 bis zum 20.10.2005 in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH, Campus Kiel, aufgrund eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. Die Nachbeobachtungszeit endet am 07.08.2008. Die mediane Nachbeobachtungszeit beträgt 82,9 Monate.

Von den 268 Patienten sind 139 Patienten (52%) männlich und 129 Patienten (48%) weiblich. Bei 120 der Patienten (45%) ist das Karzinom im Rektum lokalisiert, 148 Patienten (55%) weisen eine Lokalisation im Kolon oder Sigma auf. Die Stadienverteilung nach TNM-System der UICC ist relativ homogen mit 68 Patienten (25%) mit Stadium I, 69 Patienten (26%) mit Stadium II, 75 Patienten (28%) mit Stadium III und 56 Patienten (21%) mit Stadium IV. 234 Patienten (87%) erhielten eine R0-Resektion, bei 2 Patienten (1%) wurde eine R1-Resektion und bei 32 Patienten (12%) eine R2-Resektion durchgeführt. Das mediane Lebensalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 66,47 Jahre. Insgesamt wurden 23 Patienten (9%) neoadjuvant therapiert, wobei 1 Patient eine Chemotherapie und 22 Patienten eine kombinierte

Radiochemotherapie erhielten. Die neoadjuvante Therapie betraf ausschließlich Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum. Eine adjuvante Therapie erhielten 100 Patienten (37%), wobei bei vier Patienten eine Radiatio, bei 66 Patienten eine Chemotherapie, bei 29 Patienten eine kombinierte Radiochemotherapie und bei einem Patienten eine Immuntherapie durchgeführt wurde. Bei 136 Patienten (51%) wurde keine adjuvante Therapie angewandt und bei 32 Patienten (12%) war diese Angabe unbekannt. Bei 23 Patienten (9%) entwickelte sich innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes ein Lokalrezidiv, bei 62 Patienten (23%) wurde eine Fernmetastasierung beobachtet. 111 Patienten (41%) verstarben innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums, wobei 82 (74%) dieser 111 Patienten aufgrund des kolorektalen Karzinoms verstarben und 29 (26%) der Patienten durch andere Ursachen zu Tode kamen. Tabelle 5 gibt eine Übersicht der klinischen Daten des untersuchten Kollektivs.

Tabelle 5: Klinische Daten des untersuchten Patientenkollektivs

Variable		Anzahl der Patienten (n)
Geschlecht	männlich	139
	weiblich	129
Alter bei Operation	< 70 Jahre	156
	> 70 Jahre	112
UICC-Stadium	I	68
	II	69
	III	75
	IV	56
T-Kategorie	I	26
	II	64
	III	143
	IV	35
N-Kategorie	0	147
	I	68
	II	53
M-Kategorie	0	212
	I	56
Tumorlokalisation	Kolon/Sigma	148
	Rektum	120
Operationsradikalität	R0	234
	R1	2
	R2	32
Neoadjuvante Therapie (nur Patienten mit Rektumkarzi-	Radiochemotherapie	22
	Chemotherapie	1
Adjuvante Therapie	Radiotherapie	4
	Chemotherapie	66
	Radiochemotherapie	29
	Immuntherapie	1
Lokalrezidiv		23
Fernmetastasierung		62
Tod innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes	Tod durch Tumor	82
	Tod durch andere Ursache	29

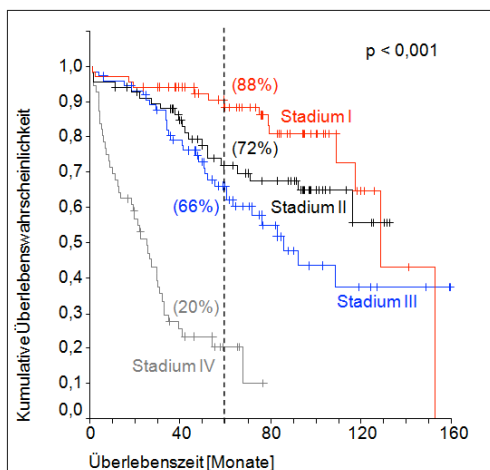
3.1.2. Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von verschiedenen klinischen Parametern

In diesem Kapitel erfolgt eine deskriptive Analyse des Patientenkollektivs. Es wurde die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom UICC-Stadium, der Operationsradikalität, dem Alter zum Zeitpunkt der Operation, der T-Kategorie, der N-Kategorie, der M-Kategorie, dem Geschlecht und der Tumorlokalisation (Kolon/Sigma vs. Rektum) bestimmt. Bei der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde unterschieden zwischen Gesamt-, tumorspezifischem und rezidivfreiem Überleben. Die Ergebnisse sind in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Auf der y-Achse (Ordinate) ist die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit als Wert zwischen 0 und 1 und auf der x-Achse (Abszisse) der Nachbeobachtungszeitraum in Monaten aufgetragen. Die Berechnungen beziehen sich auf das Gesamtkollektiv (n= 268).

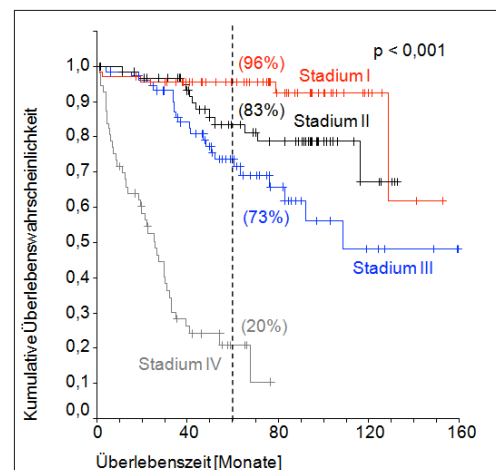
Begonnen wird mit der Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Überlebensrate und UICC-Stadien. Dies ist in Abbildung 7 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Der Unterschied zwischen den Überlebensverläufen, ausgedrückt als p-Wert, wurde jeweils für das Gesamtüberleben, das tumorspezifische Überleben und das rezidivfreie Überleben einmal für alle UICC-Stadien gemeinsam sowie für die einzelnen Stadien getrennt berechnet. In der Abbildung 7 jeweils oben rechts in der Graphik ist der p-Wert angegeben, der für alle UICC-Stadien gemeinsam berechnet wurde. Die 5-Jahresüberlebensraten und der für die jeweiligen UICC-Stadien getrennt berechnete Unterschied der Überlebensverläufe (p-Wert) ist in Tabelle 6 dargestellt. Sowohl beim Gesamtüberleben als auch beim tumorspezifischen und rezidivfreien Überleben zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Überlebensverläufe zwischen den Stadien I und III, I und IV, II und IV sowie III und IV. Bei den Stadien I und II ist der Unterschied zwischen den Überlebensverläufen beim rezidivfreien Überleben statistisch signifikant, während sich beim tumorspezifischen und beim Gesamtüberleben keine statistische Signifikanz ergibt. Zwischen den Stadien II und III zeigt sich in keinem Fall ein statistisch signifikanter Unterschied der Überlebensverläufe. Bei Betrachtung der 5-Jahresüberlebensraten sieht man jedoch auch zwischen diesen Stadien deutliche Unterschiede. Die 5-Jahres-Überlebensrate bezogen auf das Gesamtüberleben für Patienten mit Stadium I beträgt 88%, für Patienten mit Stadium II 72%, für Patienten mit Stadium III 66% und von den Patienten mit Stadium IV leben nach 5 Jahren noch 20%. Vergleicht man die Überlebensverläufe aller UICC-

Stadien gemeinsam ergibt sich sowohl beim Gesamtüberleben als auch beim tumorspezifischen und rezidivfreien Überleben ein statistisch signifikanter Unterschied der Überlebensverläufe ($p < 0,001$). Dies bedeutet, dass das Überleben in den höheren UICC-Stadien signifikant schlechter ist als in den niedrigeren Stadien. Das UICC-Stadium stellt somit einen wichtigen prognostischen Faktor für das Patientenkollektiv dar.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

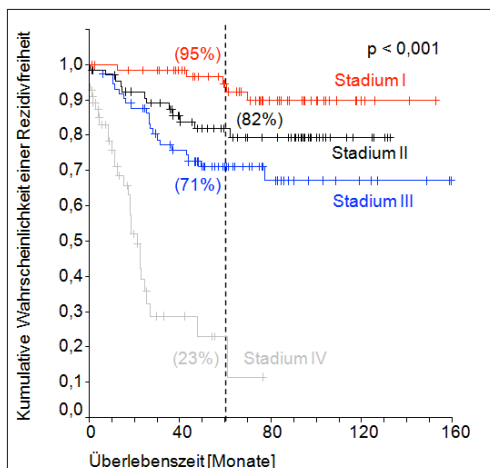


Abbildung 7: Analyse eines Zusammenhangs zwischen dem UICC-Stadium und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-rank Tests, berechnet gemeinsam über alle Schichten; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Tabelle 6: 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) [%] in Abhängigkeit vom UICC-Stadium und Unterschiedlichkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit für die jeweiligen UICC-Stadien - ausgedrückt als p-Wert - bezogen auf das Gesamtüberleben (a), das tumorspezifische Überleben (b) und das rezidivfreie Überleben (c) im Gesamtkollektiv.

a)

UICC-Stadium	n	5-JÜR (%)	p-Werte ¹			
			I	II	III	
I	68	88				
II	69	72	II	0,061		
III	75	66	III	0,001	0,139	
IV	56	20	IV	<0,001	<0,001	<0,001

b)

UICC-Stadium	n	5-JÜR (%)	p-Wert ¹			
			I	II	III	
I	68	96				
II	69	83	II	0,055		
III	75	73	III	<0,001	0,051	
IV	56	20	IV	<0,001	<0,001	<0,001

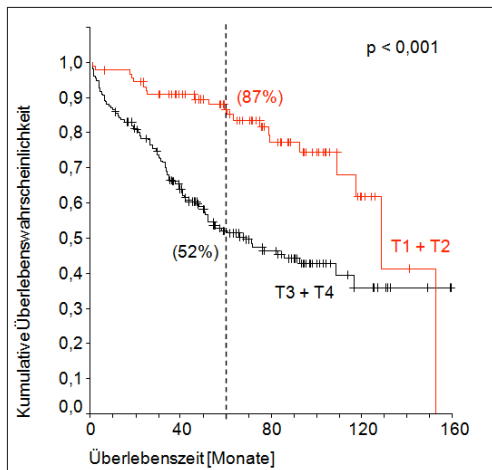
c)

UICC-Stadium	n	5-JÜR (%)	p-Werte ¹			
			I	II	III	
I	68	95				
II	69	82	II	0,049		
III	75	71	III	0,001	0,152	
IV	56	23	IV	<0,001	<0,001	<0,001

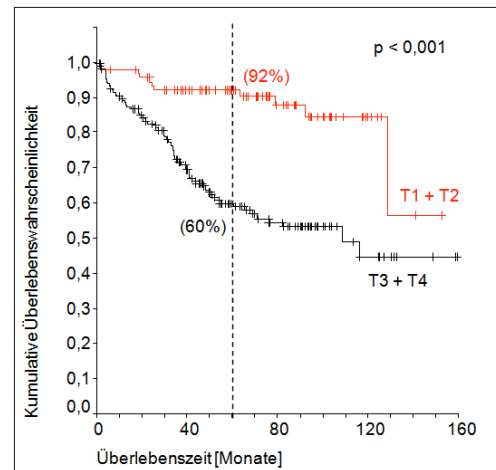
¹ p-Wert als Ergebnis des Log-rank-Tests berechnet paarweise über Schichten.

Betrachtet man die T-, N- und M-Kategorie getrennt, zeigt sich jeweils für das Gesamt-, tumorspezifische und rezidivfreie Überleben ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben (jeweils $p < 0,001$). Dies bedeutet, dass Patienten mit Stadium T3 und T4 kürzer leben als Patienten mit Stadium T1 und T2. Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N1 und N2) leben kürzer als Patienten mit N0-Status. Patienten, die bereits vor Operation eine Fernmetastase aufwiesen (M1), leben kürzer als Patienten ohne Fernmetastasen (M0). Die T-, N- und M-Kategorie stellt somit einen wichtigen prognostischen Faktor für das Patientenkollektiv dar. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8 bis 10 in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

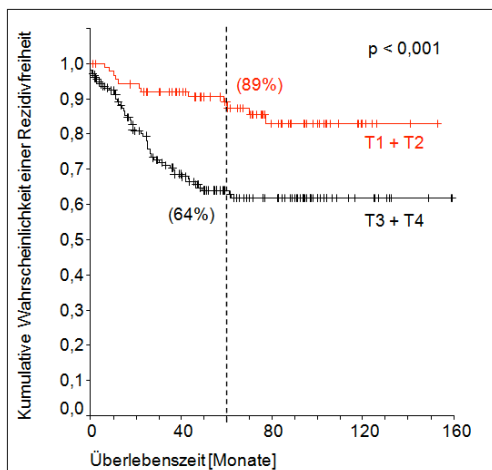
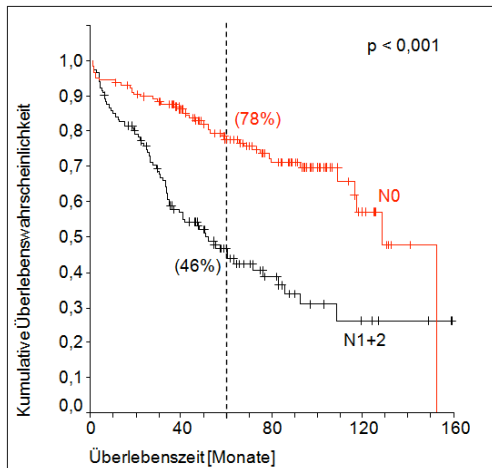
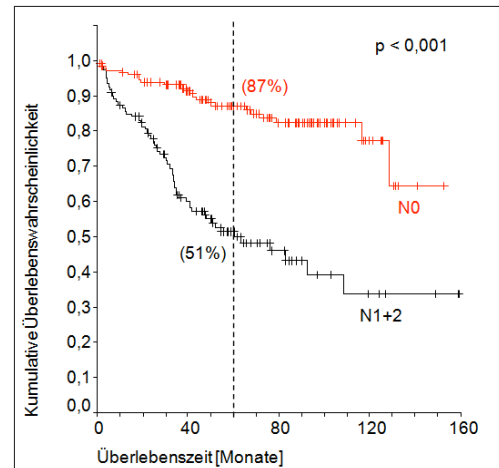


Abbildung 8: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der T-Kategorie (T1+T2 vs. T3+T4) und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

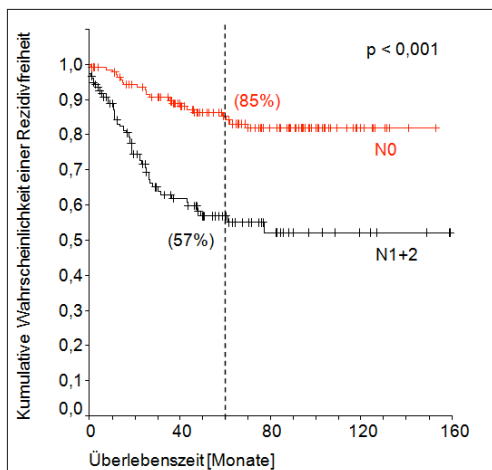
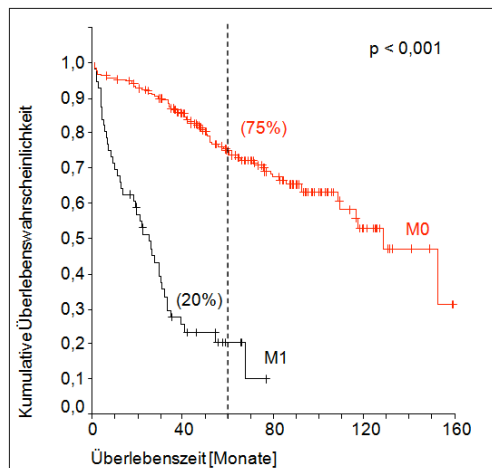
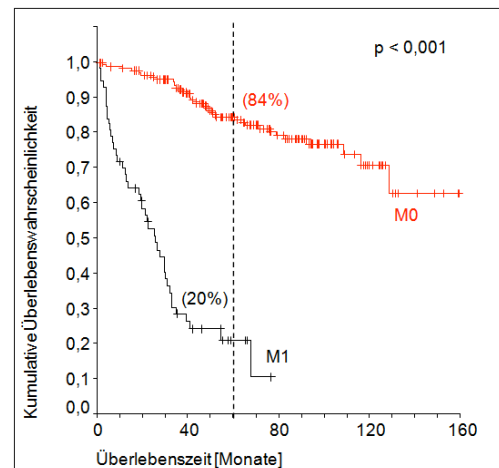


Abbildung 9: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der N-Kategorie (N0 vs. N1+N2) und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

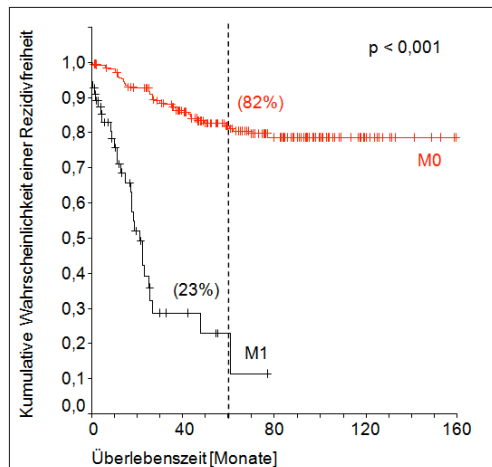
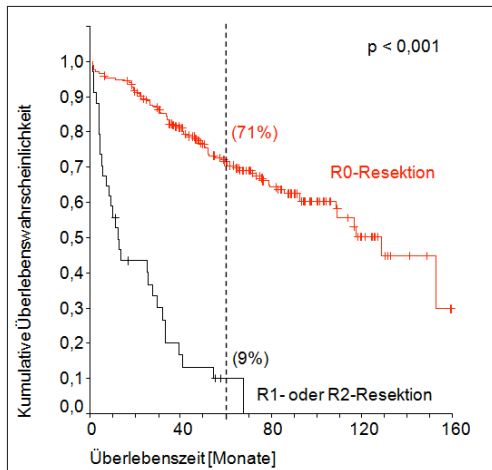


Abbildung 10: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der M-Kategorie (M0 vs. M1) und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

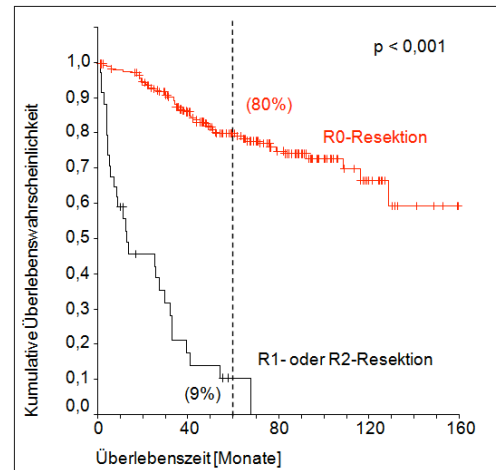
Im Weiteren wird der Zusammenhang zwischen Operationsradikalität und Überleben betrachtet. Die Operationsradikalität steht in einem stark signifikanten Zusammenhang zum gesamt- und tumorspezifischen sowie rezidivfreien Überleben (jeweils $p < 0,001$). Betrachtet man die 5-Jahresüberlebensrate bezogen auf das Gesamtüberleben, beträgt sie für die R0- resezierten Patienten 71%, wohingegen von den R1 oder R2-resezierten Patienten nach 5 Jahren nur noch 9% der Betroffenen leben. Ähnliche Werte ergaben sich für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben. Die Operationsradikalität beziehungsweise der Residualstatus nach Operation stellt so-

mit ebenfalls einen wichtigen prognostischen Faktor für dieses Patientenkollektiv dar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

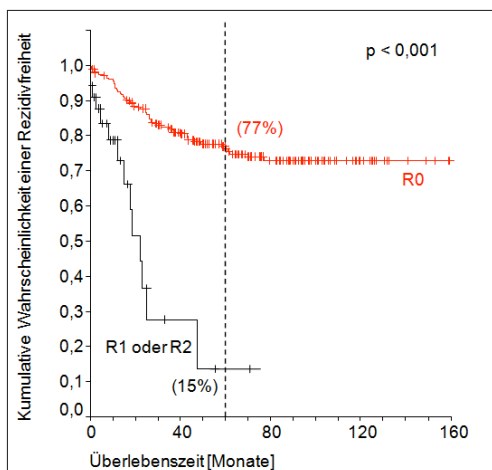
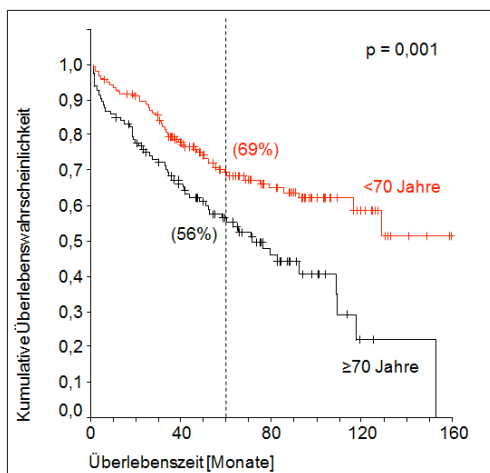


Abbildung 11: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Operationsradikalität und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

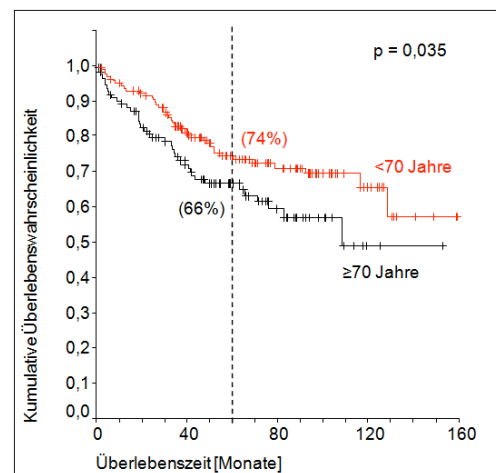
Bei der Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation und dem Überleben ergab sich beim Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben ein signifikanter Unterschied der Überlebensverläufe ($p < 0,001$; $p = 0,035$). Dies bedeutet, dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation über oder gleich 70 Jahre alt waren, früher starben als Patienten, die zum Zeitpunkt der Opera-

tion unter 70 Jahre alt waren. Das Alter zum Zeitpunkt der Operation stellt somit in dieser Patientengruppe für das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben einen wichtigen prognostischen Faktor im hier untersuchten Kollektiv dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate bezogen auf das Gesamtüberleben für Patienten mit einem Alter über oder gleich 70 Jahre zum Zeitpunkt der Operation betrug 56%, Patienten mit einem Operationsalter unter 70 Jahren hatten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 69%. Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Überlebensverläufe. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

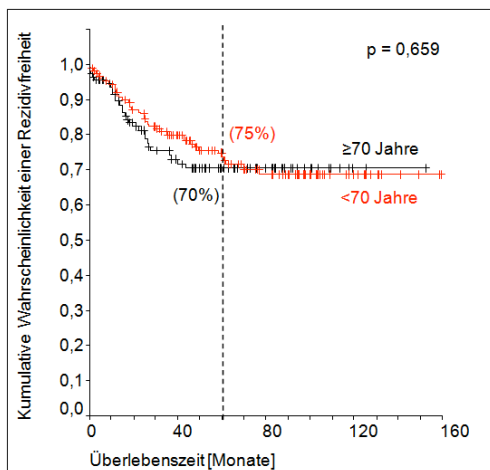


Abbildung 12: Analyse eines Zusammenhangs zwischen dem Alter zum Zeitpunkt der Operation und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) beim Gesamtkollektiv (Fälle insgesamt= 268) ; gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Die Tumorlokalisation (Kolon/Sigma vs. Rektum) und das Geschlecht zeigten weder beim Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben noch beim rezidivfreien Überleben einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben. Das Geschlecht und die Tumorlokalisation stellen somit keinen prognostischen Faktor für das Überleben dar. Die 5-Jahresüberlebensraten sowie die p-Werte, die aus den jeweiligen Log-Rank-Tests resultierten, sind in der nachfolgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: 5-Jahresüberlebensraten (5-JÜR) in Abhängigkeit vom Geschlecht und der Tumorlokalisation und Unterschiedlichkeit der Überlebensverläufe ausgedrückt als p-Wert bezogen auf das Gesamtüberleben (a), das tumorspezifische Überleben (b) und das rezidivfreie Überleben (c) im Gesamtkollektiv

a)

Variable		n	5-JÜR (%)	p-Wert ¹
Geschlecht	weiblich	129	67	0,125
	männlich	139	61	
Tumorlokalisation	Kolon/Sigma	148	61	0,321
	Rektum	120	67	

b)

Variable		n	5-JÜR (%)	p-Wert ¹
Geschlecht	weiblich	129	72	0,387
	männlich	139	70	
Tumorlokalisation	Kolon/Sigma	148	71	0,889
	Rektum	120	71	

c)

Variable		n	5-JÜR (%)	p-Wert ¹
Geschlecht	weiblich	129	74	0,955
	männlich	139	72	
Tumorlokalisation	Kolon/Sigma	148	78	0,170
	Rektum	120	67	

¹ p-Wert als Ergebnis des Log-rank Tests

3.2. Nachweis disseminierter und zirkulierender Tumorzellen

Nach der Entnahme von Blut- und Knochenmarkproben und deren Aufarbeitung (siehe Kapitel 2.2) wurde die mononukleäre Zellfraktion mittels zwei unterschiedlicher Nachweisverfahren auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Zum einen erfolgte ein molekularbiologischer Nachweis epithelialer Zellen durch Zytokeratin 20 RT-PCR in cDNA Präparationen aus Blut- und Knochenmarkszellen. Desweiteren erfolgte ein immunzytochemischer Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark unter Verwendung des Panzytokeratinantikörpers A45-B/B3 und/oder des Antikörpers Ber-EP4 (siehe Kapitel 2.3 und 2.4). Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

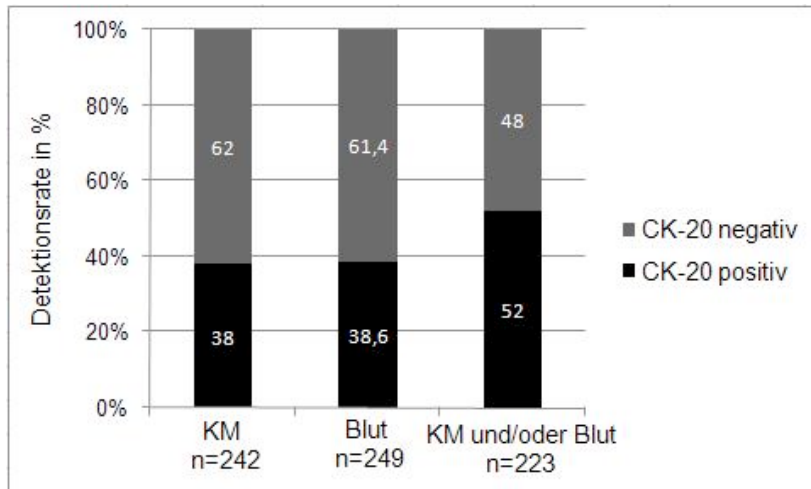
3.2.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark durch RT-PCR

Insgesamt waren in dem untersuchten Gesamtkollektiv von 268 Patienten Knochenmarkproben von 242 Patienten (90%) und Blutproben von 249 Patienten (93%) verfügbar und wurden mittels RT-PCR auf CK 20 mRNA-Expression untersucht. Bei 223 Patienten (83%) erfolgte eine Analyse sowohl im Knochenmark als auch im Blut, da Proben aus beiden Kompartimenten verfügbar waren. Wie in Kapitel 2.3.3 bereits erläutert, wurden pro Knochenmark-/ beziehungsweise Blutprobe mindestens zwei PCR-Durchläufe (Replikate) durchgeführt. Ergaben sich in den beiden Durchläufen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich Positivität oder Negativität, erfolgte ein weiterer PCR-Durchlauf, anhand dessen Ergebnisses über das Endergebnis der Probe entschieden wurde. In Abbildung 13 sind exemplarische Ergebnisse zweier Durchläufe der CK 20 RT-PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese repräsentativ für das Gesamtkollektiv dargestellt. In Abbildung 13 a und b sind jeweils die Ergebnisse der CK 20 nested RT-PCR in Blutproben von 16 Patienten mit kolorektalem Karzinom dargestellt, wobei Abbildung 13a den ersten Durchlauf und Abbildung 13b den zweiten Durchlauf der PCR zeigt. In der Abbildung gut zu erkennen sind die Amplifikationsprodukte mit einer Molekülmasse von 485 Basenpaaren, die eine CK 20 Positivität anzeigen für die Blutproben B1061, B1076, B1154, B1158 und die Positivkontrolle. In Abbildung 13 c und d sind die Ergebnisse der CK 20 nested RT-PCR von sieben weiteren Patienten jeweils in Blut- und Knochenmarkprobe und von drei Patienten nur in der Blutprobe dargestellt. Abbildung 13c zeigt den ersten PCR-Durchlauf und Abbildung 13 d den zweiten PCR-Durchlauf. Positive Banden bei 485

Basenpaaren sind für die Blutproben B1695, B1706 (1. PCR-Durchlauf), B1727 (2. PCR-Durchlauf), B1746 und B1805 zu erkennen. Bei den Knochenmarkproben zeigen sich positive Banden bei 485 Basenpaaren für KM1706 (2. PCR-Durchlauf), KM1727 (1. PCR-Durchlauf) und KM 1740 (2. PCR-Durchlauf). Ebenfalls eine positive Bande zeigt die Positivkontrolle in Abbildung 13c. Bei der Knochenmarkprobe KM 1727 erfolgte nur ein PCR-Durchlauf, da für den zweiten PCR-Durchlauf nicht genügend Material vorhanden war. Somit wurde dieser Patient aus der Studie ausgeschlossen. In einigen Fällen sind PCR-Nebenprodukte sichtbar (z. B. Probe B1746 in Abbildung 13c). Die Identität dieser Nebenprodukte wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

In Abbildung 14a sind die Detektionsraten der CK 20 RT-PCR in Form eines Säulendiagrammes dargestellt, darunter ist in Abbildung 14b tabellarisch die jeweilige Anzahl der positiv und negativ getesteten Patienten aufgeführt.

a)



b)

Kompartiment	Patienten [n]	CK 20 positiv [n]	CK 20 negativ [n]
KM	242	92	150
Blut	249	96	153
KM und/oder Blut	268	139	129

Abbildung 14: Ergebnisse der CK 20 nested RT-PCR in RNA aus Blut und Knochenmark (KM): a) Detektionsraten [%], b) Anzahl der positiv und negativ getesteten Patienten [n].

Betrachtet man die CK 20 Positivität im Knochenmark allein, so zeigten 92 von 242 Patienten (38%) ein positives Ergebnis. Von den 249 Patienten, von welchen Blutproben untersucht wurden, waren 96 (38,6%) CK 20 positiv. Die Detektionsrate im Blut entspricht damit in etwa der Detektionsrate im Knochenmark. In dem Gesamtkollektiv (n= 268) waren insgesamt 139 Patienten (52%) entweder im Blut oder Knochenmark oder in beiden Kompartimenten positiv. Bei den 223 Patienten, bei welchen sowohl eine Analyse der CK 20 Positivität im Knochenmark als auch im Blut erfolgte, zeigte sich bei 141 Patienten (63%) ein übereinstimmendes Ergebnis, wobei sich bei 47 Patienten (21%) ein doppelt positives Ergebnis und 94 Patienten (42%) ein doppelt negatives Ergebnis ergab. Bei 42 Patienten (19%) ging ein positives Er-

gebnis in der Knochenmarkprobe mit einem negativen Ergebnis in der Blutprobe einher und bei 40 Patienten (18%) trat ein negatives Ergebnis in der Knochenmarkprobe zusammen mit einem positiven Ergebnis in der Blutprobe auf.

3.2.2. Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark durch immunzytochemische Untersuchungsverfahren

Neben dem molekularbiologischen Nachweis erfolgte bei der Mehrzahl der Patientenproben ein immunzytochemischer Nachweis epithelialer Zellen auf Zytospin-Präparaten der mononukleären Zellfraktion aus Knochenmarkproben. Hierbei wurde der Antikörper A45-B/B3, der gegen die Zytokeratine CK 8, 18 und 19 gerichtet ist, und/oder der Antikörper Ber-EP4, welcher mit dem Zelloberflächenglykoprotein EpCAM reagiert, verwendet. Insgesamt wurden Knochenmarkproben von 268 Patienten untersucht. Bei neun Patienten ergab die immunzytochemische Analyse aufgrund einer sehr geringen Zellzahl auf den Objektträgern keine auswertbaren Ergebnisse. Daraus resultierte ein untersuchtes Gesamtkollektiv von $n = 259$ Patienten. Bei 250 der 259 Patienten (97%) wurde ein immunzytochemischer Nachweis unter Verwendung des Antikörpers A45-B/B3 durchgeführt. Bei 97 Patienten (37%) erfolgte darüber hinaus eine Analyse der EpCAM-Expression mit dem Antikörper Ber-EP4. Für die Färbung mit dem Antikörper Ber-EP4 wurden nur Knochenmarkproben von Patienten, die nach Oktober 1996 operiert wurden, herangezogen. Dementsprechend ergeben sich hier auch kürzere Nachbeobachtungszeiten. Ein Nachweis mit beiden Antikörpern erfolgte bei 88 Patienten (34%). In Abbildung 15 sind exemplarische Ergebnisse der immunzytochemischen Analyse einer Knochenmarkprobe eines Patienten mit kolorektalem Karzinom für den Nachweis mit den Antikörpern A45-B/B3 und Ber-EP4 nach mikroskopischer Auswertung durch ACIS dargestellt. Wie in Kapitel 2.4.3 bereits erläutert, erfolgt bei der Analyse mittels ACIS zunächst ein sogenannter Raster-Scan. Hierbei wird ein vorher festgelegter Scanbereich, welcher den Zytospin einfasst, mit niedriger Vergrößerung (10x Objektiv) gescannt. Durch eine Analyse der Farben der potentiellen Zielzellen (rot gefärbtes Zytoplasma aufgrund der Zytokeratin-Reaktion, bläulicher Zellkern aufgrund der Gegenfärbung mit Hämatoxylin) und morphologischer Kriterien (z. B. Größe der Zelle, Verhältnis Zytoplasma zu Zellkern) werden vermeintliche Tumorzellen detektiert. Die Koordinaten für die potentiell positiven Objekte werden gespeichert. In einem zweiten Schritt werden die vermeintlich positiven Objekte erneut für eine zweite Analyse in stärkerer Vergrößerung (40x Ob-

jektiv) angesteuert. In Abbildung 15 a und b ist jeweils ein Übersichtsscan für die immunzytochemische Analyse mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (Abbildung 15a) und den EpCAM-Antikörper Ber-EP4 (Abbildung 15b) dargestellt. In Abbildung 15a ist im Übersichtsscan eine Zytokeratin-positive Zelle zu erkennen. Die hämatopoetischen Zellen sind nicht gefärbt und es zeigt sich keine unspezifische Hintergrundfärbung, was für die Spezifität der immunzytochemischen Analyse spricht. Abbildung 15 c,d,e und f zeigen jeweils zwei Zytokeratin-positive (15 c, d) und zwei EpCAM-positive Zellen (15 e, f) in stärkerer Vergrößerung. Die Maßstabsbalken entsprechen in den Abbildungen 15 a und b 100 μm und in den Abbildungen 15 c bis f jeweils 10 μm .

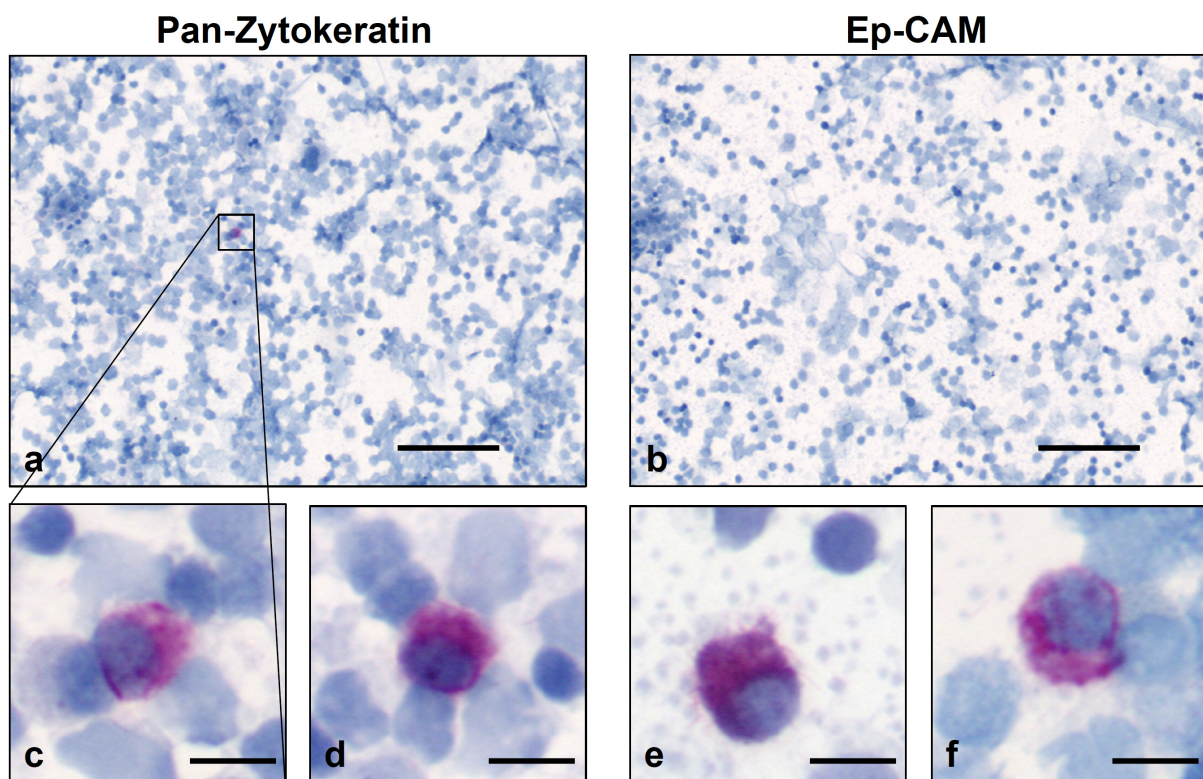
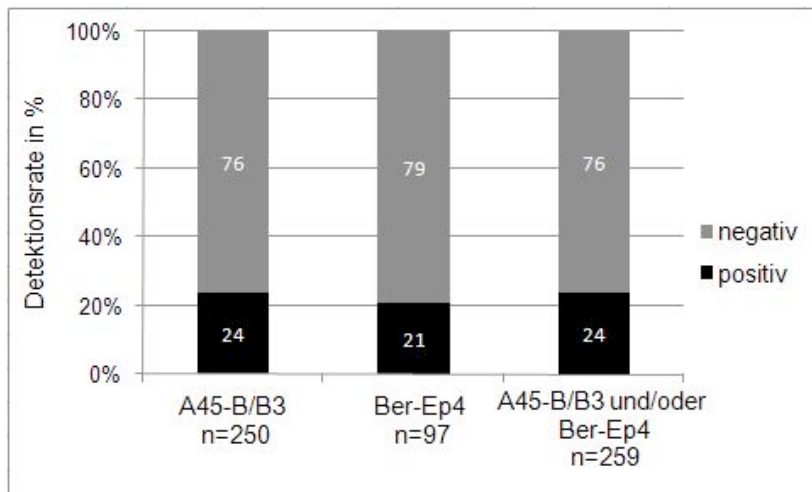


Abbildung 15: Darstellung eines exemplarischen Ergebnisses der immunzytochemischen Untersuchung einer Knochenmarkprobe eines Patienten mit kolorektalem Karzinom nach mikroskopischer Auswertung durch ACIS; a,b) Übersichtsscans für die immunzytochemische Untersuchung mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (a) und dem EpCAM-Antikörper Ber-EP4 (b); c,d) Darstellung Zytokeratin-positiver und e,f) EpCAM-positiver Zellen in höherer Vergrößerung; die Maßstabsbalken in der Abbildung entsprechen 100 μm (a, b) bzw. 10 μm (c-f).

In Abbildung 16a sind die Detektionsraten beim immunzytochemischen Nachweis von Zytokeratinen (A45-B/B3- Antikörper) und EpCAM (Ber-EP4-Antikörper) bei Knochenmarkszellen in Form eines Säulendiagrammes dargestellt. Darunter ist in

Abbildung 16b tabellarisch die jeweilige Anzahl der positiv und negativ getesteten Patienten aufgeführt.

a)



b)

Antikörper	Patienten [n]	positiv [n]	negativ [n]
A45-B/B3	250	59	191
Ber-EP4	97	20	77
A45-B/B3 und/oder Ber-EP4	259	63	196

Abbildung 16: Ergebnisse der immunzytochemischen Analyse mit einem Antikörper gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 (A45-B/B3) und einem anti-EpCAM Antikörper (Ber-EP4) bei Knochenmarkzellen: a) Detektionsraten [%], b) Anzahl der jeweils positiv und negativ getesteten Patienten [n].

Der immunzytochemische Nachweis unter Verwendung des Antikörpers A45-B/B3 zeigte bei 59 (24%) von 250 Patienten ein positives Ergebnis. Von 97 Patienten, bei denen eine Analyse mit dem Antikörper Ber-EP4 erfolgte, waren 20 Patienten (21%) positiv. Bei den 88 Patienten, bei denen sowohl eine Analyse mittels des Antikörpers A45-B/B3 als auch mittels des Antikörpers Ber-EP4 durchgeführt wurde, zeigte sich bei 67 Patienten (76%) ein übereinstimmendes Ergebnis, wobei bei 16 Patienten (18%) das Ergebnis doppelt positiv und bei 51 Patienten (58%) doppelt negativ war. Bei vier Patienten (5%) ging ein negatives Ergebnis beim Nachweis mit A45-B/B3 mit einem positiven Ergebnis beim Nachweis mit Ber-EP4 einher. Bei 17 Patienten (19%) war ein positives Ergebnis beim Nachweis mit A45-B/B3 mit einem negativen Ergebnis beim Nachweis mit Ber-EP4 gekoppelt. In dem Gesamtkollektiv von 259

Patienten waren insgesamt 63 Patienten (24%) entweder beim Nachweis durch den Antikörper A45-B/B3 oder Ber-EP4 positiv oder doppelt positiv.

3.2.3. Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen

Im Folgenden wird untersucht, inwiefern die beiden unterschiedlichen Nachweisverfahren dasselbe Ergebnis zeigen. Zum Vergleich der Untersuchungsergebnisse wird das Kollektiv von 259 Patienten betrachtet, von denen sowohl ein Ergebnis der Analyse mittels RT-PCR als auch ein Ergebnis der Analyse mittels Immunzytochemie (ICC) vorliegt. Als positiv gewertet wurden jeweils die Patienten, die beim Nachweis durch RT-PCR im Blut oder im Knochenmark oder in beiden Kompartimenten positiv waren. Beim immunzytochemischen Nachweis wurden die Patienten als positiv gewertet, die beim Nachweis mit A45-B/B3 oder mit Ber-EP4 oder beim Nachweis mit beiden Antikörpern ein positives Ergebnis zeigten.

Bei insgesamt 130 Patienten (50%) zeigte sich bei beiden Nachweisverfahren das gleiche Ergebnis, wobei 35 Patienten (13%) ein doppelt positives Ergebnis und 95 (37%) Patienten ein doppelt negatives Ergebnis aufwiesen. 28 Patienten (11%) zeigten ein negatives Ergebnis in der RT-PCR und ein positives Ergebnis beim immunzytochemischen Nachweis. Bei 101 Patienten (39%) war ein positives Ergebnis in der Analyse mittels PCR mit einem negativen Ergebnis bei der immunzytochemischen Analyse verbunden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

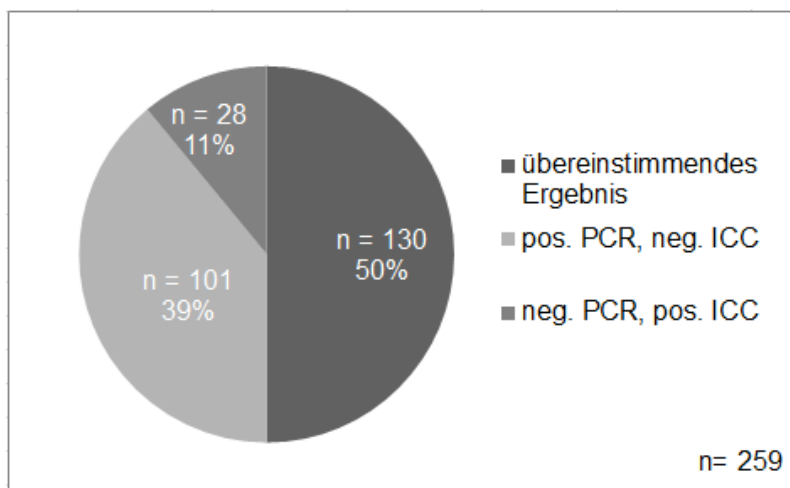


Abbildung 17: Vergleich der Ergebnisse der CK 20 RT-PCR im Blut und/oder Knochenmark mit den Ergebnissen beim immunzytochemischen Nachweis (ICC) mittels A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 im Knochenmark; n=Anzahl, unten rechts in der Ecke Gesamtpatientenzahl.

Betrachtet man allein den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, so zeigt sich bei einem Kollektiv von 235 Patienten bei insgesamt 129 Patienten (55%) ein übereinstimmendes Ergebnis, wobei 20 Patienten (9%) ein doppelt positives Ergebnis und 109 (46%) Patienten ein doppelt negatives Ergebnis aufwiesen. Bei 36 Patienten (15%) geht ein negatives Ergebnis im Nachweis mittels RT-PCR mit einem positiven Ergebnis beim immunzytochemischen Nachweis einher und bei 70 Patienten (30%) ist es umgekehrt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

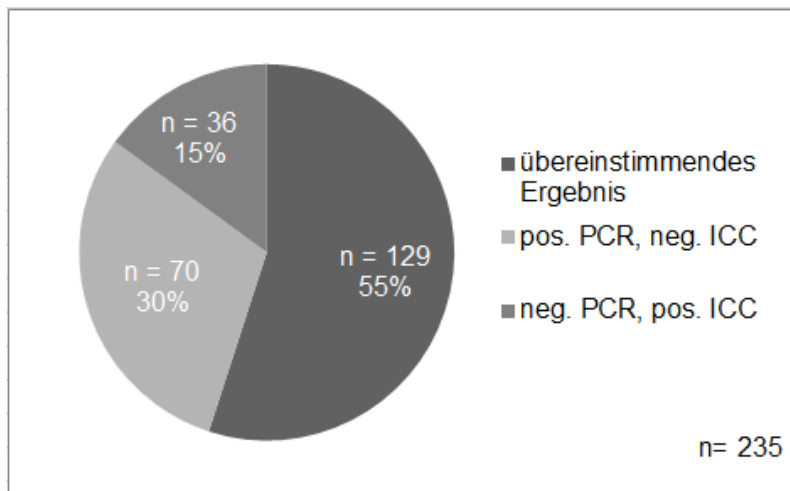


Abbildung 18: Vergleich der Ergebnisse der CK 20 RT-PCR im Knochenmark mit den Ergebnissen beim immunzytochemischen Nachweis (ICC) mittels A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 im Knochenmark; n=Anzahl, unten rechts in der Ecke Angabe der Gesamtpatientenzahl.

3.2.4. Abhängigkeit der Detektion von DTC und CTC von klinischen Parametern

Im Folgenden wird die mögliche Korrelation zwischen der Detektion von DTC und CTC und dem UICC-Stadium, der T-, N- und M-Kategorie, der Operationsradikalität, dem Alter zum Zeitpunkt der Operation, dem Geschlecht und der Tumorlokalisation untersucht. Hierbei werden der molekularbiologische Nachweis mittels PCR und der immunzytochemische Nachweis getrennt betrachtet. Begonnen wird mit der Betrachtung des CK 20 Nachweises mittels RT-PCR in Blut und/oder Knochenmark. Die p-Werte für die Korrelation wurden mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Korrelation zwischen CK 20 Positivität im Knochenmark (KM) und/oder Blut und klinischen Parametern

Variable		CK 20 Nachweis im KM und/oder Blut						χ^2 -Test (p-Wert ¹)
		Gesamt (n=268)		positiv		negativ		
		n	%	n	%	n	%	
UICC-Stadium	I	68	25	34	50	34	50	0,053
	II	69	26	33	48	36	52	
	III	75	28	34	45	41	55	
	IV	56	21	38	68	18	32	
T-Kategorie	I	26	10	11	42	15	58	0,121
	II	64	24	35	55	29	45	
	III	143	53	69	48	74	52	
	IV	35	13	24	69	11	31	
N-Kategorie	0	147	55	76	52	71	48	0,975
	I	68	25	36	53	32	47	
	II	53	20	27	51	26	49	
M-Kategorie	0	212	79	101	48	111	52	0,007
	I	56	21	38	68	18	32	
OP-Radikalität	R0	234	87	113	48	121	52	0,002
	R1 + R2	34	13	26	77	8	23	
OP-Alter	<70Jahre	155	58	76	49	79	51	0,277
	≥70Jahre	113	42	63	56	50	44	
Geschlecht	weiblich	129	48	74	57	55	43	0,083
	männlich	139	52	65	47	74	53	
Tumorlokali- sation	Kolon/Sigma	148	55	75	51	73	49	0,665
	Rektum	120	45	64	53	56	47	

¹ p-Wert als Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests berechnet für die jeweilige Variable über alle Strata

Eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) mit einem positiven Nachweis in der CK 20 RT-PCR in Blut und/oder Knochenmark ergibt sich für die Operationsradikalität und die M-Kategorie. Insgesamt erfolgte bei 268 Patienten eine Analyse mittels CK 20 RT-PCR im Knochenmark und/oder Blut. Hiervon wurden 234 Patienten R0-reseziert und 34 Patienten erhielten eine R1- oder R2-Resektion. Von den 234 R0-resezierten Patienten wurden 48% (113) positiv getestet für CK 20 und 52% (121) negativ getestet. Von den 34 Patienten, welche R1- oder R2-reseziert wurden, war das Testergebnis für CK 20 in 77% (26) positiv und in 23% (8) negativ. Im Chi-Quadrat-Test ergibt sich ein p-Wert von 0,002. Somit korreliert die Operationsradikalität signifikant mit dem Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR in Knochenmark und/oder Blut. Patienten mit R1- oder R2- Resektion haben signifikant häufiger ein positives Ergebnis als Patienten mit R0-Resektion. Dies gilt auch für den Metastasierungsstatus. Von den 268 Patienten hatten 212 zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen (M0) und bei 56 Patienten waren bereits Fernmetastasen vorhanden (M1). Von den 212 Patienten mit M0-Status wurden 48% positiv und 52% negativ getestet für CK 20. Bei den 56 Patienten mit M1-Status ergab sich bei 68% ein positives und bei 32% ein negatives Ergebnis. Im Chi-Quadrat-Test zeigt sich ein p-Wert von 0,007. Patienten mit M1-Status haben somit signifikant häufiger ein positives Ergebnis in der CK 20 RT-PCR in Blut und/oder Knochenmark als Patienten mit M0-Status. Keine signifikante Korrelation mit dem Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR in Knochenmark und/oder Blut ergibt sich für das UICC-Stadium ($p=0,053$), die T-Kategorie ($p=0,121$), die N-Kategorie ($p=0,975$), das Operationsalter ($p=0,277$), das Geschlecht (0,083) und die Tumorlokalisierung ($p=0,665$).

Im Weiteren wird der Zusammenhang zwischen denselben klinischen Parametern und der Positivität in den immunzytochemischen Untersuchungen (Positivität beim Nachweis mittels A45-B/B3 und/oder Positivität beim Nachweis mit Ber-EP4) betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Korrelation zwischen Positivität im immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 im Knochenmark (KM) und klinischen Parametern

Variable	Positivität im ICC Nachweis mit A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 im KM						χ^2 -Test (p-Wert ¹)	
	Gesamt (n=259)		positiv		negativ			
	n	%	n	%	n	%		
UICC-Stadium	I	68	26	14	21	54	79	0,359
	II	67	26	16	24	51	76	
	III	70	27	15	21	55	79	
	IV	54	21	18	33	36	67	
T-Kategorie	I	26	10	5	19	21	81	0,481
	II	64	25	13	20	51	80	
	III	134	52	38	28	96	72	
	IV	35	13	7	20	28	80	
N-Kategorie	0	145	56	32	22	113	78	0,363
	I	64	25	15	23	49	77	
	II	50	19	16	32	34	68	
M-Kategorie	0	205	79	45	22	160	78	0,083
	I	54	21	18	33	36	67	
OP-Radikalität	R0	226	87	55	24	171	76	0,991
	R1 + R2	33	13	8	24	25	76	
OP-Alter	<70Jahre	151	58	41	27	110	73	0,210
	≥70Jahre	108	42	22	20	86	80	
Geschlecht	weiblich	121	47	29	24	92	76	0,900
	männlich	138	53	34	25	104	75	
Tumorlokalisierung	Kolon/Sigma	143	55	34	24	109	76	0,819
	Rektum	116	45	29	25	87	75	

¹p-Wert als Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests berechnet für die jeweilige Variable über alle Strata

Insgesamt erfolgte bei 259 Patienten eine immunzytochemische Analyse disseminierter Tumorzellen mittels der Antikörper A45-B/B3 und/oder Ber-EP4. Keine der untersuchten Variablen zeigte im Chi-Quadrat-Test eine signifikante Korrelation. Dies bedeutet, dass weder das UICC-Stadium ($p=0,359$), die T-Kategorie ($p=0,481$), der Lymphknotenstatus ($p=0,363$), der Metastasierungsstatus ($p=0,083$), die Operationsradikalität ($p=0,991$), das Alter zum Zeitpunkt der Operation ($0,210$), das Geschlecht ($p=0,900$) noch die Tumorlokalisation ($p=0,819$) im untersuchten Kollektiv signifikant korreliert mit einer Positivität im immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen mittels A45-B/B3 und/oder Ber-EP4.

3.3. Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter und zirkulierender Tumorzellen und dem Überleben

Im Folgenden soll der Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA Expression - durch Nachweis mittels RT-PCR - sowie der CK 8, 18 und 19 Expression - durch Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 - und der EpCAM Expression - durch Nachweis mit dem Antikörper Ber-EP4 - auf die Überlebenszeit untersucht werden. Es wurden nur die kurativ behandelten Patienten (R0-Resektion) in die Überlebenszeitanalyse mit einbezogen, da so die prognostische Wertigkeit der verschiedenen Nachweisverfahren klinisch relevant beurteilt werden kann. Da es in dieser Arbeit um einen Vergleich zwischen dem molekularbiologischen und immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen geht, wurden die Ergebnisse für die Untersuchungen mittels RT-PCR und Immunzytochemie zunächst getrennt dargestellt, um sie besser vergleichen zu können. Für die beiden Antikörper, welche für den immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen herangezogen wurden, erfolgte eine getrennte Überlebenszeitanalyse. Beides sind etablierte Antikörper zum Nachweis epithelialer Tumorzellen. Jedoch weisen sie jeweils Marker mit unterschiedlicher biologischer Funktion nach, so dass es sinnvoll ist, sie hinsichtlich ihres möglicherweise unterschiedlichen Zusammenhangs mit dem Überleben getrennt zu untersuchen. Es wurde jeweils auf das Gesamtüberleben, das tumorspezifische Überleben und das rezidivfreie Überleben eingegangen. Die Ergebnisse sind in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Der Vergleich der Überlebensverläufe (positiv getestete Patienten versus negativ getestete Patienten) wurde mit dem Log-Rank Test auf Signifikanz getestet.

Es werden jeweils zunächst alle R0-resezierten Patienten gemeinsam betrachtet. Danach erfolgt eine Stratifizierung nach Tumorlokalisation (Rektum und Kolon/Sigma). Diese Auftrennung erschien uns sinnvoll bei Betrachtung der unterschiedlichen Drainagewege je nach Tumorlokalisation und der unterschiedlichen Standardtherapieverfahren, besonders hinsichtlich neoadjuvanter und adjuvanter Therapie.

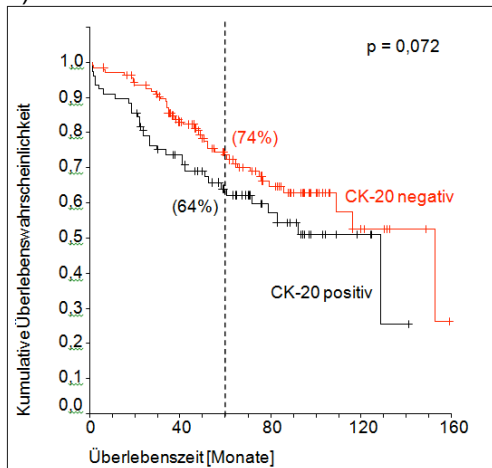
3.3.1. Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und CK 20 mRNA-Expression in Blut und Knochenmark

Zunächst wird der Zusammenhang zwischen der CK 20 Positivität in Blut und Knochenmark und dem Überleben bei allen R0-resezierten Patienten (n=234) untersucht. Bei 213 der 234 R0-resezierten Patienten erfolgte eine CK 20 Analyse im Knochenmark. Hierbei ergab sich bei 77 Patienten (36%) ein positives und bei 136 Patienten (64%) ein negatives Ergebnis. Von den CK 20 positiven Patienten entwickelten 20 und von den CK 20 negativen Patienten entwickelten 30 ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. In Abbildung 19 sind die Überlebenskurven der in den Knochenmarkproben CK 20 mRNA positiv und negativ getesteten Patienten für das Gesamt-, tumorspezifische und rezidivfreie Überleben aufgeführt.

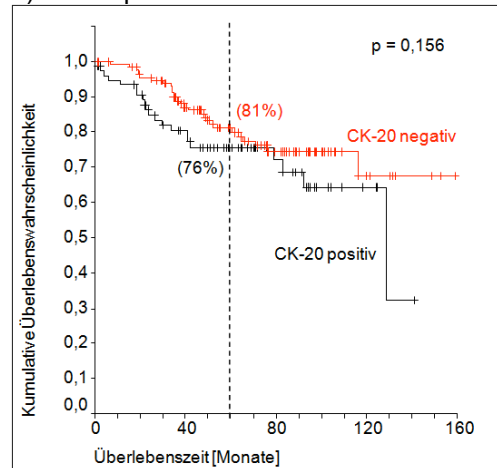
Es zeigt sich jeweils keine signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe der CK 20 positiv getesteten Patienten hinsichtlich der CK 20 negativ getesteten Patienten beim Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben und rezidivfreien Überleben ($p=0,072$; $p=0,156$; $p=0,358$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander, so dass der Unterschied zwischen den Überlebensverläufen der CK 20 positiv und negativ getesteten Patienten nicht groß genug ist, um eine statistische Signifikanz zu zeigen. Entsprechend nahe beieinander liegen die 5-Jahresüberlebensraten, die sich für das Gesamtüberleben mit 74% für die CK 20 positiven Patienten und 64% für die CK 20 negativ getesteten Patienten berechnen ließen.

Knochenmark

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

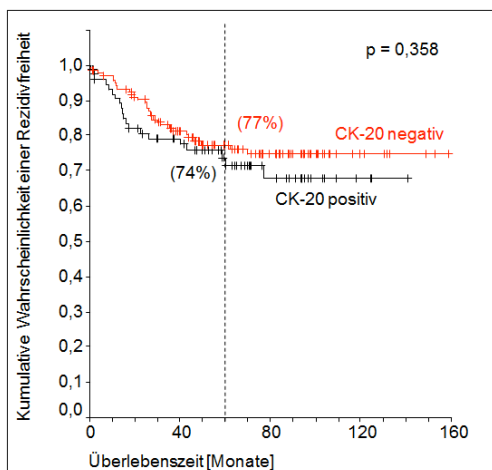


Abbildung 19: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0 resezierten Patienten (Fälle insgesamt= 213; zensierte Fälle a) 138, b) 177, c)163); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

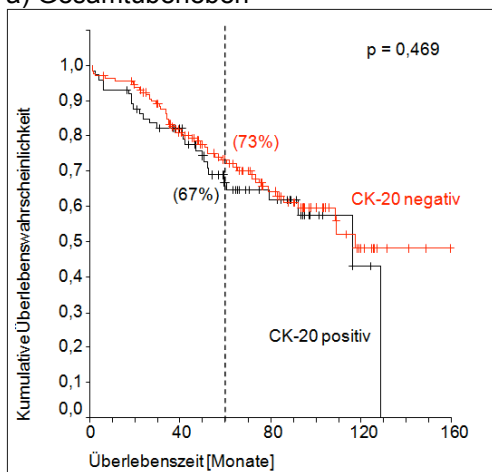
Eine Analyse von CK 20 im Blut erfolgte bei 217 Patienten. Von den 217 Patienten waren 74 (34%) CK 20 positiv und 143 (66%) CK 20 negativ. 20 der positiv getesteten Patienten und 31 der negativ getesteten Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse anhand von Kaplan-Meier-Kurven aufgeführt.

Es besteht jeweils kein signifikanter Zusammenhang zwischen CK 20 Positivität im Blut und Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben und rezidivfreien Überle-

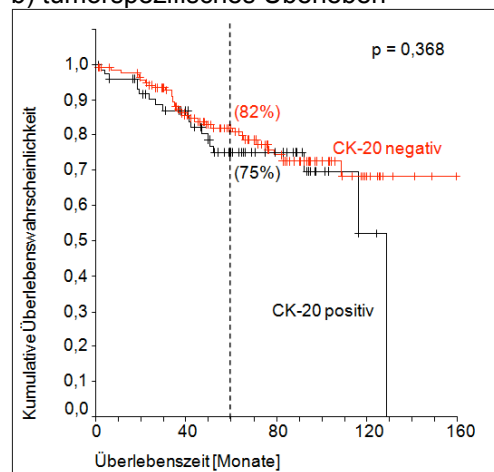
ben ($p=0,469$; $p=0,368$; $p=0,380$). Die Verteilungen überkreuzen sich teilweise sogar, welches schon ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass die Verteilungen nicht unabhängig voneinander sind. Dementsprechend liegen auch die 5-Jahresüberlebensraten sehr nahe beieinander und ließen sich mit 73% für die CK 20 negativen und 67% für die CK 20 positiven Patienten für das Gesamtüberleben berechnen. Die 5-Jahresüberlebensraten für das tumorspezifische- und rezidivfreie Überleben zeigen ähnliche Werte.

Blut

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

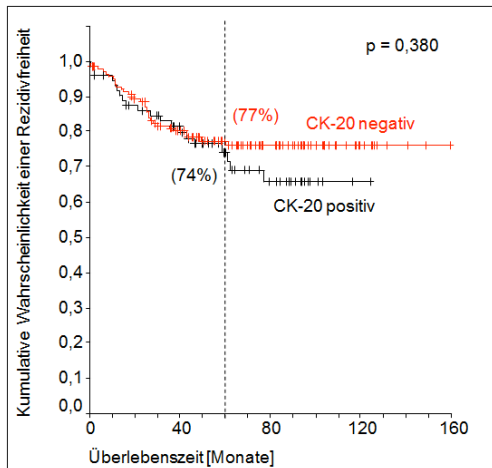
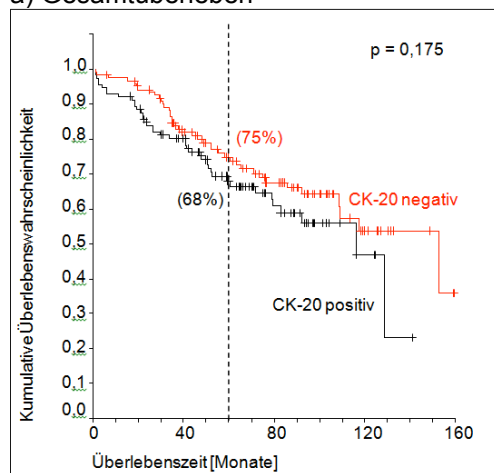


Abbildung 20: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten (Fälle insgesamt= 217; zensierte Fälle: a) 141, b) 167, c) 166); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern; oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

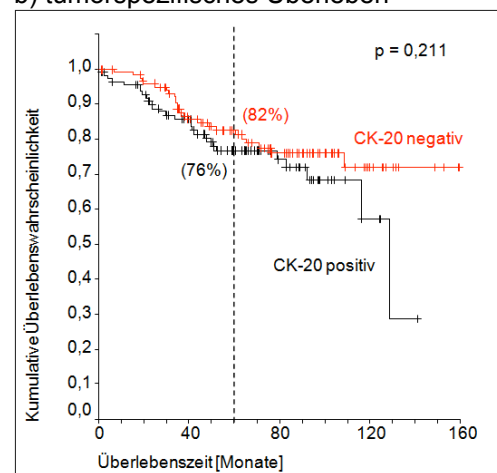
Insgesamt wurden alle 234 Patienten auf CK 20 Positivität in der PCR entweder in Blut oder Knochenmark oder in beiden Kompartimenten getestet. Hierbei zeigte sich bei 113 Patienten (48%) ein positives Ergebnis, wohingegen 121 Patienten (52%) negativ getestet wurden. Von den Patienten mit positivem Ergebnis in der PCR entwickelten 29 Patienten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase, bei den Patienten mit negativem Ergebnis waren es 25. Ein möglicher Zusammenhang dieser CK 20 Positivität mit dem Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben und rezidivfreien Überleben ist in Abbildung 21 anhand von Kaplan-Meier Analysen dargestellt.

Blut und/oder Knochenmark

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

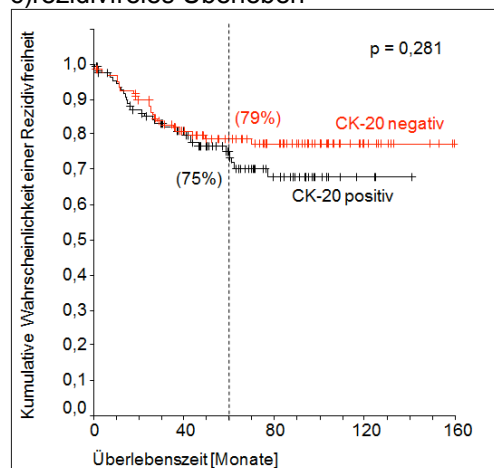


Abbildung 21: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität in Knochenmark und/oder Blut und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten (Fälle insgesamt = 234; zensierte Fälle: a) 153, b) 181, c) 180); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Auch bei Betrachtung der 234 Patienten, die auf CK 20 Positivität in der PCR entweder in Blut oder Knochenmark oder in beiden Kompartimenten getestet wurden, zeigten sich jeweils keine signifikant unterschiedlichen Verteilungen der Überlebensverläufe der CK 20 positiv getesteten sowie negativ getesteten Patienten beim Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben und rezidivfreien Überleben ($p=0,175$; $p=0,211$; $p=0,281$). Die Verteilungen liegen auch hier sehr nahe beieinander, so dass der Unterschied zwischen den Überlebensverläufen der CK 20 positiv und der CK 20 negativ getesteten Patienten nicht groß genug ist, um eine statistische Signifikanz zu zeigen. Die 5-Jahresüberlebensrate, bezogen auf das Gesamtüberleben, beträgt 75% für die negativ getesteten und 68% für die positiv getesteten Patienten. Die 5-Jahresüberlebensraten für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben zeigen ähnlich nahe beieinander liegende Werte.

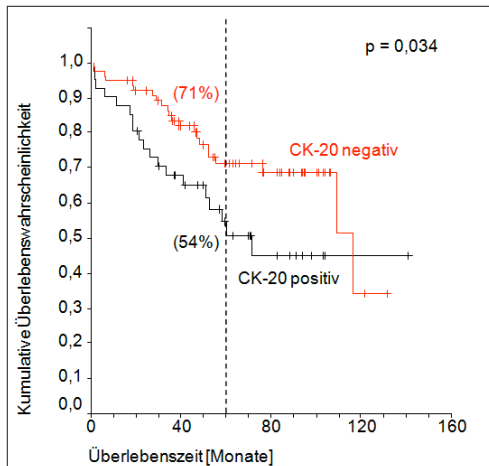
3.3.1.1. Tumorlokalisierung im Kolon/Sigma

Um eventuelle Unterschiede hinsichtlich der prognostischen Relevanz des Nachweises von disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit Kolon/Sigma-Karzinom zu der bei Patienten mit Rektumkarzinom zu analysieren, werden diese beiden Gruppen getrennt betrachtet.

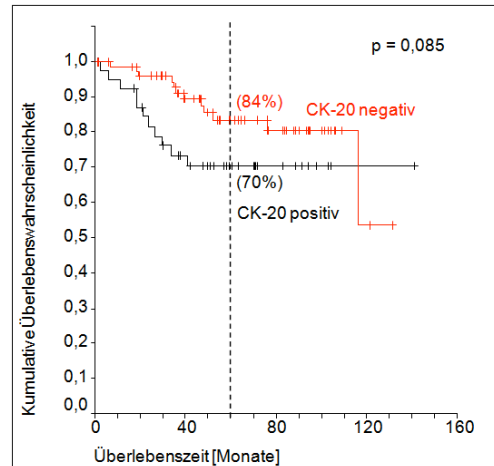
Zunächst wird der Zusammenhang der CK 20 mRNA-Expression in Blut und Knochenmark mit dem Überleben bei allen R0-resizierten Patienten mit Kolon-/Sigma-Karzinom ($n=128$) untersucht. Bei 117 der 128 Patienten wurde eine CK 20 mRNA Analyse im Knochenmark durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei 41 Patienten (35%) ein positives und bei 76 Patienten (65%) ein negatives Ergebnis. Bei den CK 20 positiv getesteten Patienten entwickelten acht und bei den negativ getesteten Patienten entwickelten 13 Patienten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse sind in Abbildung 22 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

Knochenmark

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

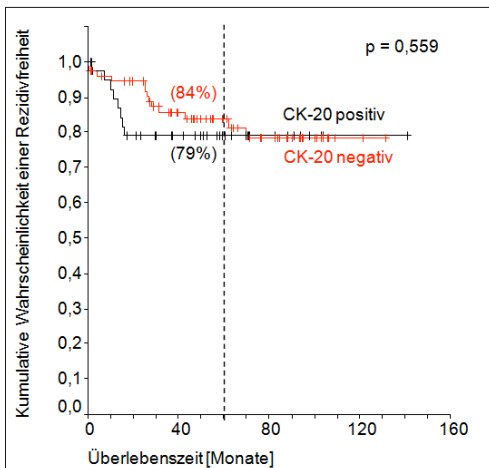


Abbildung 22. Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität in Knochenmark und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung in Kolon/Sigma (Fälle insgesamt= 117; zensierte Fälle a) 76, b) 94, c) 96); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Folgende Zusammenhänge sind anhand der Graphiken zu erkennen:

- a) **Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Knochenmark und dem Gesamtüberleben (Abbildung 22a):** Patienten mit einem positivem CK 20 RT-PCR Ergebnis im Knochenmark haben eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit als negativ getestete Patienten ($p = 0,034$). Die Graphen gehen zunächst scherenartig auseinander, wobei die Überlebensverläufe der

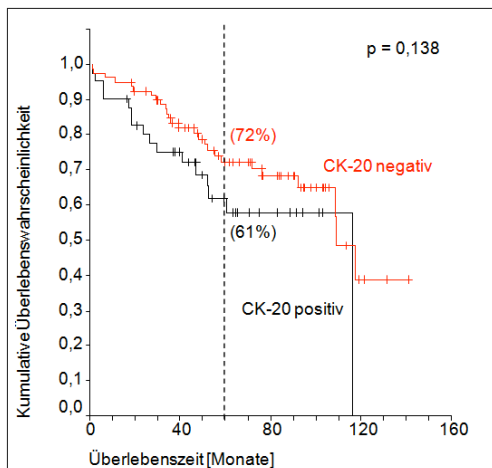
CK 20 positiven Patienten unterhalb der Überlebensverläufe der CK 20 negativen Patienten liegen und steiler abfallen. Nach einem Beobachtungszeitraum von 110 Monaten lässt sich aufgrund des Versterbens von zwei Patienten aus dem Kollektiv ein steiler Abfall der Überlebenswahrscheinlichkeit der bis dahin noch lebenden CK 20 negativen Patienten feststellen. Im Zeitraum von 5 Jahren nach Operation ergaben sich deutlich unterschiedliche Verläufe der jeweiligen Überlebenswahrscheinlichkeit, aus der sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 71 % für die CK 20 negativen Patienten und von 54% für die CK 20 positiv getesteten Patienten errechnen ließ.

- b) Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Knochenmark und dem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 22b):** Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang, jedoch ist bei Betrachtung der Überlebensverläufe ein Trend in Richtung kürzeren Überlebens der CK 20 positiven Patienten klar zu erkennen ($p=0,085$). Der Verlauf der Überlebenswahrscheinlichkeit der CK 20 positiven Patienten liegt bis zur Nachbeobachtungszeit von 118 Monaten unterhalb des Verlaufs der Überlebenswahrscheinlichkeit der CK 20 negativen Patienten und ist in dem Beobachtungszeitraum zwischen 20 und 43 Monaten deutlich steiler abfallend. Nach einem Beobachtungszeitraum von 118 Monaten kreuzt die Kurve der CK 20 Negativen die Kurve der CK 20 Positiven und verläuft dann bis zum Abschluss der Nachbeobachtungszeit unter dieser. Es ergeben sich 5-Jahresüberlebensraten von 84% für die negativ getesteten und von 70% für die positiv getesteten Patienten.
- c) Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben (Abbildung 22c):** Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,559$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander und überkreuzen sich sogar nach einer rezidivfreien Überlebenszeit von 74 Monaten. Ein positives Ergebnis in der CK 20 RT-PCR im Knochenmark zeigt somit keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastase. Die errechnete rezidivfreie 5-Jahresüberlebensrate beträgt für die CK 20 positiv getesteten Patienten 79% und für die CK 20 negativ getesteten Patienten 84%.

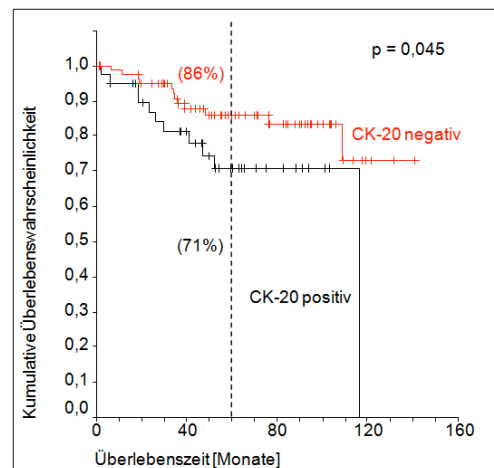
Bei 122 Patienten erfolgte ein CK 20 Nachweis im Blut. Von den 122 Patienten zeigten 41 Patienten (34%) ein positives und 81 Patienten (66%) ein negatives Ergebnis. Zehn der für CK 20 positiv getesteten Patienten und 11 der negativ getesteten Patienten entwickelten im Verlauf ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse aufgeführt.

Blut

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

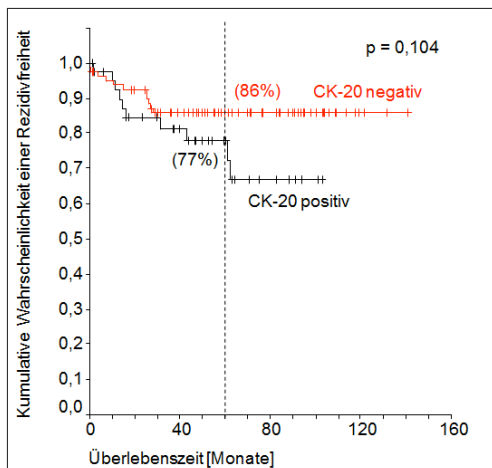


Abbildung 23: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung in Kolon/Sigma (Fälle insgesamt = 122; zensierte Fälle a) 80, b) 99, c) 101); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Folgende Ergebnisse ergeben sich aus den Graphiken:

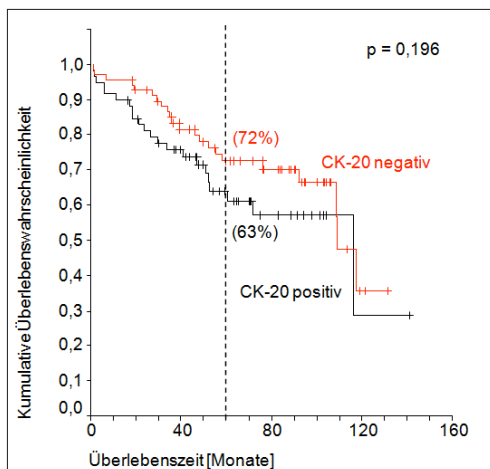
- a) **Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Blut und dem Gesamtüberleben (Abbildung 23a):** Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,138$). Bei Betrachtung der Überlebensverläufe ist jedoch ein Trend in Richtung kürzeren Überlebens der CK 20 positiven Patienten zu erkennen. Der Graph der CK 20 positiven Patienten verläuft im Beobachtungszeitraum bis 110 Monate unterhalb des Graphen der CK 20 negativen Patienten. Nach einem Beobachtungszeitraum von 110 Monaten kreuzen sich die Überlebensverläufe, so dass der Graph der CK 20 Positiven für kurze Zeit über dem Graphen der CK 20 Negativen verläuft. Nach einem Beobachtungszeitraum von 117 Monaten sind alle CK 20 positiv getesteten Patienten verstorben. Die 5-Jahresüberlebensrate für die CK 20 negativ getesteten Patienten beträgt 72%, während von den CK 20 positiv getesteten Patienten nach 5 Jahren nur noch 61% leben.
- b) **Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Blut und dem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 23b):** Patienten mit einem CK 20 positiven RT-PCR Ergebnis im Blut haben eine signifikant kürzere tumorspezifische Überlebenszeit als negativ getestete Patienten ($p=0,045$). Die Kurve der CK 20 positiven Patienten verläuft stets unterhalb der Kurve der CK 20 negativen Patienten. Nach einem Beobachtungszeitraum von 117 Monaten sind alle CK 20 positiv getesteten Patienten verstorben. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt für die CK 20 negativen Patienten 86% und für die CK 20 Positiven 71%.
- c) **Zusammenhang zwischen der CK 20 mRNA-Expression im Blut und dem rezidivfreien Überleben (Abbildung 23c):** Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p= 0,104$). Die Verteilungen liegen zunächst sehr nahe beieinander, gehen dann aber nach einem Beobachtungszeitraum von 36 Monaten scherenartig auseinander, so dass sich im Zeitraum von 5 Jahren nach Operation deutlich unterschiedliche rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten ergaben, aus der sich rezidivfreie 5-Jahresüberlebensraten von 86% für die CK 20 negativ getesteten Patienten und 77% für die CK 20 positiven errechnen ließen.

Insgesamt wurden alle 128 Patienten auf CK 20 mRNA-Expression in der PCR entweder im Blut oder im Knochenmark oder in beiden Kompartimenten getestet. Von

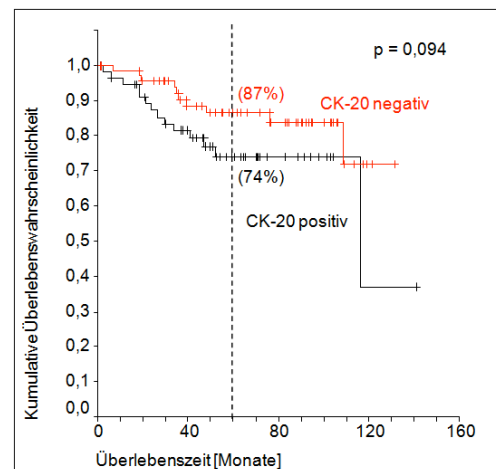
den 128 Patienten zeigten 59 (46%) ein positives und 69 (54%) ein negatives Ergebnis in der CK 20 mRNA Analyse. Hierbei entwickelten 12 der positiv getesteten und 10 der negativ getesteten Patienten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Der Zusammenhang zwischen Positivität in der CK 20 RT-PCR und dem Gesamtüberleben, dem tumorspezifischen Überleben und dem rezidivfreien Überleben ist in Abbildung 24 für die kombinierte Auswertung von Blut und Knochenmark dargestellt.

Blut und/oder Knochenmark

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

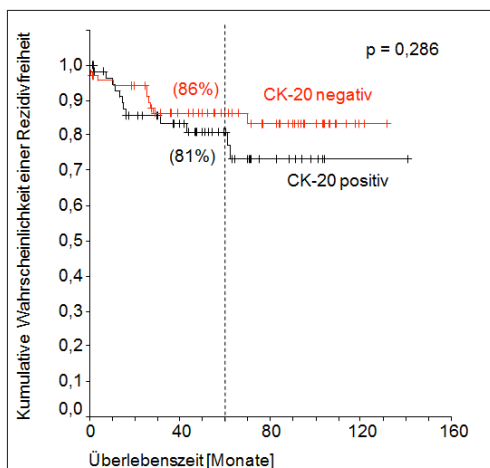


Abbildung 24: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität im Blut und/oder Knochenmark und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation in Kolon/Sigma (Fälle insgesamt = 128; zensierte Fälle a) 84, b) 104, c) 106); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Folgende Zusammenhänge sind anhand der Graphiken zu erkennen:

- a + b) Zusammenhang zwischen CK 20 Positivität im Blut und/oder Knochenmark und dem Gesamtüberleben sowie dem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 24a und b):** Es besteht jeweils kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,196/p=0,094$), jedoch ist bei Betrachtung der Überlebensverläufe ein Trend in Richtung kürzeren Überlebens der CK 20 positiven Patienten zu erkennen. Die Überlebensverläufe der CK 20 positiven Patienten liegen in beiden Graphiken bis zum Beobachtungszeitraum von 110 Monaten unterhalb der Überlebensverläufe der CK 20 negativen Patienten. Nach einem Beobachtungszeitraum von 110 Monaten kreuzen sich die beiden Kurven aufgrund des Versterbens eines Patienten aus dem Kollektiv. Beim Gesamtüberleben beträgt die 5-Jahresüberlebensrate für die CK 20 positiven Patienten 63% und für die CK 20 negativen Patienten 72%. Beim tumorspezifischen Überleben zeigt sich für die CK 20 Positiven eine 5-Jahresüberlebensrate von 74% und für die CK 20 Negativen von 87%.
- c) Zusammenhang zwischen CK 20 Positivität im Knochenmark und/oder Blut und dem rezidivfreien Überleben (Abbildung 24c):** Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,286$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander. Ab einem Beobachtungszeitraum von 11 Monaten verläuft der Graph der CK 20 positiven stets unterhalb des Graphen der CK 20 negativen Patienten. Die rezidivfreien 5-Jahresüberlebensraten ließen sich für die CK 20 positiven Patienten mit 81% und für die CK 20 negativen Patienten 86% berechnen.

3.3.1.2. Tumorlokalisierung im Rektum

Insgesamt wurden Blut- und Knochenmarkproben von 106 R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum mittels RT-PCR auf CK 20 mRNA-Expression untersucht. Bei 96 der 106 Patienten wurde eine CK 20 Analyse im Knochenmark durchgeführt. Von den 96 Patienten zeigten 36 (38%) ein positives und 60 (62%) ein negatives Ergebnis in der CK 20 RT-PCR. 12 der positiv und 17 der negativ getesteten Patienten entwickelten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Bei 95 Patienten erfolgte eine Analyse im Blut. Von den 95 Patienten waren 33 Patienten (35%) CK 20 positiv und 62 Patienten (65%) CK 20 negativ. Hierbei entwickelten 10 der positiv getesteten Patienten und 20 der

negativ getesteten Patienten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums. Insgesamt wurden alle 106 Patienten auf CK 20 mRNA-Expression in der PCR entweder im Blut oder im Knochenmark oder in beiden Kompartimenten getestet. Ein positives Ergebnis in der CK 20 RT-PCR ergab sich hierbei für 54 Patienten (51%), während 52 Patienten (49%) ein negatives Ergebnis zeigten. 17 der positiv getesteten Patienten und 15 der negativ getesteten Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums.

Die Analysen der Überlebenszeiten ergaben weder im Blut noch im Knochenmark eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe der CK 20 positiv und negativ getesteten Patienten beim Gesamtüberleben, tumorspezifischen Überleben sowie rezidivfreien Überleben. Exemplarisch sind in Abbildung 25 die Überlebensverläufe der im Knochenmark negativ bzw. positiv getesteten Patienten bezogen auf das Gesamtüberleben dargestellt.

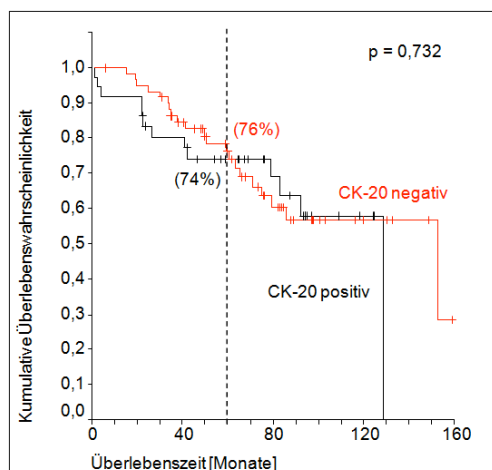


Abbildung 25.: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der CK 20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum (Fälle insgesamt= 96; zensierte Fälle: 62); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der CK 20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum ($p=0,732$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander und die 5-Jahresüberlebensraten unterscheiden sich nur gering. Für die

CK 20 positiv getesteten Patienten ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 74% und von den CK 20 negativen Patienten leben nach 5 Jahren noch 76%.

In Tabelle 10 sind die p-Werte, die 5-Jahresüberlebensraten und die Fallzahlen für das Kollektiv der R0-resezierten Rektum-Patienten jeweils für das Gesamtüberleben, tumorspezifische Überleben und rezidivfreie Überleben dargestellt. Es zeigt sich keine signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe der CK 20 positiv getesteten Patienten hinsichtlich der CK 20 negativ getesteten Patienten. Auch hinsichtlich der 5-Jahresüberlebensrate ergeben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den CK 20 positiv und negativ getesteten Patienten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ergebnis der CK 20 RT-PCR für die R0-resezierten Rektumpatienten keine prognostische Relevanz bezogen auf die Überlebenszeit hat. Das gilt sowohl für das Gesamtüberleben, als auch für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben.

Tabelle 10: Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse der CK 20 positiv und negativ getesteten Patienten im Knochenmark, Blut und Blut und/oder Knochenmark bezogen auf das a) Gesamtüberleben, b) tumorspezifische Überleben und c) rezidivfreie Überleben bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum

a) Gesamtüberleben

Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Ergebnis für CK 20 Nachweis [n]		5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
KM ³	96	62	positiv	36	74	0,732
			negativ	60	76	
Blut	95	61	positiv	33	73	0,602
			negativ	62	74	
Blut und/oder KM ³	106	69	positiv	54	72	0,559
			negativ	52	77	

b) tumorspezifisches Überleben

Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Ergebnis für CK 20 Nachweis [n]		5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
			positiv	negativ		
KM ³	96	70	positiv	36	81	0,810
			negativ	60	78	
Blut	95	68	positiv	33	80	0,455
			negativ	62	77	
Blut und/oder KM ³	106	77	positiv	54	79	0,971
			negativ	52	77	

c) rezidivfreies Überleben

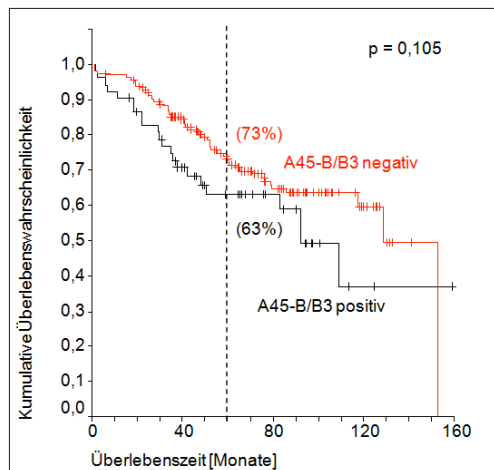
Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Ergebnis für CK 20 Nachweis [n]		Patienten mit Lokalrezidiv / Metastase [n]	5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
			positiv	negativ			
KM ³	96	67	positiv	36	12	70	0,571
			negativ	60	17	70	
Blut	95	65	positiv	33	10	71	0,668
			negativ	62	20	67	
Blut und/oder KM ³	106	74	positiv	54	17	70	0,759
			negativ	52	15	70	

¹ 5-JÜR= 5-Jahresüberlebensrate; ² p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; ³ KM= Knochenmark

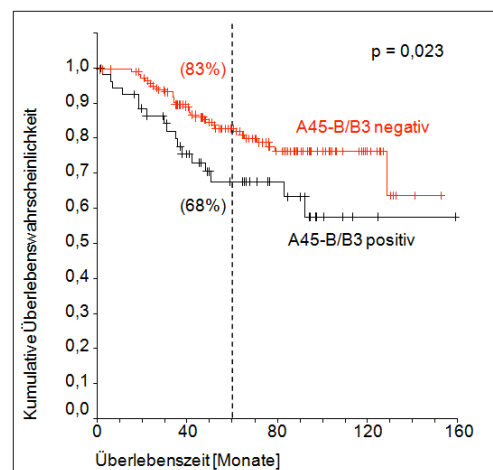
3.3.2. Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und Zytokeratinnexpression im Knochenmark (Antikörper A45-B/B3)

Neben dem molekularbiologischen Nachweis erfolgte auch ein immunzytochemischer Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark unter Verwendung des Panzytokeratinantikörpers A45-B/B3 und/oder des Antikörpers Ber-EP4, der gegen das Zelloberflächenglykoprotein EpCAM gerichtet ist. Die Überlebenszeitanalyse wurde getrennt für den Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Antikörper Ber-EP4 durchgeführt. Zunächst wird der Zusammenhang zwischen der CK 8, 18 und 19 Expression im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 im Knochenmark und dem Überleben bei allen R0-resizierten Patienten (n=219) dargestellt. Von den 219 untersuchten Patienten zeigte sich bei 53 (24%) ein positives Ergebnis im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und bei 166 (76%) ein negatives Ergebnis. 17 der positiv getesteten und 34 der negativ getesteten Patienten entwickelten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 in Form von Kaplan-Meier-Kurven abgebildet.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

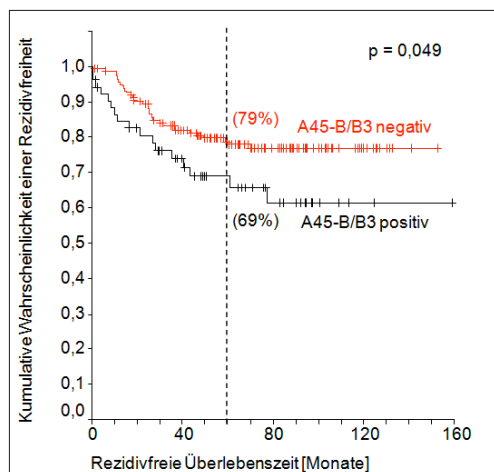


Abbildung 26: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten (Fälle insgesamt = 219; zensierte Fälle a)144 , b) 170, c)168); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Folgende Zusammenhänge sind anhand der Graphiken zu erkennen:

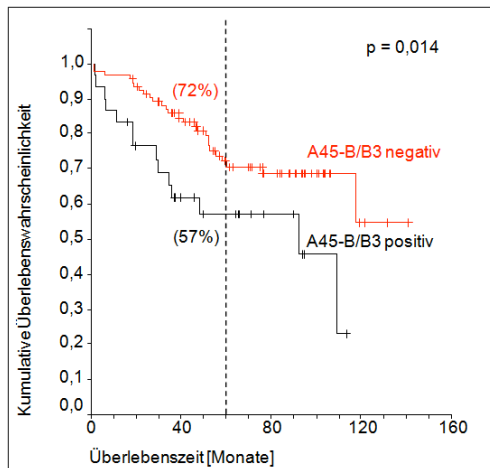
- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben (Abbildung 26a):** Die Kurve der positiv getesteten Patienten verläuft stets unterhalb der Kurve der negativ getesteten Patienten. Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit wurde mit 63% für die positiv getesteten Patienten und 73% für die negativ getesteten Patienten bestimmt, statistisch nach dem Log-Rank Test sind die Überlebensverläufe aber nicht verschieden ($p=0,105$).

- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 26b):** Patienten mit einem positiven Ergebnis im Nachweis mit A45-B/B3 haben eine statistisch signifikant kürzere tumorspezifische Überlebenszeit als negativ getestete Patienten ($p=0,023$). Die Kurven gehen scherenartig auseinander und die Kurve der positiv getesteten Patienten liegt stets unterhalb der Kurve der negativ getesteten Patienten. Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt 68% für die positiv getesteten Patienten und 83% für Patienten mit negativem Ergebnis im immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3.
- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem rezidivfreien Überleben (Abbildung 26c):** Patienten mit einem positiven Ergebnis im Nachweis mit A45-B/B3 haben eine statistisch signifikant kürzere rezidivfreie Überlebenszeit als negativ getestete Patienten ($p=0,049$). Die Überlebensverläufe gehen auch hier scherenartig auseinander und die Kurve der positiven Patienten liegt stets unterhalb der Kurve der negativen Patienten. Bei den positiv getesteten Patienten ließ sich eine 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 69% berechnen, während von den negativ getesteten Patienten nach 5 Jahren noch 79% leben.

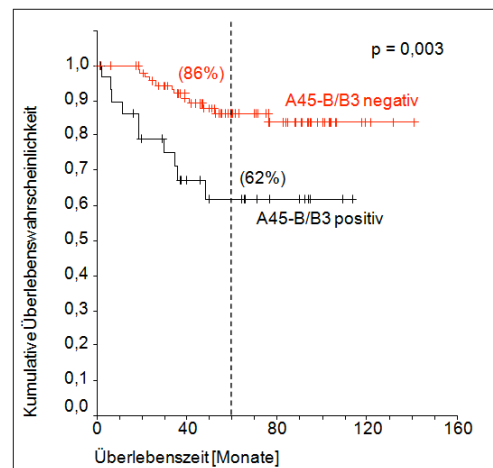
3.3.2.1. Tumorlokalisierung im Kolon/Sigma

Im Weiteren erfolgt analog zu den Analysen durch CK 20 RT-PCR eine Stratifizierung hinsichtlich der Tumorlokalisierung. Zunächst wird der Einfluss der Positivität in der immunzytochemischen Analyse mit dem Antikörper A45-B/B3 auf das Überleben bei R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung im Kolon/Sigma ($n=124$) dargestellt. Von den 124 untersuchten Patienten zeigten 30 (24%) ein positives und 94 (76%) ein negatives Ergebnis in der Analyse mit dem Antikörper A45-B/B3. Neun der positiv getesteten und 12 der negativ getesteten entwickelten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse sind in Abbildung 27 in Form von Kaplan-Meier Kurven dargestellt.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

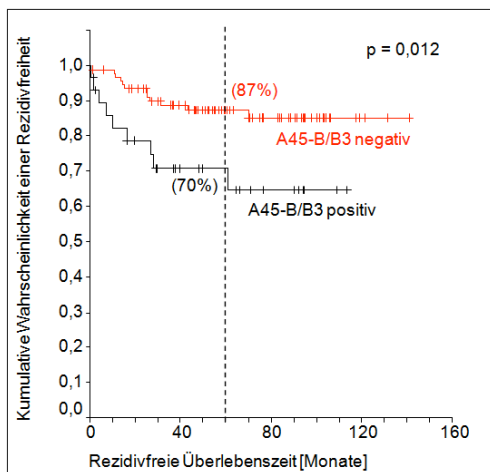


Abbildung 27: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon/Sigma (Fälle insgesamt = 124; zensierte Fälle a) 84, b) 102, c) 103); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Folgende Zusammenhänge sind anhand der Graphiken zu erkennen:

- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben (Abbildung 27a):** Patienten mit einem positiven Ergebnis im Nachweis mit A45-B/B3 leben statistisch signifikant kürzer als negativ getestete Patienten ($p=0,014$). Die Überlebensverläufe gehen scherenartig auseinander und der Graph der negativ getesteten Patienten

verläuft stets oberhalb des Graphen der positiv getesteten Patienten. Daraus ergeben sich deutlich unterschiedliche 5-Jahresüberlebensraten von 72% für die im Nachweis mit A45-B/B3 negativen Patienten und 57% für die positiv getesteten Patienten.

- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 27b):** Auch hier zeigt sich eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebenswahrscheinlichkeit der positiv getesteten Patienten hinsichtlich der negativ getesteten Patienten ($p=0,003$). Die Überlebensverläufe gehen scherenartig auseinander und die negativ getesteten Patienten leben zu jedem Zeitpunkt der Beobachtung kürzer als die positiv getesteten Patienten. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt für die negativ getesteten Patienten 86% und 62% für die positiven Patienten.
- **Zusammenhang zwischen Positivität im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem rezidivfreien Überleben (Abbildung 27c):** Patienten mit einem positiven Ergebnis im Nachweis mit A45-B/B3 entwickeln im Nachbeobachtungszeitraum statistisch signifikant häufiger ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase als negativ getestete Patienten ($p=0,012$). Die Überlebensverläufe gehen scherenartig auseinander und der Graph der negativ getesteten Patienten verläuft stets oberhalb des Graphen der positiv getesteten Patienten. Hieraus ließ sich eine rezidivfreie 5-Jahresüberlebensrate von 87% für die negativen und 70% für die positiven Patienten berechnen.

3.3.2.2. Tumorlokalisierung im Rektum

Insgesamt wurden Knochenmarkproben von 95 R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum auf Zytokeratinexpression in der immunzytochemischen Analyse mit dem Antikörper A45-B/B3 untersucht. Ein positives Ergebnis ergab sich hierbei für 23 Patienten (24%), während 72 Patienten (76%) negativ getestet wurden. Acht der positiv getesteten Patienten und 22 der negativ getesteten Patienten entwickelten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase.

In der Überlebenszeitanalyse ergab sich weder für das Gesamtüberleben noch für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe der positiv getesteten Patienten hinsichtlich der

negativ getesteten Patienten. Exemplarisch für dieses Kollektiv erfolgt in Abbildung 28 eine Darstellung der Überlebensverläufe der im Knochenmark negativ bzw. positiv getesteten Patienten bezogen auf das Gesamtüberleben.

a) Gesamtüberleben

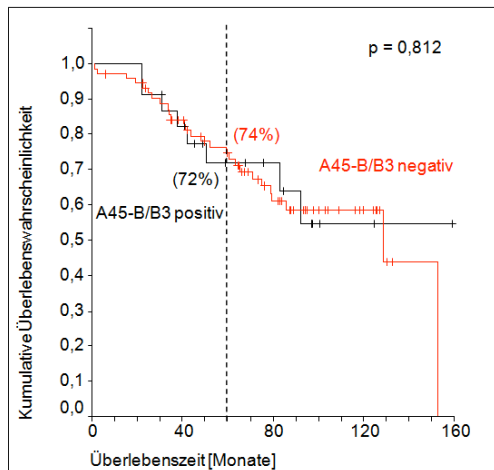


Abbildung 28: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorkolonisation im Rektum (Fälle insgesamt = 95; zensierte Fälle: 60); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zytokeratin-positiv und –negativ getesteten Patienten ($p=0,812$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander und überkreuzen sich. Die 5-Jahresüberlebensraten unterscheiden sich nur gering. Für die in der immunzytochemischen Analyse mit dem Antikörper A45-B/B3 positiv getesteten Patienten ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 72% und von den negativ getesteten Patienten leben nach 5 Jahren noch 74%.

In Tabelle 11 sind die p-Werte, die 5-Jahresüberlebensraten und die Fallzahlen für das Kollektiv der R0-resezierten Rektum-Patienten jeweils für das Gesamtüberleben, tumorspezifische Überleben und rezidivfreie Überleben dargestellt. Es zeigt sich jeweils keine signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe der positiv getesteten Patienten hinsichtlich der negativ getesteten Patienten. Auch hinsichtlich der 5-Jahresüberlebensrate ergeben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den positiv und negativ getesteten Patienten. Zusammenfassend lässt sich sagen,

dass das Ergebnis der immunzytochemischen Analyse mit dem Antikörper A45-B/B3 für die R0-resezierten Rektumpatienten keine prognostische Relevanz hat. Das gilt sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben.

Tabelle 11: Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse der in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper A45-B/B3 positiv und negativ getesteten Patienten bezogen auf das a) Gesamtüberleben, b) tumorspezifische Überleben und c) rezidivfreie Überleben bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum

a) Gesamtüberleben

Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Immunzytochemische Analyse mit A45-B/B3 [n]		5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
KM ³	95	60	positiv	23	72	0,812
			negativ	72	74	

b) Tumorspezifisches Überleben

Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Immunzytochemische Analyse mit A45-B/B3 [n]		5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
KM ³	95	68	positiv	23	75	0,803
			negativ	72	78	

c) Rezidivfreies Überleben

Kompartiment	n	Zensierte Fälle [n]	Immunzytochemische Analyse mit A45-B/B3 [n]		Patienten mit Lokalrezidiv / Metastase [n]	5-JÜR ¹ [%]	p-Wert ²
KM ³	95	65	positiv	23	8	68	0,747
			negativ	72	22	69	

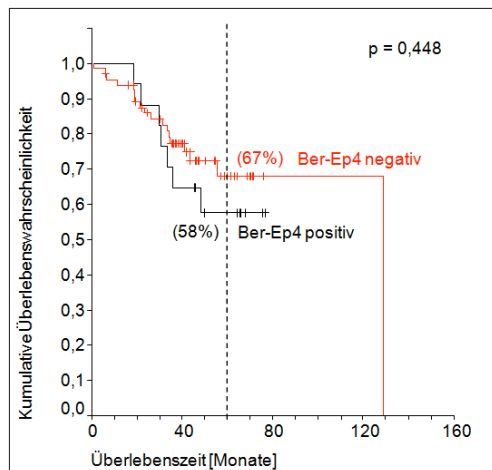
¹ 5-JÜR= 5-Jahresüberlebensrate; ² p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; ³ KM= Knochenmark

3.3.3. Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und EpCAM-Expression im Knochenmark (Antikörper Ber-EP4)

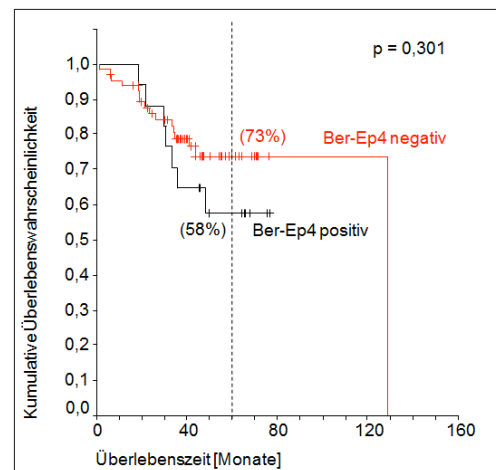
Neben dem Zytokeratinnachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 erfolgte in dieser Arbeit ein immunzytochemischer Nachweis mit dem Antikörper Ber-EP4. Der Antikörper Ber-EP4 reagiert mit dem Zelloberflächenglykoprotein EpCAM. EpCAM ist ein epithelspezifisches Antigen, welches in Epithelzellen weit verbreitet ist und eine in hohem Maße konservierte Expression in Karzinomen zeigt (Momburg et al. 1987, Latza et al. 1990). In diesem Kapitel werden die Ergebnisse für den Nachweis des Zelloberflächenglykoproteins EpCAM mit Hilfe des Antikörpers Ber-EP4 im Knochenmark mittels immunzytochemischem Nachweisverfahren dargestellt. Auch hierbei wurden sowohl alle R0-resezierten Patienten gemeinsam betrachtet (n= 83) als auch nach Tumorlokalisierung stratifiziert. Bei den 83 untersuchten R0-resezierten Patienten ergab sich bei 17 Patienten (20%) ein positives und bei 66 Patienten (80%) ein negatives Ergebnis. Von den positiv getesteten Patienten entwickelten acht und von den negativ getesteten 18 ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase im Nachbeobachtungszeitraum. Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse sind in Abbildung 29 dargestellt.

Beim Nachweis mittels Ber-EP4 zeigte sich weder beim Gesamtüberleben, noch beim tumorspezifischen und rezidivfreien Überleben eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung in den Überlebensverläufen der positiv und negativ getesteten Patienten ($p=0,448$; $p=0,301$; $p=0,246$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander und überkreuzen sich mehrfach.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

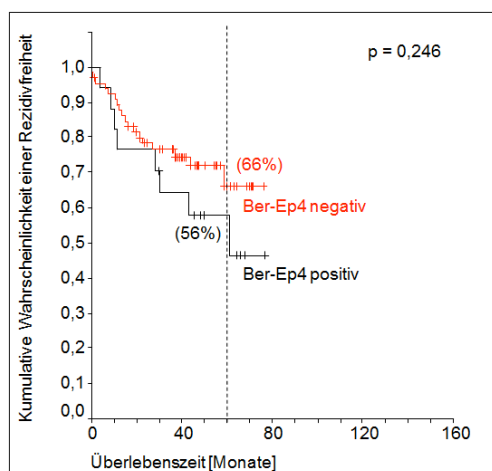


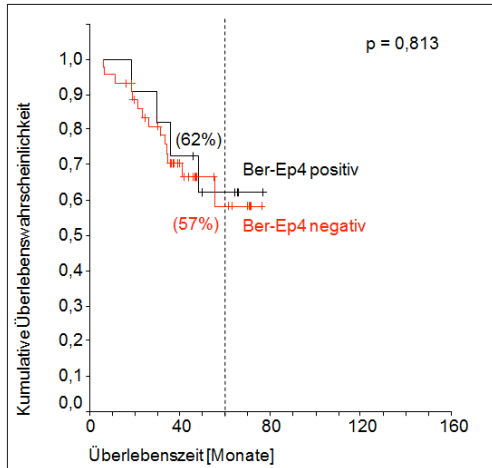
Abbildung 29: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper Ber-EP4 und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten (Fälle insgesamt = 83 zensierte Fälle a) 58, b) 60, c) 57); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

3.3.3.1. Tumorlokalisierung im Kolon/Sigma

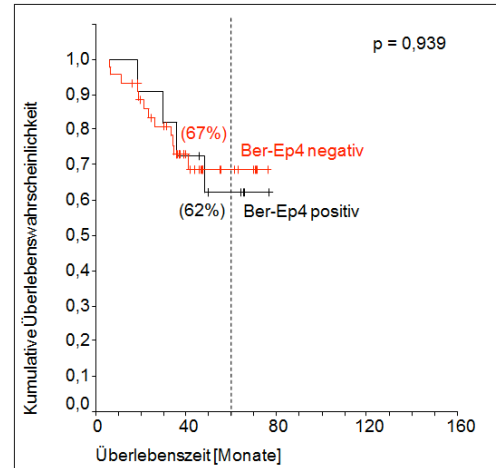
Insgesamt wurden Knochenmarkproben von 55 R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung im Kolon/Sigma auf EpCAM-Expression in der immunzytochemischen Analyse mit dem Antikörper Ber-EP4 untersucht. Elf (20%) der 55 Patienten zeigten hierbei ein positives und 44 (80%) ein negatives Ergebnis. Von den positiv getesteten Patienten entwickelten vier und von den negativ getesteten zeigten zehn Patien-

ten in der Nachbeobachtungszeit ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse sind in Abbildung 30 dargestellt.

a) Gesamtüberleben



b) tumorspezifisches Überleben



c) rezidivfreies Überleben

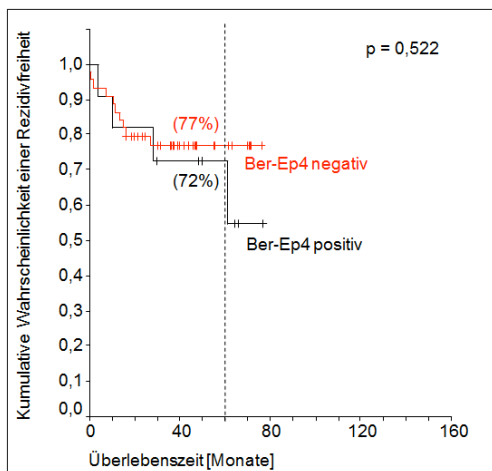


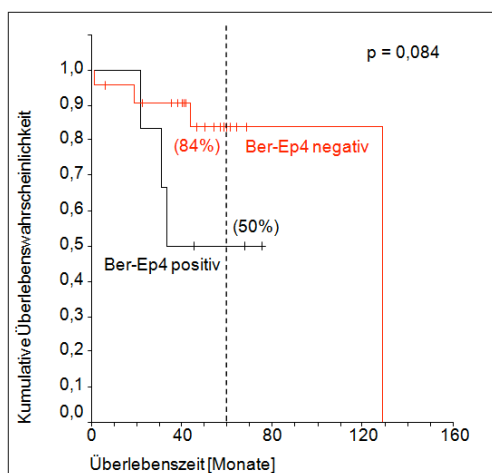
Abbildung 30: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper Ber-EP4 und dem Gesamtüberleben (a), tumorspezifischen Überleben (b) und rezidivfreien Überleben (c) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon/Sigma (Fälle insgesamt = 55; zensierte Fälle a) 37, b) 39, c) 41); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Auch hier ergab sich weder beim Gesamtüberleben noch beim tumorspezifischen und rezidivfreien Überleben eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung der Überlebensverläufe von positiv getesteten Patienten und negativ getesteten Patienten ($p=0,813$; $p=0,939$; $p=0,522$). Die Verteilungen liegen sehr nahe beieinander und überkreuzen sich mehrfach.

3.3.3.2. Tumorlokalisation im Rektum

Bei 28 R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum erfolgte eine immunzytochemische Analyse von Knochenmarkproben auf EpCAM-Expression mit dem Antikörper Ber-EP4. Von den 28 untersuchten Patienten zeigten sechs (21%) ein positives und 22 (79%) ein negatives Ergebnis. Vier der positiv getesteten und acht der negativ getesteten Patienten entwickelten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase. Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse sind in Abbildung 31 dargestellt. Hierbei ergaben sich für das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben die gleichen Ergebnisse, da in diesem Teilkollektiv alle verstorbenen Patienten aufgrund der Tumorerkrankung verstorben sind.

a) Gesamt-/ tumorspezifisches Überleben



b) rezidivfreies Überleben

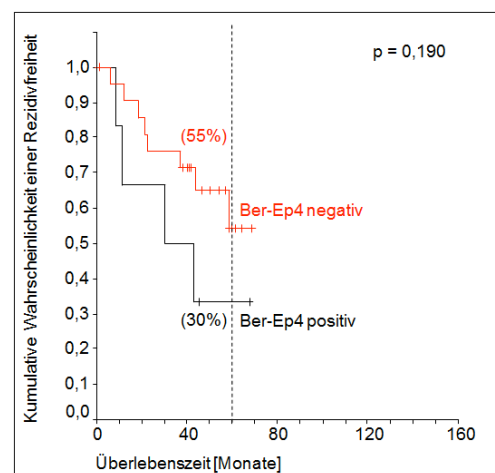


Abbildung 31: Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Positivität in der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper Ber-EP4 und dem Gesamt- und tumorspezifischen Überleben (a) und dem rezidivfreien Überleben (b) bei allen R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum (Fälle insgesamt = 28; zensierte Fälle a) 21, b) 16); gestrichelte Linie bei 60 Monaten: 5-Jahresüberlebensraten in Klammern, oben rechts in der Ecke: p-Wert als Ergebnis des Log-Rank Tests; kleine senkrechte Striche auf den Kaplan-Meier-Kurven: zensierte Fälle.

Sowohl beim Gesamt- und tumorspezifischen Überleben als auch beim rezidivfreien Überleben verläuft der Graph der positiv getesteten Patienten zunächst oberhalb des Graphen der negativ getesteten Patienten. Nach 10 bis 20 Monaten kreuzt dann der Graph der im Nachweis mit Ber-EP4 positiv getesteten Patienten den der negativ getesteten und verläuft von nun an unterhalb dieses Graphen. Obgleich die Kurven-

verläufe einen Unterschied hinsichtlich der Überlebensverläufe von negativ getesteten und positiv getesteten Patienten vermuten lassen, sind die Überlebensverläufe bei diesem sehr kleinen Teilkollektiv mit hohen Zensierungsdaten statistisch nach dem Log-Rank Test nicht signifikant verschieden ($p=0,084$; $p=0,190$).

3.4. Ergebnisse der multivariaten Analyse

Um zu prüfen, ob die untersuchten Variablen unabhängige prognostische Faktoren für das Überleben darstellen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Hierfür wurden nur Variablen herangezogen, die in der univariaten Analyse signifikant mit der Überlebenszeit korrelierten ($p < 0,05$). Die Durchführung der multivariaten Analyse erfolgte nach dem proportionalen Hazardmodell von Cox (1972) und wurde mit der Einschlußmethode berechnet.

Bei den R0-resizierten Patienten zeigten sich in der univariaten Analyse für das tumorspezifische Überleben statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensverläufe der positiv getesteten gegenüber der negativ getesteten Patienten beim immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Auch für das UICC-Stadium (I+II vs. III+IV) und das Alter zum Zeitpunkt der Operation (<70 Jahre vs ≥ 70 Jahre) ergaben sich in der univariaten Analyse p-Werte unter 0,05. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analysen sind in Tabelle 12 dargestellt. In der multivariaten Analyse ließ sich berechnen, dass sowohl der immunzytochemische Nachweis mittels A45-B/B3 als auch das UICC-Stadium und das Alter zum Zeitpunkt der Operation unabhängige prognostische Faktoren darstellen ($p=0,049$ / $p<0,001$ / $p=0,030$). Ein positiver immunzytochemischer Nachweis mittels A45-B/B3 im Knochenmark, ein UICC-Stadium III oder IV und ein Operationsalter ≥ 70 Jahre sind somit negative Prediktoren für das tumorspezifische Überleben. Es ergab sich eine Hazard-Ratio von 1,818 für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Dies bedeutet, dass Patienten mit positivem Ergebnis ein 1,818-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit negativem Ergebnis. Aus den Hazard-Ratios für das UICC-Stadium und für das Alter zum Zeitpunkt der Operation ergibt sich, dass Patienten mit UICC-Stadium III und IV ein 4,369-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit UICC-Stadium I und II, und dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation ≥ 70 Jahre alt waren, ein 2,180-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit einem Operationsalter <70 Jahren.

Tabelle 12: Multivariate Analyse für das tumorspezifische Überleben berechnet für das Teilkollektiv der R0-resezierten Patienten bei denen ein immunzytochemischer Nachweis mittels A45-B/B3 im Knochenmark durchgeführt wurde

Variable	Kategorie (Gruppe 0 vs. Gruppe1)	p-Wert univariat	p-Wert multivariat	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Sterberisiko für Gruppe ¹
ICC-Nachweis mit A45-B/B3	negativ vs. positiv	0,023	0,049	1,818	1,003 – 3,293	↑
UICC-Stadium	I+II vs. III+IV	<0,001	<0,001	4,369	2,377 – 8,030	↑
OP-Alter	<70 vs. ≥70 Jahre	0,030	0,007	2,180	1,231 – 3,858	↑

¹ bezogen auf die in Spalte 2 jeweils zweitgenannte Kategorie (A45-B/B3 positiv, UICC-Stadium III+IV, OP-Alter ≥70Jahre): ↑ = Risiko erhöht

Beim rezidiv- und metastasenfrem Überleben ergaben sich in der univariaten Analyse statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensverläufe der positiv getesteten und negativ getesteten Patienten für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Auch für das UICC-Stadium (I+II vs. III+IV) und die Tumorlokalisation (Kolon/Sigma vs. Rektum) zeigten sich p-Werte kleiner 0,05. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analysen sind in Tabelle 13 dargestellt. In der multivariaten Analyse ergab sich lediglich für das UICC-Stadium und die Tumorlokalisation ein p-Wert kleiner 0,05, so dass diese beiden Variablen unabhängige prognostische Faktoren für das Überleben darstellen. Für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3 ließ sich ein p-Wert von 0,129 berechnen. Der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 stellt somit keinen unabhängigen prognostischen Faktor dar. Die Hazard-Ratio beträgt für das UICC-Stadium 4,179 und für die Tumorlokalisation 1,856. Patienten mit UICC-Stadium III oder IV haben somit ein 4,179-fach erhöhtes Sterberisiko als Patienten mit UICC-Stadium I und II und Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum haben ein 1,856-fach erhöhtes Sterberisiko als Patienten mit Tumorlokalisation in Kolon/Sigma.

Tabelle 13: Ergebnisse der Multivariaten Analyse für das rezidiv- und metastasenfreie Überleben berechnet für das Teilkollektiv aller R0-resizierten Patienten bei denen ein immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3 im Knochenmark durchgeführt wurde

Variable	Kategorie (Gruppe 0 vs. Gruppe1)	p-Wert univariat	p-Wert multivariat	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Sterberisiko für Gruppe ¹
ICC-Nachweis mit A45-B/B3	negativ vs. positiv	0,049	0,129			
UICC-Stadium	I+II vs. III+IV	<0,001	<0,001	4,179	2,304 – 7,581	↑
Tumorlokalisation	Kolon/ Sigma vs. Rektum	0,036	0,030	1,856	1,061 – 3,248	↑

¹ bezogen auf die in Spalte 2 jeweils zweitgenannte Kategorie (A45-B/B3 positiv, UICC-Stadium III+IV, Tumorlokalisation im Rektum): ↑ = Risiko erhöht

Im Weiteren erfolgt die Betrachtung aller R0-resezierten Patienten mit Lokalisation des Karzinoms im Kolon/Sigma. Bei diesem Teilkollektiv zeigten sich in der univariaten Analyse beim Gesamtüberleben statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensverläufe bei den positiv und den negativ getesteten Patienten, sowohl für den CK 20 Nachweis mittels PCR im Knochenmark als auch den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Auch für das UICC-Stadium (I+II vs III+IV) und das Alter zum Zeitpunkt der Operation (<70Jahre vs ≥70Jahre) ergaben sich p-Werte kleiner 0,05. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analysen sind in Tabelle 14 dargestellt. In der Multivariaten Analyse zeigt sich, dass die CK 20 PCR im Knochenmark, der immunzytochemische Nachweis mit A45-B/B3, das UICC-Stadium und das Operationsalter hier unabhängige prognostische Faktoren darstellen (p= 0,009 / p= 0,002 / p< 0,001 / p= 0,001). Ein positives Ergebnis in der CK 20 PCR im Knochenmark und im immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3, ein UICC-Stadium III oder IV und ein Operationsalter ≥70 Jahre sind negative Prediktoren für das Gesamtüberleben. Die Hazard-Ratio beträgt für den CK 20 Nachweis mittels PCR im Knochenmark 2,514 und 3,146 für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Somit haben Patienten mit positivem Ergebnis in der CK 20 PCR

ein circa 2,5-fach erhöhtes Sterberisiko und Patienten mit positivem Ergebnis beim Nachweis mittels A45-B/B3 ein circa 3-fach erhöhtes Sterberisiko gegenüber Patienten mit negativem Ergebnis. Aus den Hazard-Ratios für das UICC-Stadium und das Alter zum Zeitpunkt der Operation ergibt sich, dass Patienten mit UICC-Stadium III oder IV ein 3,671-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit UICC-Stadium I oder II, und dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation ≥ 70 Jahre alt waren, ein 3,412-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit einem Operationsalter <70 Jahren.

Tabelle 14: Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben berechnet für das Teilkollektiv der R0-resezierten Patienten mit Lokalisation des Karzinoms in Kolon/Sigma

Variable	Kategorie (Gruppe 0 vs. Gruppe1)	p-Wert univariat	p-Wert multivariat	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Sterberisiko für Gruppe1 ¹
CK 20 PCR KM	negativ vs. positiv	0,034	0,009	2,514	1,264 – 5,000	↑
ICC-Nachweis mit A45-B/B3	negativ vs. positiv	0,014	0,002	3,146	1,507 – 6,567	↑
UICC-Stadium	I+II vs. III+IV	0,001	$<0,001$	3,671	1,823 – 7,396	↑
OP-Alter	<70 vs. ≥ 70 Jahre	$<0,001$	0,001	3,412	1,670 – 6,972	↑

¹ bezogen auf die in Spalte 2 jeweils zweitgenannte Kategorie (CK 20 PCR positiv, A45-B/B3 positiv, UICC-Stadium III+IV, OP-Alter ≥ 70 Jahre): ↑ = Risiko erhöht

Beim tumorpezifischen Überleben ergaben sich in der univariaten Analyse statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensverläufe zwischen den positiv und negativ getesteten Patienten für den Nachweis mittels CK 20 PCR im Blut und für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Das UICC-Stadium (I+II vs. III+IV) und das Alter zum Zeitpunkt der Operation (<70 vs. ≥ 70 Jahre) zeigen ebenfalls p-Werte kleiner 0,05 in der univariaten Analyse. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analysen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse der Multivariaten Analyse für das tumorspezifische Überleben berechnet für das Teilkollektiv der R0-resezierten Patienten mit Lokalisation des Karzinoms in Kolon/Sigma

Variable	Kategorie (Gruppe 0 vs. Gruppe1)	p-Wert univariat	p-Wert multivariat	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Sterberisiko für Gruppe ¹
CK 20 PCR Blut	negativ vs. positiv	0,045	0,090			
ICC-Nachweis mit A45-B/B3	negativ vs. positiv	0,003	0,002	4,200	1,688 – 10,449	↑
UICC-Stadium	I+II vs. III+IV	<0,001	<0,001	7,338	2,395 – 22,481	↑
OP-Alter	<70 vs. ≥70 Jahre	0,040	0,009	3,623	1,377 – 9,537	↑

¹ bezogen auf die in Spalte 2 jeweils zweitgenannte Kategorie (CK 20 PCR positiv, A45-B/B3 positiv, UICC-Stadium III+IV, OP-Alter ≥70Jahre): ↑ = Risiko erhöht

In der multivariaten Analyse sind der immunzytochemische Nachweis mittels A45-B/B3, das UICC-Stadium und das Operationsalter unabhängige prognostische Faktoren ($p=0,002$ / $p<0,001$ / $p=0,009$). Für den CK 20 Nachweis mittels PCR im Blut ergab sich in der multivariaten Analyse ein p-Wert von 0,090. Der CK 20 Nachweis mittels PCR im Blut stellt somit keinen unabhängig prognostischen Faktor dar. Die Hazard-Ratio beträgt 4,2 für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3. Patienten mit positivem Ergebnis haben somit ein 4,2-fach erhöhtes Sterberisiko als Patienten mit negativem Ergebnis. Aus der Hazard-Ratio für das UICC-Stadium und dem Alter zum Zeitpunkt der Operation ergibt sich, dass Patienten mit UICC-Stadium III oder IV ein 7,338-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit UICC-Stadium I oder II, und dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation ≥ 70 Jahre alt waren, ein 3,623-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit einem Operationsalter <70 Jahren.

Hinsichtlich des rezidiv- und metastasenfremen Überlebens zeigten sich in der univariaten Analyse für den immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensverläufe der positiv versus

negativ getesteten Patienten. Auch beim UICC-Stadium (I+II vs. III+IV) ergab sich hier ein p-Wert kleiner 0,05. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analysen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Multivariate Analyse für das rezidiv- und metastasenfreie Überleben berechnet für das Teilkollektiv aller R0-resizierten Patienten mit Lokalisation des Karzinoms im Kolon/Sigma bei denen ein immunzytochemischer Nachweis mittels A45-B/B3 im Knochenmark durchgeführt wurde

Variable	Kategorie (Gruppe 0 vs. Gruppe1)	p-Wert univariat	p-Wert multivariat	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Sterberisiko für Gruppe ¹
ICC-Nachweis mit A45-B/B3	negativ vs. positiv	0,012	0,042	2,466	1,032 – 5,891	↑
UICC-Stadium	I+II vs. III+IV	<0,001	<0,001	7,188	2,392 – 21,603	↑

¹ bezogen auf die in Spalte 2 jeweils zweitgenannte Kategorie (A45-B/B3 positiv, UICC-Stadium III+IV): ↑ = Risiko erhöht

Als Ergebnis der multivariaten Analyse sind der Nachweis mittels A45-B/B3 und das UICC-Stadium unabhängige prognostische Faktoren für das rezidiv- und metastasenfreie Überleben ($p= 0,012$ / $p< 0,001$). Ein positiver Befund beim immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3 und ein UICC-Stadium III oder IV stellen somit negative Prediktoren für das rezidiv- und metastasenfreie Überleben dar. Die Hazard-Ratio für den immunzytochemischen Nachweis mittels A45-B/B3 beträgt 2,466. Patienten mit positivem Ergebnis haben somit ein circa 2,5fach erhöhtes Risiko ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase zu entwickeln als Patienten mit negativem Ergebnis. Für das UICC-Stadium ergab sich eine Hazard-Ratio von 7,188. Patienten mit UICC-Stadium III oder IV haben demnach ein 7,188-fach erhöhtes Risiko ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastase zu entwickeln als Patienten mit UICC-Stadium I oder II.

3.5. Tumorzell dissemination als Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom: Zusammenfassung der Ergebnisse der uni- und multivariaten Analysen

Die prognostische Relevanz der beiden in dieser Arbeit untersuchten Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom lässt sich wie folgt zusammenfassen:

a) R0-resezierte Patienten:

- In der univariaten Analyse ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Positivität im immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem tumorspezifischen ($p=0,023$) und dem rezidivfreien Überleben ($p=0,049$).
- Der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische Überleben ($p=0,049$). Patienten mit positivem Ergebnis haben ein 1,818-fach erhöhtes Sterberisiko als Patienten mit negativem Ergebnis.
- Für den CK 20 Nachweis mittels nested RT-PCR ergeben sich in der univariaten Analyse weder für den Nachweis im Knochenmark, noch für den Nachweis im Blut statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Positivität im Nachweis und Überleben.

b) R0-resezierten Patienten mit Tumorlokalisierung in Kolon/Sigma:

- In der univariaten Analyse ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Positivität im immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben ($p=0,014$), dem tumorspezifischen Überleben ($p=0,003$) und dem rezidiv- und metastasenfrem Überleben ($p=0,012$).
- Der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben ($p=0,002$), sowie das tumorspezifische ($p=0,002$) und rezidivfreie Überleben ($p=0,042$). Die Hazard-Ratio beträgt 3,146 für das Gesamtüberleben, 4,2 für das tumorspezifische Überleben und 2,466 für das rezidiv- und metastasenfrem Überleben.
- In der univariaten Analyse ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Positivität in der CK 20 RT-PCR im Knochenmark und Ge-

samtüberleben ($p=0,034$) und Positivität in der CK 20 RT-PCR im Blut und dem tumorspezifischen Überleben ($p=0,045$).

- Der CK 20 Nachweis durch nested RT PCR im Knochenmark ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben ($p=0,009$). Patienten mit einem positiven Ergebnis haben ein 2,514-fach erhöhtes Sterberisiko als Patienten mit einem negativen Ergebnis.
- Auch die kombinierte Auswertung beider Nachweisverfahren im Knochenmark ergibt bei einem Teilkollektiv von 114 Patienten mit Tumorlokalisierung im Kolon oder Sigma in der univariaten Analyse einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Positivität in der CK 20 RT-PCR im Knochenmark und/oder im Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 und dem Gesamtüberleben ($p=0,038$), dem tumorspezifischen Überleben ($p=0,041$) und dem rezidiv- und metastasenfrem Überleben ($p=0,033$).

c) R0-resezierte Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum:

- Es ergeben sich weder für den immunzytochemischen noch für den molekularbiologischen Nachweis disseminierter Tumorzellen statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Positivität im Nachweis und Überleben.

4. Diskussion

Der Goldstandard aller Prognosefaktoren für Patienten mit kolorektalem Karzinom ist das Tumorstadium, eingeteilt nach dem TNM System der UICC (Wittekind und Meyer 2010). Es hat sich jedoch gezeigt, dass 30% der Patienten, die bei Erstdiagnose ein Stadium I oder II aufwiesen, nach erfolgter kurativer Behandlung letztendlich doch noch ein Rezidiv oder eine Fernmetastase entwickeln (Tsavellas et al. 2001). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass schon präoperativ eine Tumorzell dissemination stattgefunden hat, die durch die klinische Routinediagnostik nicht erfasst werden kann (Weitz et al. 1999). Der Nachweis und die Charakterisierung dieser Tumorzellen sind von großem Interesse für die Forschung. In vielen Studien konnte für das kolorektale Karzinom bereits eine klare klinische Relevanz und prognostische Signifikanz der disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen gezeigt werden (Schlimok et al. 1990, Hardingham et al. 2000, Koch et al. 2006, Vogelaar et al. 2010, Flatmark et al. 2011). Es wurden jedoch diverse unterschiedliche Nachweismethoden verwendet und es fehlt die Entwicklung eines einheitlichen methodischen Standards. Mit einer standardisierten Nachweismethode könnten dann gezielt prospektive multiinstitutionale Studien mit großen Patientengruppen durchgeführt werden und so wäre es möglich, die Bedeutung der disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen (DTC, CTC) als prognostischen Marker für die klinische Routine zu bestätigen (Steinert et al. 2012). In dieser Arbeit wurden zwei bereits etablierte Methoden zum Nachweis von DTC und CTC bei Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht und hinsichtlich ihrer Ergebnisse und ihrer prognostischen Aussagekraft verglichen.

4.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv, welches dieser Arbeit zu Grunde liegt, umfasst 268 Patienten, von denen 52% männlich und 48% weiblich sind. Das mediane Lebensalter zum Zeitpunkt der Operation beträgt 66,5 Jahre. In anderen publizierten Studien entsprechen die Daten hinsichtlich der Geschlechtsverteilung und des medianen Lebensalters zum Zeitpunkt der Operation denen in dieser Arbeit erhobenen Daten (Lindemann et al. 1992, Guo et al. 2005, Allen-Mersh et al. 2007, Flatmark et al. 2011). Betrachtet man die Kollektivgrößen in der Literatur, lässt sich eine große Spannweite feststellen. In der Metaanalyse von Rahbari et al. wurden 36 Studien hinsichtlich der prognostischen Relevanz von DTC in Knochenmarkproben und CTC in Blutproben

von Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Die Kollektivgröße reichte von 20 bis 438 Patienten mit einer medianen Größe von 67 Patienten (Rahbari et al. 2010).

In den meisten Studien werden Fälle mit Kolon- und Rektumkarzinom gemeinsam betrachtet. Ob dies klinisch und wissenschaftlich gerechtfertigt ist oder nicht eine getrennte Betrachtung erfolgen sollte, wird in Kapitel 4.3 diskutiert. Die Verteilung der Tumorlokalisation liegt in unserem Patientenkollektiv mit 55% im Kolon und 45% im Rektum. In anderen Studien waren 50 bis 59% der Tumoren im Kolon und 41 bis 50% im Rektum lokalisiert (Weitz et al. 1998, Koch et al. 2006, Lindemann et al. 1992). Somit spiegelt die Verteilung der Tumorlokalisationen in dieser Arbeit in etwa die Angaben in der Literatur wieder. Die Stadienverteilung nach TNM-System des Patientenkollektivs in dieser Arbeit ist relativ homogen mit 25% mit Stadium I, 26% mit Stadium II, 28% mit Stadium III und 21% mit Stadium IV. 87% der Patienten erhielten eine R0-Resektion, bei 13% wurde eine R1- oder R2-Resektion durchgeführt. In der Literatur ließ sich in Studien, die ebenfalls Patienten mit Stadium I-IV eingeschlossen hatten, eine ähnliche Stadienverteilung finden. 19-30% der eingeschlossenen Patienten wiesen ein Stadium I auf, 24-33% ein Stadium II, 24-30% ein Stadium III und 21-24% ein Stadium IV (Weitz et al. 1998, Wong et al. 2009, Friederichs et al. 2007). Hinsichtlich der Operationsradikalität zeigt sich in der Literatur ein etwas höherer Anteil von Patienten mit R1 oder R2 Resektion. In einer Studie von Leinung et al. erhielten 72% der eingeschlossenen Patienten eine R0-Resektion und 28% eine R1- oder R2-Resektion (Leinung et al. 2000). Eine Studie von Allen-Mersh et al. zeigte eine ähnliche Verteilung mit 78% R0-resezierten und 22% R1-oder R2 resezierten Patienten (Allen-Mersh et al. 2007). Die beobachtete Rezidivhäufigkeit des dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientenkollektivs beträgt 32% bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 83 Monaten. In der Literatur wurden Rezidivhäufigkeiten von 22 bis 38% angegeben. Die medianen Nachbeobachtungszeiten lagen zwischen 15 und 58 Monaten (Flatmark et al. 2011, Lindemann et al. 1992, Allen-Mersh et al. 2007, Koch et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Patientenkollektiv, welches dieser Arbeit zu Grunde gelegt ist, den Angaben in der Literatur entspricht und somit ein repräsentatives Kollektiv darstellt.

4.2. Tumorzellanreicherung und Auswahl der Marker für Tumorzell dissemination

Durch die geringe Anzahl der disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen unter den Knochenmark- und Blutzellen stellt ihre Detektion eine methodische Herausforderung dar. Die Tumorzellanreicherung ist zunächst als methodischer Schlüsselschritt wichtig, um die Sensitivität für die Detektion von CTC und DTC zu erhöhen. In dieser Dissertation wurde die Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll als Methode zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion und Abreicherung der polymorphkernigen Zellen verwendet. Letzteres ist notwendig, da das in dieser Arbeit untersuchte CK 20 auch in Granulozyten nachgewiesen wurde (Jung et al. 1999). Die Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll wurde für die Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Mammakarzinom als Standardverfahren für die Tumorzellanreicherung empfohlen (Fehm et al. 2006). Wiedswang et al. konnten zeigen, dass die alleinige oder zusätzliche negative immunomagnetische Selektion von CD45-positiven Leukozyten keinen signifikanten Vorteil gegenüber der Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll besitzt (Wiedswang et al. 2003). Aus diesem Grund und da die immunomagnetische Selektion deutlich kostenintensiver ist, wurde diese Methode von Fehm et al. nicht für die klinische Routine empfohlen (Fehm et al. 2006).

Neben der Tumorzellanreicherung stellen die Detektionsmarker einen entscheidenden Faktor für die Sensitivität und Spezifität des Nachweises dar. Es wurden viele verschiedene Marker für die Tumorzell dissemination untersucht, wobei zwischen tumorspezifischen (z. B. p53-Mutationen), tumorassoziierten (z. B. CEA) oder gewebsspezifischen (z. B. CK 20) Markern unterschieden wird. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der DTC und CTC über den Nachweis gewebsspezifischer, endodermaler, epithelialer Marker, deren ektope Expression im mesenchymalen Kompartiment „Blut“ oder „Knochenmark“ analysiert wurde. Zum einen erfolgte ein immunzytochemischer Nachweis in Ficoll-angereicherten Knochenmarkzellen unter Verwendung des Pan-Zytokeratin Antikörpers A-45B/B3 und/oder unter Verwendung des Antikörpers Ber-EP4, der gegen EpCAM gerichtet ist. Darüber hinaus wurde mit demselben Analysematerial sowie mit Ficoll-angereicherten Zellen aus peripherem Blut ein molekularbiologischer Nachweis endodermal-epithelialer Zellen durch Zytokeratin 20 RT-PCR durchgeführt.

4.2.1. EpCAM als Marker für Tumorzell dissemination

Der Antikörper Ber-EP4 reagiert mit dem Zelloberflächenglykoprotein EpCAM. EpCAM ist ein epithelspezifisches Antigen, welches in Epithelzellen weit verbreitet ist und eine in hohem Maße konservierte Expression in Karzinomen zeigt (Momburg et al. 1987, Latza et al. 1990), während die Expression in Leukozyten fehlt (Maheswaran und Haber 2010). EpCAM ist ein gut etablierter Marker, der häufig zur Anreicherung von Tumorzellen verwendet wird. So nutzt zum Beispiel das CellSearch™ System, welches das einzige von der amerikanischen FDA (US Food and Drug Administration) für die klinische Routine zugelassene automatische immunomagnetische System zur Detektion und Analyse von CTC ist, an paramagnetische Nanopartikel („Ferrofluide“) gebundene Anti-EpCAM-Antikörper zur Separation der CTC (Sun et al. 2011). Die Spezifität dieses Markers konnte in einer Studie von Macadam et al. gezeigt werden. Hier wurden Knochenmarkproben von 74 Patienten mit Ösophagus- oder Magenkarzinom und 14 gesunde Kontrollpatienten durch immunzytochemische Nachweisverfahren auf EpCAM Expression mit Hilfe des Antikörpers Ber-EP4 untersucht. 36,5% der Karzinompatienten zeigten ein positives Ergebnis, während nur bei einem der Kontrollpatienten eine EpCAM Expression nachgewiesen werden konnte (Macadam et al. 2003).

Obwohl EpCAM in den meisten primären kolorektalen Karzinomen exprimiert wird, kann die Expressionsrate jedoch während der Tumorzell dissemination herunterreguliert werden durch einen Prozess, der als „Epitheliale-Mesenchymale Transition“ (EMT) bekannt ist, bei dem epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen (Denève et al. 2013). Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben verlieren die epithelialen Tumorzellen durch EMT epitheliale Merkmale und erlangen mesenchymale Eigenschaften wie Motilität, Invasivität und Apoptoseresistenz, was eine entscheidende Rolle bei der Tumorzell dissemination zu spielen scheint (Sun et al. 2011, Steinert et al. 2012). Ein Nachteil bei der Nutzung von EpCAM als Marker für die Tumorzell dissemination könnte somit sein, dass zirkulierende Tumorzellen, welche eine EMT durchlaufen haben, aufgrund verlorener EpCAM-Expression nicht mit erfasst werden (Denève et al. 2013).

4.2.2. Zytokeratine als Marker für Tumorzell dissemination

Moll et al. haben gezeigt, dass die CK 20 Expression fast ausschließlich beschränkt ist auf das Epithel des Magen-Darm-Trakts, das Urothel, Merkel Zellen und alle Tumoren, die von diesen Geweben abstammen (Moll et al. 1992). Für den molekularbiologischen Nachweis mittels RT-PCR wurde entsprechend Zytokeratin 20 (CK 20) mRNA als Marker verwendet. CK 20 mRNA ist ein häufig genutzter diagnostischer und prognostischer Marker beim kolorektalen Karzinom und gilt als hoch sensitiv (Tsouma et al. 2008). Die Spezifität von CK 20 mRNA konnte ebenfalls in mehreren Studien belegt werden. Soeth et al. analysierten Knochenmarkproben von 16 klinischen Patienten ohne maligne Erkrankung mittels des CK 20-spezifischen nested RT-PCR Tests, welcher auch in dieser Dissertation verwendet wurde. Dabei waren 15 der 16 Knochenmarkproben negativ für CK 20 mRNA. Die CK 20 positive Knochenmarkprobe stammte von einem Patienten mit bereits fortgeschrittener familiärer adenomatöser Polyposis (FAP). Da ein Großteil der Patienten mit FAP nach klinischen Studien ein kolorektales Karzinom entwickelt, wurde angenommen, dass bei diesem Patienten bereits ein okkultes Karzinom bestand (Soeth et al. 1996). Zhang et al. untersuchten 58 Patienten mit kolorektalen Karzinom und 12 Kontrollpatienten ohne bekannte Krebserkrankung auf CK 20 mRNA Expression im Knochenmark und Blut mittels RT-PCR. Bei den Patienten mit kolorektalem Karzinom ergaben sich Detektionsraten von 77,6% im Knochenmark und 44,8-69% im Blut, wohingegen keine positive CK 20 mRNA Expression bei den Kontrollpatienten nachgewiesen werden konnte (Zhang et al. 2005). In einer Studie von Huang et al. wurden 62 Blutproben von Patienten mit gastrointestinalem Karzinom und 12 Blutproben gesunder Probanden mittels RT-PCR auf CK 20 mRNA Expression untersucht. Unter den 62 Blutproben der Patienten mit Malignom waren 48,4% positiv für CK 20. Bei den gesunden Probanden konnte keine CK 20 mRNA Expression nachgewiesen werden (Huang et al. 2003).

Der immunzytochemische Nachweis im Knochenmark erfolgte in der vorliegenden Arbeit neben dem Antikörper Ber-EP4 mit dem Pan-Zytokeratinantikörper A45-B/B3, der gegen die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19 gerichtet ist. Zytokeratine gelten als Standardmarker für die Detektion von DTC im Knochenmark (Pantel et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zytokeratine in epithelialen Tumorzellen sehr unterschiedlich exprimiert werden und somit Pan-Zytokeratinantikörper wie

A45-B/B3, die mehrere Zytokeratine erkennen, monospezifischen Antikörpern in der diagnostischen Sensitivität überlegen sind (Janni et al. 2004). Braun et al. demonstrierten an 191 Patienten ohne nachweisbare Krebserkrankung, dass normale Knochenmarkzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, nicht mit A45-B/B3 reagieren (Braun et al. 2000). Außerdem wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass es sich bei den A45-B/B3 positiven Zellen im Knochenmark um Tumorzellen handelt (Janni et al. 2004). Der Antikörper A45-B/B3 wird somit als ein sensitiver und spezifischer Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark angesehen (Slade und Coombes 2007).

4.3. Detektion und prognostische Bedeutung der Tumorzell dissemination beim kolorektalen Karzinom

Mit dem molekularbiologischen Nachweis mittels CK 20 RT-PCR wurden in dieser Arbeit in insgesamt 52 % (139 von 268) der Blut- oder Knochenmarkproben Tumorzellen nachgewiesen. Betrachtet man die CK 20 Positivität im Knochenmark allein, so zeigten 38% der Patienten (92 von 242) ein positives Ergebnis. Bei den Blutproben wurden 38,6% (96 von 249) CK 20 positiv getestet (siehe Kapitel 3.2.1).

Die nachstehende Tabelle (Tabelle 17) gibt zum Vergleich mit den in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnissen einen Überblick über die wichtigsten Studien zum kolorektalen Karzinom, die ebenfalls einen molekularbiologischen Nachweis mittels RT-PCR mit dem Marker CK 20 allein oder in Kombination mit anderen Markern zum Tumorzellnachweis im Blut und/oder Knochenmark genutzt haben. Hier zeigt sich eine große Spanne der Detektionsraten, die zwischen 16 und 83% liegen. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse dieser Studien nicht gänzlich vergleichbar sind. Es wurden unterschiedliche Patientenkollektive untersucht, die Blutproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und auch die Methoden zur Anreicherung der Tumorzellen waren unterschiedlich. Einige publizierte Studien zeigen deutlich höhere Detektionsraten als in dieser Dissertation und in den übrigen Studien in der Literatur. Zhang et al. untersuchten Blut- und Knochenmarkproben von 58 Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels CK 20 RT-PCR auf DTC und CTC. Die Tumorzellanreicherung erfolgte durch Dichtekissenzentrifugation. Die Detektionsraten betragen 77,6% im Knochenmark und 69% im Blut (Zhang et al. 2005). Im Gegensatz zu dem Vorgehen in dieser Dissertation wurden die Blutproben zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, zuerst 3 Tage vor Operation und

ein zweites Mal 30 Minuten vor Operation. Bei nur einmaliger Blutentnahme lag auch in der Studie von Zhang et al. die Detektionsrate bei 44,8% (Zhang et al. 2005), welches vergleichbar mit der Detektionsrate in dieser Dissertation ist (38,6%). Durch Auswertung beider Blutproben stieg die Detektionsrate auf 69% an. (Zhang et al. 2005). Die in der Studie von Zhang et al. ebenfalls hohe Detektionsrate von 77,6% im Knochenmark, im Gegensatz zur Detektionsrate in der vorliegenden Dissertation, bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung liegt in den unterschiedlichen präanalytischen und analytischen Bedingungen der jeweiligen Studien. In der Studie von Zhang et al. erfolgte die Knochenmarkentnahme vom Beckenkamm oder Sternum, wobei in der vorliegenden Dissertation das Knochenmark nur aus dem Beckenkamm entnommen wurde. Zudem wurde in der Studie von Zhang et al. ein anderes RT-PCR-System genutzt, was ebenfalls einen Unterschied in der Detektionsrate erklären könnte (Zhang et al: 2005). Guo et al. untersuchten Blutproben von 40 Patienten mit kolorektalem Karzinom von Duke`s Stadium A bis D mittels CK 20 RT-PCR auf zirkulierende Tumorzellen. Die Tumorzellanreicherung erfolgte durch Dichtekissen-zentrifugation mit nachfolgender immunomagnetischer Anreicherung. Die Detektionsrate lag bei 83%. Auffällig ist hier die Stadienverteilung der untersuchten Patienten, wobei zwei Patienten mit Duke`s Stadium A, neun mit Duke`s Stadium B, 15 mit Duke`s Stadium C und 14 mit Duke`s Stadium D untersucht wurden (Guo et al. 2005). Die Anzahl von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium war in dieser Studie also relativ hoch. Dies könnte die deutlich höheren Detektionsraten erklären. In Studien, die eine ähnliche Vorgehensweise wie in der vorliegenden Dissertation aufwiesen, konnten die Detektionsraten dieser Dissertation bestätigt werden. Soeth et al. untersuchten Knochenmarkproben von 57 Patienten mit kolorektalem Karzinom von UICC-Stadium I bis IV unter Verwendung der nested CK 20 RT-PCR, welche auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Die Tumorzellanreicherung erfolgte, wie in dieser Arbeit, durch eine Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll. Disseminierte Tumorzellen konnten in 35% der Knochenmarkproben nachgewiesen werden (Soeth et al. 1996). Dies entspricht in etwa der Detektionsrate von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark in der vorliegenden Arbeit, die 38% betrug. In einer Studie von Katsumata et al. wurden Blutproben von 57 Patienten mit kolorektalem Karzinom von UICC Stadium I bis IV mittels CK 20 RT-PCR untersucht. Die Tumorzellanreicherung erfolgte mittels Dichtekissen-zentrifugation. Zirkulierende Tumorzellen konnten in 42% der Blutproben nachgewiesen werden (Katsumata et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit

waren 38,6% der Blutproben CK 20 positiv, so dass die Detektionsraten annähernd übereinstimmen.

Tabelle 17: Studien zum Nachweis von DTC und CTC bei Patienten mit kolorektalem Karzinom durch RT-PCR

Marker	Kompartiment	Patienten [n] / Detektionsrate [%]	Korrelation mit		Autoren
CK 20	KM	57 / 35	TNM-Stadium		Soeth et al. 1996
CK 20	KM	44 / 20	Gesamtüberleben, tumorspezifischem Überleben		Vogelaar et al. 2010
CK 20	Blut	58 / 41	TNM-Stadium		Weitz et al. 1998
CK 19/ 20, MUC1, MUC2	Blut	94 / 20	Gesamtüberleben, tumorspezifischem Überleben		Hardingham et al. 2000
CK 20	Blut	40 / 83	Tumordurchmesser, Lymphknoten- und Lebermetastasen		Guo et al. 2005
CK 20	Blut	57 / 42	Gesamtüberleben, Lymphknotenmetastasen		Katsumata et al. 2006
CK 20	Blut	37 / 28	CEA-Serum Level		Friederichs et al. 2007
CK 20, CEA	Blut (24h postoperativ)	113 / 30	rezidivfreiem Überleben		Allen-Mersh et al. 2007
CK 19/20, CEA, CD133	Blut	735 / 25	Gesamtüberleben, tumorspezifischem Überleben		Iinuma et al. 2011
CK 20	KM	77 / 25	Gesamtüberleben,		Hinz et al. 2012
	Blut	105 / 40	keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben		
CK 20	KM	65 / 31	Gesamtüberleben		Soeth et al. 1997
	Blut	52 / 17			
CK 20	KM	58 / 77,6	rezidivfreiem Überleben		Zhang et al. 2005
	Blut	58 / 45-69			
CK 20	KM	25 / 16	rezidivfreiem Überleben		Koch et al. 2005
	Blut (intraoperativ)	37 / 46			
CK 20	KM	71 / 28	keine signifikante Korrelation mit dem Überleben	T-Kategorie, Anzahl der entfernten Lymphknoten	Koch et al. 2006
	Blut (prä-, intra- oder postoperativ)	82-89 / 24-34	rezidivfreiem und tumorspezifischem Überleben		
Zum Vergleich					
CK 20	KM	242 / 38	Gesamtüberleben	M-Kategorie, OP-Radikalität	diese Dissertation
	Blut	249 / 38,6	tumorspezifischem Überleben		

Beim immunzytochemischen Nachweis durch die Antikörper A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 wurden in dieser Arbeit bei insgesamt 24% (63 von 259) der Knochenmarkproben disseminierte Tumorzellen nachgewiesen. Der immunzytochemische Nachweis unter Verwendung des Antikörpers Ber-EP4 allein zeigte bei 21% (20 von 97) der Knochenmarkproben ein positives Ergebnis. Von 250 Patienten, bei denen ein Nachweis durch den Antikörper A45-B/B3 erfolgte, waren 24% (59) positiv (siehe Kapitel 3.2.2).

Tabelle 18 gibt zum Vergleich mit den in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnissen einen Überblick über die wichtigsten Studien zum kolorektalen Karzinom, in denen ebenfalls Zytokeratine oder EpCAM als Marker beim immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark verwendet wurden. Die Detektionsraten liegen zwischen 12 und 64%. Auch hier ergibt sich, dass die Studienergebnisse nicht gänzlich vergleichbar sind, da unterschiedliche Patientenkollektive und Analysemethoden verwendet wurden. In einer Studie von Steinert et al. wurden Knochenmarkproben von 140 Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Die Knochenmarkpunktion erfolgte aus dem rechten und linken Beckenkamm vor kurativer Operation. Es wurde ein immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen durchgeführt, wobei pro Patient 20 Zytospins mit jeweils 2×10^5 mononukleären Zellen untersucht wurden. 10 Zytospins wurden dabei jeweils mit dem Antikörper A45-B/B3 und die 10 weiteren mit dem Antikörper Ber-EP4 analysiert. Hierbei ergab sich eine im Vergleich zu der hier vorgelegten Dissertation sehr hohe Detektionsrate von 64% (Steinert et al. 2008). Beim Vergleich der Studie von Steinert et al. mit der vorliegenden Dissertation bleibt jedoch zu bedenken, dass für letztere nur jeweils zwei Zytospins mit 5×10^5 mononukleären Zellen untersucht wurden und nur ein kleiner Teil der Proben, nämlich 88 von 259, mit beiden Antikörpern untersucht wurden. Dies kann eine Erklärung für die in dieser Dissertation mit 24% deutlich niedrigere Detektionsrate sein. Flatmark et al. untersuchten Knochenmarkproben von 235 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es erfolgte ein Nachweis disseminierter Tumorzellen durch immunomagnetische Selektion mit Hilfe eines Anti-EpCAM Antikörpers (MOC 31). Hierbei zeigte sich eine Detektionsrate von 17% (Flatmark et al. 2011). Dies stimmt annähernd mit der Detektionsrate für den immunzytochemischen Nachweis mit Hilfe des Anti-EpCAM Antikörpers Ber-EP4 in dieser Arbeit überein, die bei 21% lag. Jedoch ist auch hier kein uneingeschränkter Vergleich möglich, da eine andere Nachweismethode und ein anderer Anti-EpCAM Antikörper benutzt wurde.

Leinung et al. untersuchten 167 Knochenmarkproben von Patienten mit kolorektalen Karzinom mit UICC Stadium I bis IV. Der immunzytochemische Nachweis der disseminierten Tumorzellen erfolgte wie in dieser Arbeit mit Hilfe des Pan-Zytokeratin-Antikörpers A45-B/B3, mit vorheriger Anreicherung der Tumorzellen durch Dichtekis-senzentrifugation. Disseminierte Tumorzellen konnten in 24% der Knochenmarkproben nachgewiesen werden (Leinung et al. 2000), was der Detektionsrate in dieser Arbeit entspricht.

Tabelle 18: Studien zum Nachweis von DTC bei Patienten mit kolorektalem Karzinom durch immunzytochemische Nachweisverfahren mit Anti-Zytokeratin und/oder Anti-EpCAM Antikörpern

Marker/Anti-körper	Kompartiment	Patienten[n] / Detektionsrate [%]	Korrelation mit	Autoren
CK 18 / CK 2	KM	156 / 27	rezidivfreiem Überleben, Tumorgröße, Lymphknoten- und Fernmetastasen	Schlimok et al. 1990
CK 18/ CK 2	KM	88 / 32	tumorspezifischem und rezidivfreiem Überleben	Lindemann et al. 1992
CK 8, 18, 19/ A45-B/B3	KM	167 / 24	progressionsfreiem, rezidivfreiem und Gesamtüberleben	Leinung et al. 2000
CK 1-8, 10, 14-16, 19 / AE1, AE3	KM	56 / 59	nicht beurteilt	Shetye et al. 2004
CK 8, 18, 19 und EpCAM / A45-B/B3 und Ber-EP4	KM	140 / 64	keine signifikante Korrelation mit dem Überleben	Steinert et al. 2008
CK 8, 18, 19/ A45-B/B3	KM	46 / 33	keine signifikante Korrelation mit dem Überleben	Vogelaar et al. 2010
CK 8, 18, 19/ A45-B/B3	KM	57 / 23	keine signifikante Korrelation mit rezidivfreiem und Gesamtüberleben	Buxhofer –Ausch et al. 2010
EpCAM / MOC31	KM	235 / 17	rezidivfreiem, tumorspezifischem und Gesamtüberleben	Flatmark et al. 2011
CK 1-8, 10, 14-16, 19 / AE1, AE3	KM	235 / 12	rezidivfreiem und tumorspezifischem Überleben	
Zum Vergleich:				
A45-B/B3	KM	250 / 24	Gesamtüberleben, tumorspezifischem und rezidivfreiem Überleben	diese Dissertation
Ber-EP4		97 / 21	keine signifikante Korrelation mit Gesamtüberleben, tumorspezifischem und rezidivfreiem Überleben	

Zur Bestimmung des prognostischen Wertes nachgewiesener disseminierter Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom wurde in dieser Arbeit das Kollektiv der R0-resezierten Patienten betrachtet. Hier ergab sich in der univariaten Analyse (Kaplan-Meier Analyse mit Log-Rank-Test) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Positivität im immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 im Knochenmark und dem tumorspezifischen Überleben ($p=0,023$) sowie rezidivfreien Überleben ($p=0,049$), nicht jedoch mit dem Gesamtüberleben (siehe Kapitel 3.3.2). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 auch ein unabhängiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische Überleben ist ($p=0,049$) (siehe Kapitel 3.4). Bemerkenswert waren die Ergebnisse, die sich nach Aufteilung des Kollektivs nach Tumorlokalisation (Rektum gegenüber Kolon/Sigma) zeigten. Für die Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum ergaben sich weder für den immunzytochemischen noch für den PCR-gestützten molekularbiologischen Nachweis disseminierter Tumorzellen statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem Überleben (siehe Kapitel 3.3.1.2, 3.3.2.2 und 3.3.3.2). Demgegenüber war bei den Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon oder Sigma der molekularbiologische Nachweis von CK 20 im Knochenmark mittels RT-PCR ein deutlicher unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben, wie die multivariate Cox-Regressionsanalyse ergab ($p=0,009$). Der immunzytochemische Nachweis im Knochenmark mit dem Antikörper A45-B/B3 stellte in dieser Arbeit bei den Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon oder Sigma ebenfalls einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben dar ($p=0,002$), sowie auch für das tumorspezifische ($p=0,002$) und rezidivfreie Überleben ($p=0,042$) (siehe Kapitel 3.4). Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von CTC im Blut dieser Patienten konnte in der univariaten Analyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CK 20 Nachweis mittels RT-PCR und dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden ($p=0,045$) (siehe Kapitel 3.3.1.1). In der multivariaten Analyse konnte der CK 20 Nachweis im Blut jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4). In dieser Arbeit zeigte sich also ein deutlicher Unterschied in der prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen zwischen Patienten mit Kolon- oder Sigma-Karzinom und Patienten mit Rektum-Karzinom. Dies ist ein sehr interessantes und klinisch möglicherweise bedeutsames Ergebnis, da in publizierten Studien Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom regelhaft gemeinsam betrachtet wurden. Aus den hier erhaltenen Befunden

ergibt sich, dass kolorektale Karzinome bei bestimmten Fragestellungen besser als getrennte Entitäten untersucht werden sollten. Die Tumorlokalisierung wurde daher in dieser Arbeit auch hinsichtlich ihrer Rolle als potentieller prognostischer Marker analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Tumorlokalisierung (Kolon/Sigma gegenüber Rektum) einen unabhängigen prognostischen Faktor für das rezidivfreie Überleben darstellt (siehe Kapitel 3.4). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung könnten die unterschiedlichen Behandlungsmethoden von Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom sein. So erhalten mehr Patienten mit Rektumkarzinom als Patienten mit Kolonkarzinom eine adjuvante Therapie. Bei Patienten mit Rektumkarzinom wird eine adjuvante Therapie für alle Patienten mit UICC-Stadium II und III empfohlen, während beim Kolonkarzinom nur Patienten mit UICC-Stadium III adjuvant behandelt werden und bei Patienten mit UICC-Stadium II nur eine Behandlung in ausgewählten Risikosituationen empfohlen wird (Schmiegel et al. 2008, Kosmider und Lipton 2007). Eine weitere mögliche Erklärung für den deutlichen Unterschied in der prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen zwischen Patienten mit Kolon- oder Sigma-Karzinom und Patienten mit Rektum-Karzinom, ist der teilweise unterschiedliche venöse Abflussweg von Rektum und Kolon. So gibt das mittlere und untere Rektumdrittel sein Blut über die Beckenvenen (Vv. Iliacae) direkt in die Vena cava inferior ab. Die zirkulierenden Tumorzellen müssen somit den Weg durch den großen und kleinen Kreislauf und das arterielle System nehmen, während das gesamte Kolon und nur das obere Rektumdrittel über die Mesenterialvenen direkt in das Leberbett drainiert. Es könnte sein, dass dieser Abflussweg des unteren oder mittleren Drittels des Rektum zu einem vermehrten mechanischen Stress und dadurch vermehrt zum Zelltod der zirkulierenden Tumorzellen führt.

Beim immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit dem Antikörper Ber-EP4 ergab sich im Gegensatz zum Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben (siehe Kapitel 3.3.3, 3.3.3.1 und 3.3.3.2). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die sehr geringe Patientenzahl (n= 97), bei denen eine Färbung mit Ber-EP4 erfolgte und die hohe Zahl von Patienten, die in der Kaplan-Meier-Analyse zensiert werden mussten, weil sie am Ende des Beobachtungszeitraums nicht verstorben waren oder kein Rezidiv oder Fernmetastasen entwickelt haben. So wurden Knochenmarkproben von 83 R0-resezierten Patienten mit dem Antikörper Ber-EP4 analysiert, wovon 57-60 Pati-

enten zensiert waren (siehe Kapitel 3.3.3). Zudem sind die Nachbeobachtungszeiten für die Patienten, bei denen ein immunzytochemischer Nachweis mit Ber-EP4 erfolgte, kürzer, da die Knochenmarkproben von Patienten, die vor Oktober 1996 operiert worden waren, nur mit dem Antikörper A45-B/B3 gefärbt wurden. Eine weitere mögliche Erklärung basiert auf der Beobachtung, dass die Expression des Zelloberflächenglykoproteins EpCAM auf den Tumorzellen sehr unterschiedlich ist und stark vom Tumortyp abhängt (Pantel et al. 2008). In einem Konzept für eine standardisierte Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Mammakarzinom wird eine Verwendung von Anti-EpCAM-Antikörpern nicht empfohlen, aufgrund der geringeren Sensitivität und Spezifität (Fehm et al. 2006). Dennoch hat sich der Antikörper Ber-EP4 als Marker zur Anreicherung von epithelialen Tumorzellen etabliert. Beim CellSearch™ System, welches, wie bereits in Kapitel 4.2.1 erwähnt wurde, das einzige von der amerikanischen FDA (US Food and Drug Administration der USA) für die klinische Routine zugelassene automatische immunomagnetische System zur Detektion und Analyse von CTC ist, werden zum Beispiel an Ferrofluide gebundene Anti-EpCAM-Antikörper zur Separation der CTC verwendet (Sun et al. 2011).

In der Literatur konnte in mehreren großen Studien die prognostische Aussagekraft zirkulierender Tumorzellen im Blut für das kolorektale Karzinom gezeigt werden. Die Ergebnisse bezüglich disseminierter Tumorzellen im Knochenmark sind heterogener, zeigen aber zum Teil auch eine prognostische Wertigkeit (Steinert et al. 2012). In einer Metaanalyse von Rahbari et al. wurden 36 Studien mit insgesamt 3094 Patienten analysiert, die die prognostische Aussagekraft von CTC und DTC in Blut und Knochenmark beim kolorektalen Karzinom untersucht haben. Es zeigte sich, dass der Nachweis von CTC im peripheren Blut signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Die prognostische Aussagekraft von DTC im Knochenmark konnte nicht belegt werden (Rahbari et al. 2010). In Einzelstudien konnte jedoch die prognostische Wertigkeit disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit kolorektalem Karzinom gezeigt werden. In einer Studie von Leinung et al. wurden 145 Patienten mit Kolonkarzinom hinsichtlich der prognostischen Relevanz von DTC im Knochenmark untersucht und es konnte gezeigt werden, dass der immunzytochemische Nachweis mit Hilfe des Pan-Zytokeratinantikörpers A45-B/B3 ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben und die Entstehung von Rezidiven darstellt (Leinung et al. 2000). Soeth et al. untersuchten 65 Knochenmarkproben von Patien-

ten mit kolorektalen Karzinom mit Hilfe einer nested RT-PCR auf CK 20 mRNA und stellten eine signifikant kürzere Überlebenszeit für die CK 20 positiv getesteten Patienten gegenüber der negativ getesteten Patienten fest (Soeth et al. 1997). Flatmark et al. führten eine Analyse von 235 Knochenmarkproben kurativ operierter Patienten mit kolorektalem Karzinom durch. Der Nachweis der DTC erfolgte durch immunomagnetische Selektion mit einem anti-EpCAM-Antikörper (MOC31) und immunohistochemische Untersuchung mit Hilfe von Panzytokeratin-Antikörpern (AE1, AE3). Der positive Nachweis korrelierte signifikant mit dem Gesamt-, tumorspezifischen und metastasenfrem Überleben (Flatmark et al. 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine klare prognostische Signifikanz der DTC im Knochenmark beim Kolonkarzinom beim molekularbiologischen Nachweis mittels CK 20 RT-PCR und beim immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3. Auch für den molekularbiologischen Nachweis mittels CK 20 RT-PCR im Blut konnte für Patienten mit Kolonkarzinom ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen positivem Nachweis und dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden. Keine prognostische Signifikanz zeigte sich beim immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper Ber-EP4 und bei Betrachtung der Patienten mit Rektumkarzinom. Es erscheint sinnvoll, Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom in Zukunft getrennt zu betrachten.

4.4. Analyse gestreuter Tumorzellen im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut

In dieser Dissertation erfolgte ein molekularbiologischer Nachweis von Tumorzellen mittels CK 20 RT-PCR in zwei unterschiedlichen Kompartimenten. Zum einen wurde eine Analyse von Blutproben durchgeführt, die über zentrale Venenkatheter von Patienten mit kolorektalem Karzinom gewonnen wurde, und zum anderen wurden Knochenmarkproben aus dem Beckenkamm untersucht. Bei Betrachtung aller R0-resezierten Patienten mit Lokalisation des Tumors im Kolon/Sigma, war der molekularbiologische Nachweis von CK 20 im Knochenmark mittels RT-PCR ein deutlicher unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (multivariate Cox-Regressionsanalyse; $p=0,009$). Auch im Blut dieser Patienten konnte hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von CTC in der univariaten Analyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CK 20 Nachweis mittels RT-PCR und dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden ($p=0,045$) (siehe Kapitel 3.3.1.1). In

der multivariaten Analyse konnte der CK 20 Nachweis im Blut jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4). Somit ist der CK 20 Nachweis mittels RT-PCR im Knochenmark, nach den Ergebnissen dieser Dissertation, ein deutlicherer Prognosefaktor für das Überleben.

Die prognostische Wertigkeit von DTC im Knochenmark bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte auch in anderen publizierten Studien gezeigt werden (Hinz et al. 2012, Flatmark et al. 2011, Vogelaar et al. 2010). Das kolorektale Karzinom metastasiert aber bevorzugt in die Leber und die Lunge. Metastasen im Skelett kommen deutlich seltener vor als zum Beispiel bei Patienten mit Mamma- oder Prostata-Karzinom. Trotzdem unterscheidet sich die Detektionsrate von DTC im Knochenmark bei Patienten mit kolorektalem Karzinom nicht deutlich von der bei Patienten mit Mamma- oder Prostata-Karzinom, so dass die Frage aufkommt, welche Rolle das Knochenmark bei der Progression eines kolorektalen Karzinoms spielt. Das Knochenmark könnte gute Voraussetzungen für das Überleben von DTC bieten und dadurch zu deren Anreicherung in diesem Kompartiment führen. Dann könnte das Knochenmark als Reservoir für die DTC fungieren, von wo aus eine Rezirkulation in andere Organe mit noch besseren Wachstumsbedingungen stattfindet (Pantel et al. 2008, Pantel et al. 2009).

Die prognostische Bedeutung von CTC im Blut bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte in einer Metaanalyse von Rahbari et al. bestätigt werden. Hierbei wurden 36 Studien mit insgesamt 3094 Patienten analysiert, in der die prognostische Aussagekraft von CTC und DTC in Blut und Knochenmark beim kolorektalen Karzinom untersucht worden war. Es zeigte sich, dass der Nachweis von CTC im peripheren Blut signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Rahbari et al. 2010). Auch in dieser Dissertation ergab sich in der univariaten Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen CK 20 Nachweis mittels RT-PCR und dem tumorspezifischen Überleben bei Patienten mit Tumorlokalisierung im Kolon oder Sigma. Ein deutlicher Vorteil der Analyse im Blut ist die einfachere Probenentnahme. Die Entnahme von Knochenmarkproben ist invasiv, unkomfortabel für die Patienten, zeitintensiv und schwierig zu standardisieren. Unter der Vorstellung, dass man durch eine wiederholte Analyse von DTC und CTC im Blut und Knochenmark zum Beispiel während und nach einer adjuvanten Therapie, eventuell Patienten mit einem erhöhten Rezidiv-Risiko identifizieren könnte, wäre die Blutentnahme bei Kontrollen deutlich einfacher zu realisieren als die wiederholte Knochenmarkpunktion (Pantel et al. 2008).

Abschließend lässt sich somit sagen, dass der Nachweis von Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom in beiden Kompartimenten (Blut und Knochenmark) prognostische Wertigkeit hat. In Bezug auf die klinische Praktikabilität ist jedoch eine Analyse im Blut vorzuziehen.

4.5. Nachweis der Tumorzell dissemination durch RT-PCR im Vergleich zur immunzytochemischen Analyse

Das Ziel dieser Dissertation war es, zwei unterschiedliche Methoden zum Nachweis einer Tumorzell dissemination vergleichend zu evaluieren. Auf der einen Seite erfolgte ein molekularbiologischer Nachweis der Tumorzell-RNA mittels RT-PCR und auf der anderen Seite ein immunzytochemischer Nachweis epithelialer Tumorzellen. Beide Methoden sind etabliert, jedoch gibt es nur wenige Studien in der Literatur, die diese beiden Methoden direkt miteinander vergleichen.

In einer Studie von Vogelaar et al. wurden Knochenmarkproben von 60 Patienten mit Lebermetastasen bei kolorektalem Karzinom untersucht. Die Detektion der disseminierten Tumorzellen erfolgte durch einen immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 sowie durch einen molekularbiologischen Nachweis mittels CK 20 RT-PCR. Die Detektionsraten betrugen 33% beim immunzytochemischen Nachweis und 20% beim Nachweis durch RT-PCR. Der Nachweis von DTC im Knochenmark durch RT-PCR korrelierte negativ mit dem Gesamt- und tumorspezifischen Überleben, während der Nachweis mittels Immunzytochemie keine Korrelation mit dem Überleben aufwies (Vogelaar et al. 2010). Noura et al. untersuchten Lymphknoten von 64 Patienten mit kolorektalem Karzinom, die aufgrund der konventionellen Histopathologie als UICC Stadium II klassifiziert wurden. Die Detektion disseminierter Tumorzellen in den Lymphknoten erfolgte durch einen CEA mRNA Nachweis mittels RT-PCR sowie durch einen immunzytochemischen Nachweis mit Anti-Zytokeratin Antikörpern (AE1/AE3). Bei 30% der Patienten zeigte sich ein positiver Befund in der RT-PCR. Beim immunzytochemischen Nachweis ergaben sich bei 55% der Patienten positive Befunde. Ein positiver Nachweis in den Lymphknoten mittels RT-PCR war signifikant assoziiert mit einem kürzeren Gesamt- und tumorspezifischen Überleben. Beim immunzytochemischen Nachweis ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit zwischen negativ und positiv getesteten Patienten (Noura et al. 2002). In den beiden beschriebenen Studien waren die Detektionsraten für den Nachweis durch RT-PCR geringer als beim immunzytochemischen

Nachweis und nur der Nachweis disseminierter Tumorzellen durch RT-PCR hatte einen prognostischen Wert.

In der hier vorgelegten Dissertation zeigten sich andere Ergebnisse. Da sich die Studien von Noura et al. und Vogelaar et al. jedoch in einigen grundsätzlichen Aspekten von dieser Arbeit unterscheiden, lassen sich die Ergebnisse nicht sinnvoll vergleichen. Vogelaar et al. hat nur Patienten mit bereits metastasiertem kolorektalen Karzinom (UICC Stadium IV) untersucht und in der Studie von Noura et al. wurden disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten nachgewiesen und somit wurde ein anderes Kompartiment analysiert. Zudem wurde ein anderer Marker genutzt, da eine CEA nested RT-PCR durchgeführt wurde. In der vorliegenden Dissertation betrug die Detektionsrate mittels CK 20 nested RT-PCR im Knochenmark 38% (92 von 242) und beim immunzytochemischen Nachweis durch die Antikörper A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 wurden bei insgesamt 24% (63 von 259) der Knochenmarkproben disseminierte Tumorzellen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Die Detektionsrate beim Nachweis durch RT-PCR war also höher als beim immunzytochemischen Nachweis. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die höhere Sensitivität der RT-PCR in der Detektion von Marker-positiven Zellen im Vergleich zur Immunzytochemie (Zaag, van der et al. 2009). Bei den Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon oder Sigma zeigte sich sowohl der molekularbiologische Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR als auch der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 im Knochenmark als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben, wobei der immunzytochemische Nachweis ebenfalls ein unabhängiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben war (siehe Kapitel 3.4). Im Vergleich hatten in dieser Arbeit somit beide Detektionsmethoden prognostischen Wert.

Ein Vorteil der RT-PCR ist ihre höhere Sensitivität verglichen mit dem immunzytochemischen Verfahren. Bei Durchführung einer RT-PCR erfolgt zunächst die Isolierung und reverse Transkription von epithelzellspezifischer RNA in komplementäre DNA und danach die Amplifikation der cDNA-Matrize zwischen spezifischen Primern durch PCR. Hieraus resultiert eine sehr hohe Amplifikationsrate, die diese Methode sehr sensitiv macht (Balic et al. 2010). Ein potentielles Problem der CK 20 RT-PCR könnte jedoch sein, dass die untersuchten Gentransskripte nicht tumorspezifisch sind, sondern beispielsweise auch in Granulozyten bei gesunden Menschen nachgewiesen werden können (Jung et al. 1999). Aus diesem Grunde erfolgte in dieser Arbeit vor Durchführung der CK 20 RT-PCR eine Isolierung der mononukleären Zellfraktion

durch Dichtekissenzentrifugation mit Ficoll. Hierdurch wird unter anderem die Granulozytenfraktion abgereichert, welche zu unerwünschten positiven Ergebnissen führen könnte. Die so erreichte Spezifität der auch in dieser Arbeit verwendeten CK 20-spezifischen nested RT-PCR mit vorangegangener Dichtekissenzentrifugation mit Ficoll konnte von Soeth et al. experimentell gezeigt werden. Hier wurden in Knochenmarkproben gesunder Probanden keine CK 20 Transkripte nachgewiesen (Soeth et al. 1996). Die Bedeutung der Ficoll-Zentrifugation für die Spezifität des CK 20-Tests im Blut wurde später in einer anderen Arbeit bestätigt (Jung et al. 1999).

Auch die Immunzytochemie stellt ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Detektion von DTC dar. Sie ist sensitiv und spezifisch genug, eine einzelne DTC in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen nachzuweisen (Pantel und Woelfle 2005). Die Spezifität des immunzytochemischen Nachweises mittels des Antikörpers A45-B/B3 konnte von Braun et al. an 191 Patienten ohne nachweisbare Krebserkrankung demonstriert werden. Nur zwei der 191 Kontrollpatienten zeigten ein positives Ergebnis (Braun et al. 2000). Die Sensitivität und Spezifität beider Methoden ist abhängig vom Marker und der Anreicherungstechnik, die benutzt werden. Sowohl für die Immunzytochemie als auch für die RT-PCR stellt die Standardisierung der Methode eine Voraussetzung dar für die akkurate Detektion von DTC und CTC (Balic et al. 2010).

Ein weiterer Vorteil der RT-PCR ist ihre Unabhängigkeit von der manuellen Beurteilung durch geschultes Fachpersonal, damit ist ihre Beurteilung objektiver, da sie nicht der variablen Interpretation des Betrachters unterliegt. Ein deutlicher Vorteil der Immunzytochemie ist andererseits, dass hier eine morphologische Beurteilung der Zelle möglich ist und somit die Identität der Tumorzelle wirklich bestätigt werden kann. Die morphologischen Eigenschaften der Zelle können so in die Beurteilung mit einbezogen und unklare Fälle ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Dissertation erfolgte die mikroskopische Auswertung mit ACIS (Automated Cellular Imaging System; Chromavision Medical Systems). Durch eine schnelle und hochsensitive Färbungsanalyse zusammen mit morphologischen Kriterien gelingt es ACIS, die seltenen Zellen, die den Kriterien einer Tumorzelle entsprechen, zu finden („rare event detection“). Ein deutlicher Vorteil der automatischen Auswertung mit ACIS ist der geringere Zeitaufwand im Gegensatz zur manuellen Auswertung. Die Analyse mittels ACIS kann zum Beispiel auch über Nacht in Abwesenheit des „menschlichen“ Befunders erfolgen. Es müssen anschließend nur die vom Gerät vorausgewählten Zellen beurteilt werden, was den Zeitaufwand und auch den Ermüdungseffekt des Be-

trichters minimiert. In einer Studie von Bauer et al. hat sich gezeigt, dass die durch ACIS unterstützte Analyse eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit für die Detektion von DTC im Knochenmark hat und sogar genauere Ergebnisse liefert als die manuelle Mikroskopie (Bauer et al. 2000).

Zusammenfassend ist sowohl die RT-PCR als auch die Immunzytochemie ein sensibles und spezifisches Verfahren zur Detektion von DTC und CTC, wobei beide Verfahren wie zuvor erläutert Vor- und Nachteile besitzen. In dieser Dissertation zeigte sich bei der Analyse von DTC und CTC bei Patienten mit Kolon oder Sigma-Karzinom mit beiden Techniken ein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben, wobei sich beim immunzytochemischen Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 ein deutlicheres Ergebnis ergab. Der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 war ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben ($p=0,002$), sowie das tumorspezifische ($p=0,002$) und rezidivfreie Überleben ($p=0,042$). Demgegenüber erwies sich der CK 20 Nachweis durch nested RT-PCR im Knochenmark nur als ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben ($p=0,009$). Da die durch die RT-PCR erreichte Sensitivität und bessere Detektionsrate jedoch auch als wichtiges Kriterium für einen klinischen Test angesehen wird, können die beiden untersuchten Testverfahren als gleichermaßen empfehlenswert für den Nachweis disseminierter Tumorzellen betrachtet werden.

4.6. Ausblick

Die weitere Erforschung der Tumorzell-detektion mit Entwicklung einer standardisierten Nachweismethode ist von entscheidender Bedeutung, um sie als prognostische Methode in der Klinik zu etablieren. Die klinische Relevanz und prognostische Signifikanz von CTC und DTC beim kolorektalen Karzinom konnte in mehreren Studien klar belegt werden (zur Übersicht: Steinert et al. 2012). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Erkenntnisse. In einer Studie von Kienle et al. konnte gezeigt werden, dass eine neoadjuvante Therapie bei Patienten mit Rektumkarzinom mit einem Abfall der Detektionsrate von Tumorzellen in Blut und Knochenmark assoziiert ist (Kienle et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Mammakarzinom die Gegenwart von DTC im Knochenmark nach Chemotherapie ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Gesamtüberleben ist (Pantel und Woelfle 2005). Diese Studien stützen nochmal die enorme Wichtigkeit und zunehmende medizinische Bedeutung des Nachweises von DTC und CTC. Der Nach-

weis von DTC und CTC ist somit hinweisend für die Prognose und könnte helfen, das Ansprechen auf eine systemische Therapie zu beurteilen, früh vor Rezidiven zu warnen und durch rechtzeitige therapeutische Intervention das Überleben zu verbessern (Tsavellas et al. 2001).

Für die klinische Verwendung von DTC und CTC ist ein besseres Verständnis der biologischen Abläufe der Tumorzell dissemination erforderlich. Jüngste Studien an Tiermodellen geben neue Einblicke in diese Prozesse. Die Umwandlung einzelner epithelialer Tumorzellen in mesenchymale Derivate (epithelial-mesenchymal transition, EMT) wird als ein Schlüsselschritt für die Tumorzell dissemination betrachtet. Hierdurch kommt es zum Verlust der Polarität und der Zell-Zell Adhäsion der epithelialen Tumorzellen (Kang und Pantel 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von bestimmten Regulatoren der EMT (wie zum Beispiel Twist 1, Zeb1, SNAIL 1) im Primärtumor verbunden ist mit einem höheren Risiko zur Metastasenbildung (De Craene und Berx, 2013). In einer anderen Studie konnte klar gezeigt werden, dass EMT in CTC von Prostata-Karzinom Patienten auftritt und zu einem schlechteren Verlauf führt (Bednarz et al. 2010). Neue experimentelle Studien haben gezeigt, dass einige Tumorzelllinien in einem mesenchymalen Zustand zwar invasiver sind, aber nicht die Möglichkeit zur Bildung von Metastasen haben (Ocana et al. 2012, Celià-Terrassa et al. 2012). Die Idee, dass für eine effektive Besiedlung anderer Organe die erneute Umwandlung der mesenchymalen Derivate in epitheliale Tumorzellen (mesenchymal –epithelial transition, MET) nötig sein könnte, wird durch neueste experimentelle Beweise in Tiermodellen unterstützt (Kang und Pantel 2013). Daraus ergibt sich das aktuelle Modell, dass Tumorzellen mit einem hohen Grad an epithelial-mesenchymaler Plastizität mit großer Wahrscheinlichkeit die Gründerzellen für Metastasen darstellen, da sie sich als mesenchymale Derivate vom Primärtumor lösen können und durch Wechsel zu ihren epithelialen Eigenschaften die Möglichkeit haben Fernmetastasen zu bilden (Brabletz, 2012). Aufgrund dieser Erkenntnisse konzentrieren sich nun viele Forschungsgruppen auf die Entwicklung von Nachweisverfahren, die CTC mit einem EMT Phänotyp detektieren können. Durch die Entwicklung einer therapeutischen Möglichkeit, die epithelial-mesenchymale Plastizität zu unterbinden, könnte eventuell die Bildung von Metastasen reduziert werden (Kang und Pantel 2013).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 268 Patienten mit kolorektalen Karzinomen auf das Vorliegen disseminierter und zirkulierender Tumorzellen in Blut und/oder Knochenmark untersucht. Hierbei wurden zwei etablierte Nachweisverfahren verglichen. Zum einen erfolgte ein immunzytochemischer Nachweis im Knochenmark unter Verwendung des Panzytokeratin Antikörpers A-45B/B3 sowie des Antikörpers Ber-EP4, der gegen EpCAM gerichtet ist. Andererseits wurde ein molekularbiologischer Nachweis epithelialer Zellen durch eine nested CK 20 RT-PCR in cDNA Präparationen aus Blut und Knochenmark durchgeführt. Ziel war es, die prognostische Relevanz der jeweiligen Nachweisverfahren hinsichtlich der Überlebenszeit und des rezidivfreien Überlebens zu ermitteln und einen Vergleich zwischen den beiden Nachweisverfahren durchzuführen. Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, ob ein Unterschied zwischen Patienten mit Kolon- oder Sigma-Karzinom, beziehungsweise Rektumkarzinom hinsichtlich der prognostischen Relevanz besteht und ob sich der Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR im Blut und im Knochenmark hinsichtlich der prognostischen Relevanz unterscheidet.

Durch die Analyse mittels CK 20 RT-PCR wurden in dieser Arbeit in insgesamt 52 % (139 von 268) der Blut- oder Knochenmarkproben Tumorzellen nachgewiesen. Betrachtet man die CK 20 Positivität im Knochenmark allein, so zeigten 38% der Patienten (92 von 242) ein positives Ergebnis. Bei den Blutproben wurden 38,6% (96 von 249) CK 20 positiv getestet. Bei der immunzytochemischen Analyse mit den Antikörpern A45-B/B3 und/oder Ber-EP4 wurden bei insgesamt 24% (63 von 259) der Knochenmarkproben disseminierte Tumorzellen nachgewiesen. Bei Verwendung des Antikörpers Ber-EP4 allein zeigten 21% (20 von 97) der Knochenmarkproben ein positives Ergebnis. Von 250 Patienten, bei denen ein Nachweis durch den Antikörper A45-B/B3 erfolgte, waren 24% (59) positiv. Beim Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Tumorlokalisation im Kolon/Sigma erwies sich sowohl der Nachweis von CK 20 mittels RT-PCR als auch der immunzytochemische Nachweis mit dem Antikörper A45-B/B3 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben, wobei der immunzytochemische Nachweis ebenfalls ein unabhängiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben war. Im Vergleich hatten in dieser Arbeit somit beide Detektionsmethoden pro-

gnostischen Wert. Die höhere Detektionsrate bei der CK 20 RT-PCR ist vereinbar mit der höheren Sensitivität dieser Methode. Bei der immunzytochemischen Analyse im Knochenmark mit dem Antikörper Ber-EP4 zeigten sich im Gegensatz dazu keine signifikant verschiedenen Überlebensverläufe der positiv und negativ getesteten Patienten. Dies ist möglicherweise durch eine zu geringe Patientenzahl und hohe Zensurierungsraten in der Kaplan-Meier-Analyse bedingt. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von CTC im Blut von Patienten mit Kolonkarzinom konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen CK 20 Nachweis mittels RT-PCR und dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden ($p=0,045$). In der multivariaten Analyse konnte der CK 20 Nachweis im Blut jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Interessanterweise ergaben sich für Patienten mit Tumorlokalisierung im Rektum weder für den immunzytochemischen noch für den molekularbiologischen Nachweis von Tumorzellen statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem Überleben. Da in den meisten publizierten Studien Kolon- und Rektumkarzinompatienten gemeinsam betrachtet wurden, unterstreicht dieses Ergebnis die Notwendigkeit der Stratifizierung nach Tumorlokalisierung.

6. Literaturverzeichnis

Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H, Wharton RQ, Glover C, Jonas SK (2007)

Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma.

Br J Surg, 94(1), 96-105

Ashworth TR (1869)

A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death.

Aust Med J, 14, 146-7

Balic M, Williams A, Dandachi N, Cote RJ (2010)

Micrometastasis: Detection methods and clinical importance.

Cancer Biomark, 9(1-6), 397-419

Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, Bossy B, Ludmann S, Yamamoto K, Masih AS, Espinoza FP, Harrington DS (2000)

Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging.

Clin Cancer Res, 6(9), 3552-9

Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K (2011)

Clinical relevance and biology of circulating tumor cells.

Breast Cancer Res, 13(6), 228

Bednarz N, Eltze E, Semjonow A, Rink M, Andreas A, Mulder L, Hannemann J, Fisch M, Pantel K, Weier HU, Bielawski KP, Brandt B (2010)

BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood.

Clin Cancer Res, 16(13), 3340-8

Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad Ø, Diel I, Solomayer E-F, Theocharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau J-P, Garcia J, Pantel K (1999)

Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells.

Cytotherapy, 1(5), 377-88

Brabletz T (2012)

To differentiate or not - routes towards metastasis.

Nat Rev Cancer, 12(6), 425-36

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G (2000)

Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.

N Engl J Med, 342(8), 525-33

Buxhofer-Ausch V, Ausch C, Kitzweger E, Mollik M, Reiner-Concin A, Ogris E, Stampfl M, Hamilton G, Schiessel R, Hinterberger W (2010)

Spontaneous changes in tumour cell dissemination to bone marrow in colorectal cancer.

Colorectal Dis, 12(8), 776-82

Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ (2004)

Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer.

Dis Colon Rectum, 47, 1145-50

Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, de Paz AM, Rubio N, Arnal-Estapé A, Eil BJ, Bermudo R, Díaz A, Guerra-Rebollo M, Lozano JJ, Estarás C, Ulloa C, Álvarez-Simón D, Milà J, Vilella R, Paciucci R, Martínez-Balbás M, de Herreros AG, Gomis RR, Kang Y, Blanco J, Fernández PL, Thomson TM (2012)

Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells.

J Clin Invest, 122(5), 1849-68

Chomczynski P, Sacchi N (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem, 162(1), 156-9

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C (2000)

Prognostic Factors in Colorectal Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999.

Arch Pathol Lab Med, 124(7), 979-94

Compton CC, Greene FL (2004)

The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond.

CA Cancer J Clin, 54, 295-308

Cox DR (1972)

Regression models and life-tables.

J R Statist Soc, 34, 187-222

De Craene B, Berx G (2013)

Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression.

Nat Rev Cancer, 13(2), 97-110

Denève E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D, Coffy A, Daurès JP, Maudelonde T, Fabre JM, Pantel K, Alix-Panabières C (2013)

Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients.

Clin Chem, 59(9), 1384-92

Fearon ER, Vogelstein B (1990)

A genetic model for colorectal tumorigenesis.

Cell, 61(5), 759-67

- Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener D, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E (2006)**
A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.
Cancer, 107(5), 885-92
- Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, Rasmussen H, Johannessen HO, Bukholm I, Rosales R, Hårklau L, Jacobsen HJ, Sandstad B, Boye K, Fodstad Ø (2011)**
Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer.
Br J Cancer, 104(9), 1434-9
- Friederichs J, Gertler R, Rosenberg R, Dahm M, Nekarda H, Holzmann B, Siwert JR (2007)**
Correlation of CK 20-positive cells in peripheral venous blood with serum CEA levels in patients with colorectal carcinoma.
World J Surg, 31(12), 2329-34
- Guo J, Xiao B, Jin Z, Qin L, Chen J, Chen H, Zhang X, Liu Z (2005)**
Detection of cytokeratin 20 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.
J Gastroenterol Hepatol, 20(8), 1279-84
- Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A. (2000)**
Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease.
Int J Cancer, 89(1), 8-13
- Heinemann V, Engel J, Gross M, Kleespies A, Kolligs F, Kopp R, Michl G, Moosmann N, Schalhorn A, Stintzing S, Tympner C, Wagner A, Rosenberg R (2010)**
Kolonkarzinom. In: Bruns CJ (Hrsg.) Gastrointestinale Tumoren.
8. Aufl., 139-185, München: Zuckschwerdt
- Hermanek P (1999)**
Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems.
Anticancer Res, 19(4a), 2771-4
- Hinz S, Bockhorst J, Röder C, Egberts J-H, Schafmeyer C, Küchler T, Becker T, Kalthoff H (2012)**
Disseminated tumor cells in bone marrow negatively influence survival after resection of colorectal liver metastases.
Ann Surg Oncol, 19, 2539-46
- Huang P, Wang J, Guo Y, Xie W (2003)**
Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer.
J Cancer Res Clin Oncol, 129(3), 192-8

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA (2008)

Systemic spread is an early step in breast cancer.

Cancer Cell, 13(1), 58-68

Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M, Hayashi N, Tamura J, Matsuda K, Fukushima R, Okinaga K, Sasako M, Mori M (2011)

Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Duke's stage B and C colorectal cancer.

J Clin Oncol, 29(12), 1547-55

Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K (1997)

Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer.

N Engl J Med, 337(17), 1188-94

Jackman RJ, Mayo CW (1951)

The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon.

Surg Gynecol Obstet, 93(3), 327-30

Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K (2004)

Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen – Methodik, Biologie und klinische Relevanz.

Dtsch Arztebl, 101(51-52), 3496-502

Jung R, Petersen K, Krüger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M (1999)

Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes.

Br J Cancer, 81(5), 870-3

Kang Y, Pantel K (2013)

Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients.

Cancer Cell, 23(5), 573-81

Kaplan EL, Meier P (1958)

Nonparametric estimation from incomplete observations.

J Amer Statist Ass, 53, 457-81

Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U (1987)

Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues.

Eur J Cancer Clin Oncol, 23(2), 137-47

Katsumata K, Sumi T, Mori Y, Hisada M, Tsuchida A, Aoki T (2006)

Detection and evaluation of epithelial cells in the blood of colon cancer patients using RT-PCR.

Int J Clin Oncol, 11(5), 385-9

Khair G, Monson JR, Greenman J (2007)

Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer.

Dis Colon Rectum, 50(8), 1188-203

Kienle P, Koch M, Autschbach F, Benner A, Treiber M, Wannemacher M, von Knebel Doeberitz M, Büchler M, Herfarth C, Weitz J (2003)

Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemoradiation: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer.

Ann Surg, 238(3), 324-30

Kinzler KW, Vogelstein B (1997)

Gatekeepers and caretakers.

Nature, 386, 761-763

Klein CA (2009)

Parallel progression of primary tumours and metastases.

Nat Rev Cancer, 9, 302-312

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002)

Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.

Lancet, 360(9334), 683-9

Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J (2005)

Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases.

Ann Surg, 241(2), 199-205

Koch M, Kienle P, Kastrati D, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J (2006)

Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer.

Int J Cancer, 118(12), 3072-7

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007)

Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.

Nature, 450(7171), 903-7

Kosmider S, Lipton L (2007)

Adjuvant therapies for colorectal cancer.

World J Gastroenterol, 13(28), 3799-3805

Kreis ME, Tympner C, Geinitz H, Adam M, Gross M, Michl GM, Walther J, Wiese-Junginger D, Göring H, Jauch KW, Rosenberg R (2010)

Rektumkarzinome. In: Bruns CJ (Hrsg.) Gastrointestinale Tumoren.

8. Aufl., 186-210, München: Zuckschwerdt

Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H (1990)

Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial.

J Clin Pathol, 43(3), 213-9

Lehnert T, Herfarth, C (1996)

Grundlagen und Wert der Lymphadenektomie beim kolorektalen Karzinom.
Chirurg, 67, 889-99

Leinung S, Würfl P, Weiss CL, Röder I, Schönfelder M (2000)

Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma.

Langenbecks Arch Surg, 385(5), 337-43

Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G (1992)

Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients.

Lancet, 340(8821), 685-9

Lippert H (2004)

Therapie und Prognose des Kolon- und Rektumkarzinoms. In: Hirner A, Weise K (Hrsg.) Chirurgie Schnitt für Schnitt.

618-19, Stuttgart: Thieme

Macadam R, Sarela A, Wilson J, MacLennan K, Guillou P (2003)

Bone marrow micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma.

Eur J Surg Oncol, 29(5), 450-4

Maheswaran S, Haber DA (2010)

Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis.

Curr Opin Genet Dev, 20(1), 96-9

Mantel N (1966)

Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its considerations.

Cancer Chemother Rep, 50(3), 163-70

Mittlböck M (2004)

Analyse von medizinischen Lebensdauerdaten.

Medizinische Universität Wien, Medizinische Statistik und Informatik

Moll R, Lowe A, Laufer J and Franke WW (1992)

Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies.

Am J Pathol, 140, 427-47

Molnar B, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z (2003)

Molecular detection of circulating cancer cells.

Dig Dis, 21, 320-325

Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P (1987)

Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.

Cancer Res, 47(11), 2883-91

Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K (2005)

Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogenous response to systemic therapy and low proliferative activity.
Clin Cancer Res, 11(10), 3678-85

Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2002)

Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry.
J Clin Oncol, 20(20), 4232-41

Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA (2012)

Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1.
Cancer Cell, 22(6), 709-24

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004)

Colon Cancer survival rates with the new AJCC sixth edition staging.
J Natl Cancer Inst, 96(19), 1420-5

Pantel K, Brakenhoff RH (2004)

Dissecting the metastatic cascade.
Nat Rev Cancer, 4(6), 448-56

Pantel K, Woelfle U (2005)

Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anti-cancer therapy.
Biochim Biophys Acta, 1756(1), 53-64

Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S (2009)

Cancer micrometastases.
Nat Rev Clin Oncol, 6(6), 339-51

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008)

Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.
Nat Rev Cancer, 8(5), 329-40

Peto R, Peto J (1972)

Asymptotically efficient rank invariant test procedures.
J R Statist Soc, 135(2), 185-207

Ponce MR, Micol JL (1992)

PCR amplification of long DNA fragments.
Nucleic Acids Res, 20(3), 623

Quirke P, Williams GT, Ectors N, Ensari A, Piard F, Nagtegaal I (2007)

The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate?
Lancet Oncol, 8, 651-7

Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J (2010)

Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer.

Gastroenterology, 138(5), 1714-26

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (2004)

Basislehrbuch Innere Medizin.

3. Aufl., 506-10, München, Jena: Urban & Fischer

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.) (2012)

Krebs in Deutschland 2007/2008.

8. Ausgabe, 36-37, Berlin

Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmüller G (1990)

Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance.

J Clin Oncol, 8(5), 831-7

Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühnbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK (2008)

S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“.

Z Gastroenterol, 46, 1-73

Shetye JD, Liljefors ML, Emdin SO, Frödin JE, Strigård K, Mellstedt HT, Porwit A (2004)

Spectrum of cytokeratin-positive cells in the bone marrows of colorectal carcinoma patients.

Anticancer Res, 24(4), 2375-83

Singletary SE, Greene FL, Sobin LH (2003)

Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual.

Cancer, 98(12), 2740-1

Slade MJ, Coombes RC (2007)

The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer.

Nat Clin Pract Oncol, 4(1), 30-41

Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H (1996)

The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease.

Int J Cancer, 69(4), 278-82

Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen J, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H (1997)

Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR.

Cancer Res, 57(15), 3106-10

Steinert R, Hantschick M, Vieth M, Gastinger I, Kühnel F, Lippert H, Reymond MA (2008)

Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer.

Arch Surg, 143(2), 122-8

Steinert G, Schölch S, Koch M, Weitz J (2012)

Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer.

Langenbecks Arch Surg, 397(4), 535-42

Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y (2011)

Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance.

J Cancer Res Clin Oncol, 137(8), 1151-73

Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG (2001)

Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer.

British Journal of Surgery, 88, 1307-1320

Tsouma A, Aggeli C, Pissimissis N, Lembessis P, Zografos GN, Koutsilieris M (2008)

Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance.

Anticancer Res, 28(6B), 3945-60

Turnbull RB (1975)

The No-Touch Isolation Technique of Resection.

JAMA, 231(11), 1181-1182

Vogelaar FJ, Mesker WE, Rijken AM, van Pelt GW, van Leeuwen AM, Tanke HJ, Tollenaar RA, Liefers GJ (2010)

Clinical impact of different detection methods for disseminated tumor cells in bone marrow of patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases: a prospective follow-up study.

BMC Cancer, 10, 153

Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M (1998)

Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer.

Clin Cancer Res, 4(2), 343-8

Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert Th, Herfarth Ch, von Knebel Doeberitz M (1999)

Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow.

Clin Cancer Res, 5, 1830-1836

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW (2005)

Colorectal Cancer.

Lancet, 365, 153-65

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B (2003)

Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.

J Clin Oncol, 21, 3469-78

Wittekind C, Meyer HJ (2010)

TNM Klassifikation maligner Tumoren.

7. Auflage, Weinheim: Wiley-VCH

Wong SC, Chan CM, Ma BB, Hui EP, Ng SS, Lai PB, Cheung MT, Lo ES, Chan AK, Lam MY, Au TC, Chan AT (2009)

Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients.

Clin Cancer Res, 15(3), 1005-12

Zaag, ES van der, Buskens CJ, Kooij N, Akol H, Peters HM, Bouma WH, Bemelman WA (2009)

Improving staging accuracy in colon and rectal cancer by sentinel lymph node mapping: a comparative study.

Eur J Surg Oncol, 35(10), 1065-70

Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY (2005)

Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer.

World J Gastroenterol, 11(3), 436-8

Ziegler A, Lange S, Bender R. (2002)

Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode.

Dtsch Med Wochenschr, 127, T14-T16

Ziegler A, Lange S, Bender R (2007) (a)

Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test.

Dtsch Med Wochenschr, 132, e39-e41

Ziegler A, Lange S, Bender R (2007) (b)

Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression.

Dtsch Med Wochenschr, 132, e42-e44

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den hilfreichen Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ganz herzlichen Dank sagen möchte ich Herrn Dr. Christian Röder für die gute Betreuung und Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit, für die vielen Stunden zur Lösung der anstehenden Probleme, sowie seine Hilfestellung und sein Engagement zu jeder Zeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor des Instituts für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie bedanken, die am Gelingen der Arbeit unterstützend mitgewirkt haben. Einen besonderen Dank möchte ich hier Bianca Körtge, Bianca Zinke und Alexandra Sieger aussprechen.

Ein besonderes Dankeswort geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mir während meiner Promotionsarbeit mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite gestanden haben. Auch meinen Schwiegereltern möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken. Meinem Mann danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Graphiken und des Layouts, sowie seine liebevolle Unterstützung während der gesamten Arbeit.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Amke Julika Wittig, geb. Nienhaus
Geburtsdatum/-ort	17. März 1981, Oberhausen
Familienstand	verheiratet, eine Tochter (geboren 2011)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

2000	Abschluss der Schullaufbahn am Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Oberhausen mit dem Abitur
------	--

Hochschulstudium

2000/2001	Studium an der Akademie für Touristik „Angell“ in Freiburg, Abschluss: „Staatlich geprüfte Wirtschaftsassistentin“
Oktober 2001 bis Mai 2008	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, Abschluss mit dem Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

seit Dezember 2008	Assistenzärztin in der Augenklinik Rendsburg
--------------------	--

Promotionsarbeit

seit Dezember 2007	Promotionsarbeit in dem Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
--------------------	--