

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie
(Direktor Prof. Dr. Thomas Becker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Evaluation einer semi-quantitativen CK20 RT-PCR zum Nachweis
zirkulierender Tumorzellen und Bestimmung der prognostischen
Bedeutung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom**

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

vorgelegt von
Greta Lou Eggebrecht
aus Göttingen

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sebastian Hinz,
Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk O. Bauerschlag,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.12.2019

gez.: Prof. Dr. Robert Bergholz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	2
1.1.1 Risikofaktoren	2
1.1.2 Klinik und Diagnostik.....	3
1.1.3 Metastasierung.....	6
1.1.4 Therapie	7
1.2 Zirkulierende Tumorzellen	10
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Studiendesign	15
2.2 Einschlusskriterien und Patientenkohorte	15
2.3 Kontrollgruppe	16
2.4 Probenentnahme	16
2.5 Semi-quantitative CK20 RealTime-PCR	16
2.5.1 Isolierung der mononukleären Zellfraktion	16
2.5.2 Isolierung der RNA.....	17
2.5.3 Synthese der cDNA.....	17
2.5.4 PCR.....	18
2.5.5 Spiking-Experimente	19
2.6 Klinische Daten	19
2.7 Statistik	19
3 ERGEBNISSE	21
3.1 Deskription der Kohorte	21
3.1.1 Patienten	21
3.1.2 UICC Stadien	23
3.1.3 Neoadjuvante und adjuvante Therapie	23

3.1.4	Überlebensdaten und Nachsorgedaten	23
3.2	Univariate Analyse.....	24
3.2.1	Assoziation von den klinischen Charakteristika mit dem Überleben der Patienten.....	24
3.2.2	Kontrollgruppe und Spiking-Experimente.....	26
3.2.3	Qualitative Detektion von CK20 und EGFR	27
3.2.4	Berechnung eines Schwellenwertes (Cut-Off) der CK20-mRNA Expression in der Gesamtkohorte	28
3.2.5	Assoziation von der quantitativen CK20-mRNA Expression mit den klinischen Charakteristika der Patienten.....	33
3.2.6	Assoziation von der quantitativen CK20-mRNA Expression mit dem Überleben bei Patienten in den UICC Stadien I-II	35
3.2.7	Vergleich der Patientenkohorte mit hoher CK20-mRNA Expression im UICC Stadium II mit einer Kohorte mit niedriger CK20-mRNA Expression im UICC Stadium III.....	36
3.3	Multivariate Analyse	39
3.3.1	Assoziation von quantitativer CK20-mRNA Expression, Patientenalter, UICC Stadien und adjuvanter Therapie mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-IV	39
3.3.2	Assoziation von quantitativer CK20-mRNA Expression, Tumorlokalisierung und lokaler Tumorausdehnung mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-II	39
4	DISKUSSION	42
4.1	Repräsentativität der Kohorte, Patientencharakteristika, Überlebensraten	42
4.2	Detektion von CTC und Nachweisverfahren	43
4.3	Korrelation zwischen dem Überleben und dem Nachweis CK20-positiver und EGFR-positiver CTC	44
4.4	Level der CK20-mRNA Expression zur Risikostratifizierung der Patienten in der Gesamtkohorte	44
4.5	Assoziation von den klinischen Charakteristika mit der quantitativen CK20-mRNA Expression.....	45
4.6	Level der CK20-mRNA Expression in der Subgruppe der Patienten in den UICC Stadien I-II zur Identifizierung von Hochrisikopatienten	46
4.7	Vergleich von Risikopatienten im UICC Stadium II im Vergleich zu Patienten im UICC Stadium III	46

4.8	Assoziation von CK20, Patientenalter, UICC Stadien und adjuvanter Therapie mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-IV in der multivariaten Analyse	47
4.9	Assoziation von CK20, Tumorlokalisierung und lokaler Tumorausdehnung mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-II in der multivariaten Analyse	48
4.10	Generelles zur Arbeit, Ausblick und Nutzen	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	LITERATURVERZEICHNIS	53
7	ANHANG.....	60
7.1	Genehmigung der Ethik-Kommission	60
8	DANKSAGUNG	61
9	PUBLIKATIONEN.....	62

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
CEA	carcinoembryonales Antigen
CTC	zirkulierende Tumorzellen, <i>englisch</i> : circulating tumour cells
DTC	disseminierte Tumorzellen, <i>englisch</i> : disseminated tumour cells
EGFR	<i>englisch</i> : epidermal growth factor receptor
EMT	epitheliale-mesenchymale-Transition
EpCAM	<i>englisch</i> : epithelial-cell-adhaesion-molecule
HR	Hazard Ratio
KI	Konfidenzintervall
KRAS	<i>englisch</i> : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
MNC	Mononukleäre Zellen, <i>englisch</i> : mononuclear cells
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
UICC	<i>französisch</i> : Union internationale contre le cancer
VEGFR	<i>englisch</i> : vascular endothelial growth factor receptor
5J-GÜR	5-Jahres Gesamtüberlebens-Rate
5J-KFÜR	5-Jahres krankheitsfreie Überlebens-Rate

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014 (umgezeichnet nach Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).....	1
Abbildung 2: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Abhängigkeit der UICC Stadien.....	26
Abbildung 3: Semi-quantitative RT-PCR Analyse der CK20 und EGFR Expression in mononukleären Zellfraktionen aus peripherem Blut eines gesunden Spenders, welchem eine definierte Anzahl von Kolonkarzinomzellen (HT29) zugesetzt wurde	27
Abbildung 4: ROC-Kurve zur Berechnung des Cut-Off Wertes der CK20-mRNA Expression anhand des Youden-Index.....	28
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens von Patienten im UICC Stadium I-IV bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel	29
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des krankheitsfreien Überlebens von Patienten im UICC Stadium I-IV bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel	30
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A,C) und krankheitsfreien Überlebens (B,D) von Patienten mit Kolonkarzinom (A,B) und Rektumkarzinom (C,D) bezogen auf das CK20-mRNA Expressionslevel.....	33
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens von Patienten im UICC Stadium I und II bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel.....	35
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des krankheitsfreien Überlebens von Patienten im UICC Stadium I und II bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel	36
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens (A) und krankheitsfreien Überlebens (B) bezogen auf Patienten im UICC Stadium II und hohem CK20-mRNA Expression verglichen mit Patienten im UICC Stadium III und niedrigem CK20-mRNA Genexpressionslevel.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UICC Stadien für das kolorektale Karzinom (Wittekind et al. 2014).....	6
Tabelle 2: Klinische Eigenschaften der Patientenkohorte.....	22
Tabelle 3: Einfluss klinischer Charakteristika der Patienten auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben (Log-Rank-Test).....	25
Tabelle 4: Korrelation der quantitativen CK20-mRNA Expression mit den klinischen Charakteristika der Patienten (χ^2 -Test).....	34
Tabelle 5: Multivariate Analyse (Cox-Regressionsanalyse) von unabhängigen Einflussfaktoren auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben in der Gesamtkohorte (UICC Stadium I-IV) sowie in der Subgruppe (UICC Stadium I-II)	41

1 Einleitung

Jährlich sterben weltweit etwa 700 000 Menschen am kolorektalen Karzinom (KRK) (Marmol et al. 2017). Damit ist das KRK die weltweit vierthäufigste Krebstodesursache nach dem Lungen-, Leber- und Magenkarzinom (Brody 2015). In Deutschland steht das KRK bei den Frauen und bei den Männern an dritter Stelle der karzinombedingten Todesfälle (**Abbildung 1**).

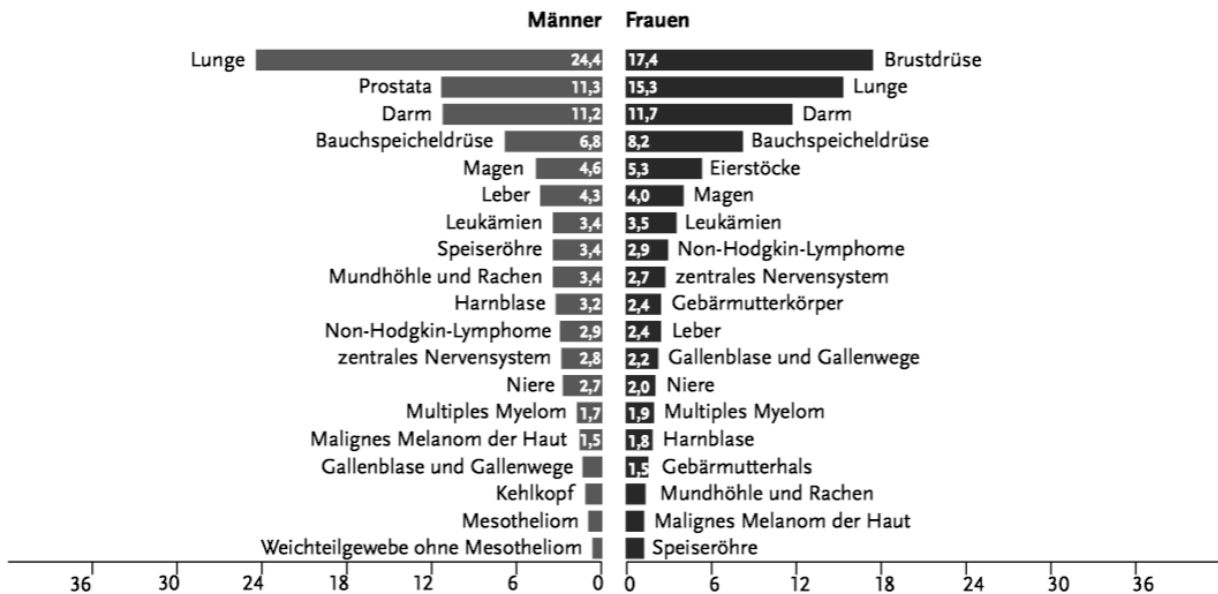


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014 (umgezeichnet nach Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017)

Nach Angaben des Robert Koch-Instituts Berlin liegt das KRK bei den Krebsneuerkrankungen bei Frauen an zweiter und bei Männern an dritter Stelle. Demzufolge ist die wissenschaftliche Erforschung des KRK von großer Bedeutung für die Gesellschaft. Zum einen gilt es, Methoden zu etablieren, die es ermöglichen, die Tumore in einem frühen Tumorstadium zu erkennen und zum anderen gilt es, die Therapie weiterhin zu optimieren. Bekanntlich sterben trotz Fortschritten in der Therapie weiterhin viele Patienten an der Progression ihres Tumorleidens. Ein Großteil der karzinombedingten Mortalität ist auf die Metastasierung des Primärtumors zurückzuführen. Besonders in frühen, primär nicht metastasierten Tumorstadien sind daher zusätzliche Marker nötig, um Subgruppen zu identifizieren,

die im weiteren Krankheitsverlauf ein erhöhtes Metastasierungsrisiko aufweisen. Ein Ansatz zur Verbesserung dieser Risikostratifikation sind Studien über die Bedeutung und die unterschiedlichen Verfahren zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC). Die folgende Arbeit befasst sich mit einem neuen, semi-quantitativen Nachweisverfahren zur Detektion von CTC und deren prognostischer Bedeutung beim kolorektalen Karzinom.

1.1 Das kolorektale Karzinom

Unter dem Begriff kolorektales Karzinom werden das Kolon- und das Rektumkarzinom zusammengefasst. Kolonkarzinome werden je nach ihrer Lokalisation weiter in Karzinome des Kolon ascendens, Kolon transversum, Kolon descendens und Kolon sigmoideum unterteilt. Rektumkarzinome werden anhand ihres Abstandes zur Anokutanlinie in Karzinome des oberen (10-15cm), des mittleren (5-<10cm) und des unteren Rektumdrittels (<5cm) unterteilt.

1.1.1 Risikofaktoren

Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken wird durch verschiedene Einflüsse erhöht. Ein wichtiger Faktor ist das Lebensalter der Patienten, denn das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen bzw. Männer lag im Jahr 2014 bei 75 bzw. 72 Jahren (Kaatsch et al. 2018). Ein weiterer Faktor ist das Geschlecht - Männer sind weltweit häufiger betroffen als Frauen. Hier scheinen die Östrogene der prämenopausalen Frau protektiv zu wirken (Hoffken et al. 2015).

Kolorektale Karzinome treten familiär gehäuft auf. Besonders eine erstgradige Verwandtschaft zu einer Person mit einem kolorektalen Karzinom erhöht das Risiko auch zu erkranken (Taylor et al. 2010). Zu unterscheiden von der genannten polygenetischen, multifaktoriellen Vererbung sind die genetischen Syndrome, die einem klaren genetischen Vererbungsmodus folgen und die häufig zur Krebsentstehung in früheren Lebensjahren führen (Lung et al. 2015). So verursacht das autosomal-dominant vererbte Lynch-Syndrom ca. 3% der kolorektalen Karzinome (Hampel et al. 2008). Eine Mutation in den sogenannten Mismatch Repair-Genen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) liegt dabei dem erhöhten Risiko einer Krebsentstehung zugrunde (Chen et al. 2017). Ebenfalls durch eine Mutation bedingt

ist die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis coli, welche in annähernd 100% der Fälle bis zur 4. Lebensdekade zu einem kolorektalen Karzinom führt (Lung et al. 2015).

Des Weiteren korreliert ein Mangel an Bewegung (Namasivayam und Lim 2017), eine ungesunde ballaststoffarme Ernährung und ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) mit einem erhöhten Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Ning et al. 2010). Ein regelmäßiger Nikotin- sowie Alkoholkonsum führt ebenso zu einer Steigerung des Erkrankungsrisikos (Botteri et al. 2008, Fedirko et al. 2011). Zudem haben Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmkrankheit wie zum Beispiel dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa leiden, ein im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gesteigertes Risiko für ein kolorektales Karzinom (Bernstein et al. 2001, Canavan et al. 2006).

1.1.2 Klinik und Diagnostik

1.1.2.1 Klinische Symptome

Die Symptome eines kolorektalen Karzinoms sind uncharakteristisch. Folgende Symptome können als Hinweis, jedoch nicht als Beweis für das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms betrachtet werden. So kann eine Blutbeimengung zum Stuhl auf ein kolorektales Karzinom hindeuten, ist aber auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. Hämorrhoiden zu finden. Als weitere mögliche Hinweise sind Änderungen der Stuhlgewohnheiten nach dem 40. Lebensjahr, sowie allgemeine karzinombedingte Symptome wie Leistungsminderung, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Schmerzen und chronische Anämien aufgrund von Blutungen zu nennen. Im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium kann ein Ileus auf ein Karzinom hindeuten. Kommt es zu einer Metastasierung des Tumors können hierdurch ebenfalls weitere Symptome entstehen. Diese können durch die Infiltration von Organen einerseits Schmerzen und andererseits eine Funktionsminderung des infiltrierten Organs sein.

1.1.2.2 Diagnose und Einteilung des Tumorstadiums

Die Diagnostik des kolorektalen Karzinoms ist umfangreich. Asymptomatische Patienten können ab dem 50. Lebensjahr an Darmkrebsvorsorgeuntersuchungen teilnehmen. Im Rahmen der Darmkrebsvorsorge wird ab dem 50. Lebensjahr einmal jährlich die Stuhluntersuchung auf okkultes Blut von der Krankenkasse bezahlt. Ab

dem 55. Lebensjahr wird eine Vorsorgekoloskopie empfohlen und die Kosten werden von der Krankenkasse übernommen. Patienten mit oben genannten Symptomen oder Patienten mit einem erhöhten Karzinomrisiko aufgrund von Vorerkrankungen oder erkrankten Verwandten werden entsprechend früher untersucht. Standardmäßig wird eine digitale rektale Untersuchung sowie eine komplette Ileokoloskopie mit ggf. Polypektomie und histologischer Untersuchung durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) 2017).

Zeigt sich in der histologischen Untersuchung ein Karzinom wird im Präparat die Tiefeninfiltration (T), der histologische Differenzierungsgrad (G), das Vorhandensein oder Fehlen von Lymphgefäßinvasionen (L) und der Resektionsrand (R) beurteilt. Die histopathologische Beurteilung wird mit dem Präfix p vor dem jeweiligen Parameter gekennzeichnet. Der Resektionsrand gibt an, ob das Karzinom im Gesunden (=R0), also komplett entfernt wurde oder, ob das Karzinom den Resektionsrand überschritten hat und ggf. noch Tumorreste im Darm des Patienten verblieben sind (R1) (Baretton et al. 2011). Des Weiteren wird das Karzinom, das am häufigsten ein Adenokarzinom ist (Recio-Boiles und Cagir 2018), auf seinen Differenzierungsgrad untersucht. Man spricht hier vom Grading. Nach der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) unterscheidet das Grading vier Differenzierungsgrade (G1-G4). G1 entspricht einem gut differenzierten, entsprechend niedrigmalignen, G4 hingegen einem ent- bzw. undifferenzierten und entsprechend hochmalignen Tumor (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017).

Der Tumor wird weiterhin auf bestimmte genetische Mutationen untersucht. Das Protein Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) ist als sogenanntes Onkogen ein zentraler Bestandteil des über den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) vermittelten Signalweges zur Zellteilung. Bei einer aktivierenden Mutation im KRAS-Gen kommt es zu einer ungehemmten Zellteilung. Dies ist für die Therapieplanung im metastasierten Stadium entscheidend, da eine Antikörpertherapie gegen den EGFR bei mutiertem KRAS zu keiner Verlängerung des Gesamtüberlebens führt (Karapetis et al. 2008) und somit den betroffenen Patienten nicht zur Verfügung steht. Ergänzend wird für die Therapieplanung der Vascular Epidermal Growth

Factor Receptor (VEGFR) Status bestimmt, da auch dieser Rezeptor als Angriffspunkt für eine Antikörpertherapie genutzt werden kann.

Zur weiteren Diagnostik erfolgen sogenannte Staging-Untersuchungen. Diese dienen der Beurteilung der Ausdehnung und potentiellen Metastasierung des Karzinoms. Ein vollständiges Staging beinhaltet neben der kompletten Koloskopie, eine Abdomensonografie, ein Röntgenthorax und eine Bestimmung des carcino-embryonalen Antigens (CEA) als Tumormarker. Beim Rektumkarzinom wird zusätzlich eine starre Rektoskopie, eine Magnetresonanz- oder Computertomografie des Beckens und bei lokal begrenztem Tumor eine rektale Endosonografie durchgeführt. Bei Verdacht auf Fernmetastasen wird beim Kolon- und beim Rektumkarzinom zusätzlich eine Computertomografie empfohlen, sowie, je nach Befunden, weitere bildgebende Verfahren.

Anhand der ermittelten Informationen wird das Karzinom in unterschiedliche Stadien eingeteilt. Diese Stadieneinteilung wurde von der UICC auf der Basis statistischer Untersuchungen erstellt (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017). Die Einteilung in die Stadien erfolgt anhand der TNM Klassifikation (Wittekind et al. 2014), die die lokale Tumorausdehnung (T), den Befall von Lymphknoten mit malignen Zellen (N) sowie die potentielle Fernmetastasierung (M) einschließt. Die UICC Stadien reichen von 0 bis IV. Mit Hilfe des Stadiums kann die Therapie geplant werden und der Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit abgeschätzt werden. Die **Tabelle 1** gibt eine Übersicht über die UICC Stadien.

Tabelle 1: UICC Stadien für das kolorektale Karzinom (Wittekind et al. 2014)

UICC 2014	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1/N2	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/T4	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b
IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

1.1.3 Metastasierung

Der Primärtumor besitzt die Fähigkeit des invasiven und zugleich destruktiven Wachstums. Das die Basalmembran durchbrechende Wachstum erlaubt eine Absiedlung von Tumorzellen zumeist hämatogen oder lymphogen in andere Organsysteme (Eccles und Welch 2007). Besitzt die abgesiedelte Tumorzelle die Möglichkeit zur Angiogenese bilden sich zuerst Mikrometastasen. Aus den Mikrometastasen können dann Metastasen entstehen (Henne-Bruns et al. 2008).

Der häufigste Metastasierungsort des kolorektalen Karzinoms ist die Leber, gefolgt von der Lunge (van der Geest et al. 2015). Das Metastasierungsmuster beruht vor allem auf dem Lymph- und Blutabfluss aus der Region des Tumors. Karzinome des Kolons führen daher häufiger zu Lebermetastasen als Karzinome des Rektums. Dies erklärt sich dadurch, dass das Blut vom Kolon ascendens über die Vena colica dextra in die Vena mesenterica superior, vom Kolon transversum über die Vena colica media in die Vena mesenterica superior und vom Kolon descendens über die Vena mesenterica inferior fließt. Die Venae mesentericae wiederum fließen in die Vena portae hepatis und somit in die Leber. Über diesen Blutabfluss können folglich Tumorzellen in die Leber gelangen und dort zu Metastasen führen. Das Rektum wird bei der venösen Gefäßversorgung in drei Abschnitte eingeteilt. Der obere Abschnitt drainiert über die Vena rectalis superior in die Vena mesenterica inferior und zuletzt auch in die Vena portae hepatis und demzufolge in die Leber. Blut des mittleren Abschnitts hingegen fließt über die Vena rectalis media und Blut des unteren Abschnittes über die Vena rectalis inferior in die Vena iliaca interna. Durch diese unterschiedliche Gefäßversorgung kommt es im oberen Abschnitt des Rektums häufiger zu Lebermetastasen als bei den darunter liegenden Abschnitten. Im mittleren und unteren Abschnitt finden sich häufiger Metastasen der Lunge oder auch regionäre Lymphknotenmetastasen in der Leiste.

1.1.4 Therapie

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms hat sich in den letzten Jahrzehnten stets weiterentwickelt. Durch auf das Individuum angepasste und zielgerichtetere Therapien konnten in den letzten Jahren Fortschritte bezüglich der Überlebenszeit der Patienten gemacht werden. Die Therapie richtet sich vor allem nach den UICC Stadien, berücksichtigt also die lokale Tumorausdehnung und Infiltration, den Befall von Lymphknoten und das Vorhandensein von Metastasen. Die Hauptpfeiler der Behandlung sind die chirurgische Resektion, die (neo-) adjuvante Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom im UICC Stadium III und eine adjuvante Chemotherapie beim Kolonkarzinom im UICC Stadium III (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017).

Im nicht-metastasierten Stadium ist das vorrangige Therapieziel eine kurative Resektion des Primärtumors. Das Ausmaß dieser Resektion ist von der Lokalisation des Tumors und der damit einhergehenden Gefäß- und Lymphversorgung abhängig. Die Resektion erfolgt mit der „no-touch-Technik“, um die Gefahr einer Tumorzell dissemination zu vermindern (Atkin et al. 2005). Beim Resektionsrand wird ein zirkumferentieller Sicherheitsabstand von ≥ 1 mm angestrebt (Park et al. 2014). Die Lymphadenektomie sollte 12 oder mehr Lymphknoten umfassen (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017). Mehrere Studien belegen, dass eine Resektion von möglichst vielen tumornahen Lymphknoten mit einer besseren Prognose einhergeht. Hierbei verbessert sich die Prognose bezogen auf das Überleben des Patienten, sowohl bei der Resektion von tumorfreien, als auch tumorbehafteten Lymphknoten (Prandi et al. 2002, Le Voyer et al. 2003, Ogino et al. 2010).

Der operativen Behandlung folgt je nach Stadium eine postoperative sogenannte adjuvante Chemotherapie. Hierbei ist zu trennen zwischen dem Kolon- und Rektumkarzinom. Beim Kolonkarzinom ist eine adjuvante Chemotherapie ab Stadium II bei Vorhandensein von Risikofaktoren möglich. Studien zeigten bei Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II ohne Risikofaktoren keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (Benson et al. 2004, O'Connor et al. 2011). Bei Patienten im UICC Stadium II mit Risikofaktoren zeigen sich uneinheitliche Studienergebnisse bezüglich des Benefits einer adjuvanten Chemotherapie. Einerseits konnten Kumar et al. 2015 in einer Kohorte von 1286 Patienten im UICC Stadium II belegen, dass vor allem Patienten mit einer hohen lokalen Tumorausdehnung (T4) sowie auch Patienten mit den Risikofaktoren (T4, Perforation des Tumors, schlechter Differenzierungsgrad, Obstruktion, Lymphgefäßinvasion, Perineuralinvasion, residualer Tumor nach OP, < 12 entfernte Lymphknoten) in der Gesamtheit betrachtet von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren (Kumar et al. 2015). Andererseits ließ sich dieser Effekt in der Studie von O'Connor et al. nicht nachweisen (O'Connor et al. 2011). Demnach ist eine Chemotherapie im UICC Stadium II möglich, aber standardmäßig nicht etabliert. Ab UICC Stadium III, also bei positivem Lymphknotenstatus, zeigt sich hingegen eine signifikante Prognoseverbesserung bei Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie (Francini et al. 1994, O'Connor et al. 2011), weshalb diese empfohlen wird (Leitlinienprogramm Onkologie der

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017).

In Studien wurde eine verbesserte lokale Kontrolle des Rektumkarzinoms durch eine zusätzliche präoperative sogenannte neoadjuvante Therapie belegt (Sauer et al. 2012). Daher werden Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels im UICC Stadium II und III einer neoadjuvanten Radiochemotherapie oder Kurzzeit-Radiotherapie zugeführt. Eine adjuvante (Radio-) Chemotherapie ist analog zur Behandlung des Kolonkarzinoms im Stadium II möglich und wird im Stadium III, sowie bei Vorliegen histopathologischer Risikofaktoren empfohlen. In der aktuellen Leitlinie des KRK wird hingegen wegen mangelnder Studienlage keine Empfehlung für oder gegen eine adjuvante Therapie nach schon erfolgter neoadjuvanter Therapie ausgesprochen (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017).

Häufig verwendete Chemotherapieprotokolle sind das sogenannte FOLFIRI-Schema (Fluorouracil, Leucovorin und Irinotecan) sowie die Oxaliplatin-haltigen FOLFOX- und XELOX-Schemata. Das sogenannte FOLFOX-Schema besteht aus Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin. Die als XELOX-Schema bezeichnete Kombination setzt sich aus Capecitabine und Oxaliplatin zusammen. Die medikamentöse Therapie des KRK hat in den letzten Jahren durch die Entwicklung sogenannter zielgerichteter Antikörper eine deutliche Verbesserung erfahren. Beispielhaft kann bei metastasiertem Tumor ohne Mutation im KRAS-Gen, also bei Vorliegen des KRAS-Wildtyps, der anti-EGFR Antikörper Cetuximab eingesetzt werden. In der sogenannten CRYSTAL-Studie führte die zusätzliche Gabe von Cetuximab zum FOLFIRI-Schema zu einem verlängerten Überleben und einer verringerten Tumorprogression verglichen mit dem FOLFIRI-Schema ohne Cetuximab (Van Cutsem et al. 2009, Van Cutsem et al. 2015). Bei Vorliegen einer Mutation im KRAS-Gen kann nach Berücksichtigung weiterer Kriterien eine Therapie mit einem Antikörper gegen VEGF in Betracht gezogen werden.

Leider sind bei ca. 20% aller Patienten mit KRK (25% bei Patienten mit Kolonkarzinom, 18% bei Patienten mit Rektumkarzinom) bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen vorhanden (Kekelidze et al. 2013). Das therapeutische Vorgehen bei Metastasierung ist komplex. Ein Therapiealgorithmus wurde in der Leitlinie zum kolorektalen Karzinom entwickelt. Primäres Therapieziel ist die möglichst starke Reduktion der Tumormasse. Unterschieden werden primär resektable Metastasen

von nicht resektablen Metastasen. Resektable Metastasen sollen primär reseziert werden und sind kurativ behandelbar. Primär nicht resektable Metastasen sollen einer Systemtherapie zugeführt werden. Im Verlauf wird durch Folgeuntersuchungen über eine mögliche sekundäre Resektabilität oder den Beginn einer palliativen Therapie entschieden. Die Wahl des Therapieverfahrens ist weiterhin abhängig von dem Allgemeinzustand des Patienten und dem Wunsch des Patienten (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017). Der Therapieplan wird in interdisziplinären Tumorkonferenzen erarbeitet. Entschieden wird dort über die mögliche Resektion des Tumors, ob und welche Radio- und/oder Chemotherapie durchgeführt werden soll, sowie über mögliche lokale Verfahren zur Verkleinerung der Metastasen, wie z.B. die Radiofrequenzablation. Ergänzt wird die Behandlung um Schmerztherapie, psychosoziale und psychoonkologische Unterstützung. Vor allem im Rahmen eines palliativen Konzepts haben die genannten supportiven Maßnahmen eine große Bedeutung.

Nach Abschluss der Therapie beginnt die Zeit der Nachsorge. In den ersten 5 Jahren nach kurativer Therapie besteht ein erhöhtes Risiko für ein lokales Rezidiv, Fernmetastasen oder einen metachronen Zweittumor (Mentges et al. 1988, Enblad et al. 1990, Galandiuk et al. 1992). In diesem Zeitraum wird daher ein vom Tumorstadium abhängiges, festes Schema an Untersuchungen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) 2017).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen

Einige Zellen des malignen Primärtumor und der Metastasen besitzen die Fähigkeit zur Migration in das Blut- und Lymphsystem. Die Existenz freigesetzter Tumorzellen im Blut wurde erstmalig im Jahr 1869 postuliert (Ashworth 1869). Die Zellen werden als zirkulierende Tumorzellen (CTC) bezeichnet. Zu unterscheiden von den CTC sind die disseminierten Tumorzellen (DTC), die sich im Knochenmark oder in anderen Geweben befinden. CTC und DTC lassen sich unter dem Begriff isolierte Tumorzellen (ITC) zusammenfassen und sind durch die UICC als Zellcluster unter 0,2mm oder einzelne Tumorzellen definiert (Markl et al. 2013).

Die meisten kolorektalen Tumoren sind epithelialen Ursprungs (Recio-Boiles und Cagir 2018). Nach aktuellem Wissenstand wird davon ausgegangen, dass einige Tumorzellen durch Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp (epitheliale-mesenchymale Transition= EMT) in die Umgebung, sowie in Blut- und Lymphgefäße wandern können (Intravasation). Mit dem Blutstrom gelangen die CTC in die Kapillaren von anderen Organen. Nach Einwanderung der Zellen in das Gewebe des jeweiligen Organs (Extravasation) und eine Umwandlung der mesenchymalen in epitheliale Tumorzellen (mesenchymal-epitheliale Transition) besteht nun die Möglichkeit der lokalen Proliferation und Metastasenentstehung (Fidler 2003, Steinert et al. 2012). Die EMT scheint also eine zentrale Rolle im Prozess der Metastasierung zu spielen, da sie die Migration und Invasion von CTC ermöglichen und deren Apoptose verhindern kann (Thiery et al. 2009, Sun et al. 2011). Dies zeigt jedoch nur eine Möglichkeit der komplexen Metastasierungskaskade. Der wirkliche Ablauf wird bis heute jedoch nur in Teilen verstanden.

Schätzungsweise gelangen täglich 10^6 Zellen pro Gramm Tumorgewebe in das Blut (Chang et al. 2000). 1970 wies Fidler anhand von Tierexperimenten mit Melanomzellen nach, dass der Großteil der Tumorzellen innerhalb kürzester Zeit im Blut untergeht, sodass letztendlich nur relativ wenige Tumorzellen potentiell Metastasen bilden können (Fidler 1970). Aber eben diese, wenn auch wenigen, Zellen sind entscheidend. In mehreren Studien und Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von CTC bei Patienten mit KRK mit einem schlechteren Überleben einhergeht (Rahbari et al. 2010, Hinz et al. 2017, Tan und Wu 2017).

Unterschiedliche Verfahren zum Nachweis von CTC sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Problematisch an der Detektion ist, dass es verschiedene heterogene Subpopulationen zirkulierender Tumorzellen gibt. Es gibt sowohl epitheliale Zellen, als auch mesenchymale Zellen, die eine EMT durchlaufen haben und CTC mit Stammzellcharakter, die als zirkulierende Tumorstammzellen bezeichnet werden (Hardingham et al. 2015). Dies ist insofern problematisch, weil die derzeit eingesetzten Nachweisverfahren die CTC meist mit einem bestimmten Marker detektieren und somit oft nur eine Subgruppe, nicht aber den gesamten Pool der CTC erfassen. Aktuelle Nachweisverfahren basieren vor allem auf immunologischen Verfahren und der Polymerasekettenreaktion über die reverse Transkriptase (RT-PCR). Immunzytochemisch werden mittels morphologischer Besonderheiten und Expression spezieller

Antigene CTC detektiert. Das Cellsearch® System, welches das erste von der U.S. Food and Drug Administration zugelassene standardisierte System zur Detektion von CTC beim metastasierten kolorektalen, Brust- und Prostatakrebs ist, nutzt einen Antikörper (Ber-EP4) gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (Huang et al. 2015). EpCAM ist auf normalen Epithelzellen exprimiert. Auf Karzinomzellen einiger Tumore, unter anderem beim KRK, ist dieses oft hochreguliert. Der Antikörper gegen EpCAM wird bei dem CellSearch® System magnetisch gekoppelt und ermöglicht dadurch eine halbautomatische magnetische Separation von Tumorzellen. Es folgt eine Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne, um nur kernhaltige Zellen zu selektieren. Im nächsten Schritt wird eine positive Selektion mittels Antikörpern gegen Zytokeratin 8, 18 und/oder 19 und die Abtrennung von Leukozyten mittels negativer Selektion von anti-CD45 Antikörpern durchgeführt. Bei dem Cellsearch® System ist zu beachten, dass bei CTC, die EMT durchlaufen haben, eine Herabregulierung von EpCAM nachgewiesen werden konnte und folglich davon auszugehen ist, dass nicht alle Subpopulationen der CTC erkannt werden (Gorges et al. 2012). Eine aktuelle Studie zeigt jedoch auch, dass die Herabregulierung von EpCAM nicht zu einer geringeren Sensitivität des CellSearch® Systems führt (Kerr et al. 2017). Dies zeigt, dass weitere größere Studien notwendig sind, um den Prozess der EMT besser zu verstehen und somit präzisere Detektionssysteme entwickeln zu können.

Ein weiteres häufig verwendetes Nachweisverfahren ist der indirekte Nachweis von CTC und DTC mittels PCR. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte PCR genutzt. Als ein Marker für die PCR wird Zytokeratin 20 (CK20) verwendet. CK20 ist als großes Intermediärfilament Teil des Zytoskeletts von epithelialen Zellen und findet sich fast ausschließlich in Zellen des Gastrointestinaltrakts, in Urothelzellen und in Merkelzellen (Moll et al. 1992) und eignet sich daher für die Selektion von CTC beim kolorektalen Karzinom. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität wird der auf dem Nachweis von CK20-mRNA basierenden PCR eine große Bedeutung zugesprochen (Soeth et al. 1997, Hinz et al. 2015, Hinz et al. 2017). Weitere bekannte Marker sind EpCAM, CK19, EGFR und CEA. Teilweise werden diese Marker zum Nachweis von CTC auch in Kombination als sogenannte Multimarker-PCR genutzt.

Von den CTC und DTC ist der Begriff Mikrometastase abzugrenzen. Bei Mikrometastasen handelt es sich nach der Definition der UICC um einen extravaskulären Tumorzellverbund, der aufgrund seines im Vergleich zu CTC und DTC größeren Durchmessers von 0,2 bis 2mm histologisch nachweisbar ist (Markl et al. 2013).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Evaluation einer neu etablierten semi-quantitativen Multimarker-PCR zum Nachweis von CK20- und EGFR-positiven zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Mit dem qualitativen Nachweis von CTC konnte in unserer Arbeitsgruppe sowie in weiteren früheren Studien bereits der unabhängig negative prognostische Wert von CTC belegt werden (Rahbari et al. 2010, Hinz et al. 2017). Mithilfe der vorliegenden Arbeit soll nun eine bessere Prognoseabschätzung und Risikostratifizierung erreicht werden, indem nicht nur das Vorhandensein von CTC, sondern auch die Quantität der CK20-mRNA Expression berücksichtigt wird. Hierzu wird die Prognose der Patienten anhand der Überlebenszeit und des krankheitsfreien Überlebens dargestellt. Ebenso wurde aufgrund der auf früheren Arbeiten basierenden Hypothese, dass EGFR-positive Zellen insbesondere beim Rektumkarzinom mit dem Überleben korrelieren (Goldstein und Armin 2001, Spano et al. 2005) die Korrelation überprüft.

Ein besonderer Fokus liegt auf den frühen UICC Stadien I und II. Patienten mit R0 reseziertem Tumor erhalten in diesen Stadien standardmäßig keine adjuvante Chemotherapie. Jedoch umfassen diese Stadien auch Tumore, welche die Tunica muscularis und Subserosa infiltrieren und somit metastasierungsfähig sind. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, ob durch die neu entwickelte semi-quantitative CK20 RT-PCR Risikopatienten in frühen Tumorstadien identifiziert werden können, die ggf. in Zukunft von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden.

Weiterhin sollen anhand der umfangreich erhobenen klinischen Daten potentiell prognostische Variablen erfasst und diese mit bisherigen Studien verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Das untersuchte Kollektiv in dieser prospektiven Studie umfasst insgesamt 381 Patienten, die aufgrund eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. Die ethische Zulassung der Studie erfolgte durch die Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (AZ110/99, siehe Anhang). Alle eingeschlossenen Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung vor der Operation und Probenentnahme ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Behandlung der Patientendaten erfolgte gemäß den Datenschutzrichtlinien streng vertraulich. Die klinischen und Nachsorgedaten wurden rückwirkend erfasst. Bei den gesammelten Blutproben wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts Universität zu Kiel eine semi-quantitative RT-PCR zum Nachweis CK20- und EGFR-positiver zirkulierender Tumorzellen durchgeführt. Diese neugewonnenen Daten wurden mit den Nachsorge- und klinischen Daten verknüpft und durch statistische Auswertung analysiert, inwiefern der Nachweis der CTC eine prognostische Relevanz hat.

2.2 Einschlusskriterien und Patientenkohorte

Jeder der 381 Patienten wurde in den Jahren 2004 bis 2013 an einem histologisch gesicherten kolorektalen Karzinom operiert. Die Operationen wurden in der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel nach aktuellem Standard durchgeführt. Eingeschlossen wurden nur Patienten bei denen der Primärtumor komplett reseziert wurde (R0). Weiterhin wurden Patienten mit hepatischer Aussaat des Primarius eingeschlossen, deren Lebermetastasen kurativ (R0) im Rahmen der Operation des Primärtumors synchron reseziert wurden. Ausgeschlossen hingegen wurden Patienten mit primär metastasiertem Tumor, deren Metastasen erst metachron reseziert wurden. Als Einschlusskriterium zählte außerdem, dass genügend Blut für die PCR entnommen werden konnte.

Die histologisch-pathologische Begutachtung und Einteilung der TNM-Klassifikation der Karzinome erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-

Holstein, Campus Kiel. Patienten im UICC Stadium III und IV wurden nach aktuellen Leitlinien eine adjuvante bzw. palliative Chemotherapie empfohlen. Patienten mit Rektumkarzinom und einem präoperativen Stadium größer als T3 oder N1 erhielten eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit 50.4 Gy und zwei Zyklen Chemotherapie mit 5-Fluoruracil sowie postoperativ 4 Zyklen Chemotherapie mit 5-Fluoruracil. In einigen Fällen wurde aufgrund der Empfehlungen der interdisziplinären Tumorkonferenz davon abgewichen.

2.3 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe befanden sich 15 freiwillige gesunde Spender, welche ausführlich über die Studie aufgeklärt wurden und vor der Probenentnahme ihr schriftliches Einverständnis zur freiwilligen Teilnahme abgaben. Die Blutproben wurden ebenfalls mit der im Folgenden beschriebenen Methode analysiert.

2.4 Probenentnahme

Nach Einleitung der Narkose erfolgte präoperativ die Blutentnahme. Das Blut wurde zentralvenös entnommen und in mit Lithium-Heparin gefüllten S-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) asserviert. Bei den gesunden Probanden erfolgte die Entnahme des Blutes durch die Punktion einer Armvene.

2.5 Semi-quantitative CK20 RealTime-PCR

Es wurde eine semi-quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (semi-quantitative real time-PCR, qRT-PCR) zum Nachweis von CTC verwendet. Bei dieser Methode wurde mit je drei parallelen PCR-Ansätzen pro Probe (technische Replikate) die Amplifikation als Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit gemessen und mithilfe eines als Referenz der Genexpression dienenden housekeeping-Gens eine relative Quantifizierung durchgeführt.

2.5.1 Isolierung der mononukleären Zellfraktion

Alle Blutproben in Li-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Germany) wurden bei Raumtemperatur (18-25°C) aufbewahrt und innerhalb von 4 Stunden

zentrifugiert. Die Dichtekissen-zentrifugation zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion (MNC), in welcher als Subpopulation auch die CTC enthalten sind, wurde mit Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Freiburg, Germany) durchgeführt. Dafür wurde Vollblut im Verhältnis 1:3 mit Zellkulturmedium (RPMI-1640 ohne Zusätze, Life Technologies, Darmstadt, Germany) verdünnt und anschließend vorsichtig in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen auf ein 15ml Ficoll-Hypaque Kissen überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend für 40 Minuten bei Raumtemperatur und 400 xg zentrifugiert (Zentrifuge Typ Rotina 420, Hettich, Tuttlingen, Germany; Zentrifugation bei langsamstem Anlauf und Auslauf ohne Rotorbremse). Bei dieser Zentrifugation sammelt sich die MNC-Fraktion entsprechend ihrer spezifischen Auftriebsdichte als Interphase auf dem Ficoll-Hypaque-Kissen, während Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Auftriebsdichte besitzen, ein Pellet am Röhrchenboden bilden. Nach der Zentrifugation wurde die MNC-Interphase mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (Raumtemperatur, 30 Min., 340 xg bei vollem Anlauf und Rotorbremse). Danach wurden die MNC (Pellet) in 1 ml PBS resuspendiert und mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

2.5.2 Isolierung der RNA

Zur Lyse der MNC wurde RNAPure Reagenz (VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Verfahren der Lyse zur Isolierung der RNA beinhaltet nach der Aufteilung der Zellsuspensionen und Zentrifugation, das Homogenisieren, die Phasentrennung nach erneuter Zentrifugation, die folgende RNA-Präzipitation, das Waschen der RNA und das Lösen der RNA. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Die Unversehrtheit der RNA wurde mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) kontrolliert.

2.5.3 Synthese der cDNA

Aus jeweils 3µg RNA wurde mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert.

2.5.4 PCR

Die PCR wurde mit dem TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und dem StepOnePlus RealTime PCR-Cycler (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für jede Analyse wurde 20µl Reaktionsansatz nach folgendem Schema vorbereitet:

Komponente	Volumen für 20µl Ansatz [µl]	Endkonzentration
TaqMan Universal MasterMix II (2x)	10	1x
TaqMan Gene Expression Assay (20x)	1	1x
cDNA + H ₂ O	9	200 ng
Gesamtvolumen	20	

Die genutzten qRT-PCR Assays waren folgende TaqMan Gene Expression Assays: KRT20 Hs00966063_m1 (Zytokeratin 20, CK20), TBP Hs00427621_m1 (TATA-binding protein, TBP), EGFR Hs01076078_m1 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

Pro PCR wurden 200ng cDNA verwendet und es wurden von jeder Probe jeweils drei technische Replikate verwendet. Der durchschnittliche Schwellenwert der Amplifikationsreaktion (C_T value) aller Replikate wurde als Grundlage der Berechnungen genutzt. Für die semi-quantitative Berechnung der Zielgenexpression nach der $2^{-\Delta C_T}$ Methode (Schmittgen und Livak 2008) diente die Expression des TATA bindenden Proteins (TBP) als Referenz und housekeeping-Gen. Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zahl der Zyklen
1	95 °C	10 Min	1
2	95 °C	15 Sek	} 65
3	60 °C	60 Sek	
4	4 °C	bis Ende	

2.5.5 Spiking-Experimente

Im Rahmen der Qualitätskontrolle und zur Prüfung der Nachweisgrenze der in dieser Arbeit verwendeten qRT-PCR wurden sogenannte Spiking-Experimente mit dem Blut eines gesunden freiwilligen Spenders durchgeführt. Die CK20-positive menschliche Kolonkarzinom-Zelllinie HT29, wurde hierfür in RPMI-1640 Medium (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), supplementiert mit 10% FBS (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) sowie 1mM Glutamax und 1mM Na-Pyruvate (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), kultiviert. Dann wurden 1000, 100, 10 und 1 HT29 Kolon-Karzinom-Zellen/Zelle zu jeweils 1ml Blut des Spenders hinzugefügt und aus dem Blut wurde wie *oben* beschrieben die MNC-Fraktion durch Ficoll-Zentrifugation isoliert und daraus Gesamt-RNA präpariert. Die relative Quantität der HT-29-Zellen wurde dann mittels der in dieser Arbeit verwendeten CK20 qRT-PCR analysiert, um so die Sensitivität dieser Methode zu überprüfen.

2.6 Klinische Daten

Die klinischen Daten wurden in die Forschungsdatenbank ProWebDB der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH, Campus Kiel eingegeben. Die ca. 100 Variablen wurden aus Arztbriefen, Anamnesebögen, Operationsberichten, Anästhesieprotokollen, Patientenkurven, Berichten und Befunden des Instituts für Pathologie, den Ambulanzakten der onkologischen Ambulanz des UKSH, dem Krebsregister Schleswig-Holstein aus Bad Segeberg, sowie von den ambulant weiterbehandelnden Ärzten recherchiert. Beispielhaft für die ausgewerteten Daten sind hier einige genannt: Datum der Erstdiagnose, demografische Daten der Patienten, Tumorlokalisierung, Tumorstadium inklusive histopathologischer Befund, genetische Syndrome, Begleiterkrankungen, Operationsverfahren (offen, laparoskopisch, Konversion von laparoskopisch zu offen, daVinci), perioperative Therapien, Zeitpunkt von Rezidiven, Zeitpunkt des Todes und weitere.

2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM, München, Deutschland) und MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgien) genutzt.

Die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit wurde sowohl als krankheitsfreies Überleben (KÜ), als auch als Gesamtüberleben (GÜ) mittels der Kaplan-Meier Analyse errechnet. Ziel der durchgeführten univariaten Analyse war es, bestimmte Einflussfaktoren und Korrelationen zu untersuchen. Die Berechnung erfolgte hier mit dem Log-rank-Test. Die Abhängigkeit der Biomarker von klinischen Parametern wurde mittels des χ^2 Test analysiert. In die multivariate Analyse wurden Einflussfaktoren, die sich in der univariaten Analyse signifikant zeigten mittels der Cox-Regressionsanalyse, unter Annahme eines konstanten Hazard Ratio der jeweiligen Gruppen, eingeschlossen und der Effekt bestimmter Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit bestimmt und mittels des Hazard Ratio und P-Wertes dargestellt. Zur Ermittlung eines Cut-Off Wertes, also Schwellenwertes der CK20-mRNA Expression wurden die „Receiver-Operating-Characteristic-Kurve“ (ROC-Kurve) und der Youden-Index verwendet. Der Cut-Off Wert stellt den Wert mit der höchsten Sensitivität und Spezifität dar und ermöglicht so eine Einteilung eines quantitativen Parameters in zwei Gruppen. Alle berechneten P-Werte sind zweiseitig und wurden bei einem Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Deskription der Kohorte

3.1.1 Patienten

In der untersuchten Kohorte waren 235 Patienten (61,7%) männlich und 146 Patienten (38,3%) weiblich. 210 Patienten (55,1%) waren bei Erstdiagnose jünger als 70 Jahre, 171 Patienten (44,9%) waren älter als 70 Jahre. Im Mittel lag der Zeitpunkt der Diagnose bei 68,5 Jahren, wobei der Diagnosezeitpunkt zwischen dem 32. Und dem 95. Lebensjahr lag. Der Tumor war bei 224 (58,8%) Patienten im Kolon und bei 157 Patienten (41,2%) im Rektum lokalisiert. Anhand des Körpergewichts und der Größe wurde der Body-Mass-Index (BMI) errechnet. Die Klassifikation der World Health Organization diente zur Definition von Untergewicht als BMI unter 18,5, Normalgewicht als BMI zwischen 18,5 und 25 und Übergewicht als BMI über 25 zum Operationszeitpunkt. Demnach waren 9 Patienten (2,4%) untergewichtig, 155 Patienten (40,7%) normalgewichtig, 207 Patienten (54,3%) übergewichtig. Bei 10 Patienten (2,6%) war der BMI unbekannt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Klinische Eigenschaften der Patientenkohorte

	Anzahl der Patienten (%)
Gesamt	381 (100,0)
Alter (Jahre)	
<70	210 (55,1)
>70	171 (44,9)
Geschlecht	
Männlich	235 (61,7)
Weiblich	146 (38,3)
Tumorlokalisation	
Kolon	224 (58,8)
Rektum	157 (41,2)
BMI (kg/m²)	
<18,5	9 (2,4)
18,5 – 25	155 (40,7)
>25	207 (54,3)
unbekannt	10 (2,6)
UICC Stadium	
I	118 (31,0)
II	91 (23,9)
III	88 (23,1)
IV	84 (22,0)
pT	
T0	8 (2,1)
T1	40 (10,5)
T2	100 (26,2)
T3	186 (48,8)
T4	47 (12,3)
pN	
N0	225 (59,1)
N1	82 (21,5)
N2	73 (19,2)
pM	
M0	296 (77,7)
M1	85 (22,3)
Neoadjuvante Therapie	
Ja	54 (14,3)
Nein	323 (84,8)
unbekannt	4 (1,1)
Adjuvante Therapie	
Ja	136 (35,7)
Nein	237 (62,2)
unbekannt	8 (2,1)

3.1.2 UICC Stadien

Die Patienten wurden anhand der Ausdehnung ihres Primärtumors, dem Vorhandensein bzw. Fehlen von Lymphknotenmetastasen und Metastasen unterschiedlichen UICC Stadien zugeteilt. Im UICC Stadium I befanden sich 118 Patienten (31%), im UICC Stadium II 91 Patienten (23,9%), im UICC Stadium III 88 Patienten (23,1%) und im UICC Stadium IV, welches eine Metastasierung voraussetzt, 84 Patienten (22%). Weitere Informationen bezüglich der Verteilung in die pT-, pN- und pM-Gruppen befinden sich in der **Tabelle 2**.

3.1.3 Neoadjuvante und adjuvante Therapie

Bei 54 Patienten (14,3%) wurde eine neoadjuvante Therapie durchgeführt. Diese neoadjuvante Radiochemotherapie wurde bei Patienten mit einem Karzinom im Rektum ab Stadium \geq T3 oder \geq N1 durchgeführt. 323 Patienten (84,8%) erhielten keine neoadjuvante Therapie. Bei 4 Patienten (1,1%) ist unbekannt, ob eine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde oder nicht. Eine adjuvante Therapie wurde bei insgesamt 136 Patienten (35,7%) angewandt. 237 Patienten (62,2%) erhielten keine adjuvante Therapie, bei 8 Patienten (2,1%) ist diese Angabe unbekannt.

3.1.4 Überlebensdaten und Nachsorgedaten

Die mediane Nachbeobachtungszeit beträgt 34 Monaten (0 - 151 Monate). Es wurde einerseits errechnet wie viele Patienten 5 Jahre nach Diagnosestellung am Leben sind (5-Jahres-Gesamtüberlebensrate= 5J-GÜR) und andererseits wie viele Patienten nach 5 Jahren krankheitsfrei leben (5-Jahres-krankheitsfreie-Überlebensrate= 5J-KFÜR). Betrachtet man das gesamte Patientenkollektiv liegt die 5J-GÜR bei 67,5% und die 5J-KFÜR bei 58,8%.

3.2 Univariate Analyse

3.2.1 Assoziation von den klinischen Charakteristika mit dem Überleben der Patienten

In der univariaten Analyse mittels des Log-Rank-Tests zeigt sich, dass Patienten über dem 70. Lebensjahr eine statistisch signifikant ($p=0,038$) verringerte 5J-GÜR haben, wohingegen das Alter beim krankheitsfreien Überleben keinen signifikanten Faktor darstellt.

Einen signifikanten Unterschied sowohl im Gesamt- ($p<0,001$) als auch im krankheitsfreien Überleben ($p=0,006$) zeigt der BMI. Normal- und übergewichtige Patienten überleben die ersten 5 Jahre nach Diagnose prozentual häufiger als untergewichtige Patienten. Auch die UICC Stadien weisen mit einem p -Wert $<0,001$ eine statistische Signifikanz mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben auf. Ein niedriges UICC Stadium geht verglichen mit höheren UICC Stadien mit einem längeren Überleben einher. Während im UICC Stadium I 87,9% der Patienten die ersten 5 Jahre überleben, sind es im UICC Stadium II 74,6%, im UICC Stadium III 53,5% und im UICC Stadium IV 5,6% (**Abbildung 2**). Ähnliche Daten fanden sich für das krankheitsfreie Überleben (**Tabelle 3**). Dieses Ergebnis verdeutlicht zum einen die große Relevanz der UICC Stadien als Prognoseprädiktor und andererseits, dass es sich bei unserem Patientenkollektiv um eine repräsentative Kohorte handelt. Weiterhin sind die Komponenten der Stadieneinteilung nach UICC auch einzeln für sich genommen signifikant. Die Tiefeninvasion des Tumors (pT), der Lymphknotenstatus (pN) und das Vorhandensein bzw. Fehlen von Metastasen (pM) korrelieren signifikant mit dem Überleben (**Tabelle 3**).

Die perioperative Therapie in Form von neoadjuvanter (Radio-)Chemotherapie und adjuvanter (Radio-)Chemotherapie geht nur als adjuvante Therapie mit einem signifikant verlängerten Gesamt- und krankheitsfreies Überleben einher, nicht aber als neoadjuvante Therapie.

Tabelle 3: Einfluss klinischer Charakteristika der Patienten auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben (Log-Rank-Test)

		5J-GÜR in %	univariate Analyse (P)	5J-KFÜR in %	univariate Analyse (P)
Gesamt		67,5		58,8	
Alter (Jahre)	<70	58,7	0,038	55,6	0,185
	>70	54,7		51,6	
Geschlecht	männlich	54,5	0,935	52,4	0,755
	weiblich	62,0		57,1	
Tumorlokalisation	Kolon	63,9	0,083	58	0,071
	Rektum	49,0		48	
BMI (kg/m²)	<18,5	22,2	<0,001	22,2	0,006
	18,5 – 25	57,7		55,2	
	>25	60,6		56,7	
UICC Stadium	I	87,9	<0,001	86,8	<0,001
	II	74,6		67,2	
	III	53,5		47,7	
	IV	5,6		3,9	
pT	T0	58,3	<0,001	58,3	<0,001
	T1	90,4		90,9	
	T2	83,6		79,0	
	T3	42,7		39,9	
	T4	25,9		19,3	
pN	N0	76,9	<0,001	73,5	<0,001
	N1	43,5		41,6	
	N2	16,5		10,2	
pM	M0	74,0	<0,001	69,9	<0,001
	M1	5,5		3,9	
neoadjuvante Therapie	Ja	64,2	0,198	57,2	0,535
	Nein	55,7		53,4	
adjuvante Therapie	Ja	44,1	0,001	38,8	<0,001
	Nein	65,5		62,9	
P Alle fettgedruckten P-Werte sind als signifikant anzusehen					

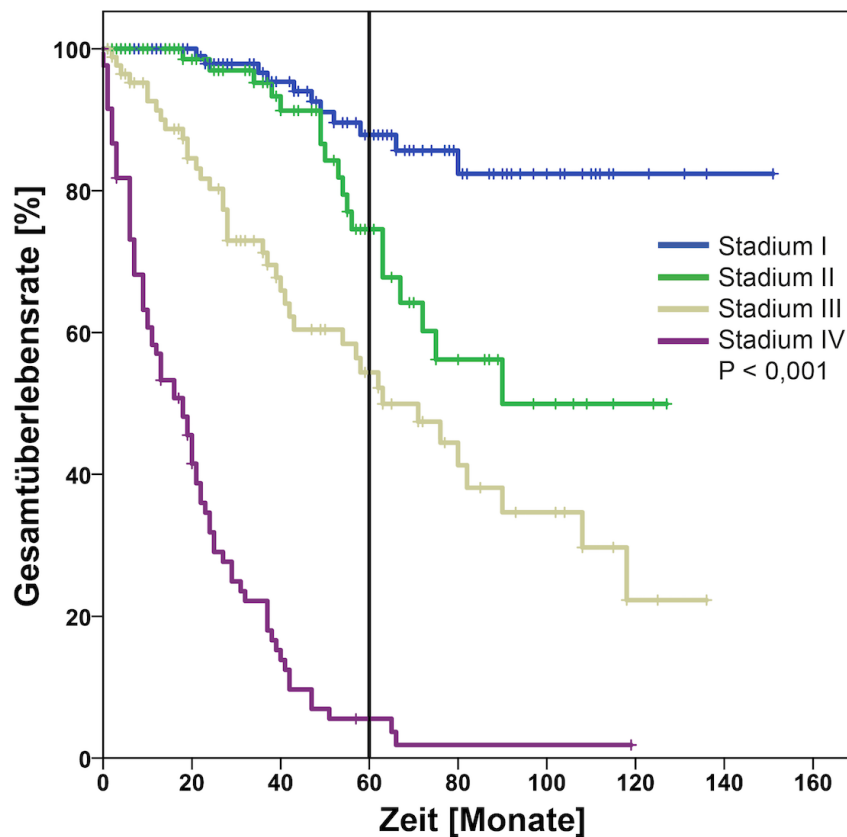


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Abhängigkeit der UICC Stadien

$P = P$ -Werte (Log-Rank-Test). Das 5-Jahres Überleben ist mit einer fettgedruckten vertikalen Linie gekennzeichnet.

3.2.2 Kontrollgruppe und Spiking-Experimente

Zur Prüfung der Spezifität der neu entwickelten semi-quantitativen RT-PCR für CK20 oder EGFR wurde in einer Kontrollgruppe das Blut von 15 gesunden Spendern untersucht. Keiner der 15 getesteten Spender war positiv für CK20 oder EGFR.

Durch die Zugabe von HT29 Tumorzellen, wurde die Sensitivität der qRT-PCR geprüft. Die Nachweisgrenze lag bei 1 Tumorzelle pro ml Vollblut für CK20 und 10 Tumorzellen pro ml Vollblut bei EGFR (**Abbildung 3**).

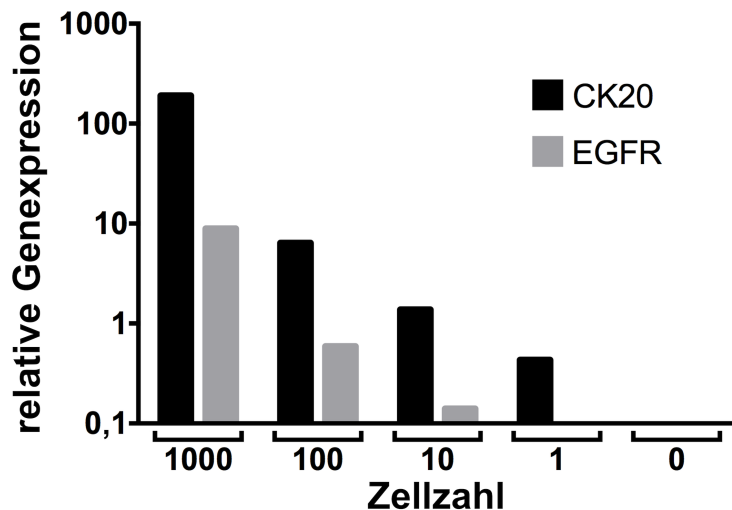


Abbildung 3: Semi-quantitative RT-PCR Analyse der CK20 und EGFR Expression in mononukleären Zellfraktionen aus peripherem Blut eines gesunden Spenders, welchem eine definierte Anzahl von Kolonkarzinomzellen (HT29) zugesetzt wurde

3.2.3 Qualitative Detektion von CK20 und EGFR

Im Gesamtkollektiv von 381 Patienten wurden bei insgesamt 53,0% der Patienten (n=202) CK20-positive CTC und bei 44,9% der Patienten (n=171) EGFR-positive CTC nachgewiesen. In der Gesamtkohorte korrelierte der Nachweis CK20-positiver CTC mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben (jeweils $p < 0,001$). Dieser signifikante Unterschied bezogen auf das Überleben zeigte sich auch bei getrennter, unabhängiger Betrachtung der Patienten mit Rektum- und Kolonkarzinom ($p = 0,007$ und $p < 0,001$). Die Detektion von EGFR wies weder eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben ($p = 0,993$), noch mit dem krankheitsfreien Überleben ($p = 0,880$) auf. Auch eine Dualmarker-Analyse von CK20 und EGFR wies keine signifikante Korrelation mit dem Überleben auf (Daten nicht abgebildet).

3.2.4 Berechnung eines Schwellenwertes (Cut-Off) der CK20-mRNA

Expression in der Gesamtkohorte

Nicht nur der qualitative Nachweis, sondern auch die Quantität der relativen CK20-mRNA Genexpression können bei der Prognoseabschätzung wichtige Informationen bieten. Über eine ROC-Kurven-Analyse (**Abbildung 4**) und den Youden-Index konnte ein Cut-Off ermittelt werden, welcher das Kollektiv in eine Gruppe mit besserer und eine Gruppe mit schlechterer Prognose teilen kann. Eine relative CK20-mRNA Expression mit dem höchsten bzw. optimalsten Youden-Index, also dem Punkt mit der höchsten Sensitivität und Spezifität zeigte sich bei 2,77 Einheiten (expression units, EU), sodass dieser als Cut-Off Wert festgelegt wurde.

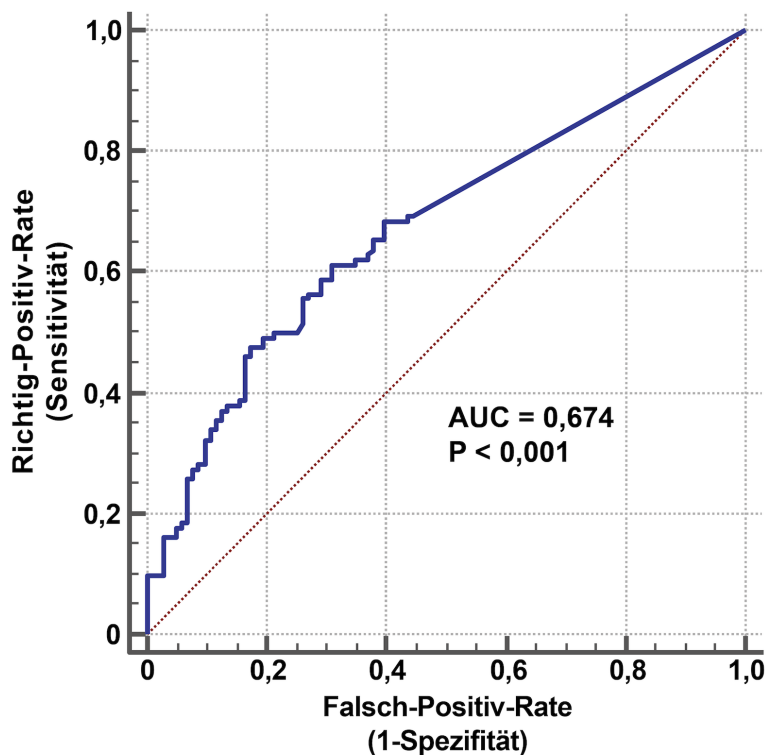
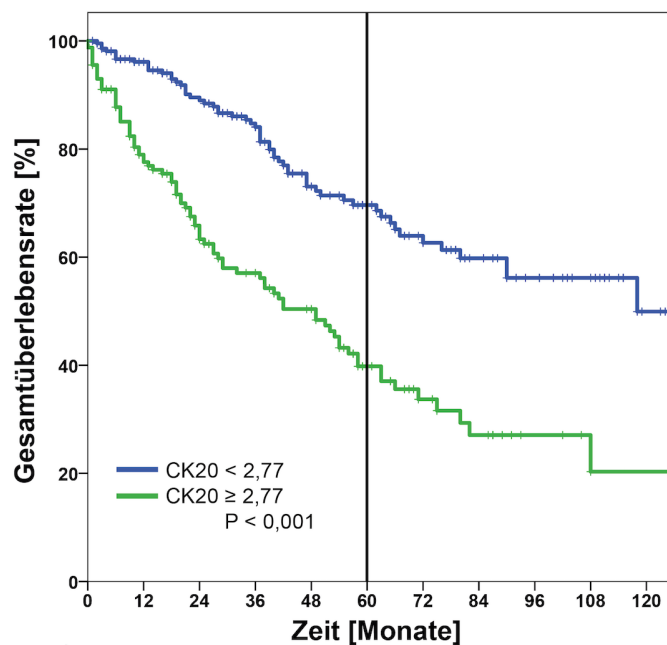


Abbildung 4: ROC-Kurve zur Berechnung des Cut-Off Wertes der CK20-mRNA Expression anhand des Youden-Index

P = P-Wert (Log-Rank-Test). AUC= Area-under-curve

Eine relative CK20-mRNA Expression unterhalb des Cut-Off Wertes von 2,77 EU fand sich bei insgesamt 57,7% (n=220) der Patienten. Bei 42,3% (n=161) der Patienten lag die CK20-mRNA Expression oberhalb des Cut-Off Wertes. Bei einer

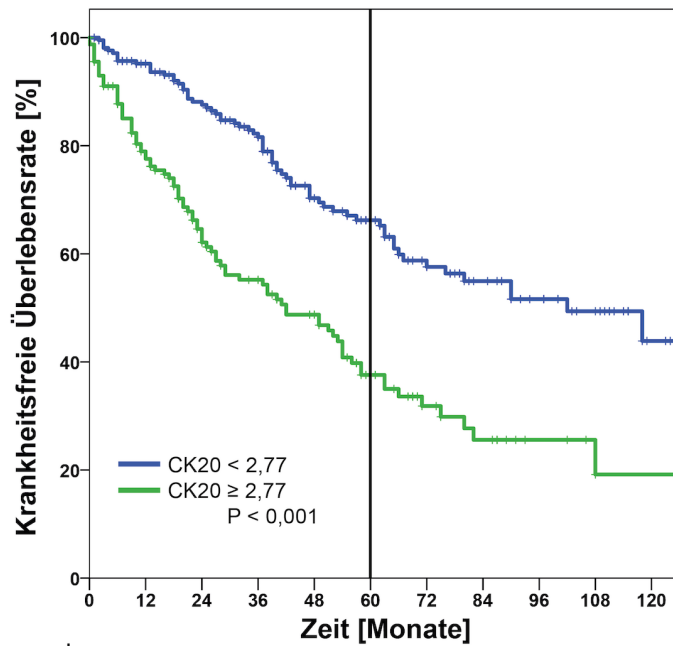
CK20-mRNA Genexpression $\geq 2,77$ EU wiesen die Patienten der Gesamtkohorte ein signifikant schlechteres Überleben auf (jeweils $p < 0,001$). Dies zeigte sich sowohl bezogen auf das Gesamt-, als auch auf das krankheitsfreie Überleben (**Abbildung 5**, **Abbildung 6**). In der Patientengruppe mit der niedrigeren ($< 2,77$ EU) CK20-mRNA Genexpression lag die Gesamtüberlebensrate nach 5 Jahren bei 69,6% und in der Gruppe mit einer hohen ($\geq 2,77$ EU) CK20-mRNA Expression nur noch bei 39,8%. Die Korrelation des ermittelten Cut-off Wertes von 2,77 EU mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben erwies sich auch in getrennter Betrachtung des Rektum- und Kolonkarzinoms jeweils als signifikant (jeweils $p < 0,001$) (**Abbildung 7 A-D**).



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	220	184	157	125	88	70	49	36	28	18	6
CK20 $\geq 2,77$	161	113	77	61	50	31	17	11	6	3	2

Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens von Patienten im UICC Stadium I-IV bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel

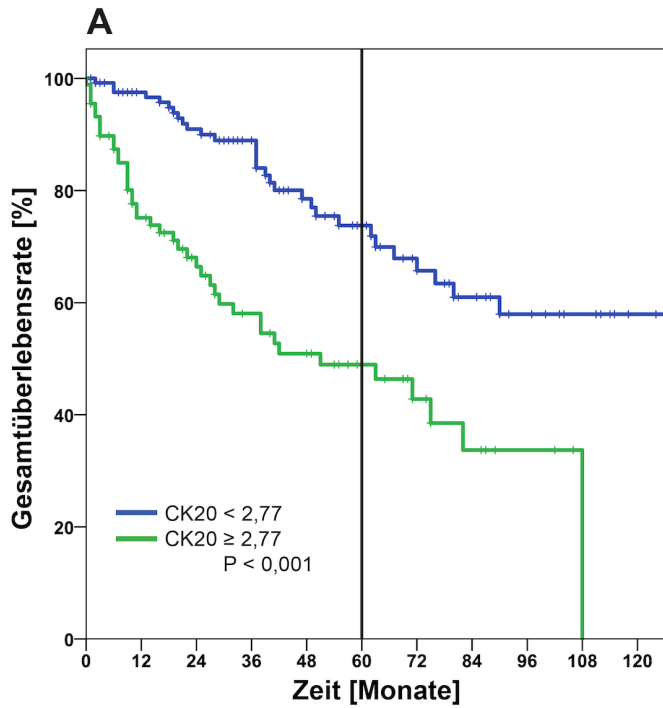
P = P-Werte (Log-Rank-Test). Die Tabelle unterhalb der Abbildung zeigt die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit einer fettgedruckten vertikalen Linie gekennzeichnet.



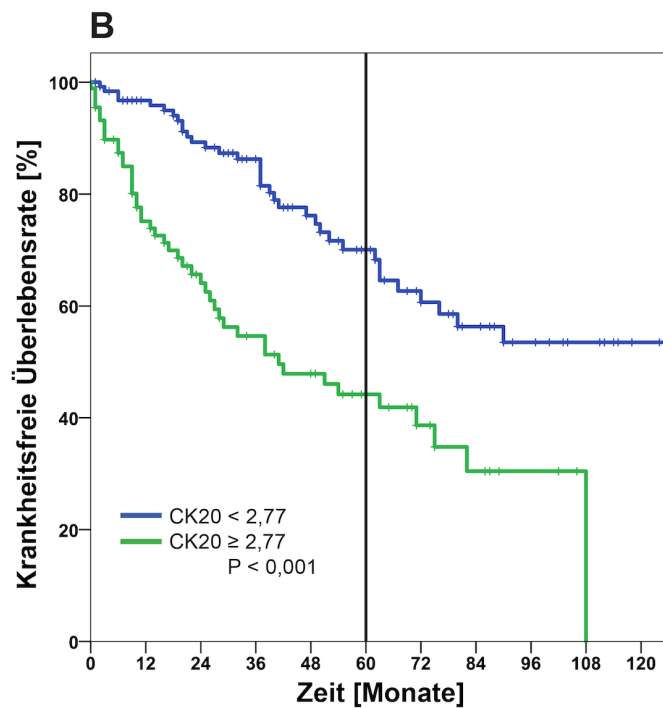
CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	220	184	157	123	88	68	47	35	27	17	5
CK20 ≥ 2,77	161	112	74	61	50	30	16	11	5	2	1

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des krankheitsfreien Überlebens von Patienten im UICC Stadium I-IV bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel

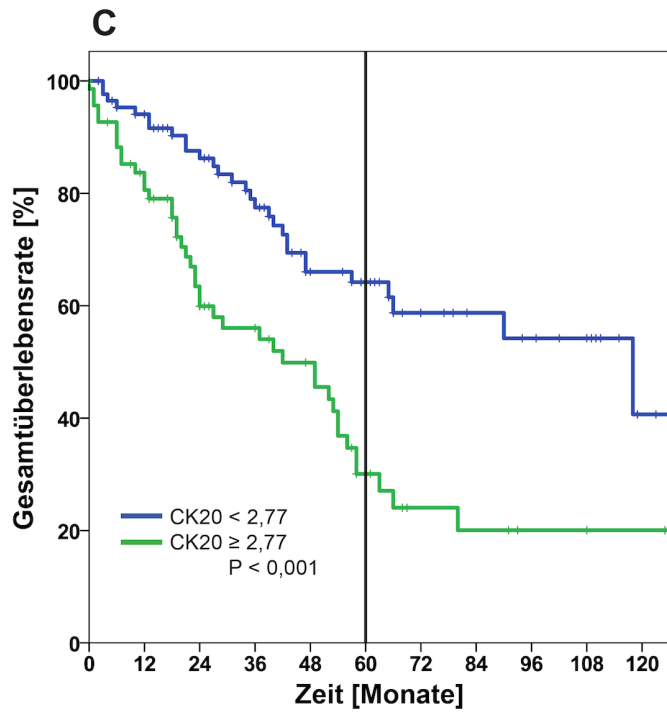
P = P-Werte (Log-Rank-Test). Die Tabelle unterhalb der Abbildung zeigt die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit fettgedruckten vertikalen Linien gekennzeichnet.



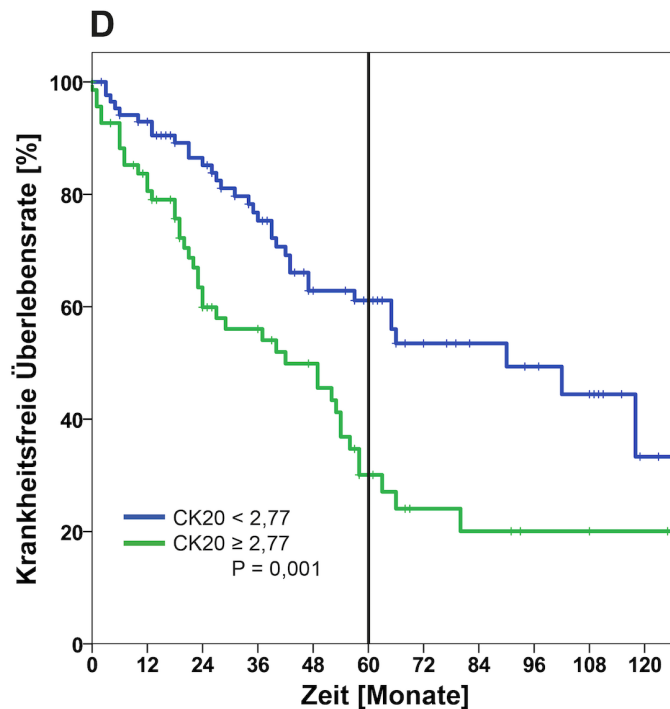
CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	132	108	93	74	51	40	29	23	17	10	4
CK20 ≥ 2,77	90	60	41	33	27	19	11	6	3	0	0



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	132	108	93	74	52	40	30	23	17	10	4
CK20 ≥ 2,77	90	60	41	33	27	19	11	7	3	0	0



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	86	76	64	51	37	30	18	13	11	8	2
CK20 ≥ 2,77	69	53	35	28	23	11	6	4	3	2	2



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	86	76	64	51	37	28	18	13	11	8	2
CK20 ≥ 2,77	69	53	35	28	23	11	6	4	3	2	2

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens (A,C) und krankheitsfreien Überlebens (B,D) von Patienten mit Kolonkarzinom (A,B) und Rektumkarzinom (C,D) bezogen auf das CK20-mRNA Expressionslevel.

P = P-Werte (Log-Rank-Test). Die Tabellen unterhalb der einzelnen Abbildungen zeigen die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit fettgedruckten vertikalen Linien gekennzeichnet.

3.2.5 Assoziation von der quantitativen CK20-mRNA Expression mit den klinischen Charakteristika der Patienten

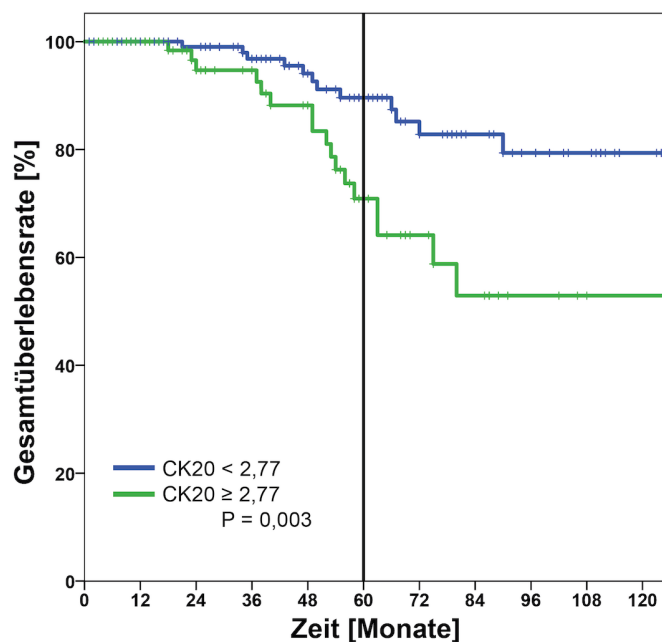
Bei der Berechnung der Korrelation der CK20-mRNA Expressionen mit den klinischen Charakteristika der Patienten zeigte sich, dass ein hohes UICC Stadium (IV), ein positiver Metastasenstatus und ein hohes lokales Tumorstadium (pT4) mit einer signifikant höheren CK20-mRNA Genexpression einhergehen ($p < 0,001$, $p < 0,001$ und $p = 0,004$), wohingegen dies bei nodal-positiven Patienten nicht der Fall war ($p = 0,083$). Weiterhin fand sich keine weitere Korrelation einer erhöhten CK20-mRNA Expression mit den übrigen klinischen Charakteristika (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Korrelation der quantitativen CK20-mRNA Expression mit den klinischen Charakteristika der Patienten (χ^2 -Test)

		Anzahl Patienten (%) mit CK20 $\geq 2,77$ EU	χ^2 -Test (P)
Gesamt		161 (42,3)	
Alter (Jahre)	< 70	82 (39,0)	0,097
	≥ 70	79 (46,2)	
Geschlecht	Männlich	92 (39,1)	0,073
	Weiblich	69 (47,3)	
Tumorlokalisation	Kolon	91 (40,6)	0,253
	Rektum	70 (44,6)	
UICC Stadium	I	42 (35,6)	<0,001
	II	35 (38,5)	
	III	26 (29,9)	
	IV	58 (68,2)	
pT	T0	4 (50,0)	0,004
	T1	8 (20,0)	
	T2	38 (38,0)	
	T3	83 (44,6)	
	T4	28 (59,6)	
pN	N0	88 (39,1)	0,083
	N+	73 (46,8)	
pM	M0	103 (34,8)	<0,001
	M1	58 (68,2)	
neoadjuvante Therapie	Ja	24 (44,4)	0,429
	Nein	137 (42,1)	
adjuvante Therapie	Ja	57 (41,9)	0,460
	Nein	104 (43,0)	
P Alle fettgedruckten P-Werte sind als signifikant anzusehen.			

3.2.6 Assoziation von der quantitativen CK20-mRNA Expression mit dem Überleben bei Patienten in den UICC Stadien I-II

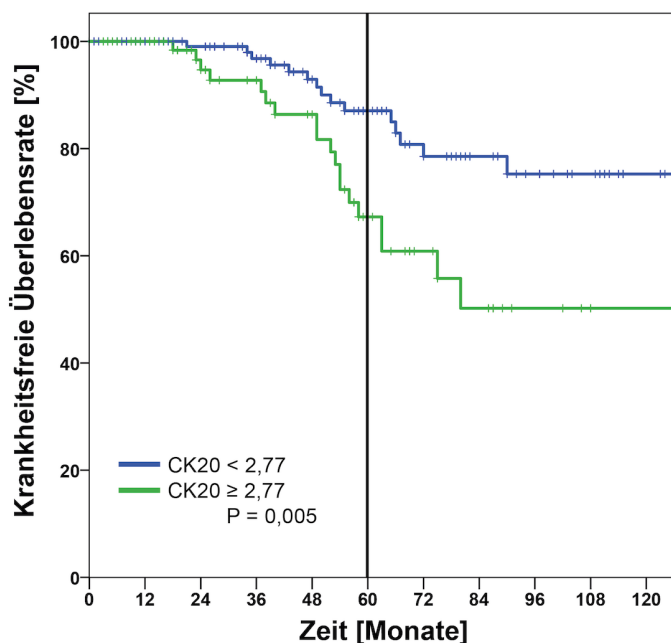
Zur separaten Analyse der Korrelation der CK20-mRNA Expression mit dem Überleben der Patienten in frühen Tumorstadien wurden insgesamt 209 Patienten in den UICC Stadien I und II als Subgruppe zusammengefasst. Es zeigte sich in dieser Subgruppe ein signifikant verringertes Gesamtüberleben bei den Patienten mit einer CK20-mRNA Expression oberhalb des definierten Cut-Off Wertes ($p=0,003$) (**Abbildung 8**). Auch hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens wies die Gruppe mit einer über dem Cut-Off Wert liegenden CK20-mRNA Expression ein signifikant schlechteres Überleben auf (**Abbildung 9**).



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	132	112	102	84	64	50	35	26	20	13	5
CK20 ≥ 2,77	77	68	51	44	37	22	13	9	4	1	1

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens von Patienten im UICC Stadium I und II bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel

$P = P$ -Werte (Log-Rank-Test). Die Tabelle unterhalb der Abbildung zeigt die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit einer fettgedruckten vertikalen Linie gekennzeichnet.



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
CK20 < 2,77	132	112	101	96	64	48	34	25	19	12	4
CK20 ≥ 2,77	77	67	53	41	37	22	12	8	3	1	1

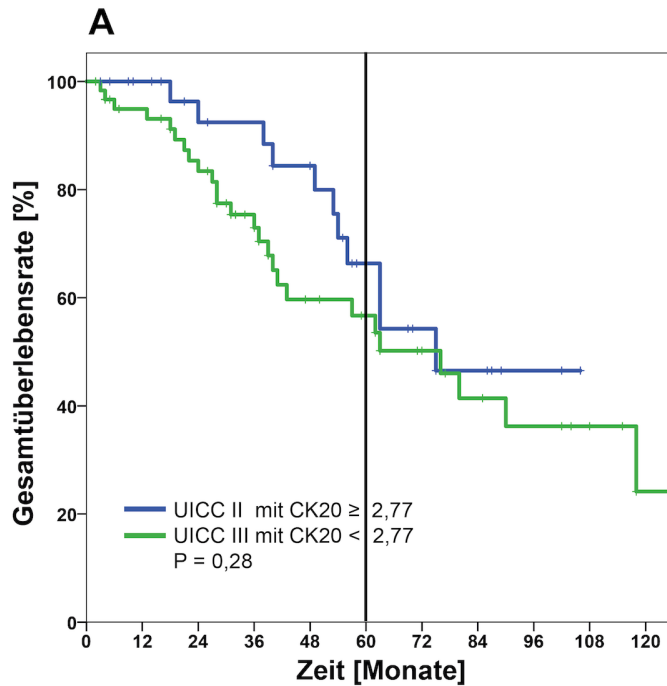
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des krankheitsfreien Überlebens von Patienten im UICC Stadium I und II bezogen auf das CK20-mRNA Genexpressionslevel

P = P-Werte (Log-Rank-Test). Die Tabelle unterhalb der Abbildung zeigt die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit fettgedruckten vertikalen Linien gekennzeichnet.

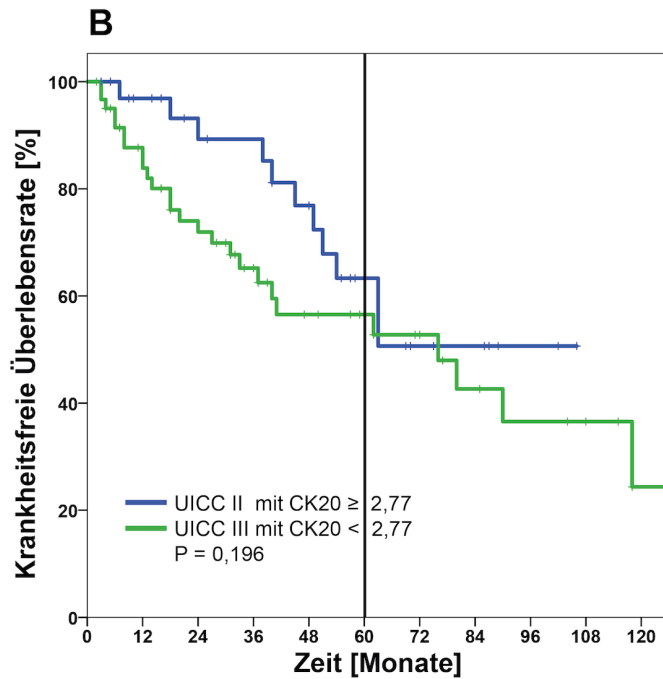
3.2.7 Vergleich der Patientenkohorte mit hoher CK20-mRNA Expression im UICC Stadium II mit einer Kohorte mit niedriger CK20-mRNA Expression im UICC Stadium III

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (UICC Stadium III) ist ein erheblicher negativer prognostischer Marker beim Kolorektalen Karzinom. Zur Überprüfung der zusätzlichen klinischen Relevanz der CTC wurde die Gruppe Patienten im UICC Stadium II und hoher CK20-mRNA Genexpression (n=35) (sog. high-risk Gruppe ohne Lymphknotenmetastase) der Gruppe im UICC Stadium III und niedriger CK20-mRNA Expression (n=62) (sog. low-risk Gruppe mit Lymphknotenmetastasen) gegenübergestellt (**Abbildung 10**). Es zeigte sich weder im

Gesamt-, noch im krankheitsfreien Überleben ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,284$ und $p=0,196$), obwohl eigentlich zu erwarten war, dass die Gruppe der UICC III Patienten eine schlechtere Prognose aufweist als die Patienten im UICC Stadium II.



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
St. II, CK20 $\geq 2,77$	35	30	24	23	19	11	7	5	2	0	0
St. III, CK20 $< 2,77$	62	52	43	30	21	18	12	9	7	4	1



CK20 Expression [EU]	Patienten unter Risiko										
St. II, CK20 \geq 2,77	35	29	23	22	17	10	6	5	2	0	0
St. III, CK20 $<$ 2,77	62	45	35	24	18	15	11	8	6	4	1

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens (A) und krankheitsfreien Überlebens (B) bezogen auf Patienten im UICC Stadium II und hohem CK20-mRNA Expression verglichen mit Patienten im UICC Stadium III und niedrigem CK20-mRNA Genexpressionslevel

P = P-Werte (Log-Rank-Test). Die Tabellen unterhalb der einzelnen Abbildungen zeigen die Anzahl der verbliebenen also lebenden Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Das 5-Jahres Überleben ist mit fettgedruckten vertikalen Linien gekennzeichnet.

3.3 Multivariate Analyse

3.3.1 Assoziation von quantitativer CK20-mRNA Expression, Patientenalter, UICC Stadien und adjuvanter Therapie mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-IV

Zur Identifikation von unabhängigen Prognosefaktoren wurde von den Faktoren, die sich in der univariaten Analyse als signifikant zeigten eine multivariate Analyse mittels des proportionalen Hazardmodell nach Cox durchgeführt. In der Gesamtkohorte wiesen Patienten mit einer CK20-mRNA Genexpression $\geq 2,77$ EU verglichen mit Patienten mit einer CK20-mRNA Genexpression $< 2,77$ EU eine signifikant verringerte Gesamt-Überlebensrate ($p < 0,001$) auf. Auch in der Analyse des krankheitsfreien Überlebens zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher CK20-mRNA Expression und dem Sterberisiko (HR 2,34; KI 1,69-3,22; $p < 0,001$).

Weitere Signifikanzen konnten im Vergleich von der Kohorte der Patienten in niedrigen UICC Stadien (I-II) mit der Kohorte von Patienten in hohen UICC Stadien (III-IV) nachgewiesen werden. In der Analyse des Gesamt- bzw. des krankheitsfreien Überlebens wiesen die Patienten der UICC Stadien III und IV eine 7,85fach bzw. 7,39fach höheres Sterberisiko als Patienten der UICC Stadien I und II (HR 7,85; KI 5,08-12,15; $p < 0,001$ bzw. HR 7,39; KI 4,90-11,16, $p < 0,001$) auf. Bezogen auf das Alter der Patienten und die Durchführung einer adjuvanten Therapie konnte in der multivariaten Analyse des Patientenkollektivs kein signifikant prognostischer Einfluss nachgewiesen werden (**Tabelle 5**).

3.3.2 Assoziation von quantitativer CK20-mRNA Expression, Tumorlokalisierung und lokaler Tumorausdehnung mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-II

Die Korrelationen zwischen dem Überleben und der CK20-mRNA Expression, der Tumorlokalisierung und der Tumorausdehnung bei Patienten, die sich in niedrigen UICC Stadien (I-II) befanden wurden analysiert. Jeder dieser drei Faktoren zeigte sich als signifikanter, unabhängig prognostischer Einflussfaktor auch in der Gruppe mit niedrigem Tumorstadium.

Eine hohe CK20-mRNA Expression von $\geq 2,77$ EU ging verglichen mit einer niedrigen CK20-mRNA Expression mit einer signifikanten Erhöhung des Sterberisikos um 225% in der Analyse des Gesamtüberleben und um 201% in der Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit einher (HR 2,25; KI 1,06-4,77; $p=0,035$ und HR 2,01; KI 1,01-4,01; $p=0,047$). Patienten mit einem Rektumkarzinom wiesen im Vergleich zu den Kolonkarzinompatienten eine signifikant geringere Sterberate auf. Dies zeigte sich sowohl in der Analyse des Gesamt-, als auch in der Analyse des krankheitsfreien Überlebens (**Tabelle 5**). Neben diesen beiden Einflussfaktoren stellte sich auch die lokale Ausdehnung des Tumors als signifikanter und unabhängiger Faktor dar. Bei einer starken Ausdehnung und Tiefeninfiltration des Tumors (pT3/4) zeigten die Patienten ein 4,5-mal so hohes Sterberisiko in Betrachtung der Gesamtüberlebenszeit (HR 4,50; KI 1,99-10,17, $p<0,001$) verglichen mit Patienten mit einer geringen Ausdehnung des Tumors (pT1/2). Darüber hinaus bestätigte sich auch die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem krankheitsfreien Überleben (HR4,17; KI 1,97-8,85, $p<0,001$).

Tabelle 5: Multivariate Analyse (Cox-Regressionsanalyse) von unabhängigen Einflussfaktoren auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben in der Gesamtkohorte (UICC Stadium I-IV) sowie in der Subgruppe (UICC Stadium I-II)

	Gesamtüberleben		Krankheitsfreies Überleben	
	multivariate HR (95% KI)	P-Werte (P)	multivariate HR (95% KI)	P-Werte (P)
UICC Stadien I-IV				
CK20 < 2,77 vs ≥ 2,77 [EU]	2,49 (1,77 – 3,49)	<0,001	2,34 (1,69 – 3,22)	<0,001
Alter < 70 vs. ≥ 70 [Jahre]	1,27 (0,90 – 1,79)	0,172	n.d.	
UICC I-II vs. III-IV	7,85 (5,08 – 12,15)	<0,001	7,39 (4,90 – 11,16)	<0,001
Adjuvante Therapie Ja vs. Nein	1,10 (0,77 – 1,56)	0,610	1,09 (0,78 – 1,53)	0,606
UICC Stadien I-II				
CK20 < 2,77 vs. ≥ 2,77 [EU]	2,25 (1,06 – 4,77)	0,035	2,01 (1,01 – 4,01)	0,047
Alter < 70 vs. ≥ 70 [Jahre]	1,59 (0,73 – 3,47)	0,245	n.d.	
Kolon vs. Rektum	0,22 (0,09 – 0,50)	<0,001	0,27 (0,13 – 0,57)	0,001
pT1/2 vs. pT3/4	4,50 (1,99 – 10,17)	<0,001	4,17 (1,97 – 8,85)	<0,001
P Alle fettgedruckten P-Werte sind als signifikant anzusehen; n.d. der Wert war in der univariaten Analyse nicht signifikant und wurde daher in der multivariaten Analyse nicht berechnet; HR: Hazard Ratio; KI: Konfidenzintervall				

4 Diskussion

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation einer semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis von CK20-positiven zirkulierenden Tumorzellen im Blut von 381 Patienten mit KRK. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Identifikation von zusätzlichen Risikofaktoren für eine schlechtere Prognose bei Patienten in frühen Tumorstadien (UICC I-II).

4.1 Repräsentativität der Kohorte, Patientencharakteristika, Überlebensraten

Im Vergleich der Patientencharakteristika der in dieser Studie untersuchten Patienten zeigte sich eine weitest gehende Übereinstimmung in der Geschlechtsverteilung im Vergleich mit anderen Studien und den Daten des epidemiologischen Krebsregisters. In der vorliegenden Studie lag der Diagnosezeitpunkt im Mittel bei 68,5 Jahren und somit früher als bei den von der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und dem Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut gesammelten Krebsdaten von 2014. Möglicherweise lässt sich dieser Unterschied durch häufiger durchgeführte Früherkennungsmaßnahmen erklären. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die meisten Patienten unserer Kohorte (31,0%) sich im UICC Stadium I befanden (**Tabelle 2**), also in einem frühen Stadium diagnostiziert wurden.

Die 5J-GÜR liegt in unserer Kohorte bei 67,5%, wohingegen bei deutschlandweiter Betrachtung die 5J-KFÜR von Patienten mit kolorektalem Karzinom in einer 2014 durchgeführten Analyse bei den Frauen bzw. Männern bei 52% bzw. 51% lagen (Kaatsch et al. 2018). Vermutlich entsteht diese Diskrepanz durch die in unserer Studie leicht höhere Anzahl an Patienten in frühen UICC Stadien.

In der univariaten Analyse zeigte sich, dass ein niedriger BMI von $<18,5$ zum Diagnosezeitpunkt ein Prädiktor für eine schlechtere Überlebensrate ist. Im Vergleich dazu zeigt eine Studie von Kroenke et al. mit über 3000 Patienten, dass sowohl Untergewicht als auch Adipositas Grad 2 und 3 mit einer Reduktion der Überlebenszeit einhergeht (Kroenke et al. 2016). In unserer Analyse wurde nur zwischen Untergewicht, Normalgewicht und Übergewicht bzw. $\text{BMI} > 25$ unterschieden. Eine Einteilung der Patienten mit einem $\text{BMI} > 25$ in die unterschiedlichen Stadien des Übergewichts und der Adipositas ist nicht erfolgt. Daher kann nicht beurteilt werden, ob es innerhalb der Patienten mit einem $\text{BMI} > 25$

bestimmte BMI Bereiche mit einer signifikant differenten Überlebenszeit gibt, wie bei der Studie von Kroenke et al. Zu ergänzen ist, dass sich ein hoher BMI in vielen Studien als Risikofaktor für die Karzinomentstehung dargestellt hat (Ning et al. 2010, Shaukat et al. 2017). Auch in unserem Patientenkollektiv ist ein Großteil der Patienten (54,3%) übergewichtig.

4.2 Detektion von CTC und Nachweisverfahren

Die Detektion von CTC erfolgte in der vorliegenden Studie mittels einer neu etablierten semi-quantitativen RT-PCR. Als Marker wurden CK20 und EGFR genutzt. CK20 wurde in früheren Studien der Arbeitsgruppe genutzt und hat sich aufgrund des unabhängig negativ prognostischen Werts etabliert (Soeth et al. 1997, Hinz et al. 2015, Hinz et al. 2017). Auch in anderen Studien wurde CK20 genutzt, um CTC nachzuweisen (Moll et al. 1992). In der 1992 von Moll et al. publizierten Studie konnte die hohe CK20-Positivität kolorektaler Tumoren immunhistochemisch belegt werden. Von 93 kolorektalen Tumoren zeigten sich 90 positiv für CK20. Die drei CK20-negativen Tumoren waren als undifferenziertes Karzinom eingestuft. Diese Entdeckung ist interessant und wichtig, da folglich nicht alle CTC CK20-positiv sind. Besonders undifferenzierte Karzinome gehen mit einer schlechten Prognose einher und eben von diesen undifferenzierten Karzinomen abgesiedelte CTC können bei CK20-Negativität der Detektion mit CK20 entgehen. Dieses beleuchtet ein zentrales Problem der aktuellen Forschung zu CTC. Es ist bisher nicht sicher möglich mit einem Marker alle CTC zu detektieren. Die unterschiedlichen Nachweisverfahren und ihre Marker detektieren zumeist nur eine Subgruppe.

Diese Schwierigkeit in der Diagnostik zeigt sich auch beim Nachweis von CTC anhand eines Antikörpers gegen das Oberflächenmembranprotein EpCAM. Die Studienergebnisse zur Rolle von EpCAM sind kontrovers. Einerseits wird von einer Hochregulierung von EpCAM im Rahmen der Tumorentstehung ausgegangen, sowie eine positive Korrelation zwischen steigendem Tumorstadium und vermehrter Expression von EpCAM gezeigt (Chai et al. 2015). Andererseits wurde eine Herabregulierung von EpCAM bei Zellen nachgewiesen, die EMT durchlaufen haben (Gorges et al. 2012). Demzufolge wird wahrscheinlich, wie bei der Detektion von CTC mittels CK20, auch bei der Detektion von CTC anhand von EpCAM nur eine Subpopulation erfasst.

4.3 Korrelation zwischen dem Überleben und dem Nachweis CK20-positiver und EGFR-positiver CTC

In mehreren Studien und Metaanalysen wurde deutlich, dass der Nachweis von CTC mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Rahbari et al. 2010, Tan und Wu 2017). Hierbei wurden häufig Kolon- und Rektumkarzinom-Patienten in einer Gruppe zusammengefasst. In einer früheren Studie aus unserer Arbeitsgruppe in Kiel zeigte sich, dass die Positivität von CTC nur bei Patienten mit Kolonkarzinom nicht aber bei Patienten mit Rektumkarzinom mit einer signifikanten Überlebenszeitverkürzung einhergeht (Hinz et al. 2015, Hinz et al. 2017). Trotzdem hatte der Nachweis von CTC bei Patienten mit Rektumkarzinom einen Nutzen, da sich CTC als Marker für das Ansprechen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie zeigten (Hinz et al. 2015). Anhand der größeren Stichprobe von nun insgesamt 381 Patienten mit KRK konnte mit dieser Arbeit nun nachgewiesen werden, dass Patienten mit CK20-positiven CTC ein signifikant schlechteres Gesamt- und auch krankheitsfreies Überleben sowohl in der Gruppe der Rektum- als auch der Kolonkarzinom-Patienten haben.

In der Literatur wurde beschrieben, dass der Nachweis von EGFR-positiven Tumorzellen insbesondere beim Rektumkarzinom mit einer schlechteren Prognose korreliert (Goldstein und Armin 2001, Spano et al. 2005). Die zielgerichtete spezifische Therapie mit anti-EGFR Antikörpern (z.B. Cetuximab) beim kolorektalen Karzinom im metastasierten Tumorstadium ist inzwischen ein wichtiger und sehr effektiver Bestandteil der medikamentösen Tumortherapie. Daher wurde von uns die Hypothese aufgestellt, dass auch der Nachweis von EGFR-positiven CTC prognostisch bedeutsam sein könnte. In dieser Studie konnten wir aber keinen Zusammenhang zwischen dem qualitativen Nachweis von EGFR und dem Überleben darstellen. Aufgrund der nicht einheitlichen Studienergebnisse und insbesondere im Hinblick auf die therapeutische Relevanz eines EGFR-Nachweises sollten weitere Forschungsanstrengungen zur Validation unternommen werden.

4.4 Level der CK20-mRNA Expression zur Risikostratifizierung der Patienten in der Gesamtkohorte

Zur besseren Differenzierung und auch zur quantitativen Verlaufskontrolle wurde die semi-quantitative CK20 RT-PCR entwickelt. Wie beschrieben ist bereits der qualitative Nachweis von CK20-positiven CTC ein negativer prognostischer Faktor

bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in der vorliegenden sowie in weiteren Studien (Rahbari et al. 2010, Hinz et al. 2017, Tan und Wu 2017), aber zur quantitativen Aussagekraft der CK20-mRNA Expression existieren bis dato keine Studien mit großen Stichproben und längeren Nachsorgezeiten. Das Ziel dieser Arbeit war daher nicht nur zu untersuchen, inwieweit CK20-positive CTC bei Patienten mit KRK mit dem Überleben korrelieren, sondern auch, zu prüfen, ob das Level der CK20-mRNA Expression eine prognostische Aussagekraft aufweist und somit eine noch bessere Stratifizierung der Patienten möglich ist. Mithilfe der in Kapitel 3.2.4 präsentierten Analysen konnte ein Cut-Off-Wert bestimmt werden. An einem KRK erkrankte Patienten mit einer CK20-mRNA Expression von gleich oder mehr als 2,77 EU weisen eine signifikant schlechtere Prognose auf als Patienten mit KRK und einer CK20-mRNA Expression von weniger als 2,77 EU. Somit konnte eine weitere Risikostratifizierung der Patienten mit KRK erfolgen. Es besteht durch die quantitative Bestimmung der CK20-mRNA nun auch die Möglichkeit einer longitudinalen und repetitiven Untersuchung von Patienten die beispielsweise unter eine palliativen Chemotherapie sind, um das Therapieansprechen mittels einer Blutentnahme zu beobachten.

4.5 Assoziation von den klinischen Charakteristika mit der quantitativen CK20-mRNA Expression

Betrachtet man nun die Korrelationen der klinischen Charakteristika mit dem definierten Cut-Off Wert, so korrelieren interessanterweise zwar die UICC Stadien, ein hohes lokales Tumorstadium und der Metastasenstatus signifikant mit einer hohen CK20-mRNA Expression, aber nicht der Lymphknotenstatus einzeln betrachtet. Dies ist insofern erstaunlich, weil Lymphknotenmetastasen als Zeichen eines fortgeschrittenen lokalen Tumorwachstums angesehen werden und einer der stärksten negativen Prognosefaktoren sind (Kumar et al. 2015). Warum es in der vorliegenden Studie keine signifikante Korrelation gibt, bleibt offen. Möglicherweise sind größere Patientenzahlen zur Untersuchung der statistischen Signifikanz nötig. Die positive Korrelation zwischen dem Metastasenstatus und einer erhöhten CK20-mRNA Expression unterstützt die weit verbreitete Annahme, dass CTC potentiell Metastasen bilden können (Antolovic et al. 2010, Bork et al. 2014).

4.6 Level der CK20-mRNA Expression in der Subgruppe der Patienten in den UICC Stadien I-II zur Identifizierung von Hochrisikopatienten

Nicht nur in der Gesamtkohorte, sondern auch in der die UICC Stadien I und II umfassenden Subgruppe zeigte sich bei den Patienten mit einer CK20-mRNA Expression oberhalb unseres Cut-Off-Wertes eine statistisch signifikant verringerte Überlebensrate. Patienten im UICC Stadium I und II weisen zwar verglichen mit den UICC Stadien III und IV eine bessere Prognose auf, aber dennoch erleidet eine nicht unerhebliche Anzahl an Patienten ein Rezidiv. Patienten im UICC Stadium I und II erhalten üblicherweise keine adjuvante Chemotherapie im Gegensatz zu den Patienten im UICC Stadium III. Mithilfe der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann eine Subgruppe detektiert werden, die eindeutig eine schlechtere Prognose aufweist. Es gibt im klinischen Alltag immer noch keine weiteren Marker, die für die Identifikation von Risikopatienten in frühen Tumorstadien geeignet sind. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob eventuell die adjuvante Chemotherapie dieser Hochrisikopatienten im UICC Stadium I und II eine Prognoseverbesserung erreichen kann.

Eine Studie mit einer vergleichbar großen Zahl an Patienten mit KRK im UICC Stadium I und II, bei denen ein auf der CK20 RT-PCR basierender Nachweis von CTC erfolgt ist, gibt es nicht. Jedoch haben Bork et al 2015 eine Studie mit 239 Patienten in den UICC Stadien I-III veröffentlicht, in der sie CTC durch das Cellsearch® System detektierten. Sie konnten in ihrer Studie ebenfalls CTC als einen negativ prognostischen Marker beim kolorektalen Karzinom nachweisen (Bork et al. 2015), so dass bereits substantielle Hinweise bezüglich des prognostischen Nutzens von CTC beim Patienten mit KRK in niedrigeren Stadien vorliegen.

4.7 Vergleich von Risikopatienten im UICC Stadium II im Vergleich zu Patienten im UICC Stadium III

Patienten im UICC Stadium I erhalten regelhaft keine adjuvante Chemotherapie. Patienten im UICC Stadium II erhalten nur bei Vorliegen besonderer Risikofaktoren eine adjuvante Chemotherapie. Patienten im UICC Stadium III haben ein erhöhtes Rezidivrisiko und werden daher in der Regel einer adjuvanten Therapie zugeführt. Problematisch ist jedoch, dass auch ein relevanter Teil (30,8%) der Patienten im UICC Stadium I und II ein Rezidiv erleiden (Bohm et al. 1993). Daher war eines

unserer Ziele, einen zusätzlichen Prognosemarker zu erforschen, der es ermöglicht Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko im UICC Stadium II zu identifizieren, die potentiell von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. Vergleicht man die Überlebensraten der Patienten in den UICC Stadien II und III ohne Berücksichtigung der CK20-mRNA Expression, weisen die Patienten im UICC Stadium II erwartungsgemäß ein signifikant verlängertes Überleben auf. In der Subgruppe der Patienten im UICC Stadium II mit hoher CK20-mRNA Expression (sogenannte „Hochrisikopatienten“) findet man eine vergleichbare 5J-GÜR wie die von Patienten des UICC Stadiums III und niedriger CK20-mRNA Expression (sogenannte „Niedrigrisikopatienten“). Dies ist interessant, da eigentlich das UICC Stadium II mit einem gegenüber dem UICC Stadium III mit einem verlängerten Überleben einhergeht, allerdings scheinbar nicht, wenn man mittels der CK20-mRNA Expression die „Hochrisiko-Patienten“ aus dem UICC Stadium II mit den „Niedrigrisiko-Patienten“ aus dem UICC Stadium III vergleicht.

Dieses zeigt, dass durch die neue RT-PCR eine Patientenpopulation im UICC Stadium II identifiziert werden kann, die bezogen auf die 5J-GÜR keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate zu Patienten mit niedriger CK20-mRNA Expression im UICC Stadium III aufwies. Möglicherweise könnten sich hieraus Konsequenzen für die Einteilung der UICC Stadien ergeben. Weitere Studien sind nötig, um zu evaluieren, ob diese „Risikopatienten“ aus dem UICC Stadium II von einer adjuvanten Therapie profitieren würden. In der vorliegenden Studie konnte dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden, da die Patienten im UICC Stadium II regelhaft keine adjuvante Therapie erhielten.

4.8 Assoziation von CK20, Patientenalter, UICC Stadien und adjuvanter Therapie mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-IV in der multivariaten Analyse

Als unabhängige negative Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinom ließen sich die CK20-mRNA Expression $\geq 2,77$ EU, die CK20-Positivität sowie fortgeschrittene UICC Stadien nachweisen. Die Ergebnisse sind vielversprechend und veranschaulichen das Potential der neu entwickelten semi-quantitativen RT-PCR zur Detektion des unabhängigen Markers CK20. Nicht nur wie schon bekannt sind die

UICC Stadien, sondern auch der Nachweis von CK20-positiven Tumorzellen ein unabhängiger Faktor für die Prognoseabschätzung.

4.9 Assoziation von CK20, Tumorlokalisation und lokaler Tumorausdehnung mit dem Überleben von Patienten in den UICC Stadien I-II in der multivariaten Analyse

Für Patienten in frühen Tumorstadien gibt es keine festen Kriterien, wann sie eine adjuvante Chemotherapie erhalten sollen und wann nicht. In den Leitlinien der *American Society of Clinical Oncology* werden lediglich Risikofaktoren genannt, bei denen eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden sollte. Diese Risikofaktoren sind eine Tumorperforation, ein T4 Tumor, ungenügende Lymphknotenexstirpation und ein schlechter Differenzierungsgrad des Tumors (Benson et al. 2004). Auch die *European Society for Medical Oncology* und das *National Comprehensive Cancer Network* empfehlen in ihren Leitlinien, bei den genannten Risikofaktoren eine adjuvante Therapie zu erwägen. Weiterhin sehen sie eine Obstruktion des Kolons durch den Tumor, eine perineurale und lymphovaskuläre Infiltration und das Heranreichen des Tumors bis an den Resektionsrand als Risikofaktoren (Schmoll et al. 2012, Kumar et al. 2015). O'Connor et al publizierten 2011 eine Studie zum kolorektalen Karzinom, in der sie in einer Kohorte von 18.613 Patienten im UICC Stadium II mit mindestens einem der genannten Risikofaktoren verglichen, ob die adjuvant therapierten Patienten einen Vorteil gegenüber den rein chirurgisch therapierten Patienten hatten. Es zeigte sich kein signifikanter Vorteil für eine der beiden Gruppen (O'Connor et al. 2011). Konträr zu diesen Ergebnissen steht eine 2015 veröffentlichte Studie von Kumar et al., die in einer Kohorte von 1286 Hochrisikopatienten im UICC Stadium II, also Patienten mit mindestens einem Risikofaktor, einen Vorteil im Gesamtüberleben durch eine adjuvante Therapie nachweisen konnte (Kumar et al. 2015). Die Risikofaktoren einzeln analysiert wiesen nur Patienten mit einer lokal stark fortgeschrittenen Tumorausdehnung (T4) einen Vorteil durch eine adjuvante Therapie auf. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Weiterentwicklung der Chemotherapieprotokolle und deren zunehmende Effektivität. Eben dies kann ein Grund dafür sein, dass die zwischen 1999 und 2008 diagnostizierten Patienten in der Studie von Kumar et al. von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten. Die Diagnose eines kolorektalen

Karzinoms erhielten die Patienten in der Studie von O'Connor et al. hingegen zwischen 1992 und 2005, als z.B. das Chemotherapeutikum Oxaliplatin Ende der 90er Jahre erst für die Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms erforscht wurde (Macdonald 1999) und somit die meisten Patienten in O'Connors Studie nicht damit therapiert wurden und davon nicht profitieren konnten (O'Connor et al. 2011).

Aufgrund der uneinheitlichen Studienlage ist es wichtig, weitere Risikofaktoren zu untersuchen, mit denen eventuell eine Gruppe an Patienten selektiert werden kann, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würde. Der Schwerpunkt für diese Arbeit sind vor allem die unabhängigen Prognosefaktoren innerhalb der Subgruppe der Patienten im UICC Stadium I und II. So konnte in der multivariaten Analyse gezeigt werden, dass die relative CK20-mRNA Expression $\geq 2,77$ EU ein unabhängiger negativer Prognosefaktor ist. Patienten mit diesem Risikofaktor können als „Hochrisikopatienten“ betrachtet werden. Somit ist es uns gelungen, mittels der modifizierten PCR Risikopatienten in den Tumorstadien UICC I und II zu identifizieren, die potentiell von einer Chemotherapie profitieren könnten.

4.10 Generelles zur Arbeit, Ausblick und Nutzen

Es ist zu bedenken, dass zwar viele Studien von der Annahme ausgehen, anhand von CK20 und EGFR CTC detektieren zu können, aber letztendlich ist nur durch den molekularen Nachweis von Mutationen in Tumorzellen des Patienten selbst und den Vergleich mit den beim jeweiligen Patienten gefundenen CTC belegbar, dass diese von diesem Tumor stammen. In der Literatur wird der Terminus CTC jedoch weitgehend genutzt, um die mittels der unterschiedlichen Verfahren detektierten Zellen, die hochwahrscheinlich Tumorzellen sind, zu beschreiben. Auch in dieser Arbeit wurde dementsprechend der Terminus CTC genutzt, um die detektierten Zellen zu bezeichnen. Weiterhin ist zu erwähnen, dass mittels der PCR lediglich indirekt auf die Quantität der nachgewiesenen Zellen geschlossen wird, indem mit der PCR die relative CK20-mRNA Expression in Units gemessen wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer ausreichend großen Stichprobe eine semi-quantitative RT-PCR getestet und dadurch der Nachweis von CK20-positiven CTC als negativer prognostischer Marker für Patienten mit KRK belegt werden. Hierdurch ist es möglich, Patienten in den UICC Stadien I und II zu stratifizieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. In weiteren Studien muss nun

evaluiert werden, ob die dadurch identifizierten Risikopatienten tatsächlich von einer adjuvanten Therapie profitieren. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die von der Arbeitsgemeinschaft für internistische Onkologie geplante CIRCULATE-Studie unter der Leitung von PD Dr. Folprecht der Universität Dresden, die über Blutproben als „liquid biopsies“ Hochrisiko-Patienten im Stadium II identifizieren soll und anschließend den Stellenwert einer adjuvanten Therapie in dieser Situation prüfen möchte. Diese Ergebnisse gilt es dann mit bisherigen Studien zu vergleichen.

Langfristiges Ziel der Analyse von Blutproben im Rahmen einer Tumorerkrankung ist es nicht nur, eine prognostische Aussage zu liefern, sondern möglicherweise auch, die Therapie zu steuern. Vielleicht besteht in der Zukunft die Möglichkeit, den semi-quantitativen Nachweis von CK20-positiven CTC als Marker zum longitudinalen Verlauf nach erfolgter Operation in Ergänzung zu den etablierten Tumormarkern wie CEA und CA19-9 zu benutzen. Zusätzlich könnte in weiteren Studien untersucht werden, ob auch das Ansprechen auf eine neoadjuvante Therapie bei fortgeschrittenen KRK mit einem Abfall der quantitativen CK20-mRNA Expression einhergeht. Für diese Ziele scheint der quantitative Nachweis dem qualitativen Nachweis überlegen zu sein. Möglicherweise lässt sich in der Zukunft der Erfolg der Therapie, das Tumorgenom oder die Progression des Tumorleides anhand von Blutproben, die im englischsprachigen Raum als Flüssigbiopsien („liquid biopsies“) bezeichnet werden, prüfen. Eine weitere Vision ist es, Blutproben als Screening für das KRK zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) steht weltweit an vierter Stelle der karzinombedingten Sterbefälle (Brody 2015). Global betrachtet sterben jährlich, trotz Fortschritten in der Therapie, ungefähr 700 000 Menschen am KRK (Marmol et al. 2017). Ein Großteil der Mortalität ist auf Entwicklung von Metastasen zurückzuführen. Demzufolge ist es von zentralem Interesse weitere Risikofaktoren und Methoden zu entwickeln, die Patienten mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko identifizieren. Dieses ist besonders für Patienten in frühen Tumorstadien notwendig, da die Patienten eventuell von einer Chemotherapie profitieren könnten, die sie nach aktuellen Leitlinien nicht erhalten. Ein vielversprechender Ansatzpunkt der aktuellen Forschung ist der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen. Mehrere Studien belegen den negativ prognostischen Wert zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit KRK (Rahbari et al. 2010, Hinz et al. 2017).

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation und Etablierung einer semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis von CK20-positiven zirkulierenden Tumorzellen im Blut von 381 Patienten und die Beurteilung der prognostischen Bedeutung in unterschiedlichen Tumorstadien.

Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit CK20-positiven zirkulierenden Tumorzellen ein signifikant reduziertes Gesamt- und krankheitsfreies Überleben aufweisen. Weiterhin zeigte sich auch ein signifikant verringertes Gesamt- und krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit nachgewiesenen CK20-positiven zirkulierenden Tumorzellen in frühen Tumorstadien (UICC Stadium I und II). Beim semi-quantitativen Nachweis von CK20-positiven CTC wurde ein Cut-Off Wert definiert. Beim Überschreiten dieses Cut-Off Wertes zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des Gesamt- und krankheitsfreien Überlebens in der univariaten und in der multivariaten Analyse sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für die Patienten in frühen Tumorstadien. Konträr dazu zeigte sich, dass der Nachweis von EGFR nicht mit einer statistisch signifikant verringerten Erniedrigung des Überlebens verbunden war.

Es konnte in dieser Arbeit der prognostische Wert von CK20-positiven zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit KRK gezeigt werden. Auch für Patienten in frühen Tumorstadien, in denen die Etablierung zusätzlicher Risikofaktoren für eine

schlechtere Prognose wichtig ist, ist es gelungen mit der neu entwickelten semi-quantitativen CK20 RT-PCR „Hochrisikopatienten“ zu identifizieren, die möglicherweise von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden. Langfristiges Ziel dieser Untersuchungen ist es, das Verfahren als sogenannte „liquid biopsy“ unter laufender adjuvanter Chemotherapie oder neoadjuvanter (Radio)-Chemotherapie im klinischen Alltag zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

Antolovic, D., Galindo, L., Carstens, A., Rahbari, N., Buchler, M. W., Weitz, J., Koch, M. (2010): **Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies.** BMC Biotechnol, 10, 35

Ashworth, T. R. (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, 146-149

Atkin, G., Chopada, A., Mitchell, I. (2005): **Colorectal cancer metastasis: in the surgeon's hands?** Int Semin Surg Oncol, 2, 5

Baretton, G. B., Tannapfel, A., Schmitt, W. (2011): **Standardized and structured histopathological evaluation of colorectal polyps: a practical checklist against the background of the new WHO classification.** Pathologe, 32, 289-296

Benson, A. B., 3rd, Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn, P. J., Krzyzanowska, M. K., Maroun, J., Mcallister, P., Van Cutsem, E., Brouwers, M., Charette, M., Haller, D. G. (2004): **American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer.** J Clin Oncol, 22, 3408-3419

Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliever, E., Wajda, A. (2001): **Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study.** Cancer, 91, 854-862

Bohm, B., Schwenk, W., Hucke, H. P., Stock, W. (1993): **Does methodic long-term follow-up affect survival after curative resection of colorectal carcinoma?** Dis Colon Rectum, 36, 280-286

Bork, U., Grutzmann, R., Rahbari, N. N., Scholch, S., Distler, M., Reissfelder, C., Koch, M., Weitz, J. (2014): **Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer.** World J Gastroenterol, 20, 10296-10304

Bork, U., Rahbari, N. N., Scholch, S., Reissfelder, C., Kahlert, C., Buchler, M. W., Weitz, J., Koch, M. (2015): **Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study.** Br J Cancer, 112, 1306-1313

Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P. (2008): **Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis.** JAMA, 300, 2765-2778

Brody, H. (2015): **Colorectal cancer.** Nature, 521, S1

Canavan, C., Abrams, K. R., Mayberry, J. (2006): **Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease**. *Aliment Pharmacol Ther*, 23, 1097-1104

Chai, X. B., Song, R. F., Xu, F. (2015): **Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis**. *Genet Mol Res*, 14, 7624-7629

Chang, Y. S., Di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K., Munn, L. L. (2000): **Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14608-14613

Chen, W., Swanson, B. J., Frankel, W. L. (2017): **Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists**. *Diagn Pathol*, 12, 24

Eccles, S. A., Welch, D. R. (2007): **Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies**. *Lancet*, 369, 1742-1757

Enblad, P., Adami, H. O., Glimelius, B., Krusemo, U., Pahlman, L. (1990): **The risk of subsequent primary malignant diseases after cancers of the colon and rectum. A nationwide cohort study**. *Cancer*, 65, 2091-2100

Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., Jenab, M. (2011): **Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies**. *Ann Oncol*, 22, 1958-1972

Fidler, I. J. (1970): **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine**. *J Natl Cancer Inst*, 45, 773-782

Fidler, I. J. (2003): **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited**. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-458

Francini, G., Petrioli, R., Lorenzini, L., Mancini, S., Armenio, S., Tanzini, G., Marsili, S., Aquino, A., Marzocca, G., Civitelli, S., Et Al. (1994): **Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer**. *Gastroenterology*, 106, 899-906

Galandiuk, S., Wieand, H. S., Moertel, C. G., Cha, S. S., Fitzgibbons, R. J., Jr., Pemberton, J. H., Wolff, B. G. (1992): **Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum**. *Surg Gynecol Obstet*, 174, 27-32

Goldstein, N. S., Armin, M. (2001): **Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system.** Cancer, 92, 1331-1346

Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Rose, L., Zollner, T. M., Krahn, T., Von Ahsen, O. (2012): **Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition.** BMC Cancer, 12, 178

Hampel, H., Frankel, W. L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J. A., Panescu, J., Fix, D., Lockman, J., Lajeunesse, J., Comeras, I., De La Chapelle, A. (2008): **Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer.** J Clin Oncol, 26, 5783-5788

Hardingham, J. E., Grover, P., Winter, M., Hewett, P. J., Price, T. J., Thierry, B. (2015): **Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer--20 Years of Progress.** Mol Med, 21 Suppl 1, S25-31

Henne-Bruns, D., Dürig, M., Kremer, B. (2008): **Duale Reihe - Chirurgie.** 3, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart (Deutschland)

Hinz, S., Hendricks, A., Wittig, A., Schafmayer, C., Tepel, J., Kalthoff, H., Becker, T., Roder, C. (2017): **Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients - a prospective study.** BMC Cancer, 17, 53

Hinz, S., Roder, C., Tepel, J., Hendricks, A., Schafmayer, C., Becker, T., Kalthoff, H. (2015): **Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer.** BMC Cancer, 15, 953

Hoffken, N., Leichsenring, J., Reinacher-Schick, A. (2015): **Clinically relevant, gender-specific differences in colorectal carcinoma (CRC).** Z Gastroenterol, 53, 782-788

Huang, X., Gao, P., Song, Y., Sun, J., Chen, X., Zhao, J., Xu, H., Wang, Z. (2015): **Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer.** BMC Cancer, 15, 202

Kaatsch, P., Spix, C. D. K., Kapitel 4), Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Waldeyer-Sauerland, M., Waldmann, A. G., Kapitel 1.1, 1.2, Anhang 5.2), Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K. K. D. D. K., Textabschnitte Zu Risikofaktoren Und Früherkennung in Kapitel 3), Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. (2018): "**Krebs in Deutschland für 2013/2014.**" URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf;jsessionid=5A773AC19770696FF51CCA9AC73DBCAB.1_cid290?__blob=publicationFile [abgerufen am: 12.01.2018]

Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H. J., Langer, C., Moore, M. J., Zalberg, J. R. (2008): **K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.** N Engl J Med, 359, 1757-1765

Kekelidze, M., D'errico, L., Pansini, M., Tyndall, A., Hohmann, J. (2013): **Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation.** World J Gastroenterol, 19, 8502-8514

Kerr, J., Anderson, C., Lippman, S. M. (2017): **Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence.** Lancet Oncol, 18, e457-e471

Kroenke, C. H., Neugebauer, R., Meyerhardt, J., Prado, C. M., Weltzien, E., Kwan, M. L., Xiao, J., Caan, B. J. (2016): **Analysis of Body Mass Index and Mortality in Patients With Colorectal Cancer Using Causal Diagrams.** JAMA Oncol, 2, 1137-1145

Kumar, A., Kennecke, H. F., Renouf, D. J., Lim, H. J., Gill, S., Woods, R., Speers, C., Cheung, W. Y. (2015): **Adjuvant chemotherapy use and outcomes of patients with high-risk versus low-risk stage II colon cancer.** Cancer, 121, 527-534

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): **S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom**, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 05.01.2018]

Le Voyer, T. E., Sigurdson, E. R., Hanlon, A. L., Mayer, R. J., Macdonald, J. S., Catalano, P. J., Haller, D. G. (2003): **Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089.** J Clin Oncol, 21, 2912-2919

Lung, M. S., Trainer, A. H., Campbell, I., Lipton, L. (2015): **Familial colorectal cancer**. Intern Med J, 45, 482-491

Macdonald, J. S. (1999): **Adjuvant therapy of colon cancer**. CA Cancer J Clin, 49, 202-219

Markl, B., Herbst, C., Cacchi, C., Schaller, T., Krammer, I., Schenkirsch, G., Probst, A., Spatz, H. (2013): **Prognostic significance of histologically detected lymph node micrometastases of sizes between 0.2 and 2 mm in colorectal cancer**. Int J Colorectal Dis, 28, 977-983

Marmol, I., Sanchez-De-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M. J. (2017): **Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer**. Int J Mol Sci, 18,

Mentges, B., Mentges, W., Grussner, R., Bruckner, R. (1988): **[Type and prognosis of loco-regional recurrence in rectal carcinoma: a follow-up study]**. Dtsch Med Wochenschr, 113, 806-810

Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., Franke, W. W. (1992): **Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies**. Am J Pathol, 140, 427-447

Namasivayam, V., Lim, S. (2017): **Recent advances in the link between physical activity, sedentary behavior, physical fitness, and colorectal cancer**. F1000Res, 6, 199

Ning, Y., Wang, L., Giovannucci, E. L. (2010): **A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies**. Obes Rev, 11, 19-30

O'connor, E. S., Greenblatt, D. Y., Loconte, N. K., Gangnon, R. E., Liou, J. I., Heise, C. P., Smith, M. A. (2011): **Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features**. J Clin Oncol, 29, 3381-3388

Ogino, S., Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Baba, Y., Kirkner, G. J., Mino-Kenudson, M., Giovannucci, E. L., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S. (2010): **Negative lymph node count is associated with survival of colorectal cancer patients, independent of tumoral molecular alterations and lymphocytic reaction**. Am J Gastroenterol, 105, 420-433

Park, J. S., Huh, J. W., Park, Y. A., Cho, Y. B., Yun, S. H., Kim, H. C., Lee, W. Y., Chun, H. K. (2014): **A circumferential resection margin of 1 mm is a negative prognostic factor in rectal cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy**. Dis Colon Rectum, 57, 933-940

Prandi, M., Lionetto, R., Bini, A., Francioni, G., Accarpio, G., Anfossi, A., Ballario, E., Becchi, G., Bonilauri, S., Carobbi, A., Cavaliere, P., Garcea, D., Giuliani, L., Morziani, E., Mosca, F., Mussa, A., Pasqualini, M., Poddie, D., Tonetti, F., Zardo, L., Rosso, R. (2002): **Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial.** *Ann Surg*, 235, 458-463

Rahbari, N. N., Aigner, M., Thorlund, K., Mollberg, N., Motschall, E., Jensen, K., Diener, M. K., Buchler, M. W., Koch, M., Weitz, J. (2010): **Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer.** *Gastroenterology*, 138, 1714-1726

Recio-Boiles, A., Cagir, B. (2018): **Cancer, Colon.** In: StatPearls, Treasure Island (FL)

Sauer, R., Liersch, T., Merkel, S., Fietkau, R., Hohenberger, W., Hess, C., Becker, H., Raab, H. R., Villanueva, M. T., Witzigmann, H., Wittekind, C., Beissbarth, T., Rodel, C. (2012): **Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years.** *J Clin Oncol*, 30, 1926-1933

Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008): **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nat Protoc*, 3, 1101-1108

Schmoll, H. J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinger, B., Van De Velde, C. J., Balmana, J., Regula, J., Nagtegaal, I. D., Beets-Tan, R. G., Arnold, D., Ciardiello, F., Hoff, P., Kerr, D., Kohne, C. H., Labianca, R., Price, T., Scheithauer, W., Sobrero, A., Tabernero, J., Aderka, D., Barroso, S., Bodoky, G., Douillard, J. Y., El Ghazaly, H., Gallardo, J., Garin, A., Glynne-Jones, R., Jordan, K., Meshcheryakov, A., Papamichail, D., Pfeiffer, P., Souglakos, I., Turhal, S., Cervantes, A. (2012): **ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making.** *Ann Oncol*, 23, 2479-2516

Shaukat, A., Dostal, A., Menk, J., Church, T. R. (2017): **BMI Is a Risk Factor for Colorectal Cancer Mortality.** *Dig Dis Sci*, 62, 2511-2517

Soeth, E., Vogel, I., Roder, C., Juhl, H., Marxsen, J., Kruger, 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, 3106-3110

Spano, J. P., Lagorce, C., Atlan, D., Milano, G., Domont, J., Benamouzig, R., Attar, A., Benichou, J., Martin, A., Morere, J. F., Raphael, M., Penault-Llorca, F., Breau, J. L., Fagard, R., Khayat, D., Wind, P. (2005): **Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival**. *Ann Oncol*, 16, 102-108

Steinert, G., Scholch, S., Koch, M., Weitz, J. (2012): **Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer**. *Langenbecks Arch Surg*, 397, 535-542

Sun, Y. F., Yang, X. R., Zhou, J., Qiu, S. J., Fan, J., Xu, Y. (2011): **Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance**. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, 1151-1173

Tan, Y., Wu, H. (2017): **The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis**. *Curr Probl Cancer*,

Taylor, D. P., Burt, R. W., Williams, M. S., Haug, P. J., Cannon-Albright, L. A. (2010): **Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach**. *Gastroenterology*, 138, 877-885

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., Nieto, M. A. (2009): **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease**. *Cell*, 139, 871-890

Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., Rougier, P. (2009): **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer**. *N Engl J Med*, 360, 1408-1417

Van Cutsem, E., Lenz, H. J., Kohne, C. H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezinek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., Van Krieken, J. H., Ciardiello, F. (2015): **Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer**. *J Clin Oncol*, 33, 692-700

Van Der Geest, L. G., Lam-Boer, J., Koopman, M., Verhoef, C., Elferink, M. A., De Wilt, J. H. (2015): **Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases**. *Clin Exp Metastasis*, 32, 457-465

Wittekind, C., Asamura, H., Sobin, L. H. (2014): **TNM atlas : illustrated guide to the TNM classification of malignant tumours**. Sechste Auflage., Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, UK

7 Anhang

7.1 Genehmigung der Ethik-Kommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens
Direktorin
Institut für Experimentelle Tumorforschung
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 17
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 500-14 191
Telefax 0431 / 500-14 195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum:

18.10.2016

AZ: A 110/99
Studienplan:

(bitte stets angeben)

Aufbau einer Krebsgewebesammlung: Molekularbiologische Charakterisierung von Tumorgenen und Tumormarkern bei soliden Tumoren mit Aufbau einer Gewebekbank – Biobank BMB-CCC

Kurzdarstellung Biobank inkl. Anlagen 1-6
Patienteninformation und Einwilligungserklärung
Zustimmungen Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Vogel, PD Dr. Ullrich

Ihr Antrag
vom:

25. August 2016 (Erweiterung/Nicht-onkologische Patienten, Aktualisierung Patienteninformation und Einwilligungserklärung)

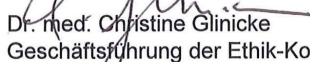
V o t u m

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem obengenannten Antrag gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein eingereichten Unterlagen beraten. Die Kommission stimmt darin überein, dass gegen die Erweiterung und Fortführung des Projektes keine Bedenken bestehen.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen des Projektes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung verbleibt bei der Projektleitung und den an dem Projekt teilnehmenden Ärzten/Mitarbeitern.


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer großer Dank geht an PD Dr. Sebastian Hinz, der mir vom Beginn bis zum Ende der Doktorarbeit stets mit seinem reichen Wissen und seiner Erfahrung mit hohem Engagement unterstützend zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Alexander Hendricks bedanken, der mir das wissenschaftliche Arbeiten und die Freude an der Forschung vermittelt hat und mich bei der Erstellung der Doktorarbeit auch zu jederzeit hilfsbereit unterstützt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Christian Röder für seine Einarbeitung in die Tumordatenbank und Hilfe bei wissenschaftlichen Fragen. Ich danke außerdem den anderen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Molekulare Onkologie des Instituts für Experimentelle Tumorforschung, im Besonderen Bianca Zinke für ihre fachliche Arbeit.

Prof. Dr. med. Thomas Becker, Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH Kiel danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik diese Doktorarbeit zu schreiben.

Herzlichst bedanke ich mich bei meiner liebevollen Familie sowie meinen Freunden für die moralische und fachliche Unterstützung. Ohne meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und allzeit helfend beigestanden haben, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Meinem Bruder danke ich zudem für seine kompetente Hilfe auch bei medizinischen Fragen.

Insbesondere meinem Ehemann danke ich von Herzen für seine Unterstützung, den Rückhalt zu jeder Zeit und für die Motivation zum Fertigstellen dieser wissenschaftlichen Arbeit.

9 Publikationen

Publikationen:

Hendricks, A., **Eggebrecht, G.L.**, Bernsmeier A., Geisen A, Dall K, Trauzold A, Becker T, Kalthoff H, Schafmayer C, Röder C, Hinz S (2018). Identifying patients with an unfavorable prognosis in early stages of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(44): 27423-27434. doi:10.18632/oncotarget.25384

Postervorstellungen/ Kongressvorträge:

Hendricks, A., Bernsmeier, A., Röder, C., **Eggebrecht, G.**, Schafmayer, C., Becker, T., Hinz, S.: Liquid Biopsies- eine quantitative multimarker PCR zur Stratifizierung einer Risikopopulation bei Kolorektalkarzinompatienten. Postervorstellung 199. Norddeutscher Chirurgenkongress, Osnabrück 2017.

Hendricks, A., Bernsmeier, A., **Eggebrecht, G.**, Schafmayer, C., Becker, T., Röder, C., Hinz, S.: Liquid biopsies – eine quantitative multimarker PCR zur Stratifizierung einer Risikopopulation bei Kolorektalkarzinompatienten. Vortrag Günther-Haenisch-Preisträgersitzung 200. Norddeutscher Chirurgenkongress, Hamburg 2017.

Hendricks, A., **Eggebrecht, G.**, Röder, C., Schafmayer, C., Tepel, J., Becker, T., Hinz, S.: Detection of circulating tumour cells by a novel RT-qPCR identifies patients with an unfavourable prognosis in UICC I and II stages of colorectal cancer. Postervorstellung Deutscher Krebskongress, Berlin 2018.